

# 一株对氯苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性

任华峰<sup>1,2</sup>, 李淑芹<sup>2</sup>, 刘双江<sup>1</sup>, 刘志培<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080; 2. 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:**从某化工厂污水处理车间好氧池活性污泥中分离到一株降解对氯苯胺的细菌 PCA039 菌株, 该菌株能够以对氯苯胺为唯一碳源、氮源生长。经过对其形态特征、生理生化以及 16S rDNA 序列分析, 该菌株初步鉴定为 *Diaphorobacter* sp.。进一步研究表明, 该菌株的生长过程中, 氯离子释放同步于对氯苯胺降解, 并且氯离子的释放量与对氯苯胺的降解量相当。其利用对氯苯胺生长的最适温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.5, 3 d 时间内的最适降解浓度为 300 mg/L (2.35 mmol/L)。测定了降解途径中相关酶的活性, 表明对氯苯胺经过苯胺双加氧酶初始氧化和羟基化后, 芳环的裂解是由邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化。

**关键词:**生物降解; 对氯苯胺; *Diaphorobacter* PCA039 菌株

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)01-0154-05

## Isolation and Characterization of a *p*-Chloroaniline Degrading Bacterial Strain

REN Hua-feng<sup>1,2</sup>, LI Shu-qin<sup>2</sup>, LIU Shuang-jiang<sup>1</sup>, LIU Zhi-pei<sup>1</sup>

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. College of Environment and Resource, North East Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** A bacterial strain that degrades *p*-chloroaniline is isolated from activated sludge of wastewater treatment plant treating wastewater from a chemical factory. Results indicate that this strain took *p*-chloroaniline as sole carbon, nitrogen and energy sources. It is identified as *Diaphorobacter* sp. PCA039 according to its morphology, and biochemical properties, and 16S rDNA sequence analysis. Further study indicate that chloride anion is released simultaneously and stoichiometrically to *p*-chloroaniline degradation during cultivation. The optimal pH and temperature for cell growth and *p*-chloroaniline degradation were 7.5 and 30℃, respectively, and the optimal concentration of *p*-chloroaniline in three days was 300 mg/L (2.35 mmol/L). Enzymatic analysis show that initial reactions of *p*-chloroaniline degradation by *Diaphorobacter* sp. PCA039 are catalyzed by aniline dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase.

**Key words:** biodegradation; *p*-chloroaniline; *Diaphorobacter* sp. PCA039

作为氯代芳烃化合物的一族, 氯代苯胺类化合物(Chloroanilines, CAs)在杀虫剂、染料、塑料和药物等的合成中大量使用, 广泛污染环境, 具有致畸、致癌、致突变效应。由于天然微生物缺乏降解此类化合物的酶或酶系, 故其通常难以生物降解, 持久滞留于环境, 并易于生物富集, 对生态环境和人体健康构成威胁。因此, 这类有毒、难于直接降解的化合物已被欧盟立法控制, 并列在美国环保署 EPA 优先污染物名单之中<sup>[1]</sup>。另外, 除进入自然界的氯代苯胺外, 它又是氯代硝基芳烃化合物和除草剂(如苯脲、苯氨基甲酸酯和酰苯胺等)的常见中间代谢产物<sup>[2]</sup>。因此, 研究氯代苯胺类化合物的生物降解对于保护环境及提高人类健康具有重要意义。目前, 相对于其他氯代芳烃类化合物的微生物降解方面所做的大量研究工作, 人们对氯代苯胺类化合物的微生物降解研究还很少见报道, 因此, 对其菌种的筛选、代谢途径及机理更是知之甚少, 主要原因是在微生物代谢过程中产生可使关键降解酶系失活的中间代谢产物<sup>[3]</sup> (“死产物”), 从而使此类化合物的降解变得非常困

难。20 世纪 70、80 年代以来, 国外就氯代苯胺类有机物的生物降解进行了一些研究<sup>[4~7]</sup>, 得到了一些降解菌。而国内还没有相关的研究。本文主要对 1 株高效降解对氯苯胺的细菌 PCA039 进行了鉴定, 研究了该菌株降解对氯苯胺的生理生化特性, 并初步探讨了该菌的对氯苯胺降解酶系。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种富集、分离纯化和培养基组成

试验样品取自南京化工总厂污水处理车间好氧池活性污泥。污泥样品按 10% 的接入量接种于培养基中, 于 30℃、130 r/min 的摇床上振荡培养 1 周左右, 培养基变浑浊后, 再按 1% 的接入量转接到新的培养基中培养 1 周左右, 如此重复 3~5 次, 然后

收稿日期: 2004-04-16; 修订日期: 2004-07-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601150); 国家自然科学基金资助项目(30230010)

作者简介: 任华峰(1977~), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物。

\* 通讯联系人 E-mail: liuzhipei@hotmail.com

在 MSB 琼脂平板上划线分离,选择不同形态特征的菌落,重新转接至加 200 mg/L 对氯苯胺的 MSB 培养基中,相同条件下培养以验证是否具有对氯苯胺降解能力,培养液变混后,进一步纯化,并检测氯离子释放量,直至得到有降解能力的纯培养菌株。

培养基 (MSB) 组成:每 L 含  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 g, 酵母粉 0.05 g, 微量元素溶液<sup>[8]</sup> 5 mL, 对氯苯胺 200 mg/L, pH 7.0. 固体培养基中加入 15 g/L 的琼脂粉。

## 1.2 细菌生长测定和生理生化指标测定

细菌生长以  $\lambda_{600\text{ nm}}$  处的浊度  $\text{OD}_{600}$  表示,革兰氏染色、碳源利用等指标测定参照文献<sup>[9,10]</sup>方法进行。

## 1.3 16S rDNA PCR 扩增和序列测定

采用菌落 PCR 扩增方法,将得到的细胞裂解液做为模板,直接用于 PCR。16S rDNA 扩增的 PCR 反应引物为一对通用引物,正向引物 Pf: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'; 反向引物 Pr: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3', 分别对应大肠杆菌的 16S rRNA 基因的 8~27 和 1495~1514 碱基。PCR 反应体系为 (50  $\mu\text{L}$ ): 10  $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  4  $\mu\text{L}$ , BSA 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 酶 0.4  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 95  $^\circ\text{C}$  4 min; 95  $^\circ\text{C}$  1 min; 55  $^\circ\text{C}$  1 min; 72  $^\circ\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^\circ\text{C}$  10 min。PCR 产物的纯化和测序由上海申能博彩生物科技有限公司完成。

## 1.4 酶活的测定

细胞培养及粗酶液的制备:菌株 PCA039 接入 300 mg/L 对氯苯胺的 MSB 培养基中,于 30  $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 3 d,然后按 200 mg/L 对氯苯胺的浓度再补加 1 次,直到  $\text{OD}_{600}$  为 0.3~0.5。8 000 r/min 离心收集细胞,以 pH 7.0 的 50 mmol/L 的磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次,然后重新悬浮于相同的缓冲液中制成细胞悬液,细胞悬液经过超声细胞破碎器破碎,于 4  $^\circ\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 25 min,弃沉淀,其上清液便为粗酶液。

邻苯二酚 1,2-双加氧酶和邻苯二酚 2,3-双加氧酶活参照文献<sup>[11,12]</sup>所述方法测定。邻苯二酚经过邻苯二酚-1,2-双加氧酶和邻苯二酚-2,3-双加氧酶作用后反应产物己二烯二酸和 2-羟基己二烯半醛酸,分别在 260 nm 和 375 nm 处有最大吸收峰,紫外分光光度计分别测定这 2 个最大吸收峰处的光吸收值的增加量,可测得双加氧酶的酶比活。反应体系包括 0.3  $\mu\text{mol}$  邻苯二酚,50 mmol/L 磷酸盐缓冲

液 1 mL,含有 0.3~0.9 mg 蛋白的细胞提取液,酶促反应总体积为 3 mL。己二烯二酸的摩尔消光系数  $\varepsilon = 16 (\text{mmol} \cdot \text{cm})^{-1}$ , 2-羟基己二烯半醛酸的摩尔消光系数  $\varepsilon = 12 (\text{mmol} \cdot \text{cm})^{-1}$ 。1 个单位的酶活力定义为在标准测定条件下每 min 生成 1 nmol 的己二烯二酸或 2-羟基己二烯半醛酸所需的酶量。酶的比活力 (U/mg 蛋白质):比活力的大小,也就是酶含量的大小,即每 mg 酶蛋白所具有的酶活力。

## 1.5 蛋白含量的测定

采用 Bradford 比色法<sup>[13]</sup>测定蛋白含量。

## 1.6 对氯苯胺和氯离子的测定

对氯苯胺的测定采用高效液相色谱法 (HPLC), C-18 反向柱,测定波长为 254 nm,流动相为甲醇:水 = 70:30 (V/V),流速为 1 mL/min,对氯苯胺的停留时间为 3.5 min 左右。氯离子浓度采用氯离子复合电极测定。

# 2 结果与讨论

## 2.1 样品的富集培养及菌种分离纯化

污泥样经过 4 次富集培养后,得到的混合微生物的培养物,它可以在含有 200 mg/L 的对氯苯胺的合成培养基中生长,在培养过程中通过测定培养液中的  $\text{OD}_{600}$  和对氯苯胺、氯离子的浓度,发现该混合培养液中的对氯苯胺的含量不断减少而氯离子浓度不断增加 (数据略),说明该混合液培养物能利用对氯苯胺生长。

上述混合培养物在对氯苯胺的 MSB 平板上进行划线分离,挑取单菌落,经过复筛、纯化后得到一株能以对氯苯胺为唯一碳源、氮源和能源生长的细菌菌株 PCA039。

菌株 PCA039 在 LB 培养基平板上培养 3 d 的菌落为米色、扁平圆形、表面轻度颗粒状湿润、边缘轻微褶皱,直径在 2.5 mm 左右;革兰氏阴性,细胞直杆状,0.6  $\mu\text{m} \times 1.2 \mu\text{m}$ ,单极毛。氧化酶阳性;不利用任何糖类,可利用甲醇、乙醇、丙酮和丙二酸钠、酒石酸钠等盐类为碳源,但不利用柠檬酸盐;硝酸盐还原和反硝化阳性;DNA 的 G+C 摩尔分数为 63.3%。扩增菌株 PCA039 的 16S rRNA 部分基因,长度为 1434 bp,在 GenBank 中的登录号为 AY559251。序列分析表明该菌株与 *Diaphorobacter nitroreducens*<sup>[10]</sup> 的相似性最高为 99%。结合菌株的形态和生理生化特征,菌株 PCA039 初步鉴定为 *Diaphorobacter* sp.。

## 2.2 PCA039 菌株利用对氯苯胺的生长和氯离子

的释放

把 PCA039 菌株接种于含 300 mg/L 对氯苯胺的合成培养基中,30 ℃ 200 r/min 摇床培养,定时取样测定菌体生长、氯离子释放及对氯苯胺的降解情况.图 1 的结果表明,4d 时间内,300 mg/L 的对氯苯胺基本被完全降解,而 J.Zeyer 等人分离的 *Pseudomonas* sp. strain G 要完全降解 2.5 mmol/L 的对氯苯胺需要至少 10d 时间<sup>[4]</sup>.PCA039 菌株的生长同步于对氯苯胺的降解和氯离子的释放,且 PCA039 菌株的生长曲线、对氯苯胺的降解曲线和氯离子的释放曲线中的迟缓期基本都在 0~20 h,这一期间是对氯苯胺对细胞的相关降解酶进行诱导的时间,然后进入对数期(20~80 h),约在 80h 达到最高的菌体生长量和最高的对氯苯胺降解率;另外,由图 1 还表明,对氯苯胺的降解量与氯离子的释放量成正比例关系.

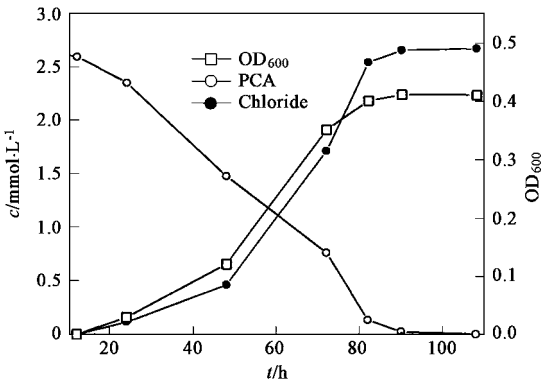


图 1 *Diaphorobacter* sp. 菌株 PCA039 利用对氯苯胺生长和氯离子释放

Fig.1 Degradation of *p*-chloroaniline and release of chloride during the growth of *Diaphorobacter* sp. PCA039 using *p*-chloroaniline as sole carbon, nitrogen and energy sources

2.3 PCA039 菌株生长和降解对氯苯胺的最佳条件

2.3.1 最适浓度

在含有不同浓度对氯苯胺(60~500 mg/L)的合成培养基中(pH 7.0),接种 PCA039 菌株,在 30 ℃ 200r/min 摇床条件下培养 3d.图 2 的结果表明,在对氯苯胺浓度低于 300 mg/L 时,PCA039 能完全降解相应浓度的对氯苯胺,同时菌体的生长(培养液浊度)与对氯苯胺浓度呈正线性关系;当对氯苯胺浓度高于 300 mg/L 时,底物在 3d 内不能被完全降解,500 mg/L 时的降解率只有 2.5%.并且,PCA039 菌株在对氯苯胺浓度为 300 mg/L 的合成

培养基中生长水平最高(降解率为 72%),故 3d 时间中 300 mg/L 的对氯苯胺应为其最适降解浓度.

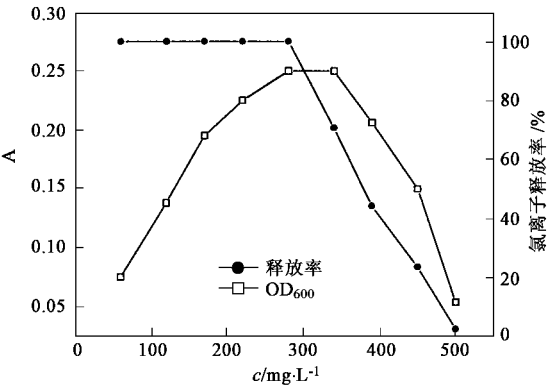


图 2 对氯苯胺浓度对菌株 PCA039 生长和氯离子释放的影响  
Fig.2 Influence of *p*-chloroaniline concentration on the growth of *Diaphorobacter* sp. PCA039 and release of chloride during *p*-chloroaniline degradation

2.3.2 最适温度

将 PCA039 菌株接种于含 300 mg/L 对氯苯胺的合成培养基中,在梯度温度摇床培养 3d,测定菌体的生长和氯离子的释放.图 3 的结果表明,PCA039 菌体生长和降解对氯苯胺的温度适宜范围为 22~34 ℃,在 30 ℃ 时达到最高的对氯苯胺降解率,此时的对氯苯胺降解率为 100%,平均降解量为 4.2 mg/(L·h)<sup>-1</sup>,菌体生长达到 OD<sub>600</sub> = 0.48.另外,由图 3 还可知道,PCA039 的生长和降解存在一个临界温度 34 ℃,一旦超过这个温度值,PCA039 的生长和代谢便基本停止,因此,该菌对高温非常敏感,建议 30~32 ℃ 为其的最适生长温度.

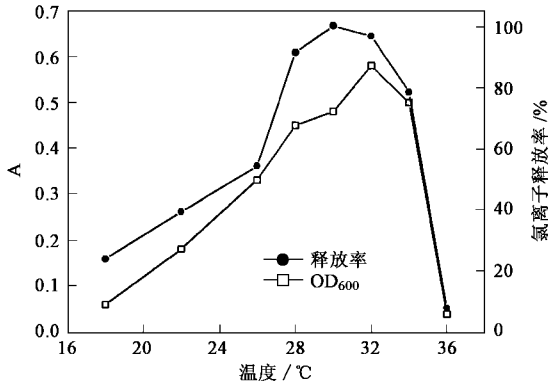


图 3 温度对菌株 PCA039 生长和氯离子释放的影响  
Fig.3 Influence of temperature on the growth of *Diaphorobacter* sp. PCA039 and release of chloride during *p*-chloroaniline degradation

2.3.3 最适初始 pH

在含 300 mg/L 对氯苯胺的不同 pH 合成培养基中接种 PCA039 菌株,30℃、200r/min 摇床培养 3d,测定细胞的生长和氯离子的释放率.图 4 的结果表明,PCA039 菌株生长细胞对对氯苯胺的降解及其细胞生长在 pH 7~11 的范围内都有较高的活性,其最佳 pH 为 7.5;但 PCA039 对酸性环境敏感,pH ≤6 时便基本停止代谢.

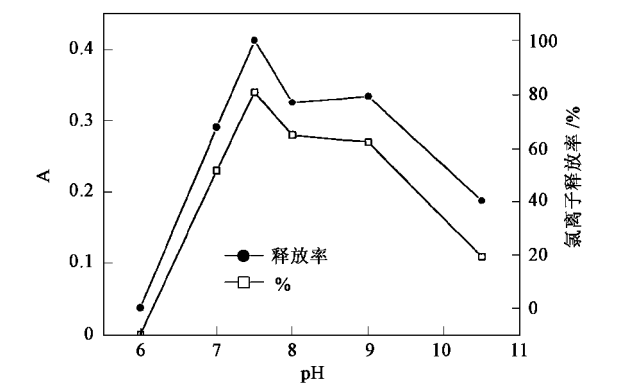


图 4 pH 对菌株 PCA039 利用对氯苯胺生长和氯离子释放的影响  
Fig.4 Influence of pH on the growth of *Diaphorobacter* sp. PCA039 and release of chloride from chloroaniline

2.4 PCA039 菌株相关酶活的测定

据文献报道,氯代芳烃的降解代谢有 2 种途径:修饰邻位开环裂解途径(1,2 位开环)<sup>[14~16]</sup>和间位开环裂解途径(2,3 位或 1,6 位开环)<sup>[3,17,18]</sup>,它们都是以氯代邻苯二酚为中间代谢产物的,如氯代苯胺类化合物(2-CA 3-CA 4-CA),经苯胺双加氧酶初始氧化和羟基化生成 3-氯邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚,然后再经过氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶或氯代邻苯二酚 2,3-双加氧酶以及其他一系列酶的作用下,最后进入三羧酸循环(TCA),生成 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O 和 Cl<sup>-</sup><sup>[13]</sup>.为了推测 PCA039 菌株降解对氯苯胺的代谢途径,测定了以对氯苯胺为唯一碳源和氮源培养的 PCA039 酶活,发现了细胞内存在催化芳烃开环的邻苯二酚 2,3-双加氧酶而没有邻苯二酚 1,2 双加氧酶,表明该菌株是通过间位开环裂解途径降解对氯苯胺的.而 LB 培养基中培养(非诱导条件)的菌体细胞的酶活却很低,所以此降解酶应为诱导酶,结果见表 1.

Arendsdorf 和 Focht 在研究洋葱假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*) P166 对 4-氯联苯的降解途径中发现,4-氯苯甲酸为中间代谢产物,然后产生 4-氯邻苯

二酚,经氯代邻苯二酚 2,3-双加氧酶进一步生成 5-氯-2-羟基康粘酸半醛<sup>[18]</sup>,该产物是一个极不稳定的化合物,极易形成不可被继续分解的产物,即“死产物”,使代谢停止.但在 PCA039 降解对氯苯胺的过程中检测到了相应化学量的氯离子释放,表明该菌株的对氯苯胺降解代谢途径可能与上述不同,其降解机制,特别是脱氯机制有待进一步研究.

表 1 不同培养基中 PCA039 细胞内邻苯二酚 2,3-双加氧酶的酶活  
Table 1 Activities of catechol 2,3-dioxygenase in cell-free extracts of strain PCA039

| 培养基 | 邻苯二酚 1,2-双加氧酶<br>(蛋白质)/U·mg <sup>-1</sup> | 邻苯二酚 2,3-双加氧酶<br>(蛋白质)/U·mg <sup>-1</sup> |
|-----|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| MSB | 0                                         | 450                                       |
| LB  | 0                                         | 64                                        |

3 结论

(1)本研究从南京化工总厂污水处理车间的污泥样品中分离得到一株能够利用对氯苯胺做为唯一碳源、氮源和能源生长的细菌 PCA039,初步鉴定为 *Diaphorobacter* sp..

(2)菌株 PCA039 降解对氯苯胺的最佳条件是温度 30℃,pH 7.5,在此条件下菌株 PCA039 能达到最佳生长状况和最大降解率,初始浓度为 300 mg/L (2.35 mmol/L) 的对氯苯胺,经过 72 h 培养,菌株 PCA039 的降解率为 72%.

(3)在以对氯苯胺为碳源、氮源的培养基中,检测到了与对氯苯胺降解相关的主要酶活性——邻苯二酚 2,3-双加氧酶,证明该菌株是通过间位开环裂解途径降解对氯苯胺的.

参考文献:

[1] Boon N, Top E M, Goris J, et al. Genetic Diversity among 3-chloroaniline and aniline-degrading strains of the *Comamonadaceae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 5: 1107~1115.

[2] Chang C W, Bumpus J A. Oligomers of 4-chloroaniline are intermediates formed during its biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 107: 337~342.

[3] Mars A E, Janssen D B, Kasberg T, et al. Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(14): 4530~4537.

[4] Zeyer J, Kearney P C. Microbial degradation of *para*-chloroaniline as sole carbon and nitrogen source [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1982, 17: 215~213.

[5] Michael L, Christel H, et al. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains [J]. *Archives of Microbiology*, 1990, 155: 56~61.

[6] Surovtseva E G, Ivoilov V S, Karasevich Yu N, et al. Chlorinated anilines, a source of carbon, nitrogen and energy for *Pseu-*

- domonas*[ J ]. *Mikrobiologiia*, 1985, **6**(54): 948 ~ 952.
- [ 7 ] Boon N, Top E M, Goris J, *et al.* Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, *l2 gfp*[ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **7**: 2906 ~ 2913.
- [ 8 ] Kaminski U, Janke D, Prauser H, *et al.* Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An17 and a pseudomonad: a comparative study[ J ]. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 1983, **23**: 235 ~ 246.
- [ 9 ] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[ M ]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [ 10 ] Khan S T, Hiraishi A. *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge[ J ]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2002, **48**: 229 ~ 308.
- [ 11 ] Hayaish O, Katagiri M, Rothberg S. Studies on oxygenase[ J ]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, **229**: 905 ~ 920.
- [ 12 ] Salas Trepas J M, Evans W C. The *meta* cleavage of catechol by *Azobacter* species[ J ]. *European Journal of Chemistry*, 1971, **20**: 400 ~ 413.
- [ 13 ] F. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, R. 布伦特等, 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[ M ]. 北京: 科学出版社, 1999. 332 ~ 333.
- [ 14 ] Latorre J, Reineke W, Knackmuss H. J. Microbial metabolism of chloroanilines: enhanced evolution by natural genetic exchange[ J ]. *Archives of Microbiology*, 1984, **140**: 159 ~ 165.
- [ 15 ] Zeyer J, Wasserfallen A, Timmis K N. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an *ortho*-cleavage pathway[ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **8**: 447 ~ 453.
- [ 16 ] Olga V M, Inna P S, Stefan R K, *et al.* A new modified *ortho* cleavage pathway of 3-chlorocatechol degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP: genetic and biochemical evidence[ J ]. *Journal of Bacteriology*, 2002, **184**(19): 5282 ~ 5292.
- [ 17 ] Kieck G M, Gibson D T. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol[ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, **41**(5): 1159 ~ 1165.
- [ 18 ] Arensdorf J J, Focht D D. A *meta* cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166[ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(2): 443 ~ 447.

## 《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道的研究成果要有创新性, 论点明确, 文字精炼, 数据可靠. 全文不超过 8000 字(含图、表、中英文摘要和参考文献). 国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示). 来稿请用 A4 纸激光打印(一式 3 份), 寄至本刊编辑部. 稿件往来一般通过本刊编辑部, 请不要寄给个人, 以免耽搁或丢失.

2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》的规定撰写. 论文各部分的排列顺序为: 题目; 作者姓名; 作者工作单位、地址、邮政编码; 中文摘要; 关键词; 中图分类号; 英文题目; 作者姓名及单位的英译名; 英文摘要; 关键词; 正文; 致谢; 参考文献.

3. 论文题目应简练并准确反映论文内容, 一般不超过 20 字, 少用副标题.

4. 中文摘要不少于 300 字, 以第 3 人称写. 摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论, 重点是结果和结论. 英文摘要与中文摘要对应, 注意人称、时态和语言习惯, 以便准确表达内容.

5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等. 科普知识不必赘述.

6. 文中图表应力求简明, 同一内容不得用图表重复表达, 要有英文对照图、表题. 图应大小一致, 曲线粗于图框, 图中所有字母、文字字号大小要统一. 表用三线表. 图表中术语、符号、单位等应与正文一致.

7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI). 论文中物理计量单位用字母符号表示, 如 mg(毫克), m(米), h(小时)等. 科技名词术语用国内通用写法, 作者译的新名词术语, 文中第一次出现时需注明原文.

8. 文中各级标题采用 1, 1.1, 1.1.1 的形式, 左起顶格书写, 3 级以下标题可用(1), (2) ... 表示, 后缩 2 格书写.

9. 文中外文字母、符号应标明其大小写, 正斜体. 生物(属、种和亚种)的拉丁学名为斜体. 缩略语首次出现时应给出中文全称, 括号内给出英文全称和缩略语.

10. 未公开发表的资料不列入参考文献, 但可在出现页以脚注表示. 文献按文中出现的先后次序编排. 常见文献书写格式为:

期刊: 作者(外国人也姓列名前). 论文名[ J ]. 期刊名, 年, 卷(期): 起页 ~ 止页.

图书: 作者. 书名[ M ]. 版次(第一版不标注). 出版地: 出版社, 年. 起页 ~ 止页.

会议文集: 作者. 论文名[ A ]. 见(在): 编者. 文集名[ C ]. 出版地: 出版社(单位), 年. 起页 ~ 止页.

学位论文: 作者. 论文名[ D ]. 出版地: 出版单位, 出版年.

报告: 作者. 论文名[ R ]. 出版地: 出版单位, 出版年.

专利: 专利所有者. 专利题名[ P ]. 专利国别: 专利号, 出版日期.

11. 来稿文责自负, 切勿一稿多投. 编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节. 在三个月内未收到本刊选用通知, 可来电询问. 对未刊稿件一般不退, 请作者自留底稿.

12. 来稿请附作者单位详细地址、邮编、电话号码、电子邮箱, 挂号寄至北京市 2871 信箱《环境科学》编辑部. 邮编: 100085; 电话: 010-62941102; 传真: 010-62849343; E-mail: hjkx@mail.rcees.ac.cn