

ISSN 1000-0933

CN 11-2031/Q

生态学报

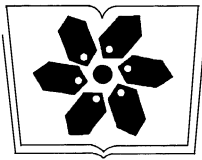
Acta Ecologica Sinica



第 32 卷 第 22 期 Vol.32 No.22 **2012**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 22 期

2012 年 11 月 (半月刊)

目 次

CO ₂ 浓度和温度升高对噬藻体 PP 增殖的联合作用	牛晓莹,程 凯,荣茜茜,等 (6917)
1956—2009 年内蒙古苏尼特左旗荒漠草原的降水格局	陈 军,王玉辉 (6925)
两个污水处理系统的能值与经济综合分析	李 敏,张小洪,李远伟,等 (6936)
退化草地阿尔泰针茅种群个体空间格局及关联性	赵成章,任 珩 (6946)
地表覆盖栽培对雷竹林凋落物养分及其化学计量特征的影响	刘亚迪,范少辉,蔡春菊,等 (6955)
福州酸雨区次生林中台湾相思与银合欢叶片的 12 种元素含量	郝兴华,洪 伟,吴承祯,等 (6964)
“雨花露”水蜜桃主要害虫与其捕食性天敌的关系	柯 磊,施晓丽,邹运鼎,等 (6972)
大兴安岭林区 10 小时时滞可燃物湿度的模拟	胡天宇,周广胜,贾丙瑞 (6984)
陕北风沙区不同植被覆盖下的土壤养分特征	李文斌,李新平 (6991)
南方型杨树人工林土壤呼吸及其组分分析	唐罗忠,葛晓敏,吴 麟,等 (7000)
黑河下游土壤水盐对生态输水的响应及其与植被生长的关系	鱼腾飞,冯 起,刘 蔚,等 (7009)
树木胸径大小对树干液流变化格局的偏度和时滞效应	梅婷婷,赵 平,倪广艳,等 (7018)
外来植物紫茎泽兰入侵对土壤理化性质及丛枝菌根真菌(AMF)群落的影响	于文清,刘万学,桂富荣,等 (7027)
基于 Landsat TM 的热带精细地物信息提取的模型与方法——以海南岛为例	王树东,张立福,陈小平,等 (7036)
雪被去除对川西高山冷杉林冬季土壤水解酶活性的影响	杨玉莲,吴福忠,杨万勤,等 (7045)
不同土壤水分处理对水稻光合特性及产量的影响	王唯逍,刘小军,田永超,等 (7053)
木蹄层孔菌不同居群间生长特性、木质素降解酶与 SRAP 标记遗传多样性	曹 宇,徐 晔,王秋玉 (7061)
加拿大一枝黄花入侵对土壤动物群落结构的影响	陈 雯,李 涛,郑荣泉,等 (7072)
间作对玉米品质、产量及土壤微生物数量和酶活性的影响	张向前,黄国勤,卞新民,等 (7082)
接种 AM 真菌对玉米和油菜种间竞争及土壤无机磷组分的影响	张宇亭,朱 敏,钱岩相注,等 (7091)
大亚湾冬季不同粒级浮游生物的氮稳定同位素特征及其与生物量的关系	柯志新,黄良民,徐 军,等 (7102)
太湖水华期间有毒和无毒微囊藻种群丰度的动态变化	李大命,叶琳琳,于 洋,等 (7109)
锌胁迫对小球藻抗氧化酶和类金属硫蛋白的影响	杨 洪,黄志勇 (7117)
基于国家生态足迹账户计算方法的福建省生态足迹研究	邱寿丰,朱 远 (7124)
能源活动 CO ₂ 排放不同核算方法比较和减排策略选择	杨喜爱,崔胜辉,林剑艺,等 (7135)
基于生境等价分析法的胶州湾围填海造地生态损害评估	李京梅,刘铁鹰 (7146)
县级生态资产价值评估——以河北丰宁县为例	王红岩,高志海,李增元,等 (7156)
专论与综述	
丛枝菌根提高宿主植物抗旱性分子机制研究进展	李 涛,杜 娟,郝志鹏,等 (7169)
城市土壤碳循环与碳固持研究综述	罗上华,毛齐正,马克明,等 (7177)
基于遥感的光合有效辐射吸收比率(FPAR)估算方法综述	董泰锋,蒙继华,吴炳方 (7190)
光衰减及其相关环境因子对沉水植物生长影响研究进展	吴明丽,李叙勇 (7202)
浮游动物化学计量学稳态性特征研究进展	苏 强 (7213)
研究简报	
2010 年两个航次獐子岛海域浮游纤毛虫丰度和生物量	于 莹,张武昌,张光涛,等 (7220)
基于熵值法的我国野生动物资源可持续发展研究	杨锡涛,周学红,张 伟 (7230)
残落物添加对农林复合系统土壤有机碳矿化和土壤微生物量的影响	王意锟,方升佐,田 野,等 (7239)
人工湿地不同季节与单元之间根际微生物多样性	陈永华,吴晓芙,张珍妮,等 (7247)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 338 * zh * P * ¥70.00 * 1510 * 36 * 2012-11



封面图说:水杉农田防护林中的小麦熟了——水杉曾广泛分布于北半球,第四纪冰期以后,水杉属的其他种类全部灭绝,水杉却在中国川、鄂、湘边境地带得以幸存,成为旷世奇珍,野生的水杉是国家一级保护植物。由于水杉耐水,适应力强,生长极为迅速,其树干通直挺拔,高大秀颀,树冠呈圆锥形,姿态优美,自发现后被人们在中国南方广泛种植,不仅成为了湖边、道路两旁的绿化观赏植物,更成为了农田防护林的重要树种。此图中整齐划一的水杉防护林像忠实的哨兵一样,为苏北农村即将成熟的麦田站岗。

彩图提供:陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201110111491

陈永华, 吴晓芙, 张珍妮, 蒋丽娟, 李科林, 柳俊. 人工湿地不同季节与单元之间根际微生物多样性. 生态学报, 2012, 32(22): 7247-7254.

Chen Y H, Wu X F, Zhang Z N, Jiang L J, Li K L, Liu J. Seasonal changes in microbial diversity in different cells of a wetland system constructed for municipal sewage treatment. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(22): 7247-7254.

人工湿地不同季节与单元之间根际微生物多样性

陈永华, 吴晓芙*, 张珍妮, 蒋丽娟, 李科林, 柳俊

(中南林业科技大学 环境科学与工程研究中心, 长沙 410004)

摘要: 采用选择性平板培养基法和 PCR-DGGE 法比较研究了三级垂直潜流人工湿地污水处理系统中不同季节与单元之间根际微生物数量与多样性, 结果表明, 随着“秋-冬-春-夏”的季节的变化, 2 种方法测定的微生物数量都呈现“高-低-高”季节性变化现象, 但选择性平板培养基法显示秋季数量最多, PCR-DGGE 法显示夏季数量最多。从三级处理单元的 1—3 级, 两种方法测定的微生物数量都呈现“低-高-低”的规律。除土样 11 外, 其余相同季节的土样均出现聚集在同一个分支下。得到的 4 个差异序列 (YP1—YP4), 经 BLAST 比较, 分别找到同源性最近的已知类群, 分别为肠杆菌属、弧菌、欧文氏菌、产酸克雷伯菌。BLASTX 比较发现 YP1 与细菌代谢分解有机物有关; YP2 蜡样芽胞杆菌生命活动相关, 具有解磷的作用; YP3 与 APOE 载脂蛋白 e 功能相似, 参与细菌的分解代谢; YP4 功能可能与细菌去氮有关。

关键词: 人工湿地; 根际微生物; 选择性平板培养基法; PCR-DGGE; BLAST 分析

Seasonal changes in microbial diversity in different cells of a wetland system constructed for municipal sewage treatment

CHEN Yonghua, WU Xiaofu*, ZHANG Zhenni, JIANG Lijuan, LI Kelin, LIU Jun

Research Center of Environment Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: Selective plating medium and PCR-DGGE techniques were applied to analyze the seasonal changes in the number and diversity of micro-organisms in the rhizosphere of three sequenced cells in a vertical subsurface-flow wetland system constructed for municipal sewage treatment. The relationship between the community structures of the microorganisms and their functions in removal of the organic pollutants was also analyzed.

The results obtained from the two applied methods showed that with the seasonal changes in the sequence of autumn-winter-spring-summer, the number of the micro-organisms displayed a general “up-down-up” pattern. The largest number of microorganisms from the rhizosphere in three treatment cells detected by the selective plating medium method was in the autumn while that by the PCR-DGGE techniques was in the summer. Correlation analysis indicated that the seasonal change in temperature was the main factor that determined the observed pattern by affecting the growth of the microorganisms. In a given season, the number of micro-organisms obtained from the two applied methods displayed a different pattern in the three sequenced treatment cells. Towards the flow direction in the sewage treatment process, the number of micro-organisms increased from the first cell to the second cell and then decreased in the third cell, accordingly, with most of the organic pollutants being removed in the first two treatment cells.

Based on the structure comparability of the microbial community among treatment cells, all soil samples collected in the same season, except for sample no. 11, were clustered in the same branch, with all DGGE comparability values being

基金项目: 环保公益性行业科研专项 (200909066); 国家科技支撑计划项目 (2012BAC09B03); 国家林业局科技推广项目 [2010]43 号; 湖南省科技计划项目 (2012SK3167); 湖南省环境科学重点学科建设项目 (2006180)

收稿日期: 2011-10-11; 修订日期: 2012-03-07

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wuxiaofu530911@vip.163.com

higher than 20%, which can thus be classified into the same group. The DGGE spectrograms of the soil microorganisms from different seasons are different. The highest comparability value, 40%, was found in the spring, while the lowest, about 25%, was in the summer, indicating that the level of the microbial diversity was higher in the summer season under the tested conditions.

Four different sequences (YP1—YP 4) were obtained, and their closest known-origin groups were identified by BLASTX analysis as *Enterobacter* sp., *Vibrio* sp., *Erwinia* sp. and *Klebsiella oxytoca*, respectively. The BLASTX comparison tests showed that YP1 played an important role in decomposing organic matters; YP2 was found to be related to the life activities of the *Cereus Spore Bacilli* with functions in phosphate dissolution; YP3 had functions similar to the apolipoprotein e (APOE) that involved in catabolism and metabolism of micro-organisms; and YP4 had an effect on nitrogen removal subject to microbial activities.

Key Words: constructed wetlands; micro-organism of plant rhizosphere; selective plating medium culture; PCR-DGGE; BLAST analysis

在人工湿地植物根际附近分布有大量的微生物,根际微生物与根系组成了一个特殊的生态系统,其繁殖速度快、数量多、代谢能力强,对土壤有机质的分解、无机质的转化、氮的固定以及提供植物营养都具有重要作用,是维持湿地生态系统和实现生态净化功能及其物质和能量转化的重要组成部分^[1-3]。所以在分析人工湿地植物根际微生物对污染物的去除机制时,了解微生物的种群时空分布,遗传多样性,对鉴定和分离处理系统中的去污优势菌很重要^[4-5]。

目前主要用来研究人工湿地根系微生物方法有传统选择性平板培养基法和 DGGE 技术^[6],本研究通过选择性平板培养基和 PCR-DGGE 两种方法,比较并联三级串连人工垂直潜流湿地在不同季节(春夏秋冬)和不同单元(1—3 级)之间的根际微生物多样性,并分析了微生物在人工湿地各单元中落群落结构和功能的对应关系,旨在为人工湿地的改进和优化提供一定的技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2008 年开始在中南林业科技大学株洲校区污水处理系统中进行,本地区为亚热带气候。系统采用一套三级串连人工垂直潜流湿地(图 1),标记为(3-1, 3-2, 3-3),植物为美人蕉(*Canna indica*)、水葱(*Scirpus validus*)、再力花(*Thalia dealbata*)、风车草(*Cyperus alternifolius*)^[7-8]4 种植物等比例混栽,植物栽植密度为 20 cm×20 cm。每级单元床体规格为:长×宽×深=5 m×2 m×1 m,填料层为沸石。系统运行 1 a 后,于 2009 年秋季(10—12 月)、冬季(1—3 月)、2010 春季(4—6 月)、夏季(7—9 月)采用 5 点取样法在取近根区土壤,编号为:秋季 3-1,秋季 3-2,秋季 3-3,冬季 3-1,冬季 3-2,冬季 3-3,春季 3-1,春季 3-2,春季 3-3,夏季 3-1,夏季 3-2,夏季 3-3,并保存于-20℃,以备实验。

1.2 试验流程及运行管理

进水为生活区污水,污水经过水泵提升后,进入预处理单元,进行预处理,然后进入三级串连人工垂直潜流湿地处理单元,经预处理后进入潜流湿地处理单元的污水主要水质指标为:COD 108.26—125.74 mg/L; TN 39.53—44.47 mg/L; TP 2.09—2.43 mg/L。实验研究期间,水力负荷保持为 2.4 m·d,污水停留时间在试验时期内的变化范围约为 48—60 h,系统 24 h 连续运转。

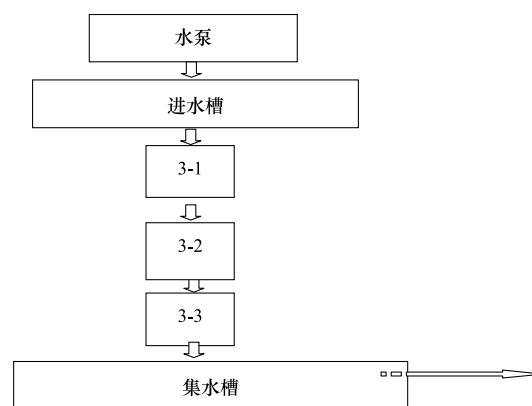


图 1 人工垂直流湿地系统流程示意

Fig. 1 Process of the vertical-flow wetland system

1.3 实验方法

1.3.1 选择性平板培养基法

采用琼脂糖固体培养基法^[9],待菌落长出后进行计数。计算公式:

$$\text{干土菌数(个/g)} = \text{菌落平均数} \times \text{稀释倍数} / \text{干土百分比}$$

1.3.2 PCR-DGGE 方法

总 DNA 的提取方法参照文献^[10],PCR 扩增反应体系 5 μL 10 $\times$ Buffer(含 Mg^{2+}),4 μL dNTP (2.5 mmol/L),2 μL 引物 GC-357F,2 μL 引物 519R,2.5 μL 模板 DN A,0.5 μL *Taq* 酶(5U/ μL),34 μL ddH₂O。PCR 程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30—35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,DGGE 电泳方法参照文献^[11]。

1.3.3 根际微生物多样性统计分析

(1)Shannon-Wiener 指数的计算公式为(1):

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i \quad (1)$$

式中, H 为 Shannon 指数; S 为每个样品的条带数目; $P_i = \frac{n_i}{N}$, n_i 为第 i 个种的个体数; N 为种群中总的个体数。

(2)Simpson 指数的计算公式为(2):

$$D_s = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2 \quad (2)$$

式中, D_s 为 Simpson 指数; S 为每个样品的条带数目; $P_i = \frac{n_i}{N}$, n_i 为第 i 个种的个体数; N 为种群中总的个体数。

(3)相似性聚类分析

采用 UPGMA 聚类分析软件对 DGGE 指纹图谱进行相似聚类分析。

(4)DGGE 电泳图谱分析

使用 Quantity one 软件对 DGGE 电泳图进行分析。

1.3.4 差异片段的克隆测序 BLAST 分析

在紫外灯下切下 DGGE 图谱中主要的差异条带,洗净后浸泡于 60 μL 无菌 MilliQ 水中 24 h 以上,取 20 μL 进行 PCR 二次扩增,扩增产物经 DGGE 确认为单一条带纯化后,纯化后送交生物公司(Sangon,上海)测序。测序结果提交 GenBank 并获得接受号。使用 GenBank 的 BLAST 对测序结果进行同源性分析。

2 结果与讨论

2.1 选择性平板培养基法

2.1.2 不同季节之间微生物群落多样性比较

用选择性平板培养基法测定的人工湿地处理单元基质中微生物菌落总数如图 2 所示。

从图 2 可以看出:随着“秋-冬-春-夏”的季节的变化,三级人工湿地单元中都出现微生物数量总体上呈现“高-低-高”季节性变化现象,即秋季为最高,进入冬季迅速降低,然后随着温度的增高逐渐增加。最高出现在秋季的结论与王锐萍^[12]对土壤微生物数量在一年中四个季节的变化趋势大致相同,冬季湖南温度很低,微生物活性较低,微生物数量较少,处理效率也相对较低,开春后随着气温的升高,微生物活性增加,繁殖速度也加快,所以培育出来的微生物数量也较多,进入秋季,湖南由于秋老虎的影响温度也较高,因此,微生物持续生长直到秋季,在秋季达到最高峰,然后秋末温度降低后微生物数量出现降低,直到冬季降到最低处。

2.1.2 不同单元之间微生物群落多样性比较

从三级单元之间微生物数量变化来看,从 1 级到 3 级,微生物数量最高为第 2 级,其次为第 1 级,最低为第 3 级,总体上呈现由 1—3 级微生物数量呈现“低-高-低”的变化趋势,即潜流人工湿地系统中微生物数量有

沿水流方向呈“低-高-低”的现象,这种现象的可能原因是污水中的大部分有机物都会被潜流人工湿地截留在前部和中部,因此,推断微生物降解有机物主要在中部,其次为前部。杨新萍等^[13]对潜流人工湿地处理水中有机物和氮的净化效率及沿程变化的研究中也发现对 TN 去除效果最好也在其中部,有机物的降解基本在湿地前部与中部完成。

2.2 PCR-DGGE 法

2.2.1 不同季节之间微生物群落多样性比较

提取微生物总 DNA 后进行 PCR 扩增,然后将经过 PCR 后电泳检查,有条带的样品,进行 DGGE 电泳,用软件处理后见图 3 所示。

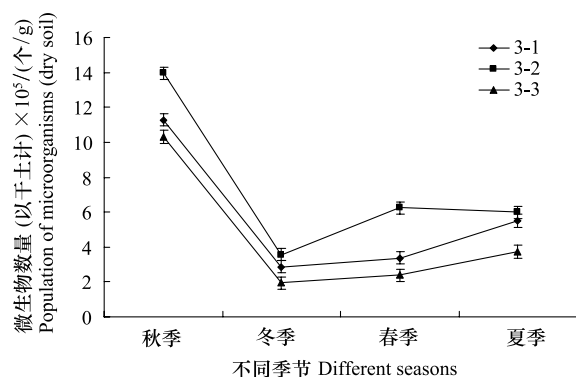


图2 不同季节的微生物数量

Fig. 2 Population of microorganisms

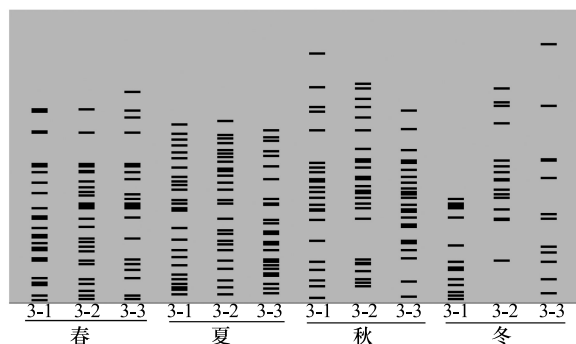


图3 DGGE 量化图

Fig. 3 DGGE Vectorization

从图 3 可以看出:12 个土样中共检测到 124 种不同的条带,统计 3 个处理池平均分别为:春季 24 个,夏季为 39 个,秋季为 25 个,冬季为 15 个。可以看出随着“秋-冬-春-夏”的季节的变化,微生物数量出现而呈现“高-低-高”季节性变化现象,这与选择性平板培养基法测定的微生物数量变化现象一致,但 PCR-DGGE 法得出微生物数量最高出现在夏季,与选择性平板培养基法测定的微生物数量秋季最高有一定差异,这可能是由于某些基质可能适合某一类或几类微生物的生长,而不适宜其它类微生物生存,结果基质中微生物总数可能很高,但微生物多样性指数不一定高。一个群落中物种类型数越多,各类型间分布比例越均匀,则该群落的生物多样性指数就越高,该指数与微生物总量并无明显联系。

2.2.2 不同季节之间微生物群落多样性比较

从 3 级单元之间微生物数量变化来看,从 1 到 3 级,也呈现“低-高-低”的变化趋势,与选择性平板培养基法测定数量变化现象一致。但是 DGGE 方法可以更细则的看出同一处理单元在相同的季节,其 DGGE 图谱具有很多相同泳带,且泳带数量相近,说明土壤微生物的群落结构相似,它们的优势菌种、菌种种类有着较大的相似性。同一处理单元在不同季节,其 DGGE 图谱也有共同泳带,但大多数泳带的位置不同及图谱总带数有明显的差异,说明有些菌种一直稳定存在,有些菌种随着季节的变化,转变为优势种群或非优势种群或消亡^[14-15]。

2.3 微生物香农-威纳 (Shannon) 指数和辛普森指数分析

从 Shannon 指数和 Simpson 指数 (表 1) 可以看出,夏季微生物种类最多,春季和秋季次之,冬季最少;这一结果与 PCR-DGGE 法测定的微生物数量变化一致。从三级单元之间的比较来看,除春季为“多-多-少”,其他季节都出现沿水流方向 Shannon 指数和 Simpson 呈现“少-多-少”的变化趋势,进一步说明本系统中微生物多样性沿水流方向呈先增加后减少的现象。

2.4 聚类分析

将 DGGE 图谱中包含的信息进行量化处理,以二进制的格式输出,再进行 UPGMA 聚类分析不同处理间

微生物群落结构的相似性,如图 4 所示。1、2、3 分别为春 3-1、3-2、3-3,4、5、6 为夏 3-1、3-2、3-3,7、8、9 为秋 3-1、3-2、3-3,10、11、12 为冬 3-1、3-2、3-3。

表 1 Shannon 指数和 Simpson 指数
Table1 Shannon index and Simpson index

样品 Sample	香浓-威纳指数(H') Shannon-Weiner Index	辛普森指数(D) Simpson index	样品 Sample	香浓-威纳指数(H') Shannon-Weiner Index	辛普森指数(D) Simpson index
春 3-1 Spring 3-1	3.219	0.960	春 3-2 Spring 3-2	3.219	0.960
春 3-3 Spring 3-3	3.045	0.952	夏 3-1 Summer 3-1	3.638	0.974
夏 3-2 Summer 3-2	3.689	0.975	夏 3-3 Summer 3-3	3.664	0.974
秋 3-1 Autumn 3-1	3.135	0.957	秋 3-2 Autumn 3-2	3.258	0.962
秋 3-3 Autumn 3-3	3.178	0.958	冬 3-1 Winter 3-1	2.708	0.933
冬 3-2 Winter 3-2	2.773	0.938	冬 3-3 Winter 3-3	2.485	0.917

1、2、3 分别为春 3-1、3-2、3-3,4、5、6 为夏 3-1、3-2、3-3,7、8、9 为秋 3-1、3-2、3-3,10、11、12 为冬 3-1、3-2、3-3 DGGE 图谱经聚类分析后发现这 12 个样属于明显的 4 组。除样 11 外,相同季节的土样均聚集在同一个分支下,同一季节的土样微生物 DGGE 图谱则可归为一组,带谱间相似性都大于 20%,不同季节土样微生物的 DGGE 分属不同组。即第一组为春季 3-1、3-2、3-3,第二组为:秋 3-1、3-2、3-3、冬 3-2,第三组为:夏 3-1、3-2、3-3,第四组为冬 3-1、3-3。这些结果表明,当季节相同时,各处理池的土样微生物群落相似性较高。其中春季微生物的相似性最高,达到了 40% 左右,夏季相似性最低,仅有 25%,这说明夏季微生物多样性丰富,这与 DGGE 法检测到夏季微生物多样性最高一致,也进一步说明季节的温度变化对微生物的多样性的影响^[16-17]。

2.5 测序结果分析

在对回收得到的特异片段进行了验证后,对其中的 4 个片段进行了克隆、测序分析,其核酸测序的部分结果为:

YP1

GGCGAGCTCTCTGCGGTACGTCTTGAGCAAGGATTAACCTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAAGTACTTTACAA
CCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCCCCCATTGTGCAATATTACCCACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTA

YP2

CGAACGCGCTCTCTGCGGTACGTCAATGAGCTAGGTATTAACCTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAAGTACTTTA
CAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACT
GCTGCCTCCCGTAGGAGTA

YP3

ATCGGACGCTCTCTCTGCGGTACGTCAATGAGCAAGGATTAACCTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACT
TTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCCCA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTA

YP4

CGGAGCTCTCTGCGGTACGTCAATGAGCAAGGATTAACCTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAAGTACTTTACAA

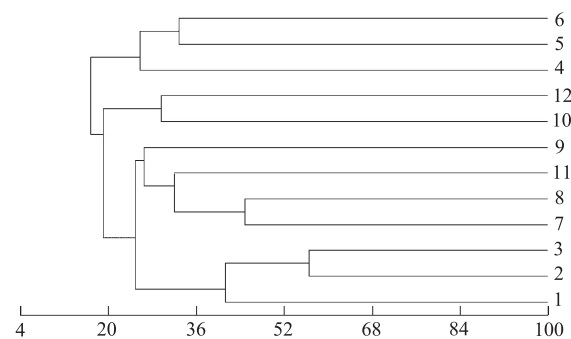


图 4 12 个土样的聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis of 12 soil samples

CCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTA

2.6 Blast 分析

将所得序列输入 GenBank, 用 Blast 程序进行相似性比较分析。具体结果如表 2—表 3 所示, 所有序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 94%—97% 之间。说明所得序列均来源为微生物, 而且在 GenBank 中找到了最相近菌属。

表 2 PCR-DGGE 法分离的 DNA 的特征

Table 2 Characteristics of cloned DNAs isolated by PCR-DGGE

DNA 克隆 DNA clone	引物组合 Primer pair	核苷酸同源; 序列号 Nucleic acid identity; Accession No.	相似性 Similarity /%	蛋白质同源; 序列号 Amino acid identity; Accession No.	E 值 E value
差异序列 1 (YP1)	(F357GC/R518)	<i>Escherichia coli</i> ; ACX001000167.1	94	3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate; ZP_06222660.1	4e-09
差异序列 2 (YP2)	(F357GC/R518)	<i>Escherichia sp.</i> ; ACID01000033.1	96	hypothetical protein; ZP_06213060.1	3e-08
差异序列 3 (YP3)	(F357GC/R518)	<i>Shigella dysenteriae</i> ; NZ_AAMJ02000006.1	97	Low quality protein; ZP_05997968.1	8e-11
差异序列 4 (YP4)	(F357GC/R518)	<i>Shigella boydii</i> ; NC_010658.1	97	Conserved hypothetical protein; AAO09423.1 AE016800_28	5e-12

表 3 在 GenBank 中的最相近菌属

Table 3 Closest species in GenBank

样品 Sample	差异序列 1 YP1	差异序列 2 YP2	差异序列 3 YP3	差异序列 4 YP4
相近菌属 Similar species	肠杆菌属 <i>Enterobacter sp.</i>	弧菌 <i>Vibrio sp.</i>	欧文氏菌 <i>Erwinia sp.</i>	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>
登录号 Registry Number	EF450119.1	FJ764192.1	FM161470.1	FM992868.1
E 值 E value	2e-22	1e-22	2e-24	6e-22

差异序列 1 (YP1) 的核苷酸序列与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (登录号: ACX001000167.1) 相似性达 94%。BLASTX 比较结果发现 3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸 (3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase) 的 E 值为 4e-09 (登录号: ZP_06222660.1)。3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸是一种 DHBP 合成酶, 提供核酮糖合成核黄素-5 所需的磷酸。核黄素又名维生素 B₂, 是细菌体内辅酶黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 与黄素腺嘌呤单核苷酸 (FMN) 的组成成分, 参与细菌能量代谢和氧化还原反应, 可能与细菌通过代谢分解有机物有关。核黄素还能进行可逆的脱氢加氢反应, 作为氧化-还原介质, 能有效降解偶氮染料废水^[18,19], 提高处理效果。

差异序列 2 (YP2) 的核苷酸序列与大肠埃希氏菌 (*Escherichia sp.*) (登录号: ACID01000033.1) 相似性达 96%。BLASTX 比较结果发现假设蛋白 (Hypothetical protein) 的 E 值为 3e-08 (登录号: ZP_06213060.1), 此种蛋白跟蜡样芽胞杆菌生命活动相关。据报道, 埃希氏菌和芽孢杆菌都有解磷的作用^[20-21]。因此, 可以认为 YP2 差异表达片段可能与细菌解磷有关。

差异序列 3 (YP3) 的核苷酸序列与痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) (登录号: NZ_AAMJ02000006.1) 相似性达 97%。BLASTX 比较结果发现低优质蛋白 (LOW QUALITY PROTEIN) 的 E 值为 8e-11 (登录号: ZP_05997968.1), 此蛋白与 APOE 载脂蛋白 e 相似, 载脂蛋白 E 是生物必不可少的甘油三酯正常代谢丰富的脂蛋白成分, YP3 差异表达片段的功能可能是参与细菌的分解代谢。

差异序列 4 (YP4) 的核苷酸序列与鲍氏志贺菌 (*Shigella boydii*) (登录号: NC_010658.1) 相似性达 97%。BLASTX 比较结果发现保守假设蛋白 (Conserved hypothetical protein) E 值为 5e-12 (登录号: AAO09423.1|AE016800_28)。与其最相近菌属克雷伯氏菌属的细菌, 具有发酵肌醇产酸或产酸产气, 水解尿素, 可以利用

枸橼酸盐,不产生硫化氢和鸟氨酸脱羧酶阴性等特性^[22],YP4 差异表达片段功能可能与细菌去氮有关。

3 结论

(1)应用选择性平板培养基法与 DGGE 方法进行了不同季节与不同单元根际细菌多样性研究。在不同季节间,随着“秋-冬-春-夏”的季节的变化,2 种方法测定的微生物数量都呈现“高-低-高”季节性变化现象,但前者显示秋季数量最多,后者显示夏季数量最多;总体上说明土壤微生物数量变化主要受季节温度的影响。三级单元之间,从 1—3 级微生物数量变化,2 种方法都呈现“低-高-低”的变化趋势,说明潜流人工湿地系统中微生物数量有沿水流方向呈先增加后减少的现象,因此,有机物的降解也基本在湿地前部与中部完成。从 Shannon 指数和 Simpson 指数来看季节变化,夏季微生物种类最多,春季和秋季次之,冬季最少。三级单元之间都出现沿水流方向 Shannon 指数和 Simpson 呈现“少-多-少”的变化趋势,此结论与前面选择性平板培养基法得出的结果一致。

(2)从 UPGMA 聚类分析不同处理间微生物群落结构的相似性来看,12 个样属于明显的 4 组。除样 11 外,相同季节的土样均聚集在同一个分支下,同一季节的土样微生物 DGGE 图谱则可归为一组,带谱间相似性都大于 20%,不同季节土样微生物的 DGGE 分属不同组。其中春季微生物的相似性最高,达到了 40% 左右,夏季相似性最低,仅有 25%,这说明夏季微生物多样性丰富,这与 DGGE 法检测到夏季微生物多样性最高一致,也进一步说明季节的温度变化对微生物的多样性的影响

(3)得到的 4 个差异序列,分别为肠杆菌属、弧菌、欧文氏菌、产酸克雷伯菌。对序列 BLASTX 比较,发现这 4 个样分别与 3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸(3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase),假设蛋白,低优质蛋白,保守假设蛋白最为相近,YP1 差异表达片段功能可能与细菌通过代谢分解有机物有关;YP2 差异表达片段功能与蜡样芽孢杆菌生命活动相关,具有解磷的作用;YP3 差异表达片段功能与 APOE 载脂蛋白 e 相似,参与细菌的分解代谢;YP4 差异表达片段功能可能与细菌去氮有关。

References:

- [1] Wetzel R G. Scientific Foundations in Constructed Wetlands for Water Quality Improvement. Boca Raton: CRC Press, 1993: 3-7.
- [2] Ragusa S R, McNevin D, Qasem S, Mitchell C. Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms. Water Research, 2004, 38(12): 2865-2873.
- [3] Popko D A, Han S K, Lanoil B, Walton W E. Molecular ecological analysis of planktonic bacterial communities in constructed wetlands invaded by *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Journal of Medical Entomology, 2006, 43(6): 1153-1163.
- [4] DeJournett T D, Arnold W A, LaPara T M. The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments. Applied Soil Ecology, 2007, 35(3): 648-659.
- [5] Chen Y H, Wu X F, Chen M L, Zhang Z N, Li K L, Wang Z C, Lei D. Analysis of microorganism species diversity in plant intercropping models in a wetland system constructed for treatment of municipal sewage. Environmental Sciences, 2011, 32(8): 2397-2402.
- [6] 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 16SrRNA. Applied Environment Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [7] Chen Y H, Wu X F, Jiang L J, Chen M L, Zeng M, Lei D, Zhang Z N, Yang S Y. Screening and evaluation of plant purification potential for phytoremediation of sanitary sewage. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(8): 1549-1554.
- [8] Chen Y H, Wu X F, He G, Chen M L, Jiang L J, Zeng M, Wang Z C. Analysis of plant effect and rhizosphere enzyme activity in a constructed vertical-flow wetland established for sewage treatment. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(11): 6051-6057.
- [9] Yue Y Q, Wang S F. Environmental Microbiology. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [10] Chen X Y, Zhou Y K, Yu X M, Zheng F C. An affection method for DNA extraction from soil Microorganisms. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(4): 33-36.
- [11] Xiao Y, Yang Z H, Zeng G M, Ma Y H, Liu Y S, Wang R J, Xu Z Y. Bacterial diversity in sequencing batch biofilm reactor (SBBR) for landfill leachate treatment using PCR-DGGE. Environmental Science, 2007, 28(5): 1095-1101.
- [12] Wang R P, Liu Q, Peng S L, Wen Y, Xue N, Lin K H. Changes in number of microbes in the soil and forest litter of Dinghu mountain. Wuyi Science Journal, 2006, 22(1): 82-87.
- [13] Yang X P, Zhou L X, Dai Y Y, Cui C H. Removal efficiency of C and N in micro-polluted river through a subsurface-horizontal flow constructed

wetlands. *Environmental Science*, 2008, 29(8): 2177-2182.

- [14] Wang J A, Huang L, Liu X Y, Yao F Q, Wu X H. Distribution of the microbes in the artificial wetland system treating campus septic tank Effluent. *Journal of Yuxi Normal University*, 2008, 24(8): 11-15.
- [15] Stehr G, Böttcher B, Dittberner P, Rath G, Koops H P. The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 17(3): 177-186.
- [16] Liang W, Wu Z B, Zhan F C, Deng J C. Seasonal variation of macrophytes root-zone Microorganisms and purification effect in the Constructed Wetland System. *Journal of Lake Sciences*, 2004, 16(4): 312-317.
- [17] Bai F Q, Li C, Zhu W M, Chen Y X. Purification effect of sewage by composite constructed wetland system in autumn and winter. *Journal of Hebei University of Engineering: Natural Science Edition*, 2009, 26(2): 45-47.
- [18] Zhao J, Jiang J Y, Ding L, Zhou Y X, Liang J. Effects of riboflavin on the biodegradation of azo dyes. *Research of Environmental Sciences*, 2009, 22(10): 1193-1197.
- [19] dos santos A B, Traverse J, Cervantes F J, van Lier J B. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(1): 42-52.
- [20] Xi L Q, Feng R Z. Research of plant phosphate-solubilizing microorganisms. *Journal of Tarim University*, 2006, 18(4): 57-61.
- [21] Asea P E A, Kucey R M, Sterart J W B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20(4): 459-464.
- [22] Li G J, Zhu R L, Xu G. Study situation and prospects of Klebsiella Oxytoca. *Shandong Journal of Animal Husbandry and Veterinary Science*, 1997, (2): 36-37.

参考文献:

- [5] 陈永华, 吴晓芙, 陈明利, 张珍妮, 李科林, 王忠诚, 雷电. 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. *环境科学*, 2011, 32(8): 2397-2402.
- [7] 陈永华, 吴晓芙, 蒋丽鹃, 陈明利, 曾敏, 雷电, 张珍妮, 阳石英. 处理生活污水湿地植物的筛选与净化潜力评价. *环境科学学报*, 2008, 28(8): 1549-1554.
- [8] 陈永华, 吴晓芙, 何钢, 陈明利, 蒋丽娟, 曾敏, 王忠诚. 人工湿地污水处理系统中的植物效应与基质酶活性. *生态学报*, 2009, 29(11): 6051-6057.
- [9] 乐毅全, 王士芬. *环境微生物学*. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [10] 陈旭玉, 周亚奎, 余贤美, 郑服丛. 一种直接用于 PCR 的土壤微生物 DNA 提取方法. *中国农学通报*, 2008, 24(4): 33-36.
- [11] 肖勇, 杨朝晖, 曾光明, 马延和, 刘有胜, 王荣娟, 徐峥勇. PCR-DGGE 研究处理垃圾渗滤液序批式生物膜反应器 (SBBR) 中的细菌多样性. *环境科学*, 2007, 28(5): 1095-1101.
- [12] 王锐萍, 刘强, 彭少麟, 文艳, 薛宁, 林开豪. 鼎湖山森林凋落物和土壤微生物数量动态. *武夷科学*, 2006, 22(1): 82-87.
- [13] 杨新萍, 周立祥, 戴媛媛, 崔春红. 潜流人工湿地处理微污染河道水中有机物和氮的净化效率及沿程变化. *环境科学*, 2008, 29(8): 2177-2182.
- [14] 王纪爱, 黄俐, 刘兴艳, 姚福泉, Wu X H. 校园化粪池出水人工湿地处理系统微生物的时空分析研究. *玉溪师范学院学报*, 2008, 24(8): 11-15.
- [16] 梁威, 吴振斌, 詹发萃, 邓家齐. 人工湿地植物根区微生物与净化效果的季节变化. *湖泊科学*, 2004, 16(4): 312-317.
- [17] 白峰青, 李冲, 朱文敏, 陈娅鑫. 秋冬季节复合人工湿地系统对污水净化效果研究. *河北工程大学学报: 自然科学版*, 2009, 26(2): 45-47.
- [18] 赵婧, 蒋进元, 丁林, 周岳溪, 梁杰. 核黄素对偶氮染料生物降解的影响. *环境科学研究*, 2009, 22(10): 1193-1197.
- [20] 席琳乔, 冯瑞章. 植物根际解磷菌的研究进展. *塔里木大学学报*, 2006, 18(4): 57-61.
- [22] 李桂杰, 朱瑞良, 徐刚. 克雷伯氏菌的研究现状综述. *山东畜牧兽医*, 1997, (2): 36-37.

CONTENTS

The combined effects of elevated CO ₂ and elevated temperature on proliferation of cyanophage PP	NIU Xiaoying, CHENG Kai, RONG Qianqian, et al (6917)
Precipitation pattern of desert steppe in Inner Mongolia, Sunite Left Banner: 1956—2009	CHEN Jun, WANG Yuhui (6925)
Emergy and economic evaluations of two sewage treatment systems	LI Min, ZHANG Xiaohong, LI Yuanwei, et al (6936)
Individual spatial pattern and spatial association of <i>Stipa krylovii</i> population in Alpine Degraded Grassland	ZHAO Chengzhang, REN Heng (6946)
Litter characteristics of nutrient and stoichiometry for <i>Phyllostachys praecox</i> over soil-surface mulching	LIU Yadi, FAN Shaohui, CAI Chunju, et al (6955)
Characteristics of leaf element concentrations of twelve nutrients in <i>Acacia confusa</i> and <i>Leucaena glauca</i> in secondary forests of acid rain region in Fuzhou	HAO Xinghua, HONG Wei, WU Chengzhen, et al (6964)
Relationships between main insect pests and their predatory natural enemies in “Yuhualu” juicy peach orchard	KE Lei, SHI Xiaoli, ZOU Yunding, et al (6972)
Simulating 10-hour time-lag fuel moisture in Daxinganling	HU Tianyu, ZHOU Guangsheng, JIA Bingrui (6984)
Soil nutrient characteristics under different vegetations in the windy and sandy region of northern Shaanxi	LI Wenbin, LI Xinpeng (6991)
Partitioning of autotrophic and heterotrophic soil respiration in southern type poplar plantations	TANG Luozhong, GE Xiaomin, WU Lin, et al (7000)
Soil water and salinity in response to water deliveries and the relationship with plant growth at the lower reaches of Heihe River, Northwestern China	YU Tengfei, FENG Qi, LIU Wei, et al (7009)
Effect of stem diameter at breast height on skewness of sap flow pattern and time lag	MEI Tingting, ZHAO Ping, NI Guangyan, et al (7018)
Invasion of exotic <i>Ageratina adenophora</i> Sprengel. alters soil physical and chemical characteristics and arbuscular mycorrhizal fungus community	YU Wenqing, LIU Wanxue, GUI Furong, et al (7027)
Models and methods for information extraction of complex ground objects based on LandSat TM images of Hainan Island, China	WANG Shudong, ZHANG Lifu, CHEN Xiaoping, et al (7036)
Effects of snow pack removal on soil hydrolase enzyme activities in an alpine <i>Abies faxoniana</i> forest of western Sichuan	YANG Yulian, WU Fuzhong, YANG Wanqin, et al (7045)
Effects of different soil water treatments on photosynthetic characteristics and grain yield in rice	WANG Weixiao, LIU Xiaojun, TIAN Yongchao, et al (7053)
Growth characteristics, lignin degradation enzyme and genetic diversity of <i>Fomes fomentarius</i> by SRAP marker among populations	CAO Yu, XU Ye, WANG Qiuyu (7061)
Effects of the invasion by <i>Solidago canadensis</i> L. on the community structure of soil animals	CHEN Wen, LI Tao, ZHENG Rongquan, et al (7072)
Effects of intercropping on quality and yield of maize grain, microorganism quantity, and enzyme activities in soils	ZHANG Xiangqian, HUANG Guoqin, BIAN Xinmin, et al (7082)
Influence of mycorrhizal inoculation on competition between plant species and inorganic phosphate forms	ZHANG Yuting, ZHU Min, XIAN Yanxiangwa, et al (7091)
The stable nitrogen isotope of size-fractionated plankton and its relationship with biomass during winter in Daya Bay	KE Zhixin, HUNG Liangmin, XU Jun, et al (7102)
Dynamics of toxic and non-toxic <i>Microcystis</i> spp. during bloom in the large shallow hypereutrophic Lake Taihu	LI Daming, YE Linlin, YU Yang, et al (7109)
Activities of antioxidant enzymes and Zn-MT-like proteins induced in <i>Chlorella vulgaris</i> exposed to Zn ²⁺	YANG Hong, HUANG Zhiyong (7117)
Ecological footprint in fujian based on calculation methodology for the national footprint accounts	QIU Shoufeng, ZHU Yuan (7124)
The comparison of CO ₂ emission accounting methods for energy use and mitigation strategy: a case study of China	YANG Xiai, CUI Shenghui, LIN Jianyi, et al (7135)
Ecological damage assessment of jiaozhou bay reclamation based on habitat equivalency analysis	LI Jingmei, LIU Tieying (7146)
The value assessment of county-level ecological assets: a case in Fengning County, Hebei Province	WANG Hongyan, GAO Zhihai, LI Zengyuan, et al (7156)
Review and Monograph	
Molecular basis for enhancement of plant drought tolerance by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a mini-review	LI Tao, DU Juan, HAO Zhipeng, et al (7169)
A review of carbon cycling and sequestration in urban soils	LUO Shanghua, MAO Qizheng, MA Keming, et al (7177)
overview on methods of deriving fraction of absorbed photosynthetically active radiation (FPAR) using remote sensing	DONG Taifeng, MENG Jihua, WU Bingfang (7190)
Research progress on influencing of light attenuation and the associated environmental factors on the growth of submersed aquatic vegetation	WU Mingli, LI Xuyong (7202)
The framework of stoichiometry homeostasis in zooplankton elemental composition	SU Qiang (7213)
Scientific Note	
Abundance and biomass of planktonic ciliates in the sea area around Zhangzi Island, Northern Yellow Sea in July and August 2010	YU Ying, ZHANG Wuchang, ZHANG Guangtao, et al (7220)
Research of wildlife resources sustainable development based on entropy method in China	YANG Xitao, ZHOU Xuehong, ZHANG Wei (7230)
Influence of residue composition and addition frequencies on carbon mineralization and microbial biomass in the soils of agroforestry systems	WANG Yikun, FANG Shengzuo, TIAN Ye, et al (7239)
Seasonal changes in microbial diversity in different cells of a wetland system constructed for municipal sewage treatment	CHEN Yonghua, WU Xiaofu, ZHANG Zhenni, et al (7247)

《生态学报》2013 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的生态学专业性高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,300 页,国内定价 90 元/册,全年定价 2160 元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENGTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

第 32 卷 第 22 期 (2012 年 11 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 32 No. 22 (November, 2012)

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:1000717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元