DOI: 10.5846/stxb201412182516
张琼琼, 黄兴如, 郭逍宇.基于 T-RFLP 技术的不同水位梯度植物根际细菌群落多样性特征分析.生态学报,2016,36(14): - .
Zhang Q Q, Huang X R, Guo X Y.Analysis of the characteristics of rhizosphere bacterial diversity from plants with different water level gradients based on T-RFLP.Acta Ecologica Sinica,2016,36(14): - .

基于 T-RFLP 技术的不同水位梯度植物根际细菌群落多样性特征分析

张琼琼, 黄兴如, 郭逍宇*
首都师范大学资源环境与旅游学院, 北京 100048

摘要:为了解水位梯度控制下不同湿地植物根际细菌群落多样性,以北京市奥林匹克公园植物氧化塘人工湿地为例,采用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术结合 ANOVA 分析,比较了水位梯度控制下三棱草、芦苇、香蒲、睡莲四种植物根际细菌群落的多样性。研究结果显示:随着水位梯度加深,根际细菌群落多样性呈现减少趋势, *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ三种不同酶切所得结果一致,且综合三种酶切的 PAT 比对中 RFs 组合数量随水位梯度加深也呈相应变化趋势。进一步分析发现,随水位梯度加深植物根际可培养细菌 RFs 数量变化较显著。不同水位梯度下各植物根际细菌群落中差异显著的菌群为 *Beta* 变形杆菌纲,水位梯度加深可能导致不同生态型植物根际泌氧能力降低,进而影响植物根际好氧细菌生存,从而出现三棱草根际属水平菌群丰富度最高,其次为芦苇、香蒲,最少为睡莲。各植物根际细菌群落的优势属多数为变形杆菌门,是脱氮除磷的功能性菌门,其中产碱杆菌属和黄杆菌属为四种植物根际细菌的共同优势属,在碳氮循环中起重要作用。

关键词:水位梯度;湿地植物;细菌多样性;T-RFLP

Analysis of the characteristics of rhizosphere bacterial diversity from plants with different water level gradients based on T-RFLP

ZHANG Qiongqiong, HUANG Xingru, GUO Xiaoyu*
College of Resources Environment and Tourism, Capital Normal University, Beijing 100048, *China*

Abstract: To elucidate rhizosphere bacterial diversity from plants with different water level gradients, we examined bacterial diversity in Beijing Olympic Park plant oxidation pond, an artificial wetland. The rhizosphere bacterial diversities for *Carex phacota* spr., *Phragmites communis*, *Typha orientalis*, and *Nymphaea tetragona* grown in plants with different water levels were compared based on terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis combined with analysis of variance (ANOVA). Our results showed that rhizosphere bacterial diversity decreased with increasing water levels. Different restriction enzymes, i.e., *Hha*I, *Msp*I, and *Rsa*I, yielded the same digestion results. By combing results from digestion with these three restriction enzymes, RF combination numbers from PAT alignment also decreased with increasing water levels, consistent with the results of single restriction enzyme digestion. Further analysis showed that RF numbers in cultured rhizosphere bacteria changed significantly with the increase in water level; in contrast, the RF numbers of uncultured bacteria did not change significantly. Under different water gradients, *β-Proteobacteria* exhibited the most significant variations among the four plants, possibly because the increase in water level may have reduced the abilities of the different plants to secrete oxygen, thereby affecting the survival of plant rhizosphere aerobic bacteria. The triangular had the highest number of rhizosphere bacterial genera, followed by reeds, cattails, and finally water lilies. The abundances of the aerobic

基金项目:国家自然科学基金(40901281);北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201310028012)
收稿日期:2014-12-18; **修订日期**:2015-06-15
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: xiaoyucnu@126.com

bacteria *Alcaligenes* sp., *Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Delftia* sp., *Janthinobacterium* sp., *Herbaspirllum* sp., *Ralstonia sp.*, *and Pelomonas* sp. were probably related to the capacity of plant roots to secrete oxygen. Moreover, the oxygen-secreting capacity of rhizospheres and root exudates varied because wetland plants with different water level gradients exhibited different growth conditions and metabolic activities, affecting rhizosphere bacteria growth and reproduction. The most dominant organisms in the rhizosphere bacterial communities of these four plants were *Proteobacteria*, which function in the removal of nitrogen and phosphorus. The common dominant genera among these rhizosphere bacteria were *Alcaligenes* and *Flavobacterium*, which play important roles in carbon and nitrogen cycles and contribute to wetland water purification.

Key Words: water level gradient; wetland plant; bacterial diversity; T-RFLP

湿地是自然环境中自净能力最强的生态系统之一[1],可利用基质-植物-微生物复合生态系统的物理、化学、生物三重协同作用,通过过滤、沉淀、吸附、离子交换、植物吸收和微生物分解等多种途径实现对污水的高效净化[2]。湿地植物在污水净化过程中扮演着重要角色。植物可以直接吸收利用水体中的氮磷等富营养化元素,进而通过植物收割使其从湿地去除。但通过植物吸收同化的去除量仅是一少部分,Oostrom 等认为仅有13%的氮是通过基质的过滤和植物吸收作用被去除[3]。栖息于湿地植物根际的多种微生物是水体中污染物主要降解者,原因是根际是植物、微生物和基质共同作用最直接、最强烈的区域[4],且植物根分泌物、通气条件及凋落物的分解过程会影响植物根际微生物群落结构特性进而影响系统的净化效能[5-6]。细菌在根环境中对各种根分泌物利用率和敏感性远远超过真菌、放线菌及藻类等,在根际微生物活动中较活跃且占主导地位,并能与根际联合生存、定殖及保持在根部[7]。

水位是影响湿地生态过程的关键因素[8]。水位梯度变化是影响湿地植物空间异质分布的主导因子[9],湿地水位梯度变异影响植物氧气的供给,从而于湿地近岸带依次形成湿生植物、挺水植物、浮叶植物等生态型的植物分布格局。基于水位梯度变异的氧气供给调节导致不同类型的湿地植物生物地化循环中好氧和厌氧过程的相互影响。高水位促进反硝化[10]、甲烷生成[11]等厌氧过程的速率,同时降低硝化作用等好氧过程的速率[12]。

基于末端限制性片段长度多态性技术(Terminal restriction fragment length polymorphism analysis, T-RFLP)可以定性和定量的进行微生物群落结构分析及不同群落结构间的比较[13],它是建立在 16S rDNA 基础上,其数据输出形式在测序过程中直接数字化完成对大量信息的快速分析,前期限制性内切酶选择是影响分析结果的关键因素[14],选择内切酶应考虑其消化后产生单峰具有特异性及可测定范围内末端片段长度(T-RFs)的数量[15]。在样品群落多样性超过 100 种时,使用单酶切可能只识别 50%的群落,适宜选择 2—4 种限制性内切酶进行多重酶切,可检测 50%—70%的群落丰富度表达[16]。研究表明,分析细菌 16S rDNA 多态性时,*Msp* Ⅰ最易得到可分辨的单一片段,*Hha* Ⅰ和 *Rsa* Ⅰ可产生数量最多的 T-RFs[17]。*Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ三种四碱基限制性内切酶的酶切位点分别为 GCG′C、C′CGG、GT′AC,综合包括了 AT 和 GC 位点,且酶切位点特异性高,可提高 16S rDNA 片段中的酶切频率、丰富酶切片段[18-19]。由于双酶切不一定比单酶切产生更多 T-RFs,甚至可能少于单酶切,因此综合三种酶切在各自反应体系中进行分别酶切,提高操作分类单元的精确有效性[20]。

近年来,已有学者初步尝试借用统计学方法在海量数据中挖掘数据的内在规律方面的优势对 T-RFLP 分析中酶切片段进行分析。储昭瑞等采用 T-RFLP 技术,选取合适的 *Hha* Ⅰ和 *Rsa* Ⅰ限制性内切酶,使得不同厌氧氨氧化细菌对应不同 T-RFs,进而完成对厌氧氨氧化细菌群落组成的快速分析[21]。黄艺等借助加权平均回归方法根据滇池流域 38 个样品产生的 110 个 T-RFs 片段对各环境因子的生态适宜性将其划分为对环境干扰的敏感片段、中间片段和耐受片段,进而成功地对滇池流域浮游生物的完整性进行评价[22]。Ding T 等采用 Average Proportion per Existence (APE)和部分主成分分析(pCCA)的方法对不同物种、不同季节、不同环境条件下植物叶内生细菌群落所产生的 T-RFs 片段进行差异性分析,表明物种变异是影响 T-RFs 片段变异的主要因素,其次是生长季节和生长环境[23]。

本文利用 T-RFLP 技术结合 *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ综合酶切结果的多样性指数、片段类型、片段丰度和基于 MiCA 的 PAT 比对分析比较不同水位梯度下湿地近岸带优势植物即湿生植物三棱草(*Carex phacota Spr.*)、挺水植物芦苇(*Phragmites communis*)和香蒲(*Typha orientalis*)、浮叶植物睡莲(*Nymphaea tetragona*)的根际细菌群落结构多样性差异,并尝试借助方差分析检验基于水位梯度变异的不同植物根际细菌群落属特征差异,探讨同一水域不同水位梯度条件下植物根际细菌群落间变异关系及细菌群落与宿主植物根际微环境间响应关系。研究结果预期在多元统计分析与 T-RFLP 相结合的微生物生态学问题分析中进行有益尝试,并预期揭示基于水位梯度湿地植物根际细菌群落多样性变异特征,对构建高效的湿地净化系统及改善和维护生态平衡提供科学参考。

1　研究区概况

奥林匹克公园南园湿地位于奥林匹克公园内,地处北京市区北部。该区属暖温带半干旱半湿润大陆性季风气候。多年平均气温 11—12 ℃,极端最高气温 41.6 ℃,极端最低气温-21.2 ℃;多年平均水面蒸发量在 1200 mm 左右;多年平均降雨量约 600 mm,年内分配不均,多集中在汛期 6—9 月,约占全年的 85%。奥林匹克公园以清河、北小河再生水处理厂的出水为补水水源,并循环利用,且补水入湖前流经南园湿地以改善水质。作为奥林匹克南园湿地的子系统之一,植物氧化塘水位梯度约 1—2 m 之间,兼具好氧塘和厌氧塘的优点,塘内各个部分均分布有大量水生植物,主要包括三棱草、芦苇、香蒲、睡莲等,集中分布于湿地近岸带 0—10 m 处,并形成较为明显的近岸带植被分布格局。植被覆盖度较高,可达 70%—90%。通过植物的净化作用出水水质可以达到地表Ⅲ类水水质标准(GB3838—2002)。

2　材料与方法

2.1　样品采集及 DNA 提取

2012 年 6 月 14 日分别从奥林匹克公园南园湿地植物氧化塘基于塘中心到近岸带设置东、南、西、北四条样带,并在样带上依据不同水位梯度下优势物种采集湿生植物三棱草(0—1cm 水深)、挺水植物芦苇(约 10cm 水深)和香蒲(约 15cm 水深)、浮叶植物睡莲(约 100cm 水深)根际土壤样品,新鲜表面附着基质的各植物根际样品装入消菌的三角瓶密封,立即带回实验室处理分析。将三棱草、芦苇、香蒲、睡莲各根际新鲜泥土通过真空抽滤泵过滤去除水分,滤膜上即留有植物根际微生物样品,随后将根际样品冷冻储藏于-20 ℃备用。采用土壤样品提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司)提取根际样品总 DNA,操作步骤按照使用说明书进行。提取总 DNA 经 0.8%(m/v)琼脂糖凝胶电泳检测鉴定,提取的 DNA 放置于-20 ℃条件下保存、备用。

2.2　16S rDNA 的 PCR 扩增

本实验的细菌引物选用正向引物 5′端带荧光物质 FAM 标记的 27f (6-FAM- 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和反向引物 1492r(5′-GGTTACCTTGTTACG ACTT -3′)对根际样品进行 16S rDNA 基因进行扩增。PCR 反应体系成分(50 μL)包含 25 μL 2×Taq PCR Master Mix,2 μL 正反向引物,4 μL 根际土壤总 DNA,17 μL ddH_2O。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min;30 个循环的常规 PCR(95 ℃变性 50 s,55 ℃退火 50 s,72 ℃引物延伸 1 min);72 ℃延伸 7 min;4 ℃保存。荧光 PCR 产物采用 1.0%的琼脂糖凝胶检测。

2.3　末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析

采用限制性内切酶 *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ分别对 PCR 产物进行酶切,酶切体系成分(20μL)包含:1 μL 内切酶,2 μL 10×buffer,10 μL PCR 产物,7 μL ddH_2O。将体系混匀后,置于恒温培养箱 37 ℃反应 4 h。然后,在 65 ℃条件下水浴 15 min 使限制性内切酶失活,终止消化反应。之后将消化产物经 ABI 测序仪扫描检测,得到 T-RFLP 图谱。

2.4　数据处理与统计分析

依据 T-RFLP 图谱文件(选择末端限制性片段(Terminal restriction fragments T-RFs)在 50—660 bp 范围内

且荧光强度超过 100 U 的峰[24])运用 Peak Scanner Software V1.0 软件进行分析,将其分析结果输入 T-REX 程序(http://trex.biohpc.org/)进行处理,输出 T-RFs 类型及相对丰度的组成矩阵,将每个 T-RF 所占的百分比作为权重输入 Primer5.0 软件进行等级多元聚类分析及非度量多维标度分析(non-metric multidimensional scaling,MDS)。基因多样性指数分析即利用 Margale 指数(S)评价物种丰富度,均匀度指数(J')计算均匀度,Shannon-weaver 指数(H')评价细菌群落综合多样性。

基于 *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ三种限制性内切酶消化的 T-RFs 类型及相对丰度组成矩阵,依据 MiCA3(http://mica.ibest.uidaho.edu/)数据库,利用 Phylogenetic Assignment Tool(PAT)程序(https://secure.limnology.wisc.edu/trflp/newuser.jsp)比对分析细菌菌群系统发育关系。依据比对结果构建基于属水平的 0、1 数据矩阵(将特定样品中出现的属定义为 1,未出现的属定义为 0),从而构建了样品数×RFs 数(16×4646)的矩阵和样品数×属数的 16×199 的原始 0、1 数据矩阵。在数据矩阵的基础上,方差分析采用 SPSS16.0 中的 ANOVA 方法(所有统计学显著水平指数 $P<0.05$)。

2.5 水质检测

于 2012 年夏(6 月 6 日、15 日、23 日)对奥体公园植物氧化塘进出口主要水质指标进行常规检测,氨态氮(NH_4^+-N)、硝态氮(NO_3^--N)由离子色谱仪(ICS-1500、ICS-90,Dionex,the United States)测定,水体化学需氧量(COD)、总磷(TP)采用国标法测定,TN 采用 N/C 分析仪测定(Multi N/C, Analytik-jena, Germany),pH、氧化还原电位(ORP)、溶解氧(DO)采用水质仪(Hydrolab Datasonde5、5X,Hach,the United States)在采样现场测定。

3 结果与分析

3.1 基于水位梯度的植物根际细菌群落分类和排序

基于 *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ三种酶切的 T-RFLP 图谱分类排序结果见图 1 和图 2。聚类分析能反应样品间微生物群落结构的相似度。从图 1 可以看出,基于相似性系数为 50%—55%对三种酶切结果分群并类,各酶切结果均表现为湿生植物三棱草根际细菌群落、挺水植物芦苇根际细菌群落、挺水植物香蒲根际细菌群落和浮叶植物睡莲根际细菌群落四大类。其次,随不同生态型植物立地水位梯度加深,其根际细菌群落相似性降低。不同酶切具有相同的结论,表明基于 T-RFLP 的酶切分型效果具有稳定性。

基于三种酶切的 MDS 排序图的压力系数均在正常范围内,即配合度适宜。从图可以看出随着水位梯度的变化各生态型植物根际群落细菌结构具有独立的分布范围。其次,不同生态型植物根际细菌群落分布格局及其范围表现出差异性,具体表现为三棱草因其适应干湿交替的水环境波动幅度较大的立地条件而具较宽生态幅度,在排序图上具较广分布格局和范围;芦苇和香蒲在挺水界面范围内分布较为集中,在排序图上具较为相似的分布格局和范围;睡莲因其对水位深度要求较为严格使其在排序图上表现为较窄的生态幅度和分布格局。基于排序的分析结果与分类结果具一致性。

3.2 基于水位梯度的植物根际细菌群落多样性分析

3.2.1 基于单一酶切的多样性分析

依据上述聚类结果,计算不同聚类菌群中 T-RFs 的平均丰度。在此基础上定义 T-RF 片段丰度值>4%的类型为优势菌群,片段丰度值<1%的类型为偶见菌群,其余为非优势菌群[25]。采用多样性指数、片段数和片段丰度三种指标描述基于水位梯度的植物根际细菌群落多样性变异(表 1),并对其分析结果进行差异显著性检验。从表中多样性指数变化趋势可以看出,随水位梯度加深各植物根际细菌群落物种丰富度指数、均匀度指数、多样性指均呈递减趋势。结合不同菌群片段数和片段丰度和可知睡莲根际细菌群落不仅具有最丰富优势菌群片段数和最高优势菌群丰度和,而且具有最低的偶见菌群片段数和最低偶见菌群丰度和,二者综合作用使得睡莲根际细菌群落具最低均匀度指数。三棱草根际细菌群落因其具最低优势菌群片段数和较高偶见菌群片段数使其具最高群落均匀度指数。不同酶切类型相比较,*Msp* Ⅰ较其它两种酶切类型对基于水位梯度

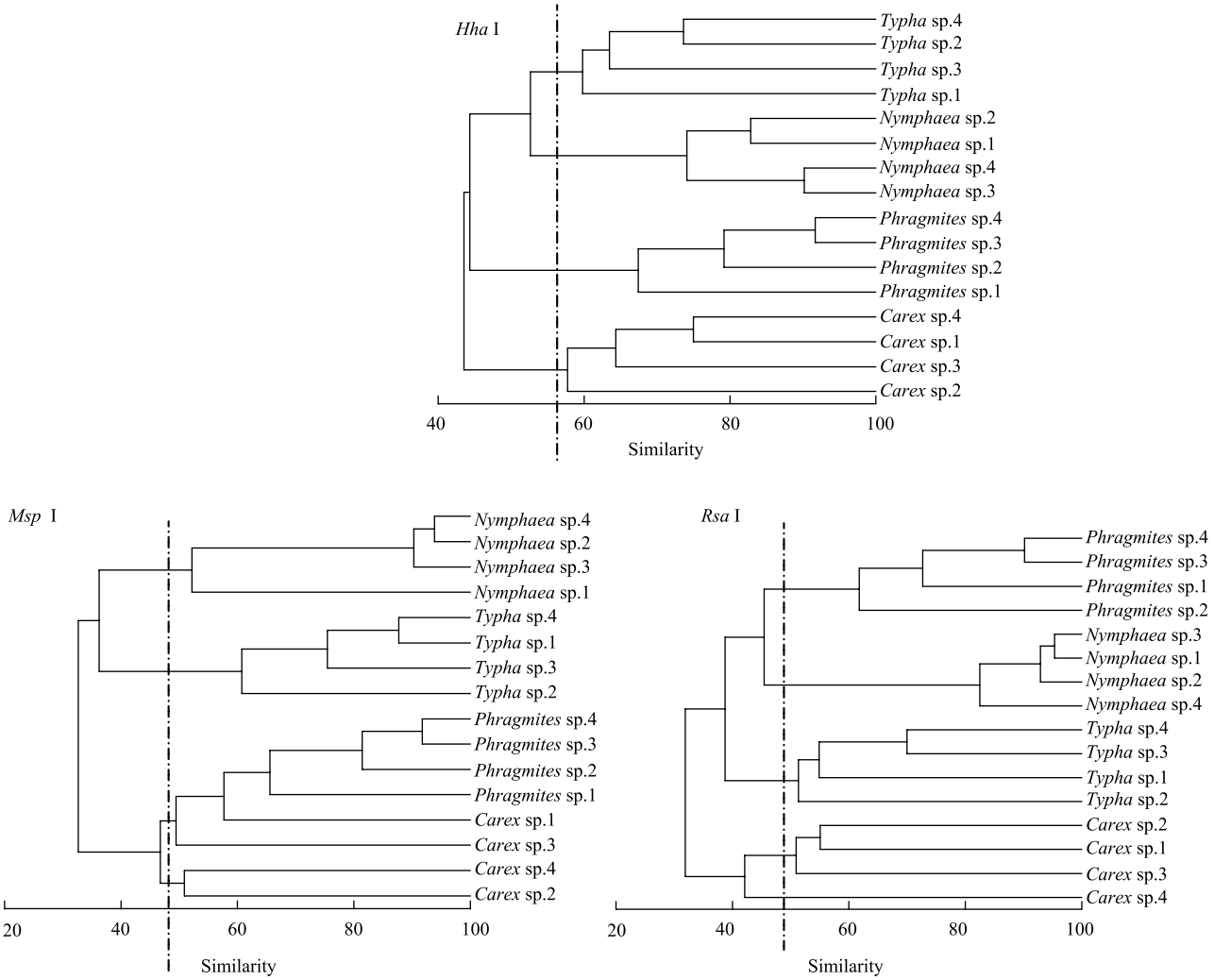


图 1　基于 T-RFLP 图谱的植物样品根际细菌群落结构的聚类分析

Fig.1　Cluster analysis of plant samples rhizosphere bacterial community structure based on T-RFLP patterns

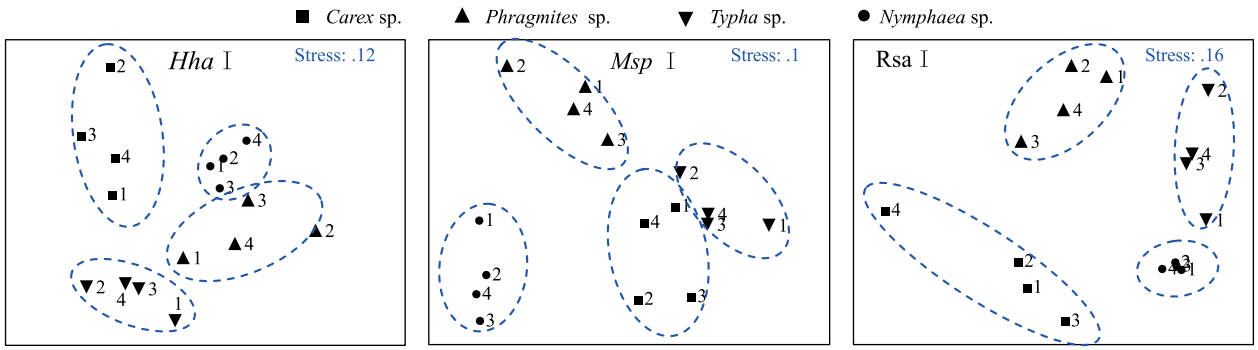


图 2　植物根际细菌群落结构的 MDS 分析

Fig.2　MDS analysis of plant rhizosphere bacteria community structure

“■”代表 *Carex* sp.;“▲”代表 *Phragmites* sp.;“▼”代表 *Typha* sp.;“●”代表 *Nymphaea* sp.

的多样性变化更为敏感;不同多样性表征参数相比较,多样性指数较片段数及片段丰度和对基于水位梯度的多样性变化更为敏感;不同多样性指数相比较,对基于水位梯度多样性变化的敏感程度依次为物种丰富度指数、均匀度指数和综合多样性指数的减小趋势。

表 1 *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ三种单一酶切的植物根际细菌群落多样性分析

Table 1 Diversity analysis of rhizosphere bacterial communities based on *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ and *Rsa* Ⅰ digestion

群落组成 Community composition		内切酶 Endonuclease	三棱草 *Carex* sp.	芦苇 *Phragmites* sp.	香蒲 *Typha* sp.	睡莲 *Nymphaea* sp.
T-RF 类型数	非优势菌群	*Hha*I	5.50±1.20ab	4.50±0.53a	6.50±0.53b	8.30±0.89c
T-RF type number	Not dominant species	*Msp*I	6.00±1.31a	5.50±1.19a	6.00±1.31a	6.75±0.89a
		*Rsa*I	4.50±0.53a	6.75±1.39b	4.75±1.58a	7.00±0.76b
	优势菌群	*Hha*I	17.00±2.93a	27.75±1.58b	15.00±2.39a	15.25±2.76a
	Dominant species	*Msp*I	17.00±3.29b	28.75±3.33d	23.25±3.06c	10.00±1.69a
		*Rsa*I	13.25±4.62a	17.75±2.55a	15.50±4.44a	12.50±2.20a
	偶见菌群	*Hha*I	24.25±13.82a	20.50±9.87a	16.50±5.04a	9.50±1.2a
	Rare species	*Msp*I	19.75±12.17b	26.50±4.17b	1.00±1.85a	1.25±1.38a
		*Rsa*I	8.25±4.03b	1.25±1.38a	9.75±4.23b	1.25±1.38a
相对丰度/%	优势菌群	*Hha*I	50.74±13.6b	32.06±5.19a	60.4±8.96b	58.98±7.06b
Relative abundance		*Msp*I	56.08±4.55b	30.31±7.28a	70.31±23.2bc	77.52±5.52c
		*Rsa*I	68.09±8.96a	72.03±12a	64.20±6.45a	73.57±6.46a
	非优势菌群	*Hha*I	37.08±6.36a	60.72±6.83b	31.16±6.86a	31.14±4.81a
		*Msp*I	30.75±6.81a	51.84±7.75b	42.43±7.92b	27.09±5.61a
		*Rsa*I	25.05±9.47a	28.30±9.88a	29.49±10.34a	29.94±2.99a
	偶见菌群	*Hha*I	9.96±2.36a	10.41±4.35b	9.15±2.89a	5.35±0.74a
		*Msp*I	13.14±7.92b	17.69±1.41b	1.65±1.92a	1.27±1.03a
		*Rsa*I	7.11±4.42b	1.60±1.17a	5.18±0.71ab	2.50±0.25a
多样性指数	Margale 指数	*Hha*I	11.00±3.83a	10.71±2.53a	6.03±1.93b	3.34±3.81c
Diversity index	Margale index	*Msp*I	8.04±3.06b	12.23±0.69c	4.71±3.05ab	1.89±1.75a
		*Rsa*I	6.66±1.48a	2.90±1.72b	7.31±2.59a	1.99±2.49c
	均匀度指数 Eveness index	*Hha*I	0.91±0.02a	0.85±0.09a	0.76±0.06b	0.78±0.14b
		*Msp*I	0.89±0.02a	0.82±0.04a	0.65±0.07b	0.45±0.07c
		*Rsa*I	0.78±0.03a	0.57±0.10b	0.53±0.13b	0.54±0.09b
	Shannon-Weaver 指数	*Hha*I	3.34±0.35a	3.19±0.57a	2.85±0.39a	2.70±0.53a
	Shannon-weaver index	*Msp*I	2.94±0.37ab	3.59±0.20b	2.50±0.64a	2.18±0.29a
		*Rsa*I	2.53±0.32a	2.43±0.21a	1.54±0.25b	1.01±0.77b

平均值±标准差;不同字母表示处理间差异显著性($P<0.05$)

3.2.2 基于多酶切综合比对的多样性分析

为进一步检验分析基于水位梯度的植物根际细菌群落多样性的变异规律,以样品数×RFs 数(16×4646)数据矩阵为原始数据得到各植物根际可培养细菌与非培养细菌的酶切组合 RFs 结果(表 2)。从表中 RFs 组合数在不同 RFs 组成类型和水位梯度控制下的不同植物类型条件下具显著差异,其中基于三种酶切的 PAT 比对 RFs 组合数量随水位梯度变异呈显著的变化趋势,即近岸带的湿生植物根际细菌 RFs 丰富度最高,由挺水植物向浮叶植物过度过程中植物根际细菌 RFs 丰富度呈减少趋势。依据可培养和非培养对三种酶切的 PAT 比对 RFs 组合进行菌种划分,采用 ANOVA 分析可以看出基于水位梯度变化的植物根际细菌群落多样性变化主要是由植物根际可培养细菌 RFs 片段数的差异引起($P<0.05$);其次基于 T-RFLP 分析中可培养 RFs 片段数占到总细菌 RFs 片段数量 4%—10%,符合可培养细菌种类低于细菌总量 1%—10%的研究结果,进一步证明了基于 T-RFLP 方法本试验结果的可靠性。基于多酶切综合多样性分析结果可客观的反应基于水位梯度变异的湿地植物根际细菌群落结构变化规律。

表 2　基于水位梯度植物根际细菌 RFs 组合数量

Table 2　Combinations RFs number of plant rhizosphere bacteria based on water level gradient

基于 RFs 组合的 PAT 比对 Based on RFs combination of PAT	湿生植物 Hygrophyte	挺水植物 Emergent macrophytes		浮叶植物 Leaved macrophyte
	三棱草 *Carex* sp.	芦苇 *Phragmites* sp.	香蒲 *Typha* sp.	睡莲 *Nymphaea* sp.
综合种的数量 Number of all species	1970.50±737.79b	1369.00±652.40ab	1708.25±150.25b	750.25±163.52a
可培养种的数量 Number of culturablel species	248.25±94.00c	103.75±15.54bc	169.25±24.69ab	44.75±21.64a
非培养种的数量 Number of unculturable species	1722.25±648.69b	1215.25±546.91ab	1539.00±140.26b	705.50±172.56a
属的数量 Number of genus	97.75±15.85b	90.00±39.29b	72.50±11.47b	32.00±3.38a
门的数量 Number of phylum	10.00±2.72b	8.75±0.88ab	7.50±1.92ab	5.50±1.77a

3.3　基于水位梯度变异的植物根际细菌群落组成特征分析

3.3.1　基于水位梯度变异的湿地植物根际菌群差异分析

(1)基于门水平的植物根际菌群差异分析

为进一步分析基于门水平的不同水位梯度下的植物根际细菌群落多样性变异特征,以样品数×属数(16×199)矩阵和样品数×RFs 数(16×4646)数据矩阵为原始数据,采用 ANOVA 分析对基于属数的门水平的细菌丰富度进行差异检验。属的结果表明 *Beta*、*Alpha*、*Gamma* 变形杆菌纲(*β*、*α*、*γ*−*Proteobacteria*)在不同水位梯度条件下由岸边向塘中心呈递减趋势($P<0.01$),其余门类不具有统计学意义的变异特征。RFs 数的结果表明 *Beta* 变形杆菌纲(*β*−*Proteobacteria*)在不同水位梯度条件下由岸边向塘中心呈现相应减少趋势($P<0.01$),其余门类不具有统计学意义的变异特征。基于 RFs 数的门水平的细菌丰富度的差异检验与属数的分析结果具有部分相似的变化趋势,但后者分辨率低于前者。*β*−*Proteobacteria* 细菌丰富度较其余门类差异性极显著,包括多种好氧或兼性细菌。

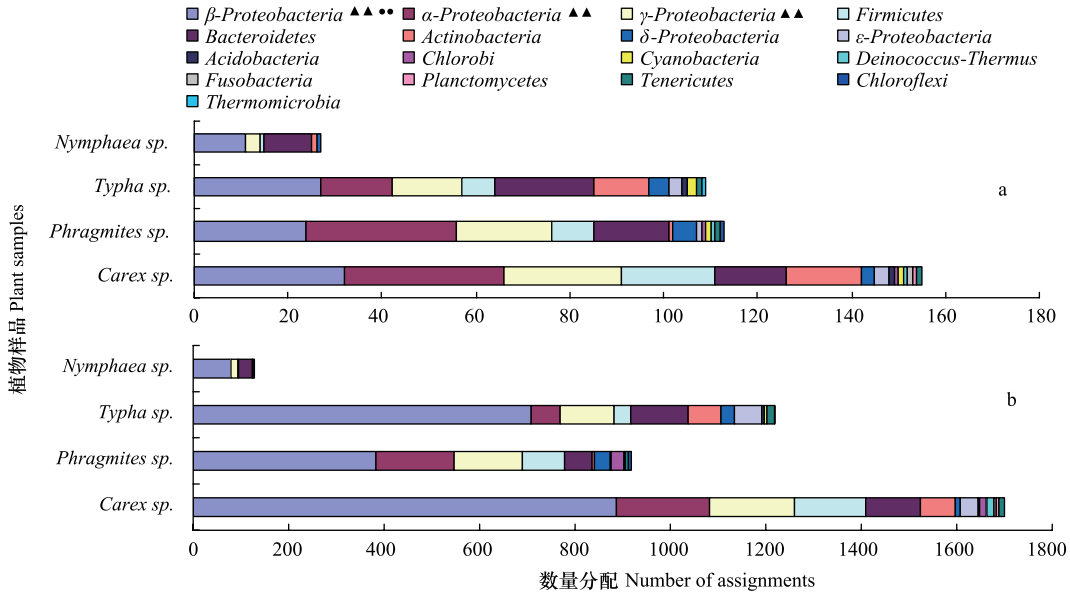


图 3　不同水位梯度下基于属数(a)和 RFs 数(b)的门水平的植物根际细菌群落多样性条形图

Fig.3　Diversity of plant rhizosphere bacterial communities in different water level gradients based on the genus numbers (a) and RFs numbers (b)

“▲▲”和“●●”分别表示图 a 和图 b 中不同水位梯度下基于门水平的同一菌群在不同植物根际细菌群落结构中的极显著差异(0.01)分布

(2) 基于属水平的植物根际菌群差异分析

基于 RFs 片段数的属水平的菌群丰富度进行差异检验,结果表明不同水位梯度条件下 *Beta* 变形菌纲(*β*-*Proteobacteria*)中具有显著差异的属为产碱杆菌属(*Alcaligenes*)($P<0.01$)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)($P<0.01$)、无色杆菌属(*Achromobacter*)($P<0.01$)、戴尔福特菌属(*Delftia*)($P=0.043$)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)($P<0.01$)、草螺菌属(*Herbaspirllum*)($P=0.027$)、罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)($P<0.01$)、*Pelomonas*($P=0.019$),且显著差异的属数随水位梯度增加呈减少趋势,其余门类中不具显著差异属。

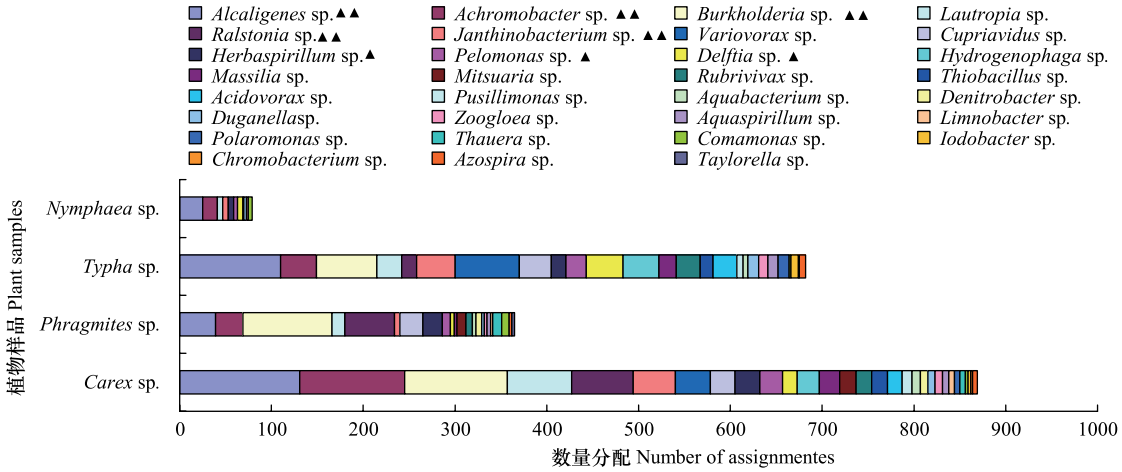


图 4 不同水位梯度下植物根际细菌群落中 *Beta* 变形杆菌纲的菌属多样性条形图

Fig.4 Bar graph showing *β-Proteobacteria* species diversity of plant rhizosphere bacteria community based on water level gradient

“▲▲”和“▲”分别表示不同水位梯度下基于属水平的同一菌群在不同植物根际细菌群落结构中的极显著差异(0.01)分布和显著差异(0.05)分布

3.3.2 基于优势属的植物根际细菌菌群组成特征分析

依据 *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ三种酶切优势片段,以 T-RF 片段丰度>4%的类型为优势菌群,筛选出不同水位梯度下的植物根际细菌菌群中优势菌属(表 4)。从表中看出,不同水位梯度下各植物根际细菌优势属呈现数量差异,其中近岸带湿生植物三棱草根际细菌优势属数量少为 3 种,低于深水位其余植物根际细菌优势属数量,芦苇根际细菌优势属数量最多,同时各植物根际细菌优势属呈现类型差异,产碱杆菌属和黄杆菌属(*Flavobacterium*)为四种植物根际细菌群落的共有优势属,伯克氏菌属为除睡莲之外三种植物根际细菌菌群的优势属,而节杆菌属(*Arthrobacter*)为除三棱草之外三种植物根际细菌菌群的优势属。由于环境因素或植物根系差异导致了芦苇和睡莲根际细菌菌群中红长命菌属(*Rubrivivax*)和二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*)等特有属的出现。

表 3 不同水位梯度下植物根际细菌群落可能优势属

Table 3 Possible dominant genera of plant rhizosphere bacteria community based on water level gradient

OUT 类型 OTU types (bp)			可能的属 Possible genus	三棱草	芦苇	香蒲	睡莲
*Hha*I	*Msp*I	*Rsa*I		*Carex* sp.	*Phragmites* sp.	*Typha* sp.	*Nymphaea* sp.
68	487	420	*Alcaligenes* sp.	+	+	+	+
87	84	304	*Flavobacterium* sp.	+	+	+	+
66	429	468	*Burkholderia* sp.	+	+	+	−
79	66	468	*Arthrobacter* sp.	−	+	+	+
205	140	468	*Rubrivivax* sp.	−	+	−	−
89	84	304	*Capnocytophaga* sp.	−	−	−	+

“+”表示优势属;“−”表示未出现.

3.4 基于水位梯度的植物根际细菌群落与水质状况的响应关系

水生态系统的水质与微生物群落结构之间存在某种联系,微生物对外部环境变化非常敏感,在一定程度

上反应水环境状况[26]。本研究区的水质参数统计特征见表 4。各水质样点的均值代表该研究区水体理化环境。将植物氧化塘各指标均值与进水水质均值相比,可看出人工湿地的 NH_4^+-N、TN、TP 均显著低于进水水质,NH_4^+-N、TN 值更是低于进水水质的十分之一,且均达到地表水环境质量标准。对氮、磷污染去除中微生物发挥重要作用[27],不同水位梯度的四种植物根际细菌群落优势属为产碱杆菌属、黄杆菌属、伯克氏菌属及节杆菌属,均为除氮特效菌,部分具有聚磷作用,且不同程度分布于四种植物根际,除氮细菌数量较多,说明植物根际细菌与水质状况具有一定响应关系。

表 4　研究区主要水质指标及水环境质量标准

Table 4　The main indicators of water quality and water environment quality standards in research region

参数 Parameter	再生水源 Reclaimed water 均值	氧化塘进水 Inflow of oxidation pond 均值	氧化塘出水 Outflow of oxidation pond 均值	水环境质量标准 water environment quality standards				
				Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
酸碱度 pH		8.578	7.919					
氧化还原电位 ORP/mV		340	380					
溶解氧 DO/(mg/L)		7.59	7.65	7.50	6.00	5.00	3.00	2.00
化学需氧量 COD/(mg/L)	25.00	17.45	19.79	15.00	15.00	20.00	30.00	40.00
氨态氮 NH_4^+-N/(mg/L)	5.00	0.135	0.125	0.15	0.50	1.00	1.50	2.00
硝态氮 NO_3^--N/(mg/L)		0.973	0.158	5.00	10.00	20.00	23.00	25.00
总氮 TN/(mg/L)	20.00	2.565	0.808	0.20	0.50	1.00	1.50	2.00
总磷 TP/(mg/L)	0.50	0.083	0.056	0.02	0.10	0.20	0.30	0.40

4　讨论

4.1　水位梯度控制下植物根际细菌群落多样性差异分析

本试验采用 T-RFLP 技术结合单一酶切及综合酶切结果分析不同水位深度的 4 种典型植物的根际细菌群落多样性差异,基于 ANOVA 方法检测表明基于水位梯度变化各植物根际细菌群落间多样性差异均具有统计学意义,试验结果显示,基于单一酶切不同植物间根际细菌群落的物种丰富度指数、均匀度指数及综合多样性指数均存在一定差异;综合三种酶切可见湿生植物三棱草根际细菌群落中菌种数量、属数量及门数量最多,其次为挺水植物芦苇和香蒲,睡莲所占数量最少。导致此差异结果的主要因素与水位深度、植物种类、根系泌氧及根际分泌物等生态因子有关[28]。

4.1.1　水位深度对植物根际细菌群落多样性差异影响

水位深度决定了植物生长分布格局[29],而不同植物类型的根际微生物多样性会有所不同,本试验中三棱草、芦苇、香蒲和睡莲根际细菌群落多样性指数、T-RFs 数量及相对丰度均存在一定差异。封晔等通过 T-RFLP 方法对神木县六道沟流域 8 种植物根际细菌群落多样性的研究结果表明,8 种植物根际细菌数量和大小均表现出一定差异[30]。赵庆节等采用 PCR-DGGE 方法对不同植物人工湿地土壤微生物特性研究同样指出芦苇与香蒲根际土壤微生物多样性存在差异,且芦苇高于香蒲[31]。同时水位条件直接影响水中基质氧的可利用率、气体扩散率[32],进而影响植物根系的生长及微生物活性。随水位深度增加,基质中含氧量减少,降低了水体及基质中有机污染物降解效率[33],导致有机负荷的相对增加带来微生物多样性的减少[34],本文 4 种植物中三棱草根际细菌群落多样性最丰富,可能由于三棱草地处干湿交替的水分环境,人工基质疏松,含氧量充足,有助于提高植物根际氧气利用率,促进基质中硝化作用与反硝化作用的偶联,加速营养物质分解,减少基质中有机负荷,增加细菌生长繁殖速率,促使其根际细菌多样性增加。冯胜等认为细菌群落多样性与水体营养水平呈负相关性[35]。同理可解释随水位深度增加,芦苇、香蒲、睡莲根际细菌多样性在属水平上呈减少趋势。武钰坤等对人工湿地芦苇和香蒲根际微生物群落多样性的研究结果表明,芦苇根际微生物具有最多的常见物种及最大的物种均匀性[36]。可见,水位深度变化会通过影响植物类型及饱和基质的含氧量来改变

微生物活性[32],间接影响湿地植物间根际环境细菌群落多样性。

4.1.2 水位梯度控制下植物根际微环境对其根际细菌群落多样性差异影响

根际微生物群落结构多样性受宿主植物的影响,可能是由于不同植物类型形成独特的根际微环境,如植物根际泌氧、分泌物等对细菌具有趋化、富集作用[37],会导致不同植物间根际细菌群落种类及数量的变化,使微生物多样性与宿主植物呈现专一性[30]。本文中基于水位梯度植物根际细菌 RFs 组合数量,湿生植物三棱草综合种的数量最多,其次为挺水植物芦苇和香蒲,睡莲最少。原因是湿地植物具有根系生物量大及通气组织发达等特点,增加植物根在饱和基质中的输氧能力。植物根际泌氧在根际还原态介质中形成氧化态的区域环境[38],促使根际形成好氧微生物生存的微氧环境[39]。根际泌氧能力与植物根系生物量及通气组织呈正相关关系[40-41],且根际泌氧速率因不同植物种类存在差异,导致植物根际土壤性质发生明显变化[6,42],从而形成根际微生物群落多样性差异。研究表明,5 月份和 8 月份芦苇根系生物量增幅均高于香蒲[43],且芦苇的泌氧能力高于香蒲[44],同时根茎型湿地植物根系生物量显著高于须根型湿地植物[45],由此进一步说明,三棱草、芦苇(根茎型)根际细菌群落属数量及门数量均高于香蒲、睡莲(须根型)。

基于属水平的植物根际细菌群落间存在一定差异,显著差异属主要包括产碱杆菌属、伯克氏菌属、无色杆菌属、戴尔福特菌属、紫色杆菌属、草螺菌属、罗尔斯通氏菌属和 *Pelomonas*,其中产碱杆菌属为专性好氧,紫色杆菌属为兼性好氧,伯克氏菌属、罗尔斯通菌属为好氧,其它均为微好氧[46],这些属的分布程度均随水位梯度加深呈递减趋势,且均与植物根泌氧能力呈正相性。不同水位梯度下植物根际细菌群落可能优势属产碱杆菌属、黄杆菌属、伯克氏菌属及节杆菌属均以好氧菌为主,符合人工湿地优势属的分布特征[47]。

植物根际分泌的有机、无机化合物是刺激根际微生物繁殖的重要能源和养分源[5],其中脂肪族和芳香族的碳氢化合物、氨基酸及糖类物质的改变会直接影响根际分泌物的种类和数量,间接影响不同植物根际间微生物的种类及数量[48],且细菌较真菌、放线菌等对植物根际分泌物具更高的敏感性及利用率[7]。植物根际分泌物对根际微生物的作用是松散的、非特异性的,主要是促进革兰氏阴性无芽胞杆菌在根际的聚积[49],本文中各植物根际优势属产碱杆菌属和黄杆菌属均为革兰氏阴性无芽胞杆菌[50],且随水位梯度加深呈丰富度减少趋势。产碱杆菌属可利用不同有机酸和氨基酸作为碳源,伯克氏菌属可氧化分解单糖、双糖、多糖,并可利用作为唯一碳源。唐利等利用连续收集装置对芦苇和香蒲根际分泌物比较分析结果表明,香蒲根际微生物数量多于芦苇[51]。不同水位梯度植物根际优势属出现共性及细菌群落相似性特征,这可能与该 4 种植物间根际微环境的相似性,促使其根际细菌群落结构呈现相似性。

4.2 湿地植物根际细菌群落组成特征与水环境质量的关系

根际微生物的存在是湿地植物进行水体修复的关键[52],细菌群落结构与水环境质量呈现协同变化特征[53]。本研究区水体中 NH_4^+-N、NO_3^--N、TN、TP 均显著低于进水水质,表明植物氧化塘对氮、磷有明显去除机制。氧化还原性质是影响碳氮磷生物地质循环的重要因素,湿地中 C、N 的去除在很大程度上受氧化还原电位的影响,Wiebner 等对人工湿地长期运行的结果得出,随着氧化还原电位升高,氨氮浓度降低[54]。湿地植物根际泌氧及分泌物会改变氧化还原电位、pH 值等根际环境,间接决定根际微生物种类和数量[55],而且不同的微生物直接作用于具体的目标污染物。在本试验中不同水位梯度控制下各植物根际细菌群落中产碱杆菌属、黄杆菌属、伯克氏菌属及节杆菌属为优势属,其中伯克氏菌属具有较强脱氮能力;节杆菌属也有固氮能力[56];产碱杆菌属具有好氧反硝化的功能,可提高人工湿地中脱氮效率。黄杆菌属是去除有机物的功能菌,可降解复杂的高分子量有机物质[57],在碳循环中起重要作用。也有研究表明产碱杆菌属等快生型细菌在有机污染物的分解代谢中起着十分重要的作用[47]。植物根际细菌优势属大多属于 *β−Proteobacteria*,其丰富度与低分子量营养物质有关。人工湿地污水处理系统是高含氮环境,大量微生物参与氮素物质的转化[58-59],不同水位梯度条件下植物根际细菌群落多样性差异促使不同植物对氮磷去除率的差异。依据不同水位梯度植物根际功能性差异属分布特征可知,对 TN、NH_4^+-N、COD 去除率由大到小表现为芦苇>香蒲>睡莲,芦苇根际特有的红长命菌属在光自养条件下亦可固氮;三棱草对 NH_4^+-N 具有很好去除率,对 TP 去除率为香蒲>芦苇>睡莲,

且对比 TN、TP 去除比率为脱氮率大于除磷率,此结果与相关文献表现一致[60-62]。因此,本研究中植物根际优势属的存在可能促进了水体碳、氮、磷等污染物降解,且不同水位梯度下各植物根际细菌群落对污染物的去除率存在差异性,其去除机制有待进一步深入研究。

5　结论

本研究采用 T-RFLP 技术分析水位梯度控制下湿地植物根际细菌群落多样性特征,并结合 ANOVA 解释了植物间根际细菌群落多样性差异,通过实验结果统计分析得出:(1)文中选取 *Hha* Ⅰ、*Msp* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ三种不同酶切产生结果一致,均为随水位梯度加深各植物生态幅逐渐变窄,根际细菌群落多样性逐渐减少,且基于三种酶切的 PAT 比对 RFs 组合数量随水位梯度变化呈相应变化趋势,其差异结果主要是由植物根际可培养细菌 RFs 片段数的变异引起。(2)不同水位梯度控制下各生态型植物根际的 *Beta* 变形杆菌纲中属水平的菌群丰富度随水位梯度增加而减少,且差异性显著,产碱杆菌属、伯克氏菌属、无色杆菌属、戴尔福特菌属、紫色杆菌属、草螺菌属、罗尔斯通氏菌属和 *Pelomonas* 均为好氧菌,其丰富度可能与各植物根系泌氧能力密切相关。湿生植物泌氧能力最强的三棱草根际属水平的菌群丰富度最高,其次为芦苇、香蒲,最少为睡莲。(3)水位梯度控制下四种植物根际细菌群落的多数优势属属于变形杆菌门,是脱氮除磷的功能性菌门,其中产碱杆菌属和黄杆菌属为四种植物根际细菌共同优势属,在碳氮循环中起重要作用,有助于人工湿地水体净化。

参考文献(References):

[1] Mausbach Maurice J, Parker W Bblake. Background and history of the concept of hydric soils // Richardson J L, Vepraskas M J, eds. Wetland Soils: Genesis, Hydrology, Landscapes, and Classification. New York: Lewis Publishers, 2001: 19-33.

[2] 曹优明, 戴涛. 菖蒲人工湿地对煤矿废水中镉的处理研究. 工业水处理, 2012, 32(7): 43-45.

[3] van Oostrom A J. Nitrogen removal in constructed wetlands treating nitrified meat processing effluent. Water Science and Technology, 1995, 32(3): 137-147.

[4] 李海燕, 王金成, 梁健. 辽东栎与油松根际土壤微生物群落结构比较研究. 土壤通报, 2010, 41(6): 1360-1364.

[5] 李稹, 黄娟, 姜磊, 徐文杰, 王其东, 陈曦. 人工湿地植物根系分泌物与根际微环境相关性的研究进展. 安全与环境学报, 2012, 12(5): 41-45.

[6] Colmer T D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. Plant, Cell & Environment, 2003, 26(1): 17-36.

[7] 李潞滨, 刘敏, 杨淑贞, 刘亮, 缪崑, 杨凯, 韩继刚. 毛竹根际可培养微生物种群多样性分析. 微生物学报, 2008, 48(6): 772-779.

[8] Jessica L M Gutknecht, Robert M Goodman, Teri C Balser. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. Plant and Soil, 2006, 289(1/2): 17-34.

[9] 王海洋, 陈家宽, 周进. 水位梯度对湿地植物生长、繁殖和生物量分配的影响. 植物生态学报, 1999, 23(3): 269-274.

[10] M Scott Smith, James M Tiedje. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. Soil Biology and Biochemistry, 1979, 11(3): 261-267.

[11] Coles Janice R P, Yavitt Joseph B. Linking belowground carbon allocation to anaerobic CH_4 and CO^2 production in a forested peatland, New York State. Geomicrobiology Journal, 2004, 21(7): 445-455.

[12] Qiu S, McComb A J. Drying-induced stimulation of ammonium release and nitrification in reflooded lake sediment. Marine and freshwater Research, 1996, 47(3): 531-536.

[13] Tillmann Lueders, Michael W Friedrich. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 320-326.

[14] Terence L Marsh. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(3): 323-327.

[15] 李献梅, 王小芬, 崔宗均. 末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP)在微生物群体分析上的应用与技术优化. 中国农业大学学报, 2009, 14(4): 1-9.

[16] 吕雪莲, 刘维达. T-RFLP 在医学微生态研究中的应用. 中国微生态学杂志, 2009, 21(3): 282-284.

[17] 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 王英, 孙波, 郝红涛, 李顺鹏. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析. 生物多样性, 2006, 14(4): 345-351.

[18] Gesche Braker, Héctor L Ayala-del-Rı oé, Allan H Devol, Andreas Fesefeldt, James M Tiedje. Community Structure of Denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea along* Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA Genes. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1893-1901.

[19] 段永红, 王铭, 孙毅, 杨武德. 高粱甲基化连锁群 A、B 的构建及甲基化位点、甲基化模式的分析. 中国农业科学, 2012, 45(18): 3699-3708

[20] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 190-197.

[21] 储昭瑞, 李相昆, 孟令威, 张杰. T-RFLP 技术在厌氧氨氧化菌群结构分析中的应用. 哈尔滨工业大学学报, 2013, 45(2): 26-30.

[22] 黄艺, 舒中亚. 基于滇池流域浮游细菌生物完整性指数的河流生态系统健康评价——以滇池流域为例. 环境科学, 2013, 34(8): 3010-3018.

[23] Ding T, Michael W Palmer, Ulrich Melcher. Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. BMC microbiology, 2013, 13(1): 1471-2180.

[24] Osborn A Mark, Moore Edward R B, Timmis Kenneth N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environmental Microbiology, 2000, 2(1): 39-50.

[25] Zhang R, Thiyagarajan Vengatesen, Qian P T. Evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis in contrasting marine environments. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(1): 169-178.

[26] 吕明姬, 汪杰, 范铮, 黄艺. 滇池浮游细菌群落组成的空间分布特征及其与环境因子的关系. 环境科学学报, 2011, 31(2): 299-306.

[27] 李智. 富氮污染水体微生物激活剂的研究与应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.

[28] George A Kowalchuk, Douwe S Buma, Wietse de Boer, Peter G L Klinkhamer, Johannes A.van Veen. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 81(1/4): 509-520.

[29] 魏华, 成水平, 吴振斌. 水文特征对水生植物的影响. 现代农业科技, 2010, (7): 13-16.

[30] 封晔, 唐明, 陈辉, 丛伟. 黄土高原六道沟流域 8 种植物根际细菌与 AMF 群落多样性研究. 环境科学, 2012, 33(1): 314-322.

[31] 赵庆节. 种植不同植物的人工湿地土壤微生物群落研究. 上海交通大学学报(农业科学版), 2011, 29(3): 47-52.

[32] 方忠梅. 水位对小叶章湿地 CO_2、CH_4排放及土壤微生物活性的影响. 生态环境学报, 2013, 22(3): 465-468.

[33] 程香菊, 陈永灿, 袁丽蓉, 赵文谦. 水体大气复氧能力研究综述. 科技导报, 2008, 26(17): 89-91.

[34] 于凤庆. 不同有机负荷条件下活性污泥微生物群落结构的演替分析[D]. 天津: 天津大学, 2012.

[35] 冯胜, 秦伯强, 高光. 细菌群落结构对水体富营养化的响应. 环境科学学报, 2007, 27(11): 1823-1829.

[36] 武钰坤, 刘永军, 司英明, 熊家晴, 王晓昌. 人工湿地不同植物根际微生物群落多样性比较研究. 生态科学, 2012, 31(3): 318-323

[37] Heinrich D, Hess D. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. Canadian Journal of Microbiology, 1985, 31(1): 26-31.

[38] 邓泓, 叶志鸿, 黄铭洪. 湿地植物根系泌氧的特征. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2007, (6): 69-76.

[39] Gilbert Bettina, Fenzel Peter. Rice roots and CH_4 oxidation: the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(14): 1903-1916.

[40] Norio Tanaka, Kentaro Yutani, Thidar Aye, K B S N Jinadasa. Effect of broken dead culms of *Phragmites australis* on radial oxygen loss in relation to radiation and temperature. Hydrobiologia, 2007, 583(1): 165-172.

[41] 刘志宽, 牛快快, 马青兰, 白晓华, 苏刘选. 8 种湿地植物根部泌氧速率的研究. 贵州农业科学, 2010, 38(4): 47-50.

[42] Visser E J W, Colmer T D, Blom C W P M, Voesenek L A C J. Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma[J]. Plant Cell & Environment, 2000, volume 23(11): 1237-1245(9).

[43] 赵建刚, 杨琼, 陈章和, 黄正光. 几种湿地植物根系生物量研究. 中国环境科学, 2003, 23(3): 290-294.

[44] 吴海明, 张建, 李伟江, 张波. 人工湿地植物泌氧与污染物降解耗氧关系研究. 环境工程学报, 2010, 4(9): 1973-1977.

[45] 陈文音, 陈章和, 何其凡, 汪晓燕, 王才荣, 陈达丰, 赖增隆. 两种不同根系类型湿地植物的根系生长. 生态学报, 2007, 27(2): 450-458.

[46] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 1-419.

[47] 李科得, 胡正嘉. 芦苇床系统净化污水的机理. 中国环境科学, 1995, 15(2): 140-144.

[48] Liao M, Xie X M. Effects of combination of plant and microorganism on degradation of simazine in soil. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(2): 195-198

[49] 申建波, 张福锁. 根分泌物的生态效应. 中国农业科技导报, 1999, 1(4): 21-27.

[50] 娄丹. 不常见的革兰氏阴性无芽胞杆菌的鉴定. 微生物学免疫学译刊, 1980, (4): 56-58.

[51] 唐利, 杨奇, 邱江平, 李旭东. 芦苇、香蒲根际分泌物及其根际效应比较分析. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2010, 26(4): 425-429.

[52] Bernard R Glick, Damir M Karaturovíc, Peter C Newell. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(6): 533-536.

[53] 汪仲琼, 王为东, 祝贵兵, 尹澄清. 人工和天然湿地芦苇根际土壤细菌群落结构多样性的比较. 生态学报, 2011, 31(16): 4489-4498.

[54] Wießner A, Kappelmeyer U, Kuschk P, Kästner M. Influence of the redox condition dynamics on the removal efficiency of a laboratory-scale constructed wetland. Water Research, 2005, 39(1): 248-256.

[55] 张淑香, 高子勤. 连作障碍与根际微生态研究Ⅱ.根系分泌物与酚酸物质. 应用生态学报, 2000, 11(1): 152-156.

[56] 江月, 周建刚, 邹煜平, 刘德立. 一种有固氮能力的节杆菌菌株的分离和初步鉴定. 华中师范大学学报(自然科学版), 2004, 38(2): 210-214.

[57] Krakat Niclas, Schmidt Stefan, Scherer Paul. Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5692-5701.

[58] 魏成, 刘平. 人工湿地污水净化效率与根际微生物群落多样性的相关性研究. 农业环境科学学报, 2008, 27(6): 2401-2406.

[59] Antonio Gelsomino, Anneke Keijzer-Wolters C, Giovanni Cacco, Jan Dirk van Elsas . Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods, 1999, 38(1/2): 1-15.

[60] 张力, 金卫红, 高锋. 空心莲子草和三棱草对海岛高含盐河道水质净化效果的研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2012, 31(4): 325-328.

[61] 刘霄, 唐婷芳子, 黄岁樑, 刘学功. 4 种湿地植物的生长特性和污水净化效果研究. 云南农业大学学报, 2013, 28(3): 392-399.

[62] 卢晓明, 赵丰, 陈建军, 张勇, 黄民生. 睡莲与梭鱼草的生理特性及脱氮除磷比较. 武汉理工大学学报, 2009, 31(23): 44-47.