

文章编号: 1003-8701(2015)04-0104-04

再力花生物湿地床氮磷去除过程中 根系微生物群落结构解析

刘勇波, 王 骥, 张兰英*

(地下水资源与环境教育部重点实验室/水资源与水环境吉林省重点实验室 / 吉林大学环境与资源学院, 长春 130021)

摘 要:生物湿地床作为富营养化水体生态修复技术的重要组成部分,具有良好的发展潜能,其应用的关键是优选适宜的植物种类,并维持较高的污水净化能力。目前,国内外对湿地床根系微生物的群落结构与优势种群组成及变化研究甚少。本文利用变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)对再力花湿地床不同根系微生物群落结构进行了解析。结果表明,腐根和黄根间具有较高相似度种群,而黄根、腐根与幼根相似度较低。微生物种类在腐根根系最为丰富,幼根最少。*Clavibacter*、*Clostridium*、*Mesoflavibacter*、*Brevundimonas*、*Chromobacterium*在生物湿地床去除污染物的过程中起到重要作用,为主要功能菌群。研究结果对应用生物湿地床净化水体中氮、磷具有一定的参考价值和理论意义。

关键词:再力花;湿地床;微生物;多样性

中图分类号:S154

文献标识码:A

Analysis of Microbial Community Structure in The Process of Nitrogen and Phosphorus Removal in *Thalia Dealbata* Bio-Rack Wetland

LIU Yong-bo, WANG Ji, ZHANG Lan-ying*

(College of Environment and Resource, Jilin University /Key Laboratory of Underground Water Resources and Environment, Ministry of Education /Key Laboratory of Water Resources and Environment of Jilin Province, Changchun 130021, China)

Abstract: As an important part of ecological remediation technology for eutrophication water, bio-rack wetland has a good development potential, and the keys to its application are selecting the appropriate plant species and maintaining a high sewage purification capacity. At present, there are few researches on microbial community structure and composition and changes of dominant population in root system of bio-rack wetland. In this paper, the microbial diversity of different roots in *Thalia dealbata* bio-rack wetland was analyzed through PCR-DGGE. The results showed that, rotted roots and yellow root had a high similarity in microbial populations, while the young root and yellow root, rotted roots had a low similarity. The microbial species of rotted roots were abundant, but relatively young root had few. *Clavibacter sp.*, *Clostridium sp.*, *Mesoflavibacter*, *Brevundimonas sp.* and *Chromobacterium sp.* played an important role in the removal of contaminant for bio-rack wetland. The research results have a certain reference value and theoretical significance for the application of bio-rack wetland to purify the water body.

key words: *Thalia dealbata*; Bio-rack wetland; Microorganism; Diversity

收稿日期: 2015-04-19

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07101-012009ZX07101-09); 国家高技术研究发展计划项目(2005AA60101005)

作者简介: 刘勇波(1975-), 男, 在读博士, 研究方向: 环境生物技术。

通讯作者: 张兰英, 女, 教授, 博士生导师, E-mail: renhejun@jlu.edu.cn

湿地处理系统已在工业废水污染控制、农业面源污染修复及湖泊治理等领域作为优先选择的技术。特别是农业面源污染方面, 由于传统处理方法的缺陷, 湿地处理系统的研究具有更显著的现实意义^[1]。

生物湿地床技术^[2], 是近几年出现的一种新的湿地系统类型。该系统用PVC(聚氯乙烯)管作为

生物框架替代土壤填料。在生物框架内种植水生植物,并结合附着微生物,来增强污染物从系统中去除的效能^[3]。相较于人工湿地、生态砾石床等,该方法已被证明具有良好的发展潜能^[4]。

目前,生物湿地床作为异位生态修复技术的重要组成部分,越来越受到关注。多数研究表明,优选适宜生物湿地床生境的植物种类、维持较高的污水净化能力是其应用的关键。再力花是多年生挺水植物,已广泛用于湿地系统中。王骥等^[5]比较了再力花与菖蒲生物湿地床对低污染河水氮、磷的净化效果,表明再力花湿地床对TN(总氮)、TP(总磷)的净化效果好于菖蒲湿地床,并且污染物质的去除主要是由根际微生物的作用。然而关于生物湿地床根系微生态方面的研究甚少,对污染物去除过程中微生物的群落结构与优势种群组成及变化仍不清楚。

本研究以再力花生物湿地床为对象,在系统稳定运行的基础上,利用变性梯度凝胶电泳技术^[6-7](DGGE)分析了再力花根系不同生长阶段根系微生物种群的多样性指数、相似性系数和优势群落等信息。并进一步探讨了再力花生物湿地床系统去除水中氮磷过程中,不同时期根系微生物群落的演变。

1 材料和方法

1.1 试剂

UltraClean[®]公司土壤DNA提取试剂盒(Bio Med);丙烯酰胺/双丙烯酰胺(37.5:1),乙二胺四乙酸(EDTA),十二烷基磺酸钠(SDS),溴化乙锭(EB)均为分析纯。

1.2 仪器

TDL-低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),变性梯度凝胶电泳系统(Bio-Rad neode system);凝胶成像系统(Bio-Rad Quantity one system),PCR仪(Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 总DNA提取及PCR扩增

随机取幼根、黄根、腐根三种生长状态的根系,按UltraClean[®]公司土壤DNA提取试剂盒说明书提取总DNA。利用细菌16S rDNA基因V3区特异性引物F338:(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')和R518:(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'),进行降落式PCR(多聚酶链式反应)扩增。

1.3.2 DGGE和群落解析

参照文献[8]的方法进行DGGE分析,对图谱中优势条带回收测序后,在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库进行比对。采用Pielou index (E,均匀度指数)、Shannon-Weiner index (H,多样性指数)、Simpson index (D,优势度指数)评估再力花根系微生物群落结构多样性。

1.3.3 实验系统及运行

实验系统(图1)由小型有机玻璃缸(长50 cm×宽40 cm×高40 cm,有效水深38 cm)及20根PVC管(高40 cm×直径9 cm)组成,再力花植物栽种PVC管中,PVC管表面钻有20 mm小孔,以保证水力流通。进水取自河水,其全年TN浓度平均4.36 mg/L;TP平均0.167 mg/L;COD_{mn}(化学需氧量高锰酸盐指数)平均8.31 mg/L。实验于温室内持续运行150 d(7月~12月)。

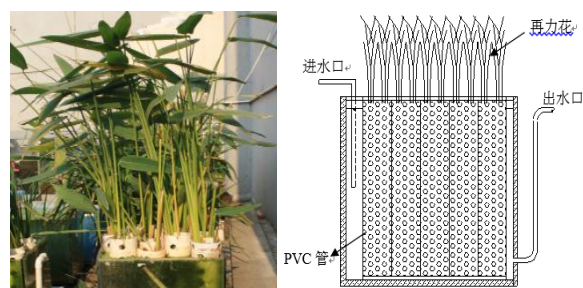


图1 再力花生物湿地床构建示意图

2 结果与分析

2.1 再力花不同生长阶段对水中氮、磷污染物的去除效果

由图2可以看出,TN月均出水浓度在1.69~5.41 mg/L之间波动,平均值为3.05 mg/L。TN去除率范围在40%~78%之间,而空白则在15%~32%间变动。TP月均出水浓度在0.124~0.177 mg/L范围内,平均值为0.154 mg/L。湿地床TP去除率范围在54%~86%之间,显著高于空白($p <$

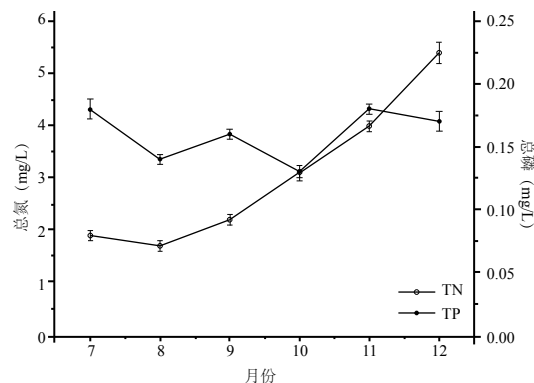


图2 再力花生物湿地床月均出水水质变化图

0.05)。

2.2 DGGE 分析

将再力花根系不同生长阶段(幼根与腐根、黄根)的根系微生物总 DNA 进行 PCR 扩增,进行 DGGE 检测后,结果如图 3,各条带所对应的光密度如图 4。图谱中每一条带代表一种微生物类群,条带数目反映了微生物的多样性^[9]。本试验腐根可检测到 18 条带,黄根可检测到 14 条带,幼

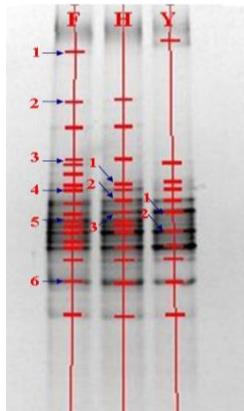


图3 不同根系 DGGE 图谱
(F:腐根;H:黄根;Y:幼根)

根 11 条带。表明再力花在这些生长阶段根系微生物种群组成丰富。但对比来看,在种类上差别明显,表现为腐根根系最多,幼根最少。这种差别可能与不同根系间输氧能力及根系分泌能力有关^[10]。根据图 3 中各条带的位置和图 4 中各条带所对应的光密度,可以确定生物湿地床系统中不同生存状态根系微生物的数量和种群关系,进而分析微生物的群落结构变化。

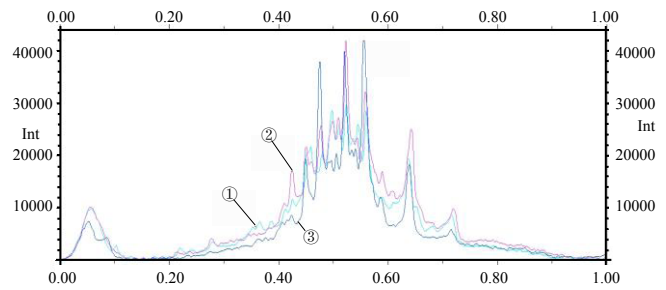


图4 三条泳道上的条带的光密度
腐根(①);黄根(②);幼根(③)

2.3 微生物群落多样性分析

Shannon-Weiner 指数, Pielou 指数, Simpson 指数分别用来考察微生物群落的丰度(生物多样性),均匀度,优势度,结果如表 1 所示。幼根中微生物多样性最差,均匀度最低,但优势度最大。

而腐根则正好相反。说明在幼根中,微生物群落结构较为单一,其原因可能是幼根放氧能力比较强,导致好氧微生物形成了优势菌群;而腐根自身无法提供氧气,其特有的根际结构使好氧、厌氧微生物均能繁殖,而表现出较复杂的多样性,同时也导致腐根的优势度较差,但均匀度较高。

表 1 不同根系微生物群落多样性分析表

样品名称	条带数	Shannon-Weiner 指数	Simpson 指数	Pielou 指数
腐根	18	2.781 51	0.930 957	0.962 336
黄根	14	2.572 17	0.916 435	0.958 317
幼根	11	2.387 84	0.894 672	0.930 95

2.4 植物根系优势菌群同源性比较

对 DGGE 图谱中的优势条带测序,并在 GenBank 数据库用 Blast 进行检索与同源性分析,得到

表 2 优势条带 DNA 序列的比对结果

条带标号	GenBank 数据库中最相近的菌种名称	相似性 (%)	登录号
F1	<i>Tolomonas auensis</i> DSM 9187 chromosome, complete genome	93	NC 012691.1
F2	<i>Streptomyces</i> sp. S4, WGS project CADY00000000 data, contig00086.whole genome shotgun sequence	100	CADY01000081.1
F3	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. sepedonicus chromosome, complete	98	NC 010407
F4	<i>Streptomyces</i> sp. S4, WGS project CADY00000000 data, contig00086, whole genome shotgun sequence	100	CADY01000081.1
F5	<i>Clostridium sticklandii</i> DSM 519 chromosome, complete genome	95	NC 014614.1
F6	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 chromosome, complete genome	94	NC 005085.1

续表 2

条带 标号	GenBank 数据库中最相近的菌种名称	相似性 (%)	登录号
H1	<i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i> S86 contig00081, whole genome shotgun sequence	93	AFOE01000057.1
H2	<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568 contig00665, whole genome shotgun sequence	92	ADUI01000302.1
H3	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 chromosome, complete genome	94	NC 005085.1
Y1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20480 DNA, contig: CTG005, whole genome shotgun sequence	94	BADX01000005.1

与所测序列具有高度同源性的细菌种类见表 2。

Y1 所代表的细菌可以被确定为 *Pseudoalteromonas* sp.。此细菌需氧生长,具有分解复杂有机物,脱氮除磷的能力^[11]。此细菌在植物幼根中为优势菌群,而未出现在黄根和腐根中,说明幼根对氮的硝化过程起着重要的作用。在腐根和黄根中检测到的优势菌群为 *Clavibacter* sp.、*Clostridium* sp.、*Mesoflavibacter*、*Brevundimonas* sp.、*Chromobacterium* sp.,其中存在好氧、兼性厌氧菌,如 *Streptomyces* 是一种含氮杂环化合物降解菌^[12],*Clostridium* 有脱氮作用^[13],*Brevundimonas* 和 *Mesoflavibacter* 可有效降解有机物^[14-15],*Chromobacterium* 是反硝化细菌^[16],这说明黄根和腐根对于生物湿地床系统中污染物质的去除起到关键作用。

2.5 种群相似度分析

进一步分析种群相似性表明,不同生长阶段根系群落结构相似度都在 50% 以上,其中腐根和黄根相似度为 72.2%,说明发育成熟的根系,其根际环境较为稳定。而幼根与腐根、黄根相似度较低,分别为 51.7% 和 56.9%,说明根际在发育过程中,供氧量的减少,导致根际环境经历了显著变化。

4 结 论

再力花湿地床氮磷去除过程中,其根系微生物群落结构变化显著。在种群相似度方面,腐根和黄根较高,幼根与黄根、腐根差别明显。在微生物种类方面,腐根最多,幼根最少。*Clavibacter*、*Clostridium*、*Mesoflavibacter*、*Brevundimonas*、*Chromobacterium* 在生物湿地床氮磷去除过程中起到重要作用,为主要功能菌群。

参考文献:

- [1] 卢少勇,金相灿,余 刚. 人工湿地的氮去除机理[J]. 生态学报,2006,26(8):2670-2677.
- [2] 刘光钊. 水体富营养及其藻害[J]. 北京:中国环境科学出版社,2005.
- [3] 谯 华,周从直,谢有奎,等. 湖泊富营养化的形成机理与

防治对策[J]. 环境科学导刊,2007,26(6):45-48.

- [4] 顾启华. 富营养化水体中藻类水华成因分析与研究[D]. 天津:天津大学,2007.
- [5] 王 骥,张兰英,卢少勇,等. 再力花/菖蒲生物湿地床去除河水中氮磷的试验[J]. 吉林大学学报(地球科学版),2012,42(S1):408-414.
- [6] 朱扬玲. 采用 PCR-DGGE 方法研究浙江玫瑰醋酿造过程中的微生物多样性[D]. 杭州:浙江工商大学,2009.
- [7] 王丽平,郑丙辉. 天津新港区潮间带沉积物细菌群落结构[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(3):303-306.
- [8] 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.
- [9] Fernández-Gómez M J, Nogales R, Insam H, et al. Use of DGGE and COMPOCHIP for investigating bacterial communities of various vermicomposts produced from different wastes under dissimilar conditions[J]. Science of the Total Environment, 2012(414): 664-671.
- [10] 李林锋,年跃刚,蒋高明. 植物吸收在人工湿地脱氮除磷中的贡献[J]. 环境科学研究,2009,22(3):337-342.
- [11] 迟明磊,阚光锋,史翠娟,等. 一株南极细菌(*Pseudoalteromonas* sp.)对模拟海水养殖水体的净化作用[J]. 极地研究,2010,22(3):313-320.
- [12] Li J, Cai W, Cai J. The characteristics and mechanisms of pyridine biodegradation by *Streptomyces* sp.[J]. Journal of hazardous materials, 2009, 165(1): 950-954.
- [13] Wang B, Li T, Zhu N, et al. Nitrogen removal of ramie stalk treated by acid wastewater combined with *Clostridium thermocellum* and the kinetic study of pyrolysis[J]. Bioresource technology, 2013(129): 1-6.
- [14] Shetti A A, Kaliwal B B. Biodegradation of imidacloprid by soil isolate *Brevundimonas* sp. MJ15[J]. International Journal of Current Research, 2012(4): 100-106.
- [15] Asker D, Beppu T, Ueda K. *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* gen. nov., sp. nov., a novel zeaxanthin-producing marine bacterium of the family Flavobacteriaceae[J]. Systematic and applied microbiology, 2007, 30(4): 291-296.
- [16] Bazylnski D A, Palome E, Blakemore N A, et al. Denitrification by *Chromobacterium violaceum*[J]. Applied and environmental microbiology, 1986, 52(4): 696-699.

(责任编辑:范杰英)