

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第1期

Vol.35 No.1

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

雾霾重污染期间北京居民对高浓度 PM _{2.5} 持续暴露的健康风险及其损害价值评估	谢元博, 陈娟, 李巍 (1)
长白山 PM _{2.5} 中水溶性离子季节变化特征研究	赵亚南, 王跃思, 温天雪, 戴冠华 (9)
青岛大气颗粒物数浓度变化及对能见度的影响	柯馨姝, 盛立芳, 孔君, 郝泽彤, 屈文军 (15)
重庆市大气二噁英污染水平及季节变化	张晓岭, 卢益, 朱明吉, 蹇川, 郭志顺, 邓力, 孙静, 张芹, 罗财红 (22)
西南地区再生铝冶炼行业二噁英大气排放	卢益, 张晓岭, 郭志顺, 蹇川, 朱明吉, 邓力, 孙静, 张芹 (30)
西南地区新型干法水泥生产中的二噁英大气排放	张晓岭, 卢益, 蹇川, 郭志顺, 朱明吉, 邓力, 孙静, 张芹 (35)
杭州市办公场所室内空气中 PBDEs 的污染现状与特征	蒋欣慰, 孙鑫, 裴小强, 金漫彤, 李云龙, 沈学优 (41)
模拟不同排放源排放颗粒及多环芳烃的粒径分布研究	符海欢, 田娜, 商惠斌, 张彬, 叶素芬, 陈晓秋, 吴水平 (46)
川东北地区元素大气沉降通量及其季节变化	童晓宁, 周厚云, 游镇烽, 汤静, 刘厚均, 黄颖, 贺海波 (53)
重庆市铁山坪 2001 ~ 2010 年酸沉降变化	余德祥, 马萧萧, 谭炳全, 赵大为, 张冬保, 段雷 (60)
汉江上游金水河流域氮湿沉降	王金杰, 张克荣, 吴川, 张全发 (66)
麦秸及其烟尘中正构脂肪酸的组成	刘刚, 李久海, 吴丹, 徐慧 (73)
兰州市室内大气降尘环境磁学特征及其随高度变化研究	吴铎, 魏海涛, 赵瑞瑞, 张蕊, 刘建宝 (79)
中亚热带针阔混交林土壤-大气界面释汞通量研究	马明, 王定勇, 申源源, 孙荣国, 黄礼昕 (85)
水稻秸秆生物炭对耕地土壤有机碳及其 CO ₂ 释放的影响	柯跃进, 胡学玉, 易卿, 余忠 (93)
黄海和东海海域溶解铀地球化学分布特征	吴晓丹, 宋金明, 吴斌, 李学刚 (100)
浑河上游(清原段)水环境中重金属时空分布及污染评价	马迎群, 时瑶, 秦延文, 郑丙辉, 赵艳民, 张雷 (108)
POCIS 采样技术应用于九龙江流域水环境中雌激素的检测	张利鹏, 王新红, 李永玉, 吴玉玲, 张祖麟 (117)
降雨条件下岩溶地下水微量元素变化特征及其环境意义	陈雪彬, 杨平恒, 蓝家程, 莫雪, 师麟 (123)
锡林河流域地表水水化学主离子特征及控制因素	唐玺雯, 吴锦奎, 薛丽洋, 张明泉, Frauke Barthold, Lutz Breuer, Hans-Georg Frede (131)
子牙河水系河流氮素组成及空间分布特征	赵钰, 单保庆, 张文强, 王超 (143)
水稻种植对中亚热带红壤丘陵区小流域氮磷养分输出的影响	宋立芳, 王毅, 吴金水, 李勇, 李裕元, 孟岑, 李航, 张满意 (150)
黄东海表层沉积物中磷的分布特征	宋国栋, 刘素美, 张国玲 (157)
河流沉积物中有机磷提取剂 (NaOH-EDTA) 提取比例与机制研究	张文强, 单保庆, 张洪, 唐文忠 (163)
沉积物短期扰动下 BAPP 再生和转化机制	武晓飞, 李大鹏, 汪明 (171)
三峡库区典型农村型消落带沉积物风险评价与重金属来源解析	敖亮, 雷波, 王业春, 周谐, 张晟 (179)
太湖东部不同类型湖区疏浚后沉积物重金属污染及潜在生态风险评价	毛志刚, 谷孝鸿, 陆小明, 曾庆飞, 谷先坤, 李旭光 (186)
滇池沉积物中主要污染物含量时间分异特征研究	王心宇, 周丰, 伊旋, 郭怀成 (194)
浓度层析荧光光谱局部匹配溢油鉴别技术	王春艳, 史晓凤, 李文东, 张金亮 (202)
光电 Fenton 技术处理污泥深度脱水液研究	王现丽, 王世峰, 吴俊峰, 濮文虹, 杨昌柱, 张敬东, 杨家宽 (208)
同步脱氮除磷颗粒污泥硝化反硝化特性试验研究	刘小英, 林慧, 马兆瑞, 王磊, 刘静伟, 郭超, 姜应和 (214)
垃圾填埋场渗滤液短程生物脱氮的长期稳定性实验研究	孙洪伟, 郭英, 彭永臻 (221)
油田区土壤石油烃组分残留特性研究	胡迪, 李川, 董倩倩, 李立明, 李广贺 (227)
水稻光合同化碳在土壤中的矿化和转化动态	谭立敏, 彭佩钦, 李科林, 李宝珍, 聂三安, 葛体达, 童成立, 吴金水 (233)
土地利用及退耕对喀斯特山区土壤活性有机碳的影响	廖洪凯, 李娟, 龙健, 张文娟, 刘云飞 (240)
水稻土团聚体 Cu ²⁺ 吸附过程中铝的溶出及土壤溶液 pH 变化	许海波, 赵道远, 秦超, 李玉姣, 董长勋 (248)
Cr(VI) 对两种黏土矿物在单一及复合溶液中 Cu(II) 吸附的影响	刘娟娟, 梁东丽, 吴小龙, 屈广周, 钱勋 (254)
淹水时长对 3 种丛枝菌根 (AM) 真菌感染 2 种湿地植物的影响	马雷猛, 王鹏腾, 王曙光 (263)
太湖水质与水生生物健康的关联性初探	周笑白, 张宁红, 张咏, 牛志春, 刘雷, 于红霞 (271)
3 种典型污染物对水生生物的急性毒性效应及其水质基准比较	姜东生, 石小荣, 崔益斌, 李梅 (279)
某制药废水对发光细菌急性毒性的评价研究	杜丽娜, 杨帆, 穆玉峰, 余若祯, 左剑恶, 高俊发, 余忻, 滕丽君, 汤薪瑶 (286)
异丙甲草胺与锌共存对斜生栅藻毒性手性差异影响	胡晓娜, 张淑娟, 陈彩东, 刘惠君 (292)
Biotic Ligand Model 的简化模型及预测性能评价	王万宾, 陈莎, 吴敏, 苏德丽, 赵婧 (299)
基于 USEtox 的焦化行业优先污染物筛选排序研究	郝天, 杜鹏飞, 杜斌, 曾思育 (304)
微囊藻毒素降解菌 <i>Paucibacter</i> sp. CH 菌的分离鉴定及其降解特性	游狄杰, 陈晓国, 向荟圯, 欧阳溱, 杨冰 (313)
硝酸盐抑制油田采出水硫酸盐还原菌活性研究	杨德玉, 张颖, 史荣久, 韩斯琴, 李光哲, 李国桥, 赵劲毅 (319)
降解纤维素产甲烷的四菌复合系	吴俊妹, 马安周, 崔萌萌, 于清, 齐鸿雁, 庄绪亮, 庄国强 (327)
中国陆地生态系统土壤异养呼吸变异的影响因素	谢薇, 陈书涛, 胡正华 (334)
内蒙古羊草草原根呼吸和土壤微生物呼吸区分的研究	史晶晶, 耿元波 (341)
南京河流夏季水-气界面 N ₂ O 排放通量	韩洋, 郑有飞, 吴荣军, 尹继福, 孙霞 (348)
杀菌剂对湖泊水体温室气体浓度分析的影响	肖启涛, 胡正华, James Deng, 肖薇, 刘寿东, 李旭辉 (356)
生物表面活性剂强化剩余污泥微生物燃料电池产电特性研究	彭海利, 张植平, 李小明, 杨麒, 罗琨, 易欣 (365)
不同硅铝比 Fe-ZSM-5 催化剂对氧化亚氮催化分解性能的研究	卢仁杰, 张新艳, 郝郑平 (371)
硫酸铵和尿素对废物焚烧过程中多种途径生成氯苯类的抑制作用	严密, 祁志福, 李晓东, 胡艳军, 陈彤 (380)
县域尺度的京津冀都市圈 CO ₂ 排放时空演变特征	汪浩, 陈操操, 潘涛, 刘春兰, 陈龙, 孙莉 (385)
保水剂性能及其农用安全性评价研究进展	李希, 刘玉荣, 郑袁明, 贺纪正 (394)

降解纤维素产甲烷的四菌复合系

吴俊妹, 马安周*, 崔萌萌, 于清, 齐鸿雁, 庄绪亮, 庄国强

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要: 自然环境中通常是微生物群落协同完成纤维素的降解, 构建可降解纤维素的混菌体系是认识微生物相互作用的关键. 利用富集培养法, 结合变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 指纹检测技术以及厌氧滚管技术, 建立了一种筛选简单降解纤维素产甲烷复合菌系的方法. 利用此方法从青藏高原若尔盖高寒湿地分离到一个由 4 株菌构成的降解纤维素产甲烷的稳定菌系. 结果表明, 该复合菌系由纤维素水解菌 *Clostridium glycolicum*、非纤维素水解菌 *Trichococcus flocculiformis* 和 *Parabacteroides merdae*、产甲烷古菌 *Methanobacterium subterraneum* 等具有不同功能的 4 种菌株组成, 且在这 4 株菌的共同作用下可将纤维素直接转化为 CH_4 . 该简单复合系的获得为今后纤维素转化甲烷复合菌系的代谢控制和遗传改造提供了一个平台.

关键词: 混合菌群; 变性梯度凝胶电泳; 若尔盖湿地; 纤维素; 甲烷

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)01-0327-07

Bioconversion of Cellulose to Methane by a Consortium Consisting of Four Microbial Strains

WU Jun-mei, MA An-zhou, CUI Meng-meng, YU Qing, QI Hong-yan, ZHUANG Xu-liang, ZHUANG Guo-qiang
(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: Cellulose was usually degraded by microbial communities in natural habitats. Construction of a simple cellulolytic consortium is necessary to understand the underlying interaction within microorganisms involved in cellulose conversion. A screening approach was developed to obtain a simple microbial community with the ability of cellulose degradation to methane. This technique was based on the method of enrichment culture accompanying with denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) fingerprint detection technology and roll-tube method. Moreover, a four-strain mixed culture capable of degrading cellulose to methane was isolated from Zoige alpine wetland of the Tibetan Plateau. The results showed that the microbial consortia consisted of three functional groups: the cellulolytic bacterium *Clostridium glycolicum*, the non-cellulolytic bacteria group of *Trichococcus flocculiformis* and *Parabacteroides merdae*, and the methanogenic bacterium *Methanobacterium subterraneum*. This four-strain co-culture can convert cellulose to methane. In the future, the isolated cellulolytic consortia could provide a platform for controlling metabolic pathways and genetic modification involved in methane production from cellulose.

Key words: microbial consortia; DGGE; Zoige wetland; cellulose; methane

面对化石能源消费量急剧增长带来的环境问题和化石能源日益枯竭所带来的能源短缺现状^[1], 开发和利用可再生的清洁能源变得日益重要和紧迫. 其中利用自然界最丰富的生物资源纤维素转化醇类、甲烷或者氢气等生物质能已成为能源和生态环境领域研究的热点^[2,3]. 纤维素因其特定的结构使得生物转化效率较低^[4], 目前纤维素的生物转化可分为单一菌种的转化和复合菌的转化^[5]. 单一菌系虽然易于控制且可遗传操作, 但因其较低的转化效率依然难以达到工业化运行的目的. 复合菌系虽然有着较高的转化效率, 如沼气的产生^[6], 但是因其复杂的种群结构而难以解析, 且对整个体系的代谢途径和过程难以进行有效的控制. 为建立可控和可解析的复合菌体系, 文献[7, 8]构建了一个由 5 株细菌组成的高效稳定纤维素降解产乙醇的复合系, 这为研究可控制的纤维素降解复合系提供一条思

路. 本研究结合传统培养法和分子生态学技术, 建立了一种筛选简单降解纤维素产甲烷复合菌系的方法, 并分离到一个由 4 株菌构成的降解纤维素产甲烷的稳定菌系, 以期今后纤维素转化甲烷复合菌系的代谢控制和遗传改造提供了一个平台.

1 材料与方法

1.1 试验材料

M 培养液 (1 000 mL) 由 980 mL 基本培养液、10 mL 痕量元素溶液和 10 mL 维生素溶液组成^[9]. 基本培养液 (1 000 mL): KH_2PO_4 0.4 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g; NH_4Cl 1.0 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g;

收稿日期: 2013-04-20; 修订日期: 2013-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41001151, 41173089)

作者简介: 吴俊妹 (1988 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: wujunshu410@mails.gucas.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: azma@rcees.ac.cn

Yeast extract 0.2 g; NaHCO₃ 6.0 g; Cysteine-HCl·H₂O 0.5 g; Na₂S·9H₂O 0.25 g; Resazurin 0.001 g. 痕量元素溶液(1 000 mL): Nitritotrialetic acid 4.5 g; FeCl₂·4H₂O 0.4 g; CoCl₂·6H₂O 0.12 g; AlK(SO₄)₂ 0.01 g; NaCl 1.0 g; CaCl₂ 0.02 g; NaMoO₄·2H₂O 0.01 g; MnCl₂·4H₂O 0.1 g; ZnCl₂ 0.1 g; H₃BO₃ 0.01 g; CuSO₄·5H₂O 0.01 g; NiCl₂ 0.02 g. 维生素溶液(1 000 mL): biotin 2.0 mg; Folic acid 2.0 mg; Pyridoxine hydrochloride 10 mg; Thiamine HCl 5.0 mg; Riboflavin 5.0 mg; Nicotinic acid 5.0 mg; DL-Calcium Pantothenate 5.0 mg; Vitamin B₁₂ 0.1 mg; P-aminobenzoic acid 5.0 mg; Lipoic acid 5.0 mg. 维生素溶液用 0.2 μm 无菌滤膜过滤除菌,在培养基使用前加入。

Mp 培养基是含有 5% (质量分数) 微晶纤维素(MCC)的 M 溶液。Mp 培养基的除氧过程参见厌氧操作手册^[10],首先采用煮沸法去除 M 培养液中的氧气,然后取 9.5 mL 已除氧的 M 培养液于含有 0.5 g MCC 且充满 N₂ 的 15 mL 厌氧管中,最后加塞、加盖密封,115℃ 灭菌 30 min,使用前加入 0.02 mL 无菌的维生素溶液。厌氧滚管参照改进的亨特厌氧滚管技术^[11]制作而成,滚管中的固体培养基包含 4.5 mL M 培养液,0.1 g MCC 和 0.05 g 吉兰胶。

1.2 试验方法

1.2.1 纤维素厌氧降解复合系的筛选

取 1 mL 采集于青藏高原若尔盖高寒湿地的泥水混合物按 10% 的接种量接种于 Mp 培养基,30℃ 静置培养。待出现明显的纤维素降解现象后以 5% 的接种量转接至新鲜的 Mp 培养基。每次转接之前,收集 1 mL 样品用于提取总基因组 DNA,利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)检测微生物群落结构的变化,直到分子指纹稳定,获得群落组成结构稳定的富集培养物为止。

以群落结构稳定的富集培养物为菌种,以 0.5 mL 的接种量接种至纤维素厌氧滚管中,滚动滚管使菌液均匀地被培养基吸收,然后将滚管置于 30℃ 培养。当滚管管壁上出现明显的水解圈时,在无菌厌氧操作箱(Etelux lab2000)内,挑取水解圈直径大、形态有差异的菌落至新鲜的 Mp 培养基中培养。再次观察到明显的纤维素降解现象后,再分别提取分离获得的各个复合系的 DNA,以细菌 16S rDNA 全长引物 27F 和 1525R^[12],古菌 16S rDNA 全长引物 21F 和 958R^[13],分别进行 PCR 扩增,然后连接、转化并测序。

1.2.2 富集培养物的微生物群落组成结构分析

称取 0.5 g 富集培养物,利用土壤 DNA 提取试剂盒(Fast DNA SPIN Kit for Soil,MPBio)提取基因组 DNA。

以富集培养物基因组 DNA 为模板对 16S rDNA 的 V3 区进行 PCR 扩增。扩增引物采用细菌通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),引物由英潍捷基生物技术有限公司合成,其中引物 338F 的 5'端连有 GC 夹板(5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGGCACGGGGGG-3'),以提高在后期 DGGE 电泳时的解链范围^[14]。50 μL 的 PCR 扩增体系为:模板 DNA 50 ng,正反向引物各 2 μL (10 μmol·L⁻¹),Taq Master Mix(康为世纪)25 μL,补足无菌超纯水(Milli-Q,120℃ 灭菌 15 min)至 50 μL。扩增条件:94℃ 预变性 5 min,退火温度从 65℃ 到 55℃ 每循环依次降 0.5℃,每个温度 1 个循环,每个循环 94℃ 变性 1 min,退火 50 s,72℃ 延伸 30 s,之后 10 个循环为 94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 30 s,最后在 72℃ 下延伸 10 min,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。采用 Dcode™ 通用突变检测系统(Bio-Rad)对 PCR 扩增产物进行电泳分离。DGGE 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性剂(尿素和去离子甲酰胺的混合物)梯度为 40%~60%。电泳条件:在电泳缓冲液 1xTAE 中,在每个点样孔中加入 45 μL PCR 扩增产物,电压 60 V、温度 60℃ 条件下电泳 17 h。电泳结束后,将凝胶在 EB 溶液中染色 15 min,然后放入去离子水中脱色 10 min,用 YLN-2000 凝胶成像分析系统观察结果并拍照,获得 DGGE 图谱,最后用无菌手术刀将 DGGE 图谱中亮度大的条带切下,置于 1.5 mL 无菌离心管中,-20℃ 保存。

采用巢氏 PCR 扩增富集培养物的古菌基因组 DNA。第一轮 PCR 扩增采用古菌全长引物 21F (5'-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3') 和 958R (5'-YCCG GCGTTGAMTCCAATT-3')。50 μL 的 PCR 扩增体系:模板 DNA 50 ng,正反向引物各 2 μL (10 μmol·L⁻¹),Taq™ (Takara) 0.25 μL (5 U·μL⁻¹),dNTPs (Takara) 4 μL (各 2.5 mmol·L⁻¹),10 × PCR buffer (Takara) 5 μL,补足无菌超纯水至 50 μL。扩增条件:94℃ 预变性 5 min,之后 30 个循环,每个循环 94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,最后在 72℃ 下延伸 5 min。第二轮 PCR 扩增采用 5'端带 GC 夹子古菌引物 340F (5'-CCTACG

GGGYGCASCAG-3') 和 519R (5'-TTACCGCGGC KGCTG-3') 进行扩增^[15]. PCR 扩增体系同上, 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 之后 30 个循环, 每个循环 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 最后在 72℃ 下延伸 5 min. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物. DGGE 变性梯度为 50% ~ 70%, 其他条件与前面描述的一致.

将上述回收的胶条用无菌超纯水清洗 2 次后用枪尖捣碎, 加入约 30 μ L 无菌超纯水 (以浸没胶条为准), -20℃ 放置 12 h. 从细菌 PCR-DGGE 胶上回收的条带用不带 GC 夹子的 338F 和 518R 进行第二轮 PCR 扩增, 扩增条件与用 GC338F 和 518R 作为引物的 PCR 扩增条件一致. 从古菌 PCR-DGGE 胶上回收的胶条用不带 GC 夹子的 340F 和 519R 进行 PCR 扩增, 扩增条件与用 GC340F 和 519R 作为引物的 PCR 扩增条件一致. 产物用 PCR 产物回收试剂盒 (OMEGA) 纯化回收后连入 pGEM-T 载体 (Promega), 挑选阳性克隆子交由北京博迈德科技发展有限公司测序. 登录 NCBI 网站, 将测序结果用 Blast 软件与库中已有的 16S rDNA 序列进行比对, 下载同源性最高的序列. 采用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法进行系统发育树分析 (检验次数为 1000 次), 构建系统发育树.

1.2.3 复合系代谢产物检测

复合系气体代谢产物直接利用气相色谱-质谱联用仪 (岛津 GC-MS 2010Plus) 测定, 其中采用高纯氮气作为载气, 气相色谱柱箱温度为 35℃, 进样口温度为 150℃. 质谱仪采用电子电离 (EI) 方式, 离子源温度为 200℃, 扫描方式为选择离子检测方式 (SIM) 扫描.

2 结果与讨论

2.1 富集培养物的微生物群落组成结构分析

为了获得简单的降解纤维素产甲烷复合系, 首先要建立一个微生物群落组成结构稳定的降解纤维素复合系, 作为开展分离试验的基础. 本研究采用高结晶度的 MCC^[16] 作为培养底物, 对沼泽地泥水混合物中的微生物进行富集培养. 提取每代培养物的基因组 DNA, 对所有 DNA 的 16S rDNA V3 区域进行细菌 PCR-DGGE 分析. 在富集培养过程中, 培养物的微生物群落组成结构的变化可以通过 DGGE 图谱中条带位置和亮度的变化反映. 如图 1 所示, 第 4 代和第 5 代的主要组成条带位置和亮度均未发生变化. 这表明, 富集培养至第 4 代, 培养物中细菌的群落组成结

构已经稳定. 利用 DGGE 技术对富集培养物古菌的群落组成结构进行分析发现, 富集培养至第 4 代, 培养物的古菌群落组成结构已经稳定 (结果未展示). 至此, 获得了稳定的降解纤维素复合系.

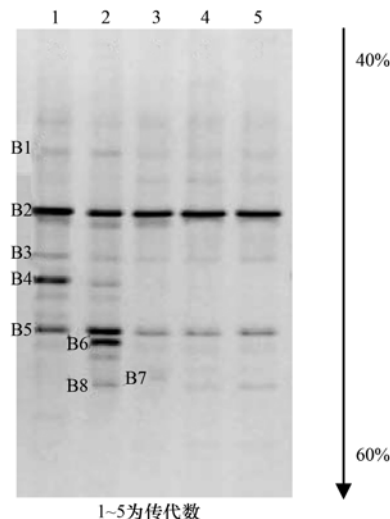


图 1 16S rDNA PCR-DGGE 图谱

Fig. 1 PCR-DGGE patterns of the 16S rDNA fragments from different generation

将上述稳定的降解纤维素复合系以 5% 的接种量接种至底物为 10 g MCC 的 100 mL Mp 培养基中, 以验证该复合系的纤维素降解能力. 如图 2 所示, 复合系在 30℃ 培养 7 d 后, 底物 MCC 发生了明显的降解现象. 未接种复合系的培养基在 30℃ 培养 7 d 后, 培养液无色透明, 底物 MCC 致密, 仍为粉末状, 接种复合系的培养基在 30℃ 培养 7 d 后, 培养液浑浊, 并且培养液中有大量的气泡产生, 底物 MCC 腐烂膨胀, 胶着成块, 难以混合均匀. 对比可知, 该复合系降解纤维素能力明显.

由于 16S rDNA 测序结果和系统发育树分析能够在一定程度上揭示上述复合系中各功能菌群之间的关系, 所以对细菌和古菌 DGGE 图谱中优势条带

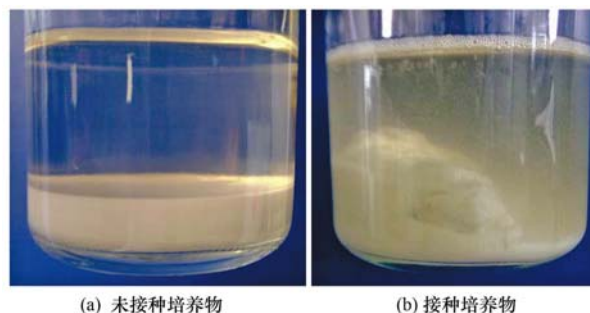


图 2 培养 7 d 后复合菌系对纤维素的降解

Fig. 2 Degradation of cellulose by microbial community after 7 days of incubation

进行 16S rDNA 测序,其中富集培养物古菌 DGGE 图谱显示古菌群落结构简单,DGGE 条带的 16S rDNA 测序结果只有一种.如图 3 所示,将细菌 DGGE 图谱优势条带的 16S rDNA 测序结果输入 NCBI 数据库中进行比对,然后下载其最相近的基因序列构建系统发育树.而古菌 DGGE 优势条带的 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中的比对结果为 *Methanobacterium subterraneum* DSM11074^T.

结合细菌 DGGE 图谱、细菌系统发育树图和古菌测序结果可知,在群落结构已稳定的培养物中,优势菌群为 *Clostridium cellulovorans* (条带 B6)、*Clostridium fimetarium* (条带 B5)、*Trichococcus flocculiformis* (条带 B2)、*Parabacteroides merdae* (条带 B3) 和 *M. subterraneum*. 其中 *T. flocculiformis* 占据最大优势,*C. fimetarium* 其次,*P. merdae* 和 *C. cellulovorans* 数量相对较少.*M. subterraneum* 则是测序得到的唯一的古菌.复合系中的微生物可以分为以下 3 个功能菌群.

(1) 纤维素水解菌 条带 B6 代表的细菌,能够降解纤维素,是梭菌属的一种.

条带 B6 的 16S rDNA 测序结果与嗜纤维梭菌 *C. cellulovorans* strain 743B 有 95% 的同源性. Sleat 等^[17] 在木质纤维素反应器中首次分离得到嗜纤维梭菌,并研究得出,该菌是严格厌氧的中温微生物,能够降解纤维素、纤维二糖和葡萄糖,该菌降解纤维素或者纤维二糖的代谢产物为丁酸盐、乳酸盐、乙酸盐、甲酸盐、 H_2 和 CO_2 . 之后 Doi 等^[18] 研究发现在嗜纤维梭菌中存在纤维小体结构.而纤维小体是多种纤维素酶、半纤维素酶依靠锚定粘附机制形成的一种多酶复合体,能高效降解天然纤维素材料^[19]. 上述资料表明嗜纤维梭菌具有直接降解纤维素的能力.由此推断,在富集培养物纤维素降解中,梭菌属的 B6 直接降解纤维素,将其转化为容易利用的小分子糖和有机酸,提供给非纤维素水解菌利用.但是 DGGE 图谱显示在富集培养物微生物群落组成结构稳定后,B6 所代表的细菌在整个群落中占的比例比较小. Wilson^[20] 研究发现,直接水解利用纤维素的微生物在参与降解纤维素的所有微生物中所占比例比较小.这一结果与本研究结果一致.

(2) 非纤维素水解菌 条带 B2、B3、B5 代表的细菌,在整个群落中占据优势地位.

条带 B5 的 16S rDNA 测序结果与 *C. fimetarium* strain Z-2189 有 98% 的同源性,菌株 B5 可以看作是 *C. fimetarium*. 据文献报道,*C. fimetarium* 分离自低

温环境下发酵分解的牛粪,是严格厌氧的低温微生物,能够降解纤维二糖、麦芽糖、半乳糖、果糖和葡萄糖,发酵糖类的终产物为乙酸盐、乙醇、乳酸盐、甲酸盐、 H_2 和 CO_2 ^[21]. 然而目前尚鲜有关于 *C. fimetarium* 能够利用纤维素的报道. 这表明在降解纤维素产甲烷的微生物食物链中,菌株 B5 位于菌株 B6 的下一级,利用菌株 B6 降解纤维素的代谢产物提供自身生长所需物质. 16S rDNA 测序结果显示,条带 B4 的 16S rDNA 测序结果与 *C. fimetarium* strain Z-2189 也有 98% 的同源性,但是条带 B4 在富集培养的起始过程中出现后不久便消失. 推测这一现象的可能原因是条带 B4 和 B5 所代表的微生物在纤维素降解过程中发挥的作用相似,为了保证群落结构的稳定性和可利用资源最大化,条带 B4 所代表的微生物最终被淘汰.

细菌 DGGE 图谱显示(图 3),条带 B2 代表的细菌在整个群落中占据最大优势. 测序结果表明,条带 B2 的序列与束毛球菌 *T. flocculiformis* strain DSM 2094 相似度高达 100%,可以认为条带 B2 代表的微生物是束毛球菌. 据文献报道,絮状束毛球菌是分离自膨胀的污泥和池塘沉积物的兼性厌氧微生物,能够发酵纤维二糖、果糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、木糖和葡萄糖产酸^[22]. 由此可以推断,絮状束毛球菌能够分解代谢多种类型的单糖和二糖. 此外,还有研究表明,絮状束毛球菌能够在低于 4℃ 的低温环境中生长,在静置培养和振荡培养时会改变细胞形态从而最大限度获取营养^[23]. 絮状束毛球菌的这些代谢特性表明,该菌株生存适应能力强. 这可能是 *T. flocculiformis* 从第 1 代到第 5 代都在整个群落中占据优势地位的原因. 束毛球菌属的 B2 与梭菌属的 B5 都能够代谢纤维二糖等小分子糖,在纤维素代谢产物的进一步转化过程中发挥着重要作用.

16S rDNA 测序结果显示,条带 B3 代表的细菌与拟杆菌 *P. merdae* strain JCM 9497 的相似度为 93%,菌株 B3 属于拟杆菌属. 拟杆菌是专性厌氧微生物,分解利用蔗糖、乳糖、木糖和葡萄糖^[24, 25]. 研究资料表明,拟杆菌属在纤维素降解过程中发挥着重要的作用^[26],同时也是为数不多的厌氧发酵产氢细菌之一^[27, 28]. 在已稳定的复合系中,纤维梭菌属的 B6 直接水解纤维素,梭菌属的 B5、束毛球菌属的 B2 和拟杆菌属的 B3 利用菌株 B6 的代谢产物生长并将其转化为小分子有机酸、 H_2 和 CO_2 . 这 4 株菌在纤维素降解过程中发挥的功能不同,并且稳定共存,共同将纤维素转化为小分子化合物.

(3) 产甲烷古菌 富集培养物古菌的 DGGE 条带的 16S rDNA 测序结果显示只有一种菌,该菌与产甲烷杆菌 *Methanobacterium subterraneum* DSM11074 的同源相似度为 98%。据文献报道,该菌是嗜碱、耐盐的专性厌氧、广温产甲烷古菌,能够利用 H_2 和 CO_2 或者甲酸盐作为底物生长,并代谢产 CH_4 ^[29]。由此推断,在复合系中, *M. subterraneum* 位于微生物食物链的终端,将纤维素水解细菌和非纤维素水解细菌共同降解纤维素的终产物转化为 CH_4 。

虽然这些菌群在降解纤维素产甲烷过程中所发

挥的具体作用和相互之间的关系,有待进一步阐明,但是可以明确,纤维素水解菌(*C. cellulovorans*)水解纤维素将难降解的大分子化合物转化为易利用的小分子化合物,非纤维素水解菌(*C. fimetarium*、*T. flocculiformis* 和 *P. merdae*)进一步发酵小分子化合物为甲酸盐、乙酸盐、 H_2 和 CO_2 ,最后产甲烷古菌(*M. subterraneum*)将甲酸盐、 H_2 和 CO_2 转化为 CH_4 。复合系中,不同的功能菌群各司其职,稳定共存,最终完成纤维素转化为 CH_4 这一生物转化过程。这一稳定复合系的获得,为筛选简单的降解纤维素产甲烷复合系奠定了基础。

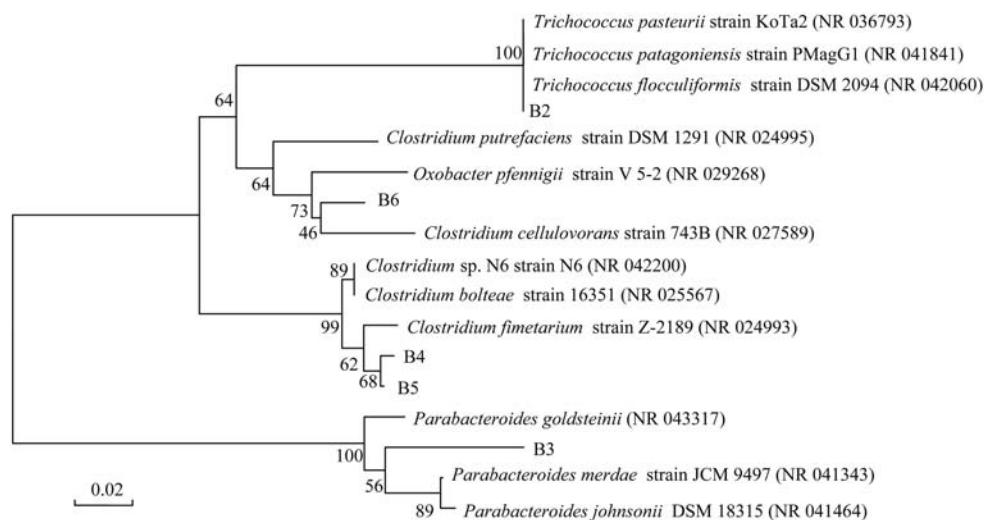


图3 纤维素厌氧降解细菌的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of anaerobic cellulolytic bacteria

2.2 复合系的筛选

虽然已经获得了稳定的降解纤维素产甲烷复合系,但是复合系中微生物的种类大于5种,再加上DGGE技术主要反映的是优势微生物种群,该复合系仍然比较复杂,难以进行代谢控制和遗传改造。因此进一步利用厌氧滚管技术,在稳定复合系的基础上开展简单的降解纤维素产甲烷复合系的筛选试验。以稳定的复合系培养物作为菌种,取0.5 mL接种至纤维素厌氧滚管中,置于30℃培养约20 d后观察到明显的纤维素水解圈,如图4所示,水解圈以菌落为中心,形成不规则的透明区域。在厌氧工作站中挑取水解圈直径大,形态各异的菌落12个(A1、A2、B1-B4、C1-C4、D1、D2)接种至新鲜的Mp培养基,置于30℃培养。约7~14 d后,A2、B1-B4和C1-C4观察到纤维素降解现象。此后,检测每个复合系的气体代谢产物,发现复合系A2具有产甲烷能力。将复合系A2传代培养,对其传代培养物的气体代谢产物进行分析发现,其中含有大量 CH_4 和

CO_2 , GC-MS 分析结果如图5所示, CH_4 含量约占厌氧管顶空气体的35.88%, CO_2 含量约占22.22%。

提取复合系A2的基因组DNA,进行PCR扩增,然后连接、转化,挑选约90%的阳性克隆进行大

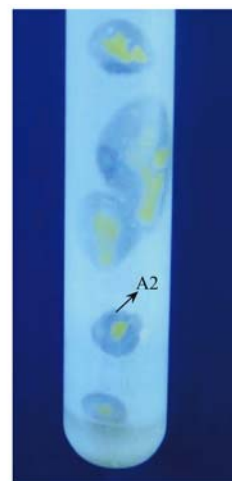


图4 纤维素水解圈

Fig. 4 Different zones of cellulose hydrolysis with visible colonies

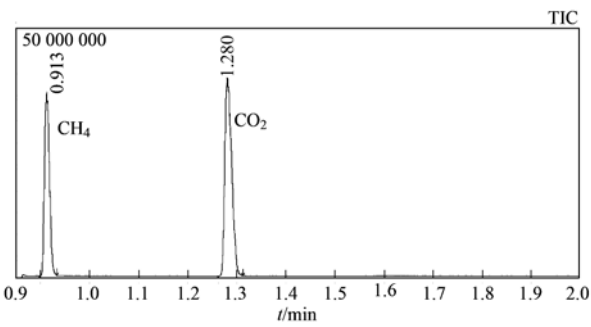


图5 复合系 A2 的气体代谢产物的 GC-MS 图

Fig. 5 GC-MS chromatogram of the gas produced by complex A2

批量测序. 结合扫描电镜观察结果(图片未给出)和大批量测序结果,发现复合系 A2 仅由 4 株菌组成. 如表 1 所示,复合系 A2 由 *Clostridium glycolicum*、*T. flocculiformis*、*P. merdae* 和 *M. subterraneum* 这 4 株菌组成. 其中,乙二醇梭菌 *C. glycolicum* 是在微碱

性环境下生长的厌氧微生物,降解纤维素、乙二醇、丙二醇、蔗糖和葡萄糖. 乙二醇梭菌代谢乙二醇的产物为乙酸盐和乙醇,代谢纤维素产 CO_2 和 H_2 [30]. 由于产甲烷古细菌 *M. subterraneum* 在代谢产甲烷过程中消耗 H_2 ,导致气体代谢物中 H_2 的浓度较低, H_2 未能被检测出来. 在这一简单复合系中,乙二醇梭菌发酵水解纤维素,絮状束毛球菌和拟杆菌再进一步分解利用乙二醇梭菌的代谢产物纤维二糖和葡萄糖等,这 3 株菌共同将纤维素转化为 H_2 、 CO_2 、乙酸盐和甲酸盐,在此基础上, *M. subterraneum* 最后将 H_2 、 CO_2 和甲酸盐转化为 CH_4 ,至此,4 株菌共同作用完成了纤维素生物转化产甲烷的过程. 纤维素生物降解产甲烷是一个复杂的过程,需要多种微生物的共同参与. 这一简单的降解纤维素产甲烷复合系的发现为研究可控的纤维素产甲烷复合工程菌提供了可能.

表 1 复合系 A2 的近缘种微生物

Table 1 Identities of complex A2

项目	近缘种(登录号)	16S rDNA 相似率/%
bacteria	<i>Clostridium glycolicum</i> strain DSM1288 (NR 036890)	87
	<i>Trichococcus flocculiformis</i> strain DSM 2094 (NR 042060)	93
	<i>Parabacteroides merdae</i> strain JCM 9497 (NR 041343)	93
archaea	<i>Methanobacterium subterraneum</i> DSM11074 ^T (NR 028247)	98

3 结论

(1) 结合富集培养法、DGGE 分子指纹检测技术、厌氧滚管技术和 16S rDNA 测序技术,建立了一种筛选简单降解纤维素产甲烷复合菌系的方法,并分离到一个由 4 株菌构成的降解纤维素产甲烷的稳定菌系.

(2) 获得的 4 菌复合系能够降解纤维素,产生约为顶空气体 35.88% 的 CH_4 . 复合系中, *C. glycolicum* 水解纤维素, *M. subterraneum* 进一步将代谢中间产物转化为 CH_4 .

参考文献:

[1] 唐炼. 世界能源供需现状与发展趋势[J]. 国际石油经济, 2005, 13(1): 30-33.

[2] Sheehan J, Himmel M. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US Department of Energy's research and development activities for bioethanol [J]. Biotechnology Progress, 2008, 15(5): 817-827.

[3] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. Science, 2006, 311(5760): 484-489.

[4] Ma A Z, Hu Q, Qu Y B, et al. The enzymatic hydrolysis rate of cellulose decreases with irreversible adsorption of cellobiohydrolase I[J]. Enzyme and Microbial Technology, 42

(7): 543-547.

[5] Liu H, Zhang T, Fang H H P. Thermophilic H_2 production from a cellulose-containing wastewater [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(4): 365-369.

[6] 成喜雨, 庄国强, 苏志国, 等. 沼气发酵过程研究进展[J]. 过程工程学报, 2008, 8(3): 607-615.

[7] Haruta S, Cui Z, Huang Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4): 529-534.

[8] Kato S, Haruta S, Cui Z J, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7099-7106.

[9] Shiratori H, Ikeno H, Ayame S, et al. Isolation and characterization of a new *Clostridium* sp. that performs effective cellulosic waste digestion in a thermophilic methanogenic bioreactor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3702-3709.

[10] Holdeman L V, Moore L V H, Moore W E C. Anaerobe laboratory manual [M]. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.

[11] Miller T L, Wolin M J. A serum bottle modification of the hungate technique for cultivating obligate anaerobes[J]. Applied Microbiology, 1974, 27(5): 985-987.

[12] Lv D, Ma A Z, Tang X M, et al. Profile of the culturable microbiome capable of producing acyl-homoserine lactone in the

- tobacco phyllosphere [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, **25**(2): 357-366.
- [13] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, **89**(12): 5685-5689.
- [14] Lv D, Ma A Z, Bai Z H, *et al.* Response of leaf-associated bacterial communities to primary acyl-homoserine lactone in the tobacco phyllosphere [J]. *Research in Microbiology*, 2012, **163**(2): 119-124.
- [15] Ovreås L, Forney L, Daae F L, *et al.* Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(9): 3367-3373.
- [16] Ardizzone S, Dioguardi F S, Mussini T, *et al.* Microcrystalline cellulose powders: structure, surface features and water sorption capability [J]. *Cellulose*, 1999, **6**(1): 57-69.
- [17] Sleat R, Mah R A, Robinson R. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, **48**(1): 88-93.
- [18] Doi R H, Goldstein M, Hashida S, *et al.* The *Clostridium cellulovorans* cellulosome [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1994, **20**(2): 87-93.
- [19] 侯爱华, 吴斌辉. 细菌纤维小体的结构和功能 [J]. *纤维素科学与技术*, 1984, **10**(1): 50-56.
- [20] Willson D B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, **14**(3): 259-263.
- [21] Kotsyurbenko O R, Nozhevnikova A N, Osipov G A, *et al.* A new psychroactive bacterium *Clostridium fimetarium*, isolated from cattle manure digested at low temperature [J]. *Mikrobiologiya*, 1995, **64**(6): 804-810.
- [22] Scheff G, Salcher O, Lingens F. *Trichococcus flocculiformis* gen. nov. sp. nov. A new gram-positive filamentous bacterium isolated from bulking sludge [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1984, **19**(2): 114-119.
- [23] Liu J R, Tanner R S, Schumann P, *et al.* Emended description of the genus *Trichococcus*, description of *Trichococcus collinsii* sp. nov., and reclassification of *Lactosphaera pasteurii* as *Trichococcus pasteurii* comb. nov. and of *Ruminococcus palustris* as *Trichococcus palustris* comb. nov. in the low-GMC Gram-positive bacteria [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, **52**(4): 1113-1126.
- [24] Johnson J L. *Bacteroides caccae* sp. nov., *Bacteroides merdae* sp. nov., and *Bacteroides stercoris* sp. nov. isolated from human feces [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1986, **36**(4): 499-501.
- [25] Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, **56**(7): 1599-1605.
- [26] 乔江涛, 郭荣波, 袁宪正, 等. 玉米秸秆厌氧降解复合菌系的微生物群落结构 [J]. *环境科学*, 2013, **34**(4): 1531-1539.
- [27] 宋丽, 刘晓风, 袁月祥, 等. 厌氧发酵产氢微生物的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2008, **24**(6): 933-939.
- [28] 林明, 任南琪, 王爱杰, 等. 混合菌种在发酵法生物产氢中的协同作用 [J]. *环境科学*, 2003, **24**(2): 54-59.
- [29] Kotelnikova S, Macario A J L, Pedersen K. *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, **48**(1): 357-367.
- [30] Gaston L W, Stadtman E. Fermentation of ethylene glycol by *Clostridium glycolicum*, sp. nov. [J]. *Journal of Bacteriology*, 1963, **85**(2): 356-362.

CONTENTS

An Assessment of PM _{2.5} Related Health Risks and Impaired Values of Beijing Residents in a Consecutive High-Level Exposure During Heavy Haze Days	XIE Yuan-bo, CHEN Juan, LI Wei (1)
Seasonal Variation of Water-Soluble Ions in PM _{2.5} at Changbai Mountain	ZHAO Ya-nan, WANG Yue-si, WEN Tian-xue, <i>et al.</i> (9)
Variation of Atmospheric Particle Number Concentrations in Qingdao and Its Impact on Visibility	KE Xin-shu, SHENG Li-fang, KONG Jun, <i>et al.</i> (15)
Concentrations of PCDD/Fs in the Atmosphere of Chongqing City and Its Seasonal Variation	ZHANG Xiao-ling, LU Yi, ZHU Ming-ji, <i>et al.</i> (22)
Atmospheric Emission of PCDD/Fs from Secondary Aluminum Metallurgy Industry in the Southwest Area, China	LU Yi, ZHANG Xiao-ling, GUO Zhi-shun, <i>et al.</i> (30)
Atmospheric Emission of PCDD/Fs from Modern Dry Processing Cement Kilns with Preheating in the Southwest Area, China	ZHANG Xiao-ling, LU Yi, JIAN Chuan, <i>et al.</i> (35)
Pollution Status and Characteristics of PBDEs in Indoor Air of Hangzhou	JIANG Xin-wei, SUN Xin, PEI Xiao-qiang, <i>et al.</i> (41)
Size Distribution of Particle and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Particle Emissions from Simulated Emission Sources	FU Hai-huan, TIAN Na, SHANG Hui-bin, <i>et al.</i> (46)
Atmospheric Deposition Fluxes and Seasonal Variations of Elements in Northeast of Sichuan, Central China	TONG Xiao-ning, ZHOU Hou-yun, YOU Chen-feng, <i>et al.</i> (53)
Trend in Acid Deposition at Tieshanping, Chongqing During 2001-2010	YU De-xiang, MA Xiao-xiao, TAN Bing-quan, <i>et al.</i> (60)
Wet Deposition of Atmospheric Nitrogen of the Jinshui Watershed in the Upper Hanjiang River	WANG Jin-jie, ZHANG Ke-rong, WU Chuan, <i>et al.</i> (66)
Chemical Compositions of <i>n</i> -Alkanoic Acids in Wheat Straw and Its Smoke	LIU Gang, LI Jiu-hai, WU Dan, <i>et al.</i> (73)
Magnetic Properties of Indoor Dustfall at Different Heights in Lanzhou	WU Duo, WEI Hai-tao, ZHAO Rui-rui, <i>et al.</i> (79)
Mercury Fluxes from Conifer-Broadleaf Forested Field in Central Subtropical Forest Zone	MA Ming, WANG Ding-yong, SHEN Yuan-yuan, <i>et al.</i> (85)
Impacts of Rice Straw Biochar on Organic Carbon and CO ₂ Release in Arable Soil	KE Yue-jin, HU Xue-yu, YI Qing, <i>et al.</i> (93)
Geochemical Distribution of Dissolved Bismuth in the Yellow Sea and East China Sea	WU Xiao-dan, SONG Jin-ming, WU Bin, <i>et al.</i> (100)
Temporal-spatial Distribution and Pollution Assessment of Heavy Metals in the Upper Reaches of Hunhe River (Qingyuan Section), Northeast China	MA Ying-qun, SHI Yao, QIN Yan-wen, <i>et al.</i> (108)
Determination of Estrogenic Compounds in Water of Jiulong River Using Polar Organic Chemical Integrative Sampler	ZHANG Li-peng, WANG Xin-hong, LI Yong-yu, <i>et al.</i> (117)
Variation Characteristics and Environmental Significant of Trace Elements Under Rainfall Condition in Karst Groundwater	CHEN Xue-bin, YANG Ping-heng, LAN Jia-cheng, <i>et al.</i> (123)
Major Ion Chemistry of Surface Water in the Xilin River Basin and the Possible Controls	TANG Xi-wen, WU Jin-kui, XUE Li-yang, <i>et al.</i> (131)
Forms and Spatial Distribution Characteristics of Nitrogen in Ziya River Basin	ZHAO Yu, SHAN Bao-qing, ZHANG Wen-qiang, <i>et al.</i> (143)
Impact of Rice Agriculture on Nitrogen and Phosphorus Exports in Streams in Hilly Red Soil Earth Region of Central Subtropics	SONG Li-fang, WANG Yi, WU Jin-shui, <i>et al.</i> (150)
Study on Distribution of Phosphorus in Surface Sediments of the Yellow Sea and the East China Sea	SONG Guo-dong, LIU Su-mei, ZHANG Guo-ling (157)
Characterization and Optimization of the NaOH-EDTA Extracts for Solution ³¹ P-NMR Analysis of Organic Phosphorus in River Sediments	ZHANG Wen-qiang, SHAN Bao-qing, ZHANG Hong, <i>et al.</i> (163)
Regeneration and Transformation of BAPP in Suspended Solids Under Short-term Sediment Disturbance	WU Xiao-fei, LI Da-peng, WANG Ming (171)
Sediment Risk Assessment and Heavy Metal Source Analysis in Typical Country Water Level Fluctuated Zone (WLFZ) of the Three Gorges	AO Liang, LEI Bo, WANG Ye-chun, <i>et al.</i> (179)
Pollution Distribution and Potential Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in Sediments from the Different Eastern Dredging Regions of Lake Taihu	MAO Zhi-gang, GU Xiao-hong, LU Xiao-ming, <i>et al.</i> (186)
Study on the Stages of Major Sediments in Dianchi Lake	WANG Xin-yu, ZHOU Feng, YI Xuan, <i>et al.</i> (194)
Oil Spill Identification Using Partial Surface Fitting Method Based on Concentration-Synchronous-Matrix-Fluorescence Spectra	WANG Chun-yan, SHI Xiao-feng, LI Wen-dong, <i>et al.</i> (202)
Treatment of Sludge Liquor Produced in Deep Dehydration by Photoelectro-Fenton Process	WANG Xian-li, WANG Shi-feng, WU Jun-feng, <i>et al.</i> (208)
Characteristics of Nitrification and Denitrification for Simultaneous Nitrogen and Phosphorus Removal by Granular Sludge	LIU Xiao-ying, LIN Hui, MA Zhao-rui, <i>et al.</i> (214)
Study on Long-Term Stability of Biological Nitrogen Removal via Nitrite from Real Landfill Leachate	SUN Hong-wei, GUO Ying, PENG Yong-zhen (221)
Compositions and Residual Properties of Petroleum Hydrocarbon in Contaminated Soil of the Oilfields	HU Di, LI Chuan, DONG Qian-qian, <i>et al.</i> (227)
Dynamics of the Mineralization and Transformation of Rice Photosynthesized Carbon in Paddy Soils - a Batch Incubation Experiment	TAN Li-min, PENG Pei-qin, LI Ke-lin, <i>et al.</i> (233)
Effects of Land Use and Abandonment on Soil Labile Organic Carbon in the Karst Region of Southwest China	LIAO Hong-kai, LI Juan, LONG Jian, <i>et al.</i> (240)
Aluminum Dissolution and Changes of pH in Soil Solution During Sorption of Copper by Aggregates of Paddy Soil	XU Hai-bo, ZHAO Dao-yuan, QIN Chao, <i>et al.</i> (248)
Effect of Cr(VI) Anions on the Cu(II) Adsorption Behavior of Two Kinds of Clay Minerals in Single and Binary Solution	LIU Juan-juan, LIANG Dong-li, WU Xiao-long, <i>et al.</i> (254)
Effect of Flooding Time Length on Mycorrhizal Colonization of Three AM Fungi in Two Wetland Plants	MA Lei-meng, WANG Peng-teng, WANG Shu-guang (263)
Preliminary Study on the Relationship Between the Water Quality and the Aquatic Biological Health Status of Taihu Lake	ZHOU Xiao-bai, ZHANG Ning-hong, ZHANG Yong, <i>et al.</i> (271)
Acute Toxicity of Three Typical Pollutants to Aquatic Organisms and Their Water Quality Criteria	JIANG Dong-sheng, SHI Xiao-rong, CUI Yi-bin, <i>et al.</i> (279)
Evaluation of the Acute Toxicity of Pharmaceutical Wastewater to Luminescent Bacteria	DU Li-na, YANG Fan, MU Yu-feng, <i>et al.</i> (286)
Influence of the Coexistence of Zn ²⁺ on the Enantioselective Toxicity of Metolachlor to <i>Scenedesmus obliquus</i>	HU Xiao-na, ZHANG Shu-xian, CHEN Cai-dong, <i>et al.</i> (292)
Simplification of Biotic Ligand Model and Evaluation of Predicted Results	WANG Wan-bin, CHEN Sha, WU Min, <i>et al.</i> (299)
Priority Pollutants Ranking and Screening of Coke Industry based on USEtox Model	HAO Tian, DU Peng-fei, DU Bin, <i>et al.</i> (304)
Isolation, Identification and Characterization of a Microcystin-degrading Bacterium <i>Paucibacter</i> sp. Strain CH	YOU Di-jie, CHEN Xiao-guo, XIANG Hui-yi, <i>et al.</i> (313)
Inhibition of the Activity of Sulfate-reducing Bacteria in Produced Water from Oil Reservoir by Nitrate	YANG De-yu, ZHANG Ying, SHI Rong-jiu, <i>et al.</i> (319)
Bioconversion of Cellulose to Methane by a Consortium Consisting of Four Microbial Strains	WU Jun-mei, MA An-zhou, CUI Meng-meng, <i>et al.</i> (327)
Factors Influencing the Variability in Soil Heterotrophic Respiration from Terrestrial Ecosystem in China	XIE Wei, ZHANG Shu-tao, HU Zheng-hua (334)
Study on the Distinguishing of Root Respiration from Soil Microbial Respiration in a <i>Leymus chinensis</i> Steppe in Inner Mongolia, China	SHI Jing-jing, GENG Yuan-bo (341)
Nitrous Oxide Flux at the Water-Air Interface of the Rivers in Nanjing During Summer	HAN Yang, ZHENG You-fei, WU Rong-jun, <i>et al.</i> (348)
Effects of Antiseptic on the Analysis of Greenhouse Gases Concentrations in Lake Water	XIAO Qi-tao, HU Zheng-hua, James Deng, <i>et al.</i> (356)
Electricity Generation of Surplus Sludge Microbial Fuel Cell Enhanced by Biosurfactant	PENG Hai-li, ZHANG Zhi-ping, LI Xiao-ming, <i>et al.</i> (365)
Fe-ZSM-5 Catalysts with Different Silica-Alumina Ratios for N ₂ O Catalytic Decomposition	LU Ren-jie, ZHANG Xin-yan, HAO Zheng-ping (371)
Inhibition of Chlorobenzene Formation via Various Routes During Waste Incineration by Ammonium Sulfate and Urea	YAN Mi, QI Zhi-fu, LI Xiao-dong, <i>et al.</i> (380)
County Scale Characteristics of CO ₂ Emission's Spatial-Temporal Evolution in the Beijing-Tianjin-Hebei Metropolitan Region	WANG Hao, CHEN Cao-cao, PAN Tao, <i>et al.</i> (385)
Characterization and Soil Environmental Safety Assessment of Super Absorbent Polymers in Agricultural Application	LI Xi, LIU Yu-rong, ZHENG Yuan-ming, <i>et al.</i> (394)

《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)

2014年1月15日 35卷 第1期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 1 Jan. 15, 2014

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: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行