

# FISH 法在土壤-植物污水处理系统中应用的可行性

王延华<sup>1</sup>, 仝昭昭<sup>2</sup>, 张骥骧<sup>3</sup>

(1. 南京师范大学地理科学学院, 江苏 南京 210046)

(2. 南京师范大学能源与机械工程学院, 江苏 南京 210042)

(3. 南京航空航天大学经济与管理学院, 江苏 南京 210016)

[摘要] 应用 FISH 法对土壤-植物污水处理系统中未经过培养的土壤氨氧化菌进行了研究. 同时介绍了样品前处理、FISH 法检测过程以及基因探针的选择等实际操作方法与过程. 研究结果表明, 对于土壤-植物污水处理系统土壤的微生物解析可用 FISH 技术. 该方法的使用为系统基质的研究提供便捷之路.

[关键词] 荧光原位杂交, 土壤-植物污水处理技术, 生活污水, 脱氮

[中图分类号] X172 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)04-0091-06

## Application of Fluorescence in Situ Hybridization in Research on Soil-Plant System for Wastewater Treatment

Wang Yanhua<sup>1</sup>, Tong Zhaozhao<sup>2</sup>, Zhang Jixiang<sup>3</sup>

(1. School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. School of Energy and Mechanical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210042, China)

(3. College of Economics and Management, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China)

**Abstract** This paper studied the fluorescence in situ hybridization (FISH) technology for ammonia oxidation bacteria detection in the soil of soil-plant system. The pretreatment of samples, FISH process and oligonucleotide probes selection were introduced. Results showed that FISH technology could be used for soil bacteria detection in soil-plant systems.

**Key words** fluorescence in situ hybridization, soil-plant system for wastewater treatment, domestic wastewater, nitrogen removal

土壤-植物污水处理技术, 也称之为根区法, 是人工强化的生态土壤系统的一种. 它采用不同的技术设计, 模拟天然湿地过程, 由人工将砾石、砂、土壤、煤渣等介质按一定比例构成生态滤层, 并有选择性植入水生植物, 通过其独特的土壤-植物-微生物系统的生态效应净化污水. 20 世纪 80 年代以来, 土壤-植物污水处理系统表现出了良好的净化性能, 受到广泛关注. 目前, 许多研究者在填料选择<sup>[1]</sup>、系统设计<sup>[2]</sup>及作物筛选<sup>[3]</sup>等方面开展了大量的研究工作, 对基质微生物<sup>[4-5]</sup>、过程模拟<sup>[6]</sup>及温室气体排放<sup>[2, 7-9]</sup>的研究也在不断探索中. 据报道, 土壤-植物污水处理系统是温室气体氧化亚氮 ( $N_2O$ ) 的重要释放源<sup>[2, 6, 7]</sup>. 本文前期研究中发现, 硝化阶段可能是污水处理过程中  $N_2O$  逸出的一个重要来源<sup>[2, 7]</sup>. 我们检阅了大量的文献, 发现较少此类报道. 植物种属、栽种方式及系统运行条件对土壤硝化菌时空变化的影响、土壤硝化菌分布与污染物去除率的相关关系仍有待进一步研究.

由于土壤-植物污水处理系统的土壤固相组成及性状复杂, 存在于其中的生物群落亦具有高度的不均一性和波动性, 传统的土壤微生物检测方法存在一定的局限性. 荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性信息, 可以在自然或人工的微生物

收稿日期: 2010-09-16

基金项目: 国家自然科学基金 (50908116)、十一五专项课题 (2008ZX07101-009-02).

通讯联系人: 王延华, 博士, 讲师, 研究方向: 污染生态修复及温室气体排放. E-mail: wangyanhu@njnu.edu.cn

环境中监测和鉴定不同的微生物个体,同时对微生物群落进行评价<sup>[10]</sup>.目前在医学领域, FISH 技术是一项比较成熟的微生物定量检测技术<sup>[11]</sup>.近年来,在水生系统<sup>[2,8,12,13]</sup>和污水处理<sup>[14-17]</sup>等领域也有一定的应用,但是在土壤<sup>[18-20]</sup>研究中的应用还不多,尤其是未经过培养的土壤.鉴于此,本文应用 FISH 技术分析土壤—植物污水处理系统中未培养的土壤中硝化菌的时空分布,探讨 FISH 技术分析土壤微生物的可行性及其影响因素,为控制土壤—植物污水处理系统  $N_2O$  逸出提供一定依据.

# 1 材料与方法

## 1.1 供试材料

样品取自潜流式土壤—植物污水处理系统(深 88 cm,直径 56 cm).该处理系统底部为 18 cm 砾石承托层,上铺 43 cm 细沙层(河沙,粒径 < 1 mm).水生植物为芦苇和香蒲,4月初连根移植,混和栽种,每个处理单元种植芦苇 10 棵、香蒲 10 棵,植株高度 70 cm 左右.设置无植物床作对比参照.床体自水面以下间隔 15 cm 预埋氧化还原电位 (ORP) 探头,每床纵向设 5 个 ORP 探头.系统水力停留时间 7 d 水力负荷  $0.042\text{ m}^3/\text{m}^2/\text{d}$  进水主要水质指标  $BOD_5$  均值  $100\text{ mg/L}$ , TN 均值  $30\text{ mg/L}$ , TP 均值  $3\text{ mg/L}$ .

样品采集和处理:以叉花点式采样法,设 5 个采样点,每点分 5 层自上而下采集,深度分别为 0 - 10 cm、- 20 cm、- 30 cm 和 - 40 cm.样品采完立即置于冰上,以防止温度变化影响微生物活动改变群落特性.

## 1.2 实验用试剂的配制

### 1.2.1 PBS 缓冲液

实验用化学试剂,称取  $8\text{ g NaCl}$ 、 $0.2\text{ g KCl}$ 、 $2.9\text{ g Na}_2\text{HPO}_4$  和  $0.2\text{ g KH}_2\text{PO}_4$  加入超纯水 1 L,用 35% 的 HCl 调整 pH 值为 7.2 在  $121^\circ\text{C}$ , 15 psi 条件下经高压蒸汽灭菌器 30 min 灭菌消毒,  $4^\circ\text{C}$  保存.

### 1.2.2 0.1 M Tris/HCl

实验用化学试剂,称取  $6\text{ g Tris}$  加入 500 mL 超纯水,用 35% 的 HCl 调整 pH 值为 7.2

### 1.2.3 TE 缓冲液

实验用化学试剂,称取  $0.605\text{ g Tris}$  加入 1 mL 500 mmol/L 的 EDTA 溶液(分子生物学用),加入超纯水 500 mL,边加边用 35% 的 HCl 调整 pH 值为 7.2

## 1.3 FISH 检测

### 1.3.1 DNA 探针

本研究采用 FISH 技术分析未经过培养的土壤微生物群落,根据待测微生物体内 16S rRNA 中的某段特异性序列,设计相应的寡核苷酸探针,就可实现对目标微生物的原位检测.氨氧化菌的检测探针 Nso19Q 是 *Proteobacteria*  $\beta$  属的亚硝酸细菌通用探针,探针的核苷酸序列为  $5'\text{-CGATCCCCTGCTTTTCTCC-3'}$ .杂交实验之前,用纯培养的 *Nitrosomonas europaea* 验证探针的特异性.空白对照探针 nonEUB338 序列为  $5'\text{-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3'}$ .探针用 Cy3 或 Cy5 标记.所有探针在  $-20^\circ\text{C}$  下保存于 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.2) 中,保存浓度  $4\text{ }\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ .采用染核酸的 SYBR Green I 荧光染料(在荧光显微镜激发光的激发下呈绿色)来标识所有微生物细胞的总量.

### 1.3.2 原位杂交实验

在 50 mL 离心管中放入折叠好的 Whatman 3MM 纸巾,用  $750\text{ }\mu\text{L}$  预先配制好的杂交液浸润.杂交实验条件根据 FA 浓度选择 (FA 浓度见表 1).表 1 列出了 FA 浓度对应的杂交缓冲液的组成.固定后的试样,涂在经过明胶处理的玻璃载片上.风干,顺次放入 50%、80%、98% 乙醇溶液 (v/v) 各 3 min 脱水后,在载玻片的上排第一个孔涂布  $10\text{ }\mu\text{L}$  空白对照探针 nonEUB338 其余注入  $10\text{ }\mu\text{L}$  稀释好的 DNA 探针(避光操作),在载玻片的下排孔注入杂交液  $10\text{ }\mu\text{L}$ ,以防止假阳性反应的出现.预先把离心管在杂交箱中  $46^\circ\text{C}$  静置数分钟,达到气液平衡.然后将载玻片放入离心管,  $46^\circ\text{C}$  杂交 2 h

### 1.3.3 探针的洗脱

取出杂交后的载玻片,立即用少量洗脱缓冲液清洗,然后把载玻片没入洗脱缓冲液中,  $48^\circ\text{C}$  避光水浴 20 min,去除未杂交或非特异性杂交的探针.洗脱完后,用冷超纯水清洗,室温干燥.不同 FA 浓度,洗脱缓冲液组成见表 2

表 1 杂交缓冲液组成  
Table 1 Hybridization buffer

试剂 /μL	FA 浓度 %								
	0	10	20	30	35	40	45	50	55
Blockace( 1g/100mL)	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
4.5M NaCl	200	200	200	200	200	200	200	200	200
SDS (1%)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Tris/HCl (1M)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Formamide (FA)	0	100	200	300	350	400	450	500	550
M illQ	707.5	607.5	507.5	407.5	357.5	307.5	257.5	207.5	707.5

表 2 洗脱缓冲液组成  
Table 2 Washing buffer

试剂 /mL	FA 浓度 %								
	0	10	20	30	35	40	45	50	55
4.5M NaCl	10	4.98	2.5	1.25	0.88	0.63	0.44	0.31	0.22
SDS (1%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Tris/HCl (1M)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M illQ	38.5	43.5	46	47.3	47.6	47.9	48.1	48.2	48.3

1.3.4 全菌染色

用与上述同样的方法在载玻片上下两排孔里涂布 10 μL 稀释 30 000 倍的 SYBR GreenI 溶液, 室温下避光染色 3 min, 然后用超纯水清洗, 室温风干. 为了防止杂交后的荧光标记见光褪色, 在载玻片的孔里滴加 3 μL 褪色防止剂 (VECTASHIELD), 然后放置盖玻片, 排除气泡, 即可进行观测.

1.3.5 细菌定量观察

采用 TCS4D 激光显微镜 (TCS4D, Leica Lasertechnik, Germany), 肉眼观察记数. 该显微镜配备有一个氩-氦离子激光器, 可选择波长 488、568 和 647 nm.

每个土壤样品制作 2~3 枚平行杂交样本, 对每枚杂交样进行 10 个视野的观察, 以全菌染色为背景, 对每一个视野的被检菌进行荧光光点的计数 (N). 之后将 2~3 枚载玻片的计数结果进行平均计算处理. 载玻片圆孔直径 5mm, 试样面积 19.6mm<sup>2</sup>, 100 倍油镜视野面积 0.01mm<sup>2</sup>, 样品稀释倍数 m, 可得试样中被检菌的浓度:  $\left[ N \times \frac{19.6}{0.01} \times \frac{1000}{3} \right] \times m \times 4$  (细菌数 /mL 样品).

1.3.6 图像解析

解析土样菌落处于分散状态的荧光现象的数字图像. 由一般光学图像不能分辨出细菌的种类与数量, 应用 SYBR GreenI 全菌染色荧光现象看出, 绿色荧光标记物是全细菌, 红色为 Cy3 或 Cy5 荧光标记物, 少量亮黄色非生物组织内容, 可以大致从图像上观测出被检测菌占总菌数的比例.

2 结果与分析

2.1 样品前处理

称取 5 g 湿土样, 用 4% (w/v) 的多聚甲醛固定液固定组织细胞, 4℃ 放置 18 h. 样品离心分离 10 min (4℃, 8 000 rpm) 后洗去固定剂. 固定好的细胞保存在磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 用水浴超声波破碎仪破碎 30 min (26 kHz, 600 W), 使聚集生长的细胞分散. 土样中菌体进行 FISH 检测前, 为了防止破碎后的生物细胞重新凝聚, 必须用 PBS 缓冲液室温冲洗样品 2 次. 上清液转移至离心管离心 5 min (4℃, 8 000 rpm). 最后细胞悬浮于 1:1 的 PBS 和纯乙醇溶液中于 20℃ 下保存. 用 200 mg/L 的三聚磷酸盐将土样稀释至合适的倍数, 在经过预处理后的载玻片的圆孔里涂布 3 μL 样品, 室温风干. 分析土壤样品的微生物时, 干扰杂质较多. 为了排除, 本实验采用 2 种方法, 一是超声波破碎, 离心分离; 二是杂交实验时加入一定浓度的 Blockace 试剂.

2.2 植物根区微环境对氨氧化菌生长的影响

根区微环境理论是从物理学角度对氨氧化菌 (AOB) 的生长及分布特性进行解释. 该理论考虑生态土壤系统微环境中各种物质 (如 ORP、有机物和植物根系等) 的传递与变化和微环境的物理、化学及生物条

件或状态的改变等.微环境理论认为:由于植物传输氧气能力的限制,使得在生态土壤床内自上而下产生 ORP 梯度,即表层和植物根区 ORP 值最高,主要以好氧硝化菌为主,在此发生硝化反应.氨氧化细菌即亚硝化细菌,在硝化作用过程中负责将铵氧化为亚硝酸盐,并释放出  $N_2O$  气体,是硝化过程中必不可少的环节.氨氧化细菌属革兰氏阴性专性化能自养细菌,以氨作为能源,喜欢微偏碱性的环境,生长极为缓慢,最适 pH 值为 7.0~8.5 最适温度为 30℃.氨氧化细菌在一般的自然土壤和污水处理系统中的含量较低.因此,探讨不同的水生植物根区的微环境变化对氨氧化菌分布特性的影响至关重要.

2.2.1 土壤-植物系统基质纵向氨氧化菌的分布特性

香蒲系统、芦苇系统及无植物栽种系统,基质纵向-10 cm、-20 cm、-30 cm 和 -40 cm 处 AOB 分布规律如图 1~3 所示.

FISH 实验结果(图 1,图 2)揭示了生长期,芦苇和香蒲在土壤-植物床-20cm 和 -30cm 深处均有较高数量的 AOB,植物枯萎期, AOB 数量大幅度减少.表明土壤-植物系统的植物根区硝化作用强.季节和气温变化对系统 AOB 数量和分布的影响显著.本实验所在地 12 月~3 月气温低于 15℃, AOB 活性极低,硝化率下降.由图 1 可知,植物床 AOB 数量高于无植物床,说明植物的存在改善了土壤-植物系统中 AOB 的生长环境,有利于硝化作用的进行.

土壤-植物系统表层(0~-10 cm)虽然 ORP 值比较大,处于好氧状态,但是  $NH_4^+-N$  含量低,这是表层 AOB 数量少的重要原因.潜流式土壤-植物系统在植物根区之下的基质部分缺少氧气,使得该区厌氧微生物活跃,不利于 AOB 的生长和增值,故而根区以下 AOB 数量呈递减趋势.可见,环境因素诸如 ORP 值和  $NH_4^+-N$  浓度影响 AOB 在土壤-植物系统基质中的分布.

pH 值对土壤-植物系统中微生物去除氮、磷等营养物质有较大的影响.在酸性和中性 pH 值条件下,根区附近的亚硝化细菌活动增强,其中硝化作用占主导地位;而当处于碱性条件下时,  $NH_3$  的蒸发作用以及可溶性正磷酸盐的化学沉淀作用就占主导作用,从而影响了土壤-植物系统对氮、磷等营养物质的去除<sup>[21]</sup>.本研究所有土壤-植物系统出水 pH 值均在 6.0~8.0 之间,有利于 AOB 的生长和  $NH_4^+-N$  的形成.

2.2.2 水生植物根系分布特性研究

土壤-植物系统植物除了能吸收氮、磷等污染物之外,更重要的作用是其根系具有较强的输送氧气和有机污染物的能力,可使根区保持较高的有机污染物和溶解氧浓度,促进好氧微生物的生存与繁殖.根系发达且较长的植物有利于好氧微生物向系统深部分布,提高系统污染物去除能力<sup>[5]</sup>.不同水生植物对 AOB 数量和分布影响不同.本实验考察生长期植物的种类对根系分布的影响,不同系统植物根区形态如图 4 所示.两种水生植物处于生长期时,根系伸长至 -30~-50 cm 左右.芦苇根较粗且发达,最长可伸展到 -50cm. FISH 法检测土壤-植物床纵向 AOB 数量,实验结果(图 1,图 2)表明芦苇的根际效应对 AOB 的影响强于香蒲,表明芦苇根际环境更有利于 AOB 的生长.

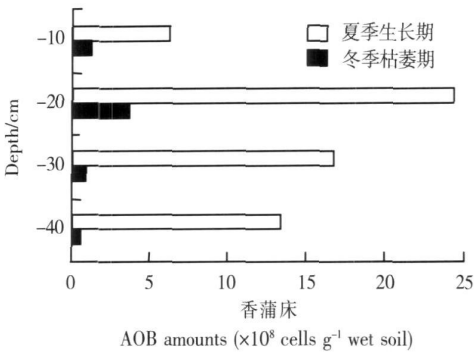


图 1 季节波动对香蒲系统土壤 AOB 分布特性的影响  
Fig.1 Seasonal effect on AOB distribution in active layers in *Typha Latifolia*

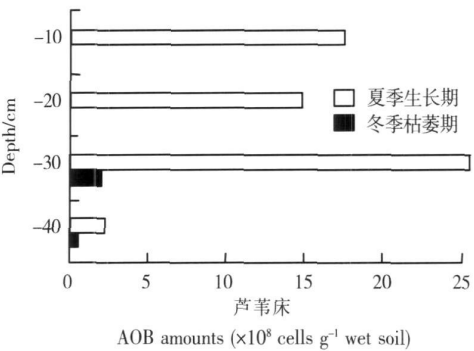


图 2 季节波动对芦苇系统土壤 AOB 分布特性的影响  
Fig.2 Seasonal effect on AOB distribution in active layers in *Phragmites australis*

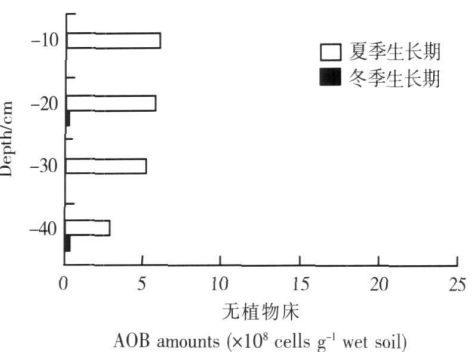


图 3 季节波动对无植物系统 AOB 分布特性的影响  
Fig.3 Seasonal effect on AOB distribution in active layers non-planted system

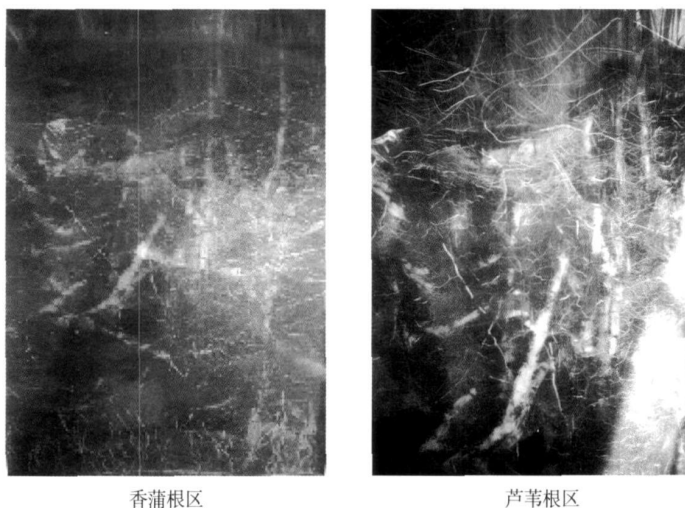


图 4 夏季水生植物根区的生长状况

Fig.4 Photograph of aquatic plant root zone in summer

### 3 结论

FISH 技术是一项新兴有力的研究工具, 本文应用 FISH 法对未经过培养的土壤 - 植物污水处理系统基质中氨氧化菌的空间分布进行观测. 为了排除样品中非生物组织的干扰, 采用水浴超声波破碎的方法, 再在杂交实验时加入一定浓度的 Blackace 试剂, 实验证明这种预处理方法对于保证下一步杂交试验的成功是有效的. 研究结果表明, 对于类似的土壤 - 植物污水处理系统基质的微生物解析可用 FISH 技术. 该方法的使用为系统基质的研究提供便捷之路, 并将为最终解释  $N_2O$  的产生机理和控制土壤 - 植物污水处理系统温室气体的释放做出贡献. 在以往对土壤微生物的研究中, 关于微生物数量的判断大多采用 MPN 法测量, 但是实践证明该方法存在一定的弊端, FISH 技术的引入可以对不同菌群的种类、数量及空间分布进行直观观测, 将土壤 - 植物污水处理系统基质的研究提升到分子生物学层次, 使得研究更具体深入.

### 4 应用展望

目前, 该技术本身还处于继续发展完善中, 尽管设备昂贵、操作技能要求高, 但是结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性信息, 可以在自然或人工的微生物环境中监测和鉴定不同的微生物个体, 同时对微生物群落进行评价. 20 世纪 70 年代, 国外开始展开温室气体源、汇和输送规律的研究. 除了化学燃料燃烧外, 陆地生物圈过程对大气  $N_2O$  浓度的增加起着极其重要的作用. 当前  $N_2O$  排放的研究已涉及污水处理厂、沼泽、人工湿地、农田土壤和森林等多个领域. 分析土壤 - 植物污水处理系统基质中一些典型菌种对温室气体  $N_2O$  逸出量的贡献程度以及生存环境和植物生长对其产生的影响, 探讨  $N_2O$  的产生机制是进一步控制其逸出的基础. 结合我国国情, 适当运用 FISH 法等先进的分子生物学检测手段, 定量分析基质微生物群落变化, 探讨基质氧化还原电位、植物生长、根区微环境及季节变化对其的影响是量化研究生态土壤污水处理系统温室气体的重要方法, 有助于研究工作的深入, 节约时间并促进新工艺、新技术的开发应用.

### [参考文献]

- [1] 张建, 黄霞, 施汉昌, 等. 掺加草炭的地下渗滤系统处理生活污水 [J]. 中国给水排水, 2004, 20(6): 41-43.
- [2] Wang Y H, Inanori R, Kong H N, et al. Nitrous oxide emission from polyculture constructed wetlands: Effect of plant species [J]. Environ Pollut, 2008, 152(2): 351-360.
- [3] 赵建刚, 杨琼, 陈章和, 等. 几种湿地植物根系生物量研究 [J]. 中国环境科学, 2003, 23(2): 290-294.
- [4] 吴振斌, 梁威, 成水平, 等. 人工湿地植物根区土壤酶活性与污水净化效果及其相关分析 [J]. 环境科学学报, 2001, 21(5): 622-624.

- [ 5 ] 梁威, 吴振斌, 周巧红, 等. 构建湿地基质微生物与净化效果及相关分析 [ J ]. 中国环境科学, 2002, 22( 3 ): 282-285.
- [ 6 ] Kong H N, K inochiY, M izuochiM, et al Study of the characteristics of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emission and methods of controlling their emission in the soil-trench wastewater treatment process[ J ]. SciTotal Environ 2002, 290( 1/3 ): 59-67.
- [ 7 ] Wang Y H, Zhang J X, Kong H N, et al A simulation model of nitrogen transformation in reed constructed wetlands[ J ]. Desalination 2009, 235( 1/3 ): 93-101.
- [ 8 ] Sovik A K, Klove B. Emission of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> from a constructed wetland in southeastem Norway[ J ]. SciTotal Environ 2007, 380( 1/3 ): 28-37.
- [ 9 ] Wang Y H, InamoriR, Kong H N, et al Influence of plant species and wastewater strength on constructed wetland methane emissions and associated microbial populations[ J ]. EcolEng 2008, 32( 1 ): 22-29.
- [ 10 ] Amann R, Fuchs B M, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization[ J ]. Current Opinion Biotechnol 2001, 12( 3 ): 231-236.
- [ 11 ] Franks A H, Ham sen H J M, Raangs G C, et al Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes[ J ]. Appl Environ Microbiol 1998, 64( 9 ): 3336-3345.
- [ 12 ] Mobarri B K, Wagner M, Urban V, et al Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria[ J ]. Appl Environ Microbiol 1996, 62( 6 ): 2156-2162.
- [ 13 ] Schramm A, Larsen L H, Revsbech N P, et al Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes[ J ]. Appl Environ Microbiol 1996, 62( 12 ): 4641-4647.
- [ 14 ] Aoi Y, Miyoshi T, Okamoto T, et al Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescence in situ hybridization[ J ]. J Biosci Bioeng 2000, 90( 3 ): 234-240.
- [ 15 ] 朱彤, 张洪军, 刘建峰, 等. 应用 FISH 法对污水生物处理系统中细菌数量的计数 [ J ]. 环境保护科学, 2007, 33( 1 ): 22-25.
- [ 16 ] 张丽娟, 许玫英, 孙国萍. FISH 法对垃圾渗滤液硝化生物膜发育的观察与分析 [ J ]. 微生物学通报, 2007, 34( 2 ): 241-245.
- [ 17 ] 张洪军, 朱彤. A/O 工艺膜生物反应器处理生活污水的脱氮特性及硝化菌群的分子检测 [ J ]. 环境污染与防治, 2009, 31( 1 ): 47-50.
- [ 18 ] Zarda B, Hahn D, Chatzinotas A, et al Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization[ J ]. Arch Microbiol 1997, 168( 3 ): 185-192.
- [ 19 ] Christensen H, Hansen M, Sorensen J. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe[ J ]. Appl Environ Microbiol 1999, 65( 4 ): 1753-1761.
- [ 20 ] Libbet-Bossa E, Rossell-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization[ J ]. Appl Environ Microbiol 1998, 64( 7 ): 2691-2696.
- [ 21 ] 詹发萃, 邓家齐, 夏宜峥, 等. 凤眼莲根区异氧细菌群落特征与异氧活性的研究 [ J ]. 水生生物学报, 1993, 17( 2 ): 150-156.

[责任编辑: 丁 蓉]