ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第36卷 第5期

Vol.36 No.5

2015

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

中国期刊方阵 双奖期刊 中华人民共和国新闻出版总署

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第36卷 第5期
2015年5月15日

目 次

深圳大气颗粒物中卤代多环芳烃污染研究 …… 孙建林,常文静,陈正侠,曾辉(1513)
北京市典型餐饮企业VOCs排放特征研究 …… 崔彤,程婧晨,何万清,任培芳,聂磊,徐东耀,潘涛(1523)
2006~2010年珠三角地区SO_2特征分析 …… 李菲,谭浩波,邓雪娇,邓涛,徐婉筠,冉靓,赵春生(1530)
环境空气$PM_{2.5}$连续监测系统手工采样比对测试 …… 王强,钟琪,迟颖,张杨,杨凯(1538)
燃煤电厂可凝结颗粒物的测试与排放 …… 裴冰(1544)
南海水域不同深度非光合微生物的固碳潜能及其对不同电子供体的响应 …… 方峰,王磊,席雪飞,胡佳俊,付小花,陆兵,徐殿胜(1550)
基于GOCI影像和水体光学分类的内陆湖泊叶绿素a浓度遥感估算 …… 冯驰,金琦,王艳楠,赵丽娜,吕恒,李云梅(1557)
贵州清水江流域丰水期水化学特征及离子来源分析 …… 吕婕梅,安艳玲,吴起鑫,罗进,蒋浩(1565)
东莞石马河流域水化学特征时空差异及来源辨析 …… 高磊,陈建耀,王江,柯志庭,朱爱萍,许凯(1573)
河南鸡冠洞洞穴水对极端气候的响应及其控制因素研究 …… 刘肖,杨琰,彭涛,赵景耀,任小凤,张银环,聂旭东,李建仓,凌新有,张志钦(1582)
石漠化治理对岩溶地下水水化学和溶解无机碳稳定同位素的影响 …… 肖时珍,熊康宁,蓝家程,张晖,杨龙(1590)
旱季不同土地利用类型下岩溶碳汇效应差异 …… 赵瑞一,梁作兵,王尊波,于正良,江泽利(1598)
有机氯农药在岩溶区上覆土壤中的垂直迁移特征及对地下水的影响 …… 孙玉川,王永啟,梁作兵,袁道先(1605)
山东南四湖沉积物中汞的污染现状及迁移研究 …… 曹霏霏,杨丽原,庞绪贵,王炳华,王云倩(1615)
摇蚊幼虫扰动下沉积物微环境和微界面对物理扰动强度的响应 …… 史晓丹,李勇,李大鹏,王忍,邓猛,黄勇(1622)
南方红壤区氮湿沉降特征及其对流域氮输出的影响 …… 郝卓,高扬,张进忠,徐亚娟,于贵瑞(1630)
不同紫色母岩对景观水体氮磷及有机物去除的影响 …… 黄雪娇,刘晓晨,李振轮,石纹豪,杨珊(1639)
荔枝落叶对铜绿微囊藻生长和光合作用的影响 …… 汪小雄,姜成春,李锦卫,汪晓军(1648)
黄连根茎浸提物对绿藻的毒理作用 …… 陈亚楠,袁玲(1655)
饮用水中消毒副产物1,1-二氯丙酮的形成机制 …… 丁春生,孟壮,徐洋洋,缪佳(1662)
水中利谷隆氯化降解动力学和消毒副产物生成特性 …… 凌晓,胡晨燕,程明,谷建(1668)
化学消毒的中和剂对水中内毒素活性检测的影响 …… 张灿,刘文君,史云,安代志,白淼,徐稳(1674)
牛粪生物炭对水中氨氮的吸附特性 …… 马锋锋,赵保卫,刁静茹,钟金魁,李安邦(1678)
丁二酸改性茶油树木屑吸附铀的研究 …… 张晓峰,陈迪云,彭燕,刘永胜,熊雪莹(1686)
SPG膜表面润湿性对膜污染和化学耐受性的影响 …… 张静,肖太民,张晶,曹丽亚,杜亚威,刘春,张磊(1694)
TiO_2诱导下左旋氧氟沙星的可见光降解及其机制 …… 郭宏生,刘亚楠,乔琪,魏红,董呈幸,薛洁,李克斌(1700)
新型高分子絮凝剂对废水中Cr(Ⅵ)的捕集性能 …… 王刚,杜凤龄,常青,徐敏(1707)
基于OUR-HPR测量在线估计活性污泥合成PHA量 …… 曾善文,王泽宇,高敬,刘东,张代钧,卢培利(1713)
分离高浓度污泥产酸发酵液的自生动态膜形成机制 …… 黄帅,刘宏波,殷波,马惠君,符波,刘和,白洁(1720)
通风强度对市政污泥生物干化中试效果的影响 …… 张喻,韩融,陆文静,王洪涛,明中远,王强,夏伟(1727)
生物可降解螯合剂谷氨酸*N*,*N*-二乙酸四钠对污泥中重金属萃取效率的研究 …… 吴青,崔延瑞,汤晓晓,杨慧娟,孙剑辉(1733)
百乐克(BIOLAK)活性污泥宏基因组的生物多样性及功能分析 …… 田美,刘汉湖,申欣,赵方庆,陈帅,姚永佳(1739)
异养硝化-好氧反硝化菌YL的脱氮特性 …… 梁贤,任勇翔,杨垒,赵思琪,夏志红(1749)
菌株*Arthrobacter* sp. CN2降解对硝基苯酚的特性与动力学 …… 任磊,史延华,贾阳,姚雪松,Ruth Nahurira,弥春霞,闫艳春(1757)
短短芽胞杆菌及其芽胞对茚的降解 …… 刘芷辰,叶锦韶,彭辉,刘则华,邓庭进,尹华,廖丽萍(1763)
垃圾填埋场抗生素抗性基因初探 …… 李蕾,徐晶,赵由才,宋立岩(1769)
不同构型人工湿地基质中土著菌的耐药性及整合子丰度调查 …… 麦晓蓓,陶然,杨扬,张敏,林剑华,满滢(1776)
硝酸盐和甲烷对覆土中苯系物厌氧氧化的影响 …… 柳蓉,龙焰,王立立,何婷,叶锦韶(1785)
山西高原落叶松人工林土壤呼吸的空间异质性 …… 严俊霞,李洪建,李君剑,武江星(1793)
施氮对黄土旱塬区春玉米土壤呼吸和温度敏感性的影响 …… 姜继韶,郭胜利,王蕊,刘庆芳,王志齐,张彦军,李娜娜,李如剑,吴得峰,孙棋棋(1802)
宣威街道尘中重金属的分布特征及其健康风险评估 …… 张文超,吕森林,刘丁彧,刘品威,米持真一,王效举,王青躍(1810)
宝鸡市街道尘埃磁学特征空间分布及环境意义 …… 张俊辉,王瑾,张健,房妮,夏敦胜(1818)
长期施肥下浙江稻田不同颗粒组分有机碳的稳定特征 …… 毛霞丽,陆扣萍,孙涛,张小凯,何丽芝,王海龙(1827)
矿区植被恢复方式对土壤微生物和酶活性的影响 …… 李君剑,刘峰,周小梅(1836)
三江平原典型湿地类型土壤微生物特征与土壤养分的研究 …… 肖烨,黄志刚,武海涛,吕宪国(1842)
钠盐类型对表面活性剂清洗煤油污染土壤的强化效应 …… 黄昭露,陈泉源,周娟,谢墨函(1849)
石油污染土壤的生物修复技术及微生物生态效应 …… 杨茜,吴蔓莉,聂麦茜,王婷婷,张明辉(1856)
可生物降解螯合剂GLDA诱导东南景天修复重金属污染土壤的研究 …… 卫泽斌,陈晓红,吴启堂,谭蒙(1864)
绿洲土Pb-Zn复合胁迫下重金属形态特征和生物有效性 …… 金诚,赵转军,南忠仁,王胜利,武文飞,王厚成(1870)
硫素对水稻根系铁锰胶膜形成及吸收镉的影响 …… 王丹,李鑫,王代长,饶伟,杜光辉,杨军,化党领(1877)
臭氧对几种楠木气体交换参数的影响 …… 李苗苗(1888)
某货车侧翻水污染事件的环境损害评估方法探索 …… 蔡锋,赵士波,陈刚才,鲜思淑,杨清玲,周贤杰,余海(1902)
《环境科学》征订启事(1543) 《环境科学》征稿简则(1756) 信息(1667,1726,1809,1848)

石油污染土壤的生物修复技术及微生物生态效应

杨茜,吴蔓莉*,聂麦茜,王婷婷,张明辉
(西安建筑科技大学环境与市政工程学院,西安 710055)

摘要: 利用投菌法和生物刺激法对陕北子长石油污染土壤进行微生物修复研究. 通过利用红外分光光度法测定不同处理方法对石油烃的去除效果确定了修复陕北石油污染土壤的最佳方案. 修复过程中利用最大可能计数法(MPN)、PCR-琼脂糖电泳法、PCR-DGGE 法分别测定了石油烃降解菌数目、催化基因、土壤微生物多样性对土壤微生物生态效应进行研究. 结果发现石油污染土壤不同生物处理修复效果为: 生物刺激(加入 N、P 营养物质) > 生物强化(投加降解菌) > 其他. 土壤中石油烃降解率与可降解石油烃的催化基因含量之间存在正相关关系,修复过程中土壤中的石油烃和烷烃降解菌数量显著多于多环芳烃降解菌数量,投加外源降解菌 SZ-1 可以显著提高土壤细菌群落的多样性. 研究结果有助于深入理解生物修复石油土壤过程中的微生物生态效应变化.

关键词:石油污染土壤; 微生物修复; 催化基因; 土壤微生物群落多样性; 最大可能计数法(MPN); PCR-DGGE
中图分类号: X53 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2015)05-1856-08 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.2015.05.047

Effects and Biological Response on Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil

YANG Qian, WU Man-li*, NIE Mai-qian, WANG Ting-ting, ZHANG Ming-hui
(School of Environmental & Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: Bioaugmentation and biostimulation were used to remediate petroleum-contaminated soil which were collected from Zichang city in North of Shaanxi. The optimal bioremediation method was obtained by determining the total petroleum hydrocarbon(TPH) using the infrared spectroscopy. During the bioremediation, number of degrading strains, TPH catabolic genes, and soil microbial community diversity were determined by Most Probable Number(MPN), polymerase chain reaction(PCR) combined agarose electrophoresis, and PCR- denaturing gradient electrophoresis(DGGE). The results in different treatments showed different biodegradation effects towards total petroleum hydrocarbon (TPH). Biostimulation by adding N and P to soils achieved the best degradation effects towards TPH, and the bioaugmentation was achieved by inoculating strain SZ-1 to soils. Further analysis indicated the positive correlation between catabolic genes and TPH removal efficiency. During the bioremediation, the number of TPH and alkanes degrading strains was higher than the number of aromatic degrading strains. The results of PCR-DGGE showed microbial inoculums could enhance microbial community functional diversity. These results contribute to understand the ecologically microbial effects during the bioremediation of petroleum-polluted soil.

Key words: petroleum contaminated soil; bioremediation; catabolic genes; soil microbial community diversity; most probable number (MPN); PCR-DGGE

石油主要由烷烃、芳香烃及环烷烃组成,此外还有少量的非烃类化合物. 在石油的开采、运输及使用过程中由于泄漏导致了各种环境污染[1,2]. 石油黏着力强,进入土壤后一方面会影响土壤中的微生物组成和结构,另一方面,会阻碍植物根系呼吸及对营养的吸收,导致植物生长不良甚至死亡[3]. 石油中的有害物质可以通过食物链进入人体,直接危害人体健康,尤其是多环芳烃类物质具有致癌、致畸、致突变等作用[4]. 微生物修复法由于操作简便费用低、对周围环境污染小、基本不产生二次污染等优势,成为土壤石油污染修复的重要技术[5~7].

目前,很多研究者致力于筛选高效石油降解菌对油污土壤进行生物修复的研究,文献[8~15]从不同石油污染土壤中筛选不同的高效石油降解菌、烷烃降解菌并对土壤进行修复研究; 也有学者对石油污染土壤的修复机制进行研究,王莉丽等[16]利用降解菌研究油污土壤中可溶性有机物的变化; 文献[17~20]则对降解菌表面活性剂进行研究. 本文利用投菌法和生物刺激法对石油污染土壤进行修复,并对修复过程中催化基因、降解菌数目变化以及油污土壤菌群多样性与微生物修复效果之间的相关性进行了实验研究.

收稿日期: 2014-10-03; **修订日期**: 2014-12-10
基金项目: 国家自然科学基金项目(51278405); 国家环境保护环境微生物利用与安全控制重点实验室开放基金项目(MARC2013D007); 陕西省教育厅重点实验室科研计划项目(13JS048); 榆林市科技局计划项目(K03259)
作者简介: 杨茜(1987~),女,硕士,主要研究方向为环境污染与生物修复技术,E-mail:Lsp19871104@163.com
* 通讯联系人,E-mail:447005853@qq.com

1　材料与方法

1.1　供试土壤及石油烃降解菌

取陕北子长县某油井周围石油污染土壤，过 20 目筛并混合搅拌均匀，作为石油污染降解修复供试土壤. 利用 Bush-hass 培养基从土壤中分离筛选出的石油烃降解菌 SZ-1(不动杆菌属) 为接种菌对土壤进行修复研究. 土壤理化性质测定、菌株分离及菌株理化性质测定见文献[21].

1.2　培养基及试剂

牛肉膏蛋白胨培养基制备方法见文献[22]；Bush-hass 培养基、1.2% 琼脂糖凝胶、50 × TAE 缓冲液、PBS 缓冲溶液的制备方法见文献[21]；土壤 DNA 提取试剂盒：PowerSoil DNA Isolation Kit，美国 MOBIO 公司；克隆试剂盒：PMD19T，TAKARA 公司；混合 PAHs 溶液：菲 10 g，蒽 1 g，芘 1 g，二苯并噻吩 1 g，用二氯甲烷溶解并定容到 1 L[23]；碘代硝基四唑兰 (INT)(3 g·L^{-1}) 溶液：准确称取碘代硝基四唑兰粉末 3 g，用灭菌纯水定容至 1 L；1.5% 的琼脂糖凝胶：量取 1 × TAE 缓冲液 50 mL 置于 250 mL 锥形瓶中，取琼脂糖粉 0.75 g 加入到缓冲液中，锡纸封住瓶口，微波炉中火加热 2 min 使得琼脂糖粉完全溶解.

1.3　石油污染土壤微生物修复实验方案

分别称取 500 g 供试土壤分装于圆形瓷盆，按表 1 所示方案对土壤进行 8 周的生物修复处理，修复期间每天均匀翻动土壤保持透气性.

表 1　石油污染土壤微生物修复处理方案[1)]

Table 1　Bioremediation treatments of petroleum contaminated soil

修复处理编号	土壤修复处理方案
1	自然状态供试土壤 + 灭菌纯水(土壤含水率 40%)
2	灭菌供试土壤 + 灭菌纯水(土壤含水率 40%)
3	自然状态供试土壤 + SZ-1 菌悬液 + 灭菌纯水(土壤含水率 40%)
4	自然状态供试土壤 + 氮磷营养液(土壤 C∶N∶P = 100∶10∶1) + 灭菌纯水(土壤含水率 40%)
5	自然状态供试土壤 + SZ-1 菌悬液 + 氮磷营养(土壤 C∶N∶P = 100∶10∶1) + 灭菌纯水(土壤含水率 40%)
6	灭菌供试土壤 + SZ-1 菌悬液 + 灭菌纯水(土壤含水率 40%)

1)灭菌土壤采用 0.103 MPa，121℃，加压蒸汽灭菌 1 h；SZ-1 菌悬液：接种菌悬液(D_{620} = 2.0 的菌悬液 20 mL)于供试土壤中，保证供试土壤中降解菌个数达到 10^9 个·g^{-1}；土壤 C∶N∶P = 100∶10∶1[24] [分别加入 $(NH_4)_2SO_4$ 和 KH_2PO_4 各 19.6 g·kg^{-1} 和 0.9 g·kg^{-1}]；保持 40% 土壤含水率(加灭菌纯水 187.5 mL)

1.4　不同修复处理土壤中石油烃的测定方法

取以上不同处理的土壤样品，风干研磨后，分别准确称取 1 g 各处理土样于称量瓶中，加入 25 mL 四氯化碳，利用超声波细胞粉碎机(JY92-Ⅱ，美国 SONICS)超声萃取 15 min，功率为 170 W. 重复萃取两次，过滤后收集滤液于 50 mL 容量瓶中，定容，每个样品做 3 个平行. 利用 OCMA-350 红外测油仪测定土壤中石油烃.

1.5　土壤中催化基因的测定方法

利用土壤 DNA 提取试剂盒提取 1、3、4 号土壤样品 DNA. 采用 5 倍系列稀释法将提取的土壤 DNA 稀释. 查找文献得到可降解链烷烃和可降解芳烃的催化基因引物[包括 2 种芳烃催化基因①(nahAcfor/nahAcrew)α-亚基萘双加氧酶基因、②(AJ025/AJ026)α-亚基环羟基双加氧酶基因和 2 种烷烃催化基因、③(alk-3F/alk-3R)链烷烃羟化酶基因、④(alkFa/aklRa) 链烷烃单加氧酶基因]，其引物碱基序列、PCR 扩增程序以及基因检测方法见文献[21,25~28].

1.6　土壤中降解菌数目测定方法(MPN 法)

分别称取 1 g 的 1、3、4 号土壤，加入 9 mL PBS 缓冲溶液，摇匀. 30℃，130 r·min^{-1}，振荡培养 30 min，取上清液进行 10 倍系列稀释，依次获得 10^1、10^2、…、10^{10} 土壤稀释液. 分别以石油烃(取自陕北某油田)，正十六烷及混合 PAHs 溶液为 MPN 底物. 按文献所述的方法测定石油烃降解菌、烷烃降解菌和多环芳烃降解菌的数目[23].

1.7　土壤微生物群落分析方法(PCR-DGGE)

利用土壤 DNA 提取试剂盒提取土壤样品的 DNA.

利用细菌通用引物对 338F/518R (5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′)/(5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′)对土壤 DNA 进行 PCR 扩增，50 μL PCR 反应体系配置：22 μL ddH_2O，25 μL 2 × Go *Taq* 酶，2 μL 引物 F，2 μL 引物 R. PCR 反应升温程序：94℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，57℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，重复 30 个循环，最后 72℃再延伸 7 min. PCR 扩增产物利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行

检测[29].

检测条带清晰无拖尾表示扩增结果良好,将PCR扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析. DGGE程序为:丙烯酰胺凝胶浓度10%,变性梯度范围40% ~60%,PCR产物上样量为10 μL. 60℃,60V条件下运行15 h. 电泳结束用Gelred染色1 h,利用基因成像系统捕获图像并利用Quantity one软件(Quantity one-4.6.2)分析DGGE图像,切割DGGE条带,利用PMD19T载体试剂盒(PMD19T,TAKARA公司)进行克隆测序分析.

2 结果与分析

2.1 不同修复处理土壤中石油烃去除效果

不同生物处理对土壤石油烃的去除效果如图1所示. 本次针对陕北子长某油井周围石油污染土壤修复实验中,生物刺激(添加氮磷营养的4、5号处理)对石油污染土壤的修复效果最好,修复8周时对石油烃去除率分别达到59.7%和57.5%;其次为生物强化处理修复的土壤(投加外源菌的3、6号处理),修复8周时对石油烃去除率达到33%左右;但是在自然条件下,保持土壤含水率为40%时(1号处理)以及灭菌处理(2号处理)对土壤的修复效果均不明显. 由以上结果可知,本次修复过程中土著菌对石油烃的降解效果较差,而在不添加氮磷营养时,外源菌比土著菌的环境适应性更强,石油烃去除效果更明显. 研究结果表明在修复土壤时,只有在碳氮磷比适宜条件下土著菌才能有效降解石油烃,而外加降解菌进行生物强化也可以对该土壤起到一定的修复作用.

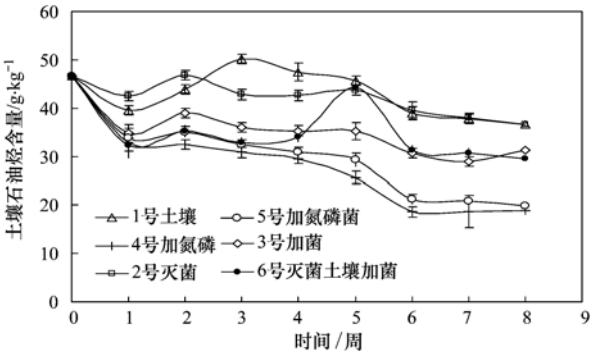


图1 不同修复处理石油污染土壤中石油烃含量

Fig. 1 TPH of different treatment soils

2.2 土壤中可降解石油烃的催化基因测定结果

对1、3和4号土壤中可降解烷烃和多环芳烃的催化基因进行测定,结果如表2所示.

修复前(第0周,即生物修复未开始时),油污土壤中只含有AJ025/AJ026引物、alkFa/aklRa引物控制的基因. 随修复时间增加,这两种引物控制基因呈现出先增加后稳定或者降低的趋势. 且3号处理中AJ025/AJ026引物基因数量明显多于其他两种处理. 根据以前的研究工作可知菌株SZ-1含有AJ025/AJ026引物控制的基因[26],由此推断,3号处理土壤中增加的该引物基因是由于投加外源菌SZ-1引起的.

在微生物修复初期(第1周),AJ025/AJ026控制降解芳烃的催化基因含量增加较快,并且1、3号处理出现新的nahAcfor/nahAcrew可降解芳烃的催化基因;在修复期(2 ~7周时),alkFa/aklRa控制降解烷烃的催化基因含量增加较快,同时检测到新的alk-3F/alk-3R可降解烷烃催化基因. 研究表明,

表2 生物修复土壤基因检测结果1)

Table 2 Catabolic genes in different treatment soils

项目	目的催化基因	时间/周				
		0	1	2	6	7
1号处理(土壤)	①(nahAcfor/nahAcrew)	—	++	++	—	—
	②(AJ025/AJ026)	+	+++	+++	++	++
	③(alk-3F/alk-3R)	—	—	++	+++	+++
	④(alkFa/aklRa)	+	+	++	+++	+
3号处理(土壤加不动杆菌SZ-1)	①(nahAcfor/nahAcrew)	—	++	—	—	—
	②(AJ025/AJ026)	+++	+++	++	++	—
	③(alk-3F/alk-3R)	—	—	+	+++	++
	④(alkFa/aklRa)	+	+	+++	—	+++
4号处理(土壤加N、P营养)	①(nahAcfor/nahAcrew)	—	—	—	—	—
	②(AJ025/AJ026)	+	+++	+++	+	++
	③(alk-3F/alk-3R)	—	—	+++	++++	+++
	④(alkFa/aklRa)	+	++	++++	+++	+++

1)"—"表示无控制该引物的基因存在,"+"表示存在该引物控制的基因,"+"的个数表示DNA的稀释倍数,如:"+"表示在稀释倍数5^1时可以检测到该基因,"++"表示稀释倍数为5^2时该基因仍可以检测出,以此类推

在微生物修复过程中，可降解芳烃的催化基因种类和数量有先增加后减少的趋势，可降解烷烃的催化基因的种类和数量呈明显增加趋势.

2.3　石油烃、烷烃、多环芳烃降解菌数目的测定结果

1、3、4 号土壤中石油烃、烷烃、多环芳烃降解菌数的测定结果如图 2 ~4 所示.

由图 2、3、4 可知，4 号处理中石油烃、烷烃、多环芳烃降解菌数目增加幅度均最大，并且石油烃和烷烃降解菌数目可达 10^5 CFU·mL^{-1}以上，多环芳烃降解菌数目最多可达到 10^2 CFU·mL^{-1}. 在石油污染土壤修复过程中石油烃和烷烃降解菌个数明显多于多环芳烃降解菌.

根据图 5 可知，修复后期 4 号处理中总降解菌数远远多于其他两种处理土壤中的总降解菌，并且不同处理中总降解菌数目呈现修复期（第 0 ~6 周）先减少后增加，修复后期（第 7 周）减少的变化规律. 土壤中总降解菌数目变化趋势与土壤中石油烃去除效果变化规律一致，由此可以看出，不同的生物修复处理可以促进油污土壤中总降解菌数的增多，土壤中降解菌数目越多，降解菌用于合成自身生长所需物质、加快生物新陈代谢所需要利用的唯一碳源石油烃量更多，从而使得土壤中剩余石油烃量减少，对石油烃去除效果越好.

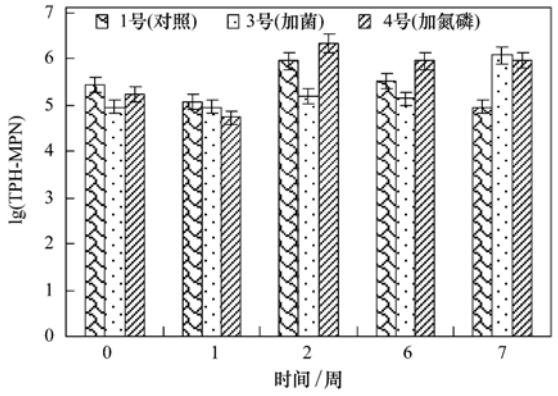


图 2　不同处理土壤中石油烃降解菌数

Fig. 2　Number of TPH degrading bacteria in different treatment soil

2.4　土壤微生物群落分析结果

提取 1、3、4 号处理土壤 DNA，利用细菌通用引物对 338F/518R 进行 PCR 扩增，结果如图 6 所示，扩增条带清晰明亮，未出现非特异性扩增，扩增片段约 180 bp，扩增过程未污染. 继续对其进行 PCR-DGGE 分析，结果如图 7 所示.

由图 7（PCR-DGGE 图谱）可以看出，空白对照（CK）中主要条带数目为 7 ~9 条；与空白对照（CK）相比，在修复第 1 周时 3 种处理土壤中的条带数变化不大（泳道 A、B、C），而修复 2 ~7 周，修复土壤中条带数目明显增多（泳道 D ~L），菌群结构变化较大.

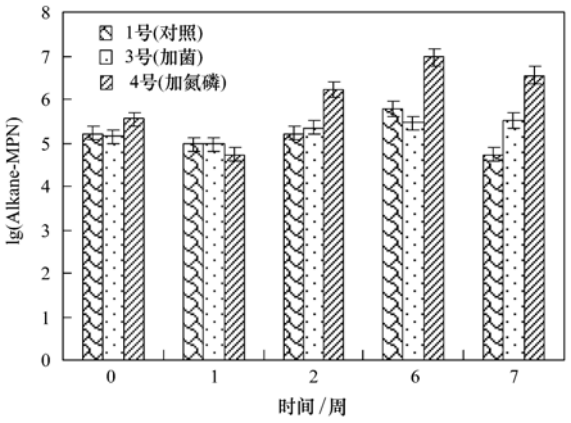


图 3　不同处理土壤中烷烃降解菌数

Fig. 3　Number of alkane degrading bacteria in different treatment soils

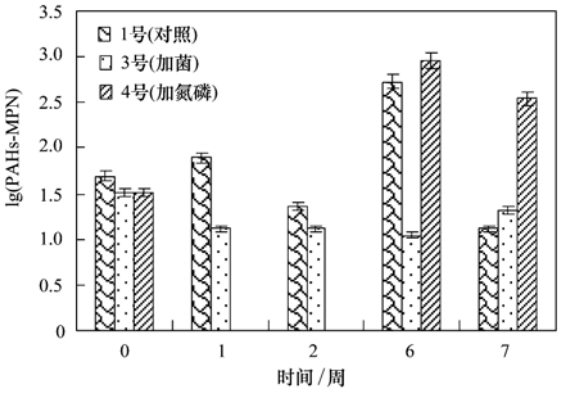


图 4　不同处理土壤中多环芳烃降解菌数

Fig. 4　PAHs degrading bacteria in different treatment soils

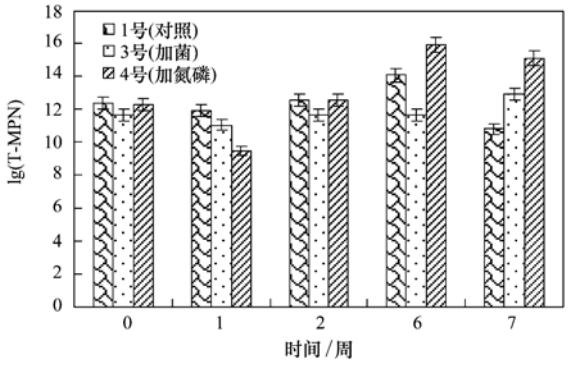
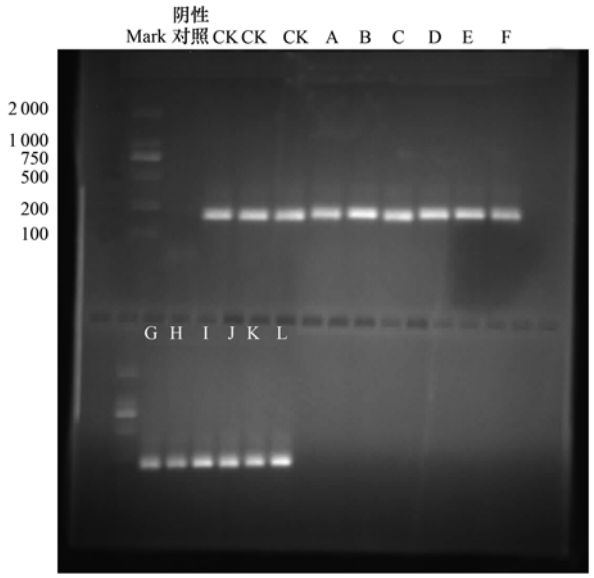


图 5　不同处理土壤中总降解菌数

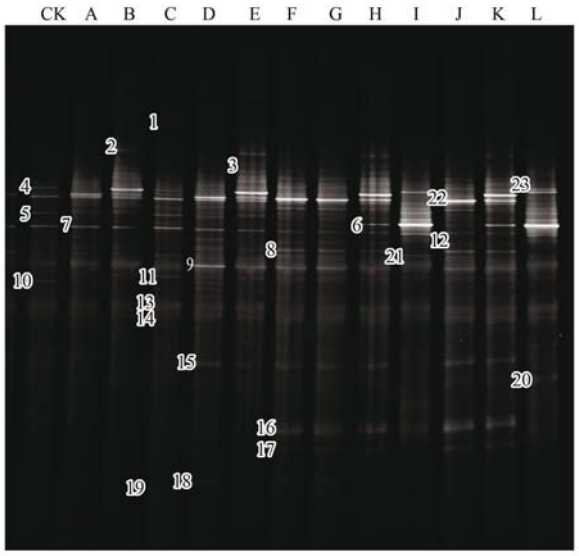
Fig. 5　Total TPH degrading bacteria in different treatment soils



泳道 CK：空白对照，第 0 周不做处理的石油污染土壤，切割条带：4、5、10；泳道 A、D、G、J：1 号（土壤）处理第 1、2、6、7 周修复土壤，切胶条带：7、9、12、15、18、22；泳道 B、E、H、K：3 号（土壤加菌 SZ-1）处理第 1、2、6、7 周修复土壤，切胶条带：2、3、6；泳道 C、F、I、L：4 号（土壤加氮磷）处理第 1、2、6、7 周修复土壤，切胶条带：1、8、11、13、14、16、17、19、20、21、23

图 6 PCR 扩增产物电泳

Fig. 6 Profiles of PCR



图注同图 6

图 7 PCR 扩增产物变性梯度凝胶电泳图谱

Fig. 7 Profiles of DGGE

对 3 号处理第 1、2、6、7 周（对应 B、E、H、K 泳道）时的条带 2 进行切割并克隆测序，结果发现该条带属于不动杆菌属，Blast 比对结果表明条带 2 与降解菌 SZ-1 的相似度超过 99%，因此可初步断定该条带有可能是外加降解菌 SZ-1.

利用 Quantity one 软件对 DGGE 泳道主条带的 DNA 浓度进行定量分析（trace quantity），结果如图 8 所示. 修复 1 周时，与空白对照相比（CK），不同处理的土壤样品中 DNA 浓度变化不大（泳道 A、B、C），但是随修复时间的增加，不同处理的土壤中条带 DNA 总浓度基本上呈增加趋势.

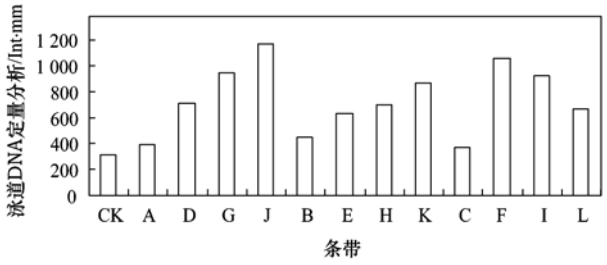


图 8 DGGE 泳道条带定量分析结果

Fig. 8 Results for band trace quantity

对 DGGE 图谱进行聚类分析（cluster analysis）的结果如图 9 所示. 修复 1 周时，土壤的菌群结构与修复前相比，变化不大. 当修复进行 2 周后，菌群结构变化较大，且相同处理的土壤在不同修复时期的菌群结构相似度较高.

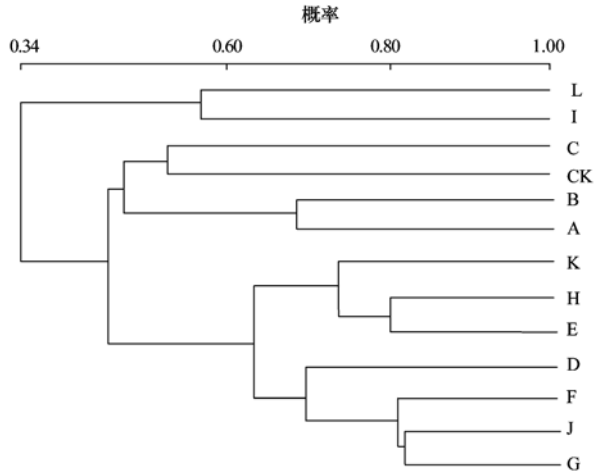


图 9 PCR-DGGE 图谱的 UPGAMA 聚类分析结果

Fig. 9 Results of cluster analysis

根据泳道条带定量分析（trace quantity）结果计算细菌群落结构多样性指标辛普森指数（Simpson's diversity index, D）[公式（1）]和香农指数（Shannon diversity index, H）[公式（2）]，结果如表 3 所示.

$$D = 1 - \sum_{i-1}^{S} P_i^2 \quad (1)$$

$$H = - \sum_{i=1}^{S} P_i \log_2 P_i \quad (2)$$

式中，P_i 指第 i 个条带强度与泳道上所有条带总强度的比值.

从表 3 中可知，与原油污土壤相比，修复土壤中香农指数和辛普森指数都有增大的趋势，说明在修复的前 6 周对油污土壤进行不同修复处理均可以使细菌群落多样性增加；而在第 7 周时土壤的群落多样性开始降低. 结合石油烃去除效果可知，土壤中细菌群落多样性结构越复杂，对石油烃的降解效果相对越好.

表 3　不同处理土壤的香农指数和辛普森指数

Table 3　Results of Simpson's and Shannon diversity index

项目	时间/周	香农指数（H）	辛普森指数（D）
空白对照(lane CK)		2.86	0.82
1 号处理(土壤)	1	2.42	0.74
	2	2.82	0.78
	6	3.21	0.84
	7	3.00	0.83
3 号处理(土壤加不动杆菌 SZ-1)	1	2.95	0.84
	2	3.24	0.87
	6	3.53	0.89
	7	3.33	0.88
4 号处理(土壤加 N、P 营养)	1	3.02	0.86
	2	3.05	0.83
	6	2.80	0.80
	7	2.56	0.75

3 号处理中的香农指数和辛普森指数最大. 说明向油污土壤投加降解菌 SZ-1 可以显著提高土壤细菌群落的多样性，但生物强化对该种土壤中石油烃的去除效果却低于生物刺激.

切割 DGGE 条带克隆培养测序，序列信息输入 NCBI 数据库进行 BLAST 比对，并申请菌种序列号，比对结果如表 4 所示. 根据 16SrRNA 序列检测结果进行系统发育树分析，分析结果如图 10 所示. 由表 4 可知，在 3 号处理不同时期土壤样品中多次出现条带 2、3、23，经检测其分别属于不动杆菌属(条带 2、23)、产甲烷原核微生物(条带 3)，并且条带 2 仅在 3 号处理土壤中出现. 在 4 号处理中除了检测到的共有条带外，还多次出现条带 21、23，序列分析发现二者属于不动杆菌属. 因此可知修复处理编号为 3、4 号的处理中不动杆菌活性较强，为优势菌群.

根据图 10 可知，检测出的微生物总体分为八大类群：不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、副球菌属(*Paracoccus*)、变形菌门(Proteobacterium)、黄杆菌属(*Flavobacteriaceae*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、放线菌(*Actinobacterium*). 其中，条带 2 和条带 12 亲缘性较近(98%)，条带 4 与 JX624259 假单胞菌属(100%)、条带 1 与 JQ400417

表 4　DGGE 条带 16S rRNA 序列分析

Table 4　16S rRNA sequence analysis results of DGGE bands

DGGE 条带编号	种属	数据库进入序列号	序列相近的微生物	相似度/%
1	*Bacillus lentus*	KJ481836	KF378647	100
2	*Acinetobacter* sp.	KJ481837	KF453955	94
3	*Methanogenic prokaryote*	KJ481838	KC821450	98
4	*Pseudomonas* sp.	KJ481839	JX624259	100
5	Uncultured α-Proteobacterium	KJ481840	JN409106	91
6	Uncultured Moraxellaceae bacterium	KJ481841	JN038240	99
7	*Sphingomonas* sp.	KJ481842	KF830230	100
8	Uncultured *Salinimicrobium* sp.	KJ481843	KF859581	99
9	Uncultured *Pseudomonas* sp.	KJ481844	EU755103	98
10	Uncultured *Gemmatimonas* sp.	KJ481845	JQ400417	96
11	*Pseudomonas* sp.	KJ481846	AB628746	98
12	*Acinetobacter* sp.	KJ481847	KF453955	100
13	*Geodermatophilus* sp.	KJ481848	X92363	99
14	Uncultured *Acinetobacter* sp.	KJ481849	AB908751	99
15	*Paracoccus marcusii*	KJ481836	KF856725	100
16	*Sphingosinicella* sp.	KJ481837	KF877719	100
17	*Sphingomonas* sp.	KJ481838	KF777648	99
18	*Mycobacterium* sp.	KJ481839	KF663791	99
19	Uncultured *Actinomyces*	KJ481840	JX442917	95
20	Uncultured Prokaryote	KJ481841	KC337096	98
21	*Acinetobacter* sp.	KJ481842	KF663060	100
22	Uncultured Moraxellaceae bacterium	KJ481843	JN038240	99
23	*Acinetobacter* sp.	KJ481844	KF792192	99

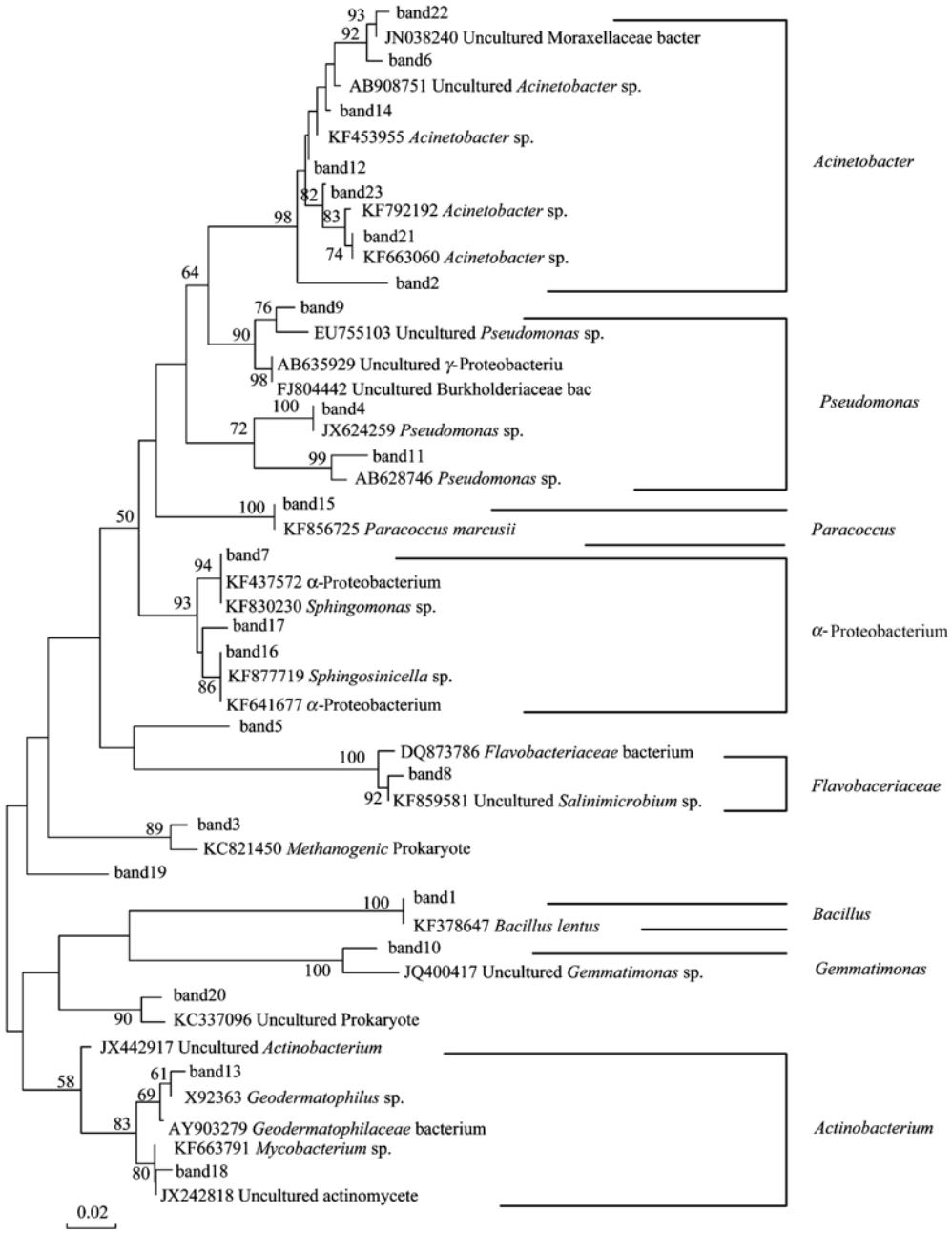


图 10 DGGE 条带系统发育树

Fig. 10 Phylogenetic tree of DGGE

芽单胞菌属(100%)、条带 15 与 KF856725 副球菌属(100%)几乎为同一种属,条带 11 与 AB628746 的假单胞菌的亲缘性较近(99%).

3 结论

(1)陕北子长石油污染土壤样品修复效果由好到差的顺序依次为:向土壤中补充 N、P 营养物质 > 向土壤中投加不动杆菌 SZ-1 > 其他处理. 土著菌只有在碳氮磷比适宜条件下才能有效降解石油烃;外源菌 SZ-1 比土著菌环境适应性强,能有效地降解土壤中的石油烃.

(2)土壤中可降解烷烃和多环芳烃的催化基因总量和总降解菌数量越多,土壤中石油烃的去除效果越好. 修复土壤中石油烃和烷烃降解菌数量明显多于多环芳烃降解菌数量.

(3)向油污土壤中投加 SZ-1 降解菌可以显著提高土壤细菌群落的多样性,该外加菌与土壤中的土著菌存在着协同修复作用. 细菌群落多样性结构越复杂,对石油烃的降解效果相对较好.

参考文献:

[1] 郝春博, 王广才, 董建楠, 等. 石油污染地下水中细菌多样性研究[J]. 环境科学, 2009, **30**(8): 2464-2472.

[2] 山宝琴, 张永涛, 曹巧玲, 等. 6 种陕北适生豆科植物生长对原油污染土壤的响应[J]. 环境科学, 2014, **35**(3): 1125-1130.

[3] 王红旗, 刘新会, 李国学, 等. 土壤环境学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007. 88-89.

[4] 廉景燕, 哈莹, 黄磊, 等. 石油污染土壤物化修复前后生物毒性效应[J]. 环境科学, 2011, **32**(3): 870-874.

[5] 卢晓霞, 李秀利, 马杰, 等. 焦化厂多环芳烃污染土壤的强化微生物修复研究[J]. 环境科学, 2011, **32**(3): 864-869.

[6] Chaineau C H, Rougeux G, Yéprémian C, *et al*. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, **37**(8): 1490-1497.

[7] 韩慧龙, 陈镇, 杨健民, 等. 真菌-细菌协同修复石油污染土壤的场地试验[J]. 环境科学, 2008, **29**(2): 454-461.

[8] Wang Z Y, Gao D M, Li F M, *et al*. Petroleum hydrocarbon degradation potential of soil bacteria native to the Yellow River delta[J]. Pedosphere, 2008, **18**(6): 707-716.

[9] Karamalidis A K, Evangelou A C, Karabika E, *et al*. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet [J]. Bioresource Technology, 2010, **101**(16): 6545-6552.

[10] 吴涛, 谢文军, 依艳丽, 等. 耐盐石油烃降解菌的筛选鉴定及其特性研究[J]. 环境科学, 2012, **33**(11): 3949-3955.

[11] Hassanshahian M, Ahmadinejad M, Tebyanian H, *et al*. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances)[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, **73**(1): 300-305.

[12] 汪杰, 郑维爽, 礼晓, 等. 高效石油降解菌的筛选鉴定及修复能力研究[J]. 环境科学学报, 2010, **30**(6): 1228-1234.

[13] Xu Y, Sun G D, Jin J H, *et al*. Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, **264**: 430-438.

[14] Maria S K, Irena B I, Tatiana N K, *et al*. Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus strains* in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, **84**: 118-125.

[15] 韩慧龙, 汤晶, 江皓, 等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究[J]. 环境科学, 2008, **29**(1): 189-195.

[16] 王莉丽, 吴蔓莉, 丁艺, 等. 油污土壤修复过程中水溶性有机物光谱特性研究[J]. 安全与环境学报, 2012, **12**(6): 27-30.

[17] Zhang X S, Xu D J, Zhu C Y, *et al*. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aerugin*[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, **209**: 138-146.

[18] 刘魏魏, 尹睿, 林先贵, 等. 生物表面活性剂-微生物强化紫花苜蓿修复多环芳烃污染土壤[J]. 环境科学, 2010, **31**(4): 1076-1084.

[19] 任春燕. 产微生物表面活性剂菌株的筛选、性能及其应用研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2009.

[20] 高小朋, 姜钊, 高秀梅, 等. 石油降解菌产表面活性剂的条件优化[J]. 环境工程学报, 2013, **7**(8): 3244-3248.

[21] 杨茜, 吴蔓莉, 曹碧霄, 等. 石油降解菌的筛选、降解特性及其与基因的相关性研究[J]. 安全与环境学报, 2014, **14**(1): 187-192.

[22] 张宏波, 林爱军, 刘爽, 等. 芘高效降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2010, **31**(1): 243-248.

[23] Wrenn B A, Venosa A D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, **42**(3): 252-258.

[24] Mancera-López M E, Sparza-García F E, Chávez-Gómez B, *et al*. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, **61**(2): 151-160.

[25] 刘怡辰, 曹娟, 高国庆, 等. 萘降解菌 N19-3 的分离、鉴定和萘双加氧酶基因的检测[J]. 环境科学研究, 2008, **21**(5): 27-31.

[26] Taylor P M, Medd J M, Schoenborn L, *et al*. Detection of known and novel genes encoding aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in soils and in aromatic hydrocarbon-degrading bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, **216**(1): 61-66.

[27] Widada J, Nojiri H, Kasugak K, *et al*. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, **58**(2): 202-209.

[28] Powell S M, Bowman J P, Ferguson S H, *et al*. The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, **42**(11): 2012-2021.

[29] Wu M L, Chen L M, Tian Y Q, *et al*. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media [J]. Environmental Pollution, 2013, **178**: 152-158.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 36 No. 5

May 15, 2015

CONTENTS

Pollution of Halogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Particulate Matters of Shenzhen ····· SUN Jian-lin, CHANG Wen-jing, CHEN Zheng-xia, *et al.* (1513)

Emission Characteristics of VOCs from Typical Restaurants in Beijing ····· CUI Tong, CHENG Jing-chen, HE Wan-qing, *et al.* (1523)

Characteristics Analysis of Sulfur Dioxide in Pearl River Delta from 2006 to 2010 ····· LI Fei, TAN Hao-bo, DENG Xue-jiao, *et al.* (1530)

Comparison Test Between $PM_{2.5}$ Continuous Monitoring System and Manual Sampling Analysis for $PM_{2.5}$ in Ambient Air ····· WANG Qiang, ZHONG Qi, CHI Ying, *et al.* (1538)

Determination and Emission of Condensable Particulate Matter from Coal-fired Power Plants ····· PEI Bing (1544)

Potential Carbon Fixation Capability of Non-photosynthetic Microbial Community at Different Depth of the South China Sea and Its Response to Different Electron Donors ····· FANG Feng, WANG Lei, XI Xue-fei, *et al.* (1550)

Remote Sensing Estimation of Chlorophyll-a Concentration in Inland Lakes Based on GOCI Image and Optical Classification of Water Body ····· FENG Chi, JIN Qi, WANG Yan-nan, *et al.* (1557)

Hydrochemical Characteristics and Sources of Qingshuijiang River Basin at Wet Season in Guizhou Province ····· LÜ Jie-mei, AN Yan-ling, WU Qi-xin, *et al.* (1565)

Temporal-spatial Variation and Source Identification of Hydro-chemical Characteristics in Shima River Catchment, Dongguan City ····· GAO Lei, CHEN Jian-yao, WANG Jiang, *et al.* (1573)

Response and Control Factors of Groundwater to Extreme Weather, Jiguan Cave, Henan Province, China ····· LIU Xiao, YANG Yan, PENG Tao, *et al.* (1582)

Impact of Rocky Desertification Treatment on Underground Water Chemistry and Dissolved Inorganic Carbon Isotope in Karst Areas ····· XIAO Shi-zhen, XIONG Kang-ning, LAN Jia-cheng, *et al.* (1590)

Difference of Karst Carbon Sink Under Different Land Use and Land Cover Areas in Dry Season ····· ZHAO Rui-yi, LIANG Zuo-bing, WANG Zun-bo, *et al.* (1598)

Vertical Migration Characteristics of Organochlorine Pesticides in Overlying Soil in Karst Terranes and Its Impact on Groundwater ····· SUN Yu-chuan, WANG Yong-qi, LIANG Zuo-bing, *et al.* (1605)

Pollution Status and Migration of Mercury in the Sediments of Nansi Lake in Shandong Province ····· CAO Fei-fei, YANG Li-yuan, PANG Xu-gui, *et al.* (1615)

Response of Sediment Micro Environment and Micro Interface to Physical Disturbance Intensity Under the Disturbance of *Chironomus plumosus* ····· SHI Xiao-dan, LI Yong, LI Da-peng, *et al.* (1622)

Characteristics of Atmospheric Nitrogen Wet Deposition and Associated Impact on N Transport in the Watershed of Red Soil Area in Southern China ····· HAO Zhuo, GAO Yang, ZHANG Jin-zhong, *et al.* (1630)

Effect of Different Purple Parent Rock on Removal Rates of Nitrogen, Phosphorus and Organics in Landscape Water ····· HUANG Xue-jiao, LIU Xiao-chen, LI Zhen-lun, *et al.* (1639)

Effects of *Litchi chinensis* Defoliation on Growth and Photosynthesis of *Microcystis aeruginosa* ····· WANG Xiao-xiong, JIANG Chen-chun, LI Jin-wei, *et al.* (1648)

Toxicity of *Coptis chinensis* Rhizome Extracts to Green Algae ····· CHEN Ya-nan, YUAN Ling (1655)

Formation Mechanism of the Disinfection By-product 1,1-Dichloroacetone in Drinking Water ····· DING Chun-sheng, MENG Zhuang, XU Yang-yang, *et al.* (1662)

Degradation Kinetics and Formation of Disinfection By-products During Linuron Chlorination in Drinking Water ····· LING Xiao, HU Chen-yan, CHENG Ming, *et al.* (1668)

Interference for Various Quench Agents of Chemical Disinfectants on Detection of Endotoxin Activities in Water ····· ZHANG Can, LIU Wen-jun, SHI Yun, *et al.* (1674)

Ammonium Adsorption Characteristics in Aqueous Solution by Dairy Manure Biochar ····· MA Feng-feng, ZHAO Bao-wei, DIAO Jing-ru, *et al.* (1678)

Absorption of Uranium with Tea Oil Tree Sawdust Modified by Succinic Acid ····· ZHANG Xiao-feng, CHEN Di-yun, PENG Yan, *et al.* (1686)

Effect of Membrane Wettability on Membrane Fouling and Chemical Durability of SPG Membranes ····· ZHANG Jing, XIAO Tai-min, ZHANG Jing, *et al.* (1694)

TiO_2-Induced Photodegradation of Levofloxacin by Visible Light and Its Mechanism ····· GUO Hong-sheng, LIU Ya-nan, QIAO Qi, *et al.* (1700)

Performance of Novel Macromolecule Flocculant in the Treatment of Wastewater Containing Cr(Ⅵ) Ions ····· WANG Gang, DU Feng-ling, CHANG Qing, *et al.* (1707)

On-line Estimation for the Amount of Stored PHA in Activated Sludge Based on OUR-HPR Measurements ····· ZENG Shan-wen, WANG Ze-yu, GAO Jing, *et al.* (1713)

Formation Mechanism of Self-forming Dynamic Membrane During Separation of High-concentration Sewage Sludge Fermented for Acid Production ····· HUANG Shuai, LIU Hong-bo, YIN Bo, *et al.* (1720)

Influence of Air Flux on Municipal Sludge Biodrying in a Pilot Scale Test ····· ZHANG Yu, HAN Rong, LU Wen-jing, *et al.* (1727)

Extraction of Heavy Metals from Sludge Using Biodegradable Chelating Agent *N*,*N*-bis(carboxymethyl) Glutamic Acid Tetrasodium ····· WU Qing, CUI Yan-rui, TANG Xiao-xiao, *et al.* (1733)

Biodiversity and Function Analyses of BIOLAK Activated Sludge Metagenome ····· TIAN Mei, LIU Han-hu, SHEN Xin, *et al.* (1739)

Characteristics of Nitrogen Removal by a Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacterium YL ····· LIANG Xian, REN Yong-xiang, YANG Lei, *et al.* (1749)

Biodegradation Characteristics and Kinetics of *p*-nitrophenol by Strain *Arthrobacter* sp. CN2 ····· REN Lei, SHI Yan-hua, JIA Yang, *et al.* (1757)

Biodegradation of Pyrene by Intact Cells and Spores of *Brevibacillus brevis* ····· LIU Zhi-chen, YE Jin-shao, PENG Hui, *et al.* (1763)

Investigation of Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Landfill ····· LI Lei, XU Jing, ZHAO You-cai, *et al.* (1769)

Investigation of Antibiotic Resistance of Indigenous Bacteria and Abundance of Class I Integron in Matrix of Constructed Wetlands of Different Configurations ····· MAI Xiao-bei, TAO Ran, YANG Yang, *et al.* (1776)

Effects of Nitrate and CH_4 on Anaerobic Oxidation of BETX in Landfill Cover Soils ····· LIU Rong, LONG Yan, WANG Li-li, *et al.* (1785)

Spatial Heterogeneity of Soil Respiration in a Planted Larch Forest in Shanxi Plateau ····· YAN Jun-xia, LI Hong-jian, LI Jun-jian, *et al.* (1793)

Effects of Nitrogen Fertilization on Soil Respiration and Temperature Sensitivity in Spring Maize Field in Semi-Arid Regions on Loess Plateau ····· JIANG Ji-shao, GUO Sheng-li, WANG Rui, *et al.* (1802)

Distribution Characteristics of Heavy Metals in the Street Dusts in Xuanwei and Their Health Risk Assessment ····· ZHANG Wen-chao, LÜ Sen-lin, LIU Ding-yu, *et al.* (1810)

Spatial Distribution of Magnetic Properties of Street Dust in Baoji City and Its Implications of Environment ····· ZHANG Jun-hui, WANG Jin, ZHANG Jian, *et al.* (1818)

Effect of Long-term Fertilizer Application on the Stability of Organic Carbon in Particle Size Fractions of a Paddy Soil in Zhejiang Province, China ····· MAO Xia-li, LU Kou-ping, SUN Tao, *et al.* (1827)

Effects of Different Reclaimed Scenarios on Soil Microbe and Enzyme Activities in Mining Areas ····· LI Jun-jian, LIU Feng, ZHOU Xiao-mei (1836)

Soil Microorganism Characteristics and Soil Nutrients of Different Wetlands in Sanjinag Plain, Northeast China ····· XIAO Ye, HUANG Zhi-gang, WU Hai-tao, *et al.* (1842)

Strengthening Effects of Sodium Salts on Washing Kerosene Contaminated Soil with Surfactants ····· HUANG Zhao-lu, CHEN Quan-yuan, ZHOU Juan, *et al.* (1849)

Effects and Biological Response on Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil ····· YANG Qian, WU Man-li, NIE Mai-qian, *et al.* (1856)

Enhanced Phytoextraction of Heavy Metals from Contaminated Soils Using *Sedum alfredii* Hance with Biodegradable Chelate GLDA ····· WEI Ze-bin, CHEN Xiao-hong, WU Qi-tang, *et al.* (1864)

Speciation Characteristics and Bioavailability of Heavy Metals in Oasis Soil Under Pb, Zn Combined Stress ····· JIN Cheng, ZHAO Zhuan-jun, NAN Zhong-ren, *et al.* (1870)

Influence of Sulfur on the Formation of Fe-Mn Plaque on Root and Uptake of Cd by Rice (*Oryza sativa* L.) ····· WANG Dan, LI Xin, WANG Dai-chang, *et al.* (1877)

Effects of Ozone on Photosynthesis of Several Plants ····· LI Miao-miao (1888)

A Method Research on Environmental Damage Assessment of a Truck Rollover Pollution Incident ····· CAI Feng, ZHAO Shi-bo, CHEN Gang-cai, *et al.* (1902)

《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　刘　毅　汤鸿霄　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）

2015 年 5 月 15 日　第 36 卷　第 5 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 36　No. 5　May 15, 2015

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：120.00 元　　**国外发行代号**：M 205

国 内 外 公 开 发 行