

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第11期

Vol.33 No.11

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

京津冀与长三角区域大气 NO ₂ 污染特征	王英, 李令军, 刘阳 (3685)
2008~2011 年夏季京津冀区域背景大气污染变化分析	杨俊益, 辛金元, 吉东生, 朱彬 (3693)
沧州市大气污染特征观测研究	王永宏, 胡波, 王跃思, 刘伟, 张武 (3705)
华北工业城市降水中金属元素污染特征及来源	李月梅, 潘月鹏, 王跃思, 王英锋, 李杏茹 (3712)
广州市交通主干道空气中苯系物的测量	叶丛雷, 谢品华, 秦敏, 凌六一, 郑尼娜, 刘文彬, 黄祖照 (3718)
基于实时交通信息的道路机动车动态排放清单模拟研究	黄成, 刘娟, 陈长虹, 张健, 刘登国, 朱景瑜, 黄伟明, 巢渊 (3725)
柴油轿车燃用煤基 F-T 合成油的排放特性	胡志远, 程亮, 谭丕强, 楼狄明 (3733)
九龙江口滨海湿地生源要素空间分布特征	余小青, 杨军, 刘乐冕, 田原, 余正, 王昌付 (3739)
南四湖水体氮、磷营养盐时空分布特征及营养状态评价	舒凤月, 刘玉配, 赵颖, 吴艳鹏, 李爱华 (3748)
天目湖流域湿地对氮磷输出影响研究	李兆富, 刘红玉, 李恒鹏 (3753)
北京市新建城区不透水地表径流 N、P 输出形态特征研究	李立青, 吕书丛, 朱仁肖, 刘泽权, 单保庆 (3760)
云阳宗海库的分布与来源	张玉玺, 向小平, 张英, 陈玺, 刘景涛, 王金翠, 张媛静, 孙继朝 (3768)
南方某城市地表水体中粪源性污染指示微生物的分布特征研究	孙傅, 沙婧, 刘彦华 (3778)
三峡库区大宁河藻细胞昼夜垂直迁移研究	张永生, 郑丙辉, 姜霞, 郑浩, 钟娜, 陈春宵 (3787)
江淮农村生态型排水系统构建及截污作用研究	单保庆, 李楠, 唐文忠 (3797)
人工湿地植物床-沟壕系统水质净化效果	汪仲琼, 张荣斌, 陈庆华, 魏宏斌, 王为东 (3804)
潜流人工湿地演变对废水中有机物、氮及磷去除的影响	魏泽军, 谢建平, 黄玉明 (3812)
人工湿地处理含盐生活污水的特性研究	高峰, 杨朝晖, 李晨, 金卫红, 邓一兵 (3820)
催化湿式氧化法降解水中的 β -萘酚	刘杰, 于超英, 赵培庆, 陈革新 (3826)
ZVI/EDDS/Air 体系降解水中 2,4-二氯酚的研究	孙倩, 周海燕, 曹梦华, 吴琳娜, 王琳玲, 陈静, 陆晓华 (3833)
微波改性 MWNTs/TiO ₂ 复合材料对 1,2,3-三氯苯的光催化降解研究	施周, 张茜, 张伟, 徐舜开, 张骅 (3840)
腐殖酸对生物炭去除水中 Cr(VI) 的影响机制研究	丁文川, 田秀美, 王定勇, 曾晓岚, 徐茜, 陈健康, 艾小雨 (3847)
臭氧氧化-活性污泥法处理含 PVA 工业废水的试验研究	邢晓琼, 黄程兰, 刘敏, 陈滢 (3854)
复合底物对颗粒化 EBPR 系统除磷特性的影响及优化试验研究	徐少娟, 孙培德, 郑雄柳, 董毅 (3859)
进水比例对水解反应器出水水质的影响研究	梁康强, 熊娅, 戚茂荣, 林秀军, 朱民, 宋英豪 (3868)
厌氧-好氧联合型生物反应器埋地渗滤液水质水量变化规律的研究	韩智勇, 刘丹, 李启彬, 陈馨 (3873)
我国城市污水处理回用调查研究	郭宇杰, 王学超, 周振民 (3881)
快雌醇和壬基酚在土壤中的吸附-解吸特征	姜鲁, 王继华, 李建忠, 辛佳, 李森, 刘翔 (3885)
黄土丘陵区刺槐林深层土壤有机碳矿化特征初探	马昕昕, 许明祥, 杨凯 (3893)
半干旱黄土丘陵区土壤结皮的地表水文效应	卫伟, 温智, 陈利顶, 陈瑾, 吴东平 (3901)
广西大石围巨型漏斗土壤中多环芳烃与环境因素	孔祥胜, 祁士华, 蒋忠诚, 黄保健 (3905)
酸性条件下黄铁矿氧化机制的研究	王楠, 易筱筠, 党志, 刘云 (3916)
淋洗条件下砂土和粉土盐运移过程的监测研究	付腾飞, 贾永刚, 郭磊, 刘晓磊 (3922)
空气注射修复苯污染地下水模拟研究	樊艳玲, 姜林, 张丹, 钟茂生, 贾晓洋 (3927)
不同终点检测 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7 的细胞毒性	张帅帅, 刘堰, 刘树深, 朱祥伟 (3935)
上海世博园后滩湿地桤木类群落特征及其对环境因子的响应	陈立婧, 吴艳芳, 景钰湘, 王聪, 张饮江 (3941)
耐盐石油降解菌的筛选鉴定及其特性研究	吴涛, 谢文军, 依艳丽, 李小彬, 王君, 胡相明 (3949)
高效降酚菌株 <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10 生长动力学和苯酚降解特性的研究	陈晓华, 魏刚, 刘思远, 孙江曼, 王芳芳, 李昊源, 刘宇军 (3956)
四溴双酚 A 好氧降解菌的筛选及其降解特性研究	钱艳园, 刘莉莉, 于晓娟, 丁丛, 王志平, 施玉衡, 李晨君 (3962)
长期施用有机和无机肥对黑土 <i>nirS</i> 型反硝化菌种群结构和丰度的影响	尹昌, 范分良, 李兆君, 宋阿琳, 朱平, 彭畅, 梁永超 (3967)
三氯乙烯在不同土壤中的吸附特性及其影响因素研究	何龙, 邱兆富, 吕树光, 逯志昌, 王治立, 隋倩, 林匡飞, 刘勇弟 (3976)
多菌灵在农田土壤中的降解及其影响因素研究	肖文丹, 杨肖娥, 李廷强 (3983)
硫化物对垃圾焚烧污泥焚烧飞灰高温过程中重金属挥发的影响	刘敬勇, 孙永裕 (3990)
关于医疗垃圾飞灰中二噁英在惰性气氛下的低温热脱附研究	纪莎莎, 李晓东, 徐旭, 陈彤 (3999)
第七届环境模拟与污染控制学术研讨会论文	
稻田气溶胶 NH ₃ 和气体 NO _x 排放在线测定研究	龚巍巍, 栾胜基 (4006)
一种可同时检测挥发性氯代烷烃和氯代烯烃的电子鼻的研制	文晓刚, 刘锐, 蔡强, 万梅, 汤灵容, 陈吕军 (4012)
基于被动采样技术的垃圾焚烧厂及周边大气中 PAHs 分布研究	孙少艾, 李洋, 周轶, 王海蛟, 孙英 (4018)
涪江流域农业非点源污染空间分布及污染源识别	丁晓雯, 沈珍瑶 (4025)
人工湿地不同区域基质磷含量的差异分析	曹雪莹, 种云霄, 余光伟, 仲海涛 (4033)
基于 RT-qPCR 选择性检测水中活性病原菌	林怡雯, 李丹, 吴舒旭, 何苗, 杨天 (4040)
消毒副产物生成的温度影响和动力学模型	张小璐, 杨宏伟, 王小仵, 付静, 解跃峰 (4046)
一种厌氧微观定量研究新方法	张仲良, 吴静, 蒋剑凯, 姜洁, 李怀志 (4052)
梧桐树叶作为反硝化碳源的研究	熊剑锋, 徐华, 阎宁, 张永明 (4057)
降解嗜盐菌 AD-3 的筛选、降解特性及加氧酶基因的研究	崔长征, 冯天才, 于亚琦, 董斐, 杨昕梅, 冯耀宇, 刘勇弟, 林汉平 (4062)
《环境科学》征订启事 (3711) 《环境科学》征稿简则 (3767) 信息 (3998, 4039, 4045, 4056) 专辑征稿通知 (4051)	

长期施用有机和无机肥对黑土 *nirS* 型反硝化菌种群结构和丰度的影响

尹昌¹, 范分良¹, 李兆君¹, 宋阿琳¹, 朱平², 彭畅², 梁永超^{1*}

(1. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部作物营养与施肥重点实验室, 北京 100081; 2. 吉林省农业科学院资源与环境研究中心, 长春 130033)

摘要: 利用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)和实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, Q-PCR)技术, 结合反硝化潜势(DEA)和土壤理化性质的测定, 探索了长期施用有机和无机肥对公主岭黑土 *nirS* 型反硝化细菌的群落结构和丰度的影响。试验设不施肥(CK)、单施有机肥(OM)、单施无机肥(NPK)以及有机肥和无机肥混施(MNPK)等 4 个处理。结果表明, 长期施用有机肥显著增加了土壤的 DEA, 其中 OM、NPK 和 MNPK 处理分别为 CK 处理的 5.92、1.81 和 6.03 倍, 而 NPK 和 CK 间无差异。有机肥处理增加了黑土 *nirS* 型反硝化细菌的丰度, OM、NPK 和 MNPK 处理中 *nirS* 基因的拷贝数分别为 CK 的 2.73、1.30 和 3.98 倍; NPK 处理对 *nirS* 基因的拷贝数影响不显著。T-RFLP 图谱显示施用有机肥改变了 *nirS* 反硝化细菌的群落结构; 相比于非有机肥处理, 有机肥处理中增加了一类 79 bp 的片段类型, 显著降低了 84 bp 的片段类型, 并完全抑制了一类 99 bp 的片段类型, 而有机肥处理间和非有机肥处理间的 *nirS* 群落结构分别相似。系统发育分析表明: 黑土中 *nirS* 型反硝化菌主要由 α 、 β 和 γ -变形菌纲及一些尚未培养的微生物组成, 79 bp 的片段类型与 γ -变形菌纲的假单胞菌科(Pseudomonadaceae)和 β -变形菌纲的伯克氏菌目(Burkholderiales)相似, 84 bp 片段类型与 Burkholderiales 和红环菌目(Rhodocyclales)相似。相关性分析表明, pH、全磷(TP)、全氮(TN)、总有机碳(TOC)、硝态氮(NO_3^- -N)和铵态氮(NH_4^+ -N)依次与 *nirS* 型反硝化细菌的种群丰度(r 为 0.724 ~ 0.922, $P < 0.05$)和 DEA(r 为 0.453 ~ 0.938, $P < 0.01$)显著相关, DEA 与 *nirS* 型反硝化细菌的种群丰度显著线性正相关($r = 0.85$, $P < 0.01$); 冗余度分析表明, 除含水量外, TN、TP、pH、TOC、 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N(r 为 0.440 ~ 0.862, $P < 0.01$)依次与 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的变化显著相关, DEA 的变化和 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的变化亦显著相关($r = 0.863$, $P < 0.01$)。本研究表明相比于无机肥处理, 公主岭黑土中 *nirS* 型反硝化菌的群落结构与丰度对有机肥处理有更显著的响应, 且其群落结构的改变与种群丰度的增加与 DEA 的提高显著相关。

关键词: 黑土; 反硝化菌; *nirS*; 实时荧光定量 PCR; 冗余分析; 末端限制性片段长度多态性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)11-3967-09

Influences of Long-term Application of Organic and Inorganic Fertilizers on the Composition and Abundance of *nirS*-type Denitrifiers in Black Soil

YIN Chang¹, FAN Fen-liang¹, LI Zhao-jun¹, Song A-lin¹, ZHU Ping², PENG Chang², LIANG Yong-chao¹

(1. Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization, Ministry of Agriculture, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Agriculture Environment and Resources Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The objectives of this study were to explore the effects of long-term organic and inorganic fertilizations on the composition and abundance of *nirS*-type denitrifiers in black soil. Soil samples were collected from 4 treatments (i. e. no fertilizer treatment, CK; organic manure treatment, OM; chemical fertilizer treatment (NPK) and combination of organic and chemical fertilizers treatment (MNPK)) in Gongzhuling Long-term Fertilization Experiment Station. Composition and abundance of *nirS*-type denitrifiers were analyzed with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and real-time quantitative PCR (Q-PCR), respectively. Denitrification enzyme activity (DEA) and soil properties were also measured. Application of organic fertilizers (OM and MNPK) significantly increased the DEAs of black soil, with the DEAs in OM and MNPK being 5.92 and 6.03 times higher than that in CK treatment, respectively, whereas there was no significant difference between NPK and CK. OM and MNPK treatments increased the abundances of *nirS*-type denitrifiers by 2.73 and 3.83 times relative to that of CK treatment, respectively. The abundance of *nirS*-type denitrifiers in NPK treatment was not significantly different from that of CK. The T-RFLP analysis of *nirS* genes showed significant differences in community composition between organic and inorganic treatments, with the emergence of a 79 bp T-RF, a significant decrease in relative abundance of the 84 bp T-RF and a loss of the 99 bp T-RF in all organic treatments. Phylogenetic analysis

收稿日期: 2012-02-16; 修订日期: 2012-05-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(41171208, 40901119); 浙江省重大科技专项(2008C12045-2); 国家科技支撑计划项目(2012BAD05B06)

作者简介: 尹昌(1984~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物分子生态学, E-mail: yc729@163.com

* 通讯联系人, E-mail: yeliang@caas.ac.cn

indicated that the *nirS*-type denitrifiers in the black soil were mainly composed of α , β and γ -Proteobacteria. The 79 bp-type denitrifiers inhabiting exclusively in organic treatments (OM and MNPK) were affiliated to Pseudomonadaceae in γ -Proteobacteria and Burkholderiales in β -Proteobacteria. The 84bp-types were related to Burkholderiales and Rhodocyclales. Correlation analysis indicated that pH, concentrations of total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), total organic carbon (TOC), nitrate (NO_3^- -N) and ammonia (NH_4^+ -N) were significantly related to abundances of *nirS*-denitrifiers ($r=0.724-0.922$, $P<0.05$) and the DEA ($r=0.453-0.938$, $P<0.01$). In addition, the DEAs were linearly and positively correlated with the abundances of *nirS*-type denitrifiers ($r=0.85$, $P<0.01$). Redundancy analysis showed that except moisture, pH and concentrations of TP, TOC, NH_4^+ -N and NO_3^- -N were significantly correlated with the community structure of *nirS*-type denitrifiers ($r=0.440-0.862$, $P<0.01$). Furthermore, the DEAs were significantly correlated with the compositions of *nirS*-denitrifiers ($r=0.863$, $P<0.01$). In conclusion, the *nirS*-type denitrifiers in the black soil are more responsive to the organic treatments than to the inorganic treatments in terms of community composition and abundance, both of which are correlated with the changes of DEAs.

Key words: black soil; denitrifiers; *nirS*; real-time quantitative PCR; redundancy analysis; T-RFLP

反硝化作用是反硝化微生物将环境中的硝酸盐或亚硝酸盐经多步酶催化逐步还原为气态产物(NO 、 N_2O 和 N_2)的过程.它是农田生态系统中 N_2O 释放的主要途径^[1],也是农田氮肥损失的重要途径^[2],在陆地生态系统氮循环中具有举足轻重的地位.除极端酸化土壤中具有化学反硝化作用外,土壤反硝化作用主要由反硝化菌参与执行,这些微生物广泛分布于细菌、古菌和真菌等微生物种群中^[3].理解和调控土壤反硝化过程必须研究这些微生物的生态学变化规律.

施肥是农业生产中最重要的农艺措施之一,不同施肥模式往往改变土壤的多种理化性质,如施用铵态氮肥能降低土壤pH,而大部分有机肥则可提高土壤有机质含量和稳定pH^[4].以往研究主要探讨了不同施肥措施对土壤反硝化速率的影响^[5,6],少量学者也探讨了施肥如何通过改变土壤反硝化菌的群落特征,进而影响土壤反硝化速率^[7-9].比如,Enwall等^[7]发现长期施用有机肥改变了*nosZ*型反硝化细菌的群落结构,提高土壤的反硝化潜势;Wolsing等^[8]发现不同施肥处理条件下*nirK*型反硝化细菌的群落结构组成随时间的推移而变化,且有机肥、无机肥间的*nirK*型反硝化细菌的群落结构存在显著的差异,而*nirS*基因只能在春季的土壤中扩增到.在国内,罗希茜等^[9]发现,使用化肥改变了水稻土中*nirK*型反硝化细菌的群落结构,对*nirS*型反硝化细菌的群落结构没有影响.这些研究表明,施肥对反硝化细菌的种群具有显著影响,且具有土壤特异性.但目前对我国旱地的施肥效应的研究十分罕见.

东北是我国主要的商品粮基地,随着人口增长,对粮食需求的增大,该地区的肥料等农业投入也不断增大.深入研究不同施肥措施对反硝化微生物的影响,有助于理解反硝化作用机制,减少氮肥损失和

N_2O 排放.为此,本研究以吉林省公主岭长期定位肥料试验为对象,采用微生物分子生态学方法研究黑土反硝化微生物对施肥的响应,以期为该地区的养分资源综合管理提供科学参考.

1 材料与方法

1.1 长期定位施肥试验概况

试验地点位于吉林省公主岭市,地处东经 $124^\circ48'33.9''$,北纬 $43^\circ30'23''$,海拔高度约220 m,年平均温度 $4\sim5^\circ\text{C}$,无霜期125~140 d,年降水量450~600 mm,年蒸发量1200~1600 mm.土壤为典型黑土,成土母质为第四纪黄土状沉积物.长期施肥试验始于1980年.试验开始时,供试土壤0~20 cm土层含有机质 $28.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全氮(TN) $1.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全磷(TP) $1.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全钾(TK) $22.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、碱解氮 $114\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效磷(P) $27\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效钾(K) $190\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 7.8.试验设12个处理,种植模式为玉米连作.本研究选取不施肥(CK)、单施有机肥(OM)、单施无机肥(NPK)和有机与无机肥混施(MNPK)这4个处理研究长期施用有机肥和无机肥对*nirS*型反硝化菌种群的影响.其中CK为不施肥对照,OM施肥量为单施粪肥 $1300\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$,NPK施肥用量为:N, $165\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$; P_2O_5 , $82.5\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$; K_2O , $82.5\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$,MNPK施肥处理中有机肥和化学肥料施肥量分别与OM和NPK相同.

1.2 土壤的采集和基本理化性质的测定

土壤样品采集于2009年8月3日.采用五点采样法,采样深度为0~20 cm,将5个点混匀作为一个样,重复3次.采集的土样保存在保鲜盒内迅速送至实验室,鲜土过2 mm筛,用于测定土壤含水量等理化性质.用于分子试验分析的土样保存于 -80°C 冰箱,部分土样风干用于测定其他理化性质.

土壤的含水量(H_2O)采用烘干法测定;土壤pH采用电位法(水土比2.5:1)测定土壤TOC采用

重铬酸钾容量法(外加热)测定;土壤 TN 采用开氏消煮法测定;土壤 TP 采用酸溶-钼锑抗比色法测定; NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 采用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 K_2SO_4 浸提,浸提液采用流动分析仪测定。

1.3 DEA 的测定

反硝化潜势的测定采用乙炔抑制法。简述如下:称取相当于 10 g 干土的鲜土,装入 50 mL 血清瓶,加入 10 mL $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KNO_3 和葡萄糖混合溶液,采用丁基橡胶塞和铝盖压口密封,充氮气 5 min,平衡至大气压后,充入 10% 的乙炔气体,样品放置于摇床, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 25°C 培养,每隔 1 h 采集气体,气体样品采用 HP7890A 气相色谱分析。

1.4 DNA 的提取

采用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒和 MP FastPrep-24 核酸提取仪提取土壤 DNA,提取步骤参考说明书。提取产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色检验。

1.5 T-RFLP 分析

笔者初步研究发现,*nirK* 型反硝化菌的群落结构在不同施肥处理条件下无显著变化。因此,本研究中,采用 *nirS* 作为分子标记对 *nirS* 型反硝化菌的群落结构进行分析。亚硝酸还原酶 *nirS* 基因分别采用引物对 cd3aF-R3cd^[10] 进行扩增,其中引物 cd3aF 采用 6-FAM 荧光标记,扩增条件如文献[10]。扩增体系如下:25 μL 的扩增体系(试剂来自 Takara)中包括:1 $\times$ PCR 反应缓冲溶液, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP,前后引物各 $0.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1.25 U 的 *rTaq* 酶和 1 μL 的 5 倍稀释 DNA 模板, $400 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 BSA,剩余体积用双蒸水补齐。扩增在 Bio-Rad thermal cycle 上进行。扩增产物经切胶纯化后,用 5 U 的 *Hha* I 酶切,酶切产物用 Tiangen (天根生化,中国)纯化试剂盒纯化。取 2~4 μL 酶切纯化产物,加入 8 μL 去离子甲酰胺和 0.025 μL Mapmarker1000 内标,混合,采用 ABI 3730 测序仪上机分析。所得数据采用 Peak Scanner 分析,片段长度通过和内标比较加以确定。分析时忽略信号强度低于总信号强度 2% (各峰对应的信号强度的总和)和 <50 bp 的峰。参考 Dunbar 等^[11]的方法将每个峰的信号强度标准化,每种末端限制性片段(T-RF)类型的相对丰度用百分比的形式表示。

1.6 Q-PCR

标准曲线的制作:选取单克隆转接过夜培养后,采用 UNIQ-10(生工,上海)柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒,质粒浓度经 Nanodrop 测定后,逐步 10

倍稀释至 $10^1 \sim 10^8$ 拷贝,保存于 -80°C 备用。

Q-PCR 在 Bio-Rad IQ5 上进行,反应体系为:2 μL 20 倍稀释 DNA 模板, 10 μL $2 \times$ Bio-Rad Supermix (Bio-Rad), 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物 cd3aF 和 R3cd 各 0.4 μL ,剩余体积用双蒸水补齐。反应程序如文献[12]。

1.7 克隆和测序

根据 T-RFLP 结果选择不施肥处理(CK)和单施有机肥(OM)处理的 DNA 作模板,采用上述引物进行 PCR 扩增,扩增条件同上,引物不添加荧光标记,扩增产物经切胶纯化后连接至 pUC19 质粒(Takara,大连),感化细胞 JM109 *E. coli*,过夜培养后,进行蓝白斑筛选,选取阳性克隆进行测序,序列经和 NCBI 数据库比对确认为目的片段后,进行比对和建树分析。

1.8 数据分析

长期不同施肥对土壤理化性质、DEA 和 T-RFLP 片段分布的影响的显著性采用单因素方差分析(SPSS 18.0)检验,并进行多重比较。用 MEGA 5.0 对克隆序列进行比对,并采用邻接法(Neighbour-Joining),用翻译后的氨基酸序列建树。采用 CANOCO 4.5 中的冗余法(redundancy analysis)分析 *nirS* 型反硝化菌群落结构与土壤理化性质及 DEA 的相关性。

2 结果与分析

2.1 不同施肥处理对土壤理化性质和 DEA 的影响

如表 1 所示,除含水量外,长期不同施肥对 pH、TP、TN、TOC、 NO_3^- 和 NH_4^+ 皆有显著影响($P < 0.05$)。施肥显著降低了土壤的 pH。在施肥处理中 MNPK 对 pH 的降低程度最高,OM 其次,NPK 最低。 NO_3^- -N 和 TOC 表现出和 pH 相反的趋势,MNPK 中的 NO_3^- 和 TOC 最高,但 NPK 和 OM 之间 TOC 的差异并不显著。 NH_4^+ -N 在有机肥处理中(OM 和 MNPK)显著降低,NPK 与 CK 间无显著差异。施用有机肥显著增加了土壤中的 TP 和 TN 含量,相比于 TN,TP 在处理间的变化更为明显。有机肥处理(OM 和 MNPK)和非有机肥处理间(CK 和 NPK)的 DEA 也存在显著的差异,施用有机肥显著提高了土壤的 DEA,OM 和 MNPK 处理分别为 CK 的 5.92 和 6.03 倍,而 NPK 和 CK 间无差异。

2.2 不同施肥对 *nirS* 型反硝化菌丰度的影响

长期不同施肥处理间土壤的 *nirS* 型反硝化菌的丰度存在显著的差异(图 1)。施用有机肥显著增

表 1 不同施肥对部分土壤理化性质和 DEA¹⁾

Table 1 Effects of different fertilization regimes on soil physic-chemical properties and DEA

处理	pH (H ₂ O)	H ₂ O /%	NO ₃ ⁻ -N /mg·kg ⁻¹	NH ₄ ⁺ -N /mg·kg ⁻¹	TOC /mg·kg ⁻¹	TN /g·kg ⁻¹	TP /g·kg ⁻¹	DEA (以 N-N ₂ O/干土重计) /ng·(g·h) ⁻¹
CK	8.06a ²⁾	17.48a	5.44d	2.72a	16.88b	1.43b	0.96d	31.21b
OM	7.70c	16.79a	26.29b	0.89b	22.60ab	2.28a	2.55b	184.82a
NPK	8.02b	15.54a	15.25c	3.57a	17.29b	1.57b	1.30c	56.53b
MNPK	7.50d	14.91a	138.15a	0.22b	23.61a	2.41a	3.09a	188.16a

1) $P < 0.05$; 2) 不同小写字母表示同列数据具有显著差异

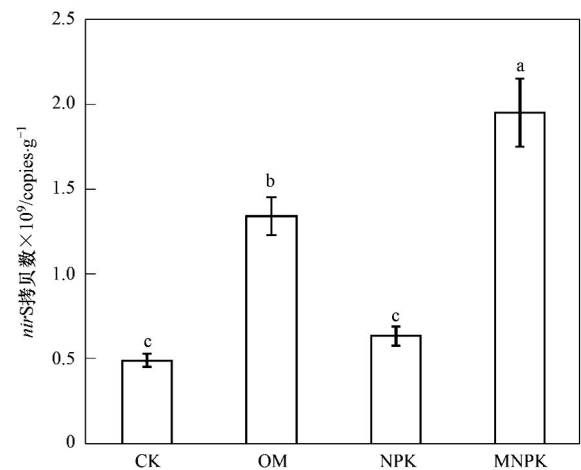


图 1 不同施肥处理条件下 *nirS* 型反硝化细菌的群落丰度

Fig. 1 Abundances of *nirS*-type denitrifiers under different fertilization regimes

加了土壤中 *nirS* 基因的拷贝数,OM、NPK 和 MNPK 分别为 CK 的 2.73、1.30 和 3.06 倍,但 CK 和 NPK 间差异不显著. MNPK 中 *nirS* 基因拷贝数最高,高达 1.9×10^9 copies·g⁻¹, CK 最低,为 4.9×10^8 copies·g⁻¹.

2.3 不同施肥处理对 *nirS* 型反硝化菌群落结构的影响

采用 T-RFLP 技术对 *nirS* 型反硝化菌的群落结构进行分析. 在所有的处理中,*nirS* 基因都得到了特异性较好的扩增产物,经克隆测序比对后确认为目的基因. 经两次独立提取 DNA 和 T-RFLP 分析后,各处理和重复都得到了相似的 T-RFLP 图谱,说明结果是可以重现的,代表了所取土样中的 *nirS* 型反硝化菌的群落结构变化. 采用 *Hha* I 酶切得到 13 种 T-RF 片段长度(图 2),其中片段长度 73、84、122 和 238 bp 占总片段的 63.3% ~ 76.3%. 79 bp 只在有机肥处理(OM 和 MNPK)中存在,片段长度 99 bp 只在非有机肥(CK 和 NPK)出现,片段长度 73、84、86、122、147、192、231 和 238 bp 在所有的处理中皆有出现,但各片段在处理之间的百分比有

所不同. 方差分析表明:73 bp 在有机肥处理中显著增加;84 bp 在有机肥处理中显著降低($P < 0.05$),非有机肥为施有机肥处理的 1.35 倍,OM 与 MNPK 间无差异;施肥处理显著增加了 119 bp 的百分比,但各施肥处理之间差异不显著;147 和 231 bp 在处理间无显著差异;片段长度 407 和 410 bp 只在 OM 处理中出现.

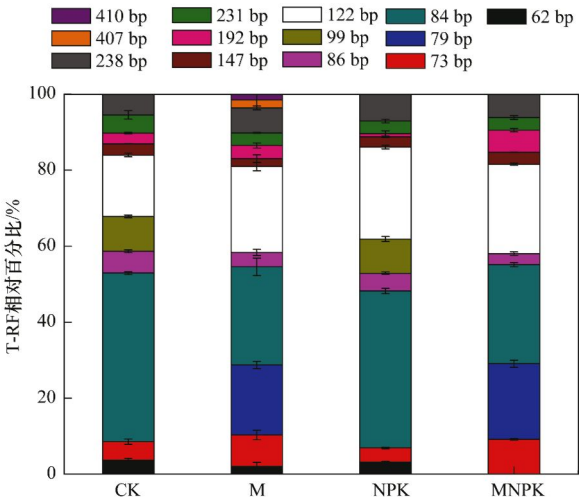
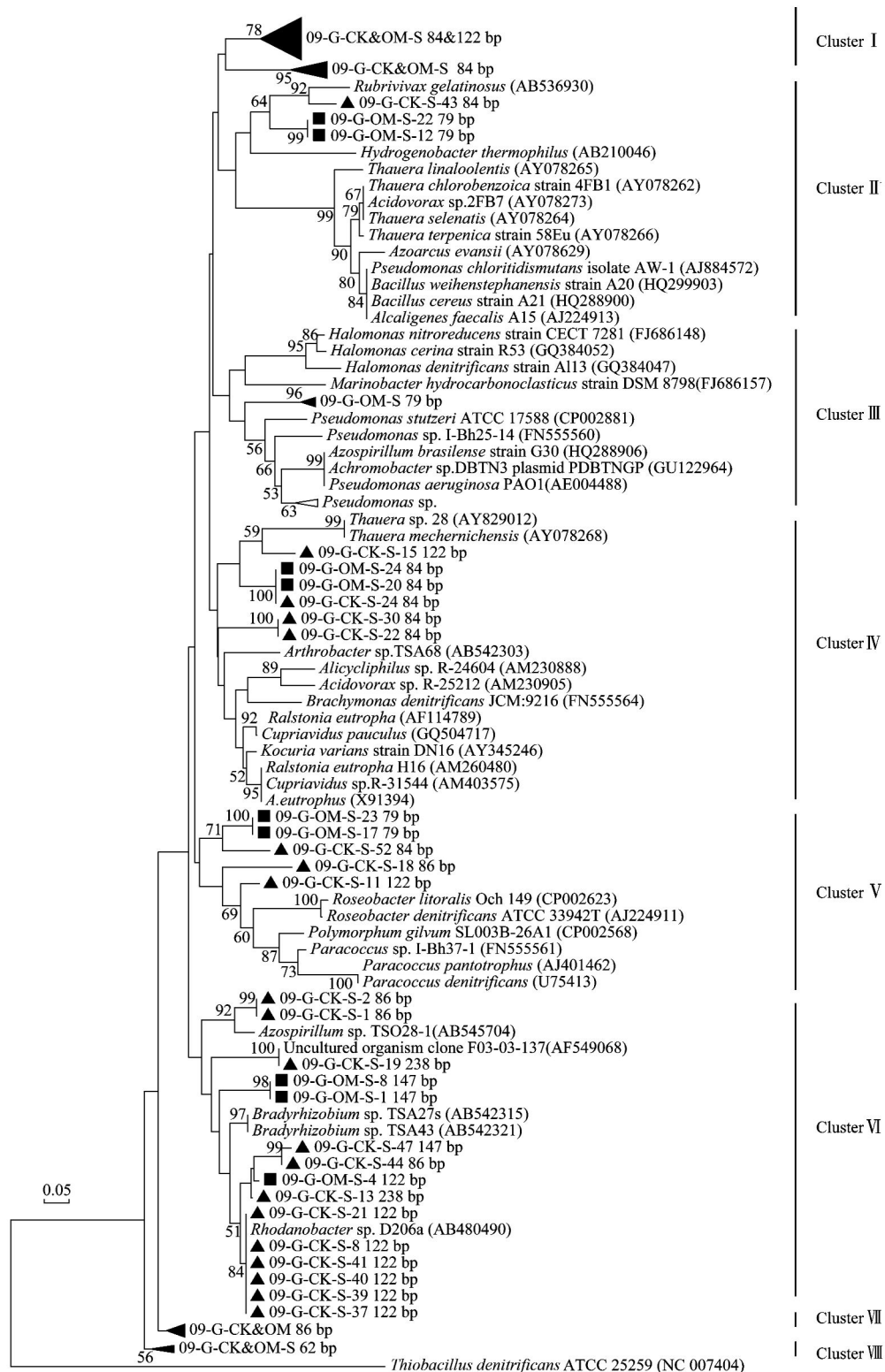


图 2 不同施肥处理条件下 *nirS* 型反硝化菌的群落组成

Fig. 2 Composition of *nirS*-type denitrifiers under different fertilization regimes

系统发育分析表明(图 3):大多数 *nirS* 序列和已知的反硝化微生物相似性较低,但和 NCBI 数据库中来自土壤的 *nirS* 序列有较高的相似性(84 ~ 100%,氨基酸序列). 除部分枯草芽孢杆菌(*Bacillus*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)等属的序列外,进化树在纲的水平上和 16S rRNA 基因分类比较一致. 依据序列在进化树上的分布和已知微生物的相似度,将进化树分为 8 簇. 克隆序列主要集中在第 I、V 和 VI 簇. 第 I 簇包括片段长度为 84 bp 的 25 条序列(CK 文库的 13 条序列和 OM 文库的 12 条序列),以及片段长度为 122 bp 的 3 条序列(CK 文库的 1 条序列和 OM 文库的 2 条序列),未找到与该簇序列相近的已知微生物. 第 II 簇内的 3



各分支上的数字是1 000次重复取样分析的支持百分比, <50 的省略, 序列前的字母的意义分别为: 09, 取样时间;

G, 公主岭; CK 和 OM, 不施肥和有机肥处理, 最后的数字为克隆编号

图3 *nirS* 基因系统发育树(采用邻接法构建)

Fig. 3 Phylogenetic tree of *nirS* gene

条序列皆与 β -变形菌纲(β -Proteobacteria)的伯克氏菌目(Burkholderiales)的 *Rubrivivax gelatinosus* 有较

高的分类值. 第Ⅲ簇内集中了70%的片段长度为79 bp 的序列, 这些序列与 γ -变形菌纲(γ -

Proteobacteria) 的 *Pseudomonadaceae* 相似. 第Ⅳ簇由片段长度为 84 bp 和 122 bp 的克隆序列组成, 它们与 β -Proteobacteria 的 *Burkholderiales* 和红环菌目 (Rhodocyclales) 的部分已知微生物相似. 第Ⅴ簇由 2 条片段长度为 79 bp 及各 1 条片段长度为 84, 86 和 122 bp 的序列组成, 与它们相近的已知微生物为 α -变形菌纲 (α -Proteobacteria) 的红杆菌目 (Rhodobacterales) 的细菌. 第Ⅵ簇主要由片段长度为 86、122、147 和 238 bp 的克隆序列组成. 其中片段长度为 122 bp 的序列与 γ -Proteobacteria 的黄色

单胞菌目 (Xanthomonadales) 的 *Rhodanobacter* 有较高的分类值. 第Ⅶ和Ⅷ簇分别由片段长度为 86 bp 和 62 bp 的克隆序列组成, 未找到与其相近的已知微生物.

2.4 DEA 和土壤理化性质的相关性

将 DEA 和土壤理化性质进行相关性分析 (表 2), 结果显示: TN、TP、OM 及 NO_3^- -N 与 DEA 呈显著正相关; 而 pH 和 NH_4^+ -N 与 DEA 呈显著负相关, 且皆具有较高的相关系数; 含水量与 DEA 的相关系数较低, 未达到显著水平.

表 2 DEA 和土壤理化性质相关系数 (r) 和显著性 (P 值)

项目	pH	H ₂ O	TOC	TN	TP	NO_3^- -N	NH_4^+ -N
r	-0.870	0.041	0.816	0.938	0.904	0.453	-0.713
P	0.002	0.680	0.002	0.002	0.002	0.010	0.004

2.5 *nirS* 型反硝化细菌群落特征和土壤理化性质及 DEA 的相关性

采用冗余度法分析了 *nirS* 型反硝化菌的群落结构与土壤理化性质和反硝化潜势的相关性 (图 4). 结果显示, *nirS* 型反硝化菌群落结构的变异主要显示在 PC1 轴上, 其能解释变异的 88.6%, 而 PC2 轴可以解释总变异的 4.6%. CK、NPK 和 OM 及 MNPK 处理沿 PC1 轴两端分布; OM 和 MNPK 处理交替沿 PC2 轴分布; CK 和 NPK 处理的 *nirS* 型反硝化菌的群落结构在图上分别成簇出现, 但是两者之间的差异主要显示在 PC2 轴上. DEA、TP、TN、TOC、 NO_3^- -N、 NH_4^+ 和 pH 等矢量在 x 轴上皆有较长的投影, 但 DEA、TP、TN、TOC 和 NO_3^- -N 的矢量方向指向有机肥处理, NH_4^+ 和 pH 指向相反方向. 采用 Monte Carlo 法检验后显示, DEA、TN、TP、TOC、 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 和 pH 与群落结构的相关系数依次为 $0.863 > 0.862 > 0.837 > 0.797 > 0.440 > -0.716 > -0.813$, 且皆达到极显著水平 ($P < 0.01$). 但含水量和 *nirS* 型反硝化菌群落结构相关性较低, 且没有达到显著水平 ($P > 0.05$).

对 *nirS* 型反硝化菌种群丰度和土壤理化性质

表 3 *nirS* 型反硝化菌种群丰度和土壤理化性质的相关性分析

项目	pH	H ₂ O	TOC	TN	TP	NO_3^- -N	NH_4^+ -N
r	0.922	0.251	0.824	0.839	0.918	0.740	0.724
P	0.002	0.376	0.002	0.002	0.002	0.002	0.034

3 讨论

长期施用有机肥显著提高了公主岭黑土的反硝

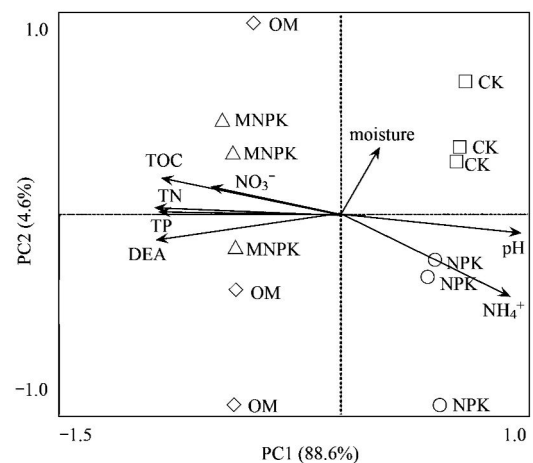


图 4 长期不同施肥条件下 *nirS* 型反硝化菌群落结构和环境因子及 DEA 相关性分析

Fig. 4 Redundancy analysis of the correlation between soil properties, DEA and community structure of *nirS*-type denitrifiers

进行相关性分析 (表 3). 结果显示: 除含水量外, 其余环境因子皆和种群丰度的变化显著相关, 相关性顺序为 $\text{pH} > \text{TP} > \text{TN} > \text{TOC} > \text{NO}_3^-$ -N $> \text{NH}_4^+$ -N. 将 DEA 和 *nirS* 基因的拷贝数进行线性回归分析的结果显示, 两者之间存在极显著的线性正相关关系, 且相关系数达到 0.85 ($P < 0.001$, 图 5).

化潜势, 而长期施用无机肥的效果不明显 (表 1). 类似的研究也表明, 有机肥对反硝化的影响往往比无机肥的影响大, 如 Enwall 等^[7] 的研究表明, 相比

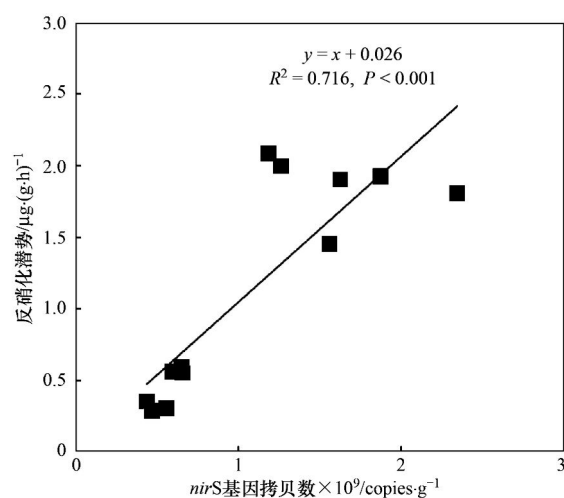
图5 DEA 和 *nirS* 型反硝化种群丰度相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis between DEA and abundance of *nirS*-denitrifiers

于单施化肥处理,有机肥处理显著提高了土壤的DEA; Dambreville 等^[13]亦发现,与单施硝酸铵相比,施用腐熟的猪粪显著增加了土壤的反硝化潜势. 传统观念认为,有机肥改变土壤 DEA,主要是由于有机肥改变了土壤的理化性质^[5,6],本研究的结果也显示,DEA 的变化与部分土壤理化性质的改变有着显著的相关性(表2). 而最近的研究则从分析反硝化微生物本身着手,研究发现土壤 DEA 的变化与反硝化菌种群特征,如种群结构和丰度,存在一定的相关关系^[7,13~15]. 然而,研究结论并不一致^[7,13~15]. 为了探索公主岭黑土对有机和无机肥差异性响应的微生物机制,本研究以 *nirS* 型反硝化菌为例,分析了反硝化菌种群对长期施用有机肥和无机肥的响应.

研究表明,长期施用有机肥显著增加了 *nirS* 型反硝化菌的种群丰度,而 NPK 仅在施用有机肥的基础上才促进了反硝化的生长(图1). 与其它研究结果相比表明,有机肥显著促进反硝化菌生长这种现象具有一定的普遍性^[7,13,14]. 有机肥促进反硝化菌生长可能通过以下多种途径:①有机肥中含有较高的氮素,同时,施用有机肥的土壤氮素转化的速率较高,为反硝化菌提供了丰富的反应底物^[16,17];②施用有机肥为营养生长的反硝化菌提供了丰富的碳源^[13];③施用有机肥土壤的微生物活性往往较高,氧气的消耗也就更快,这为反硝化作用提供良好的低氧微域环境^[18];④长期施用有机肥的土壤往往具有更强的缓冲能力,可减少 pH 变化和干湿交替等胁迫对反硝化菌的抑制作用^[19].

由于本研究土壤的 pH 较高,而且 NPK 仅在施用有机肥的基础上才显著促进了反硝化的生长(图1),因此,提供碳源或创造厌氧环境可能是长期施用有机肥显著提高公主岭黑土 *nirS* 型反硝化细菌种群丰度的主导因素.

系统发育分析表明,公主岭黑土中的 *nirS* 反硝化细菌主要为 α 、 β 和 γ 变形菌纲的反硝化微生物(图3). 长期施用有机肥显著增加了 79 bp 片段类型,这种片段类型主要包括 Burkholderiales 和 Pseudomonadaceae; 而显著减少了 84 bp 片段类型,其主要包括 Burkholderiales 和 Rhodocyclales. 因此,可以推测有机肥主要促进了片段类型为 79 bp 的 Pseudomonadaceae 的生长. 尽管目前关于 Pseudomonadaceae 营养代谢特点的研究较少,但 Henderson 等^[20]的研究表明向土壤中添加葡萄糖可以显著促进这类反硝化菌的生长,这说明 Pseudomonadaceae 适合生长在富营养的环境中,有机肥中含有的大量易分解糖类和脂肪酸等物质可能是促进这类反硝化菌生长的主要原因^[21]. 与有机肥不同,施用无机肥对 *nirS* 型反硝化菌的群落结构影响较小(图4);而且,MNPK 处理中 *nirS* 型反硝化菌群落结构的改变并未表现出 OM 和 NPK 处理条件下群落结构变化的加和性(图3),这进一步说明有机肥处理导致的环境改变是影响 *nirS* 型反硝化细菌群落结构变化的主要原因. 施用有机肥后,99 bp 片段类型消失了,但遗憾的是本研究未能克隆到该序列,这类反硝化菌可能是一种偏好贫营养环境的微生物,但也可能源于 PCR 扩增时出现的偏差.

目前众多的研究表明,*nirS* 型反硝化菌种群对环境的变化不敏感^[22,23]. 如 Yoshida 等^[22]发现,在水稻土中 *nirS* 型反硝化菌对利于反硝化的环境变化不敏感;在国内 Chen 等^[23]发现,我国南方水稻土中的 *nirS* 型反硝化菌主要为 α -变形菌纲,其次为 β -变形菌纲的细菌,*nirS* 型反硝化菌的群落结构对施肥处理没有显著的响应. 本研究表明,公主岭黑土中 *nirS* 型反硝化菌主要由 α -变形菌纲、 β -变形菌纲和 γ -变形菌纲的微生物组成(图5),与水稻土相比,两种土壤类型中 *nirS* 型反硝化细菌的主要种群存在差异. Cavigelli 等^[24]的研究表明,群落结构不同的土壤反硝化菌种群对环境因子变化的响应不同;Ishii 等^[25]的研究亦发现,即使是细菌群落结构相似但理化特点不同的水稻土中对反硝化环境响应的反硝化菌种群并不相同,这说明土壤中对环境变

化的响应的反硝化菌种群具有土壤的特异性,这在一定程度上解释了黑土中 *nirS* 型反硝化菌对有机肥处理的敏感响应。

反硝化过程由 *narG* 或 *napA*、*nirK* 或 *nirS*、*norB* 或 *norZ* 和 *nosZ* 等多种基因编码的酶逐步催化完成^[26]。最近的研究表明,携带不同反硝化基因的微生物种群对环境因子变化的响应并不一致^[27]。因此,有必要研究其它类型的反硝化微生物对长期不同施肥的响应,通过对反硝化微生物种群的多步基因的分析,来深入揭示施肥处理引起的土壤理化性质的变化对黑土反硝化菌种群影响的机制;此外,在 DNA 水平的研究可以部分解释长期定位试验对反硝化细菌种群的影响,但为了更好反映土壤原位的反硝化菌种群的动态变化,在 RNA 水平上的研究亟待展开^[28]。

4 结论

(1)相比于无机肥处理,长期施用有机肥处理显著增加了黑土中 *nirS* 型反硝化菌的种群丰度,且 MNPK 显著高于 OM,NPK 和 CK 间无显著差异;施用有机肥改变了 *nirS* 型反硝化菌的群落结构,有机肥处理间的群落结构相似,非有机肥处理间的群落结构相似。

(2)相比于施用无机肥,长期施用有机肥显著增加了黑土的 DEA,NPK 对 DEA 无显著影响。*nirS* 型反硝化菌群落结构($r = 0.863$, $P < 0.001$)和种群丰度($r = 0.85$, $P < 0.001$)的变化皆和 DEA 显著相关。

(3)综上所述,本研究表明黑土中 *nirS* 型反硝化菌种群的群落结构和丰度对长期施用有机肥有显著的响应,且这种响应与 DEA 的变化显著相关。

参考文献:

- [1] Conrad R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO , CH_4 , OCS , N_2O , and NO) [J]. Microbiological Reviews, 1996, **60**(4): 609-640.
- [2] Seitzinger S, Harrison J A, Böhlke J K, et al. Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis [J]. Ecological Applications, 2006, **16**(6): 2064-2090.
- [3] Shapleigh J P. The denitrifying prokaryotes [J]. The Prokaryotes, 2006, **16**(6): 769-792.
- [4] Stamatiadis S, Werner M, Buchanan M. Field assessment of soil quality as affected by compost and fertilizer application in a broccoli field (San Benito County, California) [J]. Applied Soil Ecology, 1999, **12**(3): 217-225.
- [5] Angers D A, Van Bochove E, Prévost D, et al. Soil carbon and nitrogen dynamics following application of pig slurry for the 19th consecutive Year II. nitrous oxide fluxes and mineral nitrogen [J]. Soil Science Society of America Journal, 2000, **64**(4): 1396-1403.
- [6] Drury C F, McKenney D J, Findlay W I. Relationships between denitrification, microbial biomass and indigenous soil properties [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1991, **23**(8): 751-755.
- [7] Enwall K, Philippot L, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(12): 8335-8343.
- [8] Wolsing M, Priemer A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, **48**(2): 261-271.
- [9] 罗希茜, 陈哲, 魏文学, 等. 长期施用氮肥对水稻土亚硝酸还原酶基因多样性的影响 [J]. 环境科学, 2010, **31**(2): 423-430.
- [10] Throbäck I N, Johansson M, Rosenquist M, et al. Silver (Ag^+) reduces denitrification and induces enrichment of novel *nirK* genotypes in soil [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, **270**(2): 189-194.
- [11] Dunbar J, Ticknor LO, Kuske C R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(1): 190-197.
- [12] Kandeler E, Deiglmayr K, Tschérko D, et al. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(9): 5957-5962.
- [13] Dambreville C, Hallet S, Nguyen C, et al. Structure and activity of the denitrifying community in a maize-cropped field fertilized with composted pig manure or ammonium nitrate [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, **56**(1): 119-131.
- [14] Hallin S, Jones C M, Schlöter M, et al. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment [J]. The ISME Journal, 2009, **3**(5): 597-605.
- [15] Dandie C E, Burton D L, Zebarth B J, et al. Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(19): 5997-6005.
- [16] Baudoin E, Philippot L, Chèneby D, et al. Direct seeding mulch-based cropping increases both the activity and the abundance of denitrifier communities in a tropical soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, **41**(8): 1703-1709.
- [17] Fan F L, Yang Q B, Li Z J, et al. Impacts of organic and inorganic fertilizers on nitrification in a cold climate soil are linked to the bacterial ammonia oxidizer community [J]. Microbial Ecology, 2011, **62**(4): 982-990.

- [18] Smith K. The potential for feedback effects induced by global warming on emissions of nitrous oxide by soils [J]. *Global Change Biology*, 1997, **3**(4): 327-338.
- [19] Sharma S, Szele Z, Schilling R, *et al.* Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(3): 2148-2154.
- [20] Henderson S L, Dandie C E, Patten C L, *et al.* Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76**(7): 2155-64.
- [21] Paul J W, Beauchamp E G. Effect of carbon constituents in manure on denitrification in soil [J]. *Canadian Journal of Soil Science*, 1989, **69**(1): 49-61.
- [22] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, *et al.* *nirK*-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harboring bacteria [J]. *Microbes and Environments*, 2010, **25**(1): 45-48.
- [23] Chen Z, Luo X Q, Hu R G, *et al.* Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil [J]. *Microbial Ecology*, 2010, **60**(4): 850-861.
- [24] Cavigelli M A, Robertson G P. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem [J]. *Ecology*, 2000, **81**(5): 1402-1414.
- [25] Ishii S, Yamamoto M, Tago K, *et al.* Microbial populations in various paddy soils respond differently to denitrification-inducing conditions, albeit background bacterial populations are similar [J]. *Soil Science & Plant Nutrition*, 2010, **56**(2): 220-224.
- [26] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**(4): 533-616.
- [27] Chen Z, Liu J B, Wu M N, *et al.* Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil [J]. *Microbial Ecology*, 2012, **63**(2): 446-459.
- [28] Philippot L, Hallin S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, **8**(3): 234-239.

CONTENTS

Characteristics of Atmospheric NO ₂ in the Beijing-Tianjin-Hebei Region and the Yangtze River Delta Analyzed by Satellite and Ground Observations	··· WANG Ying, LI Ling-jun, LIU Yang (3685)
Variation Analysis of Background Atmospheric Pollutants in North China During the Summer of 2008 to 2011	····· YANG Jun-yi, XIN Jin-yuan, JI Dong-sheng, <i>et al.</i> (3693)
Characteristics of Atmospheric Pollutants in Cangzhou	····· WANG Yong-hong, HU Bo, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3705)
Chemical Characteristics and Sources of Trace Metals in Precipitation Collected from a Typical Industrial City in Northern China	····· LI Yue-mei, PAN Yue-peng, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3712)
BTX Monitoring Nearby Main Road Traffic in Guangzhou	····· YE Cong-lei, XIE Pin-hua, QIN Min, <i>et al.</i> (3718)
Dynamic Road Vehicle Emission Inventory Simulation Study Based on Real Time Traffic Information	····· HUANG Cheng, LIU Juan, CHEN Chang-hong, <i>et al.</i> (3725)
Emission Characteristics of a Diesel Car Fueled with Coal Based Fischer-Tropsch (F-T) Diesel and Fossil Diesel Blends	····· HU Zhi-yuan, CHENG Liang, TAN Pi-qiang, <i>et al.</i> (3733)
Spatial Variations of Biogenic Elements in Coastal Wetland Sediments of the Jiulong River Estuary	····· YU Xiao-qing, YANG Jun, LIU Le-mian, <i>et al.</i> (3739)
Spatio-Temporal Distribution of TN and TP in Water and Evaluation of Eutrophic State of Lake Nansi	····· SHU Feng-yue, LIU Yu-pei, ZHAO Ying, <i>et al.</i> (3748)
Impact on Nitrogen and Phosphorous Export of Wetlands in Tianmu Lake Watershed	····· LI Zhao-fu, LIU Hong-yu, LI Heng-peng (3753)
Nitrogen and Phosphorus Composition in Urban Runoff from the New Development Area in Beijing	····· LI Li-qing, LÜ Shu-cong, ZHU Ren-xiao, <i>et al.</i> (3760)
Distribution and Sources of Arsenic in Yangzonghai Lake, China	····· ZHANG Yu-xi, XIANG Xiao-ping, ZHANG Ying, <i>et al.</i> (3768)
Occurrence of Fecal Indicator Bacteria in Urban Surface Water: A Case Study in Southern China	····· SUN Fu, SHA Jing, LIU Yan-hua (3778)
Vertical Migration of Algal Cells in the Daning River Bay of the Three Gorges Reservoir	····· ZHANG Yong-sheng, ZHENG Bing-hui, JIANG Xia, <i>et al.</i> (3787)
Construct of Yangtze-Huai River Rural Areas Ecological Drainage System and Its Retention Effect on Pollutants	····· SHAN Bao-qing, LI Nan, TANG Wen-zhong (3797)
Water Treatment Efficiency of Constructed Wetland Plant-Bed/Ditch Systems	····· WANG Zhong-qiong, ZHANG Rong-bin, CHEN Qing-hua, <i>et al.</i> (3804)
Effect of the Subsurface Constructed Wetland Evolution into Free Surface Flow Constructed Wetland on the Removal of Organic Matter, Nitrogen, and Phosphor in Wastewater	····· WEI Ze-jun, XIE Jian-ping, HUANG Yu-ming (3812)
Treatment Characteristics of Saline Domestic Wastewater by Constructed Wetland	····· GAO Feng, YANG Zhao-hui, LI Chen, <i>et al.</i> (3820)
Degradation of β -Naphthol by Catalytic Wet Air Oxidation	····· LIU Jie, YU Chao-ying, ZHAO Pei-qing, <i>et al.</i> (3826)
Degradation of 2,4-Dichlorophenol in Aqueous Solution by ZVI/EDDS/Air System	····· SUN Qian, ZHOU Hai-yan, CAO Meng-hua, <i>et al.</i> (3833)
Study on Photocatalytic Degradation of 1,2,3-Trichlorobenzene Using the Microwaved MWNTs/TiO ₂ Composite	····· SHI Zhou, ZHANG Qian, ZHANG Wei, <i>et al.</i> (3840)
Mechanism of Cr(VI) Removal from Aqueous Solution Using Biochar Promoted by Humic Acid	····· DING Wen-chuan, TIAN Xiu-mei, WANG Ding-yong, <i>et al.</i> (3847)
Research on the Treatment of Wastewater Containing PVA by Ozonation-Activated Sludge Process	····· XING Xiao-qiong, HUANG Cheng-lan, LIU Min, <i>et al.</i> (3854)
Effects of Composite Substrates on the Phosphorus Removal in Granule-based EBPR System and Its Optimization Experiment	····· XU Shao-juan, SUN Pei-de, ZHENG Xiong-liu, <i>et al.</i> (3859)
Research of Input Water Ratio's Impact on the Quality of Effluent Water from Hydrolysis Reactor	····· LIANG Kang-qiang, XIONG Ya, QI Mao-rong, <i>et al.</i> (3868)
Evolution of Leachate Quantity and Quality in the Anaerobic-semiaerobic Bioreactor Landfill	····· HAN Zhi-yong, LIU Dan, LI Qi-bin, <i>et al.</i> (3873)
National Survey of Urban Sewage Reuse in China	····· GUO Yu-jie, WANG Xue-chao, ZHOU Zhen-min (3881)
Sorption and Desorption of 17 α -Ethinyl Estradiol and 4- <i>n</i> -Nonylphenol in Soil	····· JIANG Lu, WANG Ji-hua, LI Jian-zhong, <i>et al.</i> (3885)
Soil Organic Carbon Mineralization of Black Locust Forest in the Deep Soil Layer of the Hilly Region of the Loess Plateau, China	····· MA Xin-xin, XU Ming-xiang, YANG Kai (3893)
Effects of Soil Crusts on Surface Hydrology in the Semiarid Loess Hilly Area	····· WEI Wei, WEN Zhi, CHEN Li-ding, <i>et al.</i> (3901)
Environmental Factors on Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils from Dashiwei Karst Giant Doline (Tiankeng) in Guangxi, China	····· KONG Xiang-sheng, QI Shi-hua, JIANG Zhong-cheng, <i>et al.</i> (3905)
Investigation on Mechanism of Pyrite Oxidation in Acidic Solutions	····· WANG Nan, YI Xiao-yun, DANG Zhi, <i>et al.</i> (3916)
Monitoring of Water and Salt Transport in Silt and Sandy Soil During the Leaching Process	····· FU Teng-fei, JIA Yong-gang, GUO Lei, <i>et al.</i> (3922)
Simulation on Remediation of Benzene Contaminated Groundwater by Air Sparging	····· FAN Yan-ling, JIANG Lin, ZHANG Dan, <i>et al.</i> (3927)
Detecting the Cytotoxicities of Five Bisphenol A Analogues to the MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell Line Through Different Endpoints	····· ZHANG Shuai-shuai, LIU Yan, LIU Shu-shen, <i>et al.</i> (3935)
Response of Copepod Community Characteristics to Environmental Factors in the Backshore Wetland of Expo Garden, Shanghai	····· CHEN Li-jing, WU Yan-fang, JING Yu-xiang, <i>et al.</i> (3941)
Isolation, Identification and Characterization of Halotolerant Petroleum-degrading Bacteria	····· WU Tao, XIE Wen-jun, YI Yan-li, <i>et al.</i> (3949)
Growth Kinetics and Phenol Degradation of Highly Efficient Phenol-degrading <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10	····· CHEN Xiao-hua, WEI Gang, LIU Si-yuan, <i>et al.</i> (3956)
Isolation of Aerobic Degrading Strains for TBBPA and the Properties of Biodegradation	····· QIAN Yan-yuan, LIU Li-li, YU Xiao-juan, <i>et al.</i> (3962)
Influences of Long-term Application of Organic and Inorganic Fertilizers on the Composition and Abundance of <i>nirS</i> -type Denitrifiers in Black Soil	····· YIN Chang, FAN Fen-liang, LI Zhao-jun, <i>et al.</i> (3967)
Characteristics and Influencing Factors of Trichloroethylene Adsorption in Different Soil Types	····· HE Long, QIU Zhao-fu, LÜ Shu-guang, <i>et al.</i> (3976)
Degradation of Carbendazim in Paddy Soil and the Influencing Factors	····· XIAO Wen-dan, YANG Xiao-e, LI Ting-qiang (3983)
Effects of Sulphur Compounds on the Volatile Characteristics of Heavy Metals in Fly Ash from the MSW and Sewage Sludge Co-combustion Plant During the Disposal Process with Higher Temperature	····· LIU Jing-yong, SUN Shui-yu (3990)
Low-temperature Thermal Treatment of Dioxin in Medical Waste Fly Ash Under Unert Atmosphere	····· JI Sha-sha, LI Xiao-dong, XU-Xu, <i>et al.</i> (3999)
Hourly Measurement on Aerosol NH ₃ and Gas NO _x Emission in the Rice Field	····· GONG Wei-wei, LUAN Sheng-ji (4006)
Implementation of an Electronic Nose for Rapid Detection of Volatile Chloralkane and Chloroalkene	····· WEN Xiao-gang, LIU Rui, CAI Qiang, <i>et al.</i> (4012)
Pilot Study on PAHs of the Atmosphere Around the Refuse Incineration Plant Based on the Technology of Passive Sampling	····· SUN Shao-ai, LI Yang, ZHOU Yi, <i>et al.</i> (4018)
Spatial Distribution and Pollution Source Identification of Agricultural Non-Point Source Pollution in Fujian Watershed	····· DING Xiao-wen, SHEN Zhen-yao (4025)
Difference of P Content in Different Area Substrate of Constructed Wetland	····· CAO Xue-ying, CHONG Yun-xiao, YU Guang-wei, <i>et al.</i> (4033)
Selective Detection of Viable Pathogenic Bacteria in Water Using Reverse Transcription Quantitative PCR	····· LIN Yi-wen, LI Dan, WU Shu-xu, <i>et al.</i> (4040)
Formation of Disinfection By-products; Temperature Effect and Kinetic Modeling	····· ZHANG Xiao-lu, YANG Hong-wei, WANG Xiao-mao, <i>et al.</i> (4046)
A Novel Quantitative Approach to Study Dynamic Anaerobic Process at Micro Scale	····· ZHANG Zhong-liang, WU Jing, JIANG Jian-kai, <i>et al.</i> (4052)
Leaves of <i>Platanus orientalis</i> as the Carbon Source for Denitrification	····· XIONG Jian-feng, XU Hua, YAN Ning, <i>et al.</i> (4057)
Isolation, Characterization of an Anthracene Degrading Bacterium <i>Martellella</i> sp. AD-3 and Cloning of Dioxygenase Gene	····· CUI Chang-zheng, FENG Tian-cai, YU Ya-qi, <i>et al.</i> (4062)

《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11月15日 33卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 11 Nov. 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. sciencecp. com	Distributed	by	Science Press Tel: 010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. 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