

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第34卷 第1期

Vol.34 No.1

2013

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

长三角背景地区秋冬季节大气气态总汞含量特征研究 窦红颖,王书肖,王龙,张磊,郝吉明(1)

厦门城区大气颗粒物 PM₁₀ 中有机酸源谱特征分析 杨冰玉,黄星星,郑桢,刘碧莲,吴水正(8)

兴隆大气气溶胶中水溶性无机离子分析 李杏茹,宋爱利,王英锋,孙颖,刘子锐,王跃思(15)

气相组分对氨吸收同步脱除模拟烟气 SO₂ 和 NO_x 的影响 王鸿,朱天乐,王美艳(21)

麦秸全量还田下太湖地区两种典型水稻土稻季氨挥发特性比较 汪军,王德建,张刚,王远(27)

单光子/光电子在线质谱实时分析聚氯乙烯热分解/燃烧产物 陈文东,侯可勇,陈平,李芳龙,赵无垠,崔华鹏,花磊,谢园园,李海洋(34)

碱性活性炭表面特征及其吸附甲烷的研究 张梦竹,李琳,刘俊新,孙永军,李国滨(39)

夏季黄渤海表层海水中二甲亚砜(DMSO)的浓度分布 王敏,张洪海,杨桂朋(45)

2010年秋季长江口口外海域 CDOM 的三维荧光光谱-平行因子分析 闫丽红,陈学君,苏荣国,韩秀荣,张传松,石晓勇(51)

基于集合均方根滤波的太湖叶绿素 a 浓度估算与预测 李渊,李云梅,王桥,张卓,郭飞,吕恒,毕坤,黄昌春,郭宇龙(61)

基于 HJ1A-CCD 数据的高光谱影像重构研究 郭宇龙,李云梅,朱利,徐德强,李渊,檀静,周莉,刘阁(69)

重庆雪玉洞岩溶地下河地球化学敏感性研究 徐尚全,杨平恒,殷建军,毛海红,王鹏,周小萍(77)

区域点源和非点源磷入河量计算的二元统计模型 陈丁江,孙嗣畅,贾颖娜,陈佳勃,吕军(84)

秦淮河典型河段总氮总磷时空变异特征 李跃飞,夏永秋,李晓波,熊正琴,颜晓元(91)

湘江沉积物镉和汞质量基准的建立及其应用 蒋博峰,桑磊鑫,孙卫玲,郝伟,李丽,邓宝山(98)

丹江口水库迁建区土壤重金属分布及污染评价 张雷,秦延文,郑丙辉,时瑶,韩超男(108)

汾水水库周边土壤重金属含量与空间分布 李晋昌,张红,石伟(116)

黄河下游引黄灌区地下水重金属分布及健康风险评估 张妍,李发东,欧阳竹,赵广帅,李静,柳强(121)

胶州湾、套子湾及四十里湾表层沉积物中有机氯农药的含量和分布特征 刘艺凯,钟广财,唐建辉,潘晓辉,田崇国,陈颖军(129)

基于干扰梯度的钦江流域底栖动物完整性指数候选参数筛选 卢东琪,张勇,蔡德所,刘朔孺,陈燕海,王备新(137)

海洋细菌 *Marinobacter adhaerens* HY-3 分离鉴定及对中肋骨条藻的化感作用 王洪斌,陈文慧,李信书,李士虎,阎斌伦(145)

水稻秸秆浸泡液对铜绿微囊藻生理特性的影响 苏文,孔繁翔,于洋,贾育红,张民(150)

化感物质肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻生长及生理特性的影响 高李李,郭沛涌,苏光明,魏燕芳(156)

无负压供水模式下管网水力模拟与安全评价分析 王欢欢,刘书明,姜帅,孟凡琳,白璐(163)

天然有机物的相对分子量分布及亲疏水性对微滤膜组合工艺中膜污染的影响 胡孟柳,林洁,许光红,董秉直(169)

不同基质条件下透性处理对脱硫弧菌硫酸盐还原活性的影响 徐慧伟,张旭,李立明,郑光洁,李广贺(177)

基于零价铁的双金属体系对六氯苯还原脱氯研究 曾宪委,刘建国,聂小琴(182)

负载型 TiO₂ 光电催化降解孔雀石绿的动力学研究 张小娜,周少奇,周晓(188)

污水厂微孔曝气系统工况下充氧性能测试与分析 吴媛媛,周小红,施汉昌,邱勇(194)

微气泡及其产生方式对活性污泥混合液性质的影响 刘春,马锦,张磊,张静,张明,吴根(198)

不同氮浓度冲击对颗粒污泥脱氮过程中 N₂O 产生量的影响 韩雪,高大文(204)

模拟电镀污泥重金属浸出液对氧化亚铁硫杆菌活性的影响 谢鑫源,孙培德,楼菊青,郭茂新,马王钢(209)

嗜麦芽窄食单胞菌对铜镉的吸附特性与离子交换 白洁琼,尹华,叶锦韶,彭辉,唐立栲,何宝燕,李跃鹏(217)

阴离子表面活性剂改性水滑石吸附硝基苯的特性研究 夏燕,朱润良,陶奇,刘汉阳(226)

活性氧化铝对水中磷的去除与回收研究 孟文娜,谢杰,吴德意,张振家,孔海南(231)

北京城区可吸入颗粒物分布与呼吸系统疾病相关分析 杨维,赵文吉,官兆宁,赵文慧,唐涛(237)

北京市市售鸡蛋和鸭蛋中全氟化合物的污染水平研究 齐彦杰,周珍,史亚利,孟昭福(244)

北京市场常见淡水食用鱼体内农药残留水平调查及健康风险评估 千志勇,金芬,孙景芳,原盛广,郑蓓,张文婧,安伟,杨敏(251)

多效应残差法(MERA)表征二甲亚砜-农药二元混合物毒性相互作用 霍向晨,刘树深,张晶,张瑾(257)

利用 DGGE-菌落原位杂交法分离土壤中精喹禾灵降解菌 吕欣,彭霞薇,呼庆,马安周,江泽平,魏远(263)

不同白腐真菌复配方式对产酶的影响 孟瑶,梁红,高大文(271)

不同施肥措施对土壤活性有机碳的影响 张瑞,张贵龙,姬艳艳,李刚,常泓,杨殿林(277)

垦殖对湿地土壤有机碳垂直分布及可溶性有机碳截留的影响 霍莉莉,邹元春,郭佳伟,吕宪国(283)

黄河三角洲碱蓬湿地土壤有机碳及其组分分布特征 董洪芳,于君宝,管博(288)

丘陵林地土壤酸化改良剂的集中施用-自然扩散修复技术研究 方熊,刘菊秀,尹光彩,赵亮,刘世忠,褚国伟,李义勇(293)

重度滴滴涕污染土壤低温等离子体修复条件优化研究 陈海红,骆永明,滕应,刘五星,潘澄,李振高,黄玉娟(302)

无定形 Fe(OH)₃ 和 Fe₃O₄ 共沉淀态 As 的化学提取 陈义萍,王少锋,贾永锋(308)

铝和锰对外生菌根真菌生长、养分吸收及分泌作用的影响 李华,黄建国,袁玲(315)

污泥和餐厨垃圾联合干法中温厌氧消化性能研究 段妮娜,董滨,李江华,戴翎翎,戴晓虎(321)

高比表面生物质炭的制备、表征及吸附性能 李坤权,李焯,郑正,桑大志(328)

基于情景分析的浙江沿海地区环境污染防治战略研究 田金平,陈吕军,杜鹏飞,钱易(336)

微生物全细胞传感器在重金属生物可利用度监测中的研究进展 侯启会,马安周,庄绪亮,庄国强(347)

2012 城市生态学术研讨会会议论文

北京市城乡环境梯度下街尘中重金属污染特征 何小艳,顾培,李叙勇,赵洪涛(357)

北京市道路灰尘中污染物含量沿城乡梯度、道路密度梯度的变化特征 唐荣莉,马克明,张育新,毛齐正(364)

北京城市典型下垫面降雨径流污染初始冲刷效应分析 任玉芬,王效科,欧阳志云,侯培强(373)

洋河流域张家口段河流水质演化及驱动因子分析 虎博,王铁宇,吕永龙,杜立宇,罗维(379)

低碳交通电动汽车减排潜力及其影响因素分析 施晓清,李笑诺,杨建新(385)

北京市社区生活垃圾分类收集实效调查及其长效管理机制研究 邓俊,徐琬莹,周传斌(395)

人工湿地在应用中存在的问题及解决措施 黄锦楼,陈琴,许连煌(401)

《环境科学》征订启事(26) 《环境科学》征稿简则(68) 信息(76,144,301,400) 专辑征稿通知(394)

利用 DGGE-菌落原位杂交法分离土壤中精喹禾灵降解菌

吕欣^{1,2}, 彭霞薇^{1,2*}, 呼庆², 马安周², 江泽平³, 魏远³

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 中国科学院生态环境研究中心环境生物技术室, 北京 100085; 3. 中国林业科学研究院林业研究所林木引种与植物地理研究室, 北京 100091)

摘要: 从自然环境中分离到的可降解农药的土著微生物, 因其对环境的友好性及原位修复的可行性, 受到了高度关注. 从土壤中筛选精喹禾灵降解菌株, 首先利用 PCR-DGGE 技术分析了除草剂精喹禾灵胁迫下土壤细菌群落结构及多样性的变化. 结果表明, 添加精喹禾灵后, 土壤细菌群落结构发生了明显的改变. 精喹禾灵使细菌多样性呈现出增加-减少-增加的变化趋势, 其中第 9 d 变化最大, 后期趋于稳定. 根据 DGGE 图谱条带的测序结果推断, *Pseudomonas*、*Massilia*、*Burkholderia* 等属中的细菌对精喹禾灵具有耐受性或降解潜力, 这些微生物类群可作为减少农药残留的土著微生物资源进行分离筛选. 根据条带的测序结果, 合成了地高辛 (Digoxigenin) 标记的探针, 并进行了菌落原位杂交, 筛选到了 3 株具有降解潜力的菌株, 其中 L1 可以利用精喹禾灵作为唯一碳源生长, 经 16S rRNA 基因鉴定该菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.). 利用高效液相色谱法测定了菌株 L1 在无机盐培养基中降解精喹禾灵的效果. 结果表明, 培养 7 d 后, 精喹禾灵的含量减少了近 50%, 且随着精喹禾灵含量的降低, L1 菌体数量增加, 证实了菌株 L1 具有降解精喹禾灵的能力. 这一结果为今后研究菌株 L1 降解精喹禾灵的机制、功能基因等奠定了基础.

关键词: 精喹禾灵; 变性梯度凝胶电泳; 菌落原位杂交; 微生物降解; 假单胞菌属

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)01-0263-08

Isolation of Quizalofop-*p*-ethyl-degrading Bacteria from Soil by DGGE-Colony *in situ* Hybridization

LÜ Xin^{1,2}, PENG Xia-wei^{1,2}, HU Qing², MA An-zhou², JIANG Ze-ping³, WEI Yuan³

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Department of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. Department of Exotic Forestry and Phytogeography, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Naturally occurring bacteria isolates capable of metabolizing pesticides have received considerable attention because they offer the possibility of both environmentally friendly and *in situ* remediation. The effect of herbicide quizalofop-*p*-ethyl on bacterial community in soil was analyzed using the technique of PCR-DGGE for isolating strains biodegrading quizalofop-*p*-ethyl. Results indicated that the soil bacterial community structures significantly changed after adding quizalofop-*p*-ethyl. The bacterial diversity of soil showed an increasing-decreasing-increasing trend. The largest changes occurred in the 9th day and then became stabilized. According to the sequencing results of bands in DGGE profiles, it inferred that members of bacterial genera *Pseudomonas*, *Massilia* and *Burkholderia* had tolerance to quizalofop-*p*-ethyl, and the potential for degradation. These microbial groups could be used to isolate and screen as the indigenous microbial resources to reduce pesticide residues. Digoxigenin-labeled probes had been synthesized based on the sequencing results of bands in the DGGE profiles, and three bacterial strains capable of biodegrading quizalofop-*p*-ethyl were isolated from soil by colony *in situ* hybridization technique. The strain named L1 was able to utilize quizalofop-*p*-ethyl as the sole source of carbon. The strain was identified as *Pseudomonas* sp., based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA. The degrading ability of strain L1 in minimal medium with quizalofop-*p*-ethyl was investigated by HPLC. The quizalofop-*p*-ethyl content decreased by almost 50% after 7 days, and the biomass of strain L1 increased while the content of quizalofop-*p*-ethyl was decreased. This confirmed that the strain L1 had the capacity of degradation. This result provided a basis for future research on degradation mechanism and functional genes.

Key words: quizalofop-*p*-ethyl; DGGE; colony *in situ* hybridization; biodegradation; *Pseudomonas* sp.

收稿日期: 2012-03-06; 修订日期: 2012-05-18

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAC09B03); 国家自然科学基金项目(20707035)

作者简介: 吕欣(1987~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为资源与环境微生物, E-mail: lvxin14@126.com

* 通讯联系人, E-mail: pengxw@bjfu.edu.cn

精喹禾灵 (quizalofop-*p*-ethyl), 化学名称: (*R*)-2-[4-(6-氯喹啉-2-基氧)苯氧基]丙酸乙酯, 结构式如图 1 所示, 它是一种芳氧苯氧丙酸酯类除草剂. 其作用机制是通过杂草茎叶吸收, 在植物体内向上和向下双向传导, 积累在顶端及居间分生, 抑制细胞脂肪酸合成, 使杂草坏死. 精喹禾灵在禾本科杂草和双子叶作物间有高度的选择性, 对阔叶作物田的禾本科杂草有很好的防效^[1-3]. 由于作用速度快, 药效稳定等优点, 精喹禾灵在全球范围内被广泛使用. 虽然它属低毒除草剂, 但是随着研究的进展, 越来越多的报道显示, 精喹禾灵对作物、动物及人类的安全产生严重影响^[4-11]. 因此, 精喹禾灵在美国、加拿大等国家被限定残留限量, 甚至禁止使用, 但精喹禾灵在我国仍被广泛生产和使用^[12].

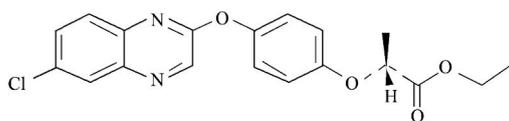


图 1 精喹禾灵化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of quizalofop-*p*-ethyl

土壤是微生物生长繁殖的天然基质, 土壤中微生物种类繁多, 生物量大, 同时土壤也是除草剂最大的载体, 从土壤中分离精喹禾灵降解菌, 并分析其降解效果, 可为环境修复, 减轻污染, 发展绿色农业提供理论依据, 具有重要意义^[13,14]. 此外, 微生物降解法与物理、化学降解法相比, 具有投资少, 避免二次污染等优点. 已有大量研究表明, 微生物对农药的降解起着十分关键的作用^[14-20], 而目前有关精喹禾灵的微生物降解却鲜有报道.

本研究利用 PCR-DGGE 和菌落原位杂交相结合的方法, 通过 DGGE 图谱中显示出的变化, 利用条带测序结果合成探针, 并与平板培养的菌落进行杂交. 将现代分子生物学技术与传统筛选分离微生物的方法科学地结合, 有目的、针对性地在土壤土著微生物中进行富集、筛选、分离和鉴定, 以期获得能够有效降解精喹禾灵的菌株, 为解决其残留问题寻求有效手段, 并为今后降解机理的研究及菌剂的研发奠定基础, 同时也为其他有机污染物污染土壤的生物修复提供依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 土壤样品

土壤样品采于内蒙古土默特左旗地区, 位置坐

标 N 40°38'、E 111°15'. 取样深度为 10 m, 穿过浅层粉土中的潜水层. 根据土层深度逐层取样, 分别装入无菌自封袋中, 冰浴冷藏带回实验室.

1.1.2 其他材料

95% 精喹禾灵原药由中国科学院生态环境研究中心环境生物技术室赠与; 引物由上海生工生物技术有限公司合成; DGGE 凝胶所用药品均为 Amresco 产品; 配制培养基所用药品均为 OXOID 产品; 胶回收及纯化试剂盒为 Promega 产品; T-easy 载体、*Taq* DNA 聚合酶为 TaKaRa 产品.

1.2 方 法

1.2.1 土壤样品的处理

将近水层的土壤样品混合均匀, 每份 200 g 分别置于三角瓶中, 保持土壤持水率为 100%, 在 30℃ 摇床上避光培养, 周期为 21 d. 用丙酮溶解精喹禾灵原药, 与水混合, 形成乳浊液, 分别在第 2、5、8、11、14、17、20 d 分次喷洒于土壤中, 使得最终使用浓度达到 0.15 mg·g⁻¹ 土壤. 分别在第 0、3、6、9、12、15、18、21 d 取 10 g 土壤, 一部分用于提取土壤微生物总 DNA, 一部分保存于 -20℃ 备用.

1.2.2 变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE)

土壤微生物基因组 DNA 采用 FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals) 进行提取, 保存于 -20℃. 选择细菌 16S rRNA 基因 V3 区的引物 338FGC 和 518R (表 1), 以土壤微生物总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 反应程序为 94℃ (5 min) - [94℃ (1 min) - 52℃ (50 s) - 72℃ (1 min 30 s)] (30 循环) - 72℃ (10 min) - 4℃ 保存.

表 1 细菌通用引物

Table 1 Universal primers of bacterial

引物	序列 (5'-3')
338FGC	CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG GGCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG
338F	CCTACGGGAGGCAGCAG
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG

采用美国 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离. 聚丙烯酰胺 (PAGE) 胶浓度为 8% (质量浓度), 变性梯度为 30% ~ 60%, 在 80 V 电压下, 60℃ 电泳 15 h. 电泳完毕后, 将凝胶置于含有 EB 的 1×TAE 缓冲液中染色 15

min, 经蒸馏水漂洗后, 将凝胶转移至成像系统中, 用 Versa Doc™ (Bio-Rad) 成像系统观察并拍照。

1.2.3 特异性条带的回收、测序及鉴定

将 DGGE 电泳图谱中特殊的条带(在富集周期内一直存在或后期出现的条带)切下分别放入无菌离心管中, 经反复冲洗后, 将凝胶中 DNA 溶出, 溶解液作为模板进行 PCR 扩增. 纯化后的 PCR 产物与 T-easy 载体连接, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 验证后送交北京擎科生物技术有限公司测序. 将所得有效序列在 NCBI 上进行比对, 以其中

同源性最高的序列为参照菌株, 相似性 $\geq 97\%$ 的序列视为同一序列型(sequence type).

1.2.4 探针的合成及菌落原位杂

根据 DGGE 条带测序结果, 用 Primer 5.0 软件设计可以扩增出每个条带的特异性引物(表 2), 并分别进行 PCR 扩增, 将扩增结果测序, 检测引物特异性. 将检测后的特异性引物及 DNA 模板, 利用 Roche 公司 PCR DIG Labeling Mix 试剂盒, 通过 PCR 反应合成地高辛标记的产物, 再经 95 $^{\circ}\text{C}$ 解链 5 min, 得到 DIG 标记的探针。

表 2 合成特异性探针的引物

Table 2 Primers used in the synthesis of specific probes

引物编号	引物序列(5'-3')	特异序列长度/bp	PCR 产物长度/bp
1F	GGAGGAAGGGCACT	58	88
1R	TTACCGCGGCTGCTGG		
2F	ATCCAGCCATTCCGC	82	98
2R	ACCGTCATTAGCGAGC		
3F	AACCCTGATCCAGCC	96	126
3R	GCCGGTGCTTCTTATC		
4F	CCATGCCGCGTGTGT	77	90
4R	CGTCAATGCTCCAAGG		
5F	TTCGGGCTGTAAAGC	73	86
5R	CGGTGCTTATTCTGTCC		
6F	CGTGCAGGATGAAG	46	67
6R	GTATTAGAAGGAGC		
7F	TATCGGACAATGGG	66	94
7R	GTCATTATCATCCCGG		
8F	CAAGCCTGATCCAGCC	51	82
8R	GGTACCGTCATTATCGT		
9F	TGATCCAGCAATGCCG	73	128
9R	GTAGTTAGCCGGTGC		
10F	CAAGCCTGATCCAGCCAT	105	128
10R	TTACCGCGGCTGCTGG		

将 1 g 土壤(21 d), 经梯度稀释后, 取 200 μL 涂布于分别添加精喹禾灵(浓度为 0.15 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)的 LB 平板和土壤浸出液平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至产生直径 2~5 mm 大小的菌落, 且菌落数量适中, 互不重叠。

菌落原位杂交的主要步骤为印迹、裂解、固定、预杂交、杂交、显色. 本实验采用文献[21]的方法, 结合 Roche 公司 DIG Nucleic Acid Detection 试剂盒进行杂交实验。

1.2.5 菌株的鉴定

将经杂交筛选到的微生物在 LB 培养基上划线培养. 待长出单菌落后继续在新培养基上划线, 直到成为纯菌。

将菌株分别接种于以精喹禾灵(浓度为 0.15 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)作为唯一碳源的无机盐液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 10 d 后, 分别涂布于上述固

体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至长出肉眼可见的菌落. 将能够生长的菌株接种于以精喹禾灵(浓度为 0.15 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)作为唯一碳源的无机盐液体培养基中, 设置对照组, 分别于 1、2、3、5、7 d 取样, 经萃取后, 利用高效液相色谱(HPLC, 岛津-GL, RID-10A)验证菌株的降解能力^[22,23]。

保存具有降解能力的菌株, 并进行 16S rRNA 基因全长 PCR 扩增, 扩增产物进行纯化、连接、转化, 阳性克隆子经验证后送交测序公司测序, 并在 NCBI 上进行比对, 构建系统进化树。

2 结果与讨论

2.1 DGGE 图谱分析精喹禾灵对土壤细菌多样性的影响

对精喹禾灵处理不同天数的土壤中细菌

16S rRNA基因 V3 区 PCR 产物进行 DGGE 分析, 结果如图 2 所示. 不同的泳道代表不同的处理天数的样品, 泳道中的条带数目的多少反映样品中细菌群落的多样性. 本实验中, 每个样品在 30%~60% 的变性梯度下可分离到 15~18 条不同的条带, 条带数最少的是处理 0 d 和 9 d 的样品, 条带数最多是处理 18 d 和 21 d 的样品. 从图谱中可以看出, 在添加精喹禾灵后, 土壤细菌的多样性发生明显变化, 每个样品的条带数随着处理的时间呈现出增加-减少-增加的趋势. 由于精喹禾灵是分次添加于土壤中, 使其终浓度达到 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 因此图谱中显示的这一变化趋势表明: 当

土壤中添加低浓度的精喹禾灵时, 某些种类的细菌其生长活性受到激发, 使土壤细菌多样性增加; 随着精喹禾灵浓度的增大, 由于其本身的毒性以及微生物种群之间的相互作用, 土壤中细菌的多样性减少; 当土壤细菌对精喹禾灵产生了耐受性, 或者可以通过代谢降低其毒性后, 土壤中细菌的多样性再次增加. 这与已有文献报道结果一致^[24~26]. 高浓度的环境污染物如农药, 对微生物的生长具有毒害作用, 然而在浓度较低时有些农药由于含有碳元素, 往往可以作为细菌的碳源和营养物质, 从而促进某些细菌的生长^[24], 进而改变细菌种群的结构及多样性^[25,26].

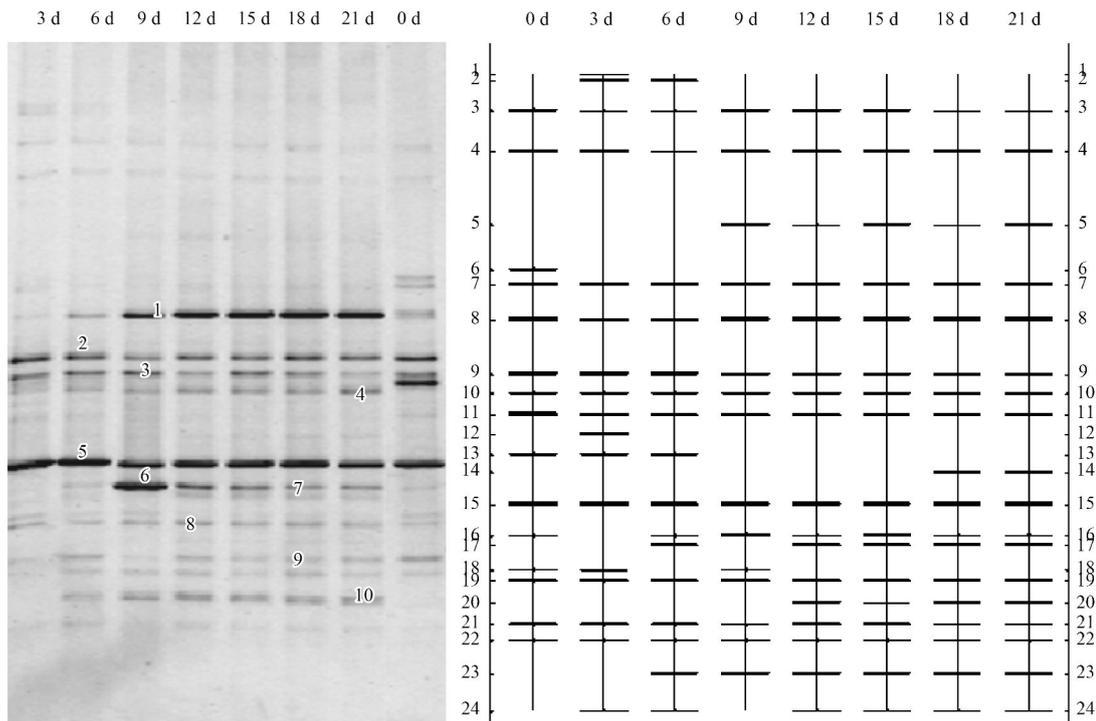


图 2 精喹禾灵处理不同天数后土壤细菌 DGGE 指纹图谱

Fig. 2 Bacterial DGGE profile of soils with quizalofop-*p*-ethyl in different treatment time

根据电泳图谱中条带的信息, 运用 Quantity One 软件对不同处理天数的样品进行非加权组平均法 (UPGAMA) 聚类分析和相似度分析, 结果如图 3 和表 3 所示. 不同处理天数的样品分为两个聚类: 第 I 组类型中, 处理 3 d 和 6 d 聚为一类, 但与 0 d 样品的差异性较大; 第 II 组类型中, 处理 12、15、18 和 21 d 聚为一类, 但与处理 9 d 样品的差异性较大. 这说明添加精喹禾灵后, 土壤细菌群落结构发生了明显的改变. 在添加精喹禾灵初期, 土壤中细菌群落结构虽发生变化, 但是变化不大; 在处理 9 d 前后, 群落结构发生较大变化; 在添加的后期, 细菌群落结构恢复相对稳定的状态. 从表 3 中可以看出,

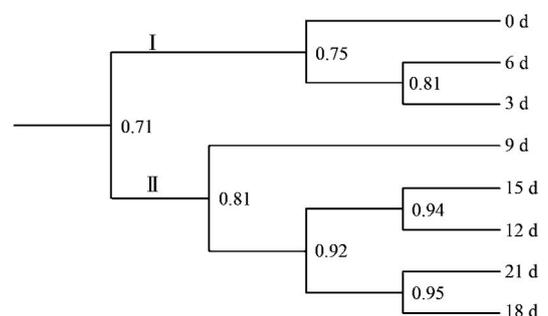


图 3 精喹禾灵处理不同天数后土壤细菌群落结构相似性的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis of the soil bacterial community with quizalofop-*p*-ethyl in different treatment time

表 3 精喹禾灵处理不同天数后土壤细菌群落结构相似性分析/%

Table 3 Similarity analysis of the soil bacterial community with quizalofop-*p*-ethyl in different treatment time/%

处理天数/d	0	3	6	9	12	15	18	21
0	100	75.5	74.5	74.3	68.8	70.7	67.2	67.2
3		100.0	81.3	66.3	64.9	67.4	64.5	62.5
6			100.0	72.2	78.5	80.7	77.8	76.2
9				100.0	82.2	82.2	79.0	79.5
12					100.0	94.2	90.5	92.2
15						100.0	93.2	93.2
18							100.0	94.8
21								100.0

在添加精喹禾灵后,土壤中细菌群落结构相似度最高的是处理 18 d 和 21 d,为 94.8%;相似度最低的是处理 3 d 和 21 d,为 62.5%。

电泳图谱中条带的亮度反映出细菌相对生物量的多少,利用 MVSP 软件对各样品中的细菌多样性指数(H)、丰度(S)和均匀度(E_H)进行了综合分析,结果如表 4 所示。其中,细菌多样性指数最高的是处理 21 d 的样品,指数为 2.825;多样性指数最低的是处理 9 d 的样品,指数为 2.635。细菌丰度最高的是处理 18 d 和 21 d,均为 18;细菌丰度最低的是处理 0 d 和 9 d,为 15。不同处理天数土壤中细菌的均匀度虽有波动,但是变化范围不大。

表 4 精喹禾灵处理不同天数后土壤细菌多样性指数(H)、丰度(S)及均匀度(E_H)Table 4 Shannon index (H), richness (S) and evenness (E_H) of the soil bacterial community with quizalofop-*p*-ethyl in different treatment time

处理天数/d	多样性指数(H)	丰度(S)	均匀度(E_H)
0	2.651	15	0.979
3	2.765	17	0.976
6	2.781	17	0.982
9	2.635	15	0.973
12	2.771	17	0.978
15	2.769	17	0.977
18	2.815	18	0.974
21	2.825	18	0.977

表 5 DGGE 测序条带序列比对结果

Table 5 Alignment of DGGE sequenced clone to its highly-similar GenBank sequence

条带编号	系统类群	最相似菌株	相似度/%
1	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. (DQ227346.1)	99
2	β -Proteobacteria	Uncultured beta Proteobacterium (EU409850.1)	100
3	β -Proteobacteria	<i>Massilia</i> sp. (AB552860.1)	98
4	β -Proteobacteria	Uncultured <i>Rhodospirillum</i> sp. (GQ421058.1)	99
5	β -Proteobacteria	<i>Limnobacter thiooxidans</i> (GQ284439.1)	100
6	β -Proteobacteria	Uncultured beta Proteobacterium (GU202941.1)	100
7	α -Proteobacteria	Uncultured <i>Sphingobium</i> sp. (FJ978465.1)	98
8	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ662890.1)	100
9	β -Proteobacteria	<i>Limnobacter thiooxidans</i> (GQ284439.1)	99
10	α -Proteobacteria	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. (GU560171.1)	100

2.2 电泳条带测序和分析

根据 DGGE 指纹图谱,将在处理周期内一直存在或后期出现的条带切胶回收,共得到 10 条带,如图 2 所示。将 10 条带进行测序并在 NCBI 上比对后,得到各个条带代表的细菌类型及其相似程度的结果,如表 5 所示。1~10 号条带分属于变形菌门(Proteobacteria)中 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 这 3 个亚门,且其中一部分为未培养微生物。

根据序列的比对结果可以推断,*Pseudomonas*、*Massilia*、*Burkholderia* 等属中的部分细菌对精喹禾灵有耐受性,或可以利用对精喹禾灵及其代谢产物。这些具有降解精喹禾灵潜力的细菌类群均为革兰氏阴性菌类群,其中已有文献报道 *Pseudomonas* 中有菌株具有降解精喹禾灵的能力^[22]; *Pseudomonas aeruginosa* 中的某些菌株可减少精喹禾灵对豆类作物产生的药害,并提高其品质^[27]。此外,还有文献报道 *Bacillus* 中的菌株同样具有高效降解精喹禾灵的能力^[22,23],但在本实验回收的条带中,未发现这一类群的细菌,其原因是由于本实验采用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒法提取微生物总 DNA,在利用珠子进行物理破壁时,击打作用力强,易造成 DNA 的断裂^[28],且该方法在进行 PCR 反应时,会产生特异性

扩增^[29],使得部分微生物类群在实验中丢失。

2.3 菌落原位杂交分离精喹禾灵降解细菌

根据 DGGE 条带测序结果,设计可以分别扩增出 1~10 号条带的特异性引物(表 2),并分别进行 PCR 扩增,将扩增结果测序。根据测序结果表明,利用特异性引物扩增获得的产物,其序列与切胶测序的结果一致。因此,所设计的特异性引物可以用于合成地高辛标记的探针。

利用试剂盒分别通过 PCR 反应合成高辛标标记的产物,再经 95℃ 解链 5 min,得到 10 种探针。利用 1~10 号条带测序所用的阳性克隆子检测探针的特异性,结果表明,10 种探针的特异性较为理想。

将这些探针分别与平板培养的结果进行菌落原位杂交,得到杂交图谱,根据图谱显示的位置,从平板中挑取对应位置的菌体划线培养,一共得到 3 个菌株,分别对应 1、8、10 号条带,标记为 L1、L2、L3。从杂交结果可以看出:① 切胶回收的条带中,只有少部分能够与平板培养的结果对应,这意味着 DGGE 图谱中出现的菌群只有很少一部分能够在平板上形成肉眼可见的菌落,而大多数细菌不能在合成的媒介中生长^[30];② DGGE 图谱中有些生物量较大的条带,并不能从平板培养中得到可培养的菌株,如 5 号条带,而一些生物量相对较小的却可以,如 10 号条带。分析出现这种结果的原因主要有 2 点:① 在 DGGE 图谱中,很多类群为未培养细菌,到目前为止,还没有一种培养基能够让其生长,或是缺少某些必须营养物质,或是缺少某些未知的生长因子^[31]。② 本实验中使用的培养基是 LB 培养基和土壤浸出液培养基,二者虽营养物质丰富,且后者含有生长因子,但是并不适合所有可培养细菌的生长,从而导致一些在选择培养基中可生长的类群被遗漏^[32]。

2.4 菌株的鉴定

将菌株 L1、L2、L3 分别接种于以精喹禾灵(浓度为 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 作为唯一碳源的无机盐液体培

养基中,培养 10 d 后,涂布于上述固体培养基上。结果表明,菌株 L1 可以利用精喹禾灵作为唯一的碳源来生长,并出现明显的水解圈,说明菌株 L1 具有降解精喹禾灵的能力;而菌株 L2、L3 则不能利用精喹禾灵作为唯一的碳源,说明菌株 L2、L3 对精喹禾灵只具有耐受性,或者是参与共代谢降解过程。

将 L1 接种于上述液体培养基中,分别于 1、2、3、5、7 d 取样,利用 HPLC 法验证菌株的降解能力,同时利用平板计数法检测 L1 生长情况,结果如图 4 所示。在菌株 L1 的作用下,培养基中精喹禾灵的浓度明显变小,验证了 L1 对其的降解能力,而且在 3 d 后,降解速度加快,7 d 后,降解了近 50%。菌株 L1 可以利用精喹禾灵作为唯一碳源生长,并且在 3 d 后进入对数生长期。从图 4 中可以看出,随着培养基中精喹禾灵浓度的降低,L1 菌体数量增加,即精喹禾灵的浓度与 L1 菌体数量存在明显的负相关性,这证实了精喹禾灵浓度的减少是由于 L1 的生长和代谢。

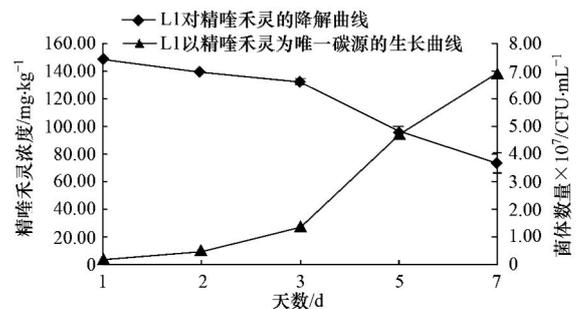


图 4 L1 对精喹禾灵的降解曲线及其生长曲线

Fig. 4 Degradation curve of quizalofop-p-ethyl with L1 and growth curve of L1

将菌株 L1 进行 16S rRNA 基因全长 PCR 扩增并测序,测序结果在 NCBI 上比对,根据比对结果选取同源性较高的序列和该属模式菌株的序列,构建系统进化树(图 5)。比对结果显示,菌株 L1 与假单胞菌属(*Pseudomonas*)的同源性最高。从进化树中可以看出,菌株 L1 与施氏假单胞菌(*Pseudomonas*

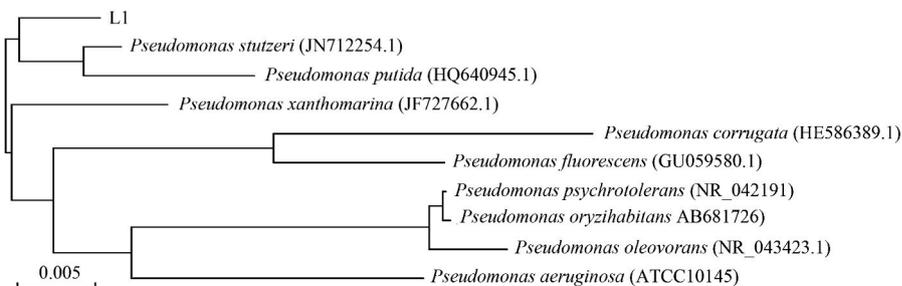


图 5 菌株 L1 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain L1 based on the entire 16S rRNA sequence alignments

stutzeri) 的亲缘关系较近。

3 结论

(1) 在除草剂精喹禾灵的胁迫下, 土壤细菌群落结构发生了明显的改变, 其多样性呈现出增加-减少-增加的变化趋势, 其中第 9 d 变化最大, 后期趋于稳定。对各样品中细菌多样性指数、丰度和均匀度的分析结果表明, 不同处理天数土壤中细菌的这三个指标均存在差异, 虽有波动, 但是变化范围不大。

(2) 根据 DGGE 图谱条带的测序结果可以推断, *Pseudomonas*、*Massilia*、*Burkholderia* 等属中的部分细菌对降解精喹禾灵有耐受性, 或可以利用对精喹禾灵及其代谢产物。

(3) 利用 DGGE 图谱中条带的测序结果, 合成地高辛标记的探针, 并将现代分子生物学中菌落原位杂交技术与传统平板培养的方法科学地结合, 有针对性地从小土壤土著微生物中筛选降解菌, 拓展了微生物筛选的新方法。通过这种方法, 筛选到了 3 株具有降解或耐受潜力的菌株, 其中 L1 可以利用精喹禾灵作为唯一碳源生长。经 16S rRNA 基因鉴定该菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 与施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 的亲缘关系较近。

(4) 利用 HPLC 法测定了一株假单胞菌 L1 独立降解精喹禾灵的效果。结果表明, 菌株 L1 在以精喹禾灵作为唯一碳源的无机盐培养基中生长 7 d 后, 精喹禾灵的含量减少了近 50%, 且精喹禾灵的含量与 L1 菌体数量呈明显的负相关, 证实了菌株 L1 具有降解精喹禾灵的能力。

参考文献:

[1] 朱良天. 农药[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 361-363.
 [2] 农业部农药检定所. 新编农药手册(续集)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 375.
 [3] 曾得意, 王鸣华, 施海燕, 等. 精喹禾灵酶联免疫吸附分析(ELISA)研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 443-449.
 [4] 曹小红, 李松耀, 王春玲, 等. 除草剂精喹禾灵用于硅藻过量产生二十碳五烯酸[J]. 生物工程学报, 2007, 23(15): 885-890.
 [5] 李浙江, 王金信, 王利平, 等. 精喹禾灵对不同花生品种安全性的测定[J]. 现代农药, 2006, 5(2): 46-47.
 [6] 陈日萍, 高明, 蔡冬苗, 等. 精喹禾灵亚慢性经口暴露对雄性大鼠的生殖毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(3): 208-211.
 [7] 孙建析, 顾刘金, 杨校华, 等. 精喹禾灵的亚慢性毒性研究[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(2): 149-150.
 [8] Gronwald J W. Lipid biosynthesis inhibitors[J]. Weed Science,

1991, 39: 435-449.
 [9] Egli M A, Gengenbach B G, Gronwald J W, et al. Characterization of maize acetyl-coenzyme a carboxylase [J]. Plant Physiology, 1993, 101(2): 499-506.
 [10] Elefsimiotis I S, Liatsos G D, Stamelakis D, et al. Case Report: Mixed cholestatic/hepatocellular liver injury induced by the herbicide quizalofop-p-ethyl [J]. Environmental Medicine Environmental Health Perspectives, 2007, 115(10): 1479-1481.
 [11] Mustafa Y, Arikan E S. Genotoxicity testing of quizalofop-p-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay[J]. Caryologia, 2008, 61(1): 45-52.
 [12] 刘刚. 精喹禾灵原药产品登记动态[J]. 农化新世纪, 2007, 11(6): 21.
 [13] 冯化成. 土壤细菌和农药分解[J]. 农药译丛, 1994, 16(4): 47-50.
 [14] Soulas G, Lagacherie B. Modelling of microbial degradation of pesticides in soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33(6): 551-557.
 [15] Singh B K, Walker A, Morgan J A W, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* Strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4855-4863.
 [16] Barragán-Huerta B E, Costa-Pérez C, Peralta-Cruz J, et al. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59(3): 239-244.
 [17] Li X H, Jiang J D, Gu L F, et al. Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(4): 331-335.
 [18] 聂志娟. 氰氟草酯降解菌分离鉴定、降解特性的研究及氰氟草酯水解酶基因(*chbH*)的克隆和表达[D]. 江苏: 南京农业大学, 2011. 14-16, 37-38.
 [19] 王一奇. 多菌灵降解菌 *Pseudomonas* sp. CBW 的分离、鉴定及其降解特性与降解机理[D]. 浙江: 浙江大学, 2010. 39-55.
 [20] 杨明伟, 叶非. 微生物降解农药的研究进展[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 26-29.
 [21] Batisson I, Pesce S, Besse-Hoggan P, et al. Isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water[J]. Microbial Ecology, 2007, 54(4): 761-770.
 [22] 汤富彬. 精喹禾灵的土壤微生物降解[D]. 浙江: 浙江大学, 2002. 39-52.
 [23] 周丽兴, 万树青, 陈泽鹏, 等. 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilis*) 对精喹禾灵的降解特性[J]. 农药, 2006, 45(9): 627-629.
 [24] 朱崑, 张旻, 俞晟, 等. 十溴联苯醚对土壤中微生物群落结构及土壤潜在硝化功能的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(8): 1613-1617.
 [25] Wang M C, Liu Y H, Wang Q, et al. Impacts of methamidophos

- on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, **40**(3): 778-788.
- [26] Zhang B G, Bai Z H, Hoefel D, *et al.* The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, **407**(6): 1915-1922.
- [27] Ahemad M, Khan M S. Phosphate-solubilizing and plant-growth-promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves greengram performance in quizalafop-*p*-ethyl and clodinafop amended soil [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, **58**(2): 361-372.
- [28] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态学研究总 DNA 的提取[J]. *农业环境科学学报*, 2005, **24**(5): 854-860.
- [29] Purswani J, Martín-Platero A M, Reboleiro-Rivasa P, *et al.* Comparative analysis of microbial DNA extraction protocols for groundwater samples [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, **416**(2): 240-242.
- [30] McCaig A E, Grayston S J, Prosser J I, *et al.* Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **35**(1): 37-48.
- [31] D'Onofrio A, Crawford J M, Stewart E J, *et al.* Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria[J]. *Chemistry & Biology*, 2010, **17**(3): 254-264.
- [32] Hahn M W, Stadler P, Wu Q L, *et al.* The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **57**(3): 379-390.

CONTENTS

Characteristics of Total Gaseous Mercury Concentrations at a Rural Site of Yangtze Delta, China	DOU Hong-ying, WANG Shu-xiao, WANG Long, <i>et al.</i> (1)
Compositions of Organic Acids in PM ₁₀ Emission Sources in Xiamen Urban Atmosphere	YANG Bing-yu, HUANG Xing-xing, ZHENG An, <i>et al.</i> (8)
Analysis on Water-soluble Inorganic Ions in the Atmospheric Aerosol of Xinglong	LI Xing-ru, SONG Ai-li, WANG Ying-feng, <i>et al.</i> (15)
Effects of Gaseous Compositions the on Simultaneous Removal of NO _x and SO ₂ from Simulated Flue Gas by Ammonia Absorption	WANG Hong, ZHU Tian-le, WANG Mei-yan (21)
Comparing the Ammonia Volatilization Characteristic of Two Typical Paddy Soil with Total Wheat Straw Returning in Taihu Lake Region	WANG Jun, WANG De-jian, ZHANG Gang, <i>et al.</i> (27)
Real-Time Analysis of Polyvinyl Chloride Thermal Decomposition/Combustion Products with Single Photon Ionization/Photoelectron Ionization Online Mass Spectrometer	CHEN Wen-dong, HOU Ke-yong, CHEN Ping, <i>et al.</i> (34)
Surface Characteristics of Alkali Modified Activated Carbon and the Adsorption Capacity of Methane	ZHANG Meng-zhu, LI Lin, LIU Jun-xin, <i>et al.</i> (39)
Distribution of Dimethylsulfoxide(DMSO) in the Surface Water of the Yellow Sea and the Bohai Sea	WANG Min, ZHANG Hong-hai, YANG Gui-peng (45)
Resolving Characteristic of CDOM by Excitation-Emission Matrix Spectroscopy Combined with Parallel Factor Analysis in the Seawater of Outer Yangtze Estuary in Autumn in 2010	YAN Li-hong, CHEN Xue-jun, SU Rong-guo, <i>et al.</i> (51)
Estimation and Forecast of Chlorophyll a Concentration in Taihu Lake Based on Ensemble Square Root Filters	LI Yuan, LI Yun-mei, WANG Qiao, <i>et al.</i> (61)
Research of Hyperspectral Reconstruction Based on HJ1A-CCD Data	GUO Yu-long, LI Yun-mei, ZHU Li, <i>et al.</i> (69)
Research on the Sensitivity of Geochemical of Underground River in Chongqing Xueyu Cave	XU Shang-quan, YANG Ping-heng, YIN Jian-jun, <i>et al.</i> (77)
Bivariate Statistical Model for Calculating Phosphorus Input Loads to the River from Point and Nonpoint Sources	CHEN Ding-jiang, SUN Si-yang, JIA Ying-na, <i>et al.</i> (84)
Temporal and Spatial Variations of Total Nitrogen and Total Phosphorus in the Typical Reaches of Qinhuai River	LI Yue-fei, XIA Yong-qiu, LI Xiao-bo, <i>et al.</i> (91)
Derivation and Application of Sediment Quality Criteria of Cd and Hg for the Xiangjiang River	JIANG Bo-feng, SANG Lei-xin, SUN Wei-ling, <i>et al.</i> (98)
Distribution and Pollution Assessment of Heavy Metals in Soil of Relocation Areas from the Danjiangkou Reservoir	ZHANG Lei, QIN Yan-wen, ZHENG Bing-hui, <i>et al.</i> (108)
Concentrations of Soil Heavy Metals and Their Spatial Distribution in the Surrounding Area of Fenhe Reservoir	LI Jin-chang, ZHANG Hong, SHI Wei (116)
Distribution and Health Risk Assessment of Heavy Metals of Groundwaters in the Irrigation District of the Lower Reaches of Yellow River	ZHANG Yan, LI Fa-dong, OUYANG Zhu, <i>et al.</i> (121)
Concentrations and Distribution of Organochlorine Pesticides in the Surface Sediments of Jiaozhou Bay, Taotzi Bay and Sishili Bay	LIU Yi-kai, ZHONG Guang-cai, TANG Jian-hui, <i>et al.</i> (129)
Choice of Macroinvertebrate Metrics for Constructing a Benthic-Index of Biotic Integrity Based on the Disturbance Gradients in the Qinjiang River Basin	LU Dong-qi, ZHANG Yong, CAI De-suo, <i>et al.</i> (137)
Isolation and Identification of <i>Marinobacter adhaerens</i> HY-3 and Its Allelopathy on <i>Skeletonema costatum</i>	WANG Hong-bin, CHEN Wen-hui, LI Xin-shu, <i>et al.</i> (145)
Effects of the Rice Straw on <i>Microcystis aeruginosa</i> Analyzed by Different Physiological Parameters	SU Wen, KONG Fan-xiang, YU Yang, <i>et al.</i> (150)
Effects of Allochemicals Ethyl Cinnamate on the Growth and Physiological Characteristics of <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	GAO Li-li, GUO Pei-yong, SU Guang-ming, <i>et al.</i> (156)
Hydraulic Simulation and Safety Assessment of Secondary Water Supply System with Anti-Negative Pressure Facility	WANG Huan-huan, LIU Shu-ming, JIANG Shuai, <i>et al.</i> (163)
Effect of Relative Molecular Mass Distribution and Hydrophilicity/Hydrophobicity of NOM on Membrane Fouling in MF-combined Process	HU Meng-liu, LIN Jie, XU Guang-hong, <i>et al.</i> (169)
Effect of Permeabilization on Sulfate Reduction Activity of <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough Cells in the Presence of Different Electron Donors	XU Hui-wei, ZHANG Xu, LI Li-ming, <i>et al.</i> (177)
Dechlorination of HCB by Bimetals Based on Zero Valent Iron	ZENG Xian-wei, LIU Jian-guo, NIE Xiao-qin (182)
Study on Kinetics of Photoelectrocatalytic Degradation of Supported TiO ₂ on Malachite Green	ZHANG Xiao-na, ZHOU Shao-qi, ZHOU Xiao (188)
Measurement and Analysis of Micropore Aeration System's Oxygenating Ability Under Operation Condition in Waste Water Treatment Plant	WU Yuan-yuan, ZHOU Xiao-hong, SHI Han-chang, <i>et al.</i> (194)
Influence of Microbubble and Its Generation Process on Mixed Liquor Properties of Activated Sludge	LIU Chun, MA Jin, ZHANG Lei, <i>et al.</i> (198)
Impact of Different Nitrogen Concentrations on the N ₂ O Production in the Denitrification Process of Granular Sludge	HAN Xue, GAO Da-wen (204)
Effect of Simulated Heavy Metal Leaching Solution of Electroplating Sludge on the Bioactivity of <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	XIE Xin-yuan, SUN Pei-de, LOU Ju-qing, <i>et al.</i> (209)
Characteristic and Ion Exchanges During Cu ²⁺ and Cd ²⁺ Biosorption by <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BAI Jie-qiong, YIN Hua, YE Jin-shao, <i>et al.</i> (217)
Sorption of Nitrobenzene to Anionic Surfactant Modified Layered Double Hydroxides	XIA Yan, ZHU Run-liang, TAO Qi, <i>et al.</i> (226)
Study on Phosphate Removal and Recovery by Activated Alumina	MENG Wen-na, XIE Jie, WU De-yi, <i>et al.</i> (231)
Spatial Distribution of Inhalable Particulate and Association with Respiratory Disease in Beijing City	YANG Wei, ZHAO Wen-ji, GONG Zhao-ning, <i>et al.</i> (237)
Pollution Levels of Perfluorochemicals in Chicken Eggs and Duck Eggs from the Markets in Beijing	QI Yan-jie, ZHOU Zhen, SHI Ya-li, <i>et al.</i> (244)
Residual Levels of Pesticides in Freshwater Fish from Beijing Aquatic Product Markets and Health Risk Assessment	YU Zhi-yong, JIN Fen, SUN Jing-fang, <i>et al.</i> (251)
Characterizing the Toxicity Interaction of the Binary Mixture Between DMSO and Pesticide by the Multi-Effect Residual Analysis (MERA)	HUO Xiang-chen, LIU Shu-shen, ZHANG Jing, <i>et al.</i> (257)
Isolation of Quinolofop- <i>p</i> -ethyl-degrading Bacteria from Soil by DGGE-Colony <i>in situ</i> Hybridization	LÜ Xin, PENG Xia-wei, HU Qing, <i>et al.</i> (263)
White-Rot Fungi Combinations Impact on Enzyme Productions	MENG Yao, LIANG Hong, GAO Da-wen (271)
Effects of Different Fertilizer Application on Soil Active Organic Carbon	ZHANG Rui, ZHANG Gui-long, JI Yan-yan, <i>et al.</i> (277)
Effect of Reclamation on the Vertical Distribution of SOC and Retention of DOC	HUO Li-li, ZOU Yuan-chun, GUO Jia-wei, <i>et al.</i> (283)
Distribution Characteristics of Soil Organic Carbon and Its Composition in <i>Suaeda salsa</i> Wetland in the Yellow River Delta	DONG Hong-fang, YU Jun-bao, GUAN Bo (288)
Study the Restoration Technology of Concentrated Application-Natural Diffusion about Amendments of Acidified Soil of Hilly Woodland	FANG Xiong, LIU Ju-xiu, YIN Guang-cai, <i>et al.</i> (293)
Optimizing Remediation Conditions of Non-thermal Plasma for DDTs Heavily Contaminated Soil	CHEN Hai-hong, LUO Yong-ming, TENG Ying, <i>et al.</i> (302)
Chemical Extraction of Arsenic Co-precipitated with Amorphous Fe(OH) ₃ and Fe ₃ O ₄	CHEN Yi-ping, WANG Shao-feng, JIA Yong-feng (308)
Influence of Aluminum and Manganese on the Growth, Nutrient Uptake and the Efflux by Ectomycorrhizal Fungi	LI Hua, HUANG Jian-guo, YUAN Ling (315)
High-solids Anaerobic Co-digestion of Sludge and Kitchen Garbage Under Mesophilic Conditions	DUAN Ni-na, DONG Bin, LI Jiang-hua, <i>et al.</i> (321)
Preparation, Characterization and Adsorption Performance of High Surface Area Biomass-based Activated Carbons	LI Kun-quan, LI Ye, ZHENG Zheng, <i>et al.</i> (328)
Study on Strategies of Pollution Prevention in Coastal City of Zhejiang Province Based on Scenario Analysis	TIAN Jin-ping, CHEN Lü-jun, DU Peng-fei, <i>et al.</i> (336)
Advance in the Bioavailability Monitoring of Heavy Metal Based on Microbial Whole-cell Sensor	HOU Qi-hui, MA An-zhou, ZHUANG Xiu-liang, <i>et al.</i> (347)
Characteristics of Heavy Metal Contamination in Street Dusts Along the Urban-Rural Gradient Around Beijing	HE Xiao-yan, GU Pei, LI Xu-yong, <i>et al.</i> (357)
Content Trends of Pollutants in Street Dust of Beijing Along the Urban-Rural Gradient and Road Density Gradient	TANG Rong-li, MA Ke-ming, ZHANG Yu-xin, <i>et al.</i> (364)
Analysis of First Flush Effect of Typical Underlying Surface Runoff in Beijing Urban City	REN Yu-fen, WANG Xiao-ke, OUYANG Zhi-yun, <i>et al.</i> (373)
Temporal Variation of Water Quality and Driving Factors in Yanghe Watershed of Zhangjiakou	PANG Bo, WANG Tie-yu, LÜ Yong-long, <i>et al.</i> (379)
Research on Carbon Reduction Potential of Electric Vehicles for Low-Carbon Transportation and Its Influencing Factors	SHI Xiao-qing, LI Xiao-nuo, YANG Jian-xin (385)
Investigation of Waste Classification and Collection Actual Effect and the Study of Long Acting Management in the Community of Beijing	DENG Jun, XU Wan-ying, ZHOU Chuan-bin (395)
Problems and Countermeasures in the Application of Constructed Wetlands	HUANG Jin-lou, CHEN Qin, XU Lian-huang (401)

《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)

2013年1月15日 34卷 第1期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 34 No. 1 Jan. 15, 2013

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印刷装订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行人