

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

陈永华, 吴晓芙*, 陈明利, 张珍妮, 李科林, 王忠诚, 雷电

(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, 比较研究了人工湿地污水处理系统中植物套种模式和无植物单元在不同季节和不同单元之间根际微生物多样性。结果表明, 植物套种模式的根际微生物数量明显高于无植物模式, 夏季明显多于冬季。在三级串联的处理单元之间, 夏季根际微生物数量呈现“少-多-少”的变化规律, 冬季无明显的变化规律。UPGMA 聚类分析显示, 除冬季个别样外, 相同季节的处理均聚集在同一个分支下, 且微生物多样性指数夏季高于冬季。得到的 5 个差异序列(DF1~DF5), 经 BLAST 比较, 分别找到源性最近的已知类群, 分别为大肠杆菌、柠檬酸细菌、变形菌、产酸克雷伯菌、伯克霍尔德氏菌。BLASTX 比较发现 DF1 与分支杆菌噬菌体和解淀粉芽孢杆菌生命活动相关; DF2 是一种保守假设 ATP 结合蛋白; DF3 与蜡芽孢杆菌生命活动相关; DF4 参与微生物的分解代谢活动; DF5 与微生物通过代谢分解有机物有关。

关键词: 人工湿地; 污水处理系统; 植物套种模式; PCR-DGGE; BLAST 分析

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)08-2397-06

Analysis of Microorganism Species Diversity in Plant Intercropping Models in a Wetland System Constructed for Treatment of Municipal Sewage

CHEN Yong-hua, WU Xiao-fu, CHEN Ming-li, ZHANG Zhen-ni, LI Ke-lin, WANG Zhong-cheng, LEI Dian

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

Abstract: The selective culture method and PCR-DGGE technology were applied to analyze the number and the biodiversity of microorganism species in cells with plant intercropping models and without plants in different seasons in a wetland system constructed for treatment of municipal sewage. The results showed that the numbers of microorganisms were considerably larger in the cells with plant intercropping models than those without plants, while the number of microorganisms was apparently larger in summer than that in winter in all treatments. Along the three-sequenced treatment cells with plant intercropping models a “low-high-low” changing trend in the numbers of microorganisms in summer. The UPGMA cluster analysis showed that the treatments in the same season were clustered in the same branch except for a few samples in winter and the biodiversity index was consistently higher in summer than that in winter. Five different sequences(DF1-DF5) were obtained through BLAST analysis and retrieval. The closest known origin groups were located as *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Proteus* sp., *Klebsiella oxytoca*, and *Burkholderia* sp. respectively. The BLASTX comparison test showed that DF1 closely related to the activities of the *Mycobacterium bacillus* and the *Bacillus amyloliquefaciens*, DF2 functioned as a conservative potential ATP binding protein, DF3 related to the activities of the *Bacillus cereus* spore, DF4 was involved in catabolism metabolism of microorganism and DF5 played an important role in decomposition of organic matters.

Key words: constructed wetlands; sewage treatment; plant intercropping model; 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。研究发现微生物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]。湿地中微生物的群落特征与功能是评价人工湿地作用的重要指标之一, 近年来对人工湿地微生物的研究逐渐深入, 主要包括微生物种群时空分布、微生物酶活性、遗传多样性等^[4-6]。

式的基础上, 植物套种模式为: 8~9 月种植暖季植物, 当暖季植物到了秋末(11 月), 在地上部枯黄时, 进行暖季植物收割, 然后在暖季植物的株行间套种冷季植物, 进入冬季, 暖季植物地上部分基本枯死, 这时株行间的冷季植物已经长出, 一直到了次年春

收稿日期: 2010-08-25; 修订日期: 2010-10-22

基金项目: 环保公益性行业科研专项(200909066); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07212-001-2); 湖南省高校创新平台开放基金项目(09K055); 湖南省科技厅科技计划项目(2010SK3046); 湖南省环境科学重点学科建设项目(2006180)

作者简介: 陈永华(1977~)男, 博士后, 副教授, 主要研究方向为环境生物学, E-mail: chen Yonghua3333@163.com

* 通讯联系人, E-mail: wuxiaofu330911@vip.163.com

本研究在亚热带地区建立人工湿地植物套种模

末(5月),冷季植物逐渐完成一个生命周期,可以连根拔出一同收获,此时暖季植物的也开始萌芽长出,进入下一个暖季植物生长周期.因此,这样以后只要每年在秋末结合收割暖季植物时套种冷季植物,就可以快速实现湿地植物的季节更换,保证人工湿地植物的周年性生长.本研究通过选择性平板培养基法和 PCR-DGGE 方法比较套种植物模式和无植物模式(对照)在不同季节和不同分级之间的根际微生物多样性与种类功能,分析了微生物在人工湿地中发挥的功能,旨在为提高人工湿地冬季处理效率的提供基础数据,对于揭示人工湿地净化黑箱效应具有一定的理论意义.

1 材料与方法

1.1 材料

本实验系统采用 2 套并联三级串连人工垂直潜流湿地(图 1),植物套种模式的三级串连人工垂直潜流湿地单元标记为(2-1,2-2,2-3),无植物模式(对照)的三级串连人工垂直潜流湿地单元标记为(4-1,4-2,4-3),每级单元床体规格为:长×宽×深=5 m×2 m×1 m,填料层为蛭石.再力花(*Thalia dealbata*)、梭鱼草(*Pontederia cordata*)、美人蕉(*Canna indica*)、水葱(*Scirpus validus*)为植物套种模式的暖季植物^[7],金盏菊(*Calendula officinalis*)、油菜(*Brassicacapestris*)、水芹(*Oenanthe javanica*)、鸢尾(*Iris pseudoacorus*)为套种植物模式中套种的冷季植物^[8],植物栽植密度为 20 cm×20 cm.夏季(7月)和冬季(1月)在植物根际附近取土,采用 5 点取样法,编号为:夏季 2-1,夏季 2-2,夏季 2-3,夏季 4-1,夏季 4-2,夏季 4-3,冬季 2-1,冬季 2-2,冬季 2-3,冬季 4-1,冬季 4-2,冬季 4-3,并保存于 -20℃,以备实验.

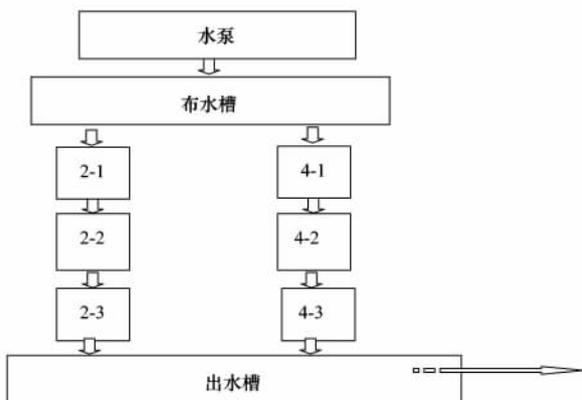


图 1 人工垂直流湿地系统流程示意

Fig. 1 Process of the vertical-flow wetland system

1.2 实验流程及运行管理

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,然后经过布水渠,均匀进入植物套种模式与无植物对照潜流处理单元,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⁻¹; TN 39.53 ~ 44.47 mg·L⁻¹; TP 2.09 ~ 2.43 mg·L⁻¹. 实验研究期间,水力负荷保持为 2.4 m³·d⁻¹,污水停留时间在实验时期内的变化范围约为 48 ~ 60 h,系统 24 h 连续运转.

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],先取新鲜的土壤样品 1 g,置于灭过菌的研钵内,加入少量无菌水,研磨 1 ~ 2 min,至土壤无大颗粒,倒入经过灭菌的 250 mL 三角瓶中.用无菌水按 10 倍稀释法做成一系列稀释液.选择 3 个连续的稀释度(10²、10³、10⁴),用稀释倒平板法进行平板接种.每个稀释度做 3 个平板,每个平板接种土壤悬液 1 mL,接种后的平板于 28 ~ 30℃ 恒温箱中培养 24 h 左右,待菌落长出后进行计数.计算公式:干土菌数(个/g) = 菌落平均数 × 稀释倍数/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 × Buffer(含 Mg²⁺),4 μL dNTP(2.5 mmol/L),2 μL 引物 GC-357F,2 μL 引物 519 R,2.5 μL 模板 DNA,0.5 μL Taq 酶(5 U/μL),34 μL ddH₂O. PCR 程序为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 ~ 35 个循环,72℃ 延伸 10 min, DGGE 电泳方法参照文献^[11].

1.3.3 DGGE 图谱的微生物多样性统计分析

(1) Shannon-Wiener 指数的计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i \quad (1)$$

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:

$$D_s = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2 \quad (2)$$

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 (Cluster Analysis)

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 条带,洗净后浸泡于 60 μL 无菌 Milli-Q 水中 24 h 以上,取 20 μL 进行 PCR 扩增,扩增产物经 DGGE 确认为单一条带后,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比较 2 种模式的微生物多样性

用选择性平板培养基法测定的人工湿地处理池土壤中细菌菌落总数如表 1 所示. LB 培养基平板法培养的不同稀释度长出的菌落情况如图 2 所示. 从表 1 可以看出:植物套种模式三级单元微生物的平均数在冬季高出无植物模式 $1.25 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$, 在夏季高出无植物模式 $1.21 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$. 说明植物套种模式的根际细菌数量在夏季和冬季都分别明显高于无植物模式. 从三级单元之间细菌数量变化来看,套种植物模式和无植物模式都呈现“低-高-低”的变化趋势,说明潜流人工湿地系统中细菌数量有沿水流方向呈先增加后减少的规律. 杨新萍等^[12]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 去除效果最好的部位也在其中部,有机物的降解基本在湿地前部与中部完成.

表 1 夏冬两季细菌数量 (以干土计) $\times 10^5 / \text{cells} \cdot \text{g}^{-1}$

Table 1 Population of microorganisms in summer and winter seasons (dry soil) $\times 10^5 / \text{cells} \cdot \text{g}^{-1}$

编号	冬季	夏季
2-1	1.56	5.38
2-2	2.09	6.10
2-3	1.60	3.73
4-1	0.55	3.71
4-2	0.73	5.56
4-3	0.38	2.31

2.2 PCR-DGGE 法比较 2 种模式的微生物多样性

将经过 PCR 后电泳检查后有条带的样品,进行

DGGE 电泳,结果如图 2 所示,用软件处理后可以做图 3. 从图 2、3 可以看出:2 种模式在不同季节之间的条带数量和位置差异很大,12 个土样中共检测到 78 种不同的条带,其中夏季的 6 个样 (除了 4-2 以外),其余样品均检测到的条带数超过了 20 个,平均为 21 个,而冬季的 6 个样平均为 8 个条带,说明夏季各处理单元的微生物种类和数目明显要高于冬季. 其中还发现 12 个样品种有很多条带的位置相似,就是说各处理单元间中存在一些相同的优势菌种^[13,14].

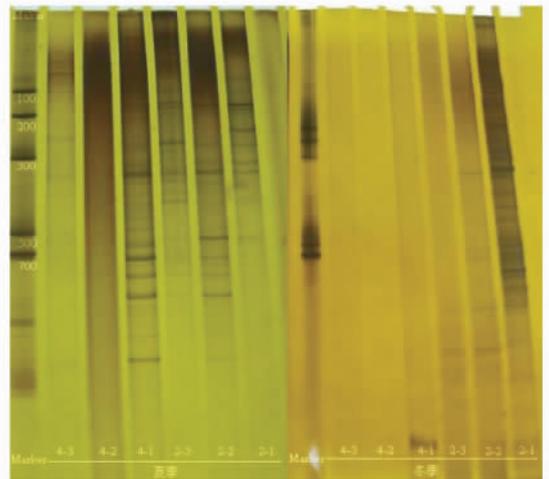


图 2 2 种模式夏季和冬季微生物 DGGE 图

Fig. 2 DGGE of microorganism in summer and winter

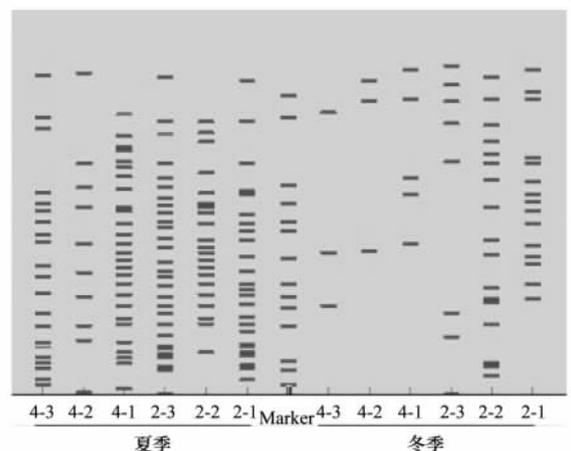


图 3 DGGE 量化图

Fig. 3 DGGE vectorization

植物套种模式与无植物模式的各处理之间的条带的数量和位置上均存在一定的差异,在夏季,植物套种模式的条带都达到 20 个以上,平均有 25 个;无植物的条带平均只有 20 条;冬季时,植物套种模式的条带都达到 8 个以上,平均有 13 条,无植物的条带最少 3 条,平均也不到 4 条,说明有植物模式的微

生物多样性在夏季和冬季都高于无植物对照. 可见, 植物模式比无植物模式的微生物群落结构复杂, 多样性更好^[15,16]. 从 2 种模式的三级单元之间的比较来看, 在夏季都存在“少-多-少”的变化规律, 在冬季, 各级之间无明显变化规律. 这一结果与前面选择性平板培养基法得到的夏季律数变化规律一致.

2.3 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细菌群落结构的相似性, 如图 4 所示. 12 个处理中除冬季 2-2 外, 相同季节的处理均聚集在同一个分支下, 夏季 2-3 和夏季 4-2 的相似性系数达到了 50% 以上, 而冬季相似性系数较高的 4-1 和 4-3 只有 33.33%, 说明夏季微生物多样性指数高. 夏季的 6 个处理基本上属于一个分支, 它的相似性系数为 22.27%, 冬季的 6 个处理除 2-2 外, 4-1、4-3、2-3 号样为一分支, 4-2 和 2-1 号样为一分支, 而它们之间的相似性却只有 5.79%, 这说明冬季各处理池中微生物群落组成间差异较大.

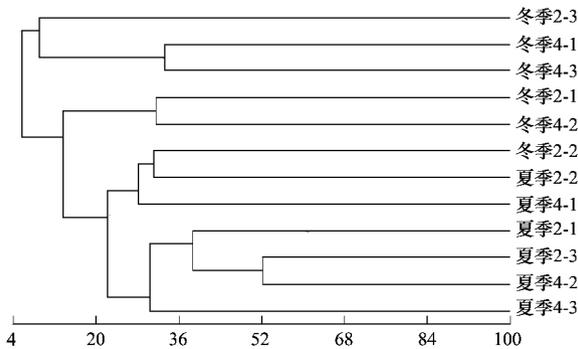


图 4 12 个土样的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of 12 soil samples

2.4 微生物香农-威纳 (Shannon) 指数和辛普森 (Simpson) 指数分析

从表 2 可以看出, Shannon 指数和 Simpson 指数, 夏季高于冬季, 植物套种模式高于无植物模式, 说明夏季微生物种类最多, 冬季最少, 植物套种模式微生物种类多比无植物模式多. 这一结果与蒋玲燕^[17] 研究结果一致, 黄德锋等^[18] 也提出植物在一定程度上提高了湿地表层微生物的多样性.

从 2 种模式的三级单元之间的比较来看, 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规律, 此结论与前面选择性平板培养基法得出的结果一致.

表 2 Shannon 指数和 Simpson 指数

Table 2 Shannon index and Simpson index

样品	Simpson 指数	Shannon 指数
冬季 2-1	0.929	2.639
冬季 2-2	0.938	2.773
冬季 2-3	0.875	2.079
冬季 4-1	0.677	1.099
冬季 4-2	0.800	1.609
冬季 4-3	0.677	1.099
夏季 2-1	0.958	3.178
夏季 2-2	0.966	3.367
夏季 2-3	0.950	2.996
夏季 4-1	0.900	2.303
夏季 4-2	0.962	3.258
夏季 4-3	0.950	2.996

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 5 个片段进行了克隆、测序分析, 其核酸测序的部分结果如下.

DF1: GCGCTGGTCTCTCTGCGCGTCCGTCAT
GAGCAAGGCATTAACCTTTACTCCCTTCTCCCCGCT
GAGACTACTTTACACCCCGAAGGCCTTCTTCATACA
CGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGC
AATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGCCCCCCGCT
GC

DF2: CAATCCTTTCTTCTGCGCGTACGTCATG
AGCAAGGTATTAACCTTTACTCCCTTCTCCCCGCTG
AAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACAC
GCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCA
ATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGCCCCCCGCTG
CCCCCG

DF3: ATGGGGCTCTCTGCGGGTACGTCATGA
GCAAGGTATTAACCTTTACTCCCTTCTCCCCGCTGAA
GTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCG
GCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATA
TTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTA

DF4: CGGAGCTCTCTGCGGGTACGTCATGAG
CAAGGTATTAACCTTTACTCCCTTCTCCCCGCTGAA
GTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCG
GCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATA
TTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTA

DF5: TACTAACTCATCTGCGGCTACGTCAT
GAGCAAAGGTATTAACCTTTACTCCCTTCTCCCCGCT
TGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATAC
ACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTG
CAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGCCCCCCG

TG

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 3、表 4 所示,

所有序列与数据库中微生物 16S rDNA 序列的相似性在 94% ~ 100% 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 3 DDRT-PCR 法分离的 cDNA 的特征

Table 3 Characteristics of cloned cDNAs isolated by DDRT-PCR

cDNA 克隆	引物组合	核苷酸同源: 序列号	相似性 /%	蛋白质同源: 序列号	E 值
DF1	(F357GC/R518)	<i>Shigella dysenteriae</i> AAMJ02000006.1	94	pG1 protein; ZP_04645459.1	5e-07
DF2	(F357GC/R518)	<i>Escherichia coli</i> AAJW02000005.1	100	Conserved hypothetical protein; AA009423.1 AE016800_28	4e-11
DF3	(F357GC/R518)	<i>Escherichia</i> sp. ACID01000033.1	97	Hypothetical protein; ZP_06213060.1	3e-09
DF4	(F357GC/R518)	<i>Shigella</i> sp. ACDL01000089.1	97	LOW QUALITY PROTEIN; ZP_05997968.1	3e-09
DF5	(F357GC/R518)	<i>Shigella flexneri</i> NC_004741.1	98	3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase; ZP_06222660.1	3e-10

表 4 在 GenBank 中的最相近菌属

Table 4 Closest species in GenBank

样品	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
相近菌属	<i>Escherichia coli</i> 大肠杆菌	<i>Citrobacter</i> sp. 柠檬酸细菌	<i>Proteus</i> sp. 变形菌	<i>Klebsiella oxytoca</i> 产酸克雷伯菌	<i>Burkholderia</i> sp. 伯克霍尔德氏菌
登录号	AM779083.1	FJ009572.1	GU075037.1	FM992868.1	EU876657.1
E 值	1e-24	1e-26	9e-24	6e-22	6e-27

DF1 的核苷酸序列与痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae* (登录号: AAMJ02000006.1) 相似性达 94%. BLASTX 比较结果发现 pG1 蛋白 (pG1 protein) 的 E 值为 5e-07 (登录号: ZP_04645459.1). pG1 protein 跟分支杆菌噬菌体和解淀粉芽孢杆菌生命活动相关, 因此推测 DF1 差异表达片段可能与某些微生物的分解代谢生命活动有关^[14,19].

DF2 的核苷酸序列与大肠杆菌 *Escherichia coli* (登录号: AAJW02000005.1) 相似性达 100%. BLASTX 比较结果发现保守假设蛋白 (conserved hypothetical protein) 的 E 值为 4e-11 (登录号: AA009423.1|AE016800_28), 是一种保守假设 ATP 结合蛋白, 因此推测 DF2 差异表达片段可能参与了微生物的 ATP 能量代谢过程.

DF3 的核苷酸序列与大肠埃希氏菌 *Escherichia* sp. (登录号: ACID01000033.1) 相似性达 97%. BLASTX 比较结果发现假设蛋白 (Hypothetical protein) 的 E 值为 3e-09 (登录号: ZP_06213060.1), 此种蛋白跟蜡样芽孢杆菌生命活动相关. 蜡状芽孢杆菌是分解卵磷脂的主要细菌. 据报道, 芽孢杆菌都有解磷的作用^[20]. 因此, 可以推测 DF3 差异表达片段可能与微生物解磷有关.

DF4 的核苷酸序列与志贺氏菌 *Shigella* sp. (登录号: ACDL01000089.1) 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, DF4 差异表达片段的功能可能是参与微生物的分解代谢.

DF5 的核苷酸序列与痢疾杆菌 *Shigella flexneri* (登录号: NC_004741.1) 相似性达 97%. BLASTX 比较结果发现 3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸合成酶的 E 值为 3e-10 (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 (riboflavin) 又名维生素 B2, 是微生物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, 参与微生物能量代谢和氧化还原反应, 可能与微生物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^[21]. DF5 片段参与微生物能量代谢和氧化还原反应, 可能与微生物通过代谢分解有机物有关.

3 结论

(1) 应用 2 种方法进行了根际微生物多样性研究. 选择性平板培养基法显示: 植物套种模式的根际微生物数量在夏季和冬季都明显高于无植物模式. 从三级单元之间变化来看, 微生物数量在套种植物模式和无植物模式都呈现“低-高-低”的变化趋势.

DGGE 方法显示:植物套种模式微生物多样性在夏季和冬季都高于无植物对照,且夏季明显多于冬季.三级单元之间的微生物数量在夏季都存在“少-多-少”的变化规律,在冬季无明显的变化规律.

(2)从 UPGMA 聚类分析不同处理间细菌群落结构的相似性来看,夏季微生物多样性指数高,冬季各处理池中微生物群落组成间差异较大.从 Shannon 指数和 Simpson 指数来看,夏季高于冬季,植物套种模式高于无植物模式.2 种模式的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.

(3)得到的 5 个差异序列,分别为大肠杆菌、柠檬酸细菌、变形菌、产酸克雷伯菌、伯克霍尔德氏菌.对序列 BLASTX 比较,发现这 5 个样分别与 PG1 蛋白,保守假设蛋白,假设蛋白,低优质蛋白,3,4-二羟基-2-丁酮-4-磷酸最为相近.DF1 差异表达片段功能跟分支杆菌噬菌体和解淀粉芽孢杆菌生命活动相关;DF2 差异表达片段功能是一种保守假设 ATP 结合蛋白;DF3 差异表达片段功能跟蜡样芽孢杆菌生命活动相关;DF4 差异表达片段功能可能是参与微生物的分解代谢;DF5 差异表达片段功能可能与微生物进行有机物分解有关.

参考文献:

- [1] Wetzel R G. Scientific foundations in Constructed Wetlands for Water Quality Improvement [M]. BocaRaton, FL: CRC Press, 1993. 3-7.
- [2] Ragusa S R, McNeven D, Qasem S, *et al.* Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms [J]. Water Reserch, 2004, **38** (12): 2865-2873.
- [3] Popko D A, Han S K, Lanoil B, *et al.* Molecular ecological analysis of planktonic bacterial communities in constructed wetlands invaded by *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitoes [J]. Journal of Medical Entomology, 2006, **43** (6): 1153-1163.
- [4] 黄德锋,李田.复合垂直流湿地氨氧化菌种群结构及活性的空间分布[J]. 环境科学, 2008, **29** (8): 2160-2165.
- [5] 陈永华,吴晓芙,何钢,等.人工湿地污水处理系统中的植物效应与基质酶活性[J]. 生态学报, 2009, **29** (11): 6051-6057.
- [6] 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 [J]. Applied Soil Ecology, 2007, **35** (3): 648-659.
- [7] 陈永华,吴晓芙,蒋丽鹃,等.处理生活污水湿地植物的筛选与净化潜力评价[J]. 环境科学学报, 2008, **28** (8): 1549-1554.
- [8] 陈永华,吴晓芙,陈明利,等.人工湿地污水处理系统冬季植物筛选与评价[J]. 环境科学, 2010, **31** (8): 1789-1794.
- [9] 乐毅全,王士芬.环境微生物学[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [10] 陈旭玉,周亚奎,余贤美,等.一种直接用于 PCR 的土壤微生物 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报, 2008, **24** (4): 33-36.
- [11] 肖勇,杨朝晖,曾光明,等. 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[J]. 环境科学, 2007, **28** (5): 1095-1101.
- [12] 杨新萍,周立祥,戴媛媛,等.潜流人工湿地处理污染河道水中有机物和氮的净化效率及沿程变化[J]. 环境科学, 2008, **29** (8): 2177-2182.
- [13] 王纪爱,黄俐,刘兴艳,等.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[J]. 玉溪师范学院学报, 2008, **24** (8): 11-15.
- [14] Stehr G, Bottecher B, Dittberner P, *et al.* The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, **17** (3): 177-186.
- [15] USEPA. A Handbook of Constructed Wetlands [R]. USEPA, 1994. 9-10.
- [16] Martin C D, Moshiri G A. Nutrient reduction in an in 2 series constructed wetland system treating landfill leachate [J]. Water Science and Technology, 1994, **29** (4): 267-272.
- [17] 蒋玲燕.修复受污染水体的潜流人工湿地微生物多样性研究[J]. 环境污染与防治, 2006, **28** (10): 734-737.
- [18] 黄德锋,李田,陆斌.复合垂直流人工湿地污染物去除及微生物群落结构的 PCR-DGGE 分析[J]. 环境科学研究, 2007, **20** (6): 137-141.
- [19] 谭文捷,李发生,杜晓明,等.解淀粉芽孢杆菌对水中丁草胺的降解及影响[J]. 环境科学研究, 2005, **18** (3): 71-74.
- [20] Asea P E A, Kucey R M, Sterart J W B. Inorganic phosphate-solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1988, **20** (4): 459-464.
- [21] Dossantos A B, Traverse J, Cervantes F J, *et al.* Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, **89**: 42-52.