

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第36卷 第2期

Vol.36 No.2

2015

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

霾与非霾期间汞在不同粒径颗粒物上的分布特征 朱琮宇,程金平,魏雨晴,薄丹丹,陈筱佳,江璇,王文华(373)

大气传输路径对上甸子本底站气溶胶光学特性的影响 蒲维维,石雪峰,马志强,赵秀娟,张小玲,徐晓峰(379)

近3年太原市夏季降水的化学特征研究 郭晓方,崔阳,王开扬,何秋生,王新明(388)

太原市PM_{2.5}中有机碳和元素碳的污染特征 刘珊,彭林,温彦平,白慧玲,刘凤娴,史美鲜,李丽娟(396)

青海省西宁市和天峻县大气颗粒物中有机氯农药和类二噁英多氯联苯的水平与分布 李秋旭,何畅,马召辉,马丽花,扎西卓玛,王英,金军(402)

北京10个常绿树种颗粒物吸附能力研究 王兵,张维康,牛香,王晓燕(408)

人工湿地空气微生物群落碳源代谢特征 宋志文,王琳,徐爱玲,吴等等,夏岩(415)

春季融雪补给后巩乃斯河水物理化学性质空间分布特征研究 刘翔,郭玲鹏,张飞云,马杰,牟书勇,赵鑫,李兰海(421)

青藏高原湖泊小流域水体离子组成特征及来源分析 李鹤,李军,刘小龙,杨曦,张伟,王洁,牛颖权(430)

亚热带深水水库——龙滩水库季节性分层与富营养化特征分析 张垒,李秋华,黄国佳,欧腾,李翎,吴迪,周黔兰,高廷进(438)

长江河口水库沉积物磷形态、吸附和释放特性 金晓丹,吴昊,陈志明,宋红军,何义亮(448)

黄河口溶解无机碳时空分布特征及影响因素研究 郭兴森,吕迎春,孙志高,王传远,赵全升(457)

苕溪干流悬浮物和沉积物的磷形态分布及成因分析 陈海龙,袁旭音,王欢,李正阳,许海燕(464)

滇池表层沉积物氮污染特征及其潜在矿化能力 孟亚媛,王圣瑞,焦立新,刘文斌,肖焱波,祖维美,徐天敏,丁帅,周童(471)

城郊排水沟渠溶质传输的暂态存储影响及参数灵敏性 李如忠,钱靖,董玉红,唐文坤,杨继伟(481)

艾比湖表层沉积物重金属的来源、污染和潜在生态风险研究 张兆永,吉力力·阿不都外力,姜逢清(490)

工矿业绿洲城郊排污渠沉积物重金属的形态分布规律及风险评估 臧飞,王胜利,南忠仁,王兆炜,任业萌,王德鹏,廖琴,周婷(497)

山东省典型工业城市土壤重金属来源、空间分布及潜在生态风险评估 戴彬,吕建树,战金成,张祖陆,刘洋,周汝佳(507)

UV协同ClO₂去除三氯生及其降解产物的研究 李玉瑛,何文龙,李青松,金伟伟,陈国元,李国新(516)

氯化铁絮凝-直接过滤工艺对地下水中As(V)的去除机制研究 康英,段晋明,景传勇(523)

负载纳米零价铁铜藻基活性炭的制备及其去除水中Cr(VI)的研究 曾淦宁,武晓,郑林,伍希,屠美玲,王铁杆,艾宁(530)

磁性石墨烯吸附水中Cr(VI)研究 刘伟,杨琦,李博,陈海,聂兰玉(537)

TiO₂@酵母复合微球固定床吸附荧光增白剂-VBL的研究 王菲,张凯强,白波,王洪伦,索有瑞(545)

MnO₂/CFP复合电极的制备及电吸附Pb²⁺特性的研究 刘方园,胡承志,李永峰,梁乾伟(552)

吸附相反应技术制备微弱光响应的多组分掺杂TiO₂催化剂 王挺,祝轶琛,孙志轩,吴礼光(559)

掺铁TiO₂纳米管阵列模拟太阳光光电催化降解双酚A的研究 项国梁,喻泽斌,陈颖,徐天佐,彭振波,刘钰鑫(568)

天然矿物负载Fe/Co催化H₂O₂氧化降解阳离子红3R 马楠,刘华波,谢鑫源(576)

臭氧微气泡处理酸性大红3R废水特性研究 张静,杜亚威,刘晓静,周玉文,刘春,杨景亮,张磊(584)

碳源类型、温度及电子受体对生物除磷的影响 韩芸,许松,董涛,王斌帆,王显耀,彭党聪(590)

低温低溶解氧EBPR系统的启动、稳定运行及工艺失效问题研究 马娟,李璐,俞小军,魏雪芬,刘娟丽(597)

O池溶解氧水平对石化废水A/O工艺污染物去除效果和污泥微生物群落的影响 丁鹏元,初里冰,张楠,王星,王建龙(604)

改善污泥脱水性能的丝状真菌的分离及其促进污泥脱水的机制初探 周雨璐,付豪逸,范先锋,王振宇,郑冠宇(612)

热碱处理对污水处理厂污泥特性的影响研究 杨世东,陈霞,刘操,肖本益(619)

不同退化程度羊草草原碳收支对模拟氮沉降变化的响应 齐玉春,彭琴,董云社,肖胜生,贾军强,郭树芳,贺云龙,闫钟清,王丽芹(625)

地表臭氧浓度升高对旱作农田N₂O排放的影响 吴杨周,胡正华,李岑子,陈书涛,谢燕,肖启涛(636)

亚热带次生林不同土壤呼吸组分的多年观测研究 刘义凡,陈书涛,胡正华,沈小帅,张旭(644)

川中丘陵县域土壤氮素空间分布特征及其影响因素 罗由林,李启权,王昌全,李冰,张新,冯文颖,翁倩,吴冕(652)

黄土丘陵区土地利用变化对深层土壤活性碳组分的影响 张帅,许明祥,张亚锋,王超华,陈盖(661)

汶川地震灾区不同气候区土壤微生物群落碳源代谢多样性 张广帅,林勇明,马瑞丰,邓浩俊,杜锟,吴承祯,洪伟(669)

土壤电动修复的电极空间构型优化研究 刘芳,付融冰,徐珍(678)

有机氯农药污染场地挖掘过程中污染物的分布及健康风险 张石磊,薛南冬,杨兵,李发生,陈宣宇,刘博,孟磊(686)

水稻不同生育期根际及非根际土壤砷形态迁移转化规律 杨文骏,王英杰,周航,易开心,曾敏,彭佩钦,廖柏寒(694)

植物根系体外溶液的提取方法研究:以多环芳烃为例 朱满党,都江雪,乐乐,李金凤,杨青青,陆守昆,占新华(700)

垂序商陆叶细胞壁结合锰机制研究 徐向华,刘翠英,李平,郎漫,赵小艳,杨建军,官敏(706)

1株筛自柴油污染土壤的铜绿假单胞菌对萘的降解特性研究 刘文超,吴彬彬,李晓森,卢滇楠,刘永民(712)

CdSe/ZnS量子点对斑马鱼胚胎发育的毒性效应 陈慕飞,黄承志,蒲德永,郑朝依,袁开米,金星星,张耀光,金丽(719)

锯齿新米虾对Cu²⁺和毒死蜱毒性的生理响应 李典宝,张玮,王丽卿,张瑞雷,季高华(727)

同步衍生超声乳化微萃取气相色谱法测定环境水样中的苯胺类化合物 田立勋,戴之希,王国栋,翁焕新(736)

热水环境中Na⁺活化斜发沸石吸附钙离子除硬过程研究 张硕,王栋,陈远超,张兴文,陈贵军(744)

区域经济-污染-环境三维评价模型的构建与应用 樊新刚,米文宝,马振宁(751)

《环境科学》征订启事(401) 《环境科学》征稿简则(437) 信息(489,522,726,735)

1 株筛自柴油污染土壤的铜绿假单胞菌对萘的降解特性研究

刘文超¹, 吴彬彬², 李晓森², 卢滇楠^{2*}, 刘永民^{1*}

(1. 辽宁石油化工大学石油化工学院, 抚顺 113001; 2. 清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 从柴油污染土壤中筛选分离出 1 株萘降解菌 HD-5, 经 16S rDNA 序列分析鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 对功能基因进行 PCR 扩增证实该菌株中含有萘双加氧酶基因 *nah*. 采用生物强化、生物刺激以及二者相结合的方式修复萘含量为 0.5% 的自配污染土壤, 综合比较了在不同修复方式下土壤中萘的降解率, 修复过程中土壤 FDA 水解酶活和脱氢酶活的变化, 以及运用定量 PCR 的方法动态分析了总细菌基因拷贝数和 *nah* 基因拷贝数. 结果表明, 在生物强化 (B)、生物刺激 (S) 以及生物强化与生物刺激相结合 (BS) 这 3 种修复方式下, 31 d 后萘去除率分别为 71.94%、62.22% 和 83.14%, BS 组在修复过程中土壤 FDA 水解酶活和脱氢酶活明显高于另外两组, 31 d 后 BS 组土壤中总细菌基因拷贝数和 *nah* 基因拷贝数分别增长了约 $2.67 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$ 和 $8.67 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$. 上述研究结果表明筛选得到的萘降解菌株在土壤中具有较好的定植特性, 在生物刺激与该降解菌株的共同作用下, 可以有效地实现土壤中萘降解, 这对这类污染生物修复过程研究具有一定的指导意义.

关键词: 微生物; 生物修复; 萘; 土壤; 污染; 降解; 酶; 定量 PCR

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)02-0712-07 DOI: 10.13227/j.hjxx.2015.02.045

Degradation Characteristics of Naphthalene with a *Pseudomonas aeruginosa* Strain Isolated from Soil Contaminated by Diesel

LIU Wen-chao¹, WU Bin-bin², LI Xiao-sen², LU Dian-nan^{2*}, LIU Yong-min^{1*}

(1. College of Petrochemical Engineering, Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Fushun 113001, China; 2. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A naphthalene-degrading bacterium (referred as HD-5) was isolated from the diesel-contaminated soil and was assigned to *Pseudomonas aeruginosa* according to 16S rDNA sequences analysis. Gene *nah*, which encodes naphthalene dioxygenase, was identified from strain HD-5 by PCR amplification. Different bioremediation approaches, including nature attenuation, bioaugmentation with strain *Pseudomonas aeruginosa*, biostimulation, and an integrated degradation by bioaugmentation and biostimulation, were evaluated for their effectiveness in the remediating soil containing 5% naphthalene. The degradation rates of naphthalene in the soil were compared among the different bioremediation approaches, the FDA and dehydrogenase activity in bioremediation process were measured, and the gene copy number of 16S rRNA and *nah* in soil were dynamically monitored using real-time PCR. It was shown that the naphthalene removal rate reached 71.94%, 62.22% and 83.14% in approaches of bioaugmentation (B), biostimulation (S) and integrated degradation composed of bioaugmentation and biostimulation (BS), respectively. The highest removal rate of naphthalene was achieved by using BS protocol, which also gives the highest FDA and dehydrogenase activity. The gene copy number of 16S rRNA and *nah* in soil increased by about $2.67 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$ and $8.67 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ after 31 days treatment using BS protocol. Above-mentioned results also demonstrated that the screened bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, could grow well in naphthalene-contaminated soil and effectively degrade naphthalene, which is of fundamental importance for bioremediation of naphthalene-contaminated soil.

Key words: microorganism; bioremediation; naphthalene; soil; pollution; degradation; enzyme; real-time PCR

多环芳烃 (PAHs) 化合物具有潜在的致癌作用^[1,2]. 土壤中的 PAHs 主要来源于污水灌溉、大气沉降和泄漏事故等^[3], PAHs 可在农作物中富集从而进入食物链威胁人类健康^[4], 亦可通过环境循环进入大气和水中, 造成二次污染. 利用微生物降解 PAHs 是一种安全和有效的处理方式^[5~7]. 萘是 PAHs 中结构最简单和分子量最小的物质, 是研究 PAHs 降解的典型化合物之一. Evans 等^[8] 首先提出了萘降解过程的开环机制. 蔡宝立等^[9] 从石油工业

废水中分离出 1 株高效萘降解菌 ND24, 经鉴定为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 将该菌株添加到 $0.2 \text{ g} \cdot \text{dL}^{-1}$ 萘污染土壤中, 经过 14 d 萘去除率为 98.2%. Zhao 等^[10] 研究了斯氏假单胞菌

收稿日期: 2014-07-31; 修订日期: 2014-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21276139)

作者简介: 刘文超 (1989 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为污染土壤修复, E-mail: 406911387@qq.com

* 通讯联系人, E-mail: ludiannan@tsinghua.edu.cn; liu79ym@tom.com

(*Pseudomonas stutzeri* ZP2), 其能以萘、菲和吐温 80 为唯一碳源生长, 对 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 菲 6 d 降解率为 96%, 但是不能降解 4 环及 4 环以上的 PAHs. 白智勇等^[11]研究了实验室保存的从石油污染的土壤中筛选出的两株萘降解菌——短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*) 和鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.), 发现酸性环境不利于短芽孢杆菌, 而碱性环境不利于鞘氨醇单胞菌, 两种菌混合后对彼此的生长及污染物的降解存在抑制作用. 郑蕾等^[12]研究了抑菌和未抑菌条件下菲、蒽、芘在土壤中的迁移过程, 结果表明微生物通过阻滞作用和降解作用影响 PAHs 的迁移, 菲、蒽和芘在土壤中都能被土著微生物降解. 李春霞^[13]从吉林省松原油田 PAHs 污染土壤中分离得到 1 株高效降解萘的菌株, 利用该菌株对实际污染土壤样品中萘进行降解, 测得其对实际样品中萘的降解率为 60.4%. 刘芳等^[14]研究证实了通过外加营养物可以提高菌株对 PAHs 的降解能力, 没有出现竞争作用而抑制微生物对 PAHs 的降解.

分子生物学技术的发展为构建和强化微生物降解土壤中有机污染物的过程提供了高效工具. 吴作军^[15]研究了微生物分子生态学技术在石油污染土壤修复中的应用, 结果表明在接种微生物的同时添加麦秸所获得的真菌和细菌的数量最多, 分别达到 $5.5 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ 和 $4.6 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$; 微生态分析结果还显示了不同的修复操作所获得的土壤微生态组成上的差异. Zou 等^[16]将土壤微生态学方法和技术用于研究 TNT 污染土壤生物修复过程, 功能基因及 16S rRNA 基因信息表明, 降解菌 Thu-Z 能在土壤中长期存活, 采用高通量测序和荧光定量 PCR 对特定种属基因及功能基因定量分析, 结果表明修复过程均是通过提高了土著 γ 变形菌, β 变形菌数量与代谢活性加速 TNT 降解. 吴彬彬等^[17]采用实时定量 PCR 技术对生物修复过程中土壤氮循环基因 *nifH*、*narG*

和 *amoA* 的拷贝数进行检测, 结果表明污染土壤中这 3 种基因拷贝数明显低于正常土壤, 修复后土壤与正常土壤接近, 同时添加秸秆和菌剂的土壤经过 40d 处理后, 其 *nifH*、*narG* 和 *amoA* 基因拷贝数分别恢复到 2.68×10^6 、 1.71×10^6 和 $8.54 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$. 上述研究成果表明: 采用分子生物学方法来解析参与土壤生物修复过程的微生物群体, 可揭开微生物修复污染土壤过程的黑箱, 为过程强化提供了依据.

本研究从柴油污染土壤中筛选分离出 1 株降解萘的铜绿假单胞菌 HD-5, 目前铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 生物降解研究多限于菌株分离鉴定、降解条件和降解效率等方面^[18], 对于降解基因方面的研究报道较少^[19], 本研究对功能基因进行 PCR 扩增证实该菌株中含有萘双加氧酶基因 *nah*, 并运用定量 PCR 的方法监测自然衰减修复、生物刺激修复、生物强化修复以及生物刺激和生物强化相结合的联合修复萘污染土壤的过程中 *nah* 基因和 16S rRNA 基因的变化, 同时测定了土壤的 FDA 水解酶活和脱氢酶活, 对比了不同修复策略中萘降解效果与土壤微生态的变化, 以期土壤修复过程强化提供了依据.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

铜绿假单胞菌 HD-5 从河北省邯郸市的柴油污染土壤中筛选得到.

1.2 土壤来源

供试土壤来自清华大学校内蔬菜种植区土壤, 经 2 mm 筛处理后备用. 土壤样品经北京农学院植物营养与资源研究所检测, 其理化性质见表 1. 萘用正己烷溶解后添加到土壤中配置成萘污染土壤 (萘质量分数为 0.5%), 待正己烷挥发完毕后使用.

表 1 供试土壤主要理化性质

Table 1 Main physical and chemical properties of the tested soil

理化指标	全氮 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	有机质 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	碱解氮 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	有效铵态氮 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	有效硝态氮 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	有效磷 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	速效钾 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	全盐 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	电导率 / $\text{mS} \cdot \text{m}^{-1}$	pH
数值	0.816	16.9	81.6	10.9	17.0	4.5	134	0.81	20.1	8.51

1.3 试剂与培养基

萘 (纯度 99%, Sigma-Aldrich); 丙酮、正己烷 (分析纯, 北京化工厂).

LB 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 121°C 灭菌 15 min,

保存备用.

无机盐培养基 (MSM): KH_2PO_4 1.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, MgSO_4 0.5 g, CaCl_2 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 121°C 灭菌 15 min, 保存备用.

萘选择性培养基:用正己烷配置 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的萘溶液,过滤除菌后取一定量添加到 MSM 培养基中,待正己烷挥发完毕后备用。

在上述培养基中加入 2% 琼脂即可得相应的固体培养基。

1.4 降解菌的筛选^[20]与鉴定

取河北邯郸柴油污染土壤样品 10 g 加入到 100 mL MSM 培养基中, 30°C 和 $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养 4 h. 将含有土壤的 MSM 悬浊液在 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min,将 10 mL 上清液加入到 100 mL 萘选择性液体培养基中经 4 代培养后(萘浓度从 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高至 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),取适量培养液稀释涂布在萘选择性固体平板上,待有明显菌落出现时从中选取大小、形态各异的菌落在 LB 固体培养基上进行进一步划线纯化分离. 将各纯化后的菌株接种在萘选择性液体培养基中观察其生长情况,将生长情况良好的菌株制备成菌悬液接种到含萘 0.5% 的 200 g 自配污染土壤中,将土壤样品置于 25°C 人工气候培养箱中,每天翻动土壤并加入去离子水使土壤含水量为 $(20\pm 2)\%$,10 d 后测定土壤中萘含量,选取降解率最高的菌作为高效萘降解菌。

菌株的鉴定工作委托中美泰和生物技术(北京)有限公司完成,测定细菌的 16S rDNA 序列并在数据库中比对,获得与其同源性最高的已知序列,由此确定其分类. 菌株的生理生化特性的测定方法见文献[21].

1.5 菌株生长曲线与萘含量的测定

将各纯化后的菌株接种在萘选择性液体培养基中,于 30°C 和 $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养,间隔一定时间取 4 mL 培养液,采用紫外分光光度计(惠普 6010)测定其在 600 nm 处的吸光度值,以此来表征培养液中菌体浓度。

土壤中的萘用丙酮和正己烷混合溶剂(1:1)作为萃取剂,采用微波萃取仪(MARSX,CEM)进行萃取. 萃取后溶液用 GC-2010 气相色谱仪(Shimadzu Inc.,日本)测定其峰面积,对照萘标准曲线求样品中萘含量. 气相色谱条件:进样口温度 300°C ,检测器温度 330°C ,毛细管柱($50\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$),柱温 130°C 保持 3 min,梯度升温 $15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 至 280°C ,进样量为 $1\text{ }\mu\text{L}$.

1.6 土壤样品设置

设计了 5 种萘污染土壤的生物修复方式,在每份 600 g 土壤中加入萘(溶于正己烷),使萘含量为 0.5% (灭菌空白对照组先灭菌,后加萘). ①灭菌空

白对照组(C):将土壤装于锥形瓶中于 121°C 下灭菌 15 min,共 2 次; ②自然衰减对照组(N):不做任何处理; ③生物强化组(B):取 HD-5 菌悬液离心,用生理盐水重悬后调节至 D_{600} 值为 1.0,取 30 mL 添加到土壤中; ④生物刺激组(S):按照 C:N:P 为 100:1.25:1 向土壤中添加含 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 营养液 30 mL; ⑤生物刺激+生物强化组(BS):向土壤中同时添加重悬菌液 30 mL 及营养液 30 mL.

将上述 5 种不同处理后的土壤体系置于 25°C 人工气候培养箱中,过夜后作为实验起始点,每天翻动土壤并加入去离子水使土壤含水量为 $(20\pm 2)\%$.

1.7 土壤 FDA 水解酶活及脱氢酶活的测定

1.7.1 FDA 水解酶活

以 20 min 内每 g 土产生的荧光素含量来表征土壤中 FDA 水解酶活性. 具体操作如下^[22]:将 2 g 土壤置于含有 15 mL 磷酸钾缓冲液($60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.6)的 50 mL 离心管中,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的荧光素二乙酯丙酮溶液,密封后振荡 5 s; 将离心管置于 30°C , $175\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中振荡反应,20 min 后加入 15 mL 氯仿/甲醇(2:1)终止反应; $8\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心,取上清液并测定 490 nm 下的吸光度值。

1.7.2 脱氢酶活

通过测定土壤中微生物的脱氢酶活性以确定微生物对有机污染物的氧化分解能力,具体方法为^[23]:取 1 g 土壤于离心管中,加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液和 0.5% TTC (2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride) 各 2 mL,充分振荡后,在 37°C 下 $145\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中培养 12 h 后加入 5 mL 丙酮,充分振荡,将有机相过滤后测量其在 486 nm 处的吸光度值,以每 g 土 12 h 内生成的红色 TPF 的含量来表征土壤中细菌脱氢酶活性。

1.8 土壤中 16S rRNA 与 *nah* 基因拷贝数的监测

采用 Baldwin 等^[24] 2003 年报道的萘双加氧酶基因 *nah* 的简并引物 *nahf/nahr* 对其进行 PCR,用细菌 DNA 提取试剂盒(Tiagen)对菌株 DNA 进行提取. *nahf* 和 *nahr* 的特异性引物分别为 CAAAARCACCTGATTYATGG 和 AYRCGRGSGACTTCTTTCAA. 总 PCR 反应体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$,体系组成为: $2\times\text{ Taq PCR Master Mix } 10\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的前后端引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$,DNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$, $\text{ddH}_2\text{O } 6\text{ }\mu\text{L}$. PCR 扩增条件为: $95^{\circ}\text{C } 10\text{ min}$, 1 个循环; $95^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$, $49^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$, $72^{\circ}\text{C } 2\text{ min}$, 30 个循环。

采用 ABI 7300 (Applied Biosystems) 荧光定量

PCR 仪对土壤中的细菌 16S rRNA、萘双加氧酶基因(*nah*)拷贝数进行实时定量测量. 反应体系总体积 20 μL , 体系组成为: $2 \times \text{SYBR Green Real-time}$

PCR Master Mix 10 μL , $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的前后端引物各 0.5 μL , DNA 模板 2 μL , ddH_2O 6.4 μL . 引物序列及扩增程序见表 2.

表 2 分类基因序列及荧光定量 PCR 扩增程序

Table 2 Sequences of genes and programs of real-time PCR

引物名称	序列	扩增条件
16S rRNA ^[25]	926F AAACTCAAAGAATTGACGG 1062R CTCACRRCACGAGCTGCTGAC	95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 1 cycle, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 40 cycle, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 1 cycle
<i>nah</i> ^[7]	<i>nahf</i> CAAAARACCTGATTYATGG <i>nahr</i> AYRCGRGSGACTTCTTTCAA	95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 1 cycle, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 49 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 40 cycle, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 1 cycle

2 结果与讨论

2.1 萘降解菌的筛选与鉴定

经过富集培养在萘选择性平板上得到 6 株能以萘为唯一碳源生长的菌株, 分别命名为 HD-1 ~ HD-6, 将其菌悬液分别接种(接种量为 10%)至萘含量为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 100 mL MSM 液体培养基中, 其生长曲线如图 1 所示.

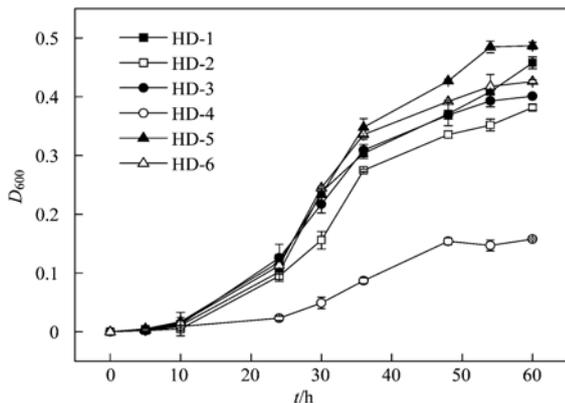


图 1 筛选菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of the bacterial strains isolated

图 1 结果表明, 菌株 HD-5 生长情况最好而菌株 HD-4 几乎没有生长. 将这 5 株菌的菌悬液分别加到萘含量为 0.5% 的 200 g 的污染土壤中, 10 d 后测定土壤中萘去除率. 由图 2 可知: 空白对照组萘去除率

为 49.35%, 这是由于萘的强挥发性所致; 加入菌株 HD-1 和 HD-5 的萘去除率分别为 64.57% 和 66.28%, 说明这两株菌能够降解土壤中的萘. 结合图 1 和 2 的结果, 后续工作选择 HD-5 作为萘降解菌株深入研究.

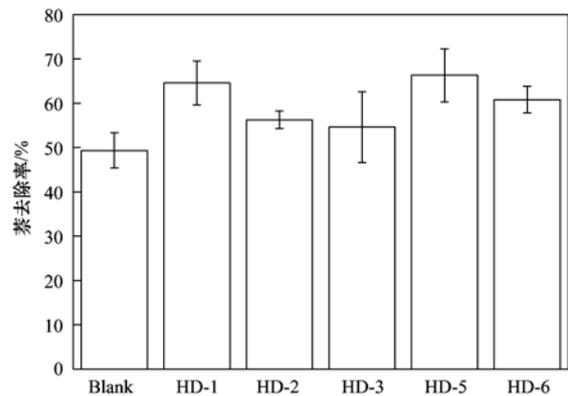


图 2 加菌 10 d 后土壤中萘去除率

Fig. 2 Removal rate of naphthalene in soil with bacteria after 10 d

图 3 给出了以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树. 结果表明, 菌株 HD-5 的 16S rDNA 与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的相似度达到 99%, 故鉴定其为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*). 对该菌株进行细菌总 DNA 的提取, 接着进行萘双加氧酶基因(*nah*)的 PCR 扩增验证, 实验结果如图 4 所示. 结果表明, 在筛选得到的萘降解菌 HD-5 中成功扩增出碱基对数为 377 的萘双加氧

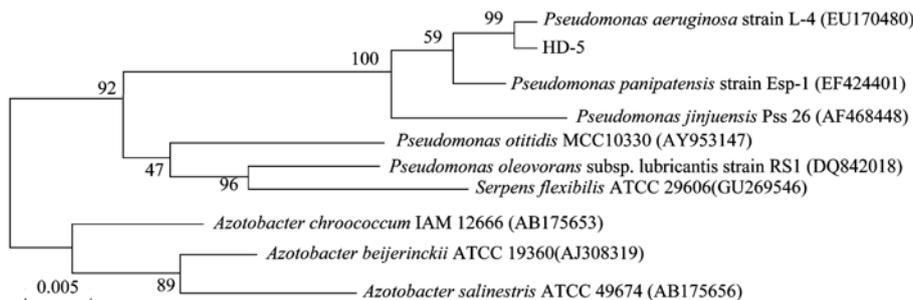
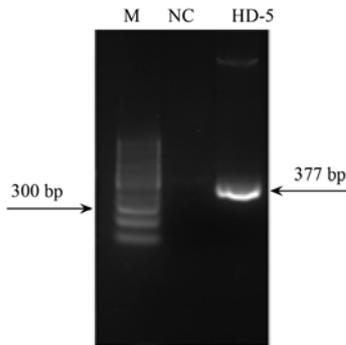


图 3 HD-5 16S rDNA 基因系统发育树

Fig. 3 16S rDNA gene phylogenetic tree of HD-5

酶基因(*nah*). 对该菌进行简单生理生化实验,结果表明该菌为革兰阴性菌,菌体的一端有单鞭毛,无芽胞,氧化酶阳性,能氧化分解葡萄糖和木糖,产酸不产气,但不分解乳糖和蔗糖. 液化明胶、可分解尿素,还原硝酸盐为亚硝酸盐并产生氮气,吲哚阴性,利用枸橼酸盐,精氨酸双水解酶阳性.



M: Marker; NC: Blank; HD-5: *P. aeruginosa*

图4 降解菌中萘双加氧酶基因(*nah*)扩增电泳图

Fig. 4 Amplification electrophoresis figure of *nah* gene in naphthalene-degrading bacteria

2.2 生物修复过程比较与分析

采用自然衰减(N)、生物刺激(S)、生物强化(B)以及生物刺激与生物强化联合修复(BS)等对于萘含量为0.5%的土壤样品进行修复处理,修复操作时间为31 d,土壤中萘去除率随修复时间变化如图5所示.

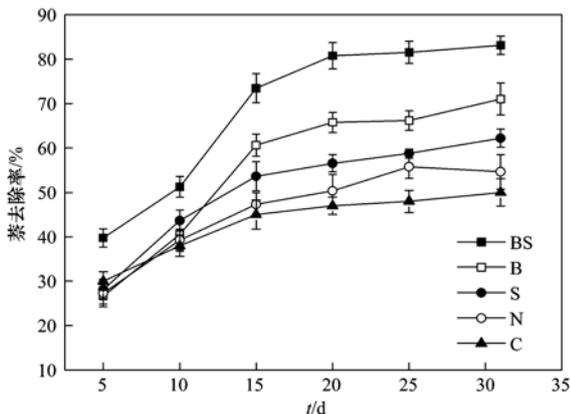


图5 不同修复措施下土壤样品中萘去除率随修复时间的变化

Fig. 5 Variation of removal rate of naphthalene with time in soil under different treatments

由图5可知,灭菌对照组(C)中萘去除率为50.03%,这说明土壤中部分萘可以通过自然挥发而降低. N组中最终萘去除率为54.64%(4.61%刨除自然挥发),这表明除了萘的自然挥发,土壤中土著微生物能够起的部分降解作用,但是降解能力不足. 通过向土壤中添加营养物质,S组中萘的去除率为

62.22%(12.19%刨除自然挥发),表明通过生物刺激可以有效地提高土壤土著菌群中具有潜在降解萘菌株的降解能力. 而在加入HD-5降解菌株之后,经过31 d处理,B组中萘去除率为71.94%(21.91%刨除自然挥发),显著高于S组和N组,表明HD-5很好地发挥了降解土壤体系中萘的作用. BS组中最终萘去除率为83.14%(33.11%刨除自然挥发),是降解效果最佳的一组. 从降解过程来看,前期与B组趋势相近,15 d之后去除率明显高于B组,表明营养物质的添加刺激了降解菌株以及土著微生物的生长,由此使萘的降解进一步提高.

2.3 不同土壤样品中酶活变化

图6给出了不同处理修复方式中土壤FDA酶活和脱氢酶活的变化. 需要说明的是,由于在C组中对土壤采取了高温连续灭菌处理,并在整个实验中通过叠氮钠维持抑菌状态,无法检测其酶活和相关基因,因此后续研究中对对比了其余4种修复方式的酶活与基因变化.

图6(a)显示了土壤FDA酶活的变化. 结果表明,所有处理方式中,前8 d的FDA水解酶活均较低,这说明污染物萘对微生物活性有较大的影响. N组的FDA酶活一直维持在较低水平,这说明萘持续抑制污染土壤中微生物活性. B组中,FDA酶活前期较低,随着生物强化修复进行,FDA水解酶活逐渐增加. S组中,前8 d的FDA酶活与B组相同,随着生物刺激修复进行,FDA水解酶活性显著增加,这主要源于营养物质的添加刺激了土著微生物的增殖. 在BS组中,降解前期土壤中FDA水解酶活性就开始增加,这表明添加的外源菌很好地定植于污染土壤,在降解后期由于营养物质刺激了土著微生物,FDA水解酶活性显著增加. FDA水解酶活从侧面揭示了生物刺激修复措施能够较好地促进土壤微生物活性恢复. 水解酶活的变化规律也与萘降解过程呈正相关性,说明了微生物在降解过程中起到主要作用.

进一步考察了不同处理修复方式中土壤脱氢酶活的变化,结果如图6(b)所示. 结果表明,在所有的处理过程中前4 d的时间内脱氢酶活均维持在较低水平. 之后N组中脱氢酶活没有明显变化,S组中脱氢酶活后期略有上升,而B组和BS组中脱氢酶活均显著升高,且BS组脱氢酶活高于B组. 这说明前期土壤中污染物的代谢主要由加入的降解菌来完成,后期由于生物刺激的作用使得土壤微生态得以恢复,土著降解菌群参与到污染物降解过程. 脱氢酶

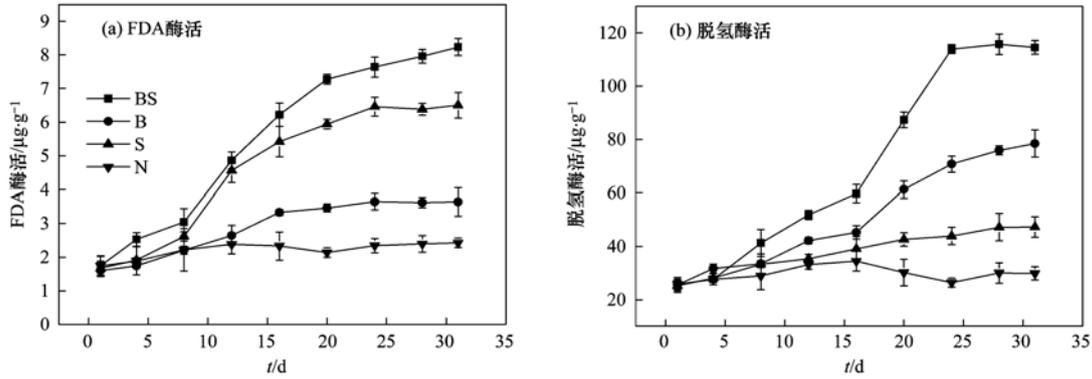


图 6 不同生物修复方式下土壤中 FDA 和脱氢酶活变化

Fig. 6 Changes of FDA and dehydrogenase activities in soil under different bioremediation treatment

活的升高表示微生物降解污染物的能力加强,与降解率呈正相关性。

2.4 不同土壤样品中基因拷贝数变化

土壤中细菌总数是评价土壤微生态的一个重要指标,通过定量 PCR 技术对 16S rRNA 基因拷贝数定量分析,可以较为准确地测定土壤中细菌的数量。正常土壤中的细菌总数在 $10^{10} \sim 10^{11}$ 数量级^[26]。图 7 给出了在不同生物修复方式下细菌总量随时间的变化。从中可以看出,在 N 组中土壤细菌总量一直保持在较低水平,这是由于污染物萘的存在对土壤理化性质带来改变且带有毒性,导致微生物生长环境变差,不利于微生物代谢。在 B 组中土壤细菌总量迅速增加,这表明降解菌可以在土壤中稳定存活。S 组通过添加营养源使土壤中细菌总数快速增加,在第 20 d 达到 10^{10} g^{-1} 后基本维持不变。BS 组中土壤细菌总数生长最快且达到最高水平,在第 15 d 达到 10^{10} g^{-1} 后继续上升至 $2.67 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$ 。细菌数量的增大表明微生物间互相促进彼此生长,有利于对污染物的降解,与降解率呈正相关性。

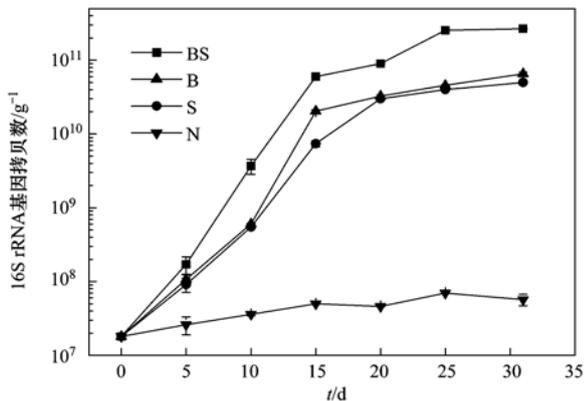


图 7 土壤中总细菌数变化

Fig. 7 Dynamic changes of total bacteria count in soil with different treatments

对于萘等 PAHs 的降解途径经研究表明,降解过程需要分子氧的参与。在反应的第一步,芳环的双加氧酶进行催化氧化,实现对芳环的开环作用。nah 基因编码的萘双加氧酶是降解的关键酶。图 8 显示了不同生物修复过程中 nah 基因的变化情况。

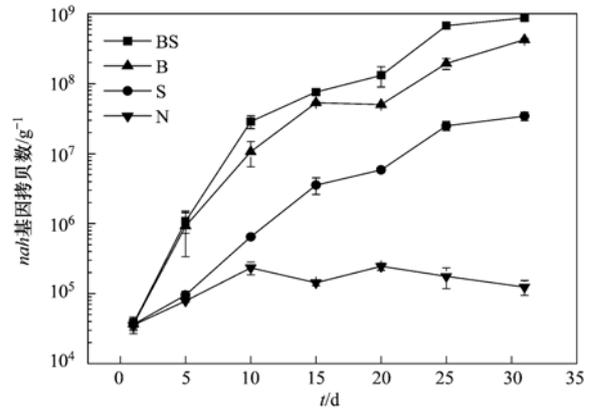


图 8 修复过程中土壤 nah 基因变化

Fig. 8 Dynamic changes of nah gene count in soil with different treatments

由图 8 可以看出,在 N 组在前 10 d 略有提升,之后基本维持不变。B 组及 BS 组在前期 nah 基因迅速增加,这是由于加入的降解菌中含有 nah 基因,这也验证了菌株 HD-5 在土壤中的存活情况。其中 BS 组中 nah 基因增加最快且数量最多, B 组紧随其后且变化趋势相近。值得关注的是, S 组的 nah 基因增加速度虽然低于 B 组,但是经过 10 d 生物刺激之后,土壤中的 nah 基因含量显著高于 N 组,这表明土壤微生物中含有可以降解萘的不可培养微生物,通过生物刺激的方式可以显著增强其活性,从而达到降解污染物萘的目的。因此通过分子生态学技术检测修复过程中降解基因的变化可以有效地指导修复策略的设计和降解微生物的筛选。

3 结论

从柴油污染土壤中分离出 1 株高效降解萘的菌株 HD-5, 经过 16S rDNA 序列分析将其鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 对其 DNA 进行 PCR 扩增验证, 确定该菌株中含有萘双加氧酶基因 *nah*. 在采用生物刺激与生物强化联合修复策略, 即萘污染土壤中添加菌株 HD-5 和营养物质, 经过 31 d 修复, 在萘含量为 0.5% 的污染土壤中萘去除率达到 83.14%, 土壤 FDA 水解酶活和脱氢酶活有明显提高, 通过实时定量 PCR 分析土壤中总细菌基因拷贝数和 *nah* 基因拷贝数, 分别增长了约 $2.67 \times 10^{11} \text{ g}^{-1}$ 和 $8.67 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$.

参考文献:

- [1] Supaka N, Pinphanichakarn P, Pattaragulwanit K, *et al.* Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene *via* cometabolism[J]. *ScienceAsia*, 2001, **27**(1): 21-28.
- [2] Shree N S, Rudra D T. Environmental bioremediation technologies[M]. Berlin: Springer, 2007. 409-443.
- [3] 曹云者, 柳晓娟, 谢云峰, 等. 我国主要地区表层土壤中多环芳烃组成及含量特征分析[J]. *环境科学学报*, 2012, **32**(1): 197-203.
- [4] Dejean S, Raynaud C, Meybeck M, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in atmospheric urban area: Monitoring on various types of sites [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2009, **148**(1): 27-37.
- [5] Tang L, Tang X Y, Zhu Y G, *et al.* Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China [J]. *Environment International*, 2005, **31**(6): 822-828.
- [6] Rentz J A, Alvarez P J J, Schnoor J L. Benzo [a] pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02 [J]. *Environmental Pollution*, 2008, **151**(3): 669-677.
- [7] Wong J W C, Lai K M, Wan C K, *et al.* Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2002, **139**(1-4): 1-13.
- [8] Evans W C, Fernley H N, Griffiths E. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism[J]. *The Biochemical Journal*, 1965, **95**: 819-831.
- [9] 蔡宝立, 李永君, 梁靖, 等. 降解萘的假单胞菌 ND24 菌株的分离和萘污染土壤的生物修复[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, **24**(6): 6-9.
- [10] Zhao H P, Wu Q S, Wang L, *et al.* Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, **164**(2-3): 863-869.
- [11] 白智勇, 李博, 杨琦. 两株菌对萘的降解特性对比[J]. *油气田地面工程*, 2013, **32**(3): 48-49.
- [12] 郑蕾, 谭文捷, 丁爱中, 等. 微生物作用下多环芳烃在土壤中的迁移特征[J]. *化工学报*, 2010, **61**(1): 200-207.
- [13] 李春霞. 环境污染物质——萘降解菌的筛选、鉴定及应用[D]. 长春: 长春理工大学, 2014. 79-88.
- [14] 刘芳, 梁金松, 孙英, 等. 高分子量多环芳烃降解菌 LD29 的筛选及降解特性研究[J]. *环境科学*, 2011, **32**(6): 1799-1804.
- [15] 吴作军. 微生物分子生态学技术在石油污染土壤修复中的应用研究[D]. 北京: 清华大学, 2010. 59-110.
- [16] Zou L D, Lu D N, Liu Z. Pathways for degrading TNT by *Thu-Z: a Pantoea* sp. Strain [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, **168**(7): 1976-1988.
- [17] 吴彬彬, 卢滇楠, 刘铮. 石油污染土壤生物修复过程中氮循环功能基因的动态检测[J]. *环境科学*, 2012, **33**(6): 2068-2074.
- [18] 袁爽, 梁成华, 李凤梅, 等. 多环芳烃降解菌的筛选与降解能力测定[J]. *生态学杂志*, 2011, **30**(2): 315-319.
- [19] 赵鑫, 韩妍, 梁文, 等. 铜绿假单胞菌生物降解特性的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2012, **31**(4): 406-414.
- [20] Van der Gast C J, Knowles C J, Starkey M, *et al.* Selection of microbial consortia for treating metal-working fluids[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, **29**(1): 20-27.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 88-194.
- [22] Adam G, Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, **33**(7-8): 943-951.
- [23] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 130-165.
- [24] Baldwin B R, Nakatsu C H, Nies L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(6): 3350-3358.
- [25] Harms G, Layton A C, Dionisi H M, *et al.* Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant [J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, **37**(2): 343-351.
- [26] 赵月春, 付蓉, 莫测辉, 等. 漆酶修复土壤 DDT 污染的动力学研究[J]. *环境化学*, 2008, **27**(4): 476-480.

CONTENTS

Size Distribution Characteristics of Particulate Mercury on Haze and Non-haze Days	ZHU Qiong-yu, CHENG Jin-ping, WEI Yu-qing, <i>et al.</i> (373)
Impact of Atmospheric Pollutants Transport Pathways on Aerosol Optical Properties at Shangdianzi Background Station	PU Wei-wei, SHI Xue-feng, MA Zhi-qiang, <i>et al.</i> (379)
Chemical Characteristics of 3-year Atmospheric Precipitation in Summer, Taiyuan	GUO Xiao-fang, CUI Yang, WANG Kai-yang, <i>et al.</i> (388)
Pollution Characteristics of Organic and Elemental Carbon in PM _{2.5} in Taiyuan	LIU Shan, PENG Lin, WEN Yan-ping, <i>et al.</i> (396)
Levels and Distribution of Organochlorine Pesticides and Dioxin-Like Polychlorinated Biphenyls in Atmospheric Particulates in Xining and Tianjun, Qinghai Province, China	LI Qiu-xu, HE Chang, MA Zhao-hui, <i>et al.</i> (402)
Particulate Matter Adsorption Capacity of 10 Evergreen Species in Beijing	WANG Bing, ZHANG Wei-kang, NIU Xiang, <i>et al.</i> (408)
Carbon Sources Metabolic Characteristics of Airborne Microbial Communities in Constructed Wetlands	SONG Zhi-wen, WANG Lin, XU Ai-ling, <i>et al.</i> (415)
Spatial Distribution Characteristics of the Physical and Chemical Properties of Water in the Kunes River After the Supply of Snowmelt During Spring	LIU Xiang, GUO Ling-peng, ZHANG Fei-yun, <i>et al.</i> (421)
Composition Characteristics and Source Analysis of Major Ions in Four Small Lake-watersheds on the Tibetan Plateau, China	LI He, LI Jun, LIU Xiao-long, <i>et al.</i> (430)
Seasonal Stratification and Eutrophication Characteristics of a Deep Reservoir, Longtan Reservoir in Subtropical Area of China	ZHANG Lei, LI Qiu-hua, HUANG Guo-jia, <i>et al.</i> (438)
Phosphorus Fractions, Sorption Characteristics and Its Release in the Sediments of Yangtze Estuary Reservoir, China	JIN Xiao-dan, WU Hao, CHEN Zhi-ming, <i>et al.</i> (448)
Spatial-Temporal Distributions of Dissolved Inorganic Carbon and Its Affecting Factors in the Yellow River Estuary	GUO Xing-sen, LÜ Ying-chun, SUN Zhi-gao, <i>et al.</i> (457)
Distributions of Phosphorus Fractions in Suspended Sediments and Surface Sediments of Tiaoxi Mainstreams and Cause Analysis	CHEN Hai-long, YUAN Xu-yin, WANG Huan, <i>et al.</i> (464)
Characteristics of Nitrogen Pollution and the Potential Mineralization in Surface Sediments of Dianchi Lake	MENG Ya-yuan, WANG Sheng-ru, JIAO Li-xin, <i>et al.</i> (471)
Influence of Transient Storage on Solute Transport and the Parameter Sensitivity Analysis in a Suburban Drainage Ditch	LI Ru-zhong, QIAN Jing, DONG Yu-hong, <i>et al.</i> (481)
Sources, Pollution Statue and Potential Ecological Risk of Heavy Metals in Surface Sediments of Aibi Lake, Northwest China	ZHANG Zhao-yong, Jilili Abuduwaili, JIANG Feng-qing (490)
Speciation Distribution and Risk Assessment of Heavy Metals in Sediments in Suburban Outfall of Industrial Oasis Region	ZANG Fei, WANG Sheng-li, NAN Zhong-ren, <i>et al.</i> (497)
Assessment of Sources, Spatial Distribution and Ecological Risk of Heavy Metals in Soils in a Typical Industry-based City of Shandong Province, Eastern China	DAI Bin, LÜ Jian-shu, ZHAN Jin-cheng, <i>et al.</i> (507)
Removal of Triclosan with the Method of UV/ClO ₂ and Its Degradation Products	LI Yu-ying, HE Wen-long, LI Qing-song, <i>et al.</i> (516)
Mechanism of Groundwater As(V) Removal with Ferric Flocculation and Direct Filtration	KANG Ying, DUAN Jin-ming, JING Chuan-yong (523)
Preparation of Nano Zero-valent Iron/ <i>Sargassum horneri</i> Based Activated Carbon for Removal of Cr(VI) from Aqueous Solution	ZENG Gan-ming, WU Xiao, ZHENG Lin, <i>et al.</i> (530)
Adsorption of Cr(VI) on Magnetic Graphene from Aqueous Solution	LIU Wei, YANG Qi, LI Bo, <i>et al.</i> (537)
Adsorption of the TiO ₂ @Yeast Composite Microspheres for Adsorbing Fluorescent Whitening Agent-VBL in Fixed Bed	WU Fei, ZHANG Kai-qiang, BAI Bo, <i>et al.</i> (545)
Preparation and Pb ²⁺ Electrosorption Characteristics of MnO ₂ /CFP Composite Electrode	LIU Fang-yuan, HU Cheng-zhi, LI Yong-feng, <i>et al.</i> (552)
Preparation of Weak Light Driven TiO ₂ Multi Composite Photocatalysts via Adsorption Phase Synthesis	WANG Ting, ZHU Yi-chen, SUN Zhi-xuan, <i>et al.</i> (559)
Photoelectrocatalytic Degradation of Bisphenol A in Water by Fe Doped-TiO ₂ Nanotube Arrays Under Simulated Solar Light Irradiation	XIANG Guo-liang, YU Ze-bin, CHEN Ying, <i>et al.</i> (568)
Oxidation of Cationic Red 3R in Water with H ₂ O ₂ Catalyzed by Mineral Loaded with Fe/Co	MA Nan, LIU Hua-bo, XIE Xin-yuan (576)
Characteristics of Acid Red 3R Wastewater Treatment by Ozone Microbubbles	ZHANG Jing, DU Ya-wei, LIU Xiao-jing, <i>et al.</i> (584)
Effects of Carbon Sources, Temperature and Electron Acceptors on Biological Phosphorus Removal	HAN Yun, XU Song, DONG Tao, <i>et al.</i> (590)
Startup, Stable Operation and Process Failure of EBPR System Under the Low Temperature and Low Dissolved Oxygen Condition	MA Juan, LI Lu, YU Xiao-jun, <i>et al.</i> (597)
Effects of Dissolved Oxygen in the Oxidative Parts of A/O Reactor on Degradation of Organic Pollutants and Analysis of Microbial Community for Treating Petrochemical Wastewater	DING Peng-yuan, CHU Li-bing, ZHANG Nan, <i>et al.</i> (604)
Isolation of Filamentous Fungi Capable of Enhancing Sludge Dewaterability and Study of Mechanisms Responsible for the Sludge Dewaterability Enhancement	ZHOU Yu-jun, FU Hao-yi, FAN Xian-feng, <i>et al.</i> (612)
Impacts of Alkaline Thermal Treatment on Characteristics of Sludge from Sewage Treatment Plant	YANG Shi-dong, CHEN Xia, LIU Cao, <i>et al.</i> (619)
Responses of Ecosystem Carbon Budget to Increasing Nitrogen Deposition in Differently Degraded <i>Leymus chinensis</i> Steppes in Inner Mongolia, China	QI Yu-chun, PENG Qin, DONG Yun-she, <i>et al.</i> (625)
Impacts of Elevated Ozone Concentration on N ₂ O Emission from Arid Farmland	WU Yang-zhou, HU Zheng-hua, LI Cen-zi, <i>et al.</i> (636)
Multi-Year Measurement of Soil Respiration Components in a Subtropical Secondary Forest	LIU Yi-fan, CHEN Shu-tao, HU Zheng-hua, <i>et al.</i> (644)
Spatial Variability of Soil Nitrogen and Related Affecting Factors at a County Scale in Hilly Area of Mid-Sichuan Basin	LUO You-lin, LI Qi-quan, WANG Chang-quan, <i>et al.</i> (652)
Effects of Land Use Change on Soil Active Organic Carbon in Deep Soils in Hilly Loess Plateau Region of Northwest China	ZHANG Shuai, XU Ming-xiang, ZHANG Ya-feng, <i>et al.</i> (661)
Carbon Source Metabolic Diversity of Soil Microbial Community Under Different Climate Types in the Area Affected by Wenchuan Earthquake	ZHANG Guang-shuai, LIN Yong-ming, MA Rui-feng, <i>et al.</i> (669)
Optimization of Electrode Configuration in Soil Electrokinetic Remediation	LIU Fang, FU Rong-bing, XU Zhen (678)
Distribution and Health Risk of HCHs and DDTs in a Contaminated Site with Excavation	ZHANG Shi-lei, XUE Nan-dong, YANG Bing, <i>et al.</i> (686)
Transformation and Mobility of Arsenic in the Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils at Different Growth Stages of Rice	YANG Wen-tao, WANG Ying-jie, ZHOU Hang, <i>et al.</i> (694)
Extraction of Plant Root Apoplast Solution; A Case Study with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	ZHU Man-dang, DU Jiang-xue, YUE Le, <i>et al.</i> (700)
Mechanism of Manganese Binding to Leaf Cell Wall of <i>Phytolacca americana</i> L.	XU Xiang-hua, LIU Cui-ying, LI Ping, <i>et al.</i> (706)
Degradation Characteristics of Naphthalene with a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Strain Isolated from Soil Contaminated by Diesel	LIU Wen-chao, WU Bin-bin, LI Xiao-sen, <i>et al.</i> (712)
Toxic Effects of CdSe/ZnS QDs to Zebrafish Embryos	CHEN Mu-fei, HUANG Cheng-zhi, PU De-yong, <i>et al.</i> (719)
Physiological Response of <i>Neocaridina denticulata</i> to the Toxicity of Cu ²⁺ and Chlorpyrifos	LI Dian-bao, ZHANG Wei, WANG Li-qing, <i>et al.</i> (727)
Determination of Anilines in Environmental Water Samples by Simultaneous Derivatization and Ultrasound Assisted Emulsification Microextraction Combined with Gas Chromatography-Flame Ionization Detectors	TIAN Li-xun, DAI Zhi-xi, WANG Guo-dong, <i>et al.</i> (736)
Adsorption of Calcium Ion from Aqueous Solution Using Na ⁺ -Conditioned Clinoptilolite for Hot-Water Softening	ZHANG Shuo, WANG Dong, CHEN Yuan-chao, <i>et al.</i> (744)
Construction and Application of Economy-Pollution-Environment Three-Dimensional Evaluation Model for District	FAN Xin-gang, MI Wen-bao, MA Zhen-ning (751)

《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)

2015年2月15日 第36卷 第2期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 36 No. 2 Feb. 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