

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第6期

Vol.33 No.6

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版



目次

我国湖泊富营养化效应区域差异性分析	曹金玲, 许其功, 席北斗, 李小平, 杨柳燕, 江立文, 魏自民, 吴献花 (1777)
基于“源”“汇”景观格局指数的海河流域总氮流失评价	孙然好, 陈利顶, 王伟, 王赵明 (1784)
云蒙湖流域土地利用变化对非点源氮污染负荷的影响	孟晓云, 于兴修, 泮雪芹 (1789)
深圳市沿岸表层海水中全氟化合物的残留特征及其分布规律	陈清武, 张鸿, 柴之芳, 沈金灿, 杨波 (1795)
典型电器工业区河涌沉积物中多环芳烃的分布、来源和潜在生态风险	邓代永, 邱孟德, 孙国萍, 郭俊, 张宏涛, 张琴, 许玫英 (1801)
珠江下游河段沉积物中重金属含量及污染评价	谢文平, 王少冰, 朱新平, 陈昆慈, 潘德博, 洪孝友, 尹怡 (1808)
扎龙湿地南山湖沉积岩芯重金属污染特征及来源判别	苏丹, 臧淑英, 叶华香, 孙丽, 贾晓丹, 李苗 (1816)
汕头湾沉积物磷的形态分布与季节变化特征研究	赵建刚, 乔永民 (1823)
氮磷比对东海浮游植物群落生长影响的微宇宙实验	黄伟, 朱旭宇, 曾江宁, 寿鹿, 陈全震, 江志兵 (1832)
春季福建北部海域浙闽沿岸流消亡期浮游桡足类种类组成及其分布	王彦国, 林景宏, 王春光, 林茂 (1839)
滩涂红树林种植-养殖耦合系统中多环芳烃含量水平分析	陈冠秋, 李耀初, 黄晋沐, 南燕, 林茂宏 (1846)
四溴双酚 A 在 5 种巢湖鱼类体内的组织分布与生物浓缩因子研究	杨苏文, 王圣瑞, 闫振广, 张普青 (1852)
五氯酚对稀有鮑卵黄蛋白原及 p53 的诱导效应	熊力, 马永鹏, 张晓峥, 金帮明, 李伟, 苏永良, 毛思予, 刘堰 (1858)
全氟辛烷磺酸 (PFOS) 对斑马鱼卵黄蛋白原 mRNA 水平的影响	程艳, 崔媛, 党志超, 谢文平, 李海山, 殷缓缓, 陈会明 (1865)
水溶性有机物电子转移能力与荧光峰强度的关系研究	陶亚, 袁田, 周顺桂, 袁勇, 庄莉, 王辉亮 (1871)
MIEX 中试实验对二级出水中有机物去除的 3DEEM 解析	杨建, 高金华, 常江 (1878)
XDLVO 理论解析钙离子对腐殖酸反渗透膜污染的影响机制	姚淑娣, 高欣玉, 郭本华, 包南, 谢慧君, 梁爽 (1884)
栅藻 LX1 在水产养殖废水中的生长、脱氮除磷和油脂积累特性	马红芳, 李鑫, 胡洪管, 于茵, 巫寅虎 (1891)
氯化铁用于反硝化同步化学生物絮凝工艺研究	王宏杰, 董文艺, 刘莉莎, 韩贵超 (1897)
合成氨废水短程反硝化特性研究	李妍, 李泽兵, 马家轩, 王晓毅, 赵白航, 李军 (1902)
基于新型反应器的好氧颗粒污泥的稳定性控制	李志华, 杨帆, 李胜, 谢磊, 王晓昌 (1907)
采用非生长能量代谢参数表征颗粒污泥稳定性	李志华, 吴军, 李胜, 谢磊, 王晓昌 (1913)
酸-碱预处理促进剩余污泥厌氧消化的研究	袁光环, 周兴求, 伍健东 (1918)
小回流比条件下污泥浓度分区试验研究	史思, 王素兰, 李瑞, 邢传宏 (1923)
非离子表面活性剂对污泥调质脱水效果的影响	侯海攀, 濮文虹, 时亚飞, 于文华, 樊明明, 刘欢, 杨昌柱, 李野, 杨家宽 (1930)
中国空气污染指数变化特征及影响因素分析	李小飞, 张明军, 王圣杰, 赵爱芳, 马潜 (1936)
南京 3 类不同大气污染过程下气溶胶水溶性无机离子的特征研究	张秋晨, 朱彬, 苏继峰, 王红磊 (1944)
深圳市郊区大气中 PM _{2.5} 的特征分析	戴伟, 高佳琪, 曹罡, 欧阳峰 (1952)
餐饮业油烟的颗粒物分析	谭德生, 邝元成, 刘欣, 戴飞鸿 (1958)
Fe-MnO _x -CeO ₂ /ZrO ₂ 低温催化还原 NO 性能研究	刘荣, 杨志琴 (1964)
自然型氨基酸及其钾盐的 CO ₂ 吸收和再生特性	晏水平, 陈竞翱, 徐明亮, 艾平, 张衍林 (1971)
耕作方式对紫色水稻土农田生态系统 CH ₄ 和 N ₂ O 排放的影响	张军科, 江长胜, 郝庆菊, 唐其文, 程炳红, 李辉, 陈璐豪 (1979)
垄作覆膜条件下田间氨挥发及影响因素	上官宇先, 师日鹏, 李娜, 韩坤, 李会科, 王林权 (1987)
添加不同 N 源条件下典型除草剂对土壤呼吸和 N ₂ O 排放的影响	孙青, 史淳星, 石坤, 言儒斌, 蒋静艳, 吴以中 (1994)
某石墨阳极法氯碱生产场地二噁英污染特征分析	余立凤, 魏文侠, 田亚静, 吴广龙, 李培中, 赵丹 (2000)
脱硫石膏对酸化森林土壤短期修复效果的研究	罗遥, 康荣华, 余德祥, 谭炳全, 段雷 (2006)
岩溶山地土壤氧化铁形态及其与成土环境的关系	张治伟, 朱章雄, 傅瓦利, 文志林 (2013)
废弃尾矿库 15 种植物对重金属 Pb、Zn 的积累和养分吸收	施翔, 陈益泰, 王树凤, 李江川 (2021)
铬胁迫对 3 种草本植物生长及铬积累的影响	王爱云, 黄姗姗, 钟国锋, 徐刚标, 刘志祥, 申响保 (2028)
湘西花垣矿区主要植物种类及优势植物重金属蓄积特征	杨胜香, 田启建, 梁士楚, 周耀渝, 邹慧成 (2038)
增施 CO ₂ 对 C3 和 C4 植物根际氯氰菊酯残留浓度的影响	慕楠, 刁晓君, 王曙光, 王鹏腾, 李攀峰 (2046)
生物强化去除吡啶的特性及微生物种群动态变化分析	乔琳, 赵宏, 王建龙 (2052)
A/O MBR 处理生活污水效率与菌群多样性的关系	邝斌宇, 史青, Montcho Leon Monthero, 丁嫚, 温东辉 (2061)
石油污染土壤生物修复过程中氮循环功能基因的动态检测	吴彬彬, 卢滇楠, 刘铮 (2068)
武汉市儿童多途径铅暴露风险评估	郝汉舟, 陈同斌, 吴基良, 雷梅, 田辉, 祖文普, 钟学斌 (2075)
电子鼻预处理装置的开发及适用性研究	卜凡阳, 文晓刚, 万梅, 刘锐, 陈吕军, 张永明 (2083)
ToxTell 生物传感器在 Cu ²⁺ 、Cd ²⁺ 冲击活性污泥系统分析中的应用	王学江, 王鑫, 刘免, 吴真, 杨连珍, 夏四清 (2090)
环境样品免疫检测基质效应分析与控制	盛建武, 何苗, 施汉昌 (2095)
热等离子体熔融固化模拟医疗废物的研究	张璐, 严建华, 杜长明, 陆胜勇, 李晓东 (2104)
城市生活垃圾组分低温干燥特性及模型研究	吴亚娟, 刘红梅, 陆胜勇, 严建华, 李晓东 (2110)
厌氧-准好氧联合型生物反应器填埋场产气规律的研究	韩智勇, 刘丹, 李启彬 (2118)
处理垃圾渗滤液的 Fe/C 空气阴极 MFC 性能研究	唐玉兰, 彭漫, 于燕, 何亚婷, 傅金祥, 赵玉华 (2125)
基于冗余分析的典型喀斯特山区土壤-石漠化关系研究	龙健, 廖洪凯, 李娟, 陈彩云 (2131)
北京市能源消费与经济增长关系的协整检验分析	陈操操, 张妍, 刘春兰, 王海华, 李铮 (2139)
《环境科学》征稿简则 (1877) 《环境科学》征订启事 (1890) 信息 (1822, 1857, 1896, 2138)	

石油污染土壤生物修复过程中氮循环功能基因的动态检测

吴彬彬, 卢滇楠*, 刘铮*

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 氮循环相关功能微生物在土壤发挥其生态功能中起着重要的作用. 为定量分析其中的固氮细菌、反硝化细菌和硝化细菌在石油污染土壤生物修复过程中的演变情况, 采用了实时定量 PCR 技术对其相关功能基因 *nifH*、*narG* 和 *amoA* 的拷贝数进行检测. 结果表明, 污染土壤中 *nifH*、*narG* 和 *amoA* 基因拷贝数及其占总 16S rRNA 基因拷贝数的比例远低于正常土壤, 修复后土壤中的同类分析结果与正常土壤接近. 表明石油污染物破坏了氮循环相关菌落结构, 而生物修复则使其得以恢复. 进一步分析了不同修复方式下氮循环功能基因的恢复情况以及土壤中石油烃降解率. 也表明同时添加秸秆和菌剂具有最好的修复效果, 处理 40 d 后其 *nifH*、*narG* 和 *amoA* 基因拷贝数(以干土计)分别恢复到 2.68×10^6 、 1.71×10^6 和 $8.54 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$, 石油烃降解率达到 48%. 投加真菌-细菌复合菌剂的效果优于只投加细菌菌剂的效果. 本研究结果表明氮循环功能基因的动态监测可以从基因和物种水平上反映土壤修复的效果, 为土壤修复的监控和效果评估提供参考.

关键词: 土壤修复; 动态监测; 功能基因; 生态评估; 实时定量 PCR

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)06-2068-07

Dynamic Changes in Functional Genes for Nitrogen Cycle During Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil

WU Bin-bin, LU Dian-nan, LIU Zheng

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Microorganisms in nitrogen cycle serve as an important part of the ecological function of soil. The aim of this research was to monitor the abundance of nitrogen-fixing, denitrifying and nitrifying bacteria during bioaugmentation of petroleum-contaminated soil using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) of *nifH*, *narG* and *amoA* genes which encode the key enzymes in nitrogen fixation, nitrification and ammoniation respectively. Three different kinds of soils, which are petroleum-contaminated soil, normal soil, and remediated soil, were monitored. It was shown that the amounts of functional microorganisms in petroleum-contaminated soil were far less than those in normal soil, while the amounts in remediated soil and normal soil were comparable. Results of this experiment demonstrate that nitrogen circular functional bacteria are inhibited in petroleum-contaminated soil and can be recovered through bioremediation. Furthermore, copies of the three functional genes as well as total petroleum hydrocarbons (TPH) for soils with six different treatments were monitored. Among all treatments, the one, into which both *E. cloacae* as an inoculant and wheat straw as an additive were added, obtained the maximum copies of 2.68×10^6 , 1.71×10^6 and 8.54×10^4 per gram dry soil for *nifH*, *narG* and *amoA* genes respectively, companying with the highest degradation rate (48% in 40 days) of TPH. The recovery of functional genes and removal of TPH were better in soil inoculated with *E. cloacae* and *C. echinulata* collectively than soil inoculated with *E. cloacae* only. All above results suggest that the nitrogen circular functional genes could be applied to monitor and assess the bioremediation of petroleum-contaminated soil.

Key words: soil remediation; dynamic monitoring; functional gene; ecological assessment; real-time PCR

生物强化修复技术^[1]通过向污染土壤中投加外源高效降解菌(群)加速石油污染物的降解. 在此过程中进一步添加外源物质, 如投入表面活性剂、废弃生物质等^[2], 可提高石油烃降解速率. 文献[3,4]采用接种真菌-细菌复合微生物菌剂和添加麦秸的措施实现了油盐共污染耕地的修复, Wu 等^[5]采用 PCR-DGGE 技术分析了该土壤强化修复过程中的微生态变化, 展现了修复操作所获得的土壤微生态组成上的差异及其对石油烃降解率的影响, 为构建和优化生物强化用的微生物菌剂提供了参考.

传统生物修复过程的跟踪和修复效果评估通常采用土壤理化性质分析和农作物种植等手段^[6]. 近年来有研究者提出以土壤中特殊微生物的演化为指标, 但其普适性还有待探讨和确认. 吴作军等^[7]以

收稿日期: 2011-08-29; 修订日期: 2011-10-24

基金项目: 中国石油化工股份有限公司科学技术研究开发项目(306038); 全国优秀博士论文作者专项基金项目(200956)

作者简介: 吴彬彬(1989~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: wubb07@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: ludianan@tsinghua.edu.cn; liuzheng@tsinghua.edu.cn

在土壤中参与氮循环的相关功能微生物为指标,采用 DGGE、基因克隆文库法对其在修复前后以及正常土壤中的多样性进行解析,发现修复后土壤中功能微生物多样性接近或达到了正常土壤的水平.然而,该方法只能进行定性分析,如何在土壤修复过程中快速定量地检测功能微生物的数量成为这一指标的具体实施和应用的限制.

实时定量 PCR (real-time PCR) 技术为快速实时定量检测土壤中特定微生物数量提供了可能.在 PCR 体系中加入荧光探针^[8]或荧光染料^[9],通过监测荧光信号强度的变化就能定量分析样品中特定基因的拷贝数.由于实时定量 PCR 技术不受微生物是否可培养的限制,已被广泛地用于土壤修复过程中相关功能基因动态演变情况的研究.例如, Baelum 等^[10]采用实时定量 PCR 监测 2,4-D 单加氧酶基因 *tfdA* 在苯氧酸除草剂 2-甲基-4-氯苯氧乙酸的降解过程中的演变情况,发现 *tfdA* 基因在这一过程中大幅增加; Joong-Wook 等^[11]通过对萘双加氧酶基因 *nahAc* 进行实时定量 PCR 分析,考察了多环芳烃污染土壤中萘的降解速率与 *nahAc* 基因拷贝数的关系,结果表明它们之间呈现显著的相关性.

本研究选取土壤生态循环中氮素循环为目标,采用实时定量 PCR 方法分析了正常土壤、石油污染土壤和污染修复后土壤中 *nifH* 基因(编码固氮作用中的固氮还原酶)、*narG* 基因(编码反硝化作用中的硝酸盐还原酶)和 *amoA* 基因(编码硝化作用中的氨单加氧酶)的拷贝数,并对石油污染土壤生物修复过程进行动态监测,探索石油污染土壤秸秆强化修复和真菌-细菌协同修复过程中氮循环功能基因的定量变化与修复效果之间的关系,以期土壤修复过程中菌剂的组成和优化、修复过程的监控和修复效果评估提供依据.

1 材料与方法

1.1 土壤样品与实验设置

1.1.1 正常、污染和修复后土壤中基因拷贝数的检测

供试土壤来自中原油田采油五厂正常耕地、污染耕地和修复后耕地的种植层(20~40 cm)土壤,经 2 mm 筛过筛处理后于 4℃ 下保存待分析.

1.1.2 不同修复模式下土壤中基因拷贝数的监测

供试土壤来自清华大学校园内蔬菜种植园土壤,经 2 mm 筛处理后向其中添加原油(含 46.6% 的饱和烃、18.8% 的芳香烃、15.0% 的沥青胶质和

19.6% 的非烃物质,以上均为质量分数),以模拟 3% (质量比)浓度的石油污染土壤.

设计了 6 种石油污染土壤生物修复模式.将污染土壤等分成 6 份,每份含 650 g 土壤,形成 5 cm 厚的土层,分别进行如下处理.①灭菌空白对照(NTC):将土壤分装于多个锥形瓶中于 121℃ 下灭菌 15 min,共进行 2 次.②不灭菌空白对照(CK):不作任何处理.③添加秸秆处理(W):土壤不灭菌,加入 5% (质量比,下同)粉碎后的秸秆.④接种细菌处理(B):土壤不灭菌,接种 30 mL D_{600} 值为 1.0 的阴沟肠杆菌悬浮液.⑤同时添加秸秆和接种细菌处理(WB):土壤不灭菌,同时加入 5% 的秸秆和 30 mL 阴沟肠杆菌悬浮液.⑥同时接种真菌和细菌处理(FB):土壤不灭菌,同时加入 30 mL 阴沟肠杆菌悬浮液和适量刺孢小克银汉霉菌孢子悬液.

上述 6 种不同处理的模拟石油污染土壤体系均置于 25℃ 人工气候箱中,过夜处理后作为实验起始点,定期(每 1~2 d)翻动土壤,并向其中加去离子水以维持土壤湿度为 $(20 \pm 2)\%$.

在 0、2、4、7、10、14、19、25、32、40 d 取样.取样时,在浅层和深层土壤中分别找 5 个取样点,每个点约取 2 g,混合均匀,总计 20 g 左右,于 4℃ 下保存待分析.

1.2 土壤总石油烃含量测定

根据美国 EPA 3546 方法^[12],采用微波萃取仪(MARSX, CEM)对土样中的总石油烃(TPH)含量进行测定.

1.3 土壤细菌总 DNA 提取

采用土壤基因组 DNA 提取试剂盒(Soil gDNA Kit, Biomiga)来提取土壤细菌总 DNA.具体操作步骤参见试剂盒内说明书.提取出的 DNA 保存于 -20℃ 待分析.

1.4 引物及常规 PCR 程序

分别以 16S rRNA、*nifH*、*narG* 和 *amoA* 基因代表总细菌、固氮菌、反硝化菌和硝化菌,通过对上述基因拷贝数的定量分析来得到体系内上述细菌的含量.16S rRNA、*nifH*、*narG* 和 *amoA* 基因各自保守序列扩增引物如表 1 所示.

PCR 反应体系包括缓冲液($10 \times$ buffer)2.5 μ L,牛血清白蛋白(BSA, $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)2 μ L,碱基混合物(dNTPs, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)2 μ L,每种引物($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1.5 μ L, *rTaq* 酶($5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)0.4 μ L,模板 1 μ L,最后补足超纯水至 25 μ L.

表 1 16S rRNA、*nifH*、*narG* 和 *amoA* 基因扩增引物¹⁾
Table 1 Primers for 16S rRNA, *nifH*, *narG* and *amoA* genes

基因名称	引物编号	碱基组成	片段大小/bp	文献
16S rRNA	1055-f	ATG GCT GTC GTC AGC T	352	[13]
	1392-r	ACG GGC GGT GTG TAC		
<i>nifH</i>	Pol-f	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	360	[14]
	Pol-R	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA		
<i>narG</i>	<i>narG</i> -f	TAY GTS GGG CAG GAR AAA CTG	110	[15]
	<i>narG</i> -r	CGT AGA AGA AGC TGG TGC TGT		
<i>amoA</i>	<i>amoA</i> -f	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	491	[16]
	<i>amoA</i> -r	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC		

1) Y(C/T), S(G/C), R(A/G), K(G/T), B(C/G/T) 为简并碱基

PCR 扩增反应程序如下:

16S rRNA 基因扩增程序:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 65 ~ 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 共 20 个循环, 每个循环退火温度降低 0.5℃; 除退火温度维持 55℃ 不变外, 以相同条件继续扩增 10 个循环; 最后 72℃ 总延伸 7 min.

nifH 基因扩增程序:94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min.

narG 基因扩增程序:95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 15 s, 63 ~ 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 扩增 6 个循环, 每个循环退火温度降低 1℃; 退火温度维持 58℃, 以上述条件再扩增 34 个循环.

amoA 基因扩增程序:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 共扩增 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min.

1.5 实时定量 PCR 标准曲线制作

目的基因 PCR 扩增产物纯化 (TIANquick Midi Purification Kit, TIANGEN) 后, 使用 pMD18-T 载体试剂盒 (TaKaRa) 将其与载体进行连接, 连接产物转化 DH5α 感受态细胞 (Tiangen). 在含有 Amp (50 μg·mL⁻¹), 表面涂有 4 μL IPTG 溶液 (200 mg·mL⁻¹) 和 40 μL X-gal 溶液 (20 mg·mL⁻¹) 的 LB 培养基上培养成单菌落. 随机挑选白色菌落进行菌落 PCR^[17], 确认该菌落为阳性克隆后置于含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃, 175 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 12 h. 培养得到的菌液采用质粒小提试剂盒 (Plasmid Miniprep Kit, Biomiga) 进行质粒提取. 提取出的质粒采用超微量分光光度计 (NANODROP 1000 Spectrophotometer) 测定其 D_{260} 值, 并根据以下公式计算得到质粒浓度.

$$c = N \times D_{260} \times 50 \times 10^{-6} / M_r \times 6.02 \times 10^{23}$$
$$M_r = n \times 660$$

式中, c 为质粒的浓度, copies·mL⁻¹; N 为测量吸光度值时质粒稀释的倍数; 50×10^{-6} 为 $D_{260} = 1.0$ 的质粒以 g·mL⁻¹ 为单位时的浓度; M_r 为质粒的相对分子质量, g·mol⁻¹; 6.02×10^{23} 为阿伏伽德罗常数; n 为质粒所含碱基对数, bp; 660 为碱基对的平均相对分子质量.

根据计算得到的质粒浓度将质粒溶液进行 10 倍梯度稀释, 制备成标准溶液. 含 4 种基因片段的质粒标准溶液浓度范围如表 2 所示.

表 2 质粒标准溶液浓度
Table 2 Concentration of standard solutions

所含目的基因	标准溶液浓度/copies·μL ⁻¹
16S rRNA	$8.02 \times 10^6 \sim 8.02 \times 10^2$
<i>nifH</i>	$1.06 \times 10^7 \sim 1.06 \times 10^3$
<i>narG</i>	$1.49 \times 10^7 \sim 1.49 \times 10^3$
<i>amoA</i>	$2.58 \times 10^7 \sim 2.58 \times 10^3$

将上述标准溶液作为模板进行实时定量 PCR, 得到各已知浓度模板所对应的循环阈值 (C_t 值), 再以 C_t 值作为纵坐标, 模板浓度对数值作为横坐标即可作出标准曲线.

1.6 实时定量 PCR 条件与程序

实验采用 ABI 7300 (Applied Biosystems) 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR. 反应体系总体积为 50 μL, 包括 2 × SYBR Premix Ex *Taq* (TaKaRa) 25 μL, 50 × ROX Reference Dye (TaKaRa) 1 μL, 10 μmol·L⁻¹ 引物各 1 μL, DNA 模板 4 μL, 超纯水 18 μL.

4 种基因采用相同的两步法扩增程序:95℃ 预变性 30 s; 40 个循环的扩增, 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 45 s; 最后加上熔解曲线分析, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s.

2 结果与讨论

2.1 实时定量 PCR 标准曲线

依照 1.5 节中所述方法进行实时定量 PCR,得到各已知浓度模板所对应的 C_t 值,再以 C_t 值作为纵坐标,模板浓度对数值作为横坐标作出标准曲线,拟合后得到数据如表 3 所示.

表 3 结果显示,4 种基因标准曲线均具有良好的线性度,除 $nifH$ 基因稍有偏差外,其余基因扩增效率也都在 $(100 \pm 10)\%$ 范围内^[18],说明在本研究土壤体系中,实时定量 PCR 对于 16S rRNA、 $nifH$ 、 $narG$ 和 $amoA$ 基因均具有较好的适用性.

表 3 拟合的标准曲线公式¹⁾

Table 3 Formulas of standard curves			
目标基因	线性拟合公式	R^2	$E/\%$
16S rRNA	$C_t = -3.1075 \lg X_0 + 35.7197$	0.9983	109.8
$nifH$	$C_t = -3.8397 \lg X_0 + 42.2692$	0.9990	82.2
$narG$	$C_t = -3.4033 \lg X_0 + 38.8758$	0.9998	96.7
$amoA$	$C_t = -3.4383 \lg X_0 + 35.5997$	0.9998	95.4

1) X_0 : 初始模板拷贝数; C_t : 循环阈值; $E = 10^{-1/K} - 1$; E : 扩增效率; K : 线性拟合公式斜率

2.2 正常、污染和修复土壤中 $nifH$ 、 $narG$ 、 $amoA$ 基因拷贝数比较分析

采用实时定量 PCR 对正常土壤、污染土壤和修复土壤中 16S rRNA、 $nifH$ 、 $narG$ 和 $amoA$ 基因拷贝数进行定量分析,结果如图 1 和图 2 所示.

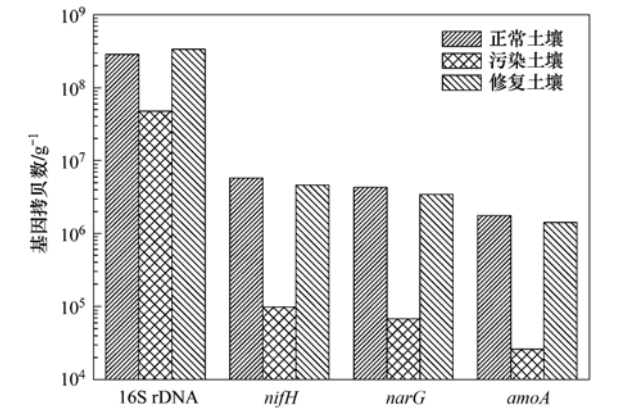


图 1 不同土壤中总细菌和功能微生物数量

Fig. 1 Amount of total and functional microorganisms in different soils

图 1 显示了正常土壤、污染土壤和修复土壤中总细菌和氮循环功能菌的数量不同. 正常土壤中 16S rRNA 基因拷贝数(以干土计,下同)为 $2.86 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$,修复土壤中的为 $3.36 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$,略高于正常土壤,而污染土壤为 $4.76 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$. 对于 3 种功能基因 $nifH$ 、 $narG$ 和 $amoA$ 而言,修复土壤中的拷贝数(分别为 $4.63 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ 、 $3.44 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ 和 $1.42 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$)略低于正常土壤(分别为 5.79×10^6 、 4.30

$\times 10^6$ 和 $1.77 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$),而污染土壤中上述基因的拷贝数分别为 9.83×10^4 、 6.79×10^4 和 $2.59 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$,远远少于正常土壤和修复土壤. 这说明石油污染物对土壤中细菌的生存有明显的抑制作用.

图 2 显示的是不同土壤中 3 种功能基因拷贝数占 16S rRNA 基因拷贝数比例的不同. 污染土壤中 $nifH$ 、 $narG$ 和 $amoA$ 基因拷贝数占 16S rRNA 基因拷贝数的比例(分别为 0.21%、0.14% 和 0.05%)远低于正常土壤(分别为 2.02%、1.50% 和 0.62%),而修复土壤中的比例(分别为 1.38%、1.03% 和 0.42%)则比较接近正常土壤. 上述结果表明,石油污染物的存在破坏了氮素循环相关的菌落结构,使氮循环功能细菌的相对含量大大降低. 这会导致土壤中有有效氮含量减少,是造成石油污染土壤种植能力丧失的重要原因^[19]. 经过生物修复后,土壤中涉及氮素循环的菌落逐渐恢复,标志着土壤种植功能的恢复.

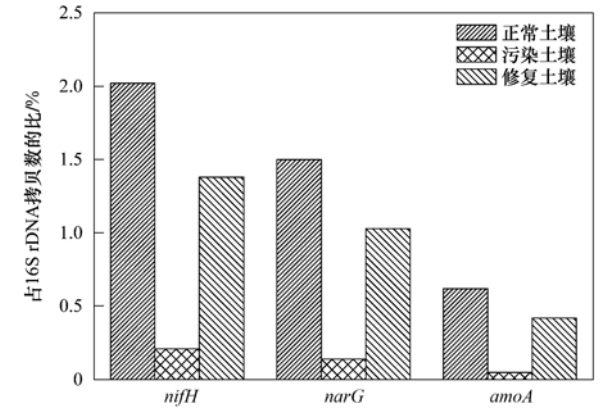


图 2 不同土壤中功能细菌数量占总细菌数量的比例

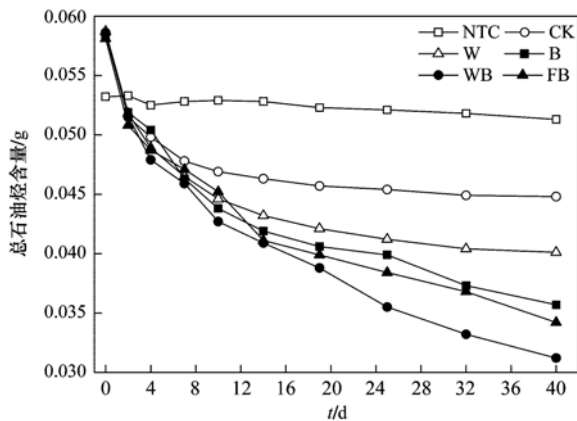
Fig. 2 Ratios of functional bacteria to total germs in different soils

2.3 土壤总石油烃含量动态变化

6 种不同处理的土壤中总石油烃含量随时间变化的关系如图 3 所示.

图 3 的结果显示,在 40 d 的处理过程中,灭菌对照组(NTC)总石油烃含量维持在 $0.051 \sim 0.054 \text{ g}$ ($2.25\% \sim 2.7\%$) 范围内,略低于模拟体系石油烃添加量,这主要源于高温灭菌过程中部分低分子量烃的挥发. 其余 5 种处理的土壤中总石油烃含量都有所降低. 其中,同时添加秸秆和接种细菌处理(WB)的土壤中总石油烃降解率最高,处理 40 d 后降解率达到 48%;同时接种真菌和细菌处理(FB)的土壤次之,达到 43%;只接种细菌处理(B)的土壤中石油烃降解率为 40%;而只添加秸秆处理(W)和空白对照(CK)的降解率分别只有 33% 和 25%.

忽略因自然挥发而造成的石油烃减少(挥发量可参考 NTC 组给出,约为 15%),只添加秸秆处理(W)组和空白对照(CK)组中石油烃部分由土壤中的土著石油烃降解菌所贡献,并且在添加秸秆的处理下,土著菌的活性得到增强,提高了石油烃的降解率.这是由于秸秆的存在增强了土壤的通透性,从而加强了氧传递,促进了土壤中微生物的呼吸^[20].秸秆对石油烃降解的强化作用通过 B 组和 WB 组的对比也可明显看出.通过 B 组和 FB 组的对比可以看出,真菌-细菌协同修复效果比细菌单独作用的效果要好.韩慧龙等^[21,22]对真菌-细菌协同修复的机制进行研究,指出这主要归功于真菌和细菌具有互补的代谢酶系,并且真菌的菌丝体可以作为通道促进细菌在土壤中的迁移.



NTC:灭菌空白对照; CK:不灭菌空白对照; W:添加秸秆处理; B:接种细菌处理; WB:同时添加秸秆和接种细菌处理; FB:同时接种真菌和细菌处理; 纵轴表示的是每 2 g 土壤中所含的总石油烃量

图 3 不同处理土壤总石油烃含量变化

Fig. 3 Dynamic changes of TPH in soils with different treatments

2.4 不同处理土壤修复过程中 16S rRNA、*nifH*、*narG*、*amoA* 基因拷贝数动态变化

分别采用 16S rRNA、*nifH*、*narG*、*amoA* 基因特异引物对土壤细菌总 DNA 进行实时定量 PCR,根据相应标准曲线计算得到 16S rRNA、*nifH*、*narG*、*amoA* 基因拷贝数,进而指示土壤中总细菌和氮循环功能菌(固氮细菌、反硝化细菌和硝化细菌)的数量,其随处理时间的变化情况如图 4~7 所示.

从图 4 可以看到,WB 组土壤 16S rRNA 基因拷贝数在处理开始就迅速增加,最高达到 $1.83 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$,远多于其他各组,说明秸秆的添加对微生物生长的促进作用是非常明显的;在处理 14 d 后有一个较大的回落,而在 25 d 时又明显上升,之后维持在 $1.1 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 左右.研究发现,秸秆可以作为优质碳

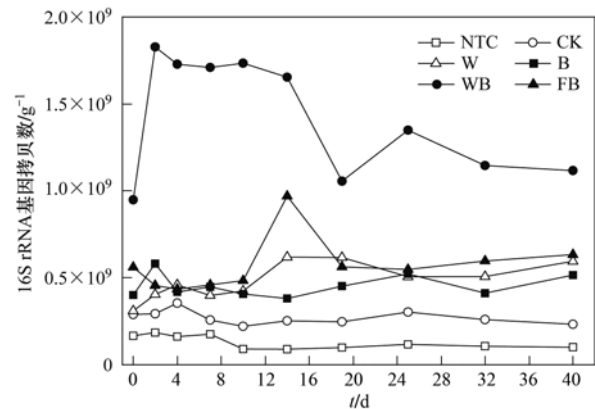


图 4 不同处理土壤中总细菌数量变化

Fig. 4 Dynamic changes of total bacteria count in soils with different treatments

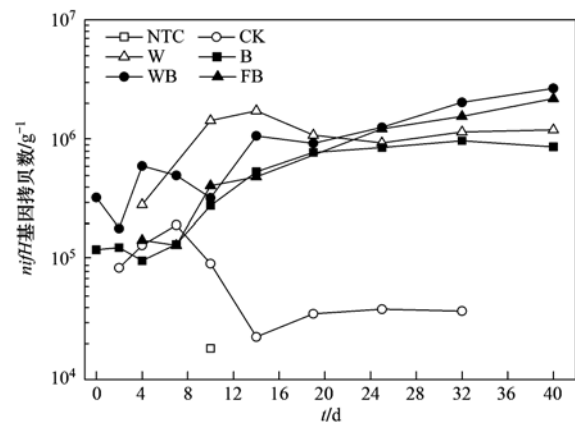


图 5 不同处理土壤中固氮细菌数量变化

Fig. 5 Dynamic changes of nitrogen fixing bacteria count in soils with different treatments

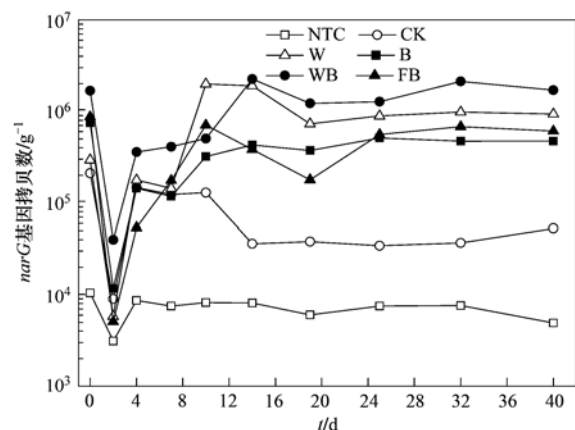


图 6 不同处理土壤中反硝化细菌数量变化

Fig. 6 Dynamic changes of denitrifying bacteria count in soils with different treatments

源促进微生物生长^[23]. 秸秆的降解过程涉及真菌、细菌等多种微生物的共同作用^[24],真菌能将秸秆中的木质素和纤维素降解为小分子化合物,以供细菌再次利用,这就可以解释 25 d 细菌数量再次上升的

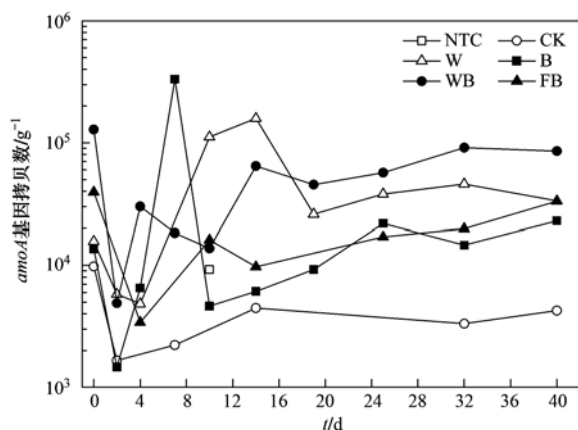


图7 不同处理土壤中硝化细菌数量变化

Fig. 7 Dynamic changes of nitrifying bacteria count in soils with different treatments

现象. 对比 FB 组和 B 组发现, 同时接种真菌和细菌的土壤中总细菌生长状况要优于只接种细菌的土壤, 这与 2.3 节的结论是一致的。

对比图 5~7 可以看出, 各实验组土壤中功能基因拷贝数在处理初期迅速减少, 以 WB 组为例, 其土壤中 *nifH* 基因拷贝数由第 0 d 的 $3.28 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ 土壤减少到第 2 d 的 $1.82 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ 土壤, *narG* 基因拷贝数由 $1.68 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ 减少到 $3.97 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$, *amoA* 基因拷贝数由 $1.29 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ 减少到 $4.89 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$, 这说明石油烃污染物对氮循环功能菌的生长有着明显的抑制作用. 随着处理的进行, 石油烃逐渐降解 (如图 3), 各功能基因拷贝数也逐渐恢复. 而两对照组中 CK 组土壤功能基因拷贝数一直处于较低的水平, NTC 组中其数量大多处于实时定量 PCR 检测限之下. 对比各实验组, WB 组土壤功能菌恢复情况要优于其他各组, 处理 40 d 时 *nifH*、*narG* 和 *amoA* 基因拷贝数分别恢复到 2.68×10^6 、 1.71×10^6 和 $8.54 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$. FB 组的情况要优于 B 组, 这与图 3 显示的石油烃降解率一致. 只添加秸秆的实验组 (W 组) 的石油烃降解率较低 (低于 B 组和 FB 组), 然而其土壤中功能菌恢复情况要好于 B 组和 FB 组, 这表明秸秆具有促进某些非石油烃降解氮循环功能菌的生存的作用. 此外, 有学者考察了秸秆存在下土壤中氮素含量的变化, 发现秸秆能够促进氮的固定和再矿化^[25,26], 这对于土壤修复也是有益的。

3 结论

本研究采用实时定量 PCR 的方法与石油烃含量测定相结合, 对石油污染土壤生物强化修复过程进行动态监测. 实验结果显示正常土壤中氮循环功

能基因拷贝数及其占 16S rRNA 基因拷贝数的比例最高, 其次为污染修复土壤, 而污染土壤中最低, 这显示石油污染对上述土壤微生物生长的抑制作用, 也揭示了石油污染土壤丧失耕作能力的内因——氮素循环被破坏. 在石油污染土壤生物修复的各种强化措施中, 同时添加秸秆和菌剂处理的土壤中氮循环功能菌的恢复最好. 投加真菌-细菌复合菌剂要优于只投加细菌的处理, 而对照组的情况最差. 上述微生物的恢复程度与对应的石油烃降解率的高低具有一致性. 本研究结果表明土壤中氮循环功能基因的实时定量分析可为生物强化修复时接种菌剂的构建、修复过程的监控和修复效果的评价提供微生态学依据。

参考文献:

- [1] Thompson I P, van der Gast C J, Ciric L, *et al.* Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(7): 909-915.
- [2] Hamdi H, Benzarti S, Manusadzian L, *et al.* Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(8): 1926-1935.
- [3] Zhang K, Hua X F, Han H L, *et al.* Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw [J]. *Chemosphere*, 2008, 73(9): 1387-1392.
- [4] 张坤, 苗长春, 徐圆圆, 等. 麦秸强化石油烃污染耕地水浸洗盐过程及场地试验 [J]. *环境科学*, 2009, 30(1): 217-222.
- [5] Wu Z J, Dong H J, Zou L D, *et al.* Enriched microbial community in bioaugmentation of petroleum-contaminated soil in the presence of wheat straw [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164(7): 1071-1082.
- [6] 晁雷, 周启星, 陈苏. 污染土壤修复效果评定方法的研究 [J]. *环境污染治理技术与设备*, 2006, 7(4): 7-11.
- [7] 吴作军. 微生物分子生态学技术在石油污染土壤修复中的应用研究 [D]. 北京: 清华大学, 2010.
- [8] Nitsche A, Steuer N, Schmidt C A, *et al.* Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA [J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(11): 1932-1937.
- [9] Morrison T B, Ma Y, Weis J H, *et al.* Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(4): 987-992.
- [10] Baelum J, Henriksen T, Hansen H C B, *et al.* Degradation of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in top- and subsoil is quantitatively linked to the class III *tfdA* gene [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1476-1486.
- [11] Park J W, Crowley D E. Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(6): 1322-1329.

- [12] 刘伟, 张明祥. 美国 EPA3546 新方法-微波快速溶剂萃取技术 [J]. 现代科学仪器, 2005, **15**(1): 52-55.
- [13] Harms G, Layton A C, Dionisi H M, *et al.* Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant [J]. Environmental Science and Technology, 2003, **37**(2): 343-351.
- [14] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil [J]. Research in Microbiology, 2001, **152**(1): 95-103.
- [15] Chon K, Chang J S, Lee E, *et al.* Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (*narG*), nitrite (*nirS*), and nitrous oxide (*nosZ*) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wetlands [J]. Ecological Engineering, 2011, **37**(1): 64-69.
- [16] Okano Y, Hristova K R, Leutenegger C M, *et al.* Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**(2): 1008-1016.
- [17] Güssow D, Clackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction [J]. Nucleic Acids Research, 1989, **17**(10): 4000.
- [18] McPherson M J, Møller S G. PCR [M]. (2nd ed.). NY: Taylor and Francis, 2006. 229-229.
- [19] Walecka-Hutchison C M, Walworth J L. Evaluating the effects of gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification on nitrogen fertilizer availability in soil experimentally contaminated with diesel [J]. Biodegradation, 2007, **18**(2): 133-144.
- [20] Callaham M A, Stewart A J, Alarcón C, *et al.* Effects of earthworm (*Eisenia fetida*) and wheat (*Triticum aestivum*) straw additions on selected properties of petroleum-contaminated soils [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, **21**(8): 1658-1663.
- [21] 韩慧龙, 汤晶, 江皓, 等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究 [J]. 环境科学, 2008, **29**(1): 189-195.
- [22] 韩慧龙, 陈镇, 杨健民, 等. 真菌-细菌协同修复石油污染土壤的场地试验 [J]. 环境科学, 2008, **29**(2): 454-461.
- [23] Rao M H. Effect of straw, nitrogen and phosphorus application on physic-chemical properties of some typical soils; Part I. Effect on soil organic carbon and its fractions [J]. International Journal of Tropical Agriculture, 1995, **13**(1-4): 57-64.
- [24] 方新, 王志学, 于森, 等. 秸秆自然降解过程中优势菌群的筛选 [J]. 安徽农业科学, 2010, **38**(1): 19-20, 55.
- [25] Corbeels M, Hofman G, van Cleemput O. Nitrogen cycling associated with the decomposition of sunflower stalks and wheat straw in a Vertisol [J]. Plant and Soil, 2000, **218**(1-2): 71-82.
- [26] Curtin D, Selles F, Wang H, *et al.* Carbon dioxide emissions and transformation of soil carbon and nitrogen during wheat straw decomposition [J]. Soil Science Society of America Journal, 1998, **62**(4): 1035-1041.

CONTENTS

Regional Heterogeneity of Lake Eutrophication Effects in China	CAO Jin-ling, XU Qi-gong, XI Bei-dou, <i>et al.</i> (1777)
Correlating Landscape Pattern with Total Nitrogen Concentration Using a Location-weighted Sink-source Landscape Index in the Haihe River Basin, China	SUN Ran-hao, CHEN Li-ding, WANG Wei, <i>et al.</i> (1784)
Impact of the Land-use Change on the Non-point Source Nitrogen Load in Yunneng Lake Watershed	MENG Xiao-yun, YU Xing-xiu, PAN Xue-qin (1789)
Residue Characteristics and Distributions of Perfluorinated Compounds in Surface Seawater Along Shenzhen Coastline	CHEN Qing-wu, ZHANG Hong, CHAI Zhi-fang, <i>et al.</i> (1795)
Distribution and Potential Ecological Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Sediments from Typical Electronics Industrial Zone	DENG Dai-yong, QIU Meng-de, SUN Guo-ping, <i>et al.</i> (1801)
Residues and Potential Ecological Risk Assessment of Metal in Sediments from Lower Reaches and Estuary of Pearl River	XIE Wen-ping, WANG Shao-bing, ZHU Xin-ping, <i>et al.</i> (1808)
Character and Sources Identification of Heavy Metals Contamination in Sediment from the Core Sediment in Nanshan Lake, the Zhalong Wetland	SU Dan, ZANG Shu-ying, YE Hua-xiang, <i>et al.</i> (1816)
Distribution Characteristics of Phosphorus Forms in Surface Sediments of the Shantou Bay in China	ZHAO Jian-gang, QIAO Yong-min (1823)
Microcosm Experiments on the Influence of Different N/P Ratios on Phytoplankton Community Growth in the East China Sea	HUANG Wei, ZHU Xu-yu, ZENG Jiang-ning, <i>et al.</i> (1832)
Species Composition and Distribution Characteristics of Pelagic Copepods in the Northern Sea of Fujian During Withdraw of Zhe-Min Coastal Current	WANG Yan-guo, LIN Jing-hong, WANG Chun-guang, <i>et al.</i> (1839)
PAHs Concentrations in Aquatic Products and Food Safety Evaluation in the Coupled Mangrove Planting-Aquaculture Ecological System	CHEN Guan-qiu, LI Yao-chu, HUANG Jin-mu, <i>et al.</i> (1846)
Tissue Distribution and Bioconcentration Factors of Tetrabromobisphenol A in Five Fishes in Lake Chaohu	YANG Su-wen, WANG Sheng-rui, YAN Zhen-guang, <i>et al.</i> (1852)
Induction Effects of Pentachlorophenol on Vitellogenin and p53 in Chinese Rare Minnow (<i>Gobiocypris rarus</i>)	XIONG Li, MA Yong-peng, ZHANG Xiao-zheng, <i>et al.</i> (1858)
Effects of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Exposure on Vitellogenin mRNA Level in Zebrafish (<i>Brachydanio rerio</i>)	CHENG Yan, CUI Yuan, DANG Zhi-chao, <i>et al.</i> (1865)
Relationship Between Electron Transfer Capacity and <i>Fluorescence Characteristics</i> of Dissolved Organic Matter	TAO Ya, YUAN Tian, ZHOU Shun-gui, <i>et al.</i> (1871)
Characterization of the Change in DOM During Municipal Secondary Effluent Treatment with Magnetic Ion Exchange Resin by 3DEEM	YANG Jian, GAO Jin-hua, CHANG Jiang (1878)
Reverse Osmosis Membrane Fouling by Humic Acid Using XDLVO Approach; Effect of Calcium Ions	YAO Shu-di, GAO Xin-yu, GUO Ben-hua, <i>et al.</i> (1884)
Growth, Removal of Nitrogen and Phosphorus, and Lipid Accumulation Property of <i>Scenedesmus</i> sp. LX1 in Aquaculture Wastewater	MA Hong-fang, LI Xin, HU Hong-ying, <i>et al.</i> (1891)
Iron Chloride for Simultaneous Denitrification and Chemical-Biological Flocculation Process	WANG Hong-jie, DONG Wen-yi, LIU Li-sha, <i>et al.</i> (1897)
Characteristic Research of Shortcut Denitrification in Synthetic Ammonia Industrial Wastewater Treatment Process	LI Yan, LI Ze-bing, MA Jia-xuan, <i>et al.</i> (1902)
Stability Control of Aerobic Granules Using an Innovative Reactor	LI Zhi-hua, YANG Fan, LI Sheng, <i>et al.</i> (1907)
Description of the Stability of Granules Using Nongrowth-related Parameters	LI Zhi-hua, WU Jun, LI Sheng, <i>et al.</i> (1913)
Enhancement of Anaerobic Digestion of Excess Sludge by Acid-Alkali Pretreatment	YUAN Guang-huan, ZHOU Xing-qiu, WU Jian-dong (1918)
Pilot Validation of Sludge Concentration Partition at Small Reflux Ratio Condition	SHI Si, WANG Su-lan, LI Rui, <i>et al.</i> (1923)
Influence of Non-ionic Surfactants on Sludge Dewaterability	HOU Hai-pan, PU Wen-hong, SHI Ya-fei, <i>et al.</i> (1930)
Variation Characteristics and Influencing Factors of Air Pollution Index in China	LI Xiao-fei, ZHANG Ming-jun, WANG Sheng-jie, <i>et al.</i> (1936)
Characteristics of Aerosol Water-Soluble Inorganic Ions in Three Types Air-Pollution Incidents of Nanjing City	ZHANG Qiu-chen, ZHU Bin, SU Ji-feng, <i>et al.</i> (1944)
Characterization of Atmospheric PM _{2.5} in the Suburb of Shenzhen	DAI Wei, GAO Jia-qi, CAO Gang, <i>et al.</i> (1952)
Analysis on Oil Fume Particles in Catering Industry Cooking Emission	TAN De-sheng, KUANG Yuan-cheng, LIU Xin, <i>et al.</i> (1958)
Low-Temperature Catalytic Reduction of NO over Fe-MnO _x -CeO ₂ /ZrO ₂ Catalyst	LIU Rong, YANG Zhi-qin (1964)
CO ₂ Absorption and Regeneration Performance of a Natural Amino Acid and Its Potassium Salt	YAN Shui-ping, CHEN Jing-ao, XU Ming-liang, <i>et al.</i> (1971)
Effects of Tillage-Cropping Systems on Methane and Nitrous Oxide Emissions from Agro-Ecosystems in a Purple Paddy Soil	ZHANG Jun-ke, JIANG Chang-sheng, HAO Qing-ju, <i>et al.</i> (1979)
Factors Influencing Ammonia Volatilization in a Winter Wheat Field with Plastic Film Mulched Ridges and Unmulched Furrows	SHANGGUAN Yu-xian, SHI Ri-peng, LI Na, <i>et al.</i> (1987)
Effects of Typical Herbicides on Soil Respiration and N ₂ O Emissions from Soil Added with Different Nitrogen Fertilizers	SUN Qing, SHI Chun-xing, SHI Kun, <i>et al.</i> (1994)
Analysis of Characteristics of Dioxin Contamination in the Chlor-alkali Site that Uses Graphite Anode for Production	YU Li-feng, WEI Wen-xia, TIAN Ya-jing, <i>et al.</i> (2000)
Effect of Flue Gas Desulfurization Gypsum Application on Remediation of Acidified Forest Soil	LUO Yao, KANG Rong-hua, YU De-xiang, <i>et al.</i> (2006)
Morphology of Soil Iron Oxides and Its Correlation with Soil-Forming Process and Forming Conditions in a Karst Mountain	ZHANG Zhi-wei, ZHU Zhang-xiong, FU Wa-li, <i>et al.</i> (2013)
Pb, Zn Accumulation and Nutrient Uptake of 15 Plant Species Grown in Abandoned Mine Tailings	SHI Xiang, CHEN Yi-tai, WANG Shu-feng, <i>et al.</i> (2021)
Effect of Cr(VI) Stress on Growth of Three Herbaceous Plants and Their Cr Uptake	WANG Ai-yun, HUANG Shan-shan, ZHONG Guo-feng, <i>et al.</i> (2028)
Bioaccumulation of Heavy Metals by the Dominant Plants Growing in Huayuan Manganese and Lead/Zinc Mineland, Xiangxi	YANG Sheng-xiang, TIAN Qi-jian, LIANG Shi-chu, <i>et al.</i> (2038)
Effect of CO ₂ Fertilization on Residual Concentration of Cypermethrin in Rhizosphere of C3 and C4 Plant	MU Nan, DIAO Xiao-jun, WANG Shu-guang, <i>et al.</i> (2046)
Bioaugmented Removal of Pyridine and the Microbial Community Dynamic Analysis	QIAO Lin, ZHAO Hong, WANG Jian-long (2052)
Relationship Between Sewage Treatment Efficiency and Bacterial Community Diversity in an A/O MBR	KUANG Bin-yu, SHI Qing, Montcho Leon Monthero, <i>et al.</i> (2061)
Dynamic Changes in Functional Genes for Nitrogen Cycle During Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil	WU Bin-bin, LU Dian-nan, LIU Zheng (2068)
Risk Assessment of Lead Exposure from Different Intake Pathways for Children in Wuhan City	HAO Han-zhou, CHEN Tong-bin, WU Ji-liang, <i>et al.</i> (2075)
Implementation of a Pretreatment Device for an Electronic Nose	BU Fan-yang, WEN Xiao-gang, WAN Mei, <i>et al.</i> (2083)
Copper and Cadmium Toxicities to Activated Sludge Investigated with ToxTell Biosensor	WANG Xue-jiang, WANG Xin, LIU Mian, <i>et al.</i> (2090)
Matrix Effect and Control of Immunoassay for Environmental Samples	SHENG Jian-wu, HE Miao, SHI Han-chang (2095)
Study on Vitrification of Simulated Medical Wastes by Thermal Plasma	ZHANG Lu, YAN Jian-hua, DU Chang-ming, <i>et al.</i> (2104)
Study on the Low Temperature Drying of Components of Municipal Solid Waste and Its Model Analysis	WU Ya-juan, LIU Hong-mei, LU Sheng-yong, <i>et al.</i> (2110)
Aerogenesis Evolution of the Anaerobic-semiaerobic Bioreactor Landfill	HAN Zhi-yong, LIU Dan, LI Qi-bin (2118)
Performance of Microbial Fuel Cells with Fe/C Catalyst Carbon Felt Air-Cathode for Treating Landfill Leachate	TANG Yu-lan, PENG Man, YU Yan, <i>et al.</i> (2125)
Relationships Between Soil and Rocky Desertification in Typical Karst Mountain Area Based on Redundancy Analysis	LONG Jian, LIAO Hong-kai, LI Juan, <i>et al.</i> (2131)
Energy Consumption and GDP Growth in Beijing: Cointegration and Causality Analysis	CHEN Cao-cai, ZHANG Yan, LIU Chun-lan, <i>et al.</i> (2139)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年6月15日 33卷 第6期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 6 Jun. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科学出版社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科学出版社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行人