

黑麦草(*Lolium perenne*)根际细菌多样性对 Ni 污染沉积物修复效果的响应

吴 卿, 赵彩云, 李东梅, 王 美, 李思聪

(天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072)

摘 要:应用黑麦草(*Lolium perenne*)对某滨海城市南排污河的重金属污染沉积物——底泥进行植物修复,并结合变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析了黑麦草根际土壤的重金属 Ni 含量和细菌多样性的关系。结果表明,黑麦草对 Ni 的修复效果较好,种植黑麦草后根际土壤 Ni 浓度降低了 11.8%。根际土壤中 Ni 有效态含量与根际土壤 pH 值的变化呈较好的正相关关系,相关系数为 0.968 8。对根际土壤细菌多样性进行分析,重金属 Ni 含量变化能够影响土壤细菌的多样性,根际土壤细菌多样性随黑麦草的生长而不断演变,且与根际土壤中 Ni 浓度变化有密切联系。对 DGGE 电泳后回收的部分片段进行测序并建立了进化树,结果表明,测序片段与非培养方法得到的菌种的同源性较高,且其均在土壤或河道底泥的相关研究中被发现。不同时期细菌群体组成和 Shannon 指数随着修复时间而变化,并与细菌总数有正相关关系。

关键词:黑麦草;污染底泥;重金属;细菌多样性

中图分类号:X173 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)06-1135-06

Response of Bacteria Diversity of Ryegrass(*Lolium perenne*) Rhizosphere to Phytoremediation Effect of Ni Polluted Sediment

WU Qing, ZHAO Cai-yun, LI Dong-mei, WANG Mei, LI Si-cong

(School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Ryegrass(*Lolium perenne*) was applied to phytoremediation of heavy metal-contaminated sediments from a sewage river in a coastal city of China. Based on the PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis), relationship between heavy metal Ni and bacteria diversity in rhizosphere sediments of ryegrass were analyzed. Results showed that ryegrass had good phytoremediation effect on heavy metal Ni, and the Ni^{2+} concentration in rhizosphere sediments of ryegrass decreased by 11.8% after ryegrass planted. There was a good correlation between concentration of available Ni and pH in rhizosphere sediments, and the correlation coefficient was 0.968 8. The diversity of bacteria in rhizosphere sediments of ryegrass was analyzed and the result indicated that the Ni concentration could affect the diversity of bacteria. The diversity of bacteria in rhizosphere sediments of ryegrass was evolved with the growth of ryegrass. Evolutionary tree was built by specific fragments obtained from electrophoresis, and results showed that sequenced bands had high homology with uncultured bacteria harvested from soil or river sediment samples. Bacterial community composition and shannon index in different growth stages of ryegrass changed over time, and Shannon index had a positive correlation with the total number of bacteria.

Keywords: ryegrass(*Lolium perenne*); polluted sewage river sediment; heavy metal; bacteria diversity

城市河道治理过程中,河道沉积的大量受重金属污染底泥的处置是许多城市面临的难题^[1]。重金属污染

土壤的植物修复研究,目前主要集中在提高土壤中重金属的植物可利用性和植物富集重金属能力方面^[2]。土壤中重金属一方面对农作物、农产品和地下水等诸多方面产生重大影响,并能通过食物链危害人类健康;另一方面对土壤的理化性质和生物学特征产生明显的影响,从而影响土壤生理结构和功能的稳定性^[3]。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,它不仅可

收稿日期:2011-10-02

基金项目:国家自然科学基金项目(50908159);973 计划项目(2007CB407306)

作者简介:吴 卿(1976—),女,副教授,主要从事污染环境生物修复的相关研究。E-mail:wuq@tju.edu.cn

以指示污染土壤的生态系统稳定性,而且还具有巨大的潜在环境修复功能^[4]。土壤微生物几乎参与土壤中一切生物和生物化学反应,同时微生物可以敏感地反映土壤环境质量的变化,而且亦是土壤中生物活性的具体体现^[5-6]。镍(Ni)是人、动物和高等植物的必需营养元素^[7-8],然而土壤中 Ni 过量会对植物产生毒害作用^[9-11]。随着人为活动如矿产资源的大量开采利用、污水灌溉、农药、化肥及污泥的广泛使用,越来越多的镍及其化合物进入农业土壤。土壤中过量的 Ni 不仅阻碍植物的生长发育,而且造成植物体内 Ni 的累积,并通过食物链对人类健康产生潜在危害。因此,对土壤-植物-微生物系统中 Ni 的化学行为进行研究具有重要的环境意义。

本实验以黑麦草(*Lolium perenne*)及其根际微生物对重金属 Ni 污染底泥的修复效果为研究目标,旨在通过黑麦草根际重金属 Ni 含量、细菌总数和根际细菌多样性变化的研究,分析黑麦草对 Ni 污染排污河道沉积物的修复效果及修复机理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物为黑麦草。供试底泥为某滨海城市南排污河河道疏浚底泥,主要理化性质及主要重金属浓度见表 1。由于该河道承担该市生活污水和工业废水的排放,重金属污染严重。经检测初始底泥重金属 Ni 含量超出土壤环境质量标准(GB 15618—1995)^[12]的二级标准 3.51 倍,为中度污染。

1.2 底泥样品处理

供试底泥风干后,剔除其中的粗杂质,用玻璃研钵将其小心研碎并过 2 mm 筛,过筛后底泥装入 0.6 m×0.5 m×0.4 m 的 2 个 PVC 箱中,每箱装 30 kg 底泥,箱底部设通气孔,将箱中底泥用去离子水调至 30%~60%持水率(WHC)。种子播种采用条播,行间距 10 cm,发芽 6 d 后定苗。种植时间为 6 月至 9 月共 120 d。根际土壤的取样方法为,抖落大土块,收集附在根系上的土壤作为根系土壤。每 4 株黑麦草根际土壤混合为一个小样。取样间隔为 30 d,测定项目包括根际

土壤 pH 值、Ni 的总量、Ni 有效态含量和根际细菌总数,每项测定指标设 3 个重复。根际细菌数量采用稀释平板法测定^[13],Ni 总量采用 HCl-HF-HClO₄ 消解法测定^[14],Ni 有效态含量采用 DTPA 提取法测定^[15-16]。

1.3 PCR-DGGE 分析根际土壤细菌多样性

黑麦草根际土壤总 DNA 利用 Omega 土壤 DNA 提取试剂盒进行提取。PCR 扩增所用引物为对大多数细菌和古细菌具有特异性的 16S rRNA 的 V6~V8 区引物 EUBf933 和 EUBr1387。EUBf933 序列为 5'-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3',EUBr1387 序列为 5'-GCCCCGGAACGTATTCACCG-3',其中 EUBf933 与 40 bp 的 GC 夹子(GC-clamp)连接^[17]。PCR 反应采用降落 PCR 策略,反应条件为:预变性 94 ℃、5 min,前 20 个循环为 94 ℃、1 min,65~55 ℃、1 min 和 72 ℃、3 min(其中每个循环后复性温度下降 0.5 ℃),后 15 个循环为 94 ℃、1 min,55 ℃、2 min 和 72 ℃、3 min,最后在 72 ℃下延伸 7 min。

采用梯度为 40%~65%的 6.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后对胶板进行银染。应用凝胶分析软件 Quantity One 对扫描所得的 DGGE 图谱进行条带识别和各项分析。对特异条带进行回收及测序,其中测序由上海英骏公司进行。

2 结果与讨论

2.1 黑麦草根际土壤 Ni 和细菌总数的变化

对黑麦草根际土壤的 Ni 含量和细菌总数的定期取样结果进行分析。黑麦草根际土壤 Ni 含量与细菌总数的数量变化情况见图 1。

从图中可以看出,经过 120 d 的黑麦草种植,植物根际土壤重金属 Ni 含量与种植前相比有较大地降低,含量减少 11.8%。细菌总数呈先上升后下降的趋势。在种植的前 90 d(即 6—8 月份)细菌总数呈上升趋势,但在 8—9 月的 30 d 中细菌总数有所下降,从总体来看细菌总数与初期相比增加了 10 倍。在黑麦草种植后的 90 d 中,Ni 浓度降低速度相对较缓,此阶段植物处于生长初期在高浓度的 Ni 环境胁迫下,有一个适应过程,因此对 Ni 的吸收能力较弱。同时,根

表 1 供试底泥的理化性质

Table 1 Physic-chemical properties of sewage river sediment

pH	速效氮/mg·kg ⁻¹	速效磷/mg·kg ⁻¹	有机质/g·kg ⁻¹	重金属全量/mg·kg ⁻¹ 干泥					
				Zn	Ni	Cr	Mn	Cu	Cd
7.47	220.2	29.75	112	1 942.7	175.7	622.1	688.0	276.6	13.5

际土壤中细菌处于高 Ni 浓度条件下, 菌体活性受抑制并处于缓慢恢复状态。实验呈现出 Ni 浓度缓慢降低和细菌总数逐渐升高的结果。在黑麦草种植的后 30 d(9 月份), 根际土壤中 Ni 浓度明显降低, 而细菌总数与 8 月份相比有所减少。

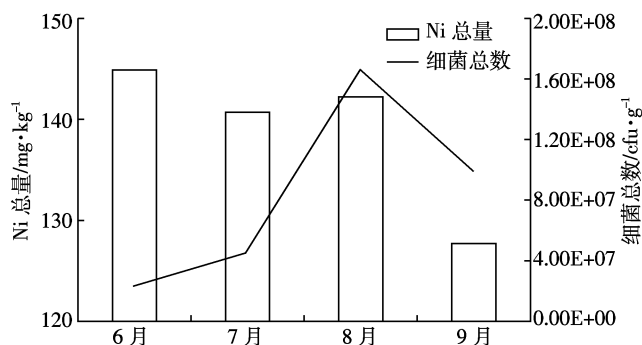


图 1 黑麦草根际土壤 Ni 总量与细菌数量变化

Figure 1 Changes of Ni concentration and total bacteria number of rhizosphere soil

图 2 为 Ni 有效态含量与根际土壤 pH 的变化情况, 可以看出, Ni 有效态含量与根际土壤 pH 呈较好的正相关关系, 相关系数为 0.968 8。在植物种植的最初 30 d 时 Ni 有效态含量有所下降, 其变化与 Ni 总量的变化一致, 此时根际土壤 pH 值也有所下降。研究表明, 土壤微生物的代谢作用能产生多种低分子量的有机酸, 使微生物通过各种代谢活动直接或间接地促进重金属的溶解, 从而促进植物对重金属的吸收, 并且提高植物对重金属的抗性^[18]。在 8 月份后, Ni 有效态的含量和根际土壤 pH 值均有所上升, 此时细菌总数也呈上升趋势。

相关研究表明, 根际细菌可以通过增加植物根的生长和根毛的数量, 增加吸收重金属的有效根表面积; 同时可以产生一些化合物例如螯合物或络合物,

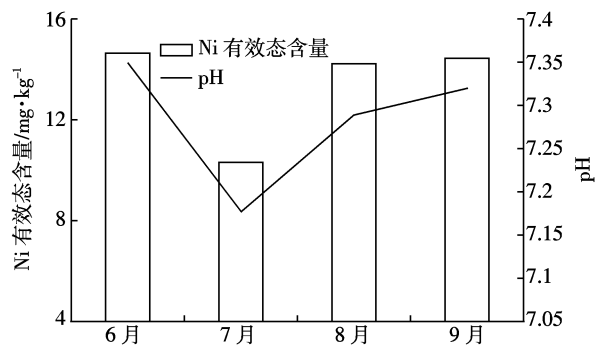


图 2 黑麦草 Ni 有效态含量与根际土壤 pH 值变化

Figure 2 Changes of available Ni and pH value of rhizosphere soil

促进根际土壤重金属的溶解; 根际细菌刺激植物的离子转运系统, 提高植物对重金属离子的转运。以上 3 种方式均可影响植物对重金属吸收和富集^[19], 因而使得 Ni 有效态含量随细菌数量的增加而增加。当 8 月份细菌数量和种类都达到最大时, 根际细菌分泌的化合物浓度也达到最大值, 大量的化合物促进 Ni 溶解为易于植物吸收的形式, 因此在 9 月份时重金属 Ni 浓度有明显降低。与此同时, 较多的溶解态重金属 Ni 对细菌的毒害作用增加, 使得此时的细菌总数有所下降。根际重金属 Ni 浓度和细菌总数的这种交互变化是二者相互作用结果。8 月份白天气温温度在 30 ℃ 左右, 较高的温度适于细菌的生长, 这也是 8 月细菌总数最高的原因之一。

2.2 根际细菌多样性的 PCR-DGGE 分析

图 3 为黑麦草根际土壤细菌的 PCR-DGGE 电泳图谱。可以看出, 初期土壤样品中的电泳条带较少, 从 6 月至 8 月随黑麦草种植时间的延长、根际土壤细菌总数增加, 电泳条带数目也有所增加, 这也说明细菌多样性随之增加。在 9 月份, 电泳结果中的条带呈减弱和减少的趋势, 此阶段的细菌总数也呈下降的趋势。因此, 黑麦草根际土壤细菌总数和细菌多样性的变化呈正相关关系。细菌多样性随黑麦草种植时间的变化与细菌总数有相似的变化趋势。

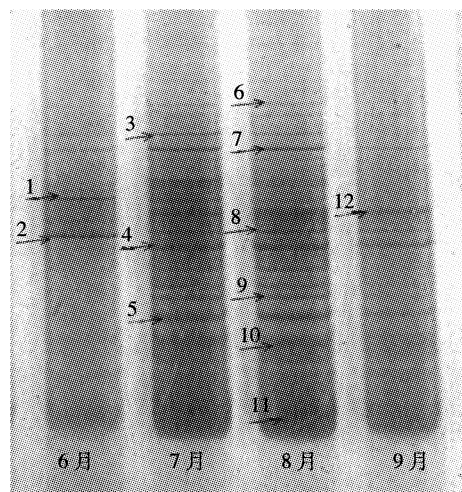


图 3 根际土壤细菌的 PCR-DGGE 电泳图谱

Figure 3 PCR-DGGE fingerprint of bacteria in rhizosphere soil

DGGE 可以很好地鉴别复杂的环境, 对样品 16S rDNA 多样性的分析结果中, 条带的多少可以反映出群落的多样性, 条带信号强弱可以反映菌种的相对数量, 因此可以根据指纹信息确定不同底泥中所含有的细菌种类和数量关系, 得出细菌多样性的信息。从黑

麦草根际土壤细菌的 DGGE 图谱(图 3)可以看出,6—9 月根际土壤细菌组成中均含有 7 号和 11 号条带,说明这两种细菌在黑麦草根际土壤中始终保持优势状态。黑麦草种植初期(6 月份)沉积物中重金属含量高,土壤中细菌种类较少,条带 1 和 2 较为明显;黑麦草种植 1 个月时(7 月份),细菌数量逐渐上升并在 8 月份达到最大,DGGE 图谱中 8 月份的条带较多。在黑麦草种植 3 个月(9 月份)时,细菌数量有小幅下降,电泳条带也相应减少,但在 7、8 月 DGGE 图谱中存在的 4、8、9、10 号条带在 9 月份的 DGGE 图谱中仍然存在,说明这几种细菌在植物生长阶段是较为稳定的菌种。

2.3 特异条带测序分析及测序条带进化树

将图 3 中清晰且较明显 12 条带进行切胶测序(条带位置如图 3 所示),得出 5 条带的测序结果,在 GenBank 数据库中使用 BLAST 工具进行比对,结果见表 2。DGGE 图谱中每一条带代表一个可能的细菌类群或可操作分类单位(OUT)。由表 2 可知,在 5 个测序结果中 4 个序列来自未经培养的细菌菌种(Uncultured Bacterium)。

进化树是用来表征物种之间进化关系,可通过生物信息学方法来构建进化树,对测序结果进行进化树分析,结果如图 4 所示。由图 4 及比对结果可知,条带 1 和 Uncultured bacterium clone ncd826d12c1 16S ribosomal RNA gene 同源性较高为 98%,同时和 *Pseudomonas sabulinigri* strain J64 16S ribosomal RNA gene 也有 98%的相似度,后者属于假单胞菌,Kyoung-Ho kim^[20]曾在沿海沙滩中提取得到该菌。条带 12 与 *Pseudomonas fluorescens* strain BCPBMS-1、*Pseudomonas aeruginosa* strain ZJHG29、*Pseudomonas aeruginosa* strain XZPG11 和 *Pseudomonas aeruginosa* strain S2QPS8 同源性均为 99%,推测其应该是 *Pseudomonas fluorescens* 中的一种。它和条带 1 属于同一菌属。*Pseudomonas fluorescens* 是革兰氏阴性杆菌,好

气,有些亦可以于厌氧状态下以硝酸盐作为电子接受者、广存于土壤及水中,多数菌体为植物致病菌或食物腐败菌。该菌种可能是原有底泥中的菌种。有报道称该菌种在工业上能分解碳氢化合物及苯酚^[21]。

条带 2 和 Uncultured gamma proteobacterium 同源性为 88%,该菌属于伽马变形杆菌,Cécile Milton^[22]在研究碳氢化合物污染的土壤生物修复中曾提取出该菌种。条带 5 属于环境样品,与 Uncultured bacterium clone SSDUT433-13 16S ribosoma 同源性为 97%。Handley-Sidhu^[23]曾在厌氧的河口泥沙中应用 16SrD-NA 分离得到该菌种,说明该菌种是河道底泥中原有的菌种。条带 7 与 Uncultured bacterium clone L2-51 相似度仅为 71%,推测可能是某种变异的新菌种。

由以上分析可得出,经过 PCR-DGGE 的方法得到的片段与非培养方法得到的菌株同源性较高,且同源菌大多可以从土壤或者河口泥沙中分离得到。

2.4 多样性指数分析

Shannon 指数是由样品中微生物种属的数量和每个种属的丰度决定的。先对这些条带进行高斯(Gauss)建模处理,将各条紧密靠在一起、边界相互融合的条带描绘成具有独立光密度分布的相互重叠的曲线,再进行 Shannon 多样性指数的计算^[24]。

Shannon-Weaver 指数(H)公式为:

$$H = -\sum P_i \lg P_i$$

式中, H 的计算是基于 DGGE 图谱中条带的数量和强度,而条带的强度通过凝胶分析软件 Quantity One 分析得到的波峰面积来表述,即 $P_i = n_i/N$ (其中 n_i 为峰面积, N 为总峰面积)。

图 5 为黑麦草种植过程中根际土壤细菌多样性指数的变化。从图中可以看出 Shannon 丰富度指数和细菌总数的变化相似,也呈先上升后下降的趋势。群落中生物种类增多代表了群落的复杂程度增高,在细菌数量增多的同时细菌的多样性也随之增加。

从 Shannon 丰富度指数和黑麦草对 Ni 修复效果

表 2 测序条带 16SrDNA 序列比对结果

Table 2 BLAST results of 16SrDNA bands

条带编号	GenBank 比对结果		
	登记号	菌种名	同源性
1	HM303829.1	Uncultured bacterium clone ncd826d12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
2	AM9348.57	Uncultured Gamma proteo bacterium partial 16S rRNA gene, clone AMJA4	88%
5	GQ90329.31	Uncultured bacterium clone SSDUT433-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%
7	JF70354.1	Uncultured bacterium clone L2-51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	71%
12	HQ907732.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain BCPBMS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%

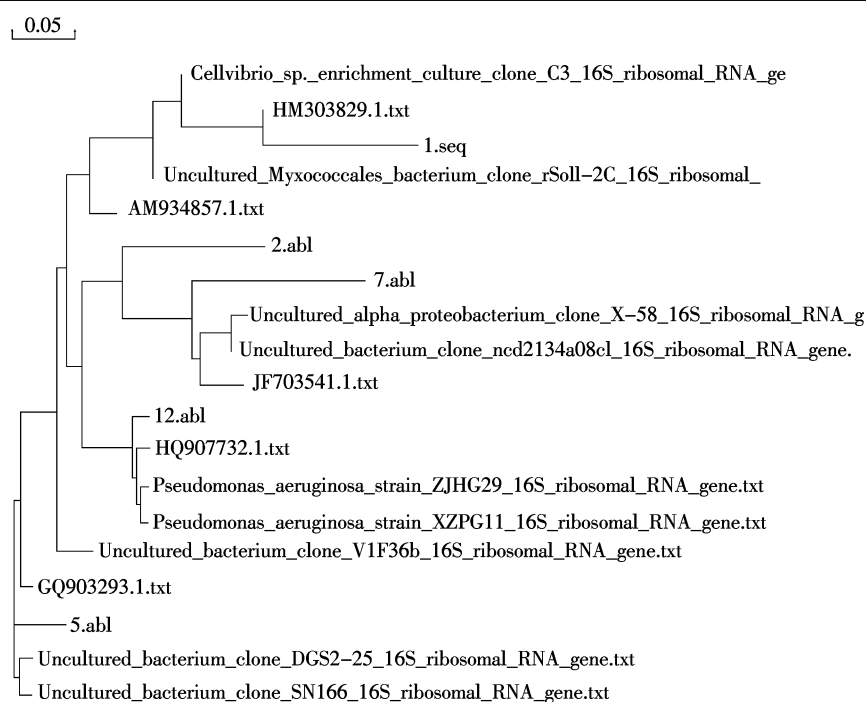


图 4 测序条带的进化树分析

Figure 4 Phylogenetic tree of sequenced bands

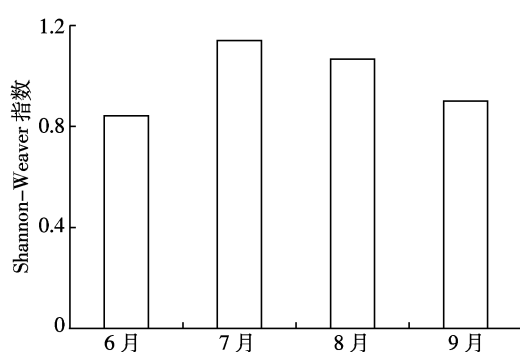


图 5 根际土壤 DGGE 条带的 Shannon 指数

Figure 5 Rhizosphere DGGE bands of the Shannon index

间的关系来看,7月份根际 Ni 总量及有效态浓度均有一定下降,虽然此时根际细菌的总数不是最大,但此时 Shannon 指数最大,说明根际丰富微生物种类能够影响植物的修复。在9月份,细菌数量和 Shannon 指数有一定的下降,可能是根际微生物对高 Ni 环境长期适应过程中,对不良环境适应性较强的菌群能够持续生长;适应性较弱的菌群会处于活性受抑制状态。在细菌总数上即表现为总量有所下降。图4也反映了黑麦草根际土壤的细菌群落的演替变化,即重金属 Ni 污染能够影响土壤细菌的多样性,这与蔡信德等的研究结果一致^[25]。根际土壤中的细菌对高 Ni 环境有逐渐适应、逐渐调整的过程,在优胜劣汰中逐渐

完善群落构成。在黑麦草种植 30~60 d 期间,那些能够对根际环境适应的菌群逐渐显示出优势,在细菌总数增多的同时菌种多样性也逐渐增加。9月份时一些在前期出现的无法适应的细菌此时消失或者减少,使得此时细菌多样性有所降低。虽然9月的 Shannon 指数有所减小,但构成群落的菌株大部分是对 Ni 胁迫环境适应性较强的菌群,从而使得此时黑麦草对 Ni 的修复效果处于最佳水平。

4 结论

黑麦草对根际土壤中 Ni 的修复效果和细菌总数及菌群多样性的变化密切相关。经过 120 d 的黑麦草种植,植物根际土壤重金属 Ni 含量与未种植前相比有较大的降低,含量减少 11.8%。细菌总数呈先上升后下降的趋势。

对黑麦草根际土壤细菌进行 16S rDNA PCR-DGGE 分析,结果表明,在黑麦草种植的不同时期根际土壤细菌的群体组成和数量有明显不同。在不同时期,优势种群在数量和位置上也有较大差异。对 12 个回收的特异片段进行测序,得到 5 个测序结果。经序列比对,结果表明测序片段与非培养方法得到的菌种的同源性较高。对测序片段建立了进化树,以初步确定测序片段在进化中的亲缘关系,同时对黑麦草根际

土壤细菌群体结构的多样性变化进行了分析,从 6 月到 9 月的 120 d 种植阶段中,根际土壤细菌多样性的变化是对根际土壤环境的一个适应过程,Shannon 指数结果表明,根际土壤中细菌多样性随黑麦草生长、根际土壤中 Ni 总量、Ni 有效态及 pH 值的变化有相应的变化。

参考文献:

- [1] 林兰稳,钟继洪,张国林,等.广州市污水污泥堆肥在环境绿化中的应用[J].生态环境,2006,15(5):974-978.
LIN Lan-wen, ZHONG Ji-hong, ZHANG Guo-lin, et al. Application of sewage sludge compost in environment of Guangzhou[J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(5):974-978.
- [2] Melanie Kuffner, Markus Puschenreiter, Gerlinde Wieshammer, et al. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows[J]. *Plant Soil*, 2008, 304:435-449.
- [3] 刘戈宇,柴团耀,孙 涛.超富集植物遏蓝菜对重金属吸收、运输和积累的机制[J].生物工程学报,2010,26(5):561-568.
LIU Ge-yu, CHAI Tuan-yao, SUN Tao. Heavy metal absorption transportation and accumulation mechanisms in hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(5):561-568.
- [4] Teng Y, Luo Y-M, Li Z-G. Principles and techniques of microbial remediation of polluted soils[J]. *Soils*, 2007, 39(4):497-502.
- [5] 何振立.土壤微生物量及其在养分循环和环境质量评价中的意义[J].土壤,1997,29(2):61-64.
HE Zhen-li. Soil microbial biomass and the significance in nutrient cycling and environmental quality assessment[J]. *Soil*, 1997, 29(2):61-64.
- [6] 蒋先军,骆永明,赵其国.重金属污染土壤的微生物学评价[J].土壤,2000,32(3):130-134.
JIANG Xian-jun, LUO Yong-ming, ZHAO Qi-guo. Assessment of heavy metal-contaminated soils using microbe as indicators[J]. *Soil*, 2000, 32(3):130-134.
- [7] 王 夔.生命科学中的微量元素[M].北京:中国计量出版社,1996.
WANG Kui. Trace elements in life science[M]. Beijing:China Metrology Publishing House, 1996.
- [8] Brown P H, Welth R M, Cary E E. Nickel: A micronutrient essential for higher plants[J]. *Plant Physical*, 1987, 85:801-804.
- [9] Poulik Z. Influence of nickel contaminated soils on lettuce and tomatoes[J]. *Scientia Horticulturae*, 1999, 81:243-250.
- [10] Kopittke P M, Asher C J, Menzies N W. Toxic effects of Ni²⁺ on growth of cowpea(*Vigna unguiculata*)[J]. *Plant Soil*, 2007, 292:283-289.
- [11] Kapustka L A, Eskew D, Yocum J M. Plant toxicity to derive ecological soil screening levels for cobalt and nickel[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(3):865-874.
- [12] 国家环境保护局. GB 15618—1995. 土壤环境质量标准[S]. Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. GB 15618—1995, Standard of soil quality[S].
- [13] 许光辉,郑洪元.土壤微生物分析方法手册[M].北京:中国农业出版社,1986:102-105.
XU Guang-hui, ZHENG Hong-yuan. Manual analysis of soil microbial [M]. Beijing:China Agricultural Press, 1986:102-105.
- [14] 马伟芳.植物修复重金属-有机物复合污染河道疏浚底泥的研究[D].天津:天津大学环境科学与工程学院,2006.
MA Wei-fang. Phytoremediation of heavy metal-organic complex in dredged sewage river sediment[D]. Tianjin: School of Environmental Science and Technology, 2006.
- [15] J Vidal, C Pérez-Sirvent, M. J Mart'inez-Sánchez, et al. Origin and behaviour of heavy metals in agricultural Calcaric Fluvisols in semiarid conditions[J]. *Geoderma*, 2004, 121(3-4):257-270.
- [16] Ana Fuentes, Mercedes Lloréns, José Sáez, et al. Simple and sequential extractions of heavy metals from different sewage sludges[J]. *Chemosphere*, 2004, 54(8):1039-1047.
- [17] Iwamoto T, Tani K, Nakamura K, et al. Monitoring impact of in situ bio stimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32(2):129-141.
- [18] Qureshi Shabnam, Richards Brian K, Hay Anthony G, et al. Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge[J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37:3361-3366.
- [19] de-Souza M P, Chu D, Zhao M, et al. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants[J]. *Planta*, 1999, 209:259-263.
- [20] Kyoung-Ho Kiml, Seong Woon Roh, Ho-Won Chang. *Pseudomonas sabulinigri* sp. isolated from black beach sand[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59:38-41.
- [21] Bergan J. Human-and-animal-pathogenic members of the genus *Pseudomonas*[M]//Starr M P, Stolp H, Truper H G, et al. The Prokaryotes. Berlin:Springer Verlag, 1981:666-700.
- [22] Cécile Milton, Delphine Boucher, Cédric Vachelard. Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3):669-681.
- [23] Stephanie Handley-Sidhu Paul J, Worsfold Christopher Boothma, et al. Corrosion and fate of depleted uranium penetrators under progressively anaerobic conditions in estuarine sediment[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(2):350-355.
- [24] Müller A K, Westergaard K, Christensen S, et al. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances[J]. *Microbial Ecology*, 2002, 48(1):49-58.
- [25] 蔡信德,仇荣亮,陈桂珠.植物修复对重金属镍污染土壤微生物群落的影响[J].土壤学报,2006,43(6):919-925.
CAI Xin-de, QIU Rong-liang, CHEN Gui-zhu. Reponse of microbial communities to phytoremediation of nickel contaminated soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(6):919-925.