

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, 李奇锋, 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 (*Corbicula fluminea*) 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)

酸性矿山废水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

(中国地质大学(北京)水资源与环境学院, 北京 100083)

摘要: 采集了安徽某铁矿酸性矿山废水水库周边土壤样品, 测定其理化参数, 并采用分子生物学方法分别研究了土壤中细菌和古菌群落组成以及驱动氨氧化作用的微生物类群. 结果表明, 该土壤样品受到酸性矿山废水严重污染, pH 低于 3, 铁铝等金属含量很高. 细菌的 16S rRNA 基因文库覆盖 11 个类群, 其中酸杆菌门 (Acidobacteria) 占主导地位, 丰度达 47.4%; 微菌门 (Verrucomicrobia) 为第二大门类, 丰度为 18.9%. 样品中含有大量嗜酸的细菌类群, 如 *Candidatus Koribacter versatilis* 和 *Holophaga* sp. 等. 古菌的 16S rRNA 基因文库仅覆盖 2 个类群, 分别为奇古菌门 (Thaumarchaeota) 和广古菌门 (Euryarchaeota), 奇古菌门占绝对优势地位. 该土壤样品中的氨氧化作用可能主要由奇古菌门的氨氧化古菌所驱动, 且该区域存在新的氨氧化古菌类群.

关键词: 酸性矿山废水; 嗜酸菌; 微生物群落结构; 根际土壤; 氨氧化古菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)06-2305-09 DOI: 10.13227/j.hjks.2014.06.037

Microbial Diversity and Ammonia-Oxidizing Microorganism of a Soil Sample Near an Acid Mine Drainage Lake

LIU Ying, WANG Li-hua, HAO Chun-bo, LI Lu, LI Si-yuan, FENG Chuan-ping

(School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences, Beijing 100083, China)

Abstract: The main physicochemical parameters of the soil sample which was collected near an acid mine drainage reservoir in Anhui province was analyzed. The microbial diversity and community structure was studied through the construction of bacteria and archaea 16S rRNA gene clone libraries and ammonia monooxygenase gene clone library of archaea. The functional groups which were responsible for the process of ammonia oxidation were also discussed. The results indicated that the soil sample had extreme low pH value (pH < 3) and high ions concentration, which was influenced by the acid mine drainage (AMD). All the 16S rRNA gene sequences of bacteria clone library fell into 11 phyla, and Acidobacteria played the most significant role in the ecosystem followed by Verrucomicrobia. A great number of acidophilic bacteria existed in the soil sample, such as *Candidatus Koribacter versatilis* and *Holophaga* sp. The archaea clone library consisted of 2 phyla (Thaumarchaeota and Euryarchaeota). The abundance of Thaumarchaeota was remarkably higher than Euryarchaeota. The ammonia oxidation in the soil environment was probably driven by ammonia-oxidizing archaea, and new species of ammonia-oxidizing archaea existed in the soil sample.

Key words: acid mine drainage; acidophilic bacteria; microbial community structure; rhizosphere; ammonia-oxidizing archaea

大规模金属矿藏的开采, 产生了大量硫化金属尾矿如黄铁矿、砷黄铁矿等. 这些尾矿给环境带来了很大威胁, 如长期暴露于空气中, 则会与微生物和水发生风化、溶浸、氧化和水解一系列反应形成酸性矿山废水 (acid mine drainage, AMD)^[1]. 酸性矿山废水 pH 非常低且含有大量金属离子, 如铁、铜、锌、锰等, 对周围水体、土壤环境带来了十分严重的危害^[2,3]. 在黄铁矿等硫化矿物的氧化过程中, *Leptospirillum ferrooxidans*、*Acidithiobacillus ferrooxidans* 和 *Ferropasma* spp. 等嗜酸微生物发挥着重要的催化作用^[4]. 有嗜酸微生物参与时, 黄铁矿的氧化速率明显高于化学氧化对黄铁矿的氧化作用, 在适宜条件下它们可使整个反应的速度提高 10^6 倍^[5].

低 pH 和高金属含量不仅影响周围地区的生态系统, 而且影响元素的生物地球化学循环. 氮循环是元素地球化学循环中非常重要的一部分. 氮循环主要由固氮、氨化、硝化、反硝化等过程组成, 均由微生物驱动. 氨氧化过程不仅是硝化作用的限速步骤, 更是整个氮元素循环的中心环节^[6,7]. 在很长一段时间里, 氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 被认为是唯一可以催化氨氧化的微生物^[8], 其存在直接影响硝化作用强度以及硝化速率^[9].

收稿日期: 2014-01-07; 修订日期: 2014-03-11

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2652012028, 2652013100); 北京高等学校青年英才计划项目

作者简介: 刘莹 (1989 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为地质微生物学, E-mail: liuyingcugb@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: chunbohao@cugb.edu.cn

但近几年的研究却发现,氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)广泛地分布在海洋、土壤、沉积物、淡水以及污水处理厂等诸多环境中^[10],而且在大多数土壤中 AOA 是主要的氨氧化承担者^[11]. 已有研究表明,在 pH 3.7~6.0 的酸性红壤中,氨氧化古菌(AOA)的氨单加氧酶 α 亚基因(*amoA*)拷贝数多于细菌 *amoA*^[11],表明氨氧化古菌可能发挥着更重要的作用. 但关于 pH 小于 3 的极端酸性环境中氨氧化类群的研究,目前还鲜见报道.

本研究取样点位于安徽省某酸性矿山废水区域,采集有短小植被覆盖区域的根际土壤,采用分子生物学技术分析其细菌和古菌的组成结构并探讨承担氨氧化功能的微生物类群. 研究结果不但有助于人们增加对矿区土壤微生物组成的了解,而且扩展了人们对极端酸性土壤中氮循环机制的认识,有利于对污染土壤的生物治理和生态恢复.

1 材料与方法

1.1 样品采集及分析

样品于 2012 年 8 月采集于安徽某铁矿酸性矿山废水库边有短小植被覆盖区域. 采集根际土壤样品后,装于无菌封口袋中,4℃ 保存运输至实验室并尽快进行实验操作. 取 100 g 土壤研磨过 1 mm 筛,以去除植物根系;将 50 g 过筛的土壤 50℃ 烘干 24 h,计算含水率. 用 KCl 溶液作为介质测定样品 pH. 总有机碳(total organic carbon, TOC)含量由总有机碳测定分析仪 Multi N/C 2100 测定. 氨氮和硝氮含量采用氯化钾溶液提取-分光光度法测定^[12]. 使用 M3 浸提剂^[13]制备浸提液,用于有效磷和有效金属的测定. 使用经离心后的浸提液,采用钼锑抗分光光度法测定有效磷含量^[14]. 有效金属含量采用 ICP (iCAP 6000, Thermo) 测定,具体测定方法见文献^[15]. 土壤中微生物丰度(Microbial abundance)采用吖啶橙染色直接计数法(acridine orange direct counting, AODC)测定,具体方法见文献^[16].

1.2 土壤基因组 DNA 的提取

取 0.5 g 土壤样品,用基因组 DNA 提取试剂盒直接提取样品中的总 DNA(参照 MoBio 试剂盒生产商建议步骤). 提取出来的基因组总 DNA 经 Nanodrop 测定 DNA 浓度后置于 -20℃ 保存.

1.3 细菌 16S rRNA 基因的扩增

利用细菌通用引物 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')和 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT

GTT ACG ACT T-3')^[17],以土壤基因组 DNA 为模板,扩增样品中细菌的 16S rDNA 基因片段. PCR 反应条件设置为预变性 95℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 53℃ 30 s,延伸 72℃ 2 min,35 个循环后,72℃ 延伸 7 min. 所有 PCR 产物都在 -20℃ 保存.

1.4 古菌 16S rRNA 基因的扩增

以土壤基因组 DNA 为模板,利用古菌通用引物 109F(ACK GCT CAG TAA CAC GT)和 934R(GTC CTC CCC CGC CAA TTC CT)^[18]扩增样品中古细菌的 16S rRNA 基因片段. PCR 反应条件设置为预变性 95℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 48℃ 30 s,延伸 72℃ 2 min,35 个循环后,72℃ 延伸 5 min.

1.5 氨单加氧酶基因(*amoA*)的扩增

amoA 是氨氧化功能酶——氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO) α 亚基的编码基因. 以土壤基因组 DNA 模板,分别利用氨氧化细菌 *amoA* 引物 *amoA*-1F(GGG GHT TYT ACT GGT GGT)和 *amoA*-2R(CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC)^[19]、*amoA*-3F(GGT GAG TGG GYT AAC MG)和 *amoA*-4R(GCT AGC CAC TTT CTG G)^[20],氨氧化古菌 *amoA* 引物 AF(STA ATG GTC TGG CTT AGA)和 AR(GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT)^[21]扩增样品中氨氧化细菌和氨氧化古菌的氨单加氧酶基因片段. 氨氧化细菌 PCR 反应条件设置为 95℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 48℃ 45 s,延伸 72℃ 2 min,35 个循环后,72℃ 延伸 10 min. 氨氧化古菌 PCR 反应条件设置为 95℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 48℃ 60 s,延伸 72℃ 2 min,35 个循环后,72℃ 延伸 10 min.

1.6 克隆文库的构建

分别构建土壤样品中细菌和古细菌的 16S rDNA 克隆文库以及氨氧化古菌的 *amoA* 克隆文库. 氨氧化细菌 *amoA* 基因经反复扩增,均未得到 PCR 产物,故未构建该文库. 克隆文库构建方法为:将 PCR 产物连接到 Promega 公司的 pGEM-T 克隆载体上,按照生产商的说明将质粒转化于 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,涂布于含有 Amp/X-gal/IPTG 的 LB 平板,于 37℃ 静置培养 17 h,之后在 4℃ 静置 2 h 显色,随机挑取白色菌落,重新培养. 利用载体特异性引物对 M13-M4(GTT TTC CCA GTC ACG AC)和 M13-RV(CAG GAA ACA GCT ATG AC)进行 PCR 扩增验证插入片段大小以筛选阳性克隆. 细菌、古菌和氨氧化古菌克隆文库分别挑取 105、38 和 43 个阳性克隆送交上海生工进行测序.

1.7 序列测定以及系统发育分析

利用 Bellerophon 程序检测并去除嵌合体^[22]. 然后用 Dotur 软件对所得序列进行分类, 计算香农指数(Shannon)和辛普森指数(Simpson)并制作饱和曲线. 最后选取代表克隆运用 Blast 程序与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 中进行相似性搜索并下载相似性最高的序列和相似性较高的已知种属的序列. 将所有序列用 BioEdit 中的 ClustalW 程序进行比对, 并用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树.

1.8 序列登录号

将本研究中所获得序列提交至 GenBank 中, 细菌 16S rDNA 的序列登录号为 KF863913-KF863952, KF924200-KF924205; 古菌 16S rDNA 的序列登录号为 KF918278-KF918306; 氨氧化古菌 *amoA* 的序列登录号为 KF916687-KF916696.

2 结果与分析

2.1 AODC 结果与理化分析

所采集土壤样品的部分物理化学参数见表 1. 样品酸性很强, pH_{KCl} 仅为 2.83. 总有机碳含量为 0.675%, 低于农田和森林土壤 TOC 平均含量^[23,24]; 含水率为 9.5%; 土壤微生物丰度为 3.1×10^8 个 $\cdot\text{g}^{-1}$; $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量分别为 $7.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $3.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. 经测得样品中有效金属含量很高, 其中 Al 含量最高达 $1380.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Fe 含量高达 $57.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. SO_4^{2-} 含量高达 $2168.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

2.2 饱和度及多样性指数分析

经测序细菌文库共获得 103 条序列, 去除载体

表 2 细菌、古菌以及氨氧化古菌克隆文库多样性指数

Table 2 Diversity indices of the bacteria and archaea and AOA clone libraries of the soil sample

克隆文库	总克隆数	OTUs	Shannon 指数	Simpson 指数	Dominance ¹⁾
细菌	95	45	3.49	0.0327	0.0832
古菌	28	14	2.38	0.0966	0.0982
氨氧化古菌	39	10	2.02	0.141	0.123

1) Dominance = $1 - \text{Shannon}/(\ln N)$ (N : Number of OTUs)

2.3 土壤中细菌、古菌以及氨氧化古菌多样性以及系统发育学分析

2.3.1 细菌多样性以及系统发育分析

将每种基因型的序列输入 RDP 网站, 得到该基因型所属的系统发育类群. 结果显示, 细菌文库中包含了 11 个类群(如图 2), 其中所占比例最大的 3 个类群分别为 Acidobacteria (47.4%)、Verrucomicrobia(18.9%)、Chloroflexi(10.5%).

经 NCBI 数据库中 Blast 程序比对分析后, 选取

表 1 土壤样品的部分化学参数

Table 1 Chemical parameters of the soil sample

参数	测定值	参数	测定值
pH	2.83	Fe/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	57.0
含水率/%	9.5	Na/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	79.86
TOC/%	0.675	K/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	45.21
微生物丰度/个 $\cdot\text{g}^{-1}$	3.1×10^8	Al/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	1380.3
$\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	7.6	Ca/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	76.95
$\text{NO}_3^-\text{-N}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	3.1	Cu/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.14
有效 P/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.3	Mg/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	12.0
$\text{SO}_4^{2-}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	2168.0	Zn/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.53
$\text{Cl}^-/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	8187.1	Mn/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	6.21

和嵌合体后有效序列为 95 条; 古细菌与氨氧化古菌文库分别得到 28 条和 39 条有效序列. 3 个文库的饱和曲线如图 1 所示, 3 个文库饱和曲线均趋于平缓, 可以比较完整地反映样品中细菌、古菌和氨氧化古菌群落结构. 从香农指数(Shannon)和辛普森指数(Simpson)可以看出该样品中细菌的多样性高于古菌(表 2).

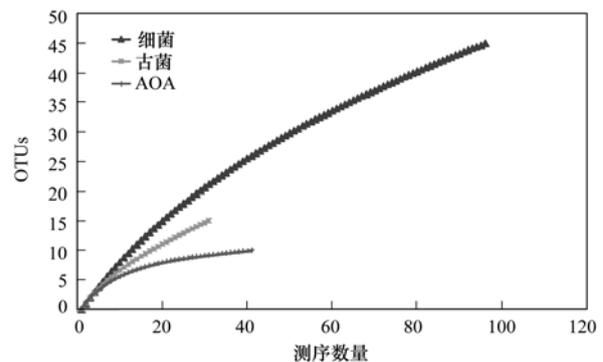


图 1 细菌、古菌和氨氧化古菌饱和度曲线

Fig. 1 Saturation curves of bacteria, archaea and AOA OTU

主要克隆进行比对, 发现与该矿区土壤样品中细菌亲缘关系较近的克隆均来自于一些酸性环境中, 如某些矿区酸性土壤、酸性湿地底泥、酸性红壤和酸性矿山废水等, 或者植被根际等.

本研究中酸杆菌门是所占比例最高的门类, 在文库中丰度达 47.4%. 酸杆菌门细菌在环境中分布广泛, 尤其在土壤和沉积物中所占比例较高——在细菌 16S rRNA 基因文库中的丰度可达 10% ~ 50%^[25-30]. 该样品中酸杆菌门细菌多属于 Gp1 类

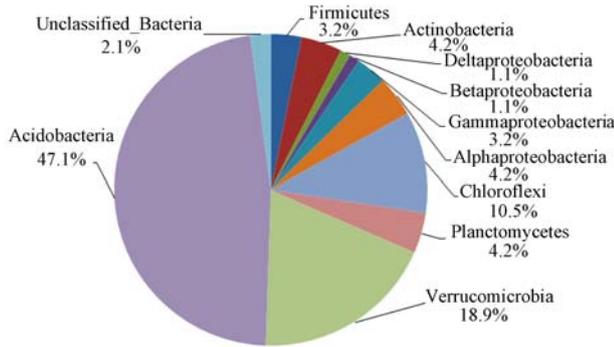


图 2 细菌文库中各类群所占比例

Fig. 2 Proportion of each phylotype in the clone library

群(如图 3). 酸杆菌门的一些成员对于极端环境如金属污染和酸性环境具有耐受性^[26]. Lee 等^[29]在研究韩国某地栗子树根际土壤时,分别应用 PCR 以及反转录 PCR(reverse transcription PCR)研究土壤样品中微生物多样性,在 rRNA 基因文库以及由 rRNA 反转录得到的 cDNA 文库中,酸杆菌门所占比例都大于 50%,表明酸杆菌门细菌在该土壤样品中数量最多而且新陈代谢活性最高.

克隆 Bac-XC-105 (2.0%)、Bac-XC-109 (5.1%)、Bac-XC-19(1.0%)和 Bac-XC-25(1.0%)均与 *Candidatus Koribacter versatilis* 的亲缘关系较

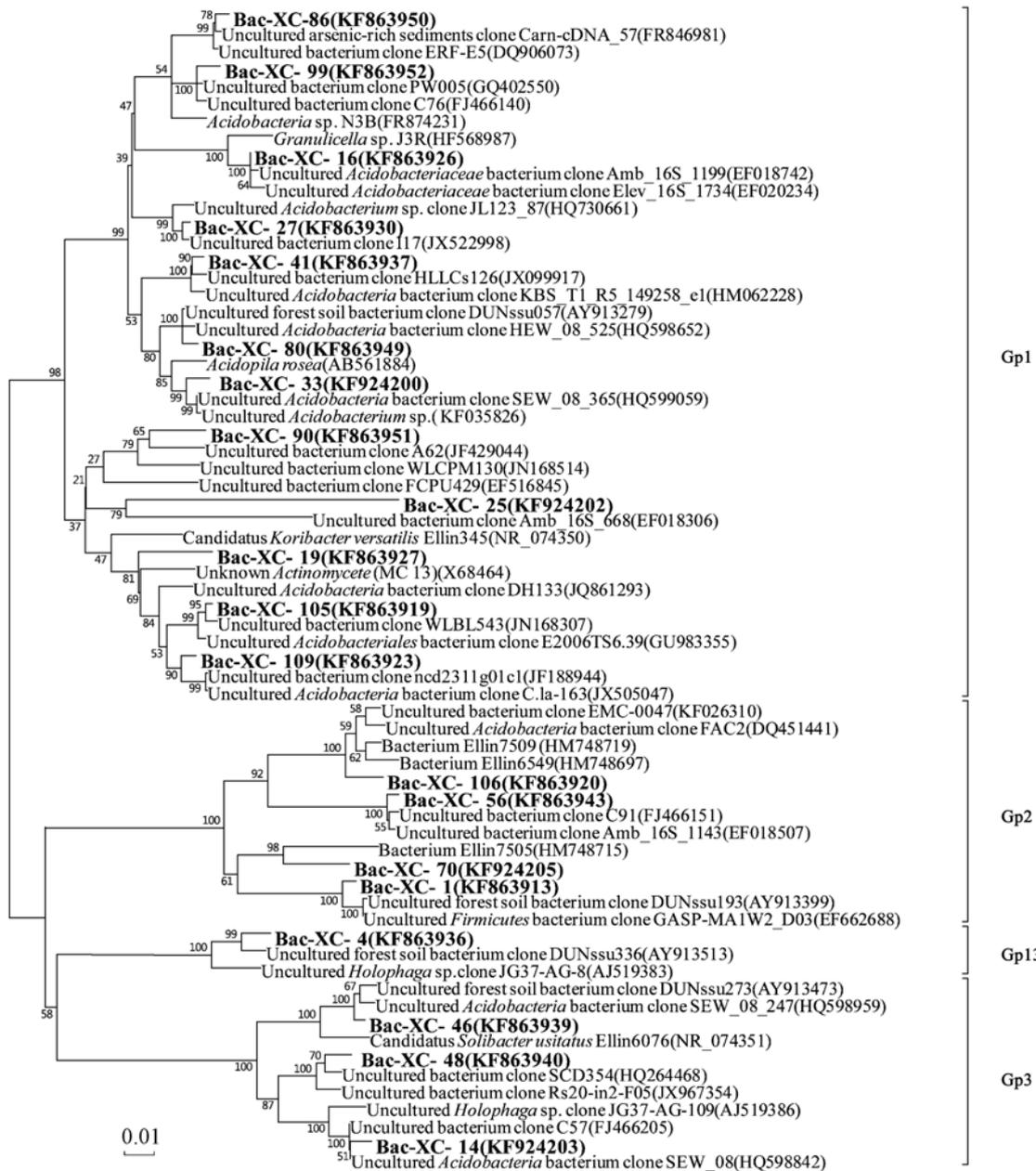


图 3 基于 16S rDNA 序列的 Acidobacteria 细菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Acidobacteria in the soil based on 16S rDNA sequences

近. Ward 等^[31] 比较了包括 *Candidatus Koribacter versatilis* 在内的酸杆菌门中 3 个种的全基因组,发现 *Candidatus Koribacter versatilis* 具备硝酸盐和亚硝酸盐还原能力,且适宜在 pH 4.0 ~ 6.5 的环境中生存.

克隆 Bac-XC-27 (4.0%)、Bac-XC-86 (1.0%) 和 Bac-XC-99 (1.0%) 与菌株 *Acidobacteria* sp. isolate N3B 的 16S rDNA 序列相似性均为 97%, 该菌株分离自法国加尔省一流经古代矿区的酸性溪流中^[32]. *Acidobacteria* 属菌株多为分离自酸性环境的化能异养菌,革兰氏染色呈阴性,好氧;可在 pH 3.0 ~ 6.0、温度为 20 ~ 37℃ 的环境中生存^[33].

克隆 Bac-XC-14 和 Bac-XC-4 (丰度分别为 4.0% 和 3.0%) 与 *Holophaga* sp. 的 16S rDNA 序列同源性较高. *Holophaga* 属细菌在一些酸性矿坑水

中曾检测到,如江西德兴市银山铅锌矿的露天矿坑储水池和地下 300 多 m 隧道中自然氧化形成的酸性矿坑水^[34]. *Holophaga* 属细菌多为革兰氏阴性严格厌氧菌,可在温度为 10 ~ 35℃ 环境中生存,最适温度为 28 ~ 32℃,最适 pH 为 6.8 ~ 7.5^[35].

克隆 Bac-XC-41 (5.1%) 和 Bac-XC-80 (2.0%) 在系统发育树上与 *Acidopila rosea* 聚为一类(图 3). Okamura 等^[36] 分别在日本的一个 AMD 处理厂(水样 pH 2.7) 和一个茶叶种植园土壤(pH 4.5) 中分离到两株 *Acidipila rosea*. *Acidipila rosea* 为革兰氏阴性好氧菌,细胞呈球形或球杆形,营养类型为化能有机营养型;可以在 pH 3.0 ~ 6.0 范围内生存,最适 pH 为 4.5; pH 7.0 时不能生存.

如图 4 所示,放线菌门包括 3 种基因型(占文库

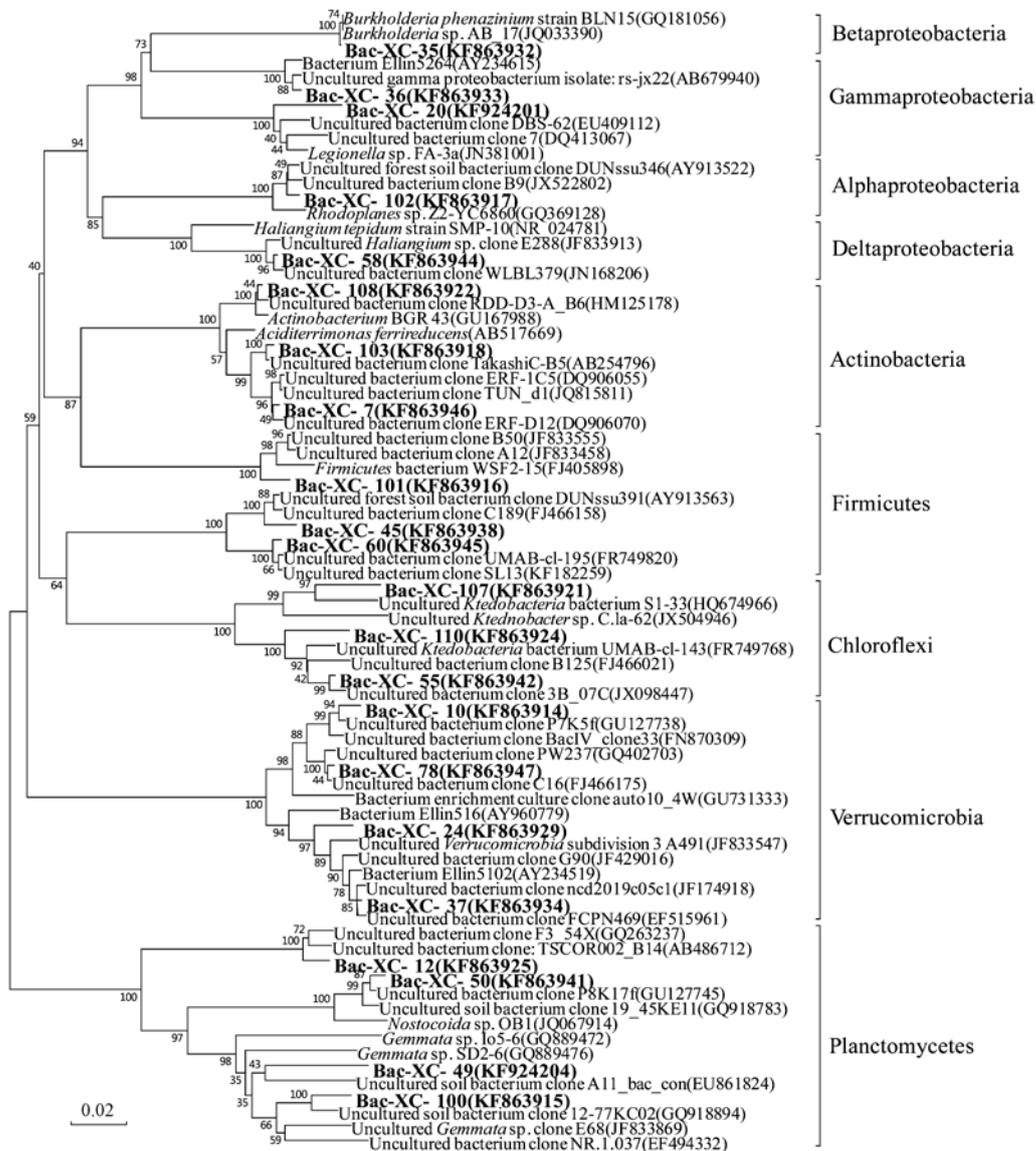


图 4 基于 16S rDNA 序列的其它门细菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of other bacteria in the soil based on 16S rDNA sequences

的 4.0%) 都与 *Aciditerrimonas ferrireducens* 在系统发育树上聚为一簇。 *Aciditerrimonas ferrireducens* 是一种中度嗜热的嗜酸菌, 具有还原铁的能力; 革兰氏染色呈阳性, 可以在 pH 2.0 ~ 4.5, 温度 35 ~ 58°C 的环境中生存, 最适 pH 为 3.0, 最适生长温度为 50°C。 有氧条件下营养类型为化能异养, 无氧环境中为化能自养, 利用三价铁氧化氢获得能量^[37]。

α -变形菌门在本文库中所占比例仅为 6.0%。 其中克隆 Bac-XC-102 (3.0%) 与红游动菌属 (*Rhodoplanes* sp.) Z2-YC6860 在系统发育树上聚为一簇。 红游动菌属细菌为一类紫色非硫细菌; 细胞革兰氏染色呈阴性, 兼性厌氧光能营养型细菌, 细胞含有类胡萝卜素和菌绿素; 该类细菌在黑暗厌氧条件下可以完成反硝化过程进行脱氮^[38]。

2.3.2 古菌多样性以及系统发育分析

经过 RDP 网站的比对分析, 本研究的土壤样品中古菌属于两个类群, 即广古菌门 (Euryarchaeota) 和奇古菌门 (Thaumarchaeota)。 测试的 29 个克隆分属于 14 个操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs), 其中 10 个 OTUs (22 个克隆) 属于奇古菌门, 4 个 OTUs (7 个克隆) 属于广古菌门。 与细菌相比, 古菌多样性明显较低。 通过系统发育分析

发现该土壤样品中古菌与氨氧化作用密切相关。

奇古菌门是 2008 年从中温环境来源的古菌 (温泉古菌) 划分出来的一个新类群^[39]。 古菌文库中归类于奇古菌门的古细菌均与氨氧化作用相关。 奇古菌门的氨氧化古菌分布广泛, 在沉积物、土壤、淡水以及海洋环境中其 *amoA* 含量显著高于氨氧化细菌^[40]。 一些研究运用抑制剂抑制硝化作用结合使用稳定性同位素探测技术 (stable isotope probing, SIP) 等证明了氨氧化古菌在一些自然环境尤其是寡营养环境的硝化作用中起重要作用^[13,39,40]。

奇古菌门中比例最高也是文库中丰度最大的基因型为 Arch-XC-25, 所占比例为 27.6%。 在 GenBank 数据库的比对结果中, 与该克隆亲缘关系最近的均为未培养菌株 (如图 5), 多数检测自土壤和沉积物中; 其中相似度为 99% 的一个序列分离自美国橡树岭 Melton 河支流流域沿岸 pH 为 4.5 的土壤样品。 克隆 Arc-XC-13 在文库中丰度为 13.8%, 与该克隆亲缘关系最近的克隆来自金属矿区 (如铀尾矿) 和酸性泉水。 基因型 Arc-XC-11 和 Arc-XC-27 各包含两个克隆 (丰度为 6.9%), 其余基因型均为单克隆。 与这些基因型相似的序列多分离自酸性红壤、酸性矿山废水、酸性温泉以

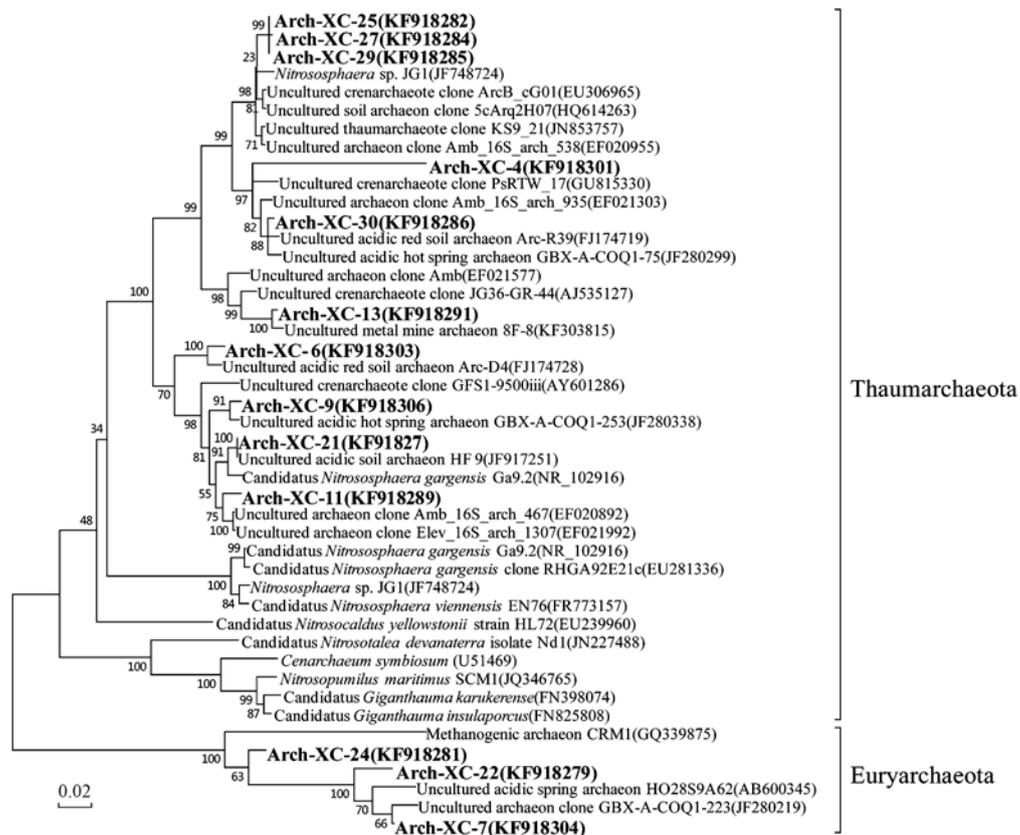


图 5 基于 16S rDNA 序列的古菌系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of archaea in the soil based on 16S rDNA sequences

及植物根际土壤等。在 GenBank 数据库中与本研究中所有古菌基因型相似度在 93% 以上的都为未得到纯培养的古菌的 16S rDNA 序列。而去除未培养古菌的序列后, 本研究中所有古菌的序列类型都与 *Nitrososphaera* (亚硝化球菌属) 亲缘关系最近, 相似度为 81% ~ 87%。*Nitrososphaera* 属的 *Nitrososphaera viennensis* EN76 (维也纳亚硝化球菌) 是第一株分离自土壤环境的氨氧化古菌^[41]; *Nitrososphaera gargensis* (加尔加亚硝化球菌) 分离自俄罗斯加尔加地区的一个温泉, 具有氧化氨的能力, 但是氨浓度超过 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 会抑制其生长^[42]。分离自英格兰酸性土壤 (pH 4.5) 的 *Nitrosotalea devanattera* (阿伯丁土壤亚硝化细杆菌) 是 1 株嗜酸氨氧化古菌, pH 4 ~ 5 时均生长良好, 当 pH > 5.5 时生长会受到抑制; 最适生长温度为 25°C ^[43]。已有研究表明, 在酸性土壤中, AOA 与硝化潜势存在明显正相关关系, 主导氨氧化过程的发生^[43]。本研究土壤也具有类似特点, 氨氧化过程可能主要由氨氧化古菌驱动。

本研究的文库中广古菌门包括 3 种基因型, 其中基因型 Arc-XC-22 丰度最大, 为 13.8%。这 3 种基因型的最相似序列均分离自哥伦比亚安第斯山脉的一个酸性温泉^[44] 和日本箱根大涌谷的一个酸性温泉^[45]。克隆 Arc-XC-3 与数据库序列相似度低于 80%, 可能是广古菌门的新种。广古菌门的所有基因型与在 GenBank 中最相似的菌种均为产甲烷

古菌 (Methanogenic archaea), 相似度均为 82% ~ 84%。产甲烷古菌是一类严格厌氧的仅利用二氧化碳和氢气、甲酸盐、甲醇、甲胺、和/或乙酸盐进行能量代谢并产生甲烷的古菌。这类微生物在全球碳循环中发挥重要作用^[46]。

2.3.3 氨氧化古菌多样性以及系统发育分析

该土壤样品未扩增到氨氧化细菌的 *amoA* 基因片段, 说明样品中不存在氨氧化细菌或氨氧化细菌含量很低。

由古菌文库组成可知本样品中大多数古菌与氨氧化功能相关, 故利用古菌特异性氨单加氧酶引物对 AF 和 AR 扩增氨单加氧酶基因序列, 共得到 39 条有效基因序列。经与 GenBank 数据库中已有序列比对, 发现该土壤样品中多数氨氧化古菌的最相似序列来自酸性红壤、酸性土壤和酸性矿山等与本样品所取条件相似的环境中, 其中多数与已知菌种的相似性都低于 90%, 基因型 AOA-XC-17 和 AOA-XC-19 与 *Nitrosotalea devanattera* (阿伯丁土壤亚硝化细杆菌) 的相似性都为 94%。从氨氧化古菌的系统发育树 (图 6) 可看出, Cluster 3 中的基因型 AOA-XC-1 (文库中丰度为 5.1%), AOA-XC-10 (12.8%), AOA-XC-13 (10.3%), AOA-XC-28 (2.6%), AOA-XC-33 (2.6%) 与数据库中的氨氧化古菌序列相似性都较低, 与已得到纯培养的氨氧化古菌 (全部位于 Cluster 2 中) 亲缘关系较远, 证明该土壤样品中存在 AOA 新类群。



图 6 基于 *amoA* 序列的氨氧化古菌 (AOA) 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of AOA in the soil based on *amoA* sequences

3 讨论

在前期研究中, 笔者利用分子生物学的方法着重研究了取样地的酸性矿山废水库的微生物群落结

构和该区域内废矿石中真核生物的多样性^[17,47]。取样区域 AMD 的 pH 在 3 以下^[17], 周围区域废矿石的 pH 也低于 3^[47]。本研究中的土壤样品受到酸性矿山废水的严重污染。该样品克隆文库中细菌、古菌

序列在数据库中的最相似序列多分离自酸性土壤、酸性沼泽、酸性红壤以及酸性矿山等理化条件相似的环境中。细菌文库中最大的门类为酸杆菌门,在该门类中存在耐酸耐重金属的类群。此外,文库中存在与反硝化作用相关的菌种,如 *Candidatus Koribacter versatilis*、红游动菌属 (*Rhodoplanes* sp.),也存在与铁还原相关的菌种,如 *Aciditerrimonas ferrireducens*,但未发现与氨氧化作用相关的菌种,说明该样品中不存在或存在较少的氨氧化细菌。而在古菌文库中却发现,大部分古菌是与氨氧化作用相关的奇古菌门的成员,且与已得到纯培养的菌种亲缘关系较远。*Nitrosotalea devanattera* 是奇古菌门中唯一一种嗜酸的氨氧化古菌,但是该细菌与本研究所有 AOA 序列的相似性都极低。经建立古菌 *amoA* 克隆文库,同样证实该土壤样品中存在氨氧化古菌,所以取样区域内氨氧化过程主要由氨氧化古菌主导。文库中所得到的 *amoA* 序列与已得到纯培养的氨氧化古菌的 *amoA* 序列相似性均低于 85%,而且其中 5 种基因型与数据库中已有研究的类群亲缘关系较远,在系统发育树上组成一个独立分枝,由此推断该土壤中可能存在未知的氨氧化古菌类群。矿区土壤由于其较低的 pH 和高重金属含量使其具有特殊性,其中所含微生物对低 pH 和重金属耐受性高,为今后矿区土壤以及理化性质相似的污染土壤的原位生物修复提供可靠依据。

4 结论

(1) 取样区域土壤受到酸性矿山废水的严重污染,pH 仅为 2.83,金属 Fe 和 Al 含量都很高。文库中的序列均与酸性环境中检测到的序列具有较高的同源性,证明该土壤中存在大量耐酸以及嗜酸的微生物。

(2) 细菌文库覆盖 11 个类群,酸杆菌门丰度近 50%,第二大门类为疣微菌门,所占比例为 18.9%。古菌文库多样性低,只存在两大门类,分别为奇古菌门和广古菌门,前者占优势地位。

(3) 细菌文库中未发现与氨氧化作用相关的类群,只存在反硝化细菌参与 N 元素的生物地球化学循环。该土壤样品中的氨氧化作用主要由奇古菌门的氨氧化古菌所驱动,且该区域存在氨氧化古菌的新类群。

参考文献:

[1] 王磊,李泽琴,姜磊. 酸性矿山废水的危害与防治对策研究[J]. 环境科学与管理, 2009, 34(10): 82-84.

- [2] Wan M X, Yang Y, Qiu G Z, *et al.* Acidophilic bacterial community reflecting pollution level of sulphide mine impacted by acid mine drainage[J]. Journal of Central South University of Technology, 2009, 16(2): 223-229.
- [3] Cherry D S, Currie R J, Soucek D J, *et al.* An integrative assessment of a watershed impacted by abandoned mined land discharges[J]. Environmental Pollution, 2001, 111(3): 377-388.
- [4] Johnson D B, Hallberg K B. The microbiology of acidic mine waters[J]. Research in Microbiology, 2003, 154(7): 466-473.
- [5] Kirby C S, Thomas H M, Southam G, *et al.* Relative contributions of abiotic and biological factors in Fe(II) oxidizing in mine drainage[J]. Applied Geochemistry, 1999, 14(4): 511-530.
- [6] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria[J]. Advances in Microbial Physiology, 1989, 30: 125-181.
- [7] De Boer W, Gunnewiek P J K, Veenhuis M. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(12): 3600-3604.
- [8] Kowalchuk G A, Stephen J R, De Boer W, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(4): 1489-1497.
- [9] Hermansson A, Lindgren P E. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 972-976.
- [10] 张丽梅,贺纪正. 一个新的古菌类群——奇古菌门 (Thaumarchaeota)[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 411-421.
- [11] Zhang L M, Offire P R, He J Z, *et al.* Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(40): 17240-17245.
- [12] HJ 634-2012, 土壤 氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定 氯化钾溶液提取-分光光度法[S].
- [13] Mehlich A. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1984, 15(12): 1409-1416.
- [14] 狄彩霞,张三粉,莎娜,等. 国标土样在土壤有效磷含量检测和质控中的应用[J]. 中国土壤与肥料, 2013, (1): 100-104.
- [15] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000. 107-240.
- [16] 苏新,陈芳,魏士平,等. 南海北部冷泉区沉积物中微生物丰度与甲烷浓度变化关系的初步研究[J]. 现代地质, 2007, 21(1): 101-104.
- [17] Hao C B, Zhang L N, Wang L H, *et al.* Microbial community composition in acid mine drainage lake of Xiang Mountain sulfide mine in Anhui Province, China[J]. Geomicrobiology Journal, 2012, 29(10): 886-895.
- [18] 何乔. 烃类化合物厌氧降解产甲烷中间代谢产物初探[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013. 16-17.
- [19] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker:

- Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(12): 4704-4712.
- [20] Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(12): 5368-5382.
- [21] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, *et al.* Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(41): 14683-14688.
- [22] Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments[J]. *Bioinformatics*, 2004, **20**(14): 2317-2319.
- [23] 杨长明, 欧阳竹, 杨林章, 等. 农业土地利用方式对华北平原土壤有机碳组分和团聚体稳定性的影响[J]. *生态学报*, 2006, **26**(12): 4148-4155.
- [24] 徐秋芳. 森林土壤活性有机碳库的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004. 28-30.
- [25] Janssen P H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(3): 1719-1728.
- [26] Barns S M, Cain E C, Sommerville L, *et al.* Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(9): 3113-3116.
- [27] Dedysh S N, Pankratov T A, Belova S E, *et al.* Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic Sphagnum peat bog[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(3): 2110-2117.
- [28] Kanokratana P, Chanapan S, Pootanakit K, *et al.* Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2004, **44**(6): 430-444.
- [29] Lee S H, Ka J O, Cho J C. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, **285**(2): 263-269.
- [30] Selenska-Pobell S, Kampf G, Hemming K, *et al.* Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, **79**(2): 149-161.
- [31] Ward N L, Challacombe J F, Janssen P H, *et al.* Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(7): 2046-2055.
- [32] Delavat F, Lett M C, Lièvreumont D. Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches[J]. *Biology Direct*, 2012, **7**: 28.
- [33] Kishimoto N, Kosako Y, Tano T. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment[J]. *Current Microbiology*, 1991, **22**(1): 1-7.
- [34] 曹琳辉. 银山铅锌矿酸性矿坑水微生物群落结构分析[D]. 长沙: 中南大学, 2007. 4-88.
- [35] Liesack W, Bak F, Kreft J U, *et al.* *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds[J]. *Archives of Microbiology*, 1994, **162**(1-2): 85-90.
- [36] Okamura K, Kawai A, Yamada T, *et al.* *Acidipila rosea* gen. nov., sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium belonging to the phylum Acidobacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, **317**(2): 138-142.
- [37] Itoh T, Yamanoi K, Kudo T, *et al.* *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, **61**(6): 1281-1285.
- [38] Himishi A, Ueda Y. *Rhodoplanes* gen. nov., a New Genus of Phototrophic Bacteria Including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, **44**(4): 665-673.
- [39] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, *et al.* Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota* [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, **6**(3): 245-252.
- [40] He J Z, Shen J P, Zhang L M, *et al.* Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(9): 2364-2374.
- [41] Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, *et al.* *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(20): 8420-8425.
- [42] Hatzenpichler R, Lebecleva E V, Spieck E, *et al.* A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, **105**(6): 2134-2139.
- [43] Lehtovirta-Morley L E, Stoecker K, Vilcinskis A, *et al.* Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(38): 15892-15897.
- [44] Bohorquez L C, Delgado-Serrano L, López G, *et al.* In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes [J]. *Microbial Ecology*, 2012, **63**(1): 103-115.
- [45] Kato S, Itoh T, Yamagishi A. Archaeal diversity in a terrestrial acidic spring field revealed by a novel PCR primer targeting archaeal 16S rRNA genes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, **319**(1): 34-43.
- [46] Thauer R K, Kaster A K, Seedorf H, *et al.* Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, **6**(8): 579-591.
- [47] 李思远, 郝春博, 王丽华, 等. 酸性矿山废水区域废矿石中真核生物多样性分析[J]. *环境科学*, 2013, **34**(10): 4105-4111.

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 Qiyi 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 Flex	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