

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第34卷 第10期

Vol.34 No.10

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

南京地区大气气溶胶 PM _{2.5} 中稳定碳同位素组成研究	吴梦龙, 郭照冰, 刘凤玲, 孙德玲, 卢霞, 姜文娟 (3727)
太原市空气颗粒物中正构烷烃分布特征及来源解析	胡冬梅, 彭林, 白慧玲, 牟玲, 韩峰, 刘效峰, 冀豪栋, 张鹏九 (3733)
交通与气象因子对不同粒径大气颗粒物的影响机制研究	罗娜娜, 赵文吉, 晏星, 官兆宁, 熊秋林 (3741)
公交车燃用生物柴油的颗粒物排放特性	楼狄明, 陈峰, 胡志远, 谭丕强, 胡炜 (3749)
兰州及其周边区域大气降水 δ ¹⁸ O 特征及其水汽来源	陈粉丽, 张明军, 马潜, 李小飞, 王圣杰, 李菲 (3755)
天山乌鲁木齐河源 1 号冰川区气溶胶水溶性离子变化特征及来源分析	岳晓英, 李忠勤, 张明军, 周平, 樊晋 (3764)
O ₃ /H ₂ O ₂ 氧化苯乙烯气体性能及机制	何觉聪, 黄倩茹, 叶杞宏, 罗雨薇, 张再利, 樊青娟, 魏在山 (3772)
马尾松针叶组织稳定硫同位素地球化学特征及来源示踪	关晖, 肖化云, 朱仁果, 郑能建, 瞿玲露 (3777)
江西省表层土壤和苔藓硫含量及硫同位素组成对比研究	李男, 肖化云, 陈永忠, 周丹, 罗笠, 吴代敏 (3782)
辽河流域非点源污染空间特征遥感解析	王雪蕾, 蔡明勇, 钟部卿, 姚延娟, 殷守敬, 吴迪 (3788)
景观带尺度高寒区水文特征时空变化规律研究	杨永刚, 胡晋飞, 肖洪浪, 邹松兵, 尹振良 (3797)
金普湾海域表层沉积物中基质结合态磷化氢的分布特征	游丽丽, 宗海波, 张淑芳, 尹国宇, 李涛, 侯立军 (3804)
崇明东滩湿地干湿交替过程脲酶活性变化初探	韩建刚, 曹雪 (3810)
FDA 水解酶分析法表征近海泥滩微生物活性	刘叶, 邹立, 刘陆, 高冬梅 (3818)
中国东北主要河流沉积物中多溴二苯醚的含量状况及生态风险分析	袁海峰, 成杭新, 赵传冬, 刘应汉, 杨柯, 李括, 彭敏, 刘飞 (3825)
深圳大鹏湾海域表层沉积物和生物体中多环芳烃残留及其风险评价	孙闰霞, 柯常亮, 谷阳光, 卢腾腾, 杜飞雁, 马胜伟, 林钦 (3832)
PMF 和 PCA/MLR 法解析上海市高架道路地表径流中多环芳烃的来源	边璐, 李田, 侯娟 (3840)
三峡库区蓄水初期大宁河重金属食物链放大特征研究	余杨, 王雨春, 周怀东, 高博, 赵高峰 (3847)
小型封闭水体环境因子与叶绿素 a 的时空分布及相关性研究	李飞鹏, 张海平, 陈玲 (3854)
太湖氮、磷自净能力的实验与模型模拟	韩涛, 翟淑华, 胡维平, 张红举, 李钦钦 (3862)
湖泊疏浚方式对内源释放影响的模拟研究	陈超, 钟继承, 范成新, 孔明, 余居华 (3872)
水体/底泥生物基城市河道富营养化水体修复试验研究	周慧华, 宋晓光, 吴革, 谢鑫源 (3879)
底泥调控剂对感潮河涌沉积物中重金属的影响	区凤荏, 孙国萍, 许玫英 (3888)
区域水化学条件对淮南采煤沉陷区水域沉积物磷吸附特征的影响研究	易齐涛, 孙鹏飞, 谢凯, 曲喜杰, 王婷婷 (3894)
4 种人工湿地填料的 f2 噬菌体吸附特性	陈迪, 郑祥, 魏源送, 杨勇 (3904)
稻壳灰对抗生素磺胺的吸附特性研究	纪莹雪, 王凤贺, 张帆, 张艳红, 王国祥, 顾中铸 (3912)
紫外辐射对腐殖酸化学稳定性影响机制研究	王文东, 周礼川, 丁真真, 王洪平, 孙学军 (3921)
基于石墨烯载体的铁基材料制备及除砷性能比较	朝木尔乐格, 冯流, 霍艳霞 (3927)
nTiO ₂ 在水中的分散沉降行为研究	陈金媛, 方金凤, 魏秀珍 (3933)
微生物-铁氧化物交互作用对黄土中砷活化迁移的影响	谢芸芸, 陈天虎, 周跃飞, 谢巧勤 (3940)
两性离子在聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜表面接枝改性的研究	周桂花, 肖峰, 肖萍, 王东升, 段晋明, 石健, 臧莉 (3945)
化粪池排口处土壤对典型农户生活污水氮素污染物的消减测算研究	周锋, 王文林, 王国祥, 马久远, 万寅婧, 唐晓燕, 梁斌, 季斌 (3954)
珠江三角洲典型集约化猪场废水污染特征及风险评价	李文英, 彭智平, 于俊红, 黄继川, 徐培智, 杨少海 (3963)
污泥堆肥草坪基质利用对草坪生长及土壤和水环境的影响	金树权, 周金波, 陈若霞, 林斌, 王德耀 (3969)
活性污泥絮体粒径分布与分形维数的影响因素	李振亮, 张代钧, 卢培利, 曾善文, 杨永浩 (3975)
不同恢复方式对硝化颗粒污泥活性的影响	郭秀丽, 高大文, 卢健聪 (3981)
生物陶粒反应器的氨自养反硝化研究	陈丹, 王弘宇, 宋敏, 杨开, 刘晨 (3986)
亚高山草甸土壤呼吸的空间异质性研究	严俊霞, 李君剑, 李洪建, 张义辉 (3992)
SiB3 模式对作物区 CO ₂ 通量的模拟研究	张庚军, 卢立新, 蒋玲梅, 蒋磊, Ian Baker (4000)
缙云山土地利用方式对土壤活性有机质及其碳库管理指数的影响	徐鹏, 江长胜, 郝庆菊, 祝滔 (4009)
典型农业城市街道灰尘重金属特征及其环境风险评价: 以许昌市为例	闫慧, 陈杰, 肖军 (4017)
苏州、无锡和南通道路灰尘中的多溴联苯醚和多氯联苯	史双昕, 董亮, 李玲玲, 张辉, 李斯明, 张天野, 黄业茹 (4024)
废旧汽车拆解区土壤中多环芳烃垂向分布特性	吴彦瑜, 胡小英, 洪鸿加, 彭晓春 (4031)
铬污染土壤的稳定化处理及其长期稳定性研究	王旌, 罗启仕, 张长波, 谈亮, 李旭 (4036)
典型磺胺类抗生素在土柱中的淋溶规律研究	李曼, 陈卫平, 魏福祥, 焦文涛 (4042)
3 种金属氧化物纳米材料在不同土壤中迁移行为研究	方婧, 余博阳 (4050)
多孔介质中 NAPLs 流体毛细管指进形态及分形表征	李慧颖, 杜晓明, 杨宾, 伍斌, 徐竹, 史怡, 房吉敦, 李发生 (4058)
毛竹入侵对常绿阔叶林主要树种的化感作用研究	白尚斌, 周国模, 王懿祥, 梁倩倩, 陈娟, 程艳艳, 沈蕊 (4066)
珠江口典型水产养殖区抗生素抗性基因污染的初步研究	梁惜梅, 袁湘平, 施震 (4073)
江苏盐城地区水产品重金属含量与安全评价	刘洋, 付强, 高军, 徐网谷, 殷波, 曹亚乔, 秦卫华 (4081)
铜胁迫对不同基因型谷子幼苗基因组 DNA 多态性的影响	张义贤, 付亚萍, 肖志华, 张喜文, 李萍 (4090)
利用高通量测序对封存 CO ₂ 泄漏情景下土壤细菌的研究	田地, 马欣, 李玉娥, 查良松, 伍洋, 邹晓霞, 刘爽 (4096)
酸性矿山废水区域废矿石中真核生物多样性分析	李思远, 郝春博, 王丽华, 吕铮, 张丽娜, 刘莹, 冯传平 (4105)
十溴联苯醚降解菌的特性及功能蛋白初步分析	常晶晶, 尹华, 秦华明, 叶锦韶, 彭辉, 宋小飞 (4112)
硒对水稻吸收积累和转运锰、铁、磷和硒的影响	胡堂, 黄益宗, 黄艳超, 刘云霞, 梁建宏 (4119)
外源铁对不同番茄品种生理特性、镉积累及化学形态的影响	刘俊, 周坤, 徐卫红, 陈惠, 张明中, 江玲, 杨芸, 王崇力, 熊治庭 (4126)
电子废物排放持久性有毒污染物的控制政策分析	李力, 吕永龙, 王铁宇 (4132)
《环境科学》征稿简则 (3926)	《环境科学》征订启事 (4057)
信息 (3878, 3953, 3999, 4041)	

FDA 水解酶分析法表征近海泥滩微生物活性

刘叶¹, 邹立^{1,2}, 刘陆¹, 高冬梅^{1,2*}

(1. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266100; 2. 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266100)

摘要: 针对近海潮间带环境高盐、有机质组成复杂和微生物活性低的特点, 根据微生物酶解荧光素双醋酸酯(FDA)产生荧光素的原理, 建立了适于泥滩类潮间带沉积环境中微生物活性检测的荧光光度法。从样品浸提液、反应产物检测仪器、预处理方法、实验条件等不同方面进行优化, 确定泥滩类潮间带沉积环境中微生物活性的最优检测方法和条件如下: 沉积物湿样以灭菌陈海水为介质, 加入吐温-80分散剂, 充分振荡后静置, 使较大颗粒自然沉降; 取上层悬浊液, 经无菌滤膜(1.2 μm , 多次煮沸灭菌)过滤, 得到待测菌液; 取待测菌液加入适量FDA溶液, 在25~30℃下避光反应180 min, 以丙酮为终止剂终止反应, 25 min内以分子荧光光度计(激发波长488 nm, 发射波长530 nm)测定反应产物的荧光强度, 该方法的检测范围(以干重计)是 $3.0 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ 。微生物活性以单位质量样品的荧光素含量表示($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 干重)。

关键词: 海洋泥滩沉积物; 微生物活性; FDA水解酶分析; 荧光光度法

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)10-3818-07

Characterization of Microbial Activities in Marine Mudflat Sediment Using FDA Hydrolase Analysis

LIU Ye¹, ZOU Li^{1,2}, LIU Lu¹, GAO Dong-mei^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Key Laboratory of Marine Environment & Ecology Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract: A method based on fluorescence spectrometry was developed to detect the microbial activities in marine mudflat sediment, where is characterized by high salinity, complex organic compounds and low microbial biomass. This paper optimized the sample extracts, the detection equipment for reaction products, the pretreatment methods, and the experimental conditions. The optimal procedure is described as following. Fresh sediment was first extracted with sterilized and aged seawater, followed by the addition of Tween-80 solution, then uniformly dispersed by thorough oscillating, and kept steady for precipitation. After filtration through a sterilized membrane (1.2 μm , sterilized in boiling water repeatedly), the supernatant was supplemented with an appropriate amount of FDA solution and allowed to react in dark for 180 min at temperature ranged 25-30℃. The reaction was terminated by the addition of acetone, and the fluorescence intensity of the reaction mixture was measured within 25 min using a molecular fluorescence photometer at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 530 nm, and the detection range of this method (dry weight) was $3.0 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ ind $\cdot\text{g}^{-1}$. The microbial activity was reported as fluorescence content in per unit sediment mass ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, dry weight).

Key words: coastal intertidal mudflat; microbial activity; FDA hydrolase analysis; fluorescence spectrometry

中国北方近海多属泥滩类潮间带, 沉积环境中常常栖息着种类繁多、分布广泛的细菌、底栖微藻和原生动物等复杂的生物相, 共同维持着生态系统的平衡, 发挥其生态功能。微生物在生态系统中物质的降解、转化及能量流动过程中起着关键的控制作用^[1~3], 其活性水平取决于各种生物、化学和物理因素以及环境营养状况^[4], 如pH值、介质、温度、水分、通气性和营养物质含量等^[5]。微生物的活性直接影响着生物地球化学循环的活跃程度及生态系统的健康和稳定, 与众多环境问题的研究密切相关。

环境样品中微生物活性检测技术主要有碳呼吸、放射性标记物掺入细胞大分子、腺苷能荷和酶分析法, 每种方法各有其适用范围^[6]。其中酶活性

分析法中的荧光素双醋酸酯(FDA)水解酶活性是多种酶活性的体现, 包括蛋白酶、脂肪酶和酯酶等^[7,8]。FDA水解酶活性作为一种快速、灵敏的测定环境样品微生物活性的方法, 与微生物活性间的相关性比其他酶活性更显著, 已经广泛用于表征不同环境中, 特别是土壤环境中的微生物生物量^[9,10]和总微生物活性^[11~14], 其应用范围仍在不断扩展, 从土壤到活性污泥^[15]、溪流沉积生物滤膜^[14]、农作物残余物^[16]以及深海沉积物^[17]。其中对深海沉积物微生物活性检测, 仍采用常规环境样品检测方

收稿日期: 2013-01-19; 修订日期: 2013-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(41176064)

作者简介: 刘叶(1988~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋生物地球化学, E-mail: liuye@ouc.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: gdm@ouc.edu.cn

法和条件,该方法针对高盐、低活性环境样品检测的适用性,有待验证和完善。

FDA 水解酶分析法的原理是:无色有机化合物 FDA 被胞外酶与膜结合酶水解,释放出黄色的高荧光产物荧光素,该高荧光产物稳定性强,可通过其产生量来表征微生物活性强度^[12]。荧光素是一种亮黄色物质,在 490 nm 可见光有较强吸收^[9],可用分光光度计检测,这是目前常用的检测方法。分光光度法检测限较高,灵敏度较低,对微生物活性较低的样品或样品间微生物活性的较小差异难以检测。荧光产物除了在可见光区有较强吸收,其在 488 nm 激发下可发出 530 nm 荧光,利用该荧光特性,可采用分子荧光法进行荧光强度检测;根据荧光素的标准曲线将荧光强度值换算成单位质量样品的荧光素含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),来表征 FDA 被微生物酶水解的强弱,即微生物活性。相对于分光光度法,荧光光度法灵敏度高,检测限低,特征性强,尤其适用于微生物浓度或活性较低的样品的检测。目前荧光光度法表征微生物活性未见报道。

泥滩类潮间带除了有机质组成复杂,具有泥砂质等复杂的沉积环境特点外,拥有独特的海洋微生物群落结构及复杂的生物相。而且,由于该方法属于酶活性分析法的范畴,所有影响酶活性的因素都将影响微生物活性分析,现有的一般土壤或水体样品微生物活性分析方法不适用于泥滩类沉积环境,因此要精确表征泥滩类沉积环境中微生物的活性,需要同时考虑其环境条件和微生物特点,有必要在现有方法的基础上,进一步优化或改动,以适用于近海泥滩类沉积环境中微生物活性的分析研究。本研究针对中国北方近海沉积环境的特点,从样品浸提液和反应产物检测仪器、预处理方法、实验条件等方面进行筛选和优化,建立适用于泥滩类沉积环境的 FDA 水解酶微生物活性检测分析方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试样品选择有机质组成复杂、具有泥砂质特点的典型泥滩类沉积环境——胶州湾大沽河河口潮间带和黄河口潮间带,分别设置潮上、潮中、潮下带三类采样点,大沽河河口采样点为 DA ($36^{\circ}10'34.2''\text{N}$, $120^{\circ}08'33.72''\text{E}$)、DB ($36^{\circ}10'57.74''\text{N}$, $120^{\circ}08'25.52''\text{E}$) 和 DC ($36^{\circ}10'50.22''\text{N}$, $120^{\circ}08'26.22''\text{E}$),黄河口采样点

为 YA ($37^{\circ}43'52.26''\text{N}$, $119^{\circ}14'51.96''\text{E}$)、YB ($37^{\circ}43'56.76''\text{N}$, $119^{\circ}14'57.3''\text{E}$) 和 YC ($37^{\circ}44'1.62''\text{N}$, $119^{\circ}15'3.84''\text{E}$)。

用预先灭菌的铝盒采集表层沉积物,快速盖上盒盖放入塑料袋中,避光冷藏暂存,至实验室尽快分析。

1.2 实验方法

1.2.1 样品浸提液和反应产物检测方法的选择

实验常用的浸提液为磷酸缓冲液和陈海水。为了降低浸提液对测试结果的影响,本实验从两种常用浸提液中选择背景值较小的一种用于微生物活性测定。为了提高检测的灵敏度,分别采用分子荧光光度计和分光光度计进行分析测定,选择灵敏度较高的检测仪器用于微生物活性分析。

分别取一定量的经灭菌处理的磷酸缓冲溶液($\text{pH}=7.6$)和陈海水,加入适量荧光素双醋酸酯溶液(fluorescein diacetate,简称 FDA, SIGMA 公司,纯度为 99.99%,使用前配制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液),振荡混匀,避光反应 180 min,分别采用荧光法(F4600 分子荧光光度计,激发波长 488 nm,发射波长 530 nm)和分光光度法(UV2550 紫外可见分光光度计,490 nm)测定反应产物的荧光强度和吸光度,并绘制荧光素的标准曲线。

1.2.2 样品预处理方法的优化

由于样品泥砂质的特点,而且有机质组成复杂,为使样品能够均匀分散,在样品中加入常用分散剂吐温 80,以使样品中的微生物更好地悬浮在浸提液中,制备成菌悬液。另外,泥滩类沉积环境中有大量底栖微藻、原生动物等生物相^[18],为了排除这些生物相对微生物活性测定的影响,实验采用 $1.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤菌悬液后,进行微生物活性测定。

(1) 吐温-80 分散剂对荧光反应的影响

取一定量的样品浸提液,按照 1% 比例加入 0.05% 的吐温-80 工作液,混合均匀,然后测试 FDA 反应的荧光强度,确定吐温-80 分散剂是否影响荧光反应。以不加吐温-80 的浸提液为对照。

(2) 滤膜对荧光反应的影响

菌悬液经无菌滤膜过滤后,虽然可以去除藻类、原生动物等对微生物活性反应的影响,但是滤膜上可能含有荧光物质或其他可溶性成分,成为潜在的荧光反应影响因素。本实验旨在研究和消除滤膜对荧光反应的影响。

滤膜的无菌处理分别采用多次煮沸灭菌法^[19]和蒸馏水中高压蒸汽灭菌法。取一定量的浸提液,

分别采用上述两种方法处理的滤膜过滤,测定滤液的荧光反应产物强度.同时以未过滤的浸提液作为对照.

1.2.3 荧光反应条件的优化

泥滩沉积物经浸提和预处理,制成待测菌液,进行测试条件实验,确定最优反应条件.

(1) FDA 最适浓度确定

待测菌液与不同终浓度 FDA 溶液反应,测定其荧光强度,最大荧光素含量时 FDA 的添加量作为 FDA 最适浓度.大沽河样品 FDA 终浓度梯度设置为:0、2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;黄河口样品 FDA 终浓度梯度设置为:0、3.0、6.0、9.0、10.0、12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

(2) 终止剂的选择和有效终止时间范围的确定

待测菌液与最适浓度的 FDA 反应后,加入 4% 的终止剂终止反应,在终止反应后 50 min 内,每隔 10 min 测定反应产物的荧光强度,根据荧光素含量的变化情况,确定最佳的终止剂和有效终止时间范围.分别以丙酮和氯仿/甲醇(2:1,体积比)混合液为终止剂,设置不加终止剂的对照组.

(3) 最适反应温度的确定

待测菌液与最适浓度 FDA 反应分别于 15、20、25、30 和 35℃ 下进行,通过反应产物的荧光强度,确定最适反应温度.

(4) 最适反应时间的确定

在最适温度下,待测菌液与最适浓度 FDA 反应,分别于 60、90、120、150、180 和 210 min 终止反应,在有效终止时间段测定荧光强度,确定最适反应时间.

1.2.4 方法检测范围的确定

对泥滩样品中微生物进行稀释和浓缩,利用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚盐酸(DAPI)进行细胞染色^[20],以表面荧光显微计数法确定微生物的浓度,根据方法可靠检出荧光信号的最低限和最高限,制备不同微生物浓度梯度的泥滩样品,确定方法检测范围.

2 结果与讨论

2.1 样品浸提液和反应产物检测仪器的选择

荧光强度与荧光素浓度呈线性正相关关系,回归方程 $y = 9\,626.9x$, $r = 0.996\,9$,式中, y 指荧光强度; x 指荧光素含量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); r 指相关系数.根据回归方程荧光强度可用荧光素浓度表示.分子荧光光度法和分光光度法测定结果如表 1 和图 1 所示.陈海水的背景荧光强度明显低于磷酸缓冲液的背景荧光强度($P < 0.01$),后者约为前者的 2.4 倍,分光光度法测定的两种浸提液的吸光值平均结果虽然都为 0.000,但两种反应产物具有微弱可见的色度差别.因此实验选择背景荧光强度较低的陈海水作为微生物浸提液,选择灵敏度较高的分子荧光光度计为反应产物的检测仪器.

近海沉积物中微生物丰度一般在 $10^3 \sim 10^5$ 个· g^{-1} ^[21~23],而一般土壤中可超过 10^{10} 个· g^{-1} ,河流、湖泊中数浓度在 $10^4 \sim 10^9$ 个· mL^{-1} ,在富营养污染区微生物数浓度往往会升高 2~3 个数量级^[24].本实验样品微生物量的实测结果大概在 $10^3 \sim 10^4$ 个· g^{-1} .表明相对普通水体和陆地土壤环境来说,潮间带样品微生物量较低.所以分光光度法测定近海沉积物样品中微生物活性误差较大,而反应产物具有高荧光特性,成为检测方法的依据.

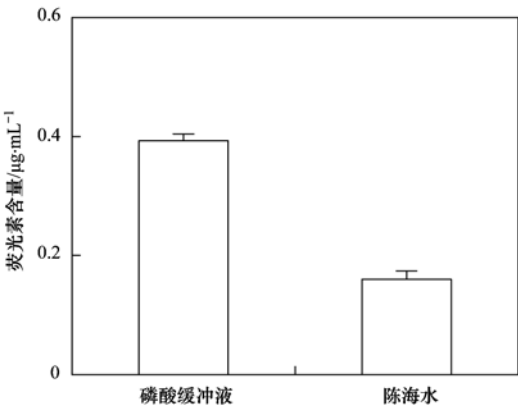


图 1 不同浸提液对荧光反应的影响

Fig. 1 Impact of different extracts on the fluorescence reaction

表 1 分子荧光光度计和分光光度计对反应产物的荧光强度和吸光值的检测结果

Table 1 Fluorescence intensity and the absorbance values of the reaction product by molecular fluorescence photometer and spectrophotometer

样品浸提液	分子荧光光度计				分光光度计			
	1	2	3	均值	1	2	3	均值
磷酸缓冲液	3 765	3 675	3 899	3 780	0.000	0.000	0.001	0.000
陈海水	1 565	1 388	1 662	1 538	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 样品预处理方法的优化

2.2.1 吐温-80 分散剂对荧光反应的影响

吐温-80 分散剂的影响结果见图 2,添加和未添加吐温-80 反应后的荧光素含量无明显差异($P >$

0.05),表明适量的分散剂吐温-80 对荧光反应基本无影响.但是适量吐温-80 分散剂使样品均匀分散,微生物更好地悬浮在浸提液中,提高提取效果.

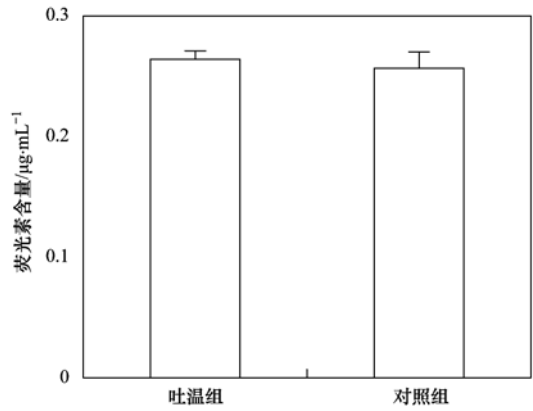


图 2 吐温-80 分散剂对荧光反应的影响

Fig. 2 Impact of Tween-80 solution on the fluorescence reaction

2.2.2 滤膜对荧光反应的影响

滤膜对荧光反应的影响结果见图 3,经煮沸灭菌和高压灭菌的滤膜过滤处理的陈海水反应产物的荧光素含量,分别高于未过滤陈海水荧光素含量的 24.5% 和 33.2%,表明滤膜上可能存在某些影响荧光测定的荧光物质^[25],或影响荧光反应的可溶性物质.该物质伴随过滤除藻、原生动物等过程,被引入到菌悬液中.

多次煮沸灭菌的滤膜与高压蒸汽灭菌的滤膜,对荧光反应的影响无明显差异($P>0.05$).但是相对于对照组,多次煮沸灭菌处理方式对反应荧光素含量的影响,比高压蒸汽灭菌方式对反应荧光素含量的影响低 8.7%.因此,采用多次煮沸灭菌法处理滤膜,并通过扣除膜空白的方法,去除滤膜对荧光反应的影响.

2.3 反应条件的优化

2.3.1 FDA 最适浓度确定

不同浓度梯度 FDA 溶液反应的荧光素含量见

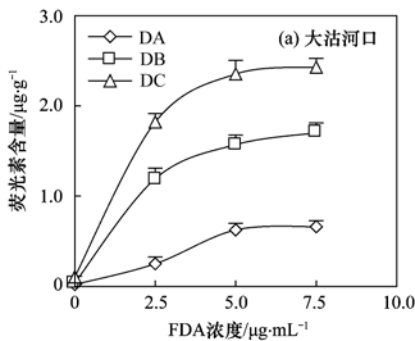
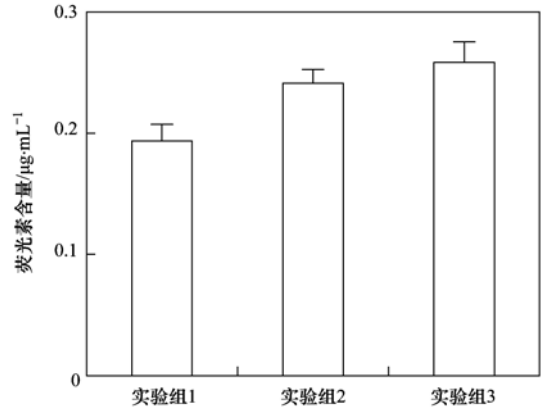


图 4 不同 FDA 浓度下的荧光素含量

Fig. 4 Fluorescence at different FDA concentration



实验组 1(未过滤陈海水)、实验组 2(煮沸滤膜过滤)、实验组 3(高压灭菌滤膜过滤)

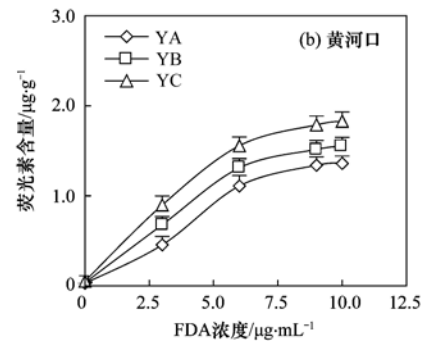
图 3 滤膜对荧光反应的影响

Fig. 3 Impact of membrane on the fluorescence reaction

图 4. 当胶州湾大沽河口样品 FDA 浓度不高于 $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,或黄河口样品 FDA 浓度不高于 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,反应产物的荧光素含量与 FDA 浓度呈正相关关系,荧光素含量逐渐增大,表明 FDA 的水解程度不断增加,样品的反应强度不断增强.当胶州湾大沽河样品 FDA 浓度高于 $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,或黄河口样品 FDA 浓度高于 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,反应产物出现混浊现象,表明 FDA 加入过量,无法进行荧光强度测定.当胶州湾大沽河口样品 FDA 浓度低于 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,或黄河口样品 FDA 浓度低于 $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,荧光素含量随 FDA 浓度增加变化较快;当 FDA 浓度分别在 $5.0 \sim 7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或 $6.0 \sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,荧光素含量随 FDA 浓度增加变化不大,可以作为最适 FDA 浓度范围.因此,胶州湾大沽河口样品最适 FDA 浓度为 $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,黄河口样品最适 FDA 浓度为 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3.2 终止剂的选择及有效终止时间范围的确定

实验开始阶段 FDA 水解反应迅速,随后反应速度大幅度降低.但是持续的慢反应将影响样品间的



可比性,因此需要加入快速终止酶反应的终止剂,终止 FDA 的水解反应,再进行荧光强度测定,以提高样品间的可比性。

FDA 法终止剂通常采用丙酮或氯仿/甲醇(2:1,体积比)混合液。本实验结果表明,丙酮和氯仿/甲醇(2:1 体积比)混合液都有一定程度的终止效应,在加入终止剂后 25 min 内,荧光素含量的变化范围分别是 1.4 ~ 8.6% 和 0.6 ~ 3.9%,变化均较小,无显著性差异($P > 0.05$),25 min 之后荧光素含量均表现了明显增强。有研究表明,丙酮终止剂使吸光度降低,不能准确测定活性较低的土壤样品(砂土、黏土);氯仿/甲醇(2:1, 体积比)混合液能够终止土壤样品的水解反应,而不会引起颜色损失^[12,13]。本实验没有发现两种终止剂的明显区别,并且采用分子荧光光度法,而非分光光度法,因此丙酮和氯仿/甲醇(2:1, 体积比)混合液都可以作为终止液,但是氯仿/甲醇(2:1, 体积比)混合液作为终止剂,使反应结果的荧光素含量大都略低于丙酮终

止剂的荧光素含量,使荧光素含量大概降低 0.5% ~ 9.2%,故而选择丙酮作为反应终止剂。

综上所述,25 min 范围内微生物活性的荧光反应都呈现较好的终止效果(图 5),这与 Green 等^[26]研究结果相似。所有样品应该在有效终止时间内测定完毕。

2.3.3 最适反应温度的确定

反应温度对荧光反应的影响结果如图 6 所示,反应产物的荧光素含量在 15 ~ 25℃ 之间与温度呈正比关系,25 ~ 30℃ 之间荧光素含量的变化较小,当反应温度超过 30℃ 时,荧光素含量均出现明显下降的趋势,当温度达 60℃ 时,大部分酶均已失活^[26];这与酶的最适反应温度有关,酶在温度升高后不同程度地失活,导致微生物活性逐渐降低。泥滩类沉积环境微生物群落属于海洋微生物,大部分海洋微生物最佳生长温度在 25 ~ 30℃ 范围内^[27]。因此,选择 25 ~ 30℃ 作为微生物活性测定的最适反应温度,此温度下 FDA 水解酶活性最高,对 FDA 的水解量

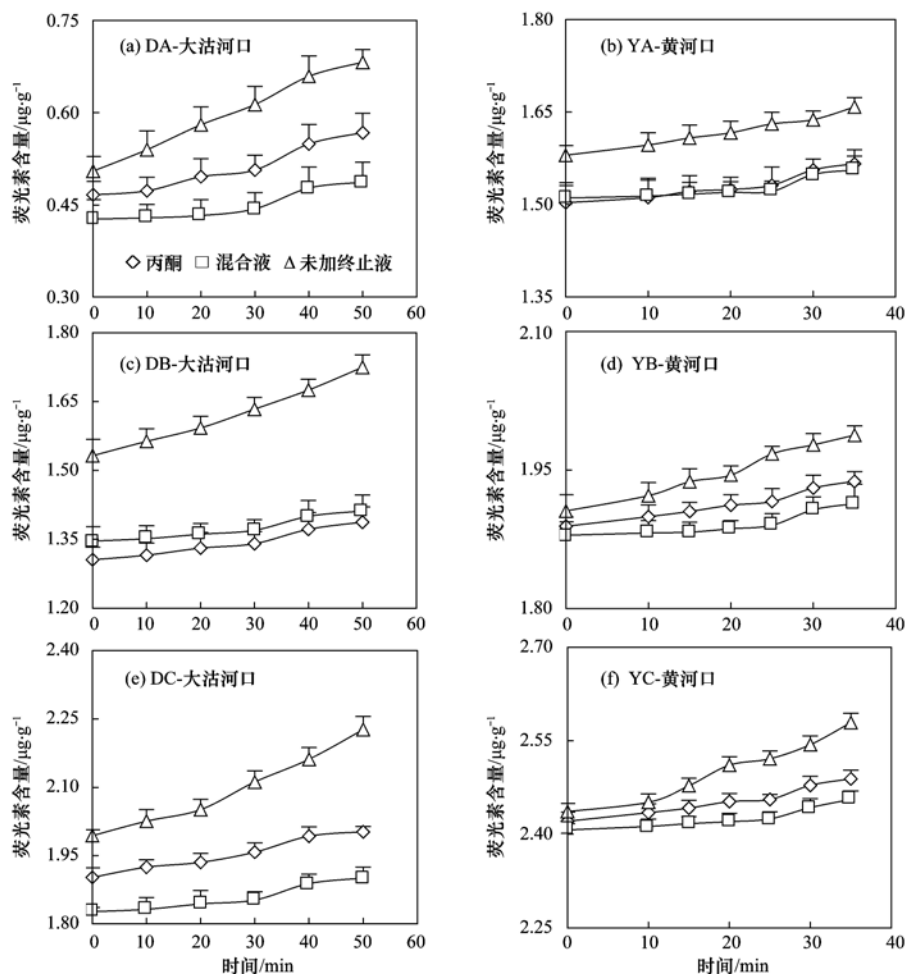


图 5 终止液的终止效果

Fig. 5 Termination effect of the stop buffer

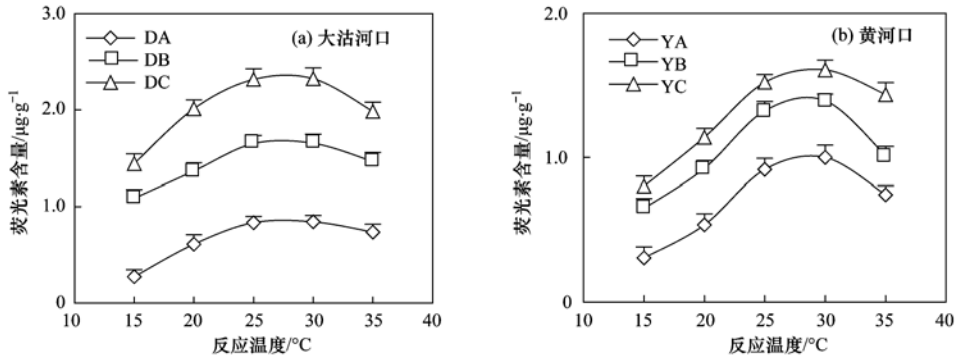


图 6 不同反应温度下的荧光素含量

Fig. 6 Fluorescence at different reaction temperature

最大,微生物活性也最强.

2.3.4 最适反应时间的确定

反应时间与荧光素含量的关系如图 7 所示,反应荧光素含量随时间延长不断增强;当进行到 150

min 时,反应速率开始降低;180 min 之后荧光素含量趋于变化缓慢、平稳. 所以最适反应时间为 180 min;这与报道的土壤样品的最适反应时间基本一致^[13,26].

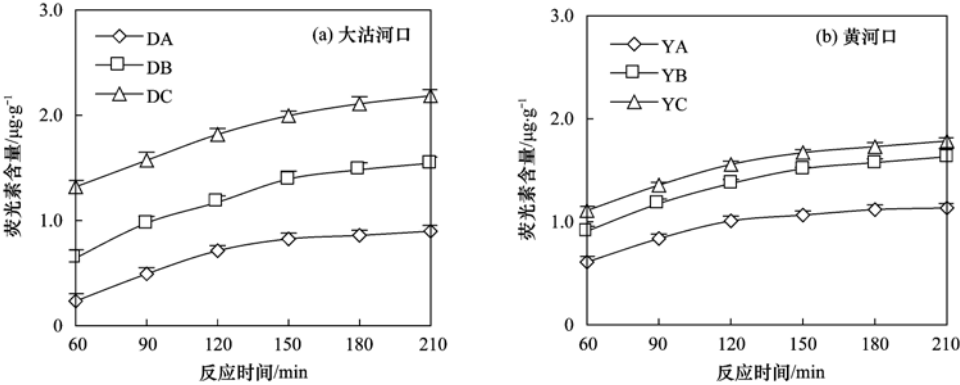


图 7 不同反应时间下的荧光素含量

Fig. 7 Fluorescence at different reaction time

2.4 方法检测范围的确定

如图 8 所示,在 $10^3 \sim 10^5$ 个·g⁻¹ 范围内不同微生物(干重,下同)数浓度的样品活性呈良好的线性关系($r=0.9956$). 根据在最优检测条件下测得空白对照的荧光强度值,加倍所对应的微生物数浓度作为方法检测范围的最低值,测得值为 3.0×10^3 个·g⁻¹. 当微生物浓度超过 1.1×10^5 个·g⁻¹ 时,受该仪器检测限的限制(荧光强度值 $< 10^5$),而无法进行荧光强度的检测. 该方法的检测范围是 $3.0 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ 个·g⁻¹,适用于一般泥滩类沉积环境中微生物活性的检测^[21~23].

3 结论

(1) 盐效应和低含量,是检测海洋环境样品的关键问题,也是不能与陆地环境样品检测方法直接通用的主要原因. 近海和河口区域潮间带沉积物中微生物活性的检测,除了高盐和低含量,还面临介质

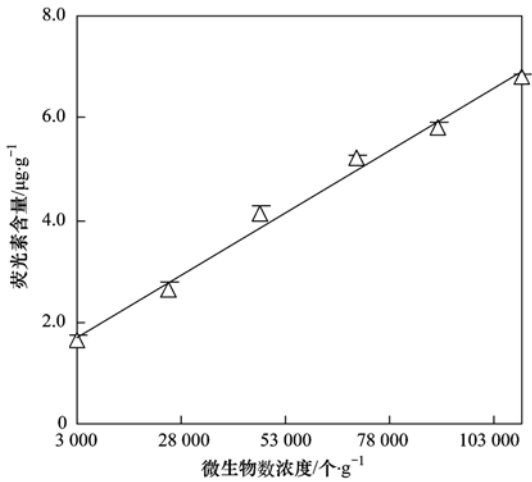


图 8 荧光素含量的线性响应范围

Fig. 8 Linear response range of the fluorescence signals

组成复杂,以及 pH、营养要素和动力扰动剧烈等问题. 针对于此,本研究根据微生物酶水解 FDA 产生荧光素的特性,以河口泥滩沉积物为实验材料,建立

海洋沉积环境微生物活性的荧光光度检测方法. 该方法具有检出限低、灵敏度高和干扰小的特点, 不仅适用于高盐、低含量的近海潮间带区域沉积物中微生物活性检测, 而且可以延伸至深远海环境沉积物微生物活性检测.

(2) 荧光素双醋酸酯(FDA)法检测微生物活性的方法如下: 称取一定量泥滩类沉积环境样品, 加入适量的灭菌陈海水, 再按照 1% 的比例加入样品分散剂 0.05% 的吐温-80 工作液, 充分振荡均匀分散后, 静置片刻使较大颗粒自然沉降; 取上层悬浊液, 通过 1.2 μm 的无菌滤膜(多次煮沸灭菌)过滤, 得到待测菌液. 不加样品的对照组(灭菌陈海水)需经同样的滤膜过滤, 以消除滤膜对荧光反应的影响; 加入适量的 FDA, 混合均匀, 在 25 ~ 30℃ 下避光反应 180 min, 再加入丙酮终止反应, 并在加入终止剂后 25 min 反应时间内, 采用分子荧光光度计(激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm)测定反应产物的荧光强度, 该方法的检测范围是 $3.0 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5$ 个 $\cdot\text{g}^{-1}$. 微生物活性以单位质量(干重)样品的荧光素含量表示($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

参考文献:

- [1] Nixdorf B, Jander J. Bacterial activities in shallow lakes—a comparison between extremely acidic and alkaline eutrophic hard water lakes[J]. *Hydrobiologia*, 2003, **506/509** (1-3): 697-705.
- [2] Deming J W, Baross J A. The early diagenesis of organic matter: bacterial activity[A]. In: Engel M H, Macko S A (Eds.). *Organic Geochemistry* [C]. New York: Plenum Press, 1993. 119-144.
- [3] Blackburn T H. Microbial food webs in sediments[A]. In: Sleight M A (Eds.). *Microbes in the Sea* [C]. New York: John Wiley and Sons, 1987. 355-359.
- [4] Marika T, Jaanis J, Jaak T. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, **407** (13): 3958-3971.
- [5] 郑有飞, 石春红, 吴芳芳, 等. 土壤微生物活性影响因子的研究进展[J]. *土壤通报*, 2009, **40** (5): 1209-1214.
- [6] 张甲耀, 宋碧玉, 陈兰洲, 等. *环境微生物学* [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2008. 243-248.
- [7] Guilbault G G, Kramer D N. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha-, and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes[J]. *Analytical Chemistry*, 1964, **36** (2): 409-412.
- [8] Rotman B, Papermaster B W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, **55** (1): 134-141.
- [9] Stubberfield L C F, Shaw P J A. A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measures of microbial activity[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1990, **12** (3-4): 151-162.
- [10] Gaspar M L, Cabello M N, Pollero R, et al. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil[J]. *Current Microbiology*, 2001, **42** (5): 339-344.
- [11] Swisher R, Carroll G C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces[J]. *Microbial Ecology*, 1980, **6** (3): 217-226.
- [12] Schnürer J, Rosswall T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **43** (6): 1256-1261.
- [13] Adam G, Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, **33** (7-8): 943-951.
- [14] Battin T J. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms[J]. *Science of the Total Environment*, 1997, **198** (1): 51-60.
- [15] Fontvieille D A, Outaguerouine A, Thevenot D R. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges [J]. *Environmental Technology*, 1992, **13** (6): 531-540.
- [16] Zablotowicz R M, Locke M A, Smeda R L. Degradation of 2, 4-D and fluometuron in cover crop residues [J]. *Chemosphere*, 1998, **37** (1): 87-101.
- [17] Gumprecht R, Gerlach H, Nehrkorn A. FDA hydrolysis and resazurin reduction as a measure of microbial activity in sediments from the south-east Atlantic [J]. *Helgolander Marine Research*, 1995, **49** (1-4): 189-199.
- [18] 姚晓, 山口一岩, 邹立, 等. 黄河三角洲南部潮间带沉积环境对底栖叶绿素 a 分布特征的影响[J]. *生态学杂志*, 2010, **29** (9): 1762-1769.
- [19] GB 5749-2006, 生活饮用水卫生标准[S].
- [20] 朱激, 林辰涛. 一种新型的 DNA 荧光染料——DAPI 的光学特性及其应用[J]. *武汉植物学研究*, 1986, **4** (1): 91-102.
- [21] 乔旭东, 唐学玺, 肖慧, 等. 渤海湾近岸海域的细菌数量分析[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2007, **37** (2): 273-276.
- [22] 肖慧, 唐学玺, 乔旭东, 等. 渤海湾天津近岸表层沉积物中细菌丰度及其与环境因子的相关性研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2010, **40** (6): 87-90.
- [23] 史君贤, 陈忠元, 胡锡钢. 南麂列岛附近海域表层水及沉积物中细菌的丰度及其在环境中的作用[J]. *东海海洋*, 1994, **12** (3): 57-61.
- [24] 张甲耀, 宋碧玉, 陈兰洲, 等. *环境微生物学* [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2008. 13-26.
- [25] 李影, 段锐, 钱爱东. “活的非可培养状态”细菌荧光显微镜检测技术[J]. *中国动物检疫*, 2010, **27** (2): 43-44.
- [26] Green V S, Stott D E, Diack M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, **38** (4): 693-701.
- [27] 张晓华, 李筠, 纪伟尚, 等. *海洋微生物学* [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007. 315-336.

CONTENTS

Stable Carbon Isotopic Composition in PM _{2.5} in Nanjing Region	WU Meng-long, GUO Zhao-bing, LIU Feng-ling, <i>et al.</i> (3727)
Distribution and Source Apportionment of <i>n</i> -Alkanes in Atmospheric Particle in Taiyuan, China	HU Dong-mei, PENG Lin, BAI Hui-ling, <i>et al.</i> (3733)
Study on Influence of Traffic and Meteorological Factors on Inhalable Particle Matters of Different Size	LUO Na-na, ZHAO Wen-ji, YAN Xing, <i>et al.</i> (3741)
Particle Emission Characteristics of Diesel Bus Fueled with Bio-diesel	LOU Di-ming, CHEN Feng, HU Zhi-yuan, <i>et al.</i> (3749)
Characteristics of δ ¹⁸ O in Precipitation and Water Vapor Sources in Lanzhou City and Its Surrounding Area	CHEN Fen-li, ZHANG Ming-jun, MA Qian, <i>et al.</i> (3755)
Characteristics and Sources of Soluble Ions in Aerosols from Glacier No. 1 at the Headwater of Urumqi River, Tianshan Mountains, China	YUE Xiao-ying, LI Zhong-qin, ZHANG Ming-jun, <i>et al.</i> (3764)
Mechanism and Performance of Styrene Oxidation by O ₃ /H ₂ O ₂	HE Jue-cong, HUANG Qian-ru, YE Qi-hong, <i>et al.</i> (3772)
Sulfur Isotopic Signatures in Leaves of <i>Pinus massoniana</i> Lamb. and Source Apportionment	GUAN Hui, XIAO Hua-yun, ZHU Ren-guo, <i>et al.</i> (3777)
Comparisons of Sulfur Contents and Isotopes Between Mosses and Surface Soils in Jiangxi Province	LI Nan, XIAO Hua-yun, CHEN Yong-zhong, <i>et al.</i> (3782)
Research on Spatial Characteristic of Non-point Source Pollution in Liaohe River Basin	WANG Xue-lei, CAI Ming-yong, ZHONG Bu-qing, <i>et al.</i> (3788)
Spatial and Temporal Variations of Hydrological Characteristic on the Landscape Zone Scale in Alpine Cold Region	YANG Yong-gang, HU Jin-fei, XIAO Hong-lang, <i>et al.</i> (3797)
Distribution of Matrix-Bound Phosphine in Surface Sediments of Jinpu Bay	YOU Li-li, ZONG Hai-bo, ZHANG Shu-fang, <i>et al.</i> (3804)
Effects of Drying-Rewetting Alternation on Urease Activity in Chongming East Intertidal Flat; Results of a Simulation Study	HAN Jian-gang, CAO Xue (3810)
Characterization of Microbial Activities in Marine Mudflat Sediment Using FDA Hydrolase Analysis	LIU Ye, ZOU Li, LIU Lu, <i>et al.</i> (3818)
Analysis of Ecological Risk and the Content Situation of Polybrominated Diphenyl Ethers in Sediments from Northeast China River Basin	NIE Hai-feng, CHENG Hang-xin, ZHAO Chuan-dong, <i>et al.</i> (3825)
Residues and Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Surface Sediments and Marine Organisms from Dapeng Bay, Shenzhen	SUN Run-xia, KE Chang-liang, GU Yang-guang, <i>et al.</i> (3832)
Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Two Mathematical Models for Runoff of the Shanghai Elevated Inner Highway, China	BIAN Lu, LI Tian, HOU Juan (3840)
Biomagnification of Heavy Metals in the Aquatic Food Chain in Daning River of the Three Gorges Reservoir During Initial Impoundment	YU Yang, WANG Yu-chun, ZHOU Huai-dong, <i>et al.</i> (3847)
Temporal and Spatial Distribution of Environmental Factors and Chlorophyll-a and Their Correlation Analysis in a Small Enclosed Lake	LI Fei-peng, ZHANG Hai-ping, CHEN Ling (3854)
Experiment and Model Simulation of Self-Purification Capacity of Nitrogen and Phosphorus in Lake Taihu	HAN Tao, ZHAI Shu-hua, HU Wei-ping, <i>et al.</i> (3862)
Simulation Research on the Release of Internal Nutrients Affected by Different Dredging Methods in Lake	CHEN Chao, ZHONG Ji-cheng, FAN Cheng-xin, <i>et al.</i> (3872)
Research of Urban Eutrophic Water Repair by Water/Sediment Biological Bases	ZHOU Hui-hua, SONG Xiao-guang, WU Ge, <i>et al.</i> (3879)
Effects of Regulatory Agent on the Heavy Metal Stability in Tidal Sediments	OU Feng-zhuang, SUN Guo-ping, XU Mei-ying (3888)
Impact of Regional Water Chemistry on the Phosphorus Isothermal Adsorption of the Sediments in Three Subsidence Waters of the Huainan Mine Areas	YI Qi-tao, SUN Peng-fei, XIE Kai, <i>et al.</i> (3894)
Adsorption Characteristics of f2 Bacteriophages by Four Substrates in Constructed Wetland	CHEN Di, ZHENG Xiang, WEI Yuan-song, <i>et al.</i> (3904)
Adsorption Characteristics of the Antibiotic Sulfanilamide onto Rice Husk Ash	Ji Ying-xue, WANG Feng-he, ZHANG Fan, <i>et al.</i> (3912)
Study on the Stability Variation Mechanism of Humic Acid Water Solution After Radiated by the UV Light	WANG Wen-dong, ZHOU Li-chuan, DING Zhen-zhen, <i>et al.</i> (3921)
Comparison of As Removal Performance by Graphene/Iron-Based Material	Chaomuerlege, FENG Liu, HUO Yan-xia (3927)
Studies on the Dispersion and Deposition Behavior of Nano-TiO ₂ in Aquatic System	CHEN Jin-yuan, FANG Jin-feng, WEI Xiu-zhen (3933)
Effect of the Interaction of Microorganisms and Iron Oxides on Arsenic Releasing into Groundwater in Chinese Loess	XIE Yun-yun, CHEN Tian-hu, ZHOU Yue-fei, <i>et al.</i> (3940)
Surface Modification of Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membrane by Using the Zwitterionic Substance	ZHOU Gui-hua, XIAO Feng, XIAO Ping, <i>et al.</i> (3945)
Estimate the Abatement Rate of Septic Tank Sewage Outfall Soil on Nitrogen Pollutants of Typical Farmer Household Sewage	ZHOU Feng, WANG Wen-lin, WANG Guo-xiang, <i>et al.</i> (3954)
Wastewater Pollution Characteristics from Typical Intensive Pig Farms in the Pearl River Delta and Its Ecological Risk Assessment	LI Wen-ying, PENG Zhi-ping, YU Jun-hong, <i>et al.</i> (3963)
Effects of Sludge Compost Used as Lawn Medium on Lawn Growth and Soil and Water Environment	JIN Shu-quan, ZHOU Jin-bo, CHEN Ruo-xia, <i>et al.</i> (3969)
Influencing Factors of Floc Size Distribution and Fractal Dimension of Activated Sludge	LI Zhen-liang, ZHANG Dai-jun, LU Pei-li, <i>et al.</i> (3975)
Influence of Different Recovery Methods on the Activity of Nitrification Granular Sludge	GUO Xiu-li, GAO Da-wen, LU Jian-cong (3981)
Study on Hydrogen Autotrophic Denitrification of Bio-ceramic Reactor	CHEN Dan, WANG Hong-yu, SONG Min, <i>et al.</i> (3986)
Studies on Spatial Heterogeneity of Soil Respiration in a Subalpine Meadow	YAN Jun-xia, LI Jun-jian, LI Hong-jian, <i>et al.</i> (3992)
Modeling of CO ₂ Fluxes at Cropland by Using SIB3 Model	ZHANG Geng-jun, LU Li-xin, JIANG Ling-mei, <i>et al.</i> (4000)
Effects of the Different Land Use on Soil Labile Organic Matter and Carbon Management Index in Junyun Mountain	XU Peng, JIANG Chang-sheng, HAO Qing-ju, <i>et al.</i> (4009)
Heavy Metal Content in Street Dust and Environmental Risk Assessment of Agricultural City: A Case Study of Xuchang City	YAN Hui, CHEN Jie, XIAO Jun (4017)
Polybrominated Diphenyl Ethers and Polychlorinated Biphenyls in Road Dust from Suzhou, Wuxi and Nantong	SHI Shuang-xin, DONG Liang, LI Ling-ling, <i>et al.</i> (4024)
Vertical Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Abandoned Vehicles Dismantling Area Soil	WU Yan-yu, HU Xiao-ying, HONG Hong-jia, <i>et al.</i> (4031)
Stabilization and Long-term Effect of Chromium Contaminated Soil	WANG Jing, LUO Qi-shi, ZHANG Chang-bo, <i>et al.</i> (4036)
Leaching Characteristics of Sulfadiazine and Sulfamethoxazole in Soil Column	LI Man, CHEN Wei-ping, WEI Fu-xiang, <i>et al.</i> (4042)
Transport Behaviors of Metal Oxide Nanomaterials in Various Soils	FANG Jing, YU Bo-yang (4050)
Fractal Characteristics of Capillary Finger Flow for NAPLs Infiltrated in Porous Media	LI Hui-ying, DU Xiao-ming, YANG Bin, <i>et al.</i> (4058)
Allelopathic Potential of <i>Phyllostachys edulis</i> on Two Dominant Tree Species of Evergreen Broad-leaved Forest in Its Invasive Process	BAI Shang-bin, ZHOU Guo-mo, WANG Yi-xiang, <i>et al.</i> (4066)
Preliminary Studies on the Occurrence of Antibiotic Resistance Genes in Typical Aquaculture Area of the Pearl River Estuary	LIANG Xi-mei, NIE Xiang-ping, SHI Zhen (4073)
Concentrations and Safety Evaluation of Heavy Metals in Aquatic Products of Yancheng, Jiangsu Province	LIU Yang, FU Qiang, GAO Jun, <i>et al.</i> (4081)
Effects of Cu ²⁺ Stress on DNA Polymorphism of Genome in Foxtail Millet of Different Genotypes	ZHANG Yi-xian, FU Ya-ping, XIAO Zhi-hua, <i>et al.</i> (4090)
Research on Soil Bacteria Under the Impact of Sealed CO ₂ Leakage by High-throughput Sequencing Technology	TIAN Di, MA Xin, LI Yu-e, <i>et al.</i> (4096)
Microeukaryotic Biodiversity in the Waste Ore Samples Surrounding an Acid Mine Drainage Lake	LI Si-yuan, HAO Chun-bo, WANG Li-hua, <i>et al.</i> (4105)
Characteristics and Functional Protein Analysis of an Effective Decabromodiphenyl Ether-Degrading Strain	CHANG Jing-jing, YIN Hua, QIN Hua-ming, <i>et al.</i> (4112)
Effect of Selenium on the Uptake and Translocation of Manganese, Iron, Phosphorus and Selenium in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	HU Ying, HUANG Yi-zong, HUANG Yan-chao, <i>et al.</i> (4119)
Effect of Exogenous Iron on Accumulation and Chemical Forms of Cadmium, and Physiological Characterization in Different Varieties of Tomato	LIU Jun, ZHOU Kun, XU Wei-hong, <i>et al.</i> (4126)
Analysis of Control Policy for Persistent Toxic Substances from Electronic Wastes in China	LI Li, LÜ Yong-long, WANG Tie-yu (4132)

《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10月15日 34卷 第10期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 34 No. 10 Oct. 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