

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第11期

Vol.33 No.11

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

京津冀与长三角区域大气 NO ₂ 污染特征	王英, 李令军, 刘阳 (3685)
2008~2011 年夏季京津冀区域背景大气污染变化分析	杨俊益, 辛金元, 吉东生, 朱彬 (3693)
沧州市大气污染特征观测研究	王永宏, 胡波, 王跃思, 刘伟, 张武 (3705)
华北工业城市降水中金属元素污染特征及来源	李月梅, 潘月鹏, 王跃思, 王英锋, 李杏茹 (3712)
广州市交通主干道空气中苯系物的测量	叶丛雷, 谢品华, 秦敏, 凌六一, 郑尼娜, 刘文彬, 黄祖照 (3718)
基于实时交通信息的道路机动车动态排放清单模拟研究	黄成, 刘娟, 陈长虹, 张健, 刘登国, 朱景瑜, 黄伟明, 巢渊 (3725)
柴油轿车燃用煤基 F-T 合成油的排放特性	胡志远, 程亮, 谭丕强, 楼狄明 (3733)
九龙江口滨海湿地生源要素空间分布特征	余小青, 杨军, 刘乐冕, 田原, 余正, 王昌付 (3739)
南四湖水体氮、磷营养盐时空分布特征及营养状态评价	舒凤月, 刘玉配, 赵颖, 吴艳鹏, 李爱华 (3748)
天目湖流域湿地对氮磷输出影响研究	李兆富, 刘红玉, 李恒鹏 (3753)
北京市新建城区不透水地表径流 N、P 输出形态特征研究	李立青, 吕书丛, 朱仁肖, 刘泽权, 单保庆 (3760)
云阳宗海库的分布与来源	张玉玺, 向小平, 张英, 陈玺, 刘景涛, 王金翠, 张媛静, 孙继朝 (3768)
南方某城市地表水体中粪源性污染指示微生物的分布特征研究	孙傅, 沙婧, 刘彦华 (3778)
三峡库区大宁河藻细胞昼夜垂直迁移研究	张永生, 郑丙辉, 姜霞, 郑浩, 钟娜, 陈春宵 (3787)
江淮农村生态型排水系统构建及截污作用研究	单保庆, 李楠, 唐文忠 (3797)
人工湿地植物床-沟壕系统水质净化效果	汪仲琼, 张荣斌, 陈庆华, 魏宏斌, 王为东 (3804)
潜流人工湿地演变对废水中有机物、氮及磷去除的影响	魏泽军, 谢建平, 黄玉明 (3812)
人工湿地处理含盐生活污水的特性研究	高峰, 杨朝晖, 李晨, 金卫红, 邓一兵 (3820)
催化湿式氧化法降解水中的 β -萘酚	刘杰, 于超英, 赵培庆, 陈革新 (3826)
ZVI/EDDS/Air 体系降解水中 2,4-二氯酚的研究	孙倩, 周海燕, 曹梦华, 吴琳娜, 王琳玲, 陈静, 陆晓华 (3833)
微波改性 MWNTs/TiO ₂ 复合材料对 1,2,3-三氯苯的光催化降解研究	施周, 张茜, 张伟, 徐舜开, 张骅 (3840)
腐殖酸对生物炭去除水中 Cr(VI) 的影响机制研究	丁文川, 田秀美, 王定勇, 曾晓岚, 徐茜, 陈健康, 艾小雨 (3847)
臭氧氧化-活性污泥法处理含 PVA 工业废水的试验研究	邢晓琼, 黄程兰, 刘敏, 陈滢 (3854)
复合底物对颗粒化 EBPR 系统除磷特性的影响及优化试验研究	徐少娟, 孙培德, 郑雄柳, 董毅 (3859)
进水比例对水解反应器出水水质的影响研究	梁康强, 熊娅, 戚茂荣, 林秀军, 朱民, 宋英豪 (3868)
厌氧-好氧联合型生物反应器填埋场渗滤液水质水量变化规律的研究	韩智勇, 刘丹, 李启彬, 陈馨 (3873)
我国城市污水处理回用调查研究	郭宇杰, 王学超, 周振民 (3881)
快雌醇和壬基酚在土壤中的吸附-解吸特征	姜鲁, 王继华, 李建忠, 辛佳, 李森, 刘翔 (3885)
黄土丘陵区刺槐林深层土壤有机碳矿化特征初探	马昕昕, 许明祥, 杨凯 (3893)
半干旱黄土丘陵区土壤结皮的地表水文效应	卫伟, 温智, 陈利顶, 陈瑾, 吴东平 (3901)
广西大石围巨型漏斗土壤中多环芳烃与环境因素	孔祥胜, 祁士华, 蒋忠诚, 黄保健 (3905)
酸性条件下黄铁矿氧化机制的研究	王楠, 易筱筠, 党志, 刘云 (3916)
淋洗条件下砂土和粉土盐运移过程的监测研究	付腾飞, 贾永刚, 郭磊, 刘晓磊 (3922)
空气注射修复苯污染地下水模拟研究	樊艳玲, 姜林, 张丹, 钟茂生, 贾晓洋 (3927)
不同终点检测 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7 的细胞毒性	张帅帅, 刘堰, 刘树深, 朱祥伟 (3935)
上海世博园后滩湿地糙足类群落特征及其对环境因子的响应	陈立婧, 吴艳芳, 景钰湘, 王聪, 张饮江 (3941)
耐盐石油降解菌的筛选鉴定及其特性研究	吴涛, 谢文军, 依艳丽, 李小彬, 王君, 胡相明 (3949)
高效降酚菌株 <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10 生长动力学和苯酚降解特性的研究	陈晓华, 魏刚, 刘思远, 孙江曼, 王芳芳, 李昊源, 刘宇军 (3956)
四溴双酚 A 好氧降解菌的筛选及其降解特性研究	钱艳园, 刘莉莉, 于晓娟, 丁丛, 王志平, 施玉衡, 李晨君 (3962)
长期施用有机和无机肥对黑土 <i>nirS</i> 型反硝化菌种群结构和丰度的影响	尹昌, 范分良, 李兆君, 宋阿琳, 朱平, 彭畅, 梁永超 (3967)
三氯乙烯在不同土壤中的吸附特性及其影响因素研究	何龙, 邱兆富, 吕树光, 逯志昌, 王治立, 隋倩, 林匡飞, 刘勇弟 (3976)
多菌灵在农田土壤中的降解及其影响因素研究	肖文丹, 杨肖娥, 李廷强 (3983)
硫化物对垃圾焚烧污泥焚烧飞灰高温过程中重金属挥发的影响	刘敬勇, 孙永裕 (3990)
关于医疗垃圾飞灰中二噁英在惰性气氛下的低温热脱附研究	纪莎莎, 李晓东, 徐旭, 陈彤 (3999)
第七届环境模拟与污染控制学术研讨会论文	
稻田气溶胶 NH ₃ 和气体 NO _x 排放在线测定研究	龚巍巍, 栾胜基 (4006)
一种可同时检测挥发性氯代烷烃和氯代烯烃的电子鼻的研制	文晓刚, 刘锐, 蔡强, 万梅, 汤灵容, 陈吕军 (4012)
基于被动采样技术的垃圾焚烧厂及周边大气中 PAHs 分布研究	孙少艾, 李洋, 周轶, 王海蛟, 孙英 (4018)
涪江流域农业非点源污染空间分布及污染源识别	丁晓雯, 沈珍瑶 (4025)
人工湿地不同区域基质磷含量的差异分析	曹雪莹, 种云霄, 余光伟, 仲海涛 (4033)
基于 RT-qPCR 选择性检测水中活性病原菌	林怡雯, 李丹, 吴舒旭, 何苗, 杨天 (4040)
消毒副产物生成的温度影响和动力学模型	张小璐, 杨宏伟, 王小仵, 付静, 解跃峰 (4046)
一种厌氧微观定量研究新方法	张仲良, 吴静, 蒋剑凯, 姜洁, 李怀志 (4052)
梧桐树叶作为反硝化碳源的研究	熊剑锋, 徐华, 阎宁, 张永明 (4057)
降解嗜盐菌 AD-3 的筛选、降解特性及加氧酶基因的研究	崔长征, 冯天才, 于亚琦, 董斐, 杨昕梅, 冯耀宇, 刘勇弟, 林汉平 (4062)
《环境科学》征订启事 (3711) 《环境科学》征稿简则 (3767) 信息 (3998, 4039, 4045, 4056) 专辑征稿通知 (4051)	

基于 RT-qPCR 选择性检测水中活性病原菌

林怡雯, 李丹, 吴舒旭, 何苗*, 杨天

(清华大学环境学院, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 以大肠杆菌和粪肠球菌作为研究对象, 研究建立了一种逆转录定量 PCR (reverse transcription q quantitative PCR, RT-qPCR) 方法, 以选择性检测水中活性病原菌. 研究结果表明, 细菌体内的 RNA 经过 RT-PCR 逆转录成 cDNA 后利用 qPCR 可定量目的基因拷贝数, 对处于稳定生长期的大肠杆菌 (培养 6 ~ 18 h) 和粪肠球菌 (培养 10 ~ 38 h) 体内的 RNA 含量进行检测分别为 $1 \text{ copies} \cdot \text{CFU}^{-1}$ 和 $7.98 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \text{CFU}^{-1}$, 以此作为细菌定量的依据, 达到准确定量检测水体中目的基因 RNA 拷贝数而确定活性细菌含量的目的. 通过 3 种方法 (培养法、qPCR、RT-qPCR) 检测热灭活后的大肠杆菌和粪肠球菌, 结果表明与 qPCR 相比, RT-qPCR 能够区分 $1.43 \lg \text{ copy}$ (大肠杆菌) 与 $2.5 \lg \text{ copy}$ (粪肠球菌) 的非活性菌, 进而选择性检测活性病原菌. 实际水样底物基质对 RT-qPCR 方法的影响不大, RT-qPCR 与培养法之间有良好的线性相关性 (大肠杆菌, $R^2 = 0.930$, 粪肠球菌, $R^2 = 0.948$), 本研究建立的方法可以用于实际水样活性病原菌的检测.

关键词: 逆转录定量 PCR; RNA; 大肠杆菌; 粪肠球菌; 活性菌

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)11-4040-06

Selective Detection of Viable Pathogenic Bacteria in Water Using Reverse Transcription Quantitative PCR

LIN Yi-wen, LI Dan, WU Shu-xu, HE Miao, YANG Tian

(State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A reverse transcription q quantitative PCR (RT-qPCR) assay method was established, which can quantify the copy numbers of RNA in pathogenic bacteria of *E. coli* and *Enterococcus faecium*. The results showed that cDNA was generated with the RT-PCR reagents, target gene was quantified with the qPCR, the copy numbers of RNA were stable at about $1 \text{ copies} \cdot \text{CFU}^{-1}$ for *E. coli* and $7.98 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \text{CFU}^{-1}$ for *Enterococcus faecium* respectively during the stationary grow phase for the both indicator bacteria [*E. coli* (6-18 h) and *Enterococcus faecium* (10-38 h)]. The established RT-qPCR method can quantify the numbers of viable bacteria through detecting bacterial RNA targets. Through detecting the heat-treated *E. coli* and *Enterococcus faecium* by three methods (culture method, qPCR, RT-qPCR), we found that the qPCR and RT-qPCR can distinguish $1.43 \lg \text{ copy}$ non-viable *E. coli* and $2.5 \lg \text{ copy}$ non-viable *Enterococcus faecium*. These results indicated that the established methods could effectively distinguish viable bacteria from non-viable bacteria. Finally we used this method to evaluate the real effluents of the secondary sedimentation of wastewater treatment plant (WWTP), the results showed that the correlation coefficients (R^2) between RT-qPCR and culture method were 0.930 (*E. coli*) and 0.948 (*Enterococcus faecium*), and this established RT-PCR method can rapidly detect viable pathogenic bacteria in genuine waters.

Key words: reverse transcription q quantitative PCR (RT-qPCR); RNA; *E. coli*; *Enterococcus faecium*; viable bacteria

环境水体中病原菌的快速检测是有效控制与预防传染性疾病暴发、保障水质卫生学安全的技术关键. 目前, 病原菌传统检测方法是培养法, 然而, 研究发现, 细菌在环境压力下可以进入“具有活性但不可培养 (viable but nonculturable, VBNC)”^[1~4] 的状态, 无法用常规培养法检出, 但 VBNC 病原菌仍然保持代谢活性和致病性^[5,6], 能够在环境压力解除后恢复其可培养性, 引发严重的微生物安全风险^[7,8]. 基于 RNA 的 PCR 技术是解决这一问题的途径之一^[9,10]. 与 DNA 相比, RNA 在环境中不稳定, 半衰期甚至只有几分钟, 因此 RNA 可以作为活性病原菌存在的分子信标^[11,12]. 近年来, 已有研究

报道^[13~20] 选择合适的 RNA 作为目的基因, 采用 RT-qPCR 技术来测定活性病原菌.

本研究以水环境中 2 种典型病原菌 (大肠杆菌和粪肠球菌) 为对象, 建立逆转录定量 PCR (RT-qPCR) 检测方法, 研究考察实际水样基质对 RT-qPCR 检测的影响, 并综合评估 RT-qPCR 技术对 2 种病原菌选择性检测活性菌的效果.

收稿日期: 2012-02-14; 修订日期: 2012-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51178242); 中国博士后科学基金项目 (023203010)

作者简介: 林怡雯 (1987 ~), 女, 硕士, 主要研究方向为基于分子生物学的环境病原微生物检测, E-mail: lyw10@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hemiao@mail.tsinghua.edu.cn

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

本研究中使用标准菌株购自中国普通微生物菌种保存中心: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, CGMCC 1.2385) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecium*, CGMCC 1.2315)。

大肠杆菌与粪肠球菌培养均选用 LB 培养基 (胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121℃ 灭菌 20 min)。

RT-qPCR 所需试剂及仪器: 逆转录试剂盒 ExScript™ RT reagent Kit Perfect Real Time (Code: DRR037A), 荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ (Code: DRR041A) 和 Premix Ex Taq™ (Code: DRR039A) 购自日本 Takara 公司; iCycler iQ5 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

其他试剂与仪器: 全基因组 RNA 提取试剂盒 RNA prep pure Cell/Bacteria Kit (Code: DP430) 购自

TIANGEN 公司。高速离心机购自德国 Eppendorf 公司; Biosep-mini 核酸蛋白仪购自日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生长曲线的测定

将 1 mL 培养过夜的大肠杆菌 ($D_{600} = 0.11$) 接和 1 mL 培养过夜的粪肠球菌 ($D_{600} = 0.06$) 接种到 100 mL 的 LB 培养基中, 分别设 3 个平行样, 置于 37℃, 150 r·min⁻¹ 培养。每 2 h 取一次样, 测定细胞数 (平板计数法)。取 500 μL 细菌混合液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 去上清液后将其贮存于 -20℃ 用于 DNA 提取; 取 500 μL 细菌混合液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 去上清液后将其贮存于 -80℃ 用于 RNA 提取。

1.2.2 qPCR 引物和探针的选择

本研究采用 SYBR® Green qPCR 定量检测大肠杆菌^[21], 采用 Taqman® qPCR 定量检测粪肠球菌^[22]。所采用的目的基因、相应的引物以及探针序列见表 1。

表 1 qPCR 采用的目的基因、相应引物以及探针序列

Table 1 Gene targets and primers used for qPCR detection

引物与探针	目的基因	序列 (5'-3')	PCR 产物长度
<i>E. coli</i>			
UAL1939b	uidA	ATGGAATTTGCGCCGATTTTGC	167 bp
UAL2105b		ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC	
<i>Enterococci</i>			
ECST748F	23S rRNA	AGAAATTCCAAACGAACCTTG	86 bp
ENC854R		CAGTGTCTACCTCCATCATT	
GPL813TQ		FAM-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA-TAMRA	

1.2.3 qPCR 标准品的制备

本研究所采用的标准品为质粒标准品, 制作方法见文献[23], 大肠杆菌制备含有 uidA 基因的质粒 DNA, 粪肠球菌制备含有 23S rRNA 基因的质粒 DNA。提取的质粒 DNA 采用核酸蛋白仪测定 DNA 的浓度, 按照以下公式换算成基因拷贝数:

基因拷贝数 (copies·ng⁻¹) = $(n \times M_w) / (NL \times 10^{-9})$
 式中, n 为核苷酸长度 (bp), M_w 为核苷酸质量, 双链 DNA 一对核苷酸的质量为 660, NL 为阿伏伽德罗常数 6.02×10^{23} 。

将提取的 DNA 按 10 倍梯度稀释便得到 qPCR 的标准品。本研究中制备的大肠杆菌标准品浓度为 2.5×10^{11} copies·μL⁻¹; 粪肠球菌为 6×10^{11} copies·μL⁻¹。

1.2.4 逆转录

大肠杆菌和粪肠球菌的 RT 的反应体系为 (10 μL): 5 × PrimeScript® Buffer (for Real Time) 2 μL,

PrimeScript® RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT (50 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, Random 6 mers (100 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, Total RNA 6.5 μL。RT-PCR 反应程序如下: 37℃ 15 min (反转录反应), 85℃ 5 s (反转录酶的失活反应), 反应得到的 cDNA 于 -20℃ 保存。

1.2.5 qPCR

大肠杆菌 qPCR 的反应体系为 (20 μL): SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL, 上下游引物各 0.8 μL (终浓度 0.4 μmol·L⁻¹), DNA (标准品或样品) 2 μL, 双蒸水 6.4 μL 补足体积至 20 μL。定量 PCR 反应程序如下: 1 个循环: 95℃, 30 s; 40 个循环: 95℃, 5 s, 60℃, 20 s, 72℃, 15 s (收集荧光); 溶解曲线的过程为: 95℃, 1 min, 从 60℃ 开始每 30 s 温度升高 0.5℃, 总共进行 71 个循环, 结束温度为 95℃, 反应结束之后 4℃ 保存。

粪肠球菌 qPCR 的反应体系 (25 μL) 为: Premix Ex Taq™ 12.5 μL, 上下游引物各 2.5 μL (终浓度

1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Taqman[®] 荧光探针 1 μL (终浓度 0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), DNA (标准品或样品) 5 μL , 双蒸水 1.5 μL 补足体积至 25 μL . qPCR 反应程序如下: 1 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 120 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s (收集荧光), 无熔解曲线过程, 反应结束后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

2 结果与讨论

2.1 qPCR 的线性检测区间与特异性

qPCR 的线性检测区间如下: 大肠杆菌为 $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{reaction}^{-1}$; 粪肠球菌为 $3 \times 10^1 \sim 3 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{reaction}^{-1}$. 以标准品浓度对数值为横坐标, 临界循环数 (threshold cycle) 为纵坐标建立 qPCR 的曲线 (图 1). 大肠杆菌标准品为本实验室已经制备, 具体见文献 [24].

大肠杆菌和粪肠球菌标准曲线的线性相关系数 (R^2) 均大于 0.99, PCR 扩增效率在 90% ~ 110% 之间. 大肠杆菌熔解曲线呈单一的熔点峰, 峰窄而尖, 峰值为 $87^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. 由于 Taqman[®] 只能与特异性的 PCR 物结合, 不存在非特异性扩增产物和引物二聚体的干扰, 因此粪肠球菌的 qPCR 不进行熔解曲线分析.

上述结果表明, 本研究建立的 qPCR 方法检测限低、定量区间广且特异性强, 符合制备 qPCR 标准曲线的要求.

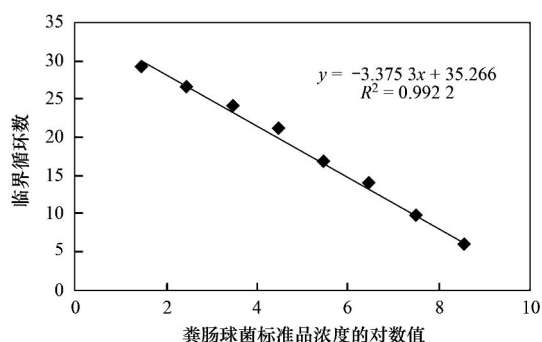


图 1 粪肠球菌的 qPCR 标准曲线

Fig. 1 The qPCR standard curve for *Enterococcus faecium*

2.2 比较不同生理状态下 qPCR 与 RT-qPCR 的检测结果

根据测定结果获得两种病原菌的生长曲线, 截取关键时间点提取 DNA 与 RNA 采用 qPCR 与 RT-qPCR 测定其浓度, 单位病原菌上的 DNA 与 RNA 拷贝数 (图 2、图 3).

大肠杆菌在培养基中培养了 30 h 后得到了大肠杆菌的生长曲线图. 培养 2 h 后进入对数生长期,

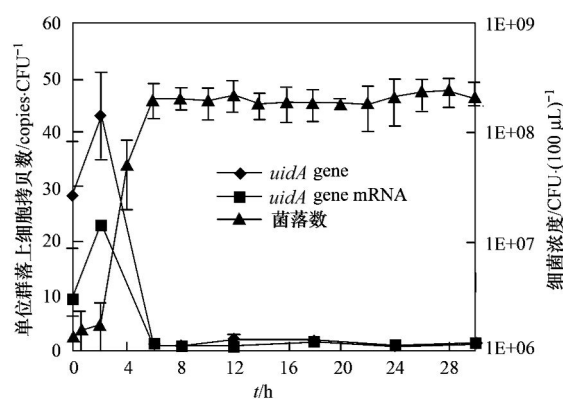


图 2 大肠杆菌生长曲线与单位大肠杆菌上 *uidA* 基因的 DNA/RNA 拷贝数

Fig. 2 Growth curve of *E. coli*, numbers of *uidA* gene DNA/RNA copies per CFU

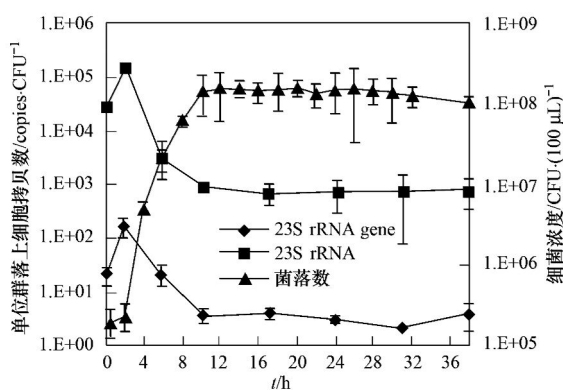


图 3 粪肠球菌生长曲线与单位粪肠球菌上 23S rRNA 基因的 DNA/RNA 拷贝数

Fig. 3 Growth curve of *Enterococcus faecium*, numbers of 23S rRNA gene DNA/RNA copies per CFU

期, 到 6 h 后到达稳定期, 如图 2 所示, 在停滞期 (0 ~ 2 h), 单位细胞内 DNA 与 RNA 的浓度均迅速上升, 最大值分别达到了 43 $\text{copies}\cdot\text{CFU}^{-1}$ 与 23 $\text{copies}\cdot\text{CFU}^{-1}$; 而在对数生长期 (2 ~ 6 h), 单位细胞内的 DNA 与 RNA 浓度均迅速下降至 1 $\text{copies}\cdot\text{CFU}^{-1}$; 在稳定期 (6 ~ 18 h), 单位细胞内的 DNA 与 RNA 浓度均维持在 1 $\text{copies}\cdot\text{CFU}^{-1}$.

粪肠球菌生长曲线如图 3 所示, 在接种 2 h 内, 细菌处于停滞期; 2 h 以后进入对数生长期; 到 10 h 后进入稳定期. 当细菌处于延滞期时 (0 ~ 2 h), 单位细胞内的 DNA 与 RNA 的浓度迅速上升, 最大值分别达到了 $1.72 \times 10^2 \text{ copies}\cdot\text{CFU}^{-1}$ 与 $1.54 \times 10^5 \text{ copies}\cdot\text{CFU}^{-1}$; 在稳定期 (10 ~ 38 h), 单位细胞内的 DNA 拷贝数在 4 copies 左右, 而 RNA 拷贝数则维持在 $7.98 \times 10^2 \text{ copies}\cdot\text{CFU}^{-1}$.

2.3 验证 RT-qPCR 对病原菌活性菌的选择性检测

取 1 mL 处于稳定生长期的大肠杆菌和粪肠球菌(37℃下培养 24 h), 在 95℃ 热灭活 10 min, 制备非活性菌。将非活性菌与活性菌分别按 1: 999、

100: 900、500: 500、900: 100、999: 1 比例投加, 同时采用 RT-qPCR 与 qPCR、培养法进行检测, 检测结果见图 4。

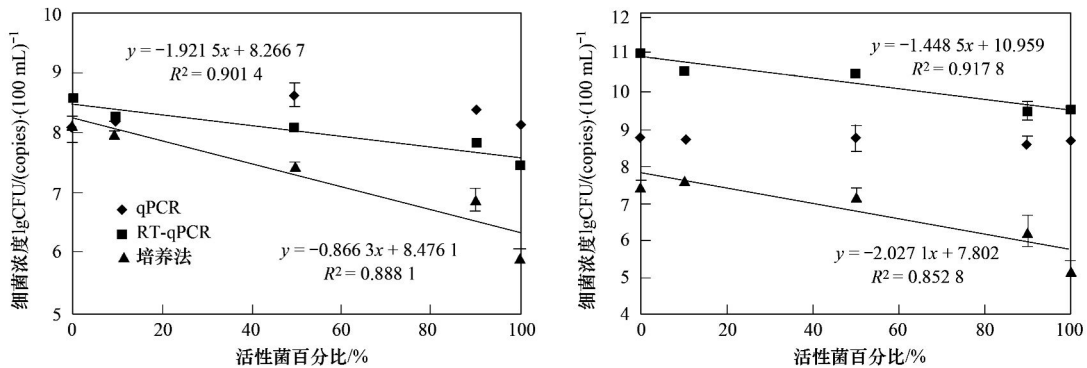


图 4 RT-qPCR 与 qPCR 对不同病原菌的检测结果

Fig. 4 Comparison of detection results using RT-qPCR and qPCR for different pathogens

图 4 表明, 常规 qPCR 对于非活性菌的检测结果相比于活性菌并没有下降, 这主要由于病原菌体内的 DNA 比较稳定, 能够在细菌死后一段时间内长期稳定存在, 使得 qPCR 的检测结果不仅包括了活性病原菌也包括了非活性病原菌而高估样品中的活性菌的数量。RT-qPCR 对于非活性菌的检测结果介于培养法与 qPCR 的检测结果之间, 当非活性菌的比例增大时, RT-qPCR 与培养法的检测值均有明显地下降。当活性菌仅为 0.1% 时, 培养法检测大肠杆菌和粪肠球菌分别下降了 2.28 lg 与 2.26 lg, 而采用 RT-qPCR 检测时分别下降了 1.43 lg (大肠杆菌) 与 2.5 lg (粪肠球菌), 说明 RNA 在非活性菌内降解

速率较快。当细菌处于不利温度条件时有可能进入 VBNC 状态, 处于这种状态的细菌无法用培养法检测而其 RNA 仍然存在^[25], 这可能是 RT-qPCR 检测结果较培养法高的原因。综上所述, RT-qPCR 检测技术能够较为有效地区分活性菌与非活性菌。

2.4 水样中底物基质对 RT-qPCR 的影响

为了评估实际样品基质对 RT-qPCR 方法的影响, 将梯度稀释的 100 μL 的细菌 (细菌数在 $10^0 \sim 10^7$ 个培养 12 h 后) 分别接种到 10 mL 的去离子水和高压灭菌的二沉出水 (secondary sedimentation effluent, SSE) 中, 每组实验同时设置阴性对照, 检测结果如图 5。

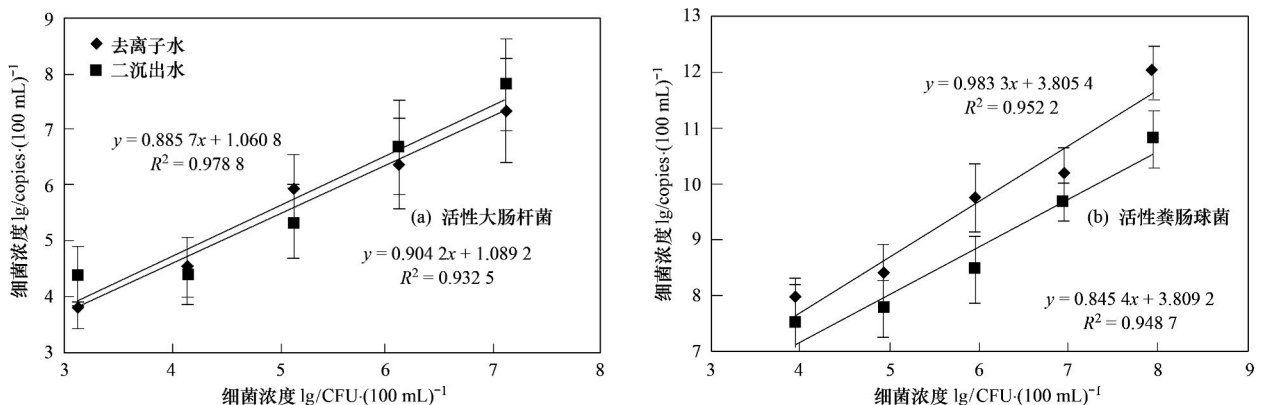


图 5 水样中底物基质对 RT-qPCR 的影响

Fig. 5 Effects of matrix in genuine waters on the detection result of RT-qPCR method

由图 5 可以得到, 当细菌接种到去离子水中时, RT-qPCR 与培养法之间有明显的线性相关性 (*uidA* 基因的线性相关系数 R^2 为 0.978, 23S rRNA 的线性相关系数 R^2 为 0.952)。当细菌接种到二沉出水中时, RT-qPCR 与培养法之间仍有比较明显的

线性相关性 (*uidA* 基因的线性相关系数 R^2 分别为 0.932, 23S rRNA 的线性相关系数 R^2 为 0.948)。两种细菌 RT-qPCR 方法的检出限为 10^3 个, 当细菌浓度较低时, 检测结果与背景值相似 (图中并没有显示)。由于 rRNA 在细菌体内的拷贝数较多, 不同

水质条件对其检测结果影响较小. 综上所述, RT-qPCR 方法检测去离子水中与在实际水样中的活性菌与培养法有较好的相关性, 底物基质对该方法的影响不大, RT-qPCR 方法能够应用于实际水样活性菌的检测.

3 结论

(1) 以水环境中 2 种典型病原菌(大肠杆菌和粪肠球菌)为研究对象, 采用 RT-PCR 将细菌体内的 RNA 逆转录成 cDNA 后利用 qPCR 定量检测目的基因的 cDNA 的拷贝数; 检测两种在不同生理状态时单位病原菌体内 RNA 拷贝数, 当处于稳定生长期时 RNA 拷贝数分别稳定在 $1 \text{ copies} \cdot \text{CFU}^{-1}$ 和 $7.98 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \text{CFU}^{-1}$, 将此作为细菌个数定量的依据, 选择性检测水体中细菌的 RNA 拷贝数进而定量细菌个数.

(2) 通过比较检测热灭活后的病原菌, RT-qPCR 能够分别区分 1.43 lg (大肠杆菌)与 2.5 lg (粪肠球菌)数量级的非活性菌, 因此 RT-qPCR 选择性检测技术能够有效区分活性菌与非活性菌.

(3) 应用本研究建立的方法, 检测实际城市污水处理厂二级出水, 结果表明, RT-qPCR 与培养法之间有较好的线性相关性, 大肠杆菌和粪肠球菌的线性相关系数 R^2 分别为 0.930 和 0.948 0, 说明实际水样中的杂质对该方法影响不大, 因此本研究建立的 RT-qPCR 方法能够很好地应用于实际水样中活性菌的选择性检测.

参考文献:

- [1] Oliver J D, Dagher M, Linden K G. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater [J]. *Water Health*, 2005, **3**(3): 249-257.
- [2] Liu Y, Wang C, Tyrrell G, *et al.* Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Water Research*, 2010, **44**(3): 711-718.
- [3] Bjergbaek L A, Rosley P. Formation of non-culturable *Escherichia coli* in drinking water [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, **99**(5): 1090-1098.
- [4] Smith B, Olive J D. *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(2): 1445-1451.
- [5] Saux M F, Hervio-Heath D, Loaec S, *et al.* Detection of cytotoxin hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(11): 5641-5646.
- [6] Berry D, Xi C, Raskin L. Effect of growth conditions on inactivation of *Escherichia coli* with monochloramine [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, **43**(3): 884-889.
- [7] Jjemba P K, Weinrich L A, Cheng W, *et al.* Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76**(13): 4169-4178.
- [8] Cotruvo J A, Dufour A, Rees G, *et al.* Waterborne zoonoses: identification, causes and control [D]. London: World Health Organization, 2004.
- [9] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, *et al.* Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(1): 290-296.
- [10] Palmer C, Bik E M, Eisen M B, *et al.* Rapid quantitative profiling of complex microbial populations [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, **34**(1): e5.
- [11] Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, D'Agostino M, *et al.* Application of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the detection of viable foodborne pathogens: progress and challenges [J]. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2006, **14**(3): 218-236.
- [12] Luna G M, Dell'Anno A, Pietrangeli B, *et al.* A new molecular approach based on qPCR for the quantification of fecal bacteria in contaminated marine sediments [J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, **157**(4): 446-453.
- [13] Ye K P, Zhang Q Q, Jiang Y, *et al.* Rapid detection of viable *Listeria monocytogenes* in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR [J]. *Food Control*, 2012, **25**(1): 117-124.
- [14] McCabe E M, Burgess C M, Walsh D, *et al.* Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hlyA* gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* [J]. *Food Microbiology*, 2011, **28**(3): 447-456.
- [15] Miller N D, Davidson P M, D'Souza D H. Real-time reverse-transcriptase PCR for *Salmonella typhimurium* detection from lettuce and tomatoes [J]. *LW T-Food Science and Technology*, 2011, **44**(4): 1088-1097.
- [16] Miller N D, Draughon F A, D'Souza D H. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for *Salmonella enterica* detection from jalapeno and serrano peppers [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, **7**(4): 367-373.
- [17] Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, *et al.* Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(7): 1961-1969.
- [18] Fey A, Eichler S, Flavie S, *et al.* Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(6): 3618-3623.

- [19] Jacobsen C S, Holben W E. Quantification of mRNA in *Salmonella* sp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, **69**(2): 315-321.
- [20] Gao W M, Zhang W W, Meldrum D R. RT-qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, **85**(3): 221-227.
- [21] Heijnen L, Medema G. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR[J]. Journal of Water and Health, 2006, **4**(4): 487-498.
- [22] Haugland R A, Siefring S C, Wymer L J, et al. Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis[J]. Water Research, 2005, **39**(4): 559-568.
- [23] 胡秀华, 何苗, 刘丽, 等. 水中轮状病毒实时定量 PCR 外标准品的构建[J]. 环境科学, 2008, **29**(2): 380-385.
- [24] 仝铁铮, 吴舒旭, 李丹, 等. 基于 PMA-定量 PCR 选择性检测技术的病原菌消毒特性研究[J]. 环境科学, 2011, **32**(4): 1120-1126.
- [25] Reissbrodt R, Rienaeker I, Romonova J M, et al. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(10): 4788-4794.

《环境科学》多项引证指标名列前茅

2011 年 12 月 2 日,中国科学技术信息研究所在中国科技论文统计结果发布会上公布了 2010 年度中国科技论文统计结果. 统计结果显示 2010 年度《环境科学》多项引证指标位居环境科学技术、安全科学技术类科技期刊前列.

综合评价总分 86.5,排名第一(排名前三名的期刊分别是《环境科学》86.5,《中国环境科学》77.9,《环境科学学报》77.3).

总被引频次 5 197,排名第一(排名前三名的期刊分别是《环境科学》5 197,《环境科学学报》3 914,《农业环境科学学报》3 700).

影响因子 1.125,排名第三(排名前三名的期刊分别是《环境科学研究》1.531,《中国环境科学》1.457,《环境科学》1.125).

综合评价总分是根据中国科技期刊综合评价指标体系,计算多项科学计量指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等),采用层次分析法确定重要指标的权重,分学科对每种期刊进行综合评定,计算出每个期刊的综合评价总分. 这项指标屏蔽了各个学科之间总体指标背景值的差异,使科技期刊可以进行跨学科比较. 根据发布的统计结果,2010 年度《环境科学》综合评价总分 86.5,在被统计的 1998 种核心期刊中名列第 27 位,在被统计的 36 种环境科学技术、安全科学技术类期刊中名列第一.

CONTENTS

Characteristics of Atmospheric NO ₂ in the Beijing-Tianjin-Hebei Region and the Yangtze River Delta Analyzed by Satellite and Ground Observations	··· WANG Ying, LI Ling-jun, LIU Yang (3685)
Variation Analysis of Background Atmospheric Pollutants in North China During the Summer of 2008 to 2011	····· YANG Jun-yi, XIN Jin-yuan, JI Dong-sheng, <i>et al.</i> (3693)
Characteristics of Atmospheric Pollutants in Cangzhou	····· WANG Yong-hong, HU Bo, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3705)
Chemical Characteristics and Sources of Trace Metals in Precipitation Collected from a Typical Industrial City in Northern China	····· LI Yue-mei, PAN Yue-peng, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3712)
BTX Monitoring Nearby Main Road Traffic in Guangzhou	····· YE Cong-lei, XIE Pin-hua, QIN Min, <i>et al.</i> (3718)
Dynamic Road Vehicle Emission Inventory Simulation Study Based on Real Time Traffic Information	····· HUANG Cheng, LIU Juan, CHEN Chang-hong, <i>et al.</i> (3725)
Emission Characteristics of a Diesel Car Fueled with Coal Based Fischer-Tropsch (F-T) Diesel and Fossil Diesel Blends	····· HU Zhi-yuan, CHENG Liang, TAN Pi-qiang, <i>et al.</i> (3733)
Spatial Variations of Biogenic Elements in Coastal Wetland Sediments of the Jiulong River Estuary	····· YU Xiao-qing, YANG Jun, LIU Le-mian, <i>et al.</i> (3739)
Spatio-Temporal Distribution of TN and TP in Water and Evaluation of Eutrophic State of Lake Nansi	····· SHU Feng-yue, LIU Yu-pei, ZHAO Ying, <i>et al.</i> (3748)
Impact on Nitrogen and Phosphorous Export of Wetlands in Tianmu Lake Watershed	····· LI Zhao-fu, LIU Hong-yu, LI Heng-peng (3753)
Nitrogen and Phosphorus Composition in Urban Runoff from the New Development Area in Beijing	····· LI Li-qing, LÜ Shu-cong, ZHU Ren-xiao, <i>et al.</i> (3760)
Distribution and Sources of Arsenic in Yangzonghai Lake, China	····· ZHANG Yu-xi, XIANG Xiao-ping, ZHANG Ying, <i>et al.</i> (3768)
Occurrence of Fecal Indicator Bacteria in Urban Surface Water: A Case Study in Southern China	····· SUN Fu, SHA Jing, LIU Yan-hua (3778)
Vertical Migration of Algal Cells in the Daning River Bay of the Three Gorges Reservoir	····· ZHANG Yong-sheng, ZHENG Bing-hui, JIANG Xia, <i>et al.</i> (3787)
Construct of Yangtze-Huai River Rural Areas Ecological Drainage System and Its Retention Effect on Pollutants	····· SHAN Bao-qing, LI Nan, TANG Wen-zhong (3797)
Water Treatment Efficiency of Constructed Wetland Plant-Bed/Ditch Systems	····· WANG Zhong-qiong, ZHANG Rong-bin, CHEN Qing-hua, <i>et al.</i> (3804)
Effect of the Subsurface Constructed Wetland Evolution into Free Surface Flow Constructed Wetland on the Removal of Organic Matter, Nitrogen, and Phosphorus in Wastewater	····· WEI Ze-jun, XIE Jian-ping, HUANG Yu-ming (3812)
Treatment Characteristics of Saline Domestic Wastewater by Constructed Wetland	····· GAO Feng, YANG Zhao-hui, LI Chen, <i>et al.</i> (3820)
Degradation of β -Naphthol by Catalytic Wet Air Oxidation	····· LIU Jie, YU Chao-ying, ZHAO Pei-qing, <i>et al.</i> (3826)
Degradation of 2,4-Dichlorophenol in Aqueous Solution by ZVI/EDDS/Air System	····· SUN Qian, ZHOU Hai-yan, CAO Meng-hua, <i>et al.</i> (3833)
Study on Photocatalytic Degradation of 1,2,3-Trichlorobenzene Using the Microwaved MWNTs/TiO ₂ Composite	····· SHI Zhou, ZHANG Qian, ZHANG Wei, <i>et al.</i> (3840)
Mechanism of Cr(VI) Removal from Aqueous Solution Using Biochar Promoted by Humic Acid	····· DING Wen-chuan, TIAN Xiu-mei, WANG Ding-yong, <i>et al.</i> (3847)
Research on the Treatment of Wastewater Containing PVA by Ozonation-Activated Sludge Process	····· XING Xiao-qiong, HUANG Cheng-lan, LIU Min, <i>et al.</i> (3854)
Effects of Composite Substrates on the Phosphorus Removal in Granule-based EBPR System and Its Optimization Experiment	····· XU Shao-juan, SUN Pei-de, ZHENG Xiong-liu, <i>et al.</i> (3859)
Research of Input Water Ratio's Impact on the Quality of Effluent Water from Hydrolysis Reactor	····· LIANG Kang-qiang, XIONG Ya, QI Mao-rong, <i>et al.</i> (3868)
Evolution of Leachate Quantity and Quality in the Anaerobic-semiaerobic Bioreactor Landfill	····· HAN Zhi-yong, LIU Dan, LI Qi-bin, <i>et al.</i> (3873)
National Survey of Urban Sewage Reuse in China	····· GUO Yu-jie, WANG Xue-chao, ZHOU Zhen-min (3881)
Sorption and Desorption of 17 α -Ethinyl Estradiol and 4- <i>n</i> -Nonylphenol in Soil	····· JIANG Lu, WANG Ji-hua, LI Jian-zhong, <i>et al.</i> (3885)
Soil Organic Carbon Mineralization of Black Locust Forest in the Deep Soil Layer of the Hilly Region of the Loess Plateau, China	····· MA Xin-xin, XU Ming-xiang, YANG Kai (3893)
Effects of Soil Crusts on Surface Hydrology in the Semiarid Loess Hilly Area	····· WEI Wei, WEN Zhi, CHEN Li-ding, <i>et al.</i> (3901)
Environmental Factors on Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils from Dashiwei Karst Giant Doline (Tiankeng) in Guangxi, China	····· KONG Xiang-sheng, QI Shi-hua, JIANG Zhong-cheng, <i>et al.</i> (3905)
Investigation on Mechanism of Pyrite Oxidation in Acidic Solutions	····· WANG Nan, YI Xiao-yun, DANG Zhi, <i>et al.</i> (3916)
Monitoring of Water and Salt Transport in Silt and Sandy Soil During the Leaching Process	····· FU Teng-fei, JIA Yong-gang, GUO Lei, <i>et al.</i> (3922)
Simulation on Remediation of Benzene Contaminated Groundwater by Air Sparging	····· FAN Yan-ling, JIANG Lin, ZHANG Dan, <i>et al.</i> (3927)
Detecting the Cytotoxicities of Five Bisphenol A Analogues to the MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell Line Through Different Endpoints	····· ZHANG Shuai-shuai, LIU Yan, LIU Shu-shen, <i>et al.</i> (3935)
Response of Copepod Community Characteristics to Environmental Factors in the Backshore Wetland of Expo Garden, Shanghai	····· CHEN Li-jing, WU Yan-fang, JING Yu-xiang, <i>et al.</i> (3941)
Isolation, Identification and Characterization of Halotolerant Petroleum-degrading Bacteria	····· WU Tao, XIE Wen-jun, YI Yan-li, <i>et al.</i> (3949)
Growth Kinetics and Phenol Degradation of Highly Efficient Phenol-degrading <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10	····· CHEN Xiao-hua, WEI Gang, LIU Si-yuan, <i>et al.</i> (3956)
Isolation of Aerobic Degrading Strains for TBBPA and the Properties of Biodegradation	····· QIAN Yan-yuan, LIU Li-li, YU Xiao-juan, <i>et al.</i> (3962)
Influences of Long-term Application of Organic and Inorganic Fertilizers on the Composition and Abundance of <i>nirS</i> -type Denitrifiers in Black Soil	····· YIN Chang, FAN Fen-liang, LI Zhao-jun, <i>et al.</i> (3967)
Characteristics and Influencing Factors of Trichloroethylene Adsorption in Different Soil Types	····· HE Long, QIU Zhao-fu, LÜ Shu-guang, <i>et al.</i> (3976)
Degradation of Carbendazim in Paddy Soil and the Influencing Factors	····· XIAO Wen-dan, YANG Xiao-e, LI Ting-qiang (3983)
Effects of Sulphur Compounds on the Volatile Characteristics of Heavy Metals in Fly Ash from the MSW and Sewage Sludge Co-combustion Plant During the Disposal Process with Higher Temperature	····· LIU Jing-yong, SUN Shui-yu (3990)
Low-temperature Thermal Treatment of Dioxin in Medical Waste Fly Ash Under Inert Atmosphere	····· JI Sha-sha, LI Xiao-dong, XU Xu, <i>et al.</i> (3999)
Hourly Measurement on Aerosol NH ₃ and Gas NO _x Emission in the Rice Field	····· GONG Wei-wei, LUAN Sheng-ji (4006)
Implementation of an Electronic Nose for Rapid Detection of Volatile Chloralkane and Chloroalkene	····· WEN Xiao-gang, LIU Rui, CAI Qiang, <i>et al.</i> (4012)
Pilot Study on PAHs of the Atmosphere Around the Refuse Incineration Plant Based on the Technology of Passive Sampling	····· SUN Shao-ai, LI Yang, ZHOU Yi, <i>et al.</i> (4018)
Spatial Distribution and Pollution Source Identification of Agricultural Non-Point Source Pollution in Fujian Watershed	····· DING Xiao-wen, SHEN Zhen-yao (4025)
Difference of P Content in Different Area Substrate of Constructed Wetland	····· CAO Xue-ying, CHONG Yun-xiao, YU Guang-wei, <i>et al.</i> (4033)
Selective Detection of Viable Pathogenic Bacteria in Water Using Reverse Transcription Quantitative PCR	····· LIN Yi-wen, LI Dan, WU Shu-xu, <i>et al.</i> (4040)
Formation of Disinfection By-products; Temperature Effect and Kinetic Modeling	····· ZHANG Xiao-lu, YANG Hong-wei, WANG Xiao-mao, <i>et al.</i> (4046)
A Novel Quantitative Approach to Study Dynamic Anaerobic Process at Micro Scale	····· ZHANG Zhong-liang, WU Jing, JIANG Jian-kai, <i>et al.</i> (4052)
Leaves of <i>Platanus orientalis</i> as the Carbon Source for Denitrification	····· XIONG Jian-feng, XU Hua, YAN Ning, <i>et al.</i> (4057)
Isolation, Characterization of an Anthracene Degrading Bacterium <i>Martellella</i> sp. AD-3 and Cloning of Dioxygenase Gene	····· CUI Chang-zheng, FENG Tian-cai, YU Ya-qi, <i>et al.</i> (4062)

《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)

2012年11月15日 33卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 11 Nov. 15, 2012

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: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行