

两种浮萍根系分泌物对荧光假单胞菌脱氮影响的差异及其剂量效应研究^①

陆玉芳^{1,2}, 周影茹^{1,2}, 施卫明^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本研究对太湖地区高效除氮紫背浮萍 *Spirodela polyrrhiza*(HZ1)和低效除氮青萍 *Lemna minor*(WX3)的根系分泌物进行了连续收集和分离,并考察了根系分泌物剂量与成分对反硝化细菌荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 脱氮效率的影响。结果发现,两种浮萍根系分泌物总组分均能显著促进 *P. fluorescens* 的脱氮效率,但对 *P. fluorescens* 的生长无影响。HZ1 根系分泌物总组分(HO)促进作用显著高于 WX3 根系分泌物总组分(WO),这与 HZ1 对水体的除氮效率高于 WX3 的结果一致。两种浮萍根系分泌物各组分也有不同的效果,其中仅 WX3 根系分泌物酸性组分(WA)显著抑制了 *P. fluorescens* 的脱氮效率, HZ1 根系分泌物不同组分是促进或无作用。总体上, *P. fluorescens* 的脱氮效率随浮萍根系分泌物及其各组分添加剂量的增加呈先上升后下降的趋势,而 WA 组分先下降后基本不变,各组分在剂量为 1.0%(v/v)时起最大效果。总之,根系分泌物与浮萍-微生物耦合系统的除氮效率密切相关,酸性组分是两种浮萍根系分泌物促进 *P. fluorescens* 脱氮效果差异的主要原因。

关键词: 浮萍; 根系分泌物; 荧光假单胞菌; 脱氮; 剂量

中图分类号: X52

浮萍是河网农田地区广泛存在的一种小型的浮水植物,具有对氮磷吸收能力强,生长快,蛋白质含量高和耐受能力强等优点,非常适合作为含氮污水净化的水生植物材料。浮萍的除氮机制长期以来受到研究人员的广泛关注,但由于研究对象和方法的不同,对浮萍除氮机理说法不一,主要包括植物吸收、微生物的硝化/反硝化作用和物理化学作用(氮挥发和沉积)3个方面,而这往往决定浮萍污水处理系统的构建及处理效果^[1-4]。

本课题组前期也对浮萍优势品种除氮机理进行了初步研究,发现紫背浮萍(HZ1)对水体的除氮效率高于青萍(WX3),但 HZ1 体内吸收氮素量显著低于 WX3,说明生物吸收不是浮萍去除水体氮素的主要因素,可能是浮萍释放出的某些次生代谢产物改变了水体微环境,从而促进了微生物的硝化/反硝化作用^[5]。根际是植物-微生物相互作用的活跃中心,与陆生植物类似,水生植物也存在着一个受根系影响的特殊区域,根系分泌物是连结水体-植物-微生物的枢纽,也是它们相互作用的信息物质^[6]。浮萍和微生物

耦合系统根际加速有机污染物降解和重金属去除已有很多报道^[7-10]。但目前,关于浮萍-微生物根际互作强化氮素去除的研究还很少。本课题组最近研究发现 HZ1 和 WX3 两种浮萍品种均分泌脂肪酸甲酯类化合物促进反硝化细菌脱氮效率^[11],初步揭示了浮萍促进水体氮素去除的根际生物学机制。然而,不同浮萍品种的根系分泌物与其对水体脱氮效率差异的关系,以及不同品种浮萍根系分泌物成分和剂量对反硝化细菌的影响还尚不清楚。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)在自然界中广泛存在,是太湖地区水稻土中的优势反硝化细菌^[12],也被证明是浮萍根际筛选到的高效好氧反硝化细菌,具有强化污水脱氮的能力^[13-14]。因此,本研究利用 *P. fluorescens* ACCC 01047 作为供试的反硝化细菌菌株,另外选取太湖地区筛选到的高效除氮紫背浮萍 HZ1 和低效除氮青萍 WX3,通过对其根系分泌物原位连续收集和分离,考察根系分泌物剂量与成分对 *P. fluorescens* 脱氮效率的影响,并进行比较,以期从根际分泌物角度阐明浮萍品种除氮效率差异的原因,

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD15B03) 和国家水专项项目(2012ZX07101-004) 资助。

* 通讯作者(wmshi@issas.ac.cn)

作者简介: 陆玉芳(1987—),女,江苏无锡人,博士研究生,主要从事是根际生物学与面源污染控制研究。E-mail: yflu@issas.ac.cn

为实际工程应用中筛选高效除氮的浮萍品种以及组建高效浮萍-微生物耦合除氮系统提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试植物与菌株

本实验选用的紫背浮萍 *Spirodela polyrrhiza*(HZ1) 和青萍 *Lemna minor*(WX3) 分别采自太湖流域的湖州市和无锡市。反硝化细菌荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 01047 购于中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)。

1.2 培养基

1.2.1 修正的 Steinberg 营养液(mg/L) NH_4Cl 12.5, KH_2PO_4 1.76, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 98.9, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.50, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.18, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18, H_3BO_3 0.12, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.76, pH 6.8。

1.2.2 LB 培养基(g/L) 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0。

1.2.3 反硝化培养基(DM, g/L) KNO_3 0.72, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.8, pH 7.0。

1.3 试验设计

1.3.1 浮萍根系分泌物的收集和分离 将约 200 个的 HZ1 和 WX3 叶状体用去离子水冲洗 3 次后, 转移到浮萍根系分泌物原位连续收集系统中^[11], 经过 5 天的收集, 将树脂柱用 500ml 去离子水冲洗, 再用 200ml 甲醇洗脱, 甲醇洗脱液在旋转蒸发仪 40℃ 下浓缩, 得到浮萍根系分泌物粗液(总组分)。用超纯水把根系分泌物粗液稀释至 50 ml 后, 根据极性和溶解度差异极性进行分离, 具体分离步骤参见文献[11], 最终得到根系分泌物总组分、酸性组分、中性组分、碱性组分和水不溶性组分, 用 2ml 甲醇溶解, 置于 -20℃ 保存。取一定量的根系分泌物各组分经氮吹仪浓缩至干, 用二氯甲烷(CH_2Cl_2)溶解, 经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

1.3.2 浮萍根系分泌物总组分对 *P. fluorescens* 脱氮和生长的影响 *P. fluorescens* 在 LB 培养基中活化, 将处在指数增长期(6h)的菌液离心 15 min(5000 r/min, 4℃)后重新悬浮于无菌 DM 中($\text{OD}_{600}=0.5$)。添加 1 ml 菌液和 200 μl 两种浮萍根系分泌物总组分(1%, v/v)到 50 ml 三角瓶中, 终体积为 20ml, 30℃, 120 r/min 振荡培养。实验用 CH_2Cl_2 取代根系分泌物作为对照(CK), 每个处理 3 个重复。实验每 12h 从体系中取 0.5 ml 菌液测定 OD_{600} 值, 并在离心后(10 000 r/min,

10 min)测定上清液中的总氮(TN)浓度。

1.3.3 浮萍根系分泌物剂量对 *P. fluorescens* 脱氮效率的影响 实验设置 0.1%、0.5%、1%、1.5%(v/v)4 个剂量的根系分泌物总组分及其不同组分的处理, 培养条件如 1.3.2 所述, 培养 48h 后测定上清液 TN 浓度。

1.4 测定方法及数据处理

菌体生物量采用比浊法测定, 即用分光光度计(Bio-Rad 3000; USA)测定 OD_{600} 值, TN 测定采用过硫酸钾消解-紫外分光光度法。

P. fluorescens 的脱氮效率(%)和脱氮促进率(%)计算公式如下:

$$\begin{aligned}\text{脱氮效率(\%)} &= \frac{[\text{初始TN浓度(mg/L)} - \text{培养48h后TN浓度(mg/L)}]}{[\text{初始TN浓度(mg/L)}]} \times 100\% \\ \text{脱氮促进率(\%)} &= \frac{[\text{各组分的脱氮效率(\%)} - \text{对照的脱氮效率(\%)}]}{[\text{对照的脱氮效率(\%)}]} \times 100\%\end{aligned}$$

所有的试验均设置 3 个重复。试验数据用 Excel 2007 和 SPSS 18.0 软件进行数理统计分析, 并用 LSD 检验进行多重比较($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

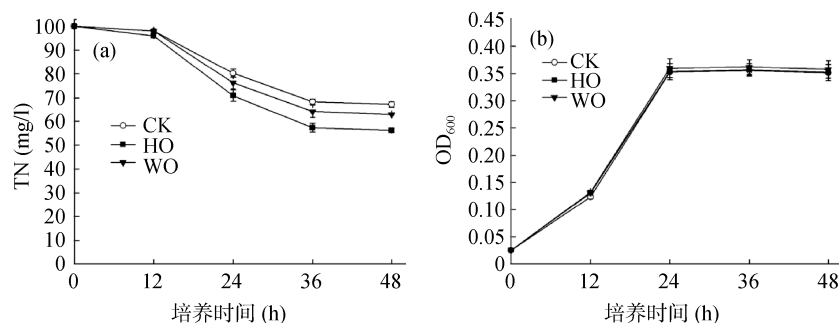
2.1 HZ1 和 WX3 根系分泌物总组分对 *P. fluorescens* 脱氮效率和生长影响的差异

本实验对 HZ1 和 WX3 的根系分泌物进行了 5 天的原位连续收集, 浓缩后获得 HZ1 的根系分泌物总组分(HO)和 WX3 的根系分泌物总组分(WO)。如图 1a 所示, 在 48h 的培养中, 前 12h 是微生物生长的延滞期, DM 中 TN 浓度在 12h 后开始下降, 相对于 CH_2Cl_2 对照, 添加浓度为 1%(v/v)的两种浮萍根系分泌物促进了 *P. fluorescens* 对 TN 的去除速率。到 48h 时, TN 浓度分别为 56.16 mg/L(HO)和 62.96 mg/L(WO), 即 HO 处理后 *P. fluorescens* 的 TN 去除率(43.8%)显著高于 WO 处理(37.0%)。这与 HZ1 对水体的除氮效率高于 WX3 的结果一致^[5], 表明两种浮萍除氮效率的差异与植物根系分泌物密切相关。常会庆等^[15]的研究也指出水生植物根系分泌物的种类和数量及其与微生物之间的作用, 是今后在实际工程中筛选高效去除营养盐的水生植物的重要依据。

尽管根系分泌物能提供碳源和能量来促进微生物的生长, 但本实验为了排除浮萍根系分泌物的营养效应, 使得实验添加根系分泌物总有机碳(TOC)浓度占基础 DM 中碳源的不足 2%, 即根系分泌物对培养

体系中碳源的质和量影响基本可忽略。如图 1b 所示, 浮萍根系分泌物对 *P. fluorescens* 的生长无显著影响, 根系分泌物处理和对照均在 24h 时达到了微生物生长的最高值, OD_{600} 约为 0.35。因此, 浮萍根系分泌物对 *P. fluorescens* 脱氮的促进主要是通过非营养性

效应促进了微生物的反硝化活性, 而不是简单提供碳源来促进反硝化微生物的生长。根系分泌物中存在着很多微量、非营养性的功能物质, 它们能作为特定信号在植物-微生物互作中发挥更为关键的作用, 如作为识别和趋化因子^[16-17]。



(CK: CH_2Cl_2 对照; HO: HZ1 根系分泌物总组分; WO: WX3 根系分泌物总组分)

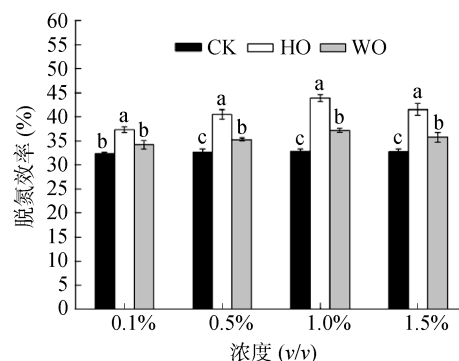
图 1 HZ1 和 WX3 根系分泌物总组分对 *P. fluorescens* 脱氮(a)和生长(b)的影响

Fig. 1 Effects of crude root exudates of HZ1 and WX3 on nitrogen removal (a) and growth (b) of *P. fluorescens*

2.2 浮萍根系分泌物总组分剂量对 *P. fluorescens* 脱氮效率的影响

添加 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%(v/v) 4 个剂量的根系分泌物培养 48h 后, *P. fluorescens* 的脱氮效率与对照相比均有显著提高(图 2), 但 WO 处理在 0.1% 剂量时基本无影响, 这可能是由于 WO 中活性物质浓度太低导致的。在 0.1%~1.5% 剂量内, *P. fluorescens* 脱氮效率随两种浮萍根系分泌物添加剂量的增加呈先上升后下降的趋势, 最大脱氮效率时添加剂量为 1.0%, 此时促进率是 33.7%(HO)和 13.0%(WO)。当根系分泌物添加剂量低于 1.0% 时, 两种浮萍根系分泌物显著促进了 *P. fluorescens* 的脱氮效率, 与对照差异显著($P < 0.05$); 但当根系分泌物添加剂量高于 1.0% 时, 两种浮萍根系分泌物对 *P. fluorescens* 脱氮的促进作用迅速减弱, 说明根系分泌物在浮萍和细菌耦合除氮系统中起了重要作用。另外, 在 4 种剂量下 HO 处理的促进效果均显著高于 WO 处理($P < 0.05$), 进一步验证了 HZ1 的根际效应强于 WX3, 且不同剂量下效果的一致性也表明根系分泌物是影响浮萍-微生物耦合系统除氮效率的重要因子。当添加剂量为 0.1%~1.0% 时, HO 和 WO 处理对 *P. fluorescens* 脱氮影响的差异随根系分泌物浓度的升高而变大; 但大于 1.0% 后, 差异又变小。由此可见, 浮萍根系分泌物对 *P. fluorescens* 脱氮的影响有特定的剂量-效应关系, 微生物的反硝化活性并不是随着根系分泌物的增加而持续增加, 根系分泌物的促进作用是在一定的范围内。同样是污染物的去除, 吴辉和郑师章^[18]研究凤眼莲根分泌物对 *Enterobacter* sp. nov. 苯酚代谢的影

响也得到了类似的结果, 发现低浓度的根分泌物(1%, v/v)促进细菌生长, 提高降酚效率, 而高浓度的根分泌物(10%, v/v)会抑制细菌降酚酶的诱导, 降低降酚效率。这些结果意味着在植物生物修复中为了强化植物-微生物根际互作, 需特别考虑植物品种和植物生物量等, 因为这些因素直接影响根系分泌物的质和量^[15,19]。另外, 今后可在鉴定了浮萍根系分泌物特定活性物质后, 对其剂量关系进行具体研究, 获得最佳的作用浓度。



(图中不同小写字母表示同一剂量下不同处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著, 下同)

图 2 不同剂量的 HZ1 和 WX3 根系分泌物总组分对 *P. fluorescens* 脱氮效率的影响

Fig. 2 Effects of different doses of crude root exudates of HZ1 and WX3 on nitrogen removal efficiency of *P. fluorescens*

2.3 浮萍根系分泌物各组分剂量对 *P. fluorescens* 脱氮效率的影响

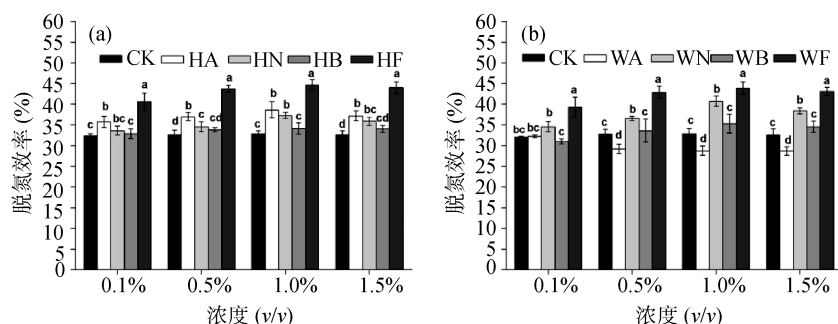
两种浮萍根系分泌物各组分在不同剂量下对 *P. fluorescens* 脱氮效率也有不同的影响。如图 3a 和

3b 所示,在各剂量处理下,两种浮萍的水不溶性组分(HF、WF)均有最显著的促进效果($P < 0.05$),随着组分添加剂量的增加,HF 和 WF 的促进率分别从 26.0% 和 22.2% 提高到 36.0% 和 33.6%,在 1.0%(v/v) 后略有下降,但不同剂量处理下两个浮萍品种间的效果无显著差异。其次,WX3 的中性组分(WN)在各剂量处理下对 *P. fluorescens* 脱氮效率分别有 10.7% ~ 17.6% 的促进效果,而 HZ1 根系分泌物的中性组分(HN)略低,有 4.18% ~ 13.6%。与对照相比,不同剂量的浮萍根系分泌物碱性组分对 *P. fluorescens* 的脱氮效率基本无影响,且两个品种间也无显著差异。然而,两种浮萍根系分泌物的酸性组分却有完全相反的作用。WX3 根系分泌物的酸性组分(WA)从添加剂量为 0.5% 起约有 10.9% 的显著抑制效果(图 3b, $P < 0.05$),但 HZ1 根系分泌物的酸性组分(HA)在各剂量下同样有 7.40% ~ 24.0% 的促进率。

总体上,*P. fluorescens* 脱氮效率随根系分泌物各组分添加剂量的增加呈先上升后下降的趋势(除了 WA 组分是先下降后基本不变的情况),且在 1.0% 剂量时各组分效果达最高值。当剂量为 0.1%(v/v) 时,两种浮萍的根系分泌物除了效果最高的 HF、WF 组分,其他均对 *P. fluorescens* 脱氮无显著影响,这可能与这些组分中活性物质浓度偏低有关,最终导致根系分泌物总组分效应不显著(图 2)。由此可见,浮萍根系分泌物各组分与 *P. fluorescens* 脱氮效率也

存在着特定的剂量-效应关系,这与根系分泌物总组分的效果趋势是一致的,表明根系分泌物不是简单的营养因子。

根系分泌物对细菌的作用不是单一组分的效应,而是各组分的综合效应^[20]。浮萍根系分泌物与单一的酸性组分、中性组分、碱性组分和水不溶性组分对 *P. fluorescens* 的影响有差异,与这一理论是一致的。而且,各个组分的作用也不是等同的,这主要与其化学成分有关。两种浮萍根系分泌物中仅 WA 组分具有显著的抑制作用,这种负面效应可能是由该组分中特定的化感物质导致。由于各组分是相互影响,相互作用的,WA 组分的抑制作用能削弱 WX3 根系分泌物中 WF 和 WN 组分的促进效果,而 HA 组分具有正效应(图 3a),这就能很好地解释 WO 促进效果低于 HO 的原因(图 2)。从环境效应角度考虑,WA 组分的反硝化抑制特性将减弱浮萍对水体的除氮效果,但在农学效应上,这种抑制作用却有减少农田氮素流失的潜力,从而间接提高植物对氮素的利用率^[21]。因此,WA 组分中特定化学成分具有开发为天然生物硝化抑制剂的潜力。植物根系能分泌有抑制硝化作用的物质,如环二萜化合物(brachialactone)和 4-羟基苯-3-甲基丙酸分别是非洲湿生臂形牧草 *B. humidicola* 和高粱根系分泌的强有力的硝化抑制剂^[22-23]。为了更好地阐明两种浮萍除氮效率差异的原因,今后需对 WA 和 HA 组分进行化学成分鉴定,并比较两者成分和含量差异。



(CK: CH_2Cl_2 对照; HA/WA: HZ1/WX3 根系分泌物酸性组分; HN/WN: HZ1/WX3 根系分泌物中性组分; HB/WB: HZ1/WX3 根系分泌物碱性组分; HF/WF: HZ1/WX3 根系分泌物水不溶性组分)

图 3 不同剂量 HZ1(a) 和 WX3 (b) 根系分泌物各组分对 *P. fluorescens* 脱氮效率的影响

Fig. 3 Effects of different doses of root exudate fractions of HZ1 (a) and WX3 (b) on nitrogen removal efficiency of *P. fluorescens*

3 结论

HZ1 和 WX3 的根系分泌物总组分均促进了 *P. fluorescens* 脱氮效率,且促进效果为 HZ1 > WX3,这与 HZ1 对水体的除氮效率高于 WX3 一致,表明根系分泌物与浮萍-微生物耦合系统除氮效果密切相关。而且,浮萍根系分泌物不是传统的营养因子,*P. fluorescens* 脱氮效率与浮萍根系分泌物具有特定剂量-效应关系,

除 WA 组分处理脱氮效率随添加剂量的增加先下降后基本不变外,其他组分呈先上升后下降的趋势,在剂量为 1.0%(v/v) 时起最大效果。根系分泌物中仅 WA 组分具有显著抑制 *P. fluorescens* 脱氮的效果,这很有可能是两种浮萍根系分泌物促进 *P. fluorescens* 脱氮效果有差异的原因,进而导致了浮萍对水体除氮效率的差异。今后对 WA 和 HA 组分化学成分的鉴定和比

较,以及特定物质与微生物相互作用的研究,能为筛选高效除氮的浮萍品种提供理论依据。

参考文献：

- [1] 沈根祥, 徐介乐, 胡双庆, 赵庆节, 刘勇弟. 浅水体浮萍污水净化系统的除氮途径[J]. 生态与农村环境学报, 2006, 22(1): 42–48
- [2] Al-Nozaily F, Alaerts G, Veenstra S. Performance of duckweed-covered sewage lagoons-II. Nitrogen and phosphorus balance and plant productivity[J]. Water Research, 2000, 34(10): 2734–2741
- [3] Peng JF, Wang BZ, Song YH, Yuan P. Modeling N transformation and removal in a duckweed pond: Model application[J]. Ecological Modelling, 2007, 206: 294–300
- [4] Zimmo OR, van der Steen NP, Gijzen HJ. Nitrogen mass balance across pilot-scale algae and duckweed-based wastewater stabilisation ponds[J]. Water Research, 2004, 38(4): 913–920
- [5] 周影茹, 袁晓燕, 王俊儒, 包涛芳, 施卫明. 太湖地区高效除氮浮萍品种的筛选及其除氮机理的初步研究[J]. 土壤, 2010, 42(3): 390–397
- [6] Stout L, Nüsslein K. Biotechnological potential of aquatic plant-microbe interactions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(3): 339–345
- [7] Toyama T, Yu N, Kumada H, Sei K, Ike M, Fujita M. Accelerated aromatic compounds degradation in aquatic environment by use of interaction between *Spirodela polyrrhiza* and bacteria in its rhizosphere[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(4): 346–353
- [8] Yamaga F, Washio K, Morikawa M (2010) Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemnaea oukikusa*[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(16): 6470–6474
- [9] Kristanti RA, Kanbe M, Toyama T, Tanaka Y, Tang YQ, Wu XL, Mori K. Accelerated biodegradation of nitrophenols in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*[J]. Journal of Environmental Science-China, 2012, 24(5): 800–807
- [10] Stout LM, Dodova EN, Tyson JF, Nusslein K. Phyto-protective influence of bacteria on growth and cadmium accumulation in the aquatic plant *Lemna minor*[J]. Water Research, 2010, 44(17): 4970–4979
- [11] Lu YF, Zhou YR, Nakai S, Hosomi M, Zhang HL, Kronzucker HJ, Shi WM. Stimulation of nitrogen removal in the rhizosphere of aquatic duckweed by root exudate components[J]. Planta, 239: 591–603
- [12] 李振高, 伍期途, 李良漠. 太湖地区水稻土优势反硝化细菌的数量、组成与酶活性[J]. 土壤学报, 1989, 26(1): 79–86
- [13] Zhou YR, Lu YF, Zhang HL, Shi WM. Aerobic denitrifying characteristics of duckweed rhizosphere bacterium RWX31[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(3): 211–219
- [14] 周影茹, 陆玉芳, 施卫明. 好氧反硝化菌 RWX31 强化污染废水脱氮的研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(10): 2047–2054
- [15] 常会庆, 丁学峰, 蔡景波. 水生植物分泌物对微生物影响的研究[J]. 水土保持研究, 2007, 14(4): 57–60
- [16] Bauer WD, Caetano-Anollés G. Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere [J]. Plant and Soil, 1990, 129(1): 45–52
- [17] Grayston SJ, Vaughan D, Jones D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability[J]. Applied Soil Ecology, 1997, 5(1): 29–56
- [18] 吴辉, 郑师章. 凤眼莲根分泌物对 *Enterobacter* sp. nov. 苯酚代谢的影响[J]. 应用生态学报, 1993, 4(1): 78–84
- [19] Karjalainen H, Stefansdottir G, Tuominen L, Kairesalo T. Do submersed plants enhance microbial activity in sediment? [J]. Aquatic Botany, 2001, 69(1): 1–13
- [20] Rovira A. Plant root exudates[J]. Botanical Review, 1969, 35(1): 35–57
- [21] Kirk GJ, Kronzucker HJ. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: A modelling study[J]. Annals of Botany, 2005, 96(4): 639–646
- [22] Subbarao GV, Nakahara K, Hurtado MP. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(64): 17 302–17 307
- [23] Zakir HAKM, Subbarao GV, Pearse SJ. Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*)[J]. New Phytologist, 2008, 180(2): 442–451

Different Effect of Root Exudates of Two Duckweed Species on Nitrogen Removal of *Pseudomonas fluorescens* and Their Dose-relationships

LU Yu-fang^{1,2}, ZHOU Ying-ru^{1,2}, SHI Wei-ming^{1*}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In this study, the root exudates of nitrogen-removal efficient *Spirodela polyrrhiza*(HZ1) and nitrogen-removal inefficient *Lemna minor* (WX3) from Tai Lake region were collected continuously and separated, and the effects of dose and composition of root exudates on the nitrogen removal efficiency of the denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens* were also investigated. The results showed that the nitrogen removal efficiency of *P. fluorescens* was significantly stimulated by the crude root exudates of two duckweed species, which exhibited no effect on the growth of the *P. fluorescens*. The stimulation of the crude root exudates of HZ1 (HO) was significantly higher than that of WX3 (WO), which was consistent with the earlier research that the nitrogen removal abilities of HZ1 was higher than WX3 in treating the polluted water. An effect of different fractions of two duckweed root exudates was also observed. Among these fractions, only the acidic fraction of root exudates of WX3 (WA) inhibited the nitrogen removal efficiency of *P. fluorescens*, while all the fractions of root exudates of HZ1 displayed a stimulatory effect or no effect. Overall, the nitrogen removal efficiency of *P. fluorescens* firstly increased and then decreased with doses of duckweed root exudates and their fractions increase, with the exception of WA, where the efficiency remained unchanged after the initial decrease. When the dose was 1.0% (v/v), all of the fractions had the maximum effect. Therefore, these results indicated a close relationship between the root exudates and the nitrogen removal abilities of coupled duckweed-microbe systems, and the acidic faction was mainly responsible for the different effects of root exudates from two duckweed species on the nitrogen removal efficiency of *P. fluorescens*.

Key words: Duckweed, Root exudate, *Pseudomonas fluorescens*, Nitrogen removal, Dose