

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第6期

Vol.35 No.6

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

北京地区冬夏季持续性雾-霾发生的环境气象条件对比分析·····	廖晓农,张小玲,王迎春,刘伟东,杜佳,赵玲慧 (2031)
阜康大气气溶胶中水溶性无机离子粒径分布特征研究·····	苗红妍,温天雪,王跃思,刘子锐,王丽,兰中东 (2045)
上海地铁站台大气颗粒物中过渡金属研究·····	包良满,雷前涛,谈明光,李晓林,张桂林,刘卫,李燕 (2052)
七一冰川地区苔藓中重金属元素含量研究·····	马娟娟,李真 (2060)
冬季东海、南黄海中 DMS 和 DMSP 浓度分布及影响因素研究·····	宋以柱,张洪海,杨桂朋 (2067)
大亚湾石化排污海域重金属污染及生态风险评价·····	徐姗姗,李纯厚,徐娇娇,肖雅元,林琳,黄小平 (2075)
深圳水库群表层水中全氟化合物的分布特征·····	王鑫璇,张鸿,何龙,沈金灿,柴之芳,杨波,王艳萍 (2085)
表层岩溶泉水中多环芳烃污染特征及来源解析·····	孙玉川,沈立成,袁道先 (2091)
桂江主要离子及溶解无机碳的生物地球化学过程·····	唐文魁,陶贞,高全洲,毛海若,姜光辉,焦树林,郑雄波,张乾柱,马赞文 (2099)
汾河源区不同景观带水文过程研究·····	杨永刚,李彩梅,秦作栋,邹松兵 (2108)
北京市通州区地下水分层质量评价及水化学特征·····	郭高轩,琚宜文,翟航,许亮,沈媛媛,纪轶群 (2114)
光透法定量两相流中流体饱和度的模型及其应用·····	章艳红,叶淑君,吴吉春 (2120)
紫色土坡耕地氮淋溶过程及其环境健康效应·····	陈维梁,高扬,林勇明,朱波,徐亚娟,于贵瑞,吴承祯 (2129)
基于非点源溶解态氮负荷估算的率水流域土地利用结构优化研究·····	陆宇超,毕孟飞,李泽利,沙健,王玉秋,钱丽萍 (2139)
镇江老城区古运河沉积物氮及有机质垂向分布及污染评价·····	周晓红,李义敏,周艺,卫安平,周广顺,肖思思 (2148)
两种沉水植物对上覆水和间隙水中可溶性无机氮的影响·····	杨文斌,李阳,孙共献 (2156)
湖泊沉积物短时间反复扰动下悬浮物上生物有效磷的动态变化·····	武晓飞,李大鹏 (2164)
不同扰动强度下城市重污染河道底泥对磷吸收和固定的影响·····	王尚,李大鹏 (2171)
池塘残饵对底泥氮、磷释放影响的模拟研究·····	吕元蛟,李瑞娇,张念,赵峰,谢从新,张敏 (2178)
再悬浮过程中河流底泥 PAHs 的迁移与释放·····	王晓慧,毕春娟,韩景超 (2185)
低分子有机酸对汞氧化还原反应的影响·····	赵士波,孙荣国,王定勇,王小文,张成 (2193)
活性炭催化过氧化氢去除荧光增白剂·····	刘海龙,张忠民,赵霞,焦茹媛 (2201)
准分子灯光照降解水中烷基酚的动力学·····	刘玉海,叶招莲,文颖频,毕承路 (2209)
AF + BAF 用于处理树脂化工集中区废水厂尾水的研究·····	涂勇,刘伟京,张耀辉,徐军,唐敏,陈勇,白永刚 (2216)
镉(II)-8-羟基喹啉分子印迹聚合物微球的合成及吸附性能研究·····	杨春艳,陈复彬,赵慧,常自强,章竹君 (2223)
微气泡曝气生物膜反应器同步硝化反硝化研究·····	刘春,年永嘉,张静,张明,张磊,龚鹏飞,肖太民,李星 (2230)
聚乳酸/淀粉固体缓释碳源生物反硝化研究·····	唐丹琦,王娟,郑天龙,刘建国,汪群慧 (2236)
丝状菌膨胀对无纺布生物反应器处理效果及膜污染特征的影响·····	侍宽,薛罡,高品,吴凡 (2241)
聚合氯化铝去除污泥水中磷的工艺优化·····	周振,胡大龙,乔卫敏,陈冠翰,蒋玲燕,李震,麦穗海 (2249)
鄱阳湖持久性有机污染物(POPs)长距离传输潜力模拟·····	弓晓峰,向洪锐,陈春丽,周文斌,王佳佳,刘春英,曾艳 (2256)
基于不确定性分析的垃圾焚烧烟气中重金属的土壤沉积及生态风险评估·····	廖志恒,孙家仁,吴兑,范绍佳,任明忠,吕家扬 (2264)
农药企业场地土壤中苯系物污染风险及管理对策·····	谭冰,王铁宇,李奇峰,张海燕,庞博,朱朝云,王道涵,吕永龙 (2272)
渤海湾海域 10 种鱼类中二噁英类及指示性多氯联苯的污染特征研究及风险评价·····	王莎莎,高丽荣,田益玲,朱帅,张芹 (2281)
基于荧光传感器 F _{rex} 的特性检测水质环境中生物毒性物质·····	赵巍,汪钊,蔡强,欧文斌,孟凡国 (2287)
对苯二酚抑制铜绿微囊藻生长下藻毒素的产生与释放·····	张元春,梁文艳,赵远,李飞贞,曹敬灿,胡绍杰 (2294)
基于沼液的培养基及产油小球藻藻种选育·····	赵凤敏,梅帅,曹有福,丁进锋,徐嘉杰,李树君 (2300)
酸性矿山废水库周边土壤微生物多样性及氨氧化菌群落研究·····	刘莹,王丽华,郝春博,李璐,李思远,冯传平 (2305)
河蚬(<i>Corbicula fluminea</i>)扰动对表层沉积物中氨氧化菌群落结构和丰度的影响·····	王雪,赵大勇,曾巾,余多慰,吴庆龙 (2314)
海洋油气田沉积物产甲烷活性及微生物生态·····	田琪,王佳,范晓蕾,罗生军,郭荣波,邱艳玲 (2322)
DGGE 及 T-RFLP 分析光照下电位对细菌群落的影响·····	吴义诚,邓欢,肖勇,赵峰 (2328)
重金属抗性解磷细菌的磷溶解特性研究·····	田江,彭霞薇,李霞,孙雅君,冯红梅,江泽平 (2334)
1 株耐冷兼性嗜碱好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性·····	王兆阳,陈国耀,姜珂,许培雅 (2341)
黑麦草-丛枝菌根对不同番茄品种抗氧化酶活性、镉积累及化学形态的影响·····	江玲,杨芸,徐卫红,王崇力,陈蓉,熊仕娟,谢文文,张进忠,熊治庭,王正银,谢德体 (2349)
黄河三角洲区土壤活性氮对盐分含量的响应·····	李玲,仇少君,陈印平,赵西梅,刘京涛,陆兆华 (2358)
宁南山区不同草地土壤原位矿化过程中氮素的变化特征·····	蒋跃利,赵彤,闫浩,黄懿梅 (2365)
长期施用四环素残留猪粪对土壤中耐药菌及抗性基因形成的影响·····	张俊,杨晓洪,葛峰,王娜,焦少俊,叶波平 (2374)
长期不同耕作方式对紫色水稻土重金属含量及有效性的影响·····	常同举,崔孝强,阮震,赵秀兰 (2381)
伊犁河流域土壤重金属环境地球化学基线研究及污染评价·····	赵新儒,特拉津·那斯尔,程永毅,詹江渝,杨剑虹 (2392)
江苏如东互花米草盐沼湿地重金属分布及其污染评价·····	张龙辉,杜永芬,王丹丹,高抒,高文华 (2401)
小流域农业面源氮污染时空特征及与土壤呼吸硝化关系分析·····	欧阳威,蔡冠清,黄浩波,耿晓君 (2411)
保护性耕作下小麦田土壤呼吸及碳平衡研究·····	张赛,王龙昌,黄召存,贾会娟,冉春燕 (2419)
米楮天然林和人工林土壤呼吸的比较研究·····	吴君君,杨智杰,翁发进,刘小飞,陈朝琪,林伟盛,王小红,陈坦 (2426)
水力停留时间对复合式厌氧折流板反应器乙醇型发酵制氢系统的影响·····	刘晓烨,张洪,李永峰 (2433)
《环境科学》征订启事 (2208)	
《环境科学》征稿简则 (2400)	
信息 (2084, 2200, 2229, 2391)	

基于荧光传感器 Frex 的特性检测水质环境中生物毒性物质

赵巍^{1,2}, 汪钊¹, 蔡强², 欧文斌², 孟凡国^{2*}

(1. 浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014; 2. 浙江清华长三角研究院, 浙江省应用酶学重点实验室, 嘉兴 314006)

摘要: 发光菌作为水环境生物毒性监控的有效手段, 近年来越来越得到重视. 本实验利用基因工程技术, 将 Frex 荧光蛋白重组到大肠杆菌中, 并通过测定菌体内 NADH 水平所引起的荧光强度变化, 来监测水体中有毒物质对微生物代谢的影响, 从而实现实时毒性监控. 实验完成了 Frex 荧光蛋白在大肠杆菌中的正确表达, 研究了培养温度、诱导时间及 IPTG 浓度等不同条件对 Frex 融合蛋白表达量和荧光活性的影响. 将此重组荧光发光菌初步应用于环境水体中有毒物质的检测研究, 选取氯化汞、苯酚、重铬酸钾、硫酸锌等 4 种国际荧光发光菌生物毒性检测标准物质进行检测, 结果表明毒性物质均能对菌体的荧光产生一定的催灭作用. 该毒物测试手段分别具有反应速度快和灵敏度高特性. 同时, 实验优化了该重组菌应用于生物毒性检测试验的条件, 为后续的应用研究提供了一定的实验基础, 拓展了荧光发光菌在其他方面的适用范围.

关键词: Frex; 荧光发光菌; 毒物测试; 水质环境; 条件优化

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)06-2287-07 DOI: 10.13227/j.hjks.2014.06.034

Detection of Biohazardous Materials in Water upon the Characteristics of Fluorescent Sensor Frex

ZHAO Wei^{1,2}, WANG Zhao¹, CAI Qiang², OU Wen-bin², MENG Fan-guo²

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Applied Enzymology, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314006, China)

Abstract: Luminescent bacteria have attracted more and more attention in recent years as an effective mean for biological toxicity of water environment monitoring. First of all, fluorescent protein Frex was correctly expressed in *Escherichia coli*, and then the effect of toxic substances on microbial metabolism in the water was monitored through the determination of the changes in the fluorescence intensity in bacteria caused by the change of NADH level in the bacteria. Then the effects of culture temperature, inducing time and the final concentration of inductor isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) on the expression level and fluorescent activity of the fusion protein Frex were studied. The recombinant fluorescent bacteria was then applied in the initial detection of toxic substances in water environment. Four international standard substances of biological toxicity test including HgCl₂, 3,5-dichlorophenol, potassium dichromate, and zinc sulfate heptahydrate were chosen to conduct experimental assay. The results suggested that all of these substances can cause a rapid decrease in the fluorescence of the bacteria. This test method has advantages of rapid reaction and high sensitivity. Meanwhile, the optimization of the conditions for the biological toxicity test lays foundation for subsequent application, and expands the application scope of luminescent bacteria in other aspects.

Key words: Frex; luminescent bacteria; toxicity test; water environment; condition optimization

在 20 世纪 80 年代兴起的 Microtox 技术(又称发光细菌毒性测试技术), 广泛应用于各种工业废水^[1-3]和地表水^[4]的毒性监测. 其原理为将海洋荧光发光菌暴露在各种环境样品中(水样品或土壤提取物), 通过检测荧光的减少量来表征环境中样品的生物毒性^[5,6], 但天然发光菌存在灵敏度不够、生物学意义不明确等诸多问题. 所以, 国外许多研究人员把目光投向基因工程改造发光菌^[7-10], 此类诱导型重组发光菌能够合成如 β -半乳糖苷酶^[11-13]、荧光素酶^[14-16]、GFP^[17-19]等报告蛋白^[20-22], 用于表征环境中样品的毒性^[23]. 近来, 研究人员开发出一种极其敏感且具有专一性并由基因编码的荧光感

受器 Frex^[24], 从而达到监控细胞内 NADH 水平的变化. 其作用原理为 Frex 蛋白能与体内的 NADH 进行结合, 使其构象发生变化后激发强荧光^[25]. 目前该荧光感受器已经应用于哺乳细胞中监测如 NADH 转移、葡萄糖代谢、电子传递链、氧化还原反映等作用. 本研究完成了 Frex 表达质粒转化入大肠杆菌并使其正确表达, 后将该重组菌暴露于毒性环境中,

收稿日期: 2013-10-11; 修订日期: 2013-12-13

基金项目: 浙江省重大科技专项(2012C03007-4); 浙江省应用酶学重点科技创新团队项目(2010R50019); 浙江省科技平台项目(2011F10067)

作者简介: 赵巍(1989 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: zw163163@yeah.net

* 通讯联系人, E-mail: mengfangguo@tsinghua.org.cn

通过监测菌液荧光值的变化来反映环境中生物毒性的大小. 本实验优化形成了一套新型的基因工程发光菌测试方法, 初步将其应用于生物毒性物质检测, 所得结果均验证了该方法的可行性.

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli BL21(DE3)pLysS 购于北京 TransGen 生物技术有限公司. Frex 重组表达质粒来自华东理工大学杨弋教授. SDS-PAGE 蛋白 marker 购自上海生物工程技术有限公司. Western-blot 蛋白 marker 购于 Rainbow 公司. 一抗 His-probe 购于 Santa Cruz Biotechnology 公司, 二抗 Anti-rabbit-HRP 购于 GE Healthcare 公司. ECL Western blotting 检测试剂盒购自 Millipore 公司. Frex 纯化蛋白由实验室纯化及保存. 实验室已保存氯化汞母液浓度为 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别用去离子水配置 3,5-二氯苯酚、重铬酸钾、硫酸锌母液, 浓度均为 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 其他试剂及药品均为进口或国产分析纯.

LB 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 121°C 灭菌 20 min, 用于 BL21(DE3)pLysS 培养.

LB 选择培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 121°C 灭菌 20 min, 冷却后加入 Amp, 终浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 用于 *E. coli* 转化子培养.

对于固体培养基, 则在液体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉.

1.2 方法

1.2.1 表达菌种的筛选及目的蛋白表达

实验筛选多种宿主菌, 最终使用 BL21(DE3)pLysS 菌株诱导表达 Frex 蛋白. 将重组质粒 pRSETb-Frex 转化, 次日挑单克隆 37°C 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 接种入 5 mL LB 选择培养基中培养过夜. 第 3 d 按 1:100 放大至 200 mL 的 LB 选择培养基摇瓶培养. 在 *D* 值达到 0.6~0.8 时, 加入 IPTG (终浓度 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 18°C 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下诱导表达.

1.2.2 Frex 表达条件的优化

分别在不同的温度、IPTG 浓度和诱导时间对 Frex 进行诱导表达. 取样进行 SDS-PAGE 电泳. 诱导前取 1 mL 菌液, 后续每隔 2 h 取 1 mL 菌液并测取 *D* 及菌液荧光值变化, 绘制菌体生长与荧光值相关曲线, 确定后续菌体毒物测试最佳时段.

1.2.3 SDS-PAGE 及 Western-blot 鉴定

将上一步收集所得 1 mL 菌液 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃上清, 用 $50\text{ }\mu\text{L}$ $1\times\text{PBS}$ ($\text{pH}=7.4$) 悬浮菌体加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ $5\times\text{loading buffer}$, 沸水煮 10 min 后, $20\text{ }\mu\text{L}$ 两块胶板同时上样. 按常规进行电泳 (120 V , 90 min). SDS-PAGE 电泳完毕后, 第一块胶考马斯亮蓝染色. 蛋白质条带通过全自动凝胶成像 ChampGel-3200 分析系统扫描检测进行分析. 另一块胶经电转移到硝酸纤维素膜上. 用含有 5% 脱脂牛奶的 $1\times\text{PBST}$ 缓冲液室温封闭 1 h, 用一抗 His-probe 4°C 孵育过夜, $1\times\text{PBST}$ 缓冲液每隔 5 min 清洗 5 次后加入二抗 Anti-rabbit-HRP 孵育 2 h. 再次用 $1\times\text{PBST}$ 缓冲液每隔 5 min 清洗 5 次后用 ECL 法进行曝光, 使用 Image Quant LAS 4000 mini 进行成像.

1.2.4 Frex 发光菌毒物测试 pH 和温度选定

诱导后菌液 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后弃上清, 用新鲜的 LB 培养基重悬菌体, 悬浮后菌液分别取 1 mL 加入 EP 管中, 置于 20°C 、 25°C 、 30°C 、 37°C 水浴保温 5 min, 96 孔板亦同等温度保温, 取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 菌液加入 96 孔板中, 测量荧光值变化. 上步其余重悬后菌液每 20 mL 分装入 50 mL 的试管中, 分别用 HCl 和 NaOH 调节 pH 至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0, 分别从各试管取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 菌液加入 96 孔板中 (3 组平行), 测得不同 pH 条件下菌液荧光值. 取不同 pH 条件下菌液, 25°C 保温 15 min 后, 结晶紫染色后显微镜下观察细胞菌体形态.

1.2.5 终点法毒物测试

收集诱导后菌体, $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心去上清, 新鲜 LB 培养基重悬, 所得菌液放入 25°C 水浴保温 5 min. 将毒物氯化汞、3,5-二氯苯酚、重铬酸钾、硫酸锌分别稀释成不同浓度于 1 mL EP 管中保存, 置于 25°C 保温 5 min. 酶标仪机器恒定测量温度为 25°C , 取保温重悬菌液 $180\text{ }\mu\text{L}$ 分别加入 96 孔板中, 酶标仪测取初始荧光值 (确保各孔间菌液荧光值相对差值 $<5\%$). 再依次向各孔中加入不同浓度毒物 $20\text{ }\mu\text{L}$ (加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 无菌水孔作为阴性对照). 首先设定酶标仪每隔 1 s 自动测取各孔间荧光值变化, 观测荧光值是否在一定时间内趋于稳定, 观测总时间为 2~3 min. 设定机器每隔 30 s 自动测取各孔内荧光值变化, 每次测量前设定振动 5 s 以确保菌液和毒物充分混匀, 测量总时间为 15 min.

1.2.6 实验数据处理

所有数据均由 OriginPro 8.5 作图软件处理.

相对荧光强度(RFU) = 加入毒物孔板荧光值/对照孔板荧光值 × 100%

荧光抑制率(Inhibitory rate) = (对照孔板荧光值 - 加入毒物孔板荧光值)/对照孔板荧光值 × 100%

2 结果与讨论

2.1 目的蛋白鉴定

如图 1 所示,泳道 1 为纯化蛋白,2 为未诱导菌体,3~12 分别为诱导 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 h 后菌体蛋白表达情况. Frex 表达质粒带有 His-tag 标签,故通过图 1 可以验证 Frex 在大肠杆菌中已正确表达,蛋白表达量在诱导 6 h 后趋于最大值,菌体自身存在部分本底表达(未加 IPTG 表达融合蛋白). 诱导温度设定为 18℃,诱导时间为 20 h,如图2(a)所示,泳道1为纯化蛋白,2~6为IPTG

浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 mmol·L⁻¹时菌体诱导表达情况. 结果表明 IPTG 浓度对于 Frex 表达量影响并不明显,故本实验采用 IPTG 诱导浓度为 0.1 mmol·L⁻¹. 设定诱导时间为 20 h,IPTG 浓度为 0.1 mmol·L⁻¹,如图 2(b)所示,泳道 1 为纯化蛋白. 2~5 分别为温度 18、25、30、37℃ 条件下菌体蛋白表达情况. 结果表明诱导温度对蛋白表达量无明显影响,但为了 Frex 的正确表达,本实验诱导温度设定为 18℃.

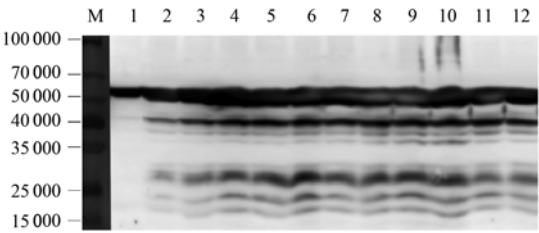


图 1 融合蛋白 Frex 的鉴定

Fig. 1 Western blotting analysis of fusion protein Frex

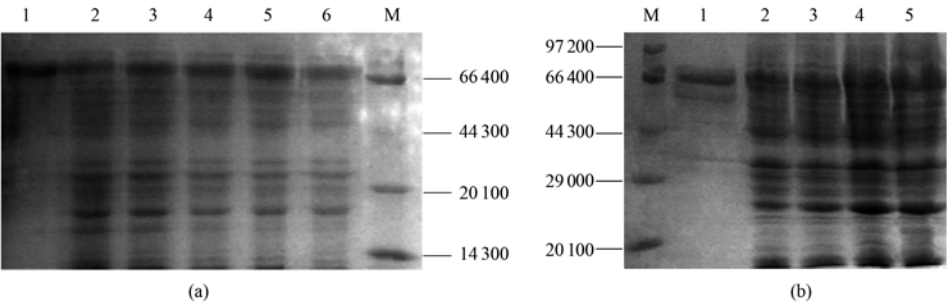


图 2 Frex 在大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中的表达及 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Influence of inducer concentration on the expression of fusion protein Frex

2.2 菌体生长 D 与荧光变化情况

图 3 结果表明,当 $D = 0.7$ 左右加入 IPTG 诱导后,菌体量在 6 h 内增长较快,6~20 h 内增殖速度明显变慢,20 h 后菌体生长进入平台期,趋于稳定,诱导后菌液最大 D 值为 1.8 左右. 随着诱导时间增加,菌体 D 值变大,菌体内诱导表达的蛋白量增多,由图 1 已知,菌体在诱导 6 h 后,目的蛋白含量趋于最大值,后续增加量不明显,而图 3 中可以看出菌体荧光呈持续增加,诱导 16 h 后达到最大值 662,取样检测结果表明,此时菌体形态和活力均非常良好,故为了提高毒物实验的准确性和灵敏性,笔者决定取诱导 16~20 h 后菌体进行后续荧光发光菌毒物实验.

2.3 菌体毒物测试条件的确定

Zhao 等^[25]通过对比不同激发波长下检测的荧光强度,发现当 Frex 蛋白与 NADH 结合后在发射波长 $E_m = 518$ nm 时,在激发波长 E_x 为 420 nm 与 500

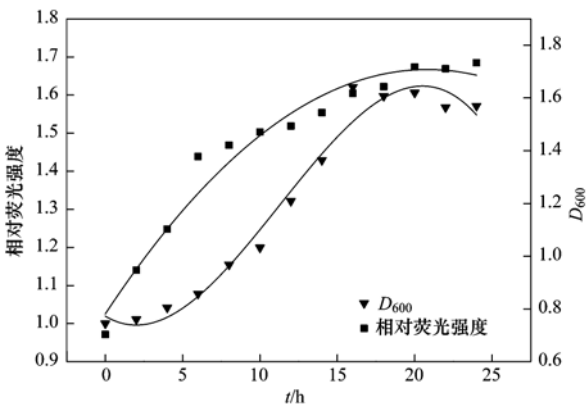


图 3 IPTG 诱导后菌体生长 D 及荧光值曲线

Fig. 3 Growth and fluorescence curve of BL21 (DE3) pLysS induced by IPTG

nm 均出现峰值^[26],通过酶标仪可以检测出较强荧光. 当 E_x 分别为 500 nm 与 420 nm 时,前者所测得荧光强度约为后者 5 倍. 同时由于激发波长为 420 nm 时,菌体在培养基中本底荧光值较大,故本实验

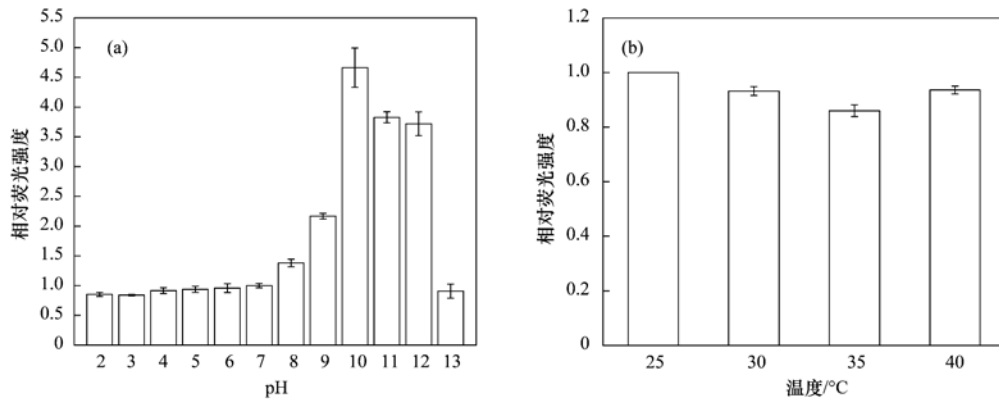


图4 发光菌毒物测试条件

Fig. 4 Toxicology test conditions of luminescent bacteria

选取后续毒物实验荧光测量波长 E_x 与 E_m 分别为 500 nm 和 525 nm, 这样实验中所测菌体荧光值能够更加贴切地反映菌体荧光总量的变化。

如图 4(a) 所示, 该菌体荧光值随 pH 的增大而增大, 在 pH = 10 时达到最大荧光值。而如图 5 所示, 菌体在 pH 分别为 4.0 与 10.0 的条件下, 形态结构已经发生明显变化。若在此条件下进行发光菌毒物实验, 结果并不能完全表征生物毒性。而诱导后菌液 pH 值约为 7.4 左右, 在国标规定范围内, 故后续实验条件 pH 范围固定在 6.5 ~ 7.5 之间, 既可以维持良好的菌体形态和消除 pH 波动带来的荧光值的变化, 同时也可以确保大部分毒物形态与性质不被破坏, 充分表征其生物毒性大小。目前, 国内利用生物荧光发光菌检测环境中有毒物质 pH 都控制为 7.0 左右, 原因在于消除 pH 对菌体的影响。然而, 有研究表明为了消除 pH 的影响, 在未知毒物性质的情况下, 把 pH 强行调至 7.0 左右, 这样很有可能会改变毒物的形态和性质。ISO113483: 2007 中规定, 一般情况下, 若样品的 pH 在 6.0 ~ 8.5, 则不需要调节 pH。国内也有一些专家甚至把发光细菌稳定发光的 pH 范围^[27]扩大到了 5.0 ~ 9.0。因此, 建议针对不同的菌种确定其最适的 pH 范围。如图 4(b) 所示, 实验温度为 20、25、30、37°C 时, 菌液荧光值差异较小, 说明该重组发光菌具有良好的热稳定性, 故后续实验采取接近室温 25°C 条件下进行。

2.4 菌体毒物测试

在直接终点法毒物实验中, 诱导 16 h 后菌液直接加入不同浓度的 4 种有毒物质, 测得菌液的荧光变化值如图 6 所示。从中可以看出氯化汞、3,5-二氯苯酚、重铬酸钾、硫酸锌等 4 种物质对菌体荧光

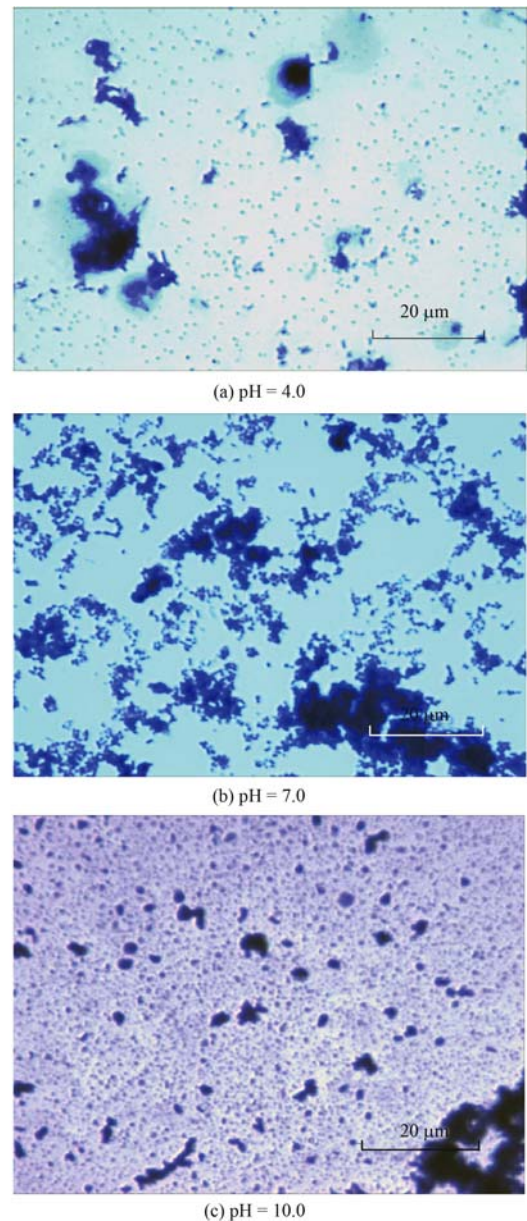


图5 不同 pH 条件下菌体显微镜成像(物镜 10×, 油镜 100×)

Fig. 5 Microscope images of bacteria at different pH

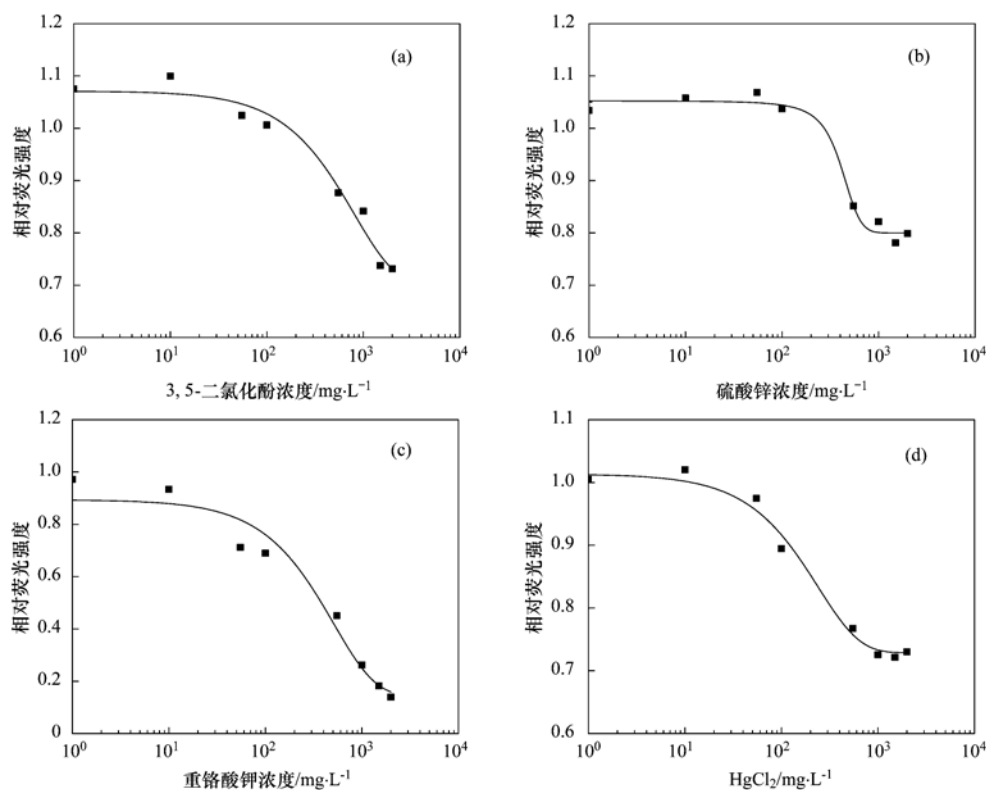


图6 终点法毒物实验分析

Fig. 6 Direct endpoint assay

值均有一定的催灭作用,物质种类及毒物浓度的不同致使菌体荧光值不同程度地降低,从而以此来表征不同物质生物毒性的大小.如图6(a)、6(b)和6(d)所示,随着毒物浓度的升高菌体荧光值逐渐下降,低浓度的毒物3,5-二氯苯酚、硫酸锌、氯化汞的加入对菌体荧光值产生了少量激活作用,致使菌体的相对荧光值有部分增高,图6(c)中低浓度毒物重铬酸钾的加入致使菌体相对荧光值降低,由此可以说明,该发光菌对4种物质反应灵敏度极限值约为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.图6(b)和6(d)所示,菌体相对荧光值在本实验测试范围内($0 \sim 2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)已分别趋近极限值0.8和0.7,由此可以推断该发光菌对硫酸锌和氯化汞的检测最高极限约为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,同理图6(a)和6(c)表明该发光菌对3,5-二氯苯酚和重铬酸钾的最高测试极限大于 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.根据拟合后曲线公式可以求出,图6中3,5-二氯苯酚、硫酸锌、重铬酸钾、氯化汞这4种物质 EC_{50} 分别为1047.5、978.0、68.2、332.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,因此可以得出本研究的荧光菌对该4种物质的检测灵敏度大小依次为重铬酸钾>氯化汞>硫酸锌>3,5-二氯苯酚.Imbi等^[28]比较了3,5-二氯苯酚、硫酸锌、氯化汞、重铬酸钾等7种物质对重

组菌 *E. coli* MC1061 (pDnlux) 和 *E. coli* MC1061 (pSllux) 以及 *V. fischeri* 等发光菌的影响(暴露时间为30 min),证明了毒物作用途径同为氧化损伤与重金属盐变性,该实验结果与本实验类似,氯化汞与重铬酸钾的 EC_{50} 值均小于3,5-二氯苯酚和硫酸锌等其他毒物,对发光菌具有较强毒性作用.

图7为不同浓度硫酸锌与荧光发光菌的作用随时间变化,表明毒物与发光菌作用能快速达到相对稳定状态(即相对荧光值不再发生明显变化),此过程反应所需时间非常短,通常只需数十秒至几分钟.如图7(a)所示,菌体在加入硫酸锌后终浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,荧光值相对值在迅速升高约0.1,而菌体加入硫酸锌后终浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,相对荧光值迅速降低约0.15,由此可以看出发光菌对毒物反应十分迅速.图7(b)表明,在硫酸锌终浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,相对荧光值迅速下降至0.831后2 min内缓慢回升至1.03,后保持相对稳定状态.我国常见的3种发光细菌为:明亮发光杆菌、费氏弧菌、青海弧菌,此类发光菌急性毒物试验常用检测时间均为15 min^[29],故本方法较此类发光菌有反应迅速的优势.

本实验作为一种原核生物实验方法,由于原核

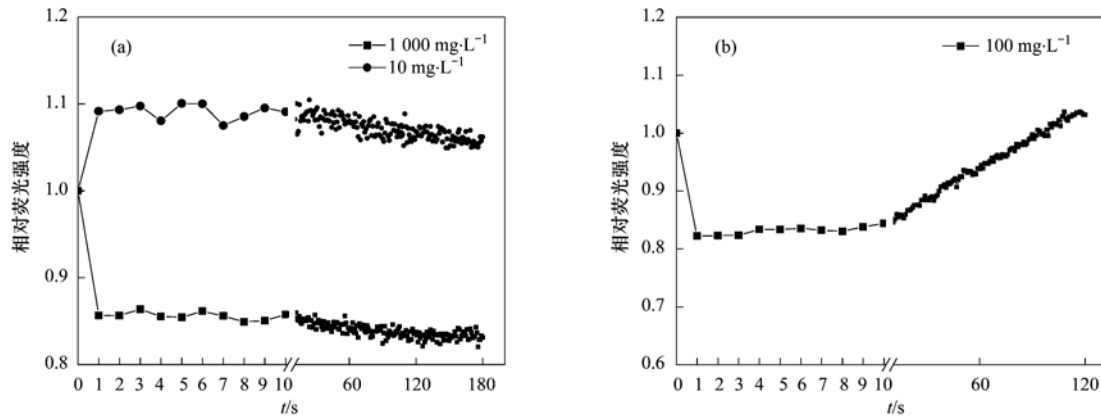


图7 硫酸锌对发光菌作用分析

Fig. 7 Effect of zinc sulfate heptahydrate on luminescent bacteria assay

生物自身特点不可避免地含有一些缺陷,例如某些化合物表现毒性须经过真核生物体内复杂的代谢活化,所以原核细胞对毒性物质的耐受性较真核细胞高^[30].而从本实验结果可以看出 BL21 (DE3) pLysS 菌体不仅满足了接近淡水的培养条件,并具有较高的毒物耐受性,在用于检测高浓度、成分复杂的废水方面可以提供更好的技术支撑.其快速反应的特点以及良好的热稳定性足以保证第一时间高效地获取微生物所处环境的基本信息,并为进一步的高级动物毒性试验和化学分析提供了可靠的依据.此基因工程菌的引入,将大大拓宽发光细菌法的应用范围与灵活性.若能进一步改进和解决该发光细菌的适应性、稳定性、活化保存技术和菌体的固定化技术等问题,各种类型的生物发光传感器^[31~33]等应用产品将不断涌现.

综上所述,该基因工程菌分别具有所需毒物与菌体的接触反应时间非常短、灵敏度高、毒物耐受性强、热稳定性好且适用于淡水环境等优点,笔者希望综合指示快和灵敏性高两大优点,使其未来可能成为一种快速预警和监测水体环境污染的工具.

3 结论

(1) 成功在宿主菌 BL21 (DE3) pLysS 中表达 Frex 荧光蛋白,诱导条件为 IPTG 浓度 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,温度为 18°C ,诱导时间 20 h,此条件下菌体内荧光蛋白表达量高且代谢稳定;确定发光菌毒物测试 pH 范围固定在 6.5 ~ 7.5 之间,激发波长 E_x 与发射波长 E_m 分别为 500 nm 和 525 nm,该发光菌具有优良的热稳定性,测试温度为 $25 \sim 40^\circ\text{C}$ 时均具有良好的发光性能.

(2) 不同浓度 3,5-二氯苯酚、硫酸锌、重铬酸

钾、氯化汞这 4 种标准物质,菌体均能做出不同程度的反应,此过程反应所需时间非常短,通常只需数十秒至几分钟,能够极其快速地表征出样品的生物毒性.本实验毒物检测的最低阈值为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,具有较高的灵敏性.硫酸锌和氯化汞最大检测上限约为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而由于常温下苯酚和重铬酸钾溶解度的限制,只能判断其检测上限大于 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,据此性质可将该发光菌应用于高浓度工业废水的毒性评价.

(3) 本荧光菌对 3,5-二氯苯酚、硫酸锌、重铬酸钾、氯化汞这 4 种物质的检测灵敏度大小依次为重铬酸钾 > 氯化汞 > 硫酸锌 > 3,5-二氯苯酚,本实验条件下菌体生理形态结构稳定,能够准确地反映样品生物毒性大小.

参考文献:

- [1] ISO/CD 11348- 1994, Water Quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacterial test) [S].
- [2] 黄正, 王家玲. 细菌发光试验及 Ames 试验检测工业废水急性毒性及致突变性的研究[J]. 环境科学, 1994, 15(6): 70-71.
- [3] 董玉瑛, 冯霄, 王宗爽, 等. 发光细菌法测定有机工业废水综合毒性[J]. 化工环保, 2005, 25(1): 65-67.
- [4] 薛建华, 王君晖. 发光菌应用于监测水环境污染的研究[J]. 科技通报, 1998, 14(5): 339-342.
- [5] Thomulka K W, McGee D J, Lange J H. Use of the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1993, 51(4): 538-544.
- [6] Dutka B J, Kwan K K. Comparison of three microbial toxicity screening tests with the microtox test [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1981, 27(1): 753-757.

- [7] Li Y F, Li F Y, Ho C L, *et al.* Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds [J]. Environmental Pollution, 2008, **152**(1): 123-129.
- [8] Christine J K, Nattapong T, Curtis A L. Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system [J]. Water Research, 2004, **38**(2): 423-431.
- [9] Ren S, Frymier P D. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays [J]. Chemosphere, 2005, **58**(5): 543-550.
- [10] Slyia D, Glover L A, Killham K, *et al.* Luminescence-based detection of activity of starved and viable but nonculturable bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(4): 1308-1316.
- [11] Yoshimitsu O, Seiichi N, Iwashiro O, *et al.* Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens [J]. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 1985, **147**(5): 219-229.
- [12] Tryland I, Fiksdal L. Enzyme characteristics of β -D-Galactosidase- and β -D-Glucuronidase-Positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne Coliforms and *Escherichia coli* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(3): 1018-1023.
- [13] Drahos D J, Hemming B C, McPherson S. Tracking recombinant organisms in the environment: β -Galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads [J]. Nature Biotechnology, 1986, **4**(5): 439-444.
- [14] Baldwin T O, Berends T, Bunch T A, *et al.* Cloning of the luciferase structural genes from *Vibrio harveyi* and expression of bioluminescence in *Escherichia coli* [J]. Biochemistry, 1984, **23**(16): 3663-3667.
- [15] Belas R, Mileham A, Cohn D, *et al.* Bacterial bioluminescence: Isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi* [J]. Science, 1982, **218**(4574): 791-793.
- [16] Cohn D H, Ogden R C, Abelson J N, *et al.* Cloning of the *Vibrio harveyi* luciferase genes: use of a synthetic oligonucleotide probe [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983, **80**(1): 120-123.
- [17] Errampalli D, Leung K, Cassidy M B, *et al.* Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, **35**(3): 187-199.
- [18] Roberto F F, Barnes J M, Bruhn D F. Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection [J]. Talanta, 2002, **58**(1): 181-188.
- [19] Leff L G, Leff A A. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(9): 3486-3488.
- [20] Louise H N. Reporter gene technology: the future looks bright [J]. Biochemical Pharmacology, 1999, **58**(5): 749-757.
- [21] Köhler S, Belkin S, Schmid R D. Reporter gene bioassays in environmental analysis [J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2000, **366**(6-7): 769-779.
- [22] Jansson J K. Marker and reporter genes: illuminating tools for environmental microbiologists [J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, **6**(3): 310-316.
- [23] Kiyohito Y. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, **73**(6): 1251-1258.
- [24] Giuliano K A, Lansing T D. Fluorescent-protein biosensors: New tools for drug discovery [J]. Trends in Biotechnology, 1998, **16**(3): 135-140.
- [25] Zhao Y Z, Jing J, Hu Q, *et al.* Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection [J]. Cell Metabolism, 2011, **14**(4): 555-566.
- [26] Zhao Y Z, Yang Y. Frex and FrexH: Indicators of metabolic states in living cells [J]. Bioengineered Bugs, 2012, **3**(3): 181-188.
- [27] 王丽莎, 魏东斌, 胡洪营. 发光细菌毒性测试条件的优化与毒性参照物的应用 [J]. 环境科学研究, 2004, **17**(4): 61-66.
- [28] Imbi K, Angela I, Olesja B, *et al.* LuxCDABE--Transformed constitutively bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity screening: comparison with naturally luminous *Vibrio fischeri* [J]. Sensors, 2011, **11**(8): 7865-7878.
- [29] GB/T 15441-1995, 水质急性毒性的测定发光细菌法 [S].
- [30] 吴泳标, 张国霞, 许玫英, 等. 发光细菌在水环境生物毒性检测中应用的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2010, **37**(8): 1222-1226.
- [31] 谢佳胤, 李捍东, 王平, 等. 微生物传感器的应用研究 [J]. 现代农业科技, 2010, **6**(1): 11-13.
- [32] 刘传银, 胡继明. 亲和型生物传感器在生物医学上的应用进展 [J]. 应用化学, 2011, **28**(6): 611-623.
- [33] 田青, 罗金平, 刘晓红, 等. 生物发光法细菌快速检测仪的研制及应用 [J]. 光学精密工程, 2010, **18**(4): 772-778.

CONTENTS

Comparative Analysis on Meteorological Condition for Persistent Haze Cases in Summer and Winter in Beijing	LIAO Xiao-nong, ZHANG Xiao-ling, WANG Ying-chun, <i>et al.</i> (2031)
Size Distributions of Water-Soluble Inorganic Ions in Atmospheric Aerosols in Fukang	MIAO Hong-yan, WEN Tian-xue, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (2045)
Study on Transition Metals in Airborne Particulate Matter in Shanghai City's Subway	BAO Liang-man, LEI Qian-tao, TAN Ming-guang, <i>et al.</i> (2052)
Heavy Metal Concentrations in Mosses from Qiye Glacier Region	MA Juan-juan, LI Zhen (2060)
Distributions of Dimethylsulfide and Dimethylsulfoniopropionate and Influencing Factors in the East China Sea and the Southern Yellow Sea During the Winter	SONG Yi-zhu, ZHANG Hong-hai, YANG Gui-peng (2067)
Pollution by Heavy Metals in the Petrochemical Sewage Waters of the Sea Area of Daya Bay and Assessment on Potential Ecological Risks	XU Shan-nan, LI Chun-hou, XU Jiao-jiao, <i>et al.</i> (2075)
Distribution of Perfluorinated Compounds in Surface Water of Shenzhen Reservoir Groups	WANG Xin-xuan, ZHANG Hong, HE Long, <i>et al.</i> (2085)
Contamination and Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Epikarst Spring Water	SUN Yu-chuan, SHEN Li-cheng, YUAN Dao-xian (2091)
Biogeochemical Processes of the Major Ions and Dissolved Inorganic Carbon in the Guijiang River	TANG Wen-kui, TAO Zhen, GAO Quan-zhou, <i>et al.</i> (2099)
Hydrologic Processes of the Different Landscape Zones in Fenhe River Headwater Catchment	YANG Yong-gang, LI Cai-mei, QIN Zuo-dong, <i>et al.</i> (2108)
Assessment of Groundwater Quality of Different Aquifers in Tongzhou Area in Beijing Plain and Its Chemical Characteristics Analysis	GUO Gao-xuan, JU Yi-wen, ZHAI Hang, <i>et al.</i> (2114)
Models for Quantification of Fluid Saturation in Two-Phase Flow System by Light Transmission Method and Its Application	ZHANG Yan-hong, YE Shu-jun, WU Ji-chun (2120)
Nitrogen Leaching and Associated Environmental Health Effect in Sloping Cropland of Purple Soil	CHEN Wei-liang, GAO Yang, LIN Yong-ming, <i>et al.</i> (2129)
Research on Land Use Structure Optimization Based on Nonpoint Source Dissolved Nitrogen Load Estimation in Shuashui Watershed	LU Yu-chao, BI Meng-fei, LI Ze-li, <i>et al.</i> (2139)
Nitrogen and Organic Matter Vertical Distribution Characteristics and Evaluation in Ancient Canal Sediments of Zhenjiang Old Town	ZHOU Xiao-hong, LI Yi-min, ZHOU Yi, <i>et al.</i> (2148)
Effects of Two Submerged Macrophytes on Dissolved Inorganic Nitrogen in Overlying Water and Interstitial Water	YANG Wen-bin, LI Yang, SUN Gong-xian (2156)
Bioavailable Phosphorus on Suspended Solids of Lake Under Short-term and Repeated Sediment Disturbance	WU Xiao-fei, LI Da-peng (2164)
Influence of Different Disturbance Intensity on the Phosphorus Adsorption and Immobilization by the Sediments from an Inner City Heavily Polluted Canal	WANG Shang, LI Da-peng (2171)
Effect of Feed Residues on the Release of Nitrogen and Phosphorus of Pond Sediment	LÜ Yuan-jiao, LI Rui-jiao, ZHANG Nian, <i>et al.</i> (2178)
Delivery and Release of Sediment PAHs During Resuspension	WANG Xiao-hui, BI Chun-juan, HAN Jing-chao (2185)
Effects of Low Molecular Weight Organic Acids on Redox Reactions of Mercury	ZHAO Shi-bo, SUN Rong-guo, WANG Ding-yong, <i>et al.</i> (2193)
Removal of Fluorescent Whitening Agent by Hydrogen Peroxide Oxidation Catalyzed by Activated Carbon	LIU Hai-long, ZHANG Zhong-min, ZHAO Xia, <i>et al.</i> (2201)
Kinetics of Alkylphenols Degradation in Aqueous Phase with Excilamp Irradiation	LIU Yu-hai, YE Zhao-lian, WEN Ying-pin, <i>et al.</i> (2209)
AF + BAF for Treating Effluent in the Sewage Plant of the Resin and Chemical Industry Park	TU Yong, LIU Wei-jing, ZHANG Yao-hui, <i>et al.</i> (2216)
Synthesis and Adsorption Property of Cd(II)-8-hydroxyquinoline Molecularly Imprinted Polymer Microspheres	YANG Chun-yan, CHEN Fu-bin, ZHAO Hui, <i>et al.</i> (2223)
Simultaneous Nitrification and Denitrification in a Microbubble-aerated Biofilm Reactor	LIU Chun, NIAN Yong-jia, ZHANG Jing, <i>et al.</i> (2230)
Effect of PLA/Starch Slow-Release Carbon Source on Biological Denitrification	TANG Dan-qi, WANG Juan, ZHENG Tian-long, <i>et al.</i> (2236)
Impacts of Filamentous Bulking on Treatment Effect and Fouling Characteristics of Nonwoven Bioreactor	SHI Kuan, XUE Gang, GAO Pin, <i>et al.</i> (2241)
Optimization for Phosphorous Removal in Thickening and Dewatering Sludge Water by Polyaluminum Chloride	ZHOU Zhen, HU Da-long, QIAO Wei-min, <i>et al.</i> (2249)
Simulation of Long-Range Transport Potential of POPs in Poyang Lake	GONG Xiao-feng, XIANG Hong-rui, CHEN Chun-li, <i>et al.</i> (2256)
Uncertainty Analysis of Ecological Risk Assessment Caused by Heavy-metals Deposition from MSWI Emission	LIAO Zhi-heng, SUN Jia-ren, WU Dui, <i>et al.</i> (2264)
Risk Assessment and Countermeasures of BTEX Contamination in Soils of Typical Pesticide Factory	TAN Bing, WANG Tie-yu, LI Qi-feng, <i>et al.</i> (2272)
Levels Distribution and Risk Assessment of the Indicator and Dioxin-Like Polychlorinated Biphenyls in Ten Different Species of Marine Fish of Bohai Bay, China	WANG Sha-sha, GAO Li-rong, TIAN Yi-ling, <i>et al.</i> (2281)
Detection of Biohazardous Materials in Water upon the Characteristics of Fluorescent Sensor Frex	ZHAO Wei, WANG Zhao, CAI Qiang, <i>et al.</i> (2287)
Generation and Release of Microcystin-LR by <i>Microcystis aeruginosa</i> Under Hydroquinone Inhibition	ZHANG Yuan-chun, LIANG Wen-yan, ZHAO Yuan, <i>et al.</i> (2294)
Culture Medium Based on Biogas Slurry and Breeding of Oil Chlorella	ZHAO Feng-min, MEI Shuai, CAO You-fu, <i>et al.</i> (2300)
Microbial Diversity and Ammonia-Oxidizing Microorganism of a Soil Sample Near an Acid Mine Drainage Lake	LIU Ying, WANG Li-hua, HAO Chun-bo, <i>et al.</i> (2305)
Effects of <i>Corbicula fluminea</i> Bioturbation on the Community Composition and Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Surface Sediments	WANG Xue, ZHAO Da-yong, ZENG Jin, <i>et al.</i> (2314)
Methanogenic Activity and Methanogen Diversity in Marine Gas Field Sediments	TIAN Qi, WANG Jia, FAN Xiao-lei, <i>et al.</i> (2322)
Effect of the Potential on Bacterial Community Under Illumination by DGGE and T-RFLP	WU Yi-cheng, DENG Huan, XIAO Yong, <i>et al.</i> (2328)
Isolation and Characterization of Two Bacteria with Heavy Metal Resistance and Phosphate Solubilizing Capability	TIAN Jiang, PENG Xia-wei, LI Xia, <i>et al.</i> (2334)
Identification and Denitrification Characteristics of a Psychrotolerant Facultative Basophilic Aerobic Denitrifier	WANG Zhao-yang, CHEN Guo-yao, JIANG Ke, <i>et al.</i> (2341)
Effects of Ryegrass and Arbuscular Mycorrhiza on Activities of Antioxidant Enzymes, Accumulation and Chemical Forms of Cadmium in Different Varieties of Tomato	JIANG Ling, YANG Yun, XU Wei-hong, <i>et al.</i> (2349)
Response of Active Nitrogen to Salinity in a Soil from the Yellow River Delta	LI Ling, QIU Shao-jun, CHEN Yin-ping, <i>et al.</i> (2358)
Variation of Soil Nitrogen During <i>in situ</i> Mineralization Process Under Different Grasslands in the Mountainous Area of Southern Ningxia, Northwest China	JIANG Yue-li, ZHAO Tong, YAN Hao, <i>et al.</i> (2365)
Effects of Long-Term Application of Pig Manure Containing Residual Tetracycline on the Formation of Drug-Resistant Bacteria and Resistance Genes	ZHANG Jun, YANG Xiao-hong, GE Feng, <i>et al.</i> (2374)
Long-Term Effects of Tillage Methods on Heavy Metal Accumulation and Availability in Purple Paddy Soil	CHANG Tong-ju, CUI Xiao-qiang, RUAN Zhen, <i>et al.</i> (2381)
Environmental Geochemical Baseline of Heavy Metals in Soils of the Ili River Basin and Pollution Evaluation	ZHAO Xin-ru, Telajin Nasier, CHENG Yong-yi, <i>et al.</i> (2392)
Distribution Patterns and Pollution Assessments of Heavy Metals in the <i>Spartina alterniflora</i> Salt-Marsh Wetland of Rudong, Jiangsu Province	ZHANG Long-hui, DU Yong-fen, WANG Dan-dan, <i>et al.</i> (2401)
Temporal-Spatial Distribution of Agricultural Diffuse Nitrogen Pollution and Relationship with Soil Respiration and Nitrification	OUYANG Wei, CAI Guan-qing, HUANG Hao-bo, <i>et al.</i> (2411)
Soil Respiration and Carbon Balance in Wheat Field Under Conservation Tillage	ZHANG Sai, WANG Long-chang, HUANG Zhao-cun, <i>et al.</i> (2419)
Comparison of Soil Respiration in Natural <i>Castanopsis carlesii</i> Forest and Plantation Forest	WU Jun-jun, YANG Zhi-jie, WENG Fa-jin, <i>et al.</i> (2426)
Influences of Hydraulic Retention Time on the Ethanol Type Fermentation Hydrogen Production System in a Hybrid Anaerobic Baffled Reactor	LIU Xiao-ye, ZHANG Hong, LI Yong-feng (2433)

《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6月15日 第35卷 第6期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 6 Jun. 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