

PCR-DGGE 研究沸石植生混凝土微生物群落结构

张政科^{1,2}, 魏清伟², 颜智勇^{1*}, 龙焰³, 岳衡⁴, 许振成² (1.湖南农业大学环境工程系, 湖南长沙 410128; 2.环境保护部华南环境科学研究所, 广东广州 510655; 3.暨南大学环境工程系, 广东广州 510632; 4.南华大学市政工程系, 湖南衡阳 412001)

摘要: 采用 PCR-DGGE 技术研究了滨水区和非滨水区沸石植生混凝土内部微生物群落结构, 结果表明: 沸石植生混凝土内部微生物多样性指数和物种丰度值均很高, 滨水区和非滨水区植生混凝土内部微生物多样性指数与物种丰度总体持平, 但是各部分微生物丰度差异明显. 滨水区微生物丰度值根部 5~10cm > 根部 10~15cm > 沸石表面生物膜. 非滨水区微生物丰度值沸石表面生物膜 > 根部 5~10cm > 根部 10~15cm. 基因测序结果和系统发育树分析可知, 滨水区和非滨水区以及沸石混凝土内各部分之间优势菌种各不相同, 在滨水区, 沸石表面微生物膜中优势菌种为丙酸杆菌、都柏林克罗诺杆菌和葡萄球菌属, 根部 5~10cm 中优势菌种为黄杆菌和沙门氏菌属, 根部 10~15cm 中优势菌种为慢生根瘤菌属; 非滨水区, 沸石表面微生物膜中优势菌种为芽孢杆菌和红假单胞菌属, 根部 5~10cm 中优势菌种为沙门氏菌、微球菌亚目的 *Agromyces* 和酸杆菌属, 根部 10~15cm 中优势菌种为沙门氏菌属.

关键词: PCR-DGGE; 沸石; 植生混凝土; 微生物群落结构

中图分类号: X522 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2013)09-1615-07

Research on community composition in zeolite-vegetation-concrete by PCR-DGGE. ZHANG Zheng-ke¹, GUO Qing-wei², YAN Zhi-yong^{1*}, LONG Yan³, YUE Heng⁴, XU Zhen-cheng² (1.Department of Environmental Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Guangzhou 510655, China; 3.Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 4.Municipal Engineering, University of South China, Hengyang 412001, China). *China Environmental Science*, 2013,33(9): 1615~1621

Abstract: The microbial community composition in zeolite-vegetation-concrete which was grown in waterfront and embankment was investigated in this study with PCR-DGGE technology. The results showed that: Shannon diversity index and species abundance value of microbial community in the system were high, and the community composition in each section of the zeolite-vegetation-concrete were very different depending on the depth. The order of species abundance value grew in waterfront of zeolite-vegetation-concrete was as followed (from high to low): rhizosphere soil (depth:5~10cm) > rhizosphere soil (depth:10~15cm) > zeolite surface biofilm, however, the order of species abundance value grew in embankment was very different from the order of waterfront section, which was zeolite surface biofilm > rhizosphere soil (depth:5~10cm) > rhizosphere soil (depth:10~15cm). Phylogenetic analysis revealed that, the pre-dominant species in zeolite-vegetation-concrete were different in each section. In waterfront section, the pre-dominant species in zeolite surface biofilm were *Propionibacterium* sp., *Cronobacter dublinensis* and *Staphylococcus epidermidis*, then *Flavobacterium* sp. and *Salmonella* sp. were the major microbe in rhizosphere soil with depth of 5~10cm, and *Bradyrhizobium* sp. was found to be the pre-dominant bacteria in rhizosphere soil with depth of 10~15cm. In embankment section, the pre-dominant microbe in zeolite surface biofilm were *Paenibacillus* sp. and *Rhodopseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Agromyces* sp. and *Acidobacteria* sp. were the major microbe group in rhizosphere soil with depth of 5~10cm, and *Salmonella* sp. was found to be the pre-dominant bacteria in rhizosphere soil with depth of 10~15cm.

Key words: PCR-DGGE; zeolite; vegetation concrete; microbial community structure

收稿日期: 2013-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(50908095); 广东省自然科学基金(9451065501002521); 国家公益性科研院所资助项目(ZX-200712-29)

* 责任作者, 副教授, zhyyan111@163.com

随着城市的发展,城市河流及其生态系统产生了巨大变化^[1],混凝土、砌石等硬质体护坡方式被广泛应用于城市河道,导致水、河道与植被分隔,阻隔了水体与土体的交换和循环,使很多河岸的植物丧失了生存空间,水生动物失去了生存和避难场所^[2-5].这种硬质体的护坡方式,只考虑了护堤,忽视了河道的生态环境效应,日渐被人们摒弃,建设生态型堤岸已成为大势所趋.

沸石植生混凝土以沸石制成较高强度的多孔混凝土骨架,并在其连通的孔隙内灌注泥土等供植物生长,既具有混凝土防护边坡的功能,又有绿化环境、改善生态景观和净化水质的功能.植生混凝土等生态护岸方法在国外已有较广泛研究^[6-8],近年来,国内也陆续开展了植生混凝土的研究工作^[9-10],并运用于诸多河道及湖泊的整治.沸石植生混凝土是本课题组开发的针对富营养化河流及湖泊的护坡材料,它由具高效氨氮吸附性能的沸石、土壤、植物和微生物组成,构成一个“微型人工湿地”系统,对水体中氨氮具有很高的处理效率.但对这个系统内微生物群落缺乏足够的认识.

PCR-DGGE 技术是目前研究环境微生物多样性及种群动态变化的有效手段^[11],Muyzer 等^[12]1993 年首次将其运用于环境微生物群落结构的研究,PCR-DGGE 技术已广泛应用于人工湿地、江河沉积物、土壤、活性污泥等环境微生物群落结构的研究^[13-16].本研究利用 PCR-DGGE 技术,以成型的沸石植生混凝土为研究对象,取沸石表面生物膜、孔隙土壤(取样深度 5~10cm)及根区土(10~15cm)三层,考察了滨水区与非滨水区的微生物群落结构特征,从而为揭示植生混凝土高效脱氮机理提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用沸石植生混凝土为研究对象,2011 年 9 月,以沸石为骨料制成多孔混凝土,再通过降碱、灌注适生材料(主要成分为塘泥、有机肥、缓释肥)等工序,最后种植百喜草,待生长 10 个月,于 2012 年 7 月选取其中长势良好的植生混凝土用

于模拟河道中试研究.

沸石植生混凝土均重 3.2kg,其中骨料(沸石)质量为 2kg,泥、水及植物质量为 1.2kg.基本构造:下部为高 10cm,直径 20cm 的圆柱形混凝土构件,上部为长势良好的百喜草(株高 30~60cm),植物根系穿透多孔混凝土构件,根长约 30cm,如图 1 所示.

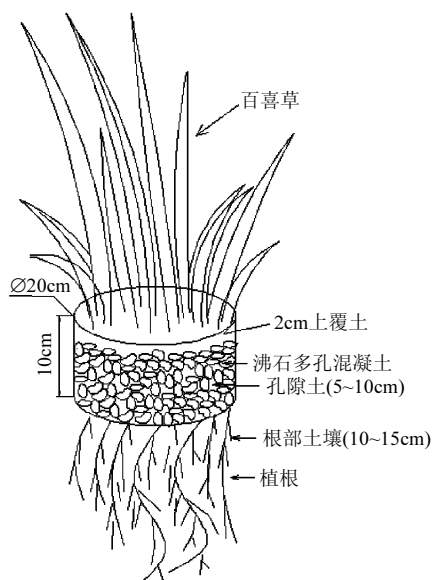


图 1 沸石植生混凝土模型

Fig.1 The model of zeolite-vegetation-concrete

1.2 样品采集

于 2012 年 8 月采集位于模拟河道中的沸石植生混凝土样品,分别取浅水区(滨水区)和堤岸(非滨水区)的沸石植生混凝土:沸石(刮取表面微生物膜)、孔隙土壤(采样深度为 5~10cm)、根区土壤(采样深度为 10~15cm)共 6 个样品,对上述样品进行 PCR-DGGE 分子实验研究,所有样品经冷冻干燥仪-80℃冻干后,研磨后过 100 目塞,样品分装放在-20℃下保存待分析^[17].

1.3 主要仪器及试剂

仪器:EPS501 型电泳仪(瑞典),ImageQuant 350(美国 GE Health),Eppdorf 5331 型 PCR 仪(德国),SIGMA 3K30 台式高速冷冻离心机(德国),BECKMAN J-6B 冷冻离心机(美国 BECKMAN 公司),DU640 核酸/蛋白分析仪(美国 BECKMAN

公司),The Dcode™ Universal Mutation system 基因突变检测系统(美国 Bio-Rad 公司).试剂: Goldview 染料购自广州东盛生物公司;DGGE 所用试剂均为 Amresco 或 BBI 分装,购自上海生工公司.

1.4 实验方法

1.4.1 样品总 DNA 提取 向样品中加入 5mLCTAB 提取液(100mmol/LTris·Cl, 100mmol/L EDTA-Na₂, 200mmol/LNaCl, 2%CTAB, pH 8.0) 中,37℃振荡 45min.加入 20%SDS 的至终浓度为 2%,65℃水浴 2h.12000r/min,10min 离心,收集上清.上清用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,加入终浓度 1/10 体积的醋酸钠(pH5.2)及 0.6 倍体积异丙醇,4℃沉淀 1h.12000r/min 冷冻离心 20min,收集沉淀,用 70%乙醇洗涤 2 次,晾干后溶

于 50μl TE(pH8.0).测定提取的总 DNA 浓度,用 TE 将其稀释至 100ng/μL.

1.4.2 16S rRNA 基因 V3 区扩增 所用引物为细菌 16SrDNA V3 高变区 F₃₅₇ 和 R₅₁₈(表 1),反应体系为 50μL 总体积,ddH₂O 41.25μL,10×Buffer (含 2.0mmol/L MgCl₂) 5μL,dNTP (10mmol/L) 1μL,F₃₅₇-GC(10μmol/L) 1μL,R₅₁₈(10μmol/L) 1μL, Taq 酶(5U/μL) 0.25μl,模板 DNA 2μL.设置阴性对照.

反应程序:94℃ 5min 预变性;20Cycles (94℃ 40s;65℃ 30s;72℃ 30s);15Cycles(94℃ 40s;55℃ 30s;72℃ 30s);72℃延伸 10min.

取 PCR 产物各 2μL,1.5% 琼脂糖凝胶加 5%Goldview 染液,1×TAE 缓冲液,120V 稳压电泳 25min,凝胶成像系统拍摄电泳图谱,检查扩增效果.

表 1 细菌 16S rDNA V3 区引物
Table 1 16S rDNA V3fragment primers of bacterium

引物	序列	扩增片段大小
F ₃₅₇ -GC	5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3'	233bp 左右
R ₅₁₈	5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'	

1.4.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 采用 D-Code 突变检测系统对滨水区、非滨水区的 6 个样品进行 DGGE 分析.所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%(丙稀酰胺:双丙稀酰胺=37.5:1),变性剂浓度从 40%~65%(100%的变性剂为 7mol/L 尿素,40%甲酰胺).在 70V 电压下,60℃恒温,1×TAE 中电泳 14h.电泳完毕后,用超纯水冲洗胶,然后将胶放进含 5%Goldview 的染液中,置于摇床上染色 30min 后,凝胶成像系统拍摄图谱.

1.4.4 DGGE 电泳图谱分析 采用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱的泳道和条带进行识别,Tolerance 设定为 2%,Rolling Size 为 10,以达到最佳效果,分析不同样品之间可能存在的联系.用 Sorenson 配对比较相似性系数(Cs),比较不同样品 DGGE 指纹图谱的相似性,计算公式为:

$Cs=2j/(a+b)$ (1)

式中:a、b 表示两个比较对象中的 DNA 条带数目;j 表示 a 和 b 中相同的条带数量.

多样性指数(H),物种丰度(S)等指标被用来比较各个样品的细菌多样性.公式如下:

$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N)$ (2)

式中:p_i 是某个样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率;S 是某个样品中所有条带数目总和.

1.4.5 切胶测序和系统发育树分析 选取具有代表性的条带,切下完整的目标 DGGE 条带,装入 1.5mL 离心管中备用.回收 DGGE 条带中的目标 DNA,并以该 DNA 为模板梯度稀释后做 PCR 扩增,并在广东省微生物研究所完成基因测序.测序完成后,使用 GenBank 的 BLAST 程序将目标序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对,获得各个

序列的同源性信息,并采用 ClustalX2.11 和 MEGA4.1 软件构建系统发育树.

品的物种丰度和多样性指数差别不大,2[#]样品的多样性指数和物种丰度最高,4[#]样品最低.

2 结果

2.1 样品 DGGE 图谱

采用 D-Code 突变检测系统对滨水区、非滨水区的 6 个样品进行 DGGE 分析.图 2 为不同样品的 DGGE 指纹图及不同位置的切胶编号.图 2 右边为 DGGE 图谱条带分布和相对强度示意.

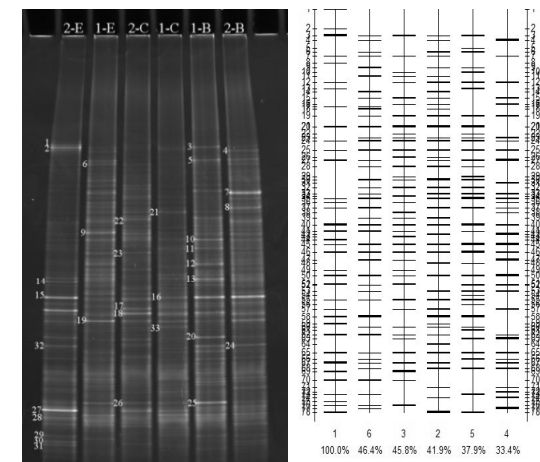


图2 样品的 DGGE 图谱及不同位置的切胶编号

Fig.2 DGGE electrophoretic image of different samples and plastic cutting number of different locations

2-E(滨水区沸石表明生物膜);1-E(堤岸沸石表面生物膜);2-C(滨水区根部);1-C(堤岸根部);1-B(堤岸孔隙土);2-B(滨水区孔隙土)

2.2 微生物群落相似性和多样性分析

2.2.1 微生物群落相似性分析 依据建立的泳道条带识别图(图2),可以比对各个泳道拥有的条带,从而计算出各个样品间的相似性系数 Cs.各样品相似系数如表 2 所示,1[#]和 4[#]相似度最低,仅为 33.4%,2[#]和 6[#]相似度最高,达到了 67.2%,说明滨水区沸石表面生物膜和堤岸根部 2 个样品中微生物存在明显的差异,而堤岸沸石表面生物膜和滨水区孔隙土这 2 个样品的微生物群落结构相似程度比较高.

2.2.2 物种丰度和微生物多样性 根据 Quantity One 软件中得到的数据计算各样品的 Shannon 指数 (*H*) 结果如表 3 所示,其中,6 个样

表 2 不同处理样品相似性系数 Cs(%)

Table 2 The similarity coefficients of different samples(%)

泳道	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]
1 [#]	100	41.9	45.8	33.4	37.9	46.4
2 [#]		100	47.3	49.5	56.5	67.2
3 [#]			100	41.7	45.5	46.5
4 [#]				100	45.1	44.2
5 [#]					100	57.3
6 [#]						100

表 3 不同样品中细菌多样性指数(*H*) 和物种丰度(*S*)

Table 3 The Shannon index and species abundance value of different samples

编号	泳道	Shannon index(<i>H</i>)	物种丰度(<i>S</i>)
1	滨水区生物膜	3.473819	36
2	堤岸生物膜	3.719809	45
3	滨水区根部	3.622911	41
4	堤岸根部	3.477759	35
5	堤岸孔隙土	3.646018	41
6	滨水区孔隙土	3.700893	44

2.3 微生物族群归属分析

采用 Quantity One 分析软件,通过 UPGMA 算法(非加权平均算法)对 6 个样品进行聚类分析.

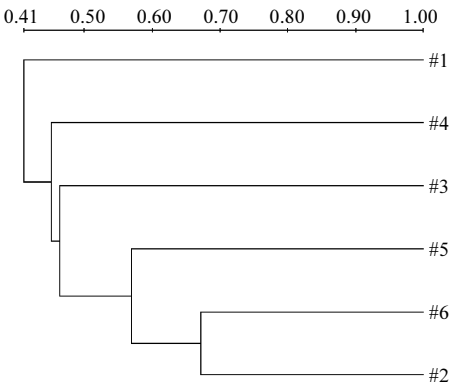


图3 样品的 DGGE 聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of bacterial community of different samples based on the DGGE banding patterns

从聚类分析结果(图 3)可以看出 2[#]~6[#]样品聚在一簇,1[#]样品单独为一簇,两簇之间相似度较低,相似性仅为 0.41.其中,2[#]与 6[#]样品中微生物族群相似性最高为 0.67.

2.4 基因测序结果及系统进化树分析

选取图 2 中具代表性的条带,对编号为 1、7、9、15、16、18、19、20、25、27 的条带进行测序,将所得到的序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对,获得各个序列的同源性信息,构建了系统发育树(图 4).系统进化树中相应种属微生物代表了沸石植生混凝土中较明亮的条带,为沸石植生混凝土

内部的优势菌群^[18].它们分别与 *Staphylococcus epidermidis* (葡萄球菌属的 *epidermidis*)、*Flavobacterium* (黄杆菌属)、*Paenibacillus* (芽孢杆菌目 *Paenibacillaceae* 科 *Paenibacillus* 属)、*Cronobacter dublinensis*(都柏林克罗诺杆菌)、*Salmonella*(沙门氏菌属)、*Bradyrhizobium* sp.(慢生根瘤菌属)、*Rhodopseudomonas* sp. (红假单胞菌属)、*Agromyces*(微球菌亚目的 *Microbacteriaceae* 科的 *Agromyces* 属)、*Acidobacteria*(酸杆菌属)、*Propionibacterium* (丙酸杆菌属)具有较高的序列相似度.

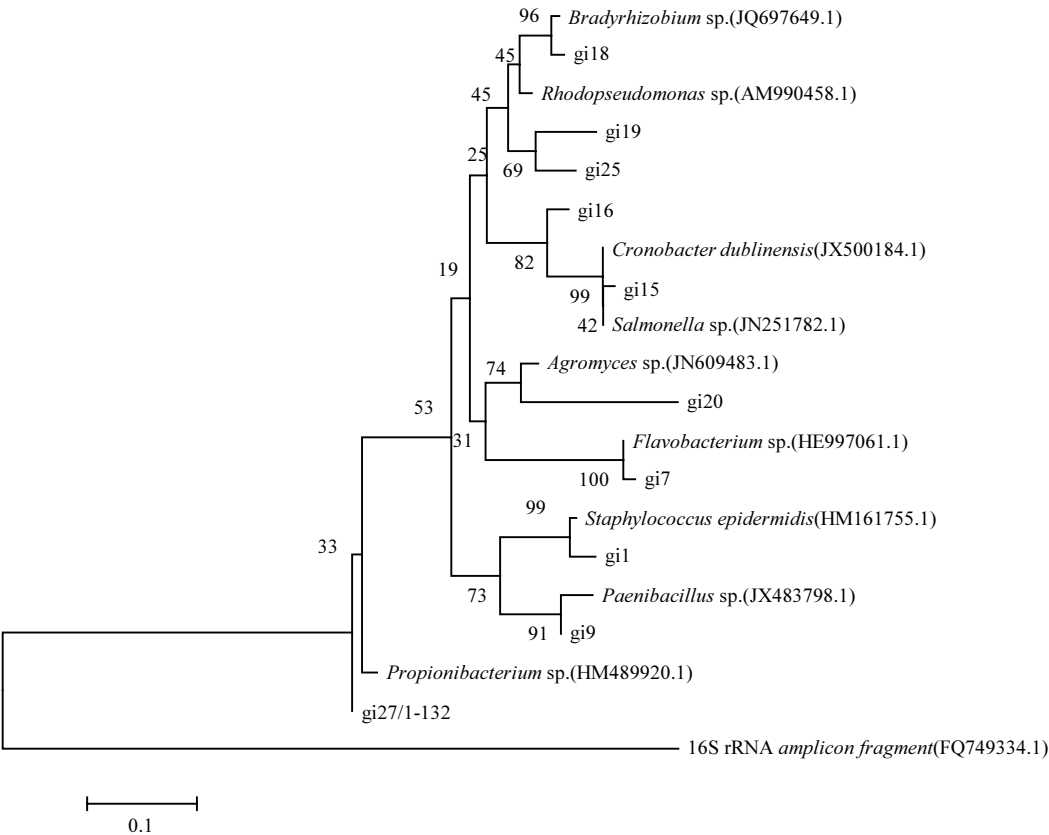


图 4 沸石植生混凝土中细菌的系统进化树分析

Fig.4 Phylogenetic tree of various bacteria in zeolite-vegetation-concrete

3 讨论

3.1 DGGE 图谱分析

从电泳结果(图2)可以看出,沸石植生混凝土中生物多样性指数很高,但各部分条带数目和优

势菌群存在一定的差异.其中,沸石表面生物膜(即 1[#]和 2[#]泳道)和孔隙土壤(即 5[#]和 6[#]泳道)样品中亮带较多,根部 10~15cm(即 3[#]和 4[#]泳道)亮带较少;堤岸根部 10~15cm(4[#]泳道)样品中细菌种类最少,堤岸沸石表面生物膜(2[#]泳道)

样品中种类最多,说明微生物群落结构随着环境条件的变化而变化^[18],微生物主要活跃在 10cm 以上表层土壤,且微生物附着于沸石表面生长旺盛,而到根部 10~15cm 深度微生物丰度和多样性均有所下降。

3.2 微生物丰度与多样性分析

由表 3 可知,沸石植生混凝土系统内部微生物丰度值很高,样品中产生的条带最少为 35 条,最多为 45 条,这比陈永华等^[19]研究人工湿地微生物多样性的结果(样品中平均为 25 个条带)要高出很多。滨水区和堤岸的植生混凝土内部微生物多样性指数及物种丰度总体持平,但是微生物在各层的分布情况不同,滨水区微生物多样性指数及物种丰度值:孔隙土(根部 5~10cm)>根部(10~15cm)>沸石表面生物膜;堤岸微生物多样性指数及物种丰度值:沸石表面生物膜>孔隙土(根部 5~10cm)>根部(10~15cm)。这是由于系统内沸石、植物、水等综合因素所致。沸石表面能供微生物附着,提供一个载体,利于微生物挂膜生长;植物根系能够泌氧^[20-23],增加孔隙土(根部 5~10cm)和根部(10~15cm)的溶解氧;而水有两方面作用:一方面是水的传质作用,相比岸上在水溶液中微生物能更快吸收水中的营养元素,这有利于微生物的生长,另一方面是溶解氧的影响,在水面下溶解氧要低于岸上,不利于好氧微生物生长。由于水对于沸石植生混凝土系统内的微生物生长起着正反两方面作用,水的传质作用,使得滨水区微生物丰度要高于非滨水区;而溶解氧的影响却使滨水区微生物要低于非滨水区,但是植物根系的泌氧作用使这方面的影响在根区(孔隙土和根部 10~15cm)削弱。所以滨水区根部微生物丰度及多样性指数要高于非滨水区,而在沸石表面生物膜中微生物分布相反。

3.3 基因测序与系统发育树分析

由基因测序结果可知,滨水区和非滨水区以及它们内部各部分间的微生物构成各不相同。在滨水区沸石混凝土中,沸石表面生物膜中优势菌种为丙酸杆菌、都柏林克罗诺杆菌和葡萄球菌属,其中丙酸杆菌属厌氧菌,能进行丙酸型发酵分解有机物,是厌氧污泥中常见细菌^[24];孔隙土(根

部 5~10cm)中优势菌种为黄杆菌和沙门氏菌属,其中黄杆菌^[25]是一种典型的反硝化细菌;根部 10~15cm 中优势菌种为慢生根瘤菌属^[26],它属革兰氏阴性菌,利用铵盐、硝酸盐等作为氮源,能固定大气氮到结合态氮(氨)供寄主植物所利用;非滨水区沸石混凝土中,沸石表面微生物膜中优势菌种为芽孢杆菌和红假单胞菌属,孔隙土(根部 5~10cm)中优势菌种为沙门氏菌、微球菌亚目的 *Agromyces* 和酸杆菌属,根部 10~15cm 中优势菌种为沙门氏菌属,其中假单胞杆菌^[27]和芽孢杆菌属^[28]被证明具有反硝化作用,它们广泛存在于自然界中,是污水处理中不可缺少的微生物^[29]。这些微生物均使得沸石植生混凝土具有良好的净化水质功能,特别是脱氮作用,沸石植生混凝土内部能够稳定进行反硝化反应。

4 结论

4.1 沸石植生混凝土内部微生物丰度值很高,在非滨水区微生物丰度由高到低排列为:沸石表面生物膜>根部 5~10cm>根部 10~15cm;滨水区:根部 5~10cm>根部 10~15cm 沸石表面生物膜。

4.2 滨水区、非滨水区及沸石植生混凝土各层微生物群落差异明显,相似度不高,各样品间相似性系数在 33.4%~67.2%之间。

4.3 滨水区和非滨水区沸石植生混凝土内部物种多样性指数及丰度总体持平,但局部差异明显。

4.4 基因测序结果显示,沸石植生混凝土中优势菌种为葡萄球菌、黄杆菌、芽孢杆菌、都柏林克罗诺杆菌、沙门氏菌、慢生根瘤菌、红假单胞菌、微球菌亚目的 *Agromyces*、酸杆菌、丙酸杆菌属,这些微生物对沸石植生混凝土净化水质功能具有重要影响。

参考文献:

- [1] 魏清伟.南方城市河道植生混凝土护砌技术的研究 [D]. 广州:华南理工大学, 2007.
- [2] 郑天柱,周建仁,王 超.污染河道的生态修复机理研究 [J]. 环境科学, 2002,23(增刊):115-117.
- [3] De Wall L C, Large A R G, Gippel C K, et al. River and floodplain rehabilitation in Western Europe: opportunities and constraints [J]. Arch. Hydrobiol. Suppl., 1995,23(9):679-693.

- [4] 丹保宪仁.水文大循环和城市水环境代谢 [J]. 给水排水, 2002,28(6):1-5.
- [5] Nilsson C, Berggren K. Alterations of riparian ecosystems caused by river regulation [J]. Bioscience, 2000,50(9):783-793.
- [6] 玉井.绿化コンクリートに関する研究 [A]. セメントコンクリート論文集, No.48:866-871.
- [7] 毛鑫.浅谈绿化混凝土 [J]. 中国水利, 2004,(19):57-58.
- [8] 吕锡武,蒋彬,李先宁.生态混凝土及其护坡技术的应用展望 [C]. 中国水环境污染控制与生态修复技术高级研讨会, 2004,2:147-151.
- [9] 董建伟,肖新民.多孔连续型绿化混凝土主要特性研究 [J]. 中国水利, 2003(6):62-63.
- [10] 黄剑鹏,胡勇有.植生型多孔混凝土的制备与性能研究 [J]. 混凝土 2011,(2):101-104.
- [11] 柳栋升,王海燕,杨慧芬,等.PCR-DGGE 研究亚硝化-电化学生物反硝化全自养脱氮工艺细菌多样性 [J]. 环境工程学报, 2012,6(9):3349-3355.
- [12] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993,59:695-700.
- [13] 郭飞宏,郑正,张继彪.PCR-DGGE 技术分析塔式蚯蚓生态滤池微生物群落结构 [J]. 中国环境科学, 2011,31(4):597-602.
- [14] Chu H, Fujii T, Morimoto S, et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007,73(2):485-491.
- [15] Liu Xinchun, Zhang Yu, Yang Min, et al. Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007,4(19):60-66.
- [16] Fang H H P, Zhang T, Liu Y. Characterization of anacetate-degrading sludge without intracellular accumulation of polyphosphate and glycogen [J]. Water Research, 2002,36(3): 3211-3218.
- [17] 俞毓馨,吴国庆,孟宪庭.环境工程微生物检验手册 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990:63-79.
- [18] 吕晶华,马挺,郑先强,等.PCR-DGGE 技术解析 A2/O 工艺好氧单元中微生物群落结构 [J]. 环境工程学报, 2012,6(6): 1907-1914.
- [19] 陈永华,吴晓芙,陈明利,等.人工湿地污水处理系统中植物套种模式根际微生物多样性研究 [J]. 环境科学, 2011,32(8): 2397-2402.
- [20] 吴振斌,贺锋,程旺元.极谱法测定无氧介质中根系氧气输导 [J]. 植物生理学报, 2000,26(3):177-180.
- [21] 黄丹萍,贺锋.湿地植物根系泌氧研究 [J]. 环境科学与技术, 2009,32(12):172-176.
- [22] Arenovski A L, Howes B L. Lacunal allocation and gas transport capacity in the salt-marsh grass *spartina-alterniflora* [J]. Oecologia, 1992,90(3):316-322.
- [23] Armwtrong W. Aeration in higher plants [J]. Advance in Botanical Research, 1979,7:236-332.
- [24] 刘和,刘晓玲,邱坚,等.C/N 对污泥厌氧发酵产酸类型及代谢途径的影响 [J]. 环境科学学报, 2010,30(2):340-346.
- [25] 郑喜春,郭晓军,姚娜,等.反硝化芽孢杆菌的筛选鉴定及反硝化特性 [J]. 生态学杂志, 2012,31(6):1447-1452.
- [26] 李友国,李杰,刘墨青,等.导入 *dctABD* 和 *parCBA/DE* 基因提高大豆慢生根瘤菌固氮效率和稳定性的研究 [J]. 遗传学报, 2000,(8):742-750.
- [27] 刘晖,孙彦富,周康群,等.PCR-DGGE 法研究 Sludge bio-membrane(SB)系统中反硝化聚磷菌的变化 [J]. 中南大学学报(自然科学版), 2011,42(4):1167-1174.
- [28] 李卫芬,傅罗琴,邓斌,等.1 株好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究 [J]. 环境科学, 2011,32(8):2403-2408.
- [29] 郭飞宏,郑正,张继彪.PCR-DGGE 技术分析塔式蚯蚓生态滤池微生物群落结构 [J]. 中国环境科学, 2011,31(4):597-602.

致谢: 本实验样品的预处理过程中得到了东江水环境研究中心(惠州站)所有工作人员的支持,在论文修改过程中,得到了阎佳博士的悉心指点,在此表示感谢。

作者简介: 张政科(1988-),男,湖南长沙人,硕士研究生,主要从事水污染控制与水环境修复研究.发表论文 1 篇。