

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第39卷 第8期

Vol.39 No.8

2018

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

我国城市 PM _{2.5} 污染的健康风险及经济损失评价	李惠娟, 周德群, 魏永杰 (3467)
冬季电力行业对长江中游城市群空气质量影响	孙晓伟, 郭秀锐, 程水源 (3476)
基于区域传输矩阵和 PM _{2.5} 达标约束的大气容量计算方法	李敏辉, 廖程浩, 杨柳林, 曾武涛, 唐喜斌 (3485)
利用 SPAMS 研究天津市夏季环境空气中细颗粒物化学组成特征	温杰, 史旭荣, 田瑛泽, 徐娇, 史国良, 冯银厂 (3492)
重庆市北碚城区气溶胶中有机碳和元素碳的污染特征	彭小乐, 郝庆菊, 温天雪, 吉东生, 刘子锐, 王跃思, 陈建博, 江长胜 (3502)
杭甬地区大气中含碳气溶胶特征及来源分析	徐宏辉, 徐婧莎, 何俊, 浦静姣, 齐冰, 杜荣光 (3511)
城市生活垃圾露天焚烧 PM _{2.5} 及其组分排放特征	王艳, 郝伟伟, 程珂, 支国瑞, 易鹏, 樊静, 张洋 (3518)
民用燃煤排放分级颗粒物中碳组分排放因子	杨国威, 孔少飞, 郑淑睿, 吴剑, 郑明明, 郑煌, 严沁, 刘海彪, 王伟, 吴方琪, 程溢 (3524)
大连地区夏季非甲烷烃 (NMHC) 特征及其来源解析	纪德钰 (3535)
“十三五”挥发性有机物总量控制情景分析	张嘉妮, 陈小方, 梁小明, 柯云婷, 范丽雅, 叶代启 (3544)
浙江省包装印刷行业挥发性有机物排放特征及排放系数	王家德, 吕建璋, 李文娟, 顾震宇, 缪孝平 (3552)
有机溶剂使用企业挥发性恶臭有机物排放特征及特征物质识别	翟增秀, 孟洁, 王巨, 翟友存, 曹阳, 邹克华 (3557)
基于 MODIS_C006 的乌鲁木齐 10 年气溶胶光学厚度变化特征	胡俊, 亢燕铭, 陈勇航, 刘鑫, 李霞, 刘琼 (3563)
基于路网车流量的北京城市副中心机动车污染控制情景	樊守彬, 郭津津, 李雪峰 (3571)
北京典型跑步区域空气污染特征及跑步者呼吸暴露	陶双成, 高硕吟, 熊新竹, 姚嘉林, 邓顺熙 (3580)
丹江口水库调水前后表层沉积物营养盐和重金属时空变化	李冰, 王亚, 郑钊, 许信, 辛英督, 黄进, 郭诗君, 毕升阁, 胡兰群, 陈兆进, 李玉英 (3591)
太湖北部湖区春、冬季节天然有机质的荧光特征及环境意义	吕伟伟, 姚昕, 张保华 (3601)
太湖重点区域水环境中邻苯二甲酸酯的污染水平及生态风险评价	朱冰清, 高占啟, 胡冠九, 王骏飞, 于南洋, 韦斯 (3614)
台风强降雨输入水源水库悬浮泥沙的氮磷吸附特性	姚玲爱, 赵学敏, 马千里, 梁荣昌, 夏北成, 卓琼芳 (3622)
珠江三角洲高碑地下水赋存环境特征及成因分析	张昌延, 何江涛, 张小文, 倪泽华 (3631)
有机污染物对杭州湾海域浮游细菌群落的影响	宣丽霞, 戴文芳, 郁维娜, 周素明, 欧昌荣, 熊金波 (3640)
澜沧江流域浮游细菌群落结构特征及驱动因子分析	程豹, 望雪, 徐雅倩, 杨正健, 刘德富, 马骏 (3649)
碧流河水库细菌群落结构特征及其关键驱动因子	王欢, 赵文, 谢在刚, 魏杰, 姜洋 (3660)
浑河底泥反硝化厌氧甲烷氧化菌群落多样性的时空分布特征及其与环境因子关系分析	张亚迪, 宋永会, 彭剑桥, 张剑桥, 张盼月, 刘瑞霞, 石国强 (3670)
人类活动对河流沉积物中反硝化厌氧甲烷氧化菌群落特征的影响	刘洋, 陈永娟, 王晓燕, 许康利 (3677)
外源氮输入对不同土地利用排水沟底泥反硝化和 N ₂ O 排放影响	余冬立, 陈心逸, 高雪梅, 张文娟, 夏永秋 (3689)
雨水管道沉积物沉淀特性及主要污染物含量分布	尚宇, 周毅, 廖安意, 方正 (3696)
水体中 Cr(VI) 对不同混凝剂混凝过程的影响	高倩, 张大为, 徐慧, 徐建坤, 张崇森, 王东升 (3704)
Co ₃ O ₄ /BiVO ₄ 复合阳极活化过一硫酸盐强化光电催化降解双酚 A	李蒋, 王雁, 张秀芳, 赵旭 (3713)
海藻酸钙/生物炭复合材料的制备及其对 Pb(II) 的吸附性能和机制	于长江, 董心雨, 王苗, 林强 (3719)
磁性生物炭对水中 CIP 和 OFL 的吸附行为和机制	赵华轩, 郎印海 (3729)
污水中新精神活性物质的分析方法优化及验证	陈培培, 杜鹏, 周子雷, 徐泽琼, 高婷婷, 李喜青 (3736)
臭氧-CNT 膜改性联用工艺对 PVDF 中空纤维膜污染进程的缓解	关羽琪, 王凯伦, 祝学东, 董丹, 薛小雷, 马艳林, 栾桂荣, 郭瑾 (3744)
阴离子交换树脂生物再生去除硝酸盐氮	叶婷, 张光, 王珂, 双陈冬, 李爱民 (3753)
普鲁士蓝@酵母菌催化剂的合成及其 Fenton 性能	陈思, 白波, 王洪化, 索有瑞 (3759)
PN/A 双菌层系统的构建及其脱氮性能	许静怡, 杜俊, 杨一峰, 吕峰, 夏四清 (3767)
苯酚对 EBPR 系统除磷性能的抑制作用	马娟, 王瑾, 俞小军, 周猛, 李光银, 孙洪伟 (3775)
反硝化-短程硝化-厌氧氨氧化工艺处理晚期垃圾渗滤液的脱氮除碳性能	王凡, 陆明羽, 殷记强, 李祥, 黄勇 (3782)
好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因	康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林, 张海涵, 商潘路, 刘珍芳, 王跃, 谭欣林 (3789)
苯并[a]芘厌氧降解的苯酚共基质协同作用与污泥微生物特性	吴海珍, 胡肖怡, 王鸣, 韦景悦, 范一文, 韦朝海, 钟练文, 彭亚环 (3797)
污泥超高温堆肥过程中 DOM 结构的光谱分析	刘晓明, 余震, 周普雄, 罗海林, 王跃强, 廖汉鹏, 周顺桂 (3807)
生物炭对华北农田土壤 N ₂ O 通量及相关功能基因丰度的影响	刘杏认, 赵光昕, 张晴雯, 田秀平 (3816)
设施菜田土壤 N ₂ O 产生对 O ₂ 的响应	陈吉吉, 宋贺, 曹文超, 王乙然, 王敬国 (3826)
利用 μ -XRF 和 XANES 研究铅锌矿区土壤铅形态及其生物有效性	孙晓艳, 柳检, 罗立强 (3835)
南京市铅锌矿采矿场土壤重金属污染评价及优势植物重金属富集特征	李俊凯, 张丹, 周培, 刘群录 (3845)
Fe-Al 改性硅藻土的制备及其对土壤 Cd 污染固定化效果	杨雨中, 朱健, 肖媛媛, 谭蓉, 王平, 陈润华, 徐海音, 杨雄 (3854)
基于稳定碳同位素技术的干旱区绿洲土壤有机碳向无机碳的转移	李杨梅, 贡璐, 安申群, 孙力, 陈新 (3867)
生境过滤驱动庞泉沟华北落叶松林土壤真菌群落的构建过程	赵鹏宇, 李鑫, 柴宝峰 (3876)
转 cry1Ab 和 epsps 基因玉米 C0030.3.5 对土壤固氮细菌丰度和群落结构的影响	王蕊, 朱珂, 李刚, 刘惠芬, 王晶, 修伟明, 赵建宁, 杨殿林 (3885)
脱硫石膏对稻田 CH ₄ 释放及其功能微生物种群的影响	胡翔宇, 向秋洁, 木志坚 (3894)
长期施肥对不同深度稻田土壤碳氮水解酶活性的影响特征	杜林森, 唐美铃, 祝贞科, 魏亮, 魏晓梦, 周萍, 葛体达, 王久荣, 邹冬生, 吴金水 (3901)
黄河口滨岸潮滩湿地泥沙沉积及外源 Cd 输入对碱蓬物质量分配及抗氧化酶活性的影响	宋红丽, 王立志, 郁万妮, 吴希媛 (3910)
黄河下游开封段引黄灌区小麦中重金属污染特征及健康风险评价	康国华, 张鹏岩, 李颜颜, 杨丹, 庞博, 何坚坚, 闫宇航 (3917)
氧化石墨烯对邻苯二甲酸二丁酯藻毒性的影响	涂海峰, 刘成, 王宇擎, 储祺, 侯晓冬, 李锋民 (3927)
有机物对厌氧氨氧化微生物燃料电池脱氮产电性能的影响	祖波, 马兰, 刘波, 卢培利, 许君 (3937)
中国氢燃料电池车燃料生命周期的化石能源消耗和 CO ₂ 排放	林婷, 吴焯, 何晓婧, 张少君, 郝吉明 (3946)
气溶胶水相反应生成二次有机气溶胶研究进展	叶招莲, 瞿珍秀, 马帅帅, 盖鑫磊 (3954)
《环境科学》征订启事 (3543)	
《环境科学》征稿简则 (3570)	
信息 (3600, 3728, 3844)	

转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 对土壤固氮细菌丰度和群落结构的影响

王蕊^{1,2}, 朱珂^{1,2}, 李刚^{1*}, 刘惠芬^{2*}, 王晶^{1,2}, 修伟明¹, 赵建宁¹, 杨殿林¹

(1. 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 天津农学院农学与资源环境学院, 天津 300384)

摘要: 为评估转基因玉米种植对土壤氮周转功能微生物的潜在风险, 以转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5(TM) 及其亲本玉米 DBN318(PM) 为研究对象, 于 2015 年拔节期、抽雄期、乳熟期、完熟期采集根际土和非根际土进行试验, 并采用荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 和末端限制性片段长度多态性 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 技术分析土壤固氮微生物 *nifH* 基因丰度和多样性。结果表明, TM 和 PM 根际土和非根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度随生长时期整体呈现先升高后降低的变化趋势, 无论是根际土还是非根际土, 同一生长时期 2 种玉米 *nifH* 基因丰度间差异均不显著。相关分析显示, 土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度与有机质含量呈极显著正相关。T-RFLP 结果表明, 所获得的 14 种 T-RFs 中, 43 bp 和 155 bp 片段所代表的固氮细菌为共有优势种群, 无论是根际土还是非根际土, 同一生长时期各 T-RFs 的相对丰度在 TM 和 PM 间差异同样不显著。土壤固氮细菌的 Shannon 指数和 Evenness 指数随生长期整体呈现出先升高后降低的变化趋势, 无论是根际土还是非根际土, 同一生长时期 TM 和 PM 的 Shannon 指数间及 Evenness 指数间均无显著差异。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 表明 TM 和 PM 土壤固氮细菌群落结构组成无显著差异。冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 显示土壤铵态氮和 pH 对固氮细菌群落结构组成影响显著。

关键词: *cry1Ab*; *epsps*; 转基因玉米; *nifH* 基因; 丰度; 群落结构

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2018)08-3885-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.201711119

Effects of Transgenic Maize with *cry1Ab* and *Epsps* Genes C0030.3.5 on the Abundance and Community Structure of Soil Nitrogen-fixing Bacteria

WANG Rui^{1,2}, ZHU Ke^{1,2}, LI Gang^{1*}, LIU Hui-fen^{2*}, WANG Jing^{1,2}, XIU Wei-ming¹, ZHAO Jian-ning¹, YANG Dian-lin¹

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. College of Agriculture and Environmental Resources, Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384, China)

Abstract: In order to evaluate the potential risk of planting transgenic corn on soil nitrogen-fixing microorganisms, in 2015, rhizosphere and non-rhizosphere soil samples were collected at the jointing stage, tassel stage, milky stage, and ripening stage, and the effects of transgenic maize with the *cry1Ab* and *epsps* genes on the abundance and diversity of soil nitrogen-fixing bacteria were studied by real-time quantitative PCR and T-RFLP. The results showed that the copy number of the diazotrophic *nifH* gene in the rhizosphere and non-rhizosphere soil of transgenic maize with the *cry1Ab* and *epsps* genes (C0030.3.5) and its parental maize (DBN318) showed a trend where it first increased and then decrease with the growth stages, ranging between 2.99×10^7 and 7.02×10^7 copies $\cdot g^{-1}$. The abundance of the diazotrophic *nifH* gene in the rhizosphere soil and non-rhizosphere soil gene showed no significant difference between TM and PM in the same growth stage ($P > 0.05$). The correlation analysis showed that the abundance of the diazotrophic *nifH* gene was positively correlated with the content of organic matter, but negatively correlated with water content. T-RFLP analysis yielded 14 T-RFs of different lengths, and 43-bp and 155-bp fragments were the dominant population. The community composition of nitrogen-fixing bacteria was the same as that of TM and PM in the rhizosphere soil and non-rhizosphere soil, and there was no significant difference between the TM and PM populations in the same growth period ($P > 0.05$). The Shannon index and Evenness index of the diazotrophic *nifH* gene showed a trend where they first increased and then decreased with the growth period, and there was no significant difference in the Shannon index and Evenness index in the same growth stage between the rhizosphere and non-rhizosphere soil samples. Principal component analysis (PCA) indicated that the composition of nitrogen-fixing bacteria was not different between TM and PM. Redundancy analysis (RDA) showed that soil ammonium, nitrogen, and pH were significantly correlated with composition of nitrogen-fixing bacteria.

Key words: *cry1Ab*; *epsps*; transgenic maize; *nifH* gene; abundance; community structure

收稿日期: 2017-11-14; 修订日期: 2018-01-16

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2015ZX08013002-004, 2016ZX08012005-005); 国家自然科学基金项目 (31200424)

作者简介: 王蕊 (1992 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物分子生态方面, E-mail: wangrui920406@126.com

* 通信作者, E-mail: ligang06@caas.cn; paula913@126.com

转基因作物商业化种植已经 21 a, 其种植面积从 1996 的 170 万 hm^2 增加到 2016 年的 1.851 亿 hm^2 , 不仅为农民乃至整个社会带来了可观的经济效益, 同时带来了巨大的环境、健康和社会效益^[1]. 转基因作物虽然具有广阔的发展前景, 但其环境安全性问题已引起国际上的广泛关注, 其对生态环境的潜在影响成为科学界研究的热点.

cryIAb 基因是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白基因的一种, 其表达产物能够与靶标害虫中肠受体结合, 造成中肠崩溃, 最终导致害虫死亡^[2]. *epsps* 基因来源于土壤细菌 (*Agrobacterium* spp. CP4), 该基因编码的 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶是草甘膦抗性的主要来源^[3]. 2 种基因通过表达载体导入受体玉米植株获得转 *cryIAb* 和 *epsps* 基因玉米, 赋予其抗虫和抗除草剂特性, 这种兼具多种优良性状的复合性状转基因作物已经成为未来的发展趋势^[4], 转基因玉米作为生物技术产业化的重大成果, 对于作物抗虫和控制杂草等方面有着非常重要的生产意义, 已得到普遍应用^[5]. 但在看到转基因玉米所带来的巨大利益的同时, 也不应忽视其对生态环境的潜在影响, 转基因玉米中外源基因所表达的蛋白分泌到土壤可能会对土壤微生物群落产生影响, 其根系分泌的转基因蛋白也可能对土壤微生物的数量造成一定的影响, 因此在推广前应进行全面的生态环境安全性评估^[6].

土壤微生物是土壤生态系统最重要的组成部分, 在土壤营养元素循环、肥力形成和发展、生态环境改善等方面发挥极其重要的作用^[7]. 土壤氮循环作为元素生物地球化学循环的重要组成部分, 直接关系到土壤质量、生产力和可持续利用. 生物固氮构成氮循环的中心环节, 由固氮微生物催化完成, 能够将大气中的氮气还原成氨, 是土壤中有效性氮素的重要来源^[8,9]. 固氮微生物的数量和多样性变化直接反映土壤固氮效率和氮素循环的运转情况, 是衡量土壤质量的重要指标^[10]. 转基因作物的外源表达产物随凋落物及根系分泌物等途径进入土壤后很可能会与固氮微生物发生相互作用^[11], 因此充分认识转基因作物种植后土壤固氮微生物群落的变化, 能够为全面地认识转基因作物的环境安全性提供参考^[12].

目前转基因玉米的环境安全性研究主要集中在对土壤动物群落结构^[13]、土壤细菌多样性^[14~18]、土壤真菌多样性的影响^[19]、基因漂流^[20,21]和外源

蛋白动态变化^[22]等方面. 固氮微生物在玉米土壤生态系统中的固氮率可达 $13 \text{ kg} \cdot (\text{hm}^2 \cdot \text{a})^{-1}$ ^[23], 是除人工施肥外土壤氮素的重要来源, 在农田生态系统氮素循环平衡起着重要作用, 然而目前缺乏转基因玉米种植对土壤固氮微生物群落影响的研究. 本文以兼具抗虫性和除草剂耐受性的转 *cryIAb* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 为研究对象, 采用 qPCR 和 T-RFLP 技术, 并结合统计学分析, 探讨其种植对土壤固氮微生物丰度和群落结构的影响, 结果对转基因玉米的环境安全性评价具有重要的参考价值.

1 材料与方法

1.1 供试土壤及样品采集

土壤样品采集于北京大北农生物技术有限公司河北省试验基地, 位于唐山市玉田县陈家铺乡 ($\text{E}117^{\circ}43'$, $\text{N}39^{\circ}47'$), 该区域气候类型为北温带大陆性季风气候, 年平均降雨量 693.1 mm, 年平均气温 11.2°C , 无霜期约为 193 d. 供试土壤为潮土, pH 8.28, 有机质 $13.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮 $2.80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全磷 $0.53 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 硝态氮 $15.96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 铵态氮 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效磷 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

试验始于 2015 年, 供试材料转 *cryIAb* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 (TM) 及亲本非转基因玉米 DBN318 (PM) 均由北京大北农生物技术有限公司提供. 采用随机区组设计, 每个处理各设置 3 次重复, 共 6 个 $10 \text{ m} \times 15 \text{ m}$ 的小区, 小区间以非转基因玉米作为保护带, 宽度为 5 m, 基地四周设有围墙, 周边为设施菜地, 无基因漂移风险. 试验前样地的土地利用方式为小麦和玉米轮作, 均为非转基因常规品种. 本试验于 5 月进行玉米播种, 采取垄施复合肥方式, 基肥占 60%, 于种植前施入, 追肥占 40%, 于拔节期施入, 期间按照当地常规操作进行田间管理, 全生育期不施用农药.

分别于拔节期 (6 月 28 日, J)、抽雄期 (8 月 10 日, T)、乳熟期 (8 月 31 日, M) 和完熟期 (9 月 28 日, R) 采集根际土 (GJ) 和非根际土 (FGJ). 根际土和非根际土采集方法参见王晶等的报道^[22]. 每个生长时期将同一小区的根际土和非根际土分别充分混匀装入自封袋中, 放入低温样品储藏箱中带回实验室. 土壤样品过 2 mm 筛后分为 2 部分, 一部分保存于 -70°C 冰箱中用于土壤微生物分子生物学分析, 另一部分用于土壤基本理化性质测定.

1.2 土壤基本理化性质测定

土壤有机质、全磷、速效磷、pH 和含水量

(H₂O)的测定参照文献[24]的方法. 土壤全氮、硝态氮和铵态氮使用连续流动分析仪测定. 测定结果见文献[25].

1.3 土壤 DNA 提取

将存于 -70℃ 冰箱中的土壤样品(根际土和非根际土, 2 种玉米, 4 个生长时期, 3 次重复, 共 48 个土壤样品), 采用 PowerSoil™ Total DNA Isolation 试剂盒 (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, CA, USA)提取 DNA, 每个样品称取 0.25 g, 提取步骤参照试剂盒说明书, 最后用 100 μL ddH₂O 洗脱. DNA 的质量采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检验, 并采用 NanoDrop 分光光度计 (NanoDrop Technologies, USA)测定浓度, DNA 样品存储在 -70℃ 冰箱中.

1.4 荧光定量 PCR

nifH 基因丰度的 qPCR 分析采用 SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa) 试剂盒于 Stratagene Mx3005P Real-Time PCR System 上进行, 使用的引物和扩增条件见表 1. 反应体系 25 μL, 其中 1.0 μL 20 倍稀释的 DNA 模板加入包括 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq™ Buffer, 0.5 μL 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹), 0.5 μL ROX Reference dye II, 0.05 μL T4 gene 32 protein (5 g·L⁻¹) (Roche)的反应液中, 用灭菌 ddH₂O 补足至总体积为 25 μL. 以灭菌 ddH₂O

作为无模板对照 (No Template Control, NTC), DNA 样品和 NTC 各 3 次重复. qPCR 反应最后绘制熔解曲线 (60 ~ 95℃, 每扫描一次温度增加 0.5℃). 参照 Stempfhuber 等^[26]的方法制作标准曲线, 采用 10 倍连续稀释的阳性质粒被用作模板进行 qPCR (每个稀释梯度均设 3 次重复), *nifH* 基因的扩增效率范围在 86.2% ~ 87.5% 之间, *R*² 为 1.000.

1.5 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP)

土壤固氮细菌 *nifH* 基因的多样性分析采用 T-RFLP 方法进行, 使用的引物和扩增条件见表 1, 其中上游引物 PolF 的 5' 末端用 6'-FAM 荧光标记. 反应体系如下: 50 μL 的 PCR 反应扩增体系包括: 5 × Buffer 10.0 μL, MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 3.0 μL, dNTPs (2.5 μmol·L⁻¹ each) 2.0 μL, 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 2.0 μL, BSA (20 g·L⁻¹) (TaKaRa) 1.0 μL, GoTaq™ Hot Start Polymerase (5 U·L⁻¹) (Promga, USA) 0.25 μL, 1.0 μL DNA 作为模板, 加灭菌 ddH₂O 补至 50 μL, 每个样品各 3 次重复, 并以灭菌 ddH₂O 作为无模板对照. 将 3 次重复的扩增产物混合, 用 Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System 试剂盒纯化 (Promega, USA), 采用限制性内切酶 *Hae* III (TaKaRa) 进行酶切, 反应条件为 37℃ 酶切 3 h. 酶切产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司检测.

表 1 PCR 所用的引物序列和反应条件
Table 1 Primer sequences and reaction conditions used for PCR

引物	序列	反应条件	应用	文献
FPGH19 PolR	TACGCGCAARGGTGGNATHG ATSGCCATCATYTCRCCGGA	95℃ for 2 min; 95℃ for 15 s, 55℃ for 30 s, 72℃ for 30 s (plate read), 35 cycles	qPCR	[27]
PolF PolR	TGCGAYCCSAARGCBGACTC ATSGCCATCATYTCRCCGGA	95℃ for 5 min; 95℃ for 30 s, 55℃ for 30 s, 72℃ for 30 s, 40 cycles; 72℃ for 5 min	T-RFLP	[28]

1.6 数据分析

将检测所得 T-RFLP 图谱中相差 1 bp 以内的片段归为同一 T-RF^[29], T-RF 丰度 (relative abundance, *R_a*) 用相对峰值表示^[30], 并去除 *R_a* 小于 1% 的 T-RFs, *R_a* 大于 10% 的 T-RFs 为该样品的优势种群^[31]. 生物多样性用 Shannon 指数 (*H*) 和 Evenness 指数 (EH) 评价.

采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 多组处理间的显著性分析采用单因素方差分析 (Duncan 检验) 法进行比较, 两组处理间的数据比较采用独立样本的 *t* 检验. PCA 分析采用 SPSS 22.0 软件进行, 相关图采用 Origin 9.0 绘制. 采用 CANOCO for Windows 4.5.1 的冗余分析确定土壤固氮微生物群落结构与

土壤环境因子的关联关系, 并应用蒙特卡洛检验进行显著性分析 (*P* < 0.05).

2 结果与分析

2.1 土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度的 qPCR 分析

土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度变化如图 1 所示. 其中根际土中, 亲本玉米固氮细菌 *nifH* 基因丰度范围为 3.86 × 10⁷ ~ 5.50 × 10⁷ copies·g⁻¹, 转基因玉米固氮细菌 *nifH* 基因丰度范围为 3.42 × 10⁷ ~ 7.02 × 10⁷ copies·g⁻¹. 而非根际土中亲本玉米固氮细菌 *nifH* 基因丰度范围分别为 3.42 × 10⁷ ~ 6.07 × 10⁷ copies·g⁻¹, 转基因玉米固氮细菌 *nifH* 基因丰度范围为 2.99 × 10⁷ ~ 5.36 × 10⁷ copies·g⁻¹. 显著性

分析表明,同一生长时期亲本玉米和转基因玉米根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度间均无显著差异 ($P >$

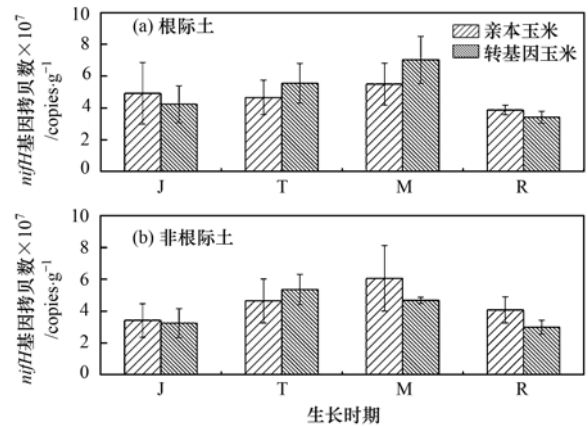


图1 不同生长时期土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度变化
Fig. 1 Abundance changes of the soil diazotrophic *nifH* gene in different growth stages

表2 土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度显著性分析

Table 2 Significant analysis of abundance of the soil diazotrophic *nifH* gene

生长时期	土壤固氮细菌 <i>nifH</i> 基因丰度			
	根际土		非根际土	
	PM	TM	PM	TM
J	$4.92 \times 10^7 \pm 1.94 \times 10^7$	$4.23 \times 10^7 \pm 1.16 \times 10^7$	$3.42 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^7$	$3.25 \times 10^7 \pm 0.91 \times 10^7$
T	$4.65 \times 10^7 \pm 1.08 \times 10^7$	$5.55 \times 10^7 \pm 1.24 \times 10^7$	$4.64 \times 10^7 \pm 1.38 \times 10^7$	$5.36 \times 10^7 \pm 0.95 \times 10^7$
M	$5.50 \times 10^7 \pm 1.32 \times 10^7$	$7.02 \times 10^7 \pm 1.47 \times 10^7$	$6.07 \times 10^7 \pm 2.06 \times 10^7$	$4.68 \times 10^7 \pm 0.20 \times 10^7$
R	$3.86 \times 10^7 \pm 0.52 \times 10^7$	$3.42 \times 10^7 \pm 0.66 \times 10^7$	$4.08 \times 10^7 \pm 1.41 \times 10^7$	$2.99 \times 10^7 \pm 0.75 \times 10^7$

相关分析表明(表3),根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度与有机质含量表现为极显著正相关关系 ($P < 0.01$),与总氮含量表现为显著正相关关系 ($P < 0.05$);非根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度与有机质

0.05),非根际土的分析结果与根际土相同.亲本玉米和转基因玉米根际土和非根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度随生长时期整体呈现先升高后降低的变化趋势(除亲本玉米根际土外).

由表2可见,PM根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度在拔节期和完熟期高于TM,而在抽雄期和乳熟期相反,但差异均不显著($P > 0.05$),非根际土的分析结果与根际土基本一致(除乳熟期PM高于TM),PM与TM间差异同样不显著($P > 0.05$).同时发现同一种玉米同一生长时期根际土和非根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度间均无显著差异($P > 0.05$).

以上研究结果说明转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 种植对土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度无显著影响,生长时期是引起土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度变化的最主要因素.

表3 *nifH* 基因丰度与基本理化性质相关性分析¹⁾

Table 3 Correlation coefficients for relationships between *nifH* gene abundance and basic physicochemical properties of soil

项目	总氮	铵态氮	硝态氮	全磷	速效磷	有机质	pH
根际土	0.439 *	-0.057	-0.077	0.270	-0.128	0.744 **	-0.036
非根际土	0.192	0.066	-0.279	0.076	-0.178	0.454 **	-0.026

1) * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

2.2 土壤固氮细菌群落的 T-RFLP 分析

T-RFLP 图谱显示(图2),PM和TM土壤中共获得14种不同长度的T-RFs.其中43bp和155bp的片段所代表的物种为所有土壤共有的优势种群,它们的相对丰度均高于其他T-RFs.在同一生长时期,PM根际土中43bp和155bp片段的相对丰度与TM无显著差异($P > 0.05$),非根际土与根际土的分析结果相同.在根际土中,39bp片段在拔节期PM中为优势片段,而在TM中虽不是优势片段,但两种玉米的相对丰度无显著差异($P > 0.05$),而69bp片段在抽雄期和乳熟期中,158bp片段在拔

节期中,180bp在乳熟期中,180bp在完熟期中的分析结果均与39bp片段的相同,两种玉米的相对丰度均无显著差异($P > 0.05$).在非根际土中,19bp片段在抽雄期PM中为优势片段,而在TM中虽不是优势片段,但两种玉米的相对丰度无显著差异($P > 0.05$),39bp片段在乳熟期中,158bp片段在完熟期中,180bp片段在完熟期中,360bp片段在完熟期中的分析结果均与19bp片段的相同,两种玉米的相对丰度均无显著差异($P > 0.05$).分析表明,TM和PM各T-RFs的相对丰度在同一生长时期和土壤样品采集区域间差异均不显著,说明转

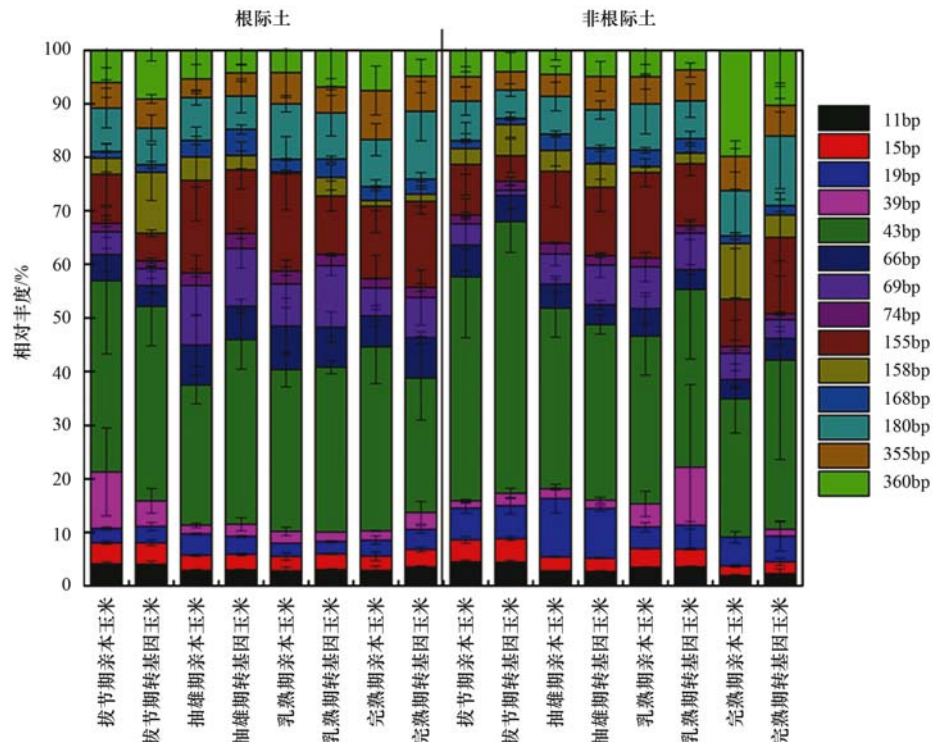


图2 不同生长时期土壤固氮细菌 *nifH* 基因的限制性酶切片段和相对丰度

Fig. 2 Average relative abundance of T-RFs of the soil diazotrophic *nifH* gene in different growth stages

cry1Ab 和 *epsps* 基因玉米 C0030. 3. 5 种植对土壤固氮细菌群落结构无显著影响。

根据 T-RFLP 图谱中片段的种类和峰值, 计算出土壤固氮细菌的 Shannon 指数和 Evenness 指数。由表 4 可见, PM 和 TM 根际土固氮细菌的 Shannon 指数变化均表现为先升高后降低, PM 抽雄期最高, TM 乳熟期最高, 而 PM 最低值出现在完熟期, TM 最低值出现在拔节期; 非根际土中, 2 种玉米的 Shannon 指数变化同样表现为先升高后降低, 最高值均出现在乳熟期, 而 PM 最低值出现在完熟期, TM 最低值出现在拔节

期。PM 和 TM 根际土固氮细菌的 Evenness 指数变化均表现为先升高后降低, 分别在乳熟期和拔节期最高, PM 和 TM 非根际土固氮细菌的 Evenness 指数变化与根际土相同。显著性分析表明, 相同生长时期 TM 和 PM 根际土固氮细菌的 Shannon 指数之间均无显著差异 ($P > 0.05$), Evenness 指数也均无显著差异 ($P > 0.05$), 非根际土的分析结果与根际土相同。说明土壤固氮细菌的 Shannon 指数和 Evenness 指数受转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030. 3. 5 种植的影响不显著, 而随生长时期变化明显。

表 4 不同生长时期土壤固氮细菌的多样性指数

Table 4 Diversity index of soil nitrogen-fixing bacteria in different growth stages

项目	Shannon 指数		Evenness 指数	
	根际土	非根际土	根际土	非根际土
PM-J	2.33 ± 0.12	2.24 ± 0.19	0.77 ± 0.08	0.77 ± 0.08
TM-J	2.45 ± 0.12	2.22 ± 0.16	0.78 ± 0.05	0.76 ± 0.03
PM-T	2.62 ± 0.06	2.44 ± 0.07	0.84 ± 0.02	0.81 ± 0.01
TM-T	2.55 ± 0.05	2.52 ± 0.01	0.82 ± 0.03	0.82 ± 0.02
PM-M	2.47 ± 0.09	2.62 ± 0.05	0.83 ± 0.03	0.86 ± 0.02
TM-M	2.59 ± 0.05	2.48 ± 0.03	0.87 ± 0.01	0.82 ± 0.03
PM-R	2.23 ± 0.15	2.18 ± 0.25	0.81 ± 0.05	0.81 ± 0.04
TM-R	2.46 ± 0.21	2.24 ± 0.21	0.85 ± 0.04	0.80 ± 0.04

2.3 土壤固氮细菌群落的 PCA 分析

PCA 分析结果表明(图 3), 同一生长时期, 根际土 PM 和 TM 固氮细菌群落组成在 PC1 和 PC2 轴上均未发生明显分离, 非根际土 PM 和 TM 固氮细菌群落同样未发生明显分离, 表明转 *cry1Ab* 和 *epsps*

基因玉米 C0030. 3. 5 土壤固氮细菌群落结构与亲本玉米 DBN318 无显著差异。

2.4 土壤环境因子与固氮细菌群落的 RDA 分析

根际土固氮细菌群落结构的 RDA 分析结果显示[图 4(a)], 前两轴可解释 *nifH* 基因多样性变化

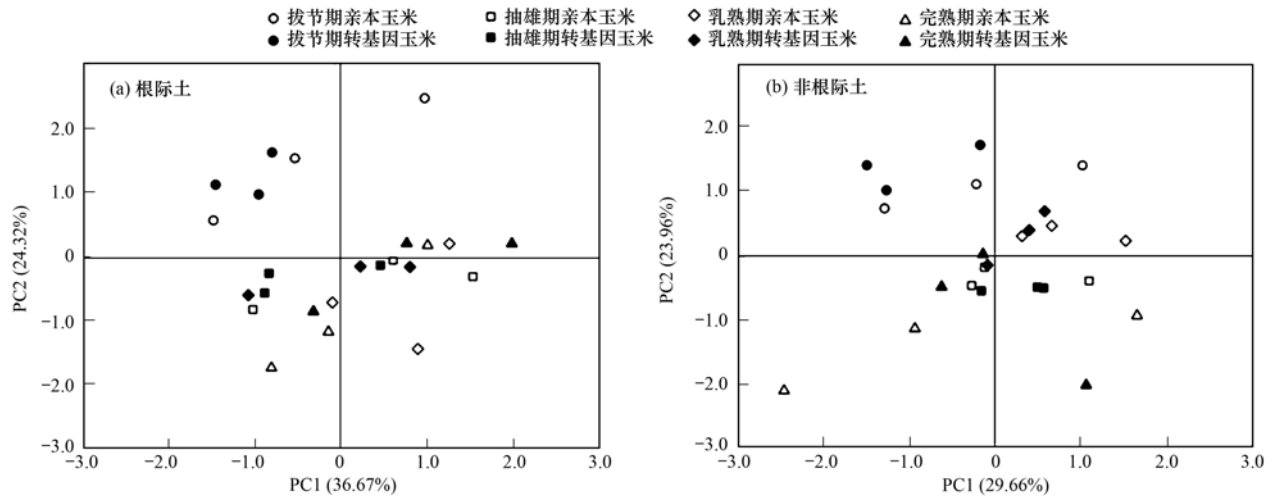


图3 不同生长时期土壤固氮细菌群落结构的PCA分析

Fig. 3 PCA analysis of the community structure of soil nitrogen-fixing bacteria in different growth stages

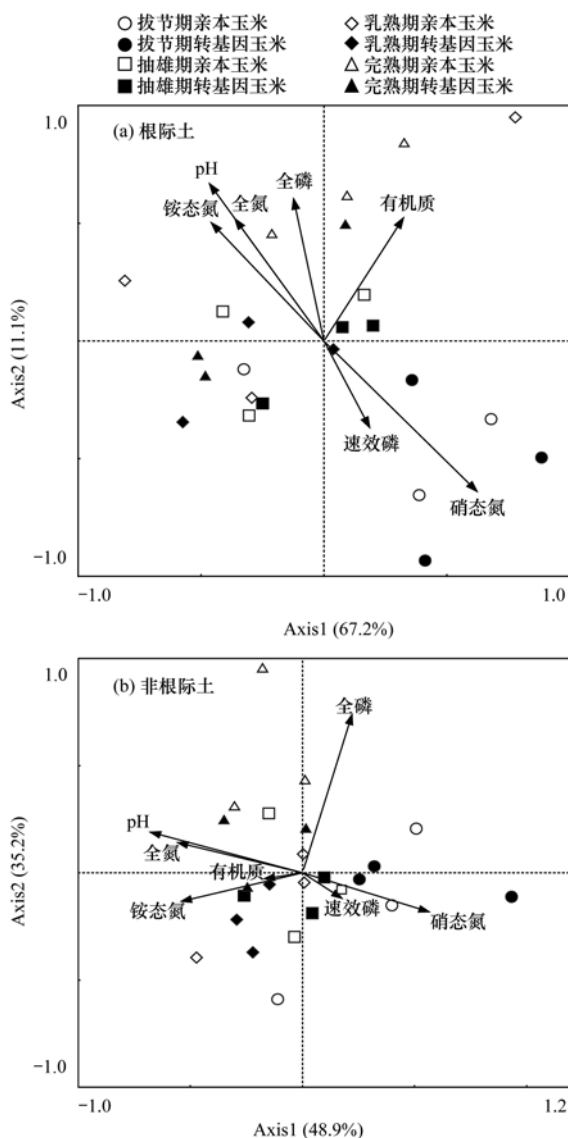


图4 不同生长时期土壤固氮细菌群落结构的RDA分析

Fig. 4 RDA analysis of the composition of soil nitrogen-fixing bacteria in different growth stages

的78.3%。土壤硝态氮含量($P=0.002$)、pH($P=0.024$)和铵态氮含量($P=0.036$)与根际固氮细菌群落组成显著相关。非根际土的RDA分析结果显示[图4(b)],前两轴可解释 *nifH* 基因多样性变化的84.1%,土壤pH($P=0.008$)、全磷含量($P=0.034$)、铵态氮含量($P=0.048$)与非根际土固氮细菌群落组成显著相关。综合分析认为,影响土壤固氮细菌群落结构的主要因素是pH和铵态氮。

3 讨论

土壤微生物作为生态系统的重要组成部分,与土壤的结构和稳定性息息相关^[32],对土壤微生物影响的研究成为转基因作物风险评估的重要内容之一。固氮微生物是土壤生态系统氮素固定的主要执行者,对土壤生态系统氮素循环平衡起着关键作用。本研究通过对转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 种植后土壤固氮细菌的丰度和多样性变化的分析,探讨了转基因玉米种植对土壤固氮细菌群落丰度和结构的影响。

对土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度分析发现,无论是根际土,还是非根际土,在4个生长时期PM和TM之间均无显著差异($P>0.05$),说明转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 种植对土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度无显著影响。与朱银玲^[33]对转 *epsps* 基因抗虫抗除草剂大豆种植后土壤 *nifH* 基因丰度变化的研究结果一致。PM和TM土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度随生长时期均呈现先升高后降低的变化趋势,其中PM和TM根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度均在乳熟期最高,完熟期最低;而PM和TM非根际土固氮细菌 *nifH* 基因丰度最高值分别出现

在乳熟期和抽雄期, 拔节期最低。根系分泌物是影响固氮微生物的重要因素^[34], 在生理活动旺盛的生长时期, 玉米植株体生长较快, 向土壤释放的根系分泌物也不断增加, 为固氮微生物提供了充足的碳源, 促进了固氮微生物的生长, 固氮细菌 *nifH* 基因丰度表现为与生长时期密切相关。

相关分析表明, 土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度与有机质含量极显著正相关, 与侯海军等^[35]对水稻田的研究结果一致。分析认为, 生物固氮是一个耗能还原过程(打破 $N \equiv N$), 因此更偏爱以还原态碳为能源的基质^[36], 土壤有机质的增加可以提高固氮酶的活性, 并促进固氮微生物的生长。固氮酶对氧高度敏感, 氧的存在可使大多数固氮菌的固氮酶不可逆失活, 土壤水分通过调节微环境中氧的水平而影响着生固氮的效率^[37]。Keuter 等^[38]对草地生态系统研究认为高水分通过降低土壤的通气性从而减少对固氮酶活性的抑制。但 Burgoyne 等发现^[39], 春季解冻带来的高水分厌氧条件会降低固氮速率, 因而 5 月(高水分)土壤的固氮速率小于 8 月。这种变化是否与农业生态系统中氮肥的投入以及相应产生的多种土壤特性次生效果有关, 具体机制有待进一步研究。

T-RFLP 结果表明, 不同生长时期土壤中不同 T-RFs 所占比例变化虽然各不相同, 但是优势种群组成结构未发生明显改变, 这些片段比例的变化反映了不同生长时期土壤中固氮细菌群落结构的整体变化趋势, 说明转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 土壤固氮细菌群落结构与亲本玉米 DBN318 无显著差异。进一步对 Shannon 指数和 Evenness 指数分析发现, 同一生长时期 TM 和 PM 之间根际土固氮细菌 *nifH* 基因的 Shannon 指数均无显著差异($P > 0.05$), 非根际土的分析结果与根际土相同; 无论根际土还是非根际土, 土壤固氮细菌 *nifH* 基因的 Evenness 指数均无显著差异($P > 0.05$)。PM 和 TM 根际土固氮细菌的 Shannon 指数变化均表现为先升高后降低, PM 抽雄期最高, 而 TM 乳熟期最高; 非根际土中, 2 种玉米的 Shannon 指数变化同样表现为先升高后降低, 最高值均出现在乳熟期。PM 和 TM 根际土固氮细菌的 Evenness 指数变化均表现为先升高后降低, 均在乳熟期最高, 在拔节期最低, 非根际土的分析结果与根际土相同。说明转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 土壤固氮细菌的 Shannon 指数和 Evenness 指数与受体玉米 DBN318 无显著差异, 生长时期较土壤样品

采集区域对 Shannon 指数和 Evenness 指数的影响更为明显。

PCA 分析结果表明转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 土壤固氮细菌群落结构与亲本玉米 DBN318 无显著差异, 与王丽娟等^[40]的研究认为耐除草剂转基因大豆根际土壤固氮微生物群落结构与亲本无显著差异的结果一致。而有研究表明, 在不同生育时期土壤固氮微生物群落多样性及丰度有不同的表现, 可能是由于玉米在抽雄期和乳熟期生长旺盛, 其根系分泌物增多为固氮微生物的增长提供更多的养分, 促进了固氮微生物的生长, 造成固氮微生物的数量及多样性增加。RDA 综合分析结果认为, 土壤 pH 和铵态氮含量是调控土壤固氮细菌群落结构变化的关键因子。pH 是影响土壤固氮微生物的重要参数^[41], pH 越高的土壤越有利于固氮细菌的活性, *nifH* 基因丰度越高^[42]。铵态氮是土壤中重要的矿质氮, 显著影响土壤固氮微生物的群落结构, Wang 等^[43]对江苏常熟水稻小麦长期轮作试验地调查发现, 固氮菌群落结构受土壤铵态氮变化的显著影响, 与本研究的结果一致。

4 结论

转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 对土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度无显著影响。土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度主要受生长时期的影响, 土壤有机质是驱动土壤固氮细菌 *nifH* 基因丰度变化的关键因子。转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 对土壤固氮细菌 *nifH* 基因多样性无显著影响。土壤固氮菌群落结构变化是土壤铵态氮、pH、全磷和硝态氮之间相互关联共同影响的结果, 其中土壤铵态氮和 pH 与固氮细菌群落关系最密切。

参考文献:

- [1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2016 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(4): 1-8.
- [2] Wolfersberger M G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control[J]. Journal of Experimental Biology, 1992, 172: 377-386.
- [3] 宋敏, 刘丽军, 苏颖异, 等. 抗草甘膦 EPSPS 基因的专利保护分析[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2): 147-152.
Song M, Liu L J, Su Y Y, et al. Analysis of patent protection of glyphosate-tolerance EPSPS gene [J]. China Biotechnology, 2010, 30(2): 147-152.
- [4] 李鑫星, 周婧, 许文涛, 等. 复合性状转基因作物及产品检测与溯源技术研究进展[J]. 农业机械学报, 2017, 48(5): 117-127.
Li X X, Zhou J, Xu W T, et al. Research progress on detection

- and traceability technology of stacked transgenic plants and their products[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, **48**(5): 117-127.
- [5] 沈平, 章秋艳, 林友华, 等. 推进我国转基因玉米产业化的思考[J]. 中国生物工程杂志, 2016, **36**(4): 24-29.
- Shen P, Zhang Q Y, Lin Y H, *et al.* Thinking to promote the industrialization of genetically modified corn of our country[J]. China Biotechnology, 2016, **36**(4): 24-29.
- [6] 左娇, 郭运玲, 孔华, 等. 转基因玉米安全性评价研究进展[J]. 玉米科学, 2014, **22**(1): 73-78.
- Zuo J, Guo Y L, Kong H, *et al.* Progress on safety evaluation of transgenic corn[J]. Journal of Maize Sciences, 2014, **22**(1): 73-78.
- [7] 徐万里, 唐光木, 葛春辉, 等. 长期施肥对新疆灰漠土土壤微生物群落结构与功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2015, **35**(2): 468-477.
- Xu W L, Tang G M, Ge C H, *et al.* Effects of long-term fertilization on diversities of soil microbial community structure and function in grey desert soil of Xinjiang[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, **35**(2): 468-477.
- [8] Zou Y K, Zhang J N, Yang D L, *et al.* Effects of different land use patterns on *nifH* genetic diversity of soil nitrogen-fixing microbial communities in *Leymus Chinensis* steppe[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, **31**(3): 150-156.
- [9] 董志新, 孙波, 殷士学, 等. 气候条件和作物对黑土和潮土固氮微生物群落多样性的影响[J]. 土壤学报, 2012, **49**(1): 130-138.
- Dong Z X, Sun B, Yin S X, *et al.* Impacts of climate and cropping on community diversity of diazotrophs in pachic udic argiboroll and fluventic ustochrept[J]. Acta Pedologica Sinica, 2012, **49**(1): 130-138.
- [10] 李刚, 王丽娟, 李玉洁, 等. 呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式对土壤固氮微生物多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2013, **24**(6): 1639-1646.
- Li G, Wang L J, Li Y J, *et al.* Effects of different vegetation restoration patterns on the diversity of soil nitrogen-fixing microbes in Hulunbeier sandy land, Inner Mongolia of North China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, **24**(6): 1639-1646.
- [11] 王丽娟. 转基因大豆对土壤氮循环相关微生物多样性的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2013.
- Wang L J. Effects of transgenic soybeans on the microorganisms related with nitrogen cycle in the rhizosphere[D]. Hohhot: Inner Mongolia Normal University, 2013.
- [12] 王敏, 关潇. 不同转基因作物对土壤微生物的影响[J]. 山西农业科学, 2015, **43**(2): 229-232, 243.
- Wang M, Guan X. The effects of different genetically modified crops on soil microorganisms[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2015, **43**(2): 229-232, 243.
- [13] 刘新颖, 王柏凤, 周琳, 等. 转 *cryIIe* 基因抗虫玉米 IE09S034 种植对田间大型土壤动物多样性的影响[J]. 作物杂志, 2016, (1): 62-68.
- Liu X Y, Wang B F, Zhou L, *et al.* Effects of *cryIIe* on soil macrofauna diversity in transgenic corn IE09S034 fields[J]. Crops, 2016, (1): 62-68.
- [14] 邹雨坤, 张静妮, 杨殿林, 等. 转 Bt 基因玉米对根际土壤细菌群落结构的影响[J]. 生态学杂志, 2011, **30**(1): 98-105.
- Zou Y K, Zhang J N, Yang D L, *et al.* Effects of transgenic Bt maize on bacterial community structure in rhizosphere soil[J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, **30**(1): 98-105.
- [15] 王敏, 孙红伟, 武海斌, 等. 转 Bt 基因玉米根际微生物和细菌生理群多样性[J]. 生态学杂志, 2010, **29**(3): 511-516.
- Wang M, Sun H W, Wu H B, *et al.* Quantity of culturable microorganisms and diversity of bacterial physiological groups in transgenic Bt corn rhizosphere[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, **29**(3): 511-516.
- [16] Devare M H, Jones C M, Thies J E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: biomass, activity, and diversity[J]. Journal of Environmental Quality, 2004, **33**(3): 837-843.
- [17] 刘明, 聂菁, 刘紫君, 等. 转基因抗病玉米对土壤可培养细菌的影响[J]. 山西农业科学, 2016, **44**(3): 353-356.
- Liu M, Nie J, Liu Z J, *et al.* Effects of transgenic resistant disease maize on soil cultivable bacteria[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2016, **44**(3): 353-356.
- [18] Rajpal V R, Rao S R, Raina S N. Molecular breeding for sustainable crop improvement volume 2 [M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. 213-230.
- [19] Xie M, Zhang Y J, Peng D L, *et al.* Field studies show no significant effect of a *cryIAb/Ac* producing transgenic cotton on the fungal community structure in rhizosphere soil[J]. European Journal of Soil Biology, 2016, **73**: 69-76.
- [20] 尹昭坤, 乔健, 袁潜华. 转基因水稻向普通野生稻及其他近缘植物的基因漂流研究进展[J]. 热带生物, 2011, **2**(4): 374-377.
- Yin Z K, Qiao J, Yuan Q H. Progresses on the gene flow from transgenic rice to common wild rice and its close relatives[J]. Journal of Tropical Organisms, 2011, **2**(4): 374-377.
- [21] Liu Y B, Chen F J, Guan X, *et al.* High crop barrier reduces gene flow from transgenic to conventional maize in large fields[J]. European Journal of Agronomy, 2015, **71**: 135-140.
- [22] Xue K, Dia B R, Thies J E. Stability of Cry3Bb1 protein in soils and its degradation in transgenic corn residues[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, **76**: 119-126.
- [23] Chalk P M, He J Z, Peoples M B, *et al.* $^{15}\text{N}_2$ as a tracer of biological N_2 fixation: a 75-year retrospective[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, **106**: 36-50.
- [24] 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.
- [25] 王晶, 王蕊, 朱珂, 等. 转 *cryIAb* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 对土壤古菌丰度和多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, **36**(10): 2048-2057.
- Wang J, Wang R, Zhu K, *et al.* Effects of transgenic maize containing *cryIAb* and *epsps* gene C0030.3.5 on the abundance and diversity of soil archaea[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, **36**(10): 2048-2057.
- [26] Stempfhuber B, Welzl G, Wubet T, *et al.* Drivers for ammonia-oxidation along a land-use gradient in grassland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, **69**: 179-186.
- [27] Reardon C L, Gollany H T, Wuest S B. Diazotroph community structure and abundance in wheat-fallow and wheat-pea crop rotations[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, **69**: 406-412.

- [28] Huang L N, Tang F Z, Song Y S, *et al.* Biodiversity, abundance, and activity of nitrogen-fixing bacteria during primary succession on a copper mine tailings [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, **78**(3): 439-450.
- [29] Yuan H Z, Ge T D, Zou S Y, *et al.* Effect of land use on the abundance and diversity of autotrophic bacteria as measured by ribulose- 1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large subunit gene abundance in soils [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, **49**(5): 609-616.
- [30] Lukow T, Dunfield P F, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **32**(3): 241-247.
- [31] Yuan H Z, Ge T D, Wu X H, *et al.* Long-term field fertilization alters the diversity of autotrophic bacteria based on the ribulose- 1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large-subunit genes in paddy soil [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, **95**(4): 1061-1071.
- [32] 方圆, 王妮, 姚晓东, 等. 我国北方温带草地土壤微生物群落组成及其环境影响因素 [J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2017, **53**(1): 142-150.
Fang Y, Wang W, Yao X D, *et al.* Soil microbial community composition and environmental controls in northern temperate steppe of China [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2017, **53**(1): 142-150.
- [33] 朱银玲. 转 *EPSPS* 基因抗除草剂大豆对土壤原核微生物群落生态影响的研究 [D]. 南京: 南京大学, 2015.
Zhu Y L. The research about ecological impacts of *EPSPS* transgenic herbicide-resistant soybean on soil prokaryotic microorganism group [D]. Nanjing: Nanjing University, 2015.
- [34] Shu W, Pablo G P, Jun Y, *et al.* Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, **28**(2): 493-503.
- [35] 侯海军, 秦红灵, 陈春兰, 等. 土壤氮循环微生物过程的分子生态学研究进展 [J]. *农业现代化研究*, 2014, **35**(5): 588-594.
Hou H J, Qin H L, Chen C L, *et al.* Research progress of the molecular ecology on microbiological processes in soil nitrogen cycling [J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2014, **35**(5): 588-594.
- [36] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective [J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2011, **42**: 489-512.
- [37] 徐鹏霞, 韩丽丽, 贺纪正, 等. 非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2017, **28**(10): 3440-3450.
Xu P X, Han L L, He J Z, *et al.* Research advance on molecular ecology of asymbiotic nitrogen fixation microbes [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, **28**(10): 3440-3450.
- [38] Keuter A, Veldkamp E, Corre M D. Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, **70**: 38-46.
- [39] Burgoyne T A, DeLuca T H. Short-term effects of forest restoration management on non-symbiotic nitrogen-fixation in western Montana [J]. *Forest Ecology and Management*, 2009, **258**(7): 1369-1375.
- [40] 王丽娟, 李刚, 赵建宁, 等. 耐除草剂转基因大豆对根际土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, **35**(6): 703-711.
Wang L J, Li G, Zhao J N, *et al.* Effects of herbicide tolerant transgenic soybeans on the diversity of soil nitrogen-fixing bacterial *nifH* genes in rhizosphere [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, **35**(6): 703-711.
- [41] 张丽梅, 贺纪正. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制 [J]. *微生物学通报*, 2013, **40**(1): 98-108.
Zhang L M, He J Z. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation [J]. *Microbiology China*, 2013, **40**(1): 98-108.
- [42] Silva M C P E, Schlöter-Hai B, Schlöter M, *et al.* Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e74500.
- [43] Wang J C, Zhang D, Zhang L, *et al.* Temporal variation of diazotrophic community abundance and structure in surface and subsoil under four fertilization regimes during a wheat growing season [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, **216**: 116-124.

CONTENTS

An Assessment of PM _{2.5} -Related Health Risks and Associated Economic Losses in Chinese Cities	LI Hui-juan, ZHOU De-qun, WEI Yong-jie (3467)
Impact of the Electric Power Industry on Air Quality in Winter of Urban Agglomerations Along the Middle Reaches of the Yangtze River	SUN Xiao-wei, GUO Xiu-rui, CHENG Shui-yuan (3476)
Capacity Simulation Method Based on Regional Transfer Matrix and PM _{2.5} Concentration Target Constraint	LI Min-hui, LIAO Cheng-hao, YANG Liu-lin, <i>et al.</i> (3485)
Analysis of Chemical Composition of the Fine Particulate Matter in Summer in Tianjin City via a Single Particle Aerosol Mass Spectrometer (SPAMS)	WEN Jie, SHI Xu-rong, TIAN Ying-ze, <i>et al.</i> (3492)
Pollution Characteristics of Organic Carbon and Elemental Carbon in Atmospheric Aerosols in Beibei District, Chongqing	PENG Xiao-le, HAO Qing-ju, WEN Tian-xue, <i>et al.</i> (3502)
Characteristics and Source Analysis of Atmospheric Carbonaceous Aerosols in the Cities of Hangzhou and Ningbo	XU Hong-hui, XU Jing-sha, HE Jun, <i>et al.</i> (3511)
Emission Characteristics and Chemical Components of PM _{2.5} from Open Burning of Municipal Solid Waste	WANG Yan, HAO Wei-wei, CHENG Ke, <i>et al.</i> (3518)
Size-resolved Emission Factors of Carbonaceous Particles from Domestic Coal Combustion in China	YANG Guo-wei, KONG Shao-fei, ZHENG Shu-ni, <i>et al.</i> (3524)
Characteristics and Source Analysis of Non-methane Hydrocarbons (NMHC) in Dalian	Ji De-yu (3535)
Scenario Analyses of the Volatile Organic Compound Emission Allowance and Allocation in the 13th Five-Year Period	ZHANG Jia-ni, CHEN Xiao-fang, LIANG Xiao-ming, <i>et al.</i> (3544)
Pollution Characteristics and Emission Coefficients of Volatile Organic Compounds from the Packaging and Printing Industry in Zhejiang Province	WANG Jia-de, LÜ Jian-zhang, LI Wen-juan, <i>et al.</i> (3552)
Emission Characteristics and Characteristic Substance Identification of Volatile Odorous Organic Compounds in Industries Using Organic Solvents	ZHAI Zeng-xiu, MENG Jie, WANG Gen, <i>et al.</i> (3557)
Analysis of Aerosol Optical Depth Variation Characteristics for 10 years in Urumqi Based on MODIS_C006	HU Jun, KANG Yan-ming, CHEN Yong-hang, <i>et al.</i> (3563)
Motor Vehicle Pollution Control Scenarios of Beijing Subsidiary Administrative Center Based on Road Traffic Flow	FAN Shou-bin, GUO Jin-jin, LI Xue-feng (3571)
Air Pollution Characteristics and Jogger Inhalation Exposure in Typical Running Area of Beijing	TAO Shuang-cheng, GAO Shuo-han, XIONG Xin-zhu, <i>et al.</i> (3580)
Temporal and Spatial Changes in Sediment Nutrients and Heavy Metals of the Danjiangkou Reservoir Before and After Water Division of the Mid-route Project	LI Bing, WANG Ya, ZHENG Zhao, <i>et al.</i> (3591)
Fluorescence Characteristics and Environmental Significance of Organic Matter in the Northern Part of Lake Taihu in Spring and Winter	LÜ Wei-wei, YAO Xin, ZHANG Bao-hua (3601)
Contamination Levels and Ecological Risk Assessment of Phthalate Esters (PAEs) in the Aquatic Environment of Key Areas of Taihu Lake	ZHU Bing-qing, GAO Zhan-qi, HU Guan-jiu, <i>et al.</i> (3614)
Nitrogen and Phosphorous Adsorption Characteristics of Suspended Solids Input into a Drinking Water Reservoir via Typhoon Heavy Rainfall	YAO Ling-ai, ZHAO Xue-min, MA Qian-li, <i>et al.</i> (3622)
Geochemical Characteristics and Genesis Analyses of High-arsenic Groundwater in the Pearl River Delta	ZHANG Chang-yan, HE Jiang-tao, ZHANG Xiao-wen, <i>et al.</i> (3631)
Effects of Organic Pollutants on the Bacterioplankton Community in Hangzhou Bay	XUAN Li-xia, DAI Wen-fang, YU Wei-na, <i>et al.</i> (3640)
Bacterioplankton Community Structure in the Lancang River Basin and the Analysis of Its Driving Environmental Factors	CHENG Bao, WANG Xue, XU Ya-qian, <i>et al.</i> (3649)
Bacterial Community Structure Characteristics in the Biliuhe Reservoir and Its Key Driving Factors	WANG Huan, ZHAO Wen, XIE Zai-gang, <i>et al.</i> (3660)
Analysis of the Temporal and Spatial Distribution of the Diversity of the Denitrifying Anaerobic Methane-Oxidizing Bacterial Community in the Sediments of the Hunhe River and Its Relationship with Environmental Factors	ZHANG Ya-di, SONG Yong-hui, PENG Jian-feng, <i>et al.</i> (3670)
Influences of Anthropogenic Activities on the Community Structure of N-DAMO Bacteria in the North Canal	LIU Yang, CHEN Yong-juan, WANG Xiao-yan, <i>et al.</i> (3677)
Impact of Exogenous Nitrogen Import on Sediment Denitrification and N ₂ O Emissions in Ditches Under Different Land Uses	SHE Dong-li, CHEN Xin-yi, GAO Xue-mei, <i>et al.</i> (3689)
Sedimentation Characteristics and Pollutant Content Distribution of Storm Drainage Sediments	SHANG Yu, ZHOU Yi, LIAO An-yi, <i>et al.</i> (3696)
Effect of Cr(VI) on Coagulation Process of Different Coagulants	GAO Qian, ZHANG Da-wei, XU Hui, <i>et al.</i> (3704)
Enhancement of Photoelectrocatalytic Degradation of Bisphenol A with Peroxymonosulfate Activated by a Co ₃ O ₄ /BiVO ₄ Composite Photoanode	LI Jiang, WANG Yan, ZHANG Xiu-fang, <i>et al.</i> (3713)
Preparation and Characterization of a Calcium Alginate/Biochar Microsphere and Its Adsorption Characteristics and Mechanisms for Pb(II)	YU Chang-jiang, DONG Xin-yu, WANG Miao, <i>et al.</i> (3719)
Behaviors and Mechanisms of CIP and OFL Adsorption by Magnetic Biochar	ZHAO Hua-xuan, LANG Yin-hai (3729)
Optimization and Validation of the Analytical Method to Detect New Psychoactive Substances in Wastewater	CHEN Pei-pei, DU Peng, ZHOU Zi-lei, <i>et al.</i> (3736)
Effect of Hybrid Process of Pre-ozonation and CNT Modification on Hollow Fiber Membrane Fouling Control	GUAN Yu-qi, WANG Kai-lun, ZHU Xue-dong, <i>et al.</i> (3744)
Bioregeneration of Anion Exchange Resin Used in Nitrate Removal	YE Ting, ZHANG Guang, WANG Ke, <i>et al.</i> (3753)
Preparation of Prussian Blue@Yeast Catalyst and Its Heterogeneous Fenton Performance	CHEN Si, BAI Bo, WANG Hong-lun, <i>et al.</i> (3759)
Nitrogen Removal of Double-bacteria-layer System via PN/A Process	XU Jing-yi, DU Jun, YANG Yi-feng, <i>et al.</i> (3767)
Inhibitory Effect of Phenol on Phosphorus Removal Performance of an EBPR System	MA Juan, WANG Jin, YU Xiao-jun, <i>et al.</i> (3775)
Treatment of Old Landfill Leachate via a Denitrification-Partial Nitritation-ANAMMOX Process	WANG Fan, LU Ming-yu, YIN Ji-qiang, <i>et al.</i> (3782)
Denitrification Characteristics and Functional Genes of Denitrifying Bacteria Under Aerobic or Anaerobic Conditions	KANG Peng-liang, CHEN Sheng-nan, HUANG Ting-lin, <i>et al.</i> (3789)
Characteristic of Benzo[a]pyrene Anaerobic Degradation by Phenol Co-substrate and Microbial Communities from Two Types of Sludge	WU Hai-zhen, HU Xiao-yi, WANG Ming, <i>et al.</i> (3797)
Spectroscopic Characterization of DOM During Hyperthermophilic Composting of Sewage Sludge	LIU Xiao-ming, YU Zhen, ZHOU Pu-xiong, <i>et al.</i> (3807)
Effects of Biochar on Nitrous Oxide Fluxes and the Abundance of Related Functional Genes from Agriculture Soil in the North China Plain	LIU Xing-ren, ZHAO Guang-xin, ZHANG Qing-wen, <i>et al.</i> (3816)
Nitrous Oxide Production in Response to Oxygen in a Solar Greenhouse Vegetable Soil	CHEN Ji-ji, SONG He, CAO Wen-chao, <i>et al.</i> (3826)
Comprehensive Study of Lead Speciation and Its Bioavailability in Soils From a Lead/Zinc Mining Area by Micro X-Ray Fluorescence and X-Ray Absorption Near-Edge Structure	SUN Xiao-yan, LIU Jian, LUO Li-qiang (3835)
Assessment of Heavy Metal Pollution in Soil and Its Bioaccumulation by Dominant Plants in a Lead-Zinc Mining Area, Nanjing	LI Jun-kai, ZHANG Dan, ZHOU Pei, <i>et al.</i> (3845)
Preparation of Iron-Aluminum Modified Diatomite and Its Immobilization in Cadmium-Polluted Soil	YANG Yu-zhong, ZHU Jian, XIAO Yuan-yuan, <i>et al.</i> (3854)
Transfer of Soil Organic Carbon to Inorganic Carbon in Arid Oasis Based on Stable Carbon Isotope Technique	LI Yang-mei, GONG Lu, AN Shen-qun, <i>et al.</i> (3867)
Environmental Filters Drive the Assembly of the Soil Fungal Community in the <i>Larix principis-rupprechtii</i> Forests of the Guandi Mountains	ZHAO Peng-yu, LI Cui, CHAI Bao-feng (3876)
Effects of Transgenic Maize with <i>cry1Ab</i> and <i>Epsps</i> Genes C0030.3.5 on the Abundance and Community Structure of Soil Nitrogen-fixing Bacteria	WANG Rui, ZHU Ke, LI Gang, <i>et al.</i> (3885)
Effects of Gypsum on CH ₄ Emission and Functional Microbial Communities in Paddy Soil	HU Xiang-yu, XIANG Qiu-jie, MU Zhi-jian (3894)
Effects of Long-term Fertilization on Enzyme Activities in Profile of Paddy Soil Profiles	DU Lin-sen, TANG Mei-ling, ZHU Zhen-ke, <i>et al.</i> (3901)
Effects of Sediment Burial and Exogenous Cd Input on Biomass Allocation and Antioxidative Enzyme Activities of <i>Suaeda salsa</i> in the Coastal Wetland of the Yellow River Delta	SONG Hong-li, WANG Li-zhi, YU Wan-ni, <i>et al.</i> (3910)
Pollution Characteristics and Health Risk Assessment of Heavy Metals in Wheat Grains Cultivated in Kaifeng Irrigation Area of the Yellow River	KANG Guo-hua, ZHANG Peng-yan, LI Yan-yan, <i>et al.</i> (3917)
Effect of Graphene Oxide on Algal Toxicity of Dibutyl Phthalate	TU Hai-feng, LIU Cheng, WANG Yu-qing, <i>et al.</i> (3927)
Effects of Organic Substrates on ANAMMOX-MFC Denitrification Electrogenesis Performance	ZU Bo, MA Lan, LIU Bo, <i>et al.</i> (3937)
Well-to-Wheels Fossil Energy Consumption and CO ₂ Emissions of Hydrogen Fuel Cell Vehicles in China	LIN Ting, WU Ye, HE Xiao-yi, <i>et al.</i> (3946)
Secondary Organic Aerosols from Aqueous Reaction of Aerosol Water	YE Zhao-lian, QU Zhen-xiu, MA Shuai-shuai, <i>et al.</i> (3954)