

基于 T-RFLP 和因子分析的香蒲根际细菌群落研究

马栋山^{1,2}, 熊薇^{1,2}, 张琼琼^{1,2}, 郭羿宏^{1,2}, 赵文吉^{1,2}, 郭逍宇^{1,2*} (1.首都师范大学资源环境与旅游学院, 北京 100048; 2.北京市城市环境过程与数字模拟重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 北京 100048)

摘要: 以北京市永定河王平湿地为研究对象,应用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)对王平湿地再生水补水口及其远离补水口的香蒲根际细菌和氨氧化细菌(AOB)的群落结构及多样性变化进行分析,在此基础上结合 MiCA3 比对、典范对应分析(CCA)和多元统计中因子分析(FA),解析湿地不同空间细菌群落功能特性的变化.结果显示再生水补水口细菌群落各多样性指数均明显低于远离补水口细菌群落,而氨氧化细菌群落则呈现相反趋势.基于传统的 T-RFLP 片段 MiCA3 比对、CCA 和 FA 相结合的分析表明:对细菌群落,占再生水补水口细菌群落总丰度 55.6%的菌群与 150bp 代表的鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)具相似净化功能,并与总有机碳生物化学循环过程具密切关系,其次占再生水补水口上游细菌群落总丰度 75.5%的菌群与 81bp 为代表的假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和 *Geitlerinema* sp.具相似净化功能,并与氮的生物化学循环过程具密切关系.占再生水补水口下游细菌群落总丰度 68.7%的菌群与 138bp 代表的小单孢菌属(*Micromonospora* sp.)具相似净化功能,同时与重金属 Cu、V、和 Ti 生物化学循环具密切关系.对氨氧化细菌,266bp 受铵态氮影响较大,占再生水补水口氨氧化细菌群落总丰度 65.5%的菌群与 266bp 代表的 *Nitrosomonas* sp.具相似的生境特征,适合在高氨环境中生长;与 58bp 所代表的 *Nitrosospira* sp.具相似功能特性菌群丰度在远离补水口样点中较前者呈现显著增加趋势,表征该类菌群适合在相对低氨环境中生长.

关键词: 因子分析(FA); 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术; 再生水; 根际细菌

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2014)10-2684-08

The research of cattail rhizosphere bacteria community based on T-RFLP and FA. MA Dong-shan^{1,2}, XIONG Wei^{1,2}, ZHANG Qiong-qiong^{1,2}, GUO Yi-Hong^{1,2}, ZHAO Wen-Ji^{1,2}, GUO Xiao-yu^{1,2*} (1.College of Resources Environment and Tourism, Capital Normal University, Beijing 100048, China; 2.Beijing Municipal Key Laboratory of Resources Environment and GIS, Beijing 100048, China). *China Environmental Science*, 2014,34(10): 2684-2691

Abstract: Water reclamation and reuse have been actively promoted in Beijing, but the potential influences of reclaimed water on the structure and function of microbial community were still poorly understood. Therefore, communities of both bacterial and ammonia oxidizing bacteria in cattail rhizosphere between the samples of reclaimed water outfall (RWO) in the Wang ping Wetland of Yong ding River, Beijing and far from the reclaimed water outfall (FRWO) were compared. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) was conducted to quantitatively detect the changes of bacterial and ammonia bacterial community structures and diversity. Then, Microbial Community Analysis III, Canonical Correspondence Analysis (CCA) and Factor Analysis (FA) were used to investigate the changes of bacterial and ammonia bacterial community functions in different water qualities. The results were as followed: samples were classified according to the disturbance degree of reclaimed water. The bacterial diversity of RWO was significantly lower than that of FRWO, while the ammonia oxidizing bacterial diversity of RWO was higher than that of FRWO. As for bacteria, the function of root-attached phylotypes in RWO samples, which accounted for 55.6% of the bacterial community, was similar to the *Sphingomonas* sp. by 150-bp T-RFs. This function might be closely related to the total organic carbon in the biological chemical cycle. The major phylotypes from upstream samples had the same function with *Pseudomonas* sp. and *Geitlerinema* sp. by 80-bp T-RFs, whose proportion was 75.5% of the bacterial community, and the function was closely related to nitrogen in the biological chemical cycle. The major phylotypes from downstream samples had the same function with *Micromonospora* sp. by 138-bp T-RFs, whose proportion was 68.7% of the bacterial community, and the

收稿日期: 2014-01-25

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)

* 责任作者, 副教授, xiaoyucnu@126.com

function was closely related to metals such as Cu, V and Ti in the biochemical cycle. For ammonia oxidizing bacteria, the function of root-attached phylotypes in RWO sample, which accounted for 65.5% of all the ammonium bacterial community, was similar to the *Nitrosomonas* sp. by 266-bp T-RFs living in high ammonium environment. The major phylotypes from FRWO had the same function with *Nitrospira* sp. by 58-bp T-RFs living in low ammonium environment.

Key words: factor analysis; terminal restriction fragment length polymorphism; reclaimed water; rhizospheric bacteria

T-RFLP 分析较 DGGE、SSCP 或 ARDRA 等方法具有分析精细、分析能力强、易于自动化等优势,另外通过 ABI 自动测序仪对任何一末端限制性片段的测序结果均可与 Internet 数据库 (<http://www.cme.msu.edu>) 的数据进行比较分析^[1]. 已有学者成功应用 T-RFLP 技术进行菌种的鉴定、湿地、农田、水体等多生态环境中微生物群落多样性及其动态变化研究^[2]. 但对环境样品进行 T-RFLP 分析时,可产生大量的酶切片段,其中 80%~90% 的酶切片段(T-RFs)属于非培养片段或数据库信息不全而无法比对到种属特征,因而无法对该片段进行深入分析. 多元统计特征分析因其在海量数据中挖掘数据的内在规律方面有较强的优势,因而得到了人们的重视. 已有学者初步尝试借用统计学方法对 T-RFLP 分析中酶切片段进行分析^[3].

再生水作为北京市稳定的第二新型水源,在维持河湖景观、恢复河湖生态等方面发挥了重要作用,而再生水水质特性决定了其城市河湖景观补水存在多种负面生态环境效应^[4]. 以氨氮为河道水体富营养化主控因素的再生水补水河湖湿地水污染防治成为湿地研究的热点问题之一^[5]. 人工湿地具有低投资、低能耗、低处理成本和脱氮除磷功能,是目前再生水厂河湖景观补水之前普遍采用的水质净化方式. 湿地再生水处理机理不仅体现在植物通过吸收作用去除氮、磷等污染物,更体现在植物通过根际分泌物影响系统中微生物特性进而影响系统处理效果^[6]. 湿地植物根际微生物群落结构与功能随湿地植物种类、季节及湿地类型等因素的变化而变化^[7]. 湿地补水水源水质的好坏同样影响植物根际微生物功能和生物过程^[8]. 大量文献分析了氨氧化细菌在水体、底泥、农田等诸多环境中群落结构及其多样性特性^[9-10]. 但对水生植物根

际氨氧化细菌群落组成及多样性的研究尚不多见. 基于此本文拟借助于因子分析(FA)、去除势典范对应分析(CCA)等多元统计分析方法,结合 T-RFLP 技术产生的大量 T-RFs 片段构建的多样性指数和 PAT 比对结果等常规分析方法对王平湿地再生水补水口、远离补水口香蒲根际细菌和氨氧化细菌群落多样性及其结构特征进行对比研究,为再生水补水湿地植物根际微生物群落净化机理提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 研究区概况

王平湿地(39°58.580'E, 115°58.930'N)西起王平沟口,东至南涧沟口,全长 1050m,属门头沟永定河段. 王平湿地系统内水生植物主要包括香蒲、芦苇、浮萍等,其中,香蒲的覆盖度可达 70%~90%. 采样点位于门头沟王平村左岸附近. 再生水主要来源于王坪村电厂和周边的居民生活区,再生水排放量约为 0.9 万 t/a.

1.2 样品采集及理化指标分析

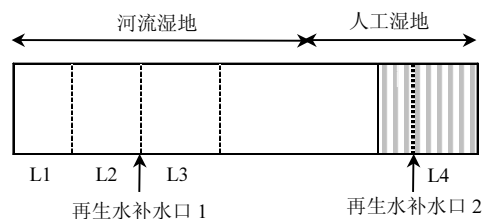


图 1 北京市王平湿地采样点分布示意

Fig.1 Distribution of sampling sites in Wangping Wetland in Beijing

选取王平湿地不同处理区植物香蒲为研究对象,分别取河流湿地再生水补水口的上游点位 L1(补水口上游 200m),再生水补水口 L2 以及补

水口下游 300m 处的 L3;人工湿地再生水补水口位点 L4(距离 L2 位点 1000m)(图 1).采样时间 2012 年 9 月,去除植物根系上的动植物残骸及石块等非底质杂物,收集附着在根系上的底泥作为样本.每个点位设 5 个平行.采集的样品装在干净密封的聚四氟乙烯塑料袋中,

于 4℃ 下保存并及时送回实验室,每个位点的 5 个平行样等量混合后最终成为一个样点,共计四个样点,分别记为 L1、L2、L3、L4^[11].样品分两部分处理:一部分进行理化指标分析,总氮(TN)采用凯氏定氮法,总磷(TP)采用碱熔—钼锑抗分光光度法,总有机碳(TOC)采用重铬酸钾氧化—分光光度法测定,铵态氮采用 2mol/L KCl 浸

提—靛酚蓝比色法测,氧化还原电位采用 ORP 仪直接测量,重金属采用原子吸收光谱法,具体测定结果见表 1.剩余根际土壤样品于-20℃ 下保存,用于微生物群落结构分析.

1.3 基于 T-RFLP 的微生物群落结构分析

1.3.1 DNA 提取 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.

1.3.2 PCR 扩增 PCR 技术采用史青应用 T-RFLP 技术分析滇池污染水体的细菌群落技术^[12]进行扩增.

表 1 不同样点香蒲根际土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of cattail rhizospheric soil in different plots

参数	L1	L2	L3	L4	参数	L1	L2	L3	L4
TN(mg/kg)	2.19	2.43	1.66	1.44	Fe(μg/kg)	66.64	54.98	71.42	50.31
TP(mg/kg)	0.48	0.43	0.75	0.38	Cu(μg/kg)	0.09	0.09	0.24	0.13
ORP(mV)	-9.40	-114.00	13.80	-145.40	Cd(μg/kg)	0.02	0.01	0.01	0.01
TOC(mg/kg)	1.99	3.31	6.59	1.45	V(μg/kg)	0.22	0.17	0.29	0.19
NH ₄ ⁺ -N(mg/kg)	4.27	19.61	4.67	1.28	Ti(μg/kg)	9.33	5.93	11.85	7.89

1.3.3 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析 分别采用 *Msp* I、*Hha* I、*Hae*III 对荧光 PCR 产物进行酶切.在 37℃ 下放置 3~5h.然后在 65℃ 条件下温浴 15min 使酶失活.随后将酶切产物送至天根生物技术有限公司进行基因扫描(GeneScan),得到 T-RFLP 图谱.

1.3.4 氨氧化细菌克隆文库的建立和测序 采用王亚男等^[13]的直接法克隆和测序分析,取总 DNA,进行 PCR 扩增、克隆、测序.

1.4 数据处理与分析

用 Peak Scanner 进行分析.舍去小于 50bp 和大于 500bp 的片段.对于细菌,由于相对数量过小的限制性末端片段(T-RFs)不会对群落的特性产生明显的影响^[14-16],故在本分析中舍去了相对数量<1%的 T-RFs,然后分别计算图谱中每一个峰的峰面积与所有峰总面积的比值,将每个 T-RF 所占的百分比作为权重导入 Primer 软件,聚类方法选择组间平均距离法,距离选择平方欧氏距离,

做出聚类分析图.综合采用 Peak Scanner、CanoDraw for Windows、primer 和 Excel2007 软件对数据进行分析,得出聚类图、优势菌种、多样性指数以及 CCA 排序.

2 结果与讨论

2.1 基于 T-RFLP 谱图的聚类分析

把采集样品基于 T-RFLP 微生物群落结构分析的谱图进行预处理之后,采用 Primer 分析结果如图 2(a)所示.以相似性 50%为标准,可以将细菌各样点分为三类:细菌类群 B I 由位于再生水补水口上游位置的 L1 样点组成,类群 B II 由再生水补水口 L2 与 L4 样点组成,类群 B III 是位于再生水补水口下游位置 L3 样点构成;如图 2(b)所示,以相似性 32%为标准,可以将氨氧化细菌各样点分为两类:氨氧化细菌类群 AOB I 包含远离再生水补水口 L1 和 L3 样点;氨氧化细菌类群 AOB II 则包含再生水补水口 L2 和 L4 两样点.

从聚类结果可知,细菌类群以受再生水干扰程度的强弱而进行分群并类,不同湿地类型 L2 与 L4 因受再生水补水口水质影响同样归为一类.与氨氧化细菌群落的分类结果相比,细菌群落对环境条件的变化较氨氧化细菌群落结构更为敏感,可能与氨氧化细菌群落主要由环境条件中不同形态氮素浓度梯度决定,细菌群落变异可能是环境条件变异的综合反应^[17].

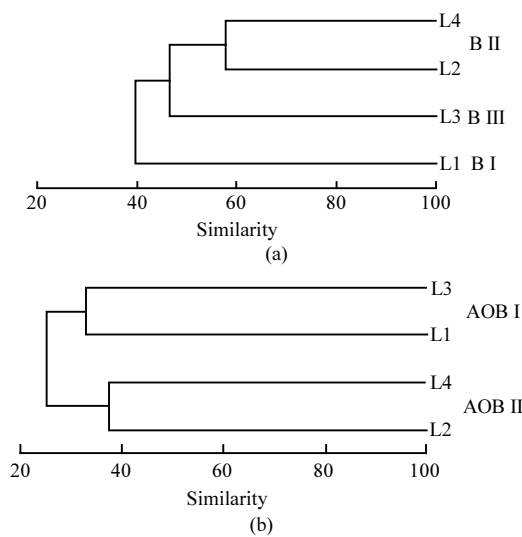


图 2 各样点细菌群落和氨氧化细菌的等级聚类分析
Fig.2 Dendrogram of hierarchical cluster analysis of the bacterial and AOB from different sampling plots

2.2 再生水补水对不同样点细菌和 AOB 群落结构多样性的影响

酶切图谱和多样性指数结果均显示,*Msp*I 酶切样品微生物多样性略高于 *Hha* I、*Hae*III 酶切,故后续分析采用 *Msp*I 酶切结果^[18].以 *Msp* I 为酶切的不同类群香蒲根际细菌和 AOB 群落多样性

指数见表 2.细菌各类群多样性指数均随再生水干扰强度的增加依次表现 B I>BIII>B II 的变化趋势,而氨氧化细菌群落则与细菌群落呈现相反的变化趋势,即再生水补水口氨氧化细菌各群落多样性指数均明显高于远离补水口氨氧化细菌群落.再生水补水不仅降低了细菌群落结构中物种的丰富度,同时为应对再生水中丰富氮磷等水质特性,细菌群落结构与再生水水质特性密切联系的优势类群在群落结构中占有主导优势,群落均匀度降低,进而群落综合多样性指数降低.对于 AOB 而言,再生水中高浓度氮含量是导致再生水补水口氨氧化细菌群落各多样性指数显著升高的直接原因^[20].

2.3 再生水补水对不同样点细菌和 AOB 群落结构的影响

以 *Msp* I 酶切结果计算各类群中 T-RFs 片段的丰度,T-RFs 片段丰度值>4%的类型为优势菌群^[20],而片段丰度值<1%的类型为偶见菌群,其余为非优势菌群^[21],以 *Msp* I 为酶切的香蒲根际细菌和 AOB 群落结构的差异见表 3.随再生水干扰强度增强细菌类群 T-RFs 片段数呈明显降低趋势;细菌类群 B I 因其较高丰度的非优势菌群和偶见菌群,从而群落均匀度较高,而细菌类群 B II 则因较低丰度的非优势菌群及不具偶见菌群从而群落均匀度较低;远离再生水补水口氨氧化细菌群落 AOB I 较补水口 AOB II 具较少的 T-RFs 片段数,且其优势氨氧化菌群相对丰度值远高于 AOB II,表明在再生水作用下氨氧化细菌优势片段数量的增加、非优势片段数量的减少和偶见片段数量的消失是导致 AOB I 群落丰富度和均匀度降低的主要原因.

表 2 以 *Msp* I 为酶切的不同类群香蒲根际细菌和氨氧化细菌群落多样性指数

Table 2 Diversity indexes of cattail rhizospheric soils bacterial and AOB community in different groups with *Msp* I enzyme

类群	<i>Msp</i> I-细菌			类群	<i>Msp</i> I-AOB		
	综合多样性指数	物种丰富度	均匀度指数		综合多样性指数	物种丰富度	均匀度指数
B I	3.464	11.07	0.8767	AOB I	2.3128	2.8230	0.5569
B II	1.457	4.122	0.5201	AOB II	2.9536	5.8847	0.8095
BIII	1.659	5.439	0.7151				

2.4 基于传统 T-RFs 片段与多元统计相结合分析

2.4.1 MiCA 比对结果 将 *Hae*III、*Msp* I、*Hha* I 3 种内切酶消化的 T-RFLP 图谱属性数据上传到 Phylogenetic Assignment Tool(PAT, <https://secure.limnology.wisc.edu/trflp/newuser.jsp>)网站^[22-23],并结合 MiCA (<http://> MiC

[A.ibest.uidaho.edu/pat.php](http://) 通过 Virtual Digest (ISPaR)模块产生的基础数据库对起主要作用 T-RFs 类型的系统发育分类进行推测.之后通过计算其细菌 T-RFs 比例,以占据整个 T-RFs 的 4%以上为优势菌种;而 AOB 通过电子酶切 (*Msp* I、*Hha*I、*Hae*III)得出的片段和克隆得出的片段相比对,比对可能种属见表 4.

表 3 *Msp* I 酶切细菌和氨氧化细菌群落结构空间差异
Table 3 The spatial differences of cattail rhizospheric soils bacterial and AOB community structures with *Msp* I enzyme

类群	优势菌群		非优势菌群		偶见菌群	
	T-T-RFs	丰度(%)	T-T-RFs	丰度(%)	T-T-RFs	丰度(%)
B I	4	34.26	26	52.22	22	13.52
B II	3	67.66	10	20.59	0	0
B III	4	61.43	16	38.57	19	11.75
AOB I	9	86.61	4	13.4	0	0
AOB II	6	53.25	19	44.46	3	2.32

表 4 *Msp*I 酶切香蒲根际细菌和 AOB 类群可能种属
Table 4 The corresponding species and features of cattail rhizospheric soils bacterial and AOB communities with *Msp* I enzyme

类群	OTU 类型(bp)			可能属
	<i>Msp</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III	
细菌	150	226	81	<i>Sphingomonas</i> sp.
	138	66	468	<i>Micromonospora</i>
	81	81	81	<i>Geitlerinema</i> sp.
	81	82	81	<i>Pseudomonas</i> sp.
氨氧化	266	—	—	<i>Nitrosomonas</i> sp.
细菌	58	—	—	<i>Nitrosospira</i> sp.

2.4.2 因子分析 以基于细菌和氨氧化细菌群落 *Msp* I 酶切,结果显示细菌群落筛选出的 73 个 T-RFs 片段反应的信息累计方差达到 92.3%,而氨氧化细菌群落筛选出的 56 个 T-RFs 片段反应的信息累计方差达到 95.4%,表明两个原始数据矩阵均可以较好地反应基于片段的源解析^[24],统计结果见表 5.细菌群落因子分析将 73 个 T-RFs 片段降为三个维度,其中 PCA1 提取了 33 个 T-RFs 片段,除 81bp 片段之外,其余 32 个非培养或数据库中无匹配.根据因子分析原理可比对的 81bp 片段可能与不可比对的 32 个 T-RFs 片段具有共同或相近的源,即 81bp 片段可能与不可比对

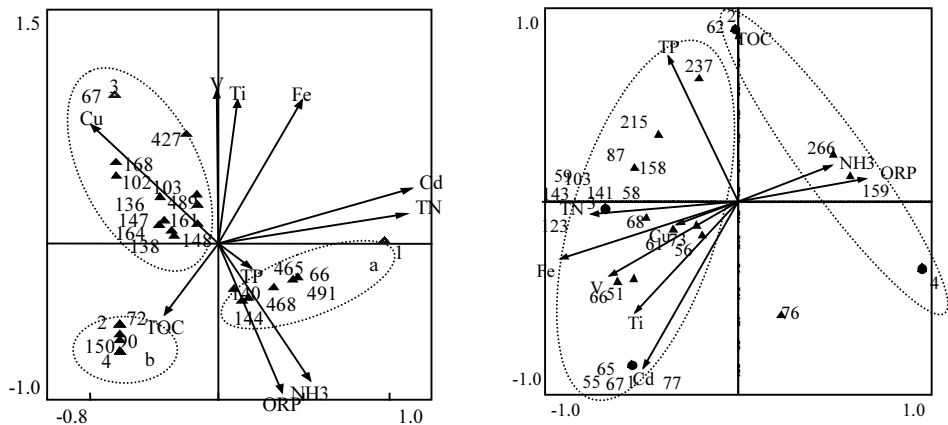
的 32 个 T-RFs 片段共同受水质生境特征中某一相同环境因子的制约和影响,或与水质生境特征中某一环境因子的生物化学循环过程具有密切的关系.同样 PCA2 和 PCA3 中提取 27 个和 11 个非培养或数据库中无匹配的 T-RFs 片段可能与其对应维度中可比对的 150bp 和 138bp 片段具有共同或相近的源.基于氨氧化细菌群落的因子分析将 56 个 T-RFs 片段降为两个维度,对于氨氧化细菌群落中 PCA4 中提取的 39 个 T-RFs 片段可能与 *Nitrosospira* sp.具有共同或相近的源,而 PCA5 代表的 17 个 T-RFs 片段可能与 *Nitrosomonas* sp.共同或相近的源.

2.4.3 典范对应分析 为验证基于 MiCA 比对结合因子分析结果见图 3.排序结果表明 CCA 排序图第一轴 AX1 和第二轴 AX2 的特征值累计占总特征值的 71.23%,排序图包含了大部分的信息,排序效果良好.对于细菌群落而言,再生水补水口样点 2 和样点 4 在排序图中具有共同的分布格局与范围,同时与样点 2 和样点 4 具共同分布格局的 T-RFs 片段主要包括了以 150bp 为代表的 PCA2 中所有 T-RFs 片段,这些片段占到样点 2 和样点 4 所代表的 B II 群落总丰度的 55.6%.环境因子中 TOC 与样点 2 和样点 4 具有共同分布格局与范围的结果则

进一步证明再生水补水口以 150bp 为代表的占群落总丰度 55.6%菌群均与水中 TOC 的生物化学循环过程具有密切关系. 而且过比对发现 150bp 片段对应的种属为鞘氨醇单胞菌属,Onruthai 研究表明鞘氨醇单胞菌是环境中比较独特的一类降解菌, 它们的降解范围非常宽,从单环、多环芳烃到其它有机污染物都可以作为它们生长的碳源^[25].PCA2 是通过聚类而得,表明在 PCA2 类群当中,除去不能确定的非培养的细菌类群外,很有可能其余的片段大部分与碳循环是相关的.

表 5 以 *MspI* 为酶切的香蒲根际细菌和 AOB 类群的 PCA 聚类片段和比例

Fig.5 Clustering fragments and proportion of cattail rhizospheric soils bacterial and AOB communities with <i>Msp</i> I enzyme							
类群	轴	T-RFs 数	丰度和(%)			非培养或数据库无匹配 T-RFs	可比对 T-RFs
			B I	B II	BIII		
细菌	PCA1	33	75.5	34.5	16.2	61,66,68,80,86,88,89,91,111,120,140,141,143,144,157,159,160,167,187,193,205,261,274,276,277,465,468,473,491,492,494,497	81
	PCA2	28	15.1	55.6	15.1	72,76,85,87,90,92,124,128,135,145,155,162,165,175,183,204,286,425,451,466,467,469,485,486,487,488,496	150
	PCA3	12	9.4	9.9	68.7	67,102,103,136,147,148,161,164,168,427,489	138
类群	轴	T-RFs 数	AOB I		AOB II	非培养或数据库无匹配 T-RFs	可比对 T-RFs
氨氧化细菌	PCA4	40	97.6		34.5	51,52,55,56,57,58,59,61,62,63,65,66,67,68,69,73,74,77,83,87,91,103,104,119,123,141,142,143,151,158,160,174,215,219,225,234,237,264,265	58
	PCA5	18	2.4		65.5	70,71,76,78,85,86,92,159,192,193,195,205,232,259,263,266,492	266



左图:细菌 a:61,68,80,81,86,88,89,91,111,120,141,143,144,157,159,160,167,187,193,205,261,274,276,277,473,492,494,497
b:76,85,87,92,124,128,135,145,155,162,165,175,183,204,286,425,451,466,467,469,485,486,487,488,496
右图:AOB a:70,71,78,85,86,92,192,193,195,205,232,259,263,492
b:52,57,63,69,74,83,104,119,142,151,160,174,219,225,234,237,264,265, 491

图 3 以 *MspI* 为酶切的香蒲根际细菌和氨氧化细菌样方、物种与环境因子的典范对应分析(CCA)

Fig.3 Canonical correspondence analysis biplot of the cattail rhizospheric soils bacterial and AOB communities in relation to the species and environmental factors

再生水补水口上游样点 1 在排序图中的 T-RFs 片段主要包括了以 81bp 为代表的 PCA1 中所有 bp 片段,它们的相对丰度和占到整个 B II 群落总丰度的 75.5%。环境因子中 TN、TP 和铵态氮与样点 1 具有共同分布格局的结果则进一步证明再生水补水口上游以 81bp 为代表的菌群与水质生境特征中 TN、TP 和铵态氮的生物化学循环过程具有密切关系。经过比对发现 81bp 对应的是假单胞菌属和 *Geitlerinema* sp. 属。假单胞菌属是一种在有机污染中普遍存在的菌属,可以利用包括单碳在内的许多有机物作为自身的能量和碳源,以有机氮或无机氮为氮源进行化能营养生活^[26],而 *Geitlerinema* sp. 是专性属于底栖生物环境,与水环境中氮的循环具有密切关系已得到普遍的认同^[27],这与 CCA 分析的结果中与环境因子氮循环具有密切关系的结果保持一致。再生水补水口下游样点 3 在排序图中的 T-RFs 片段主要包括了以 138bp 为代表的 PCA3 中所有 bp 片段数,它们的相对丰度和到整个 B III 群落总丰度的 68.7%。环境因子重金属 Cu、V 和 Ti 与样点 3 具有共同分布格局与范围的结果则进一步证明再生水补水口以 138bp 为代表的相似菌群均与水质生境特征重金属 Cu、V 和 Ti 具有密切关系。

对于 AOB 而言,与样点 2 和样点 4 具共同分布格局的 T-RFs 片段主要包括了以 266bp 为代表的 PCA5 中所有 T-RFs 片段,这些片段占到样点 2 和样点 4 所代表的 AOB II 群落总丰度的 65.5%。环境因子中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 与样点 2 和样点 4 具有共同分布格局的结果进一步证明再生水补水口以 266bp 代表的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)受到再生水铵态氮的影响较大。以 58bp 为代表的 PCA4 中所有 T-RFs 片段,这些片段占到样点 1 和样点 3 所代表的 AOB I 群落总丰度的 97.6%。环境因子中 TOC 与样点 1 和样点 3 具有共同分布格局与范围的结果则进一步证明再生水补水口以 58bp 为代表的亚硝化螺菌属菌(*Nitrosospira* sp.)受到铵态氮的影响较小。AOB II 中包含两个再生水补水口的铵态氮的含量远远大于 AOB I, AOB II 中数量丰度最多

的亚硝化单胞菌属是在富含氨氮环境中具有竞争优势,而偏好相对低氨环境的亚硝化螺菌属则数量极少。

3 结论

3.1 细菌类群以受再生水干扰程度的强弱而进行分群并类,不同湿地类型因受再生水补水口水质影响归并为一类。

3.2 再生水补水口细菌群落以有机碳循环为主,补水口上游主要以氮循环为主,远离补水口细菌类群主要体现重金属的生物化学循环。

3.3 266bp 为代表的 *Nitrosomonas* sp. 具相似功能的菌群适合在高氨环境中生长;58bp 所代表的 *Nitrosospira* sp. 具相似功能特性的菌群适合在相对低氨环境中生长。

参考文献:

- [1] Maidak B L, Cole J B, Lilburn T G. The RDP Ribosomal Data-base Project continues [J]. Nucleic Acids Res., 2000,28: 173-174.
- [2] Siripong Silil, Rittmann Bruce E. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants [J]. Water Research, 2007,41(5):1110-1120.
- [3] Tao Ding, Michael W Palmer and Ulrich Melcher Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf entophytic bacteria BMC [J]. Microbiology, 2013,13:1-11.
- [4] 孟庆义,吴晓辉,赵立新,等.再生水回用于北京景观水体引起的水质变化及其改善措施 [J]. 水资源保护, 2011,27(1):51-54.
- [5] 曾 薇,李 磊,杨莹莹,等. A^2O 工艺处理生活污水短程硝化反硝化的研究 [J]. 中国环境科学, 2010,30(5):625-632.
- [6] Grove J K, Ste in O R. Polar Organic Solvent Rem oval in Microcosm Constructed Wet lands [J]. Water Research, 2005,39: 4040-4050.
- [7] McBride M B. Environmental Chemistry in Soils [M]. Oxford: Oxford University. Press, 1994:406-407.
- [8] 陈卫平,张炜铃,潘 能,等.再生水灌溉利用的生态风险研究进展 [J]. 环境科学, 2012,33(12):4070-4080.
- [9] Teske A, Alm E, Regan J, et al. Evolutionary relationships among Ammonia and nitrite deoxidizing bacteria. [J]. Bacterial, 1994, 176:6623-6630.
- [10] Bock E, Koops H P. The genus nitrobacteria and related genera; Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source; The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria.

- Ecophysiology, isolation, identification, applications [M]. New York: Springer-Verlag, 1992.
- [11] 王 薇,俞 燕,王世和.人工湿地污水处理工艺与设计 [J]. 城市环境与城市生态, 2001,14(1):59-62.
- [12] 史 青,柏耀辉,李宗逊,等.应用 T-RFLP 技术分析滇池污染水体的细菌群落 [J]. 环境科学, 2011,32(6):1788-1792.
- [13] 王亚男,曾希柏,俄胜哲,等.施肥对设施菜地氨氧化细菌群落和丰度的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2012,31(12):2425-2432.
- [14] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA [J]. Canadian Metallurgical Quarterly, 1997,63(11):4516-4522.
- [15] Mayrand P E, Corcoran K P, Ziegle J S, et al. The use of fluorescence detection and internal lane standards to size PCR products automatically [J]. Applied and Theoretical Electrophoresis, 1992,3(1):1-11.
- [16] Ziegle J S, Su Ying, Corcoran K P, et al. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci [J]. Genomics, 1992,14(4):1026-1031.
- [17] Horswill A R, Stoodley P, Stewart P S, et al. The effect of the cheMiCAI, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2007,387:371-380.
- [18] 牟文婷,张 涛,孙 建,等.新疆特殊生境岩石内生细菌末端限制性片段长度多态性技术分析 [J]. 微生物学报, 2012,52(3): 381-388.
- [19] Daims H, Nielsen P H, Nielsen J, et al. Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology [J]. Water Sci. Technol., 2000,41(4/5):85-90.
- [20] Ringelberg D B, Foley K L, Reynolds C M. Electrogenic capacity and community composition of anodic biofilms in soil-based bioelectroche MiCAI systems [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011,90(5):1805-1815.
- [21] Zhang Rui, Thiagarajan Ve, Qian Pei-Yuan. Evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis in contrasting marine environments [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008,65(1):169-178.
- [22] Sch ü tte Ursel M E, Abdo Z, Bent St J, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(3):365-380.
- [23] Kent Angela D, Smith Dan J, Benson Barbara J, et al. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003,69(11): 6768-6776.
- [24] 李惠民.水稻土细菌和氨氧化细菌的 RFLP 分析 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2009.
- [25] Pinyakong On, Habe H, Yoshida T, et al. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2 [J]. Biotechnology Research Center, 2003,301(2):350-357.
- [26] Moore E R B, Tindall B J, V A P, Martins, et al. Palleroni. No-nmedical: *Pseudomonas* [J]. The Prokaryotes, 2006,6:646-703.
- [27] Eric H Andrianasolo1, Douglas Goeger, William H, et al. Mitsoamide: A cytotoxic linear lipopeptide from the Madagas-car marine cyanobacterium *Geitlerinema* sp.[J]. Pure and Applied Chemistry, 2007,79(4):593-602.
- 致谢:** 本实验的现场采样和实验工作由赵霏、黄迪帮忙完成。
- 作者简介:** 马栋山(1989-),男,山西朔州人,首都师范大学硕士研究生,主要从事土壤微生物研究。

《中国环境科学》2011 年度引证指标

根据《2012 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《中国环境科学》2011 年度引证指标继续位居环境科学技术、安全科学技术类科技期刊前列,核心影响因子 1.523,学科排名第 1,综合评价总分 79.2,学科排名第 2;在被统计的 1998 种核心期刊中影响因子列第 18 位,综合评价总分列第 52 位。《中国科技期刊引证报告》每年由中国科学技术信息研究所编制,统计结果被科技管理部门和学术界广泛采用。