

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第37卷 第12期

Vol.37 No.12

2016

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次(卷终)

基于数值计算的细颗粒物采样管路传输损失评估 罗李娜,程真,朱雯斐,张强,楼晟荣,乔利平,晏乃强(4457)

南京北郊重金属气溶胶粒子来源分析 秦鑫,张泽锋,李艳伟,沈艳,赵姝慧(4467)

南京青奥会期间不同天气条件下大气气溶胶中水溶性离子的分布特征 师远哲,安俊琳,王红磊,邹嘉南,王俊秀(4475)

苏州市 PM_{2.5} 中水溶性离子的季节变化及来源分析 王念飞,陈阳,郝庆菊,王欢博,杨复沫,赵晴,薄宇,贺克斌,姚玉刚(4482)

成都西南郊区春季 PM_{2.5} 中元素特征及重金属潜在生态风险评价 杨怀金,杨德容,叶芝祥,张恒德,马学款,汤志亚,毛冬艳(4490)

泉州市大气降尘中稀土元素地球化学特征及来源解析 张棕巍,于瑞莲,胡恭任,胡起超,王晓明(4504)

青奥会期间基于 $\delta^{13}\text{C}$ 观测的大气 CO₂ 来源解析 徐家平,李旭辉,肖薇,次仁旺姆,温学发,刘寿东,杜雪婷,曹畅(4514)

民航飞机起飞过程气态污染物排放特征分析 韩博,黄佳敏,魏志强(4524)

畜禽养殖场空气中可培养抗生素耐药菌污染特点研究 张兰河,贺雨伟,陈默,高敏,仇天雷,王旭明(4531)

有序介孔材料过滤脱除纳米颗粒物 邢奕,王骢,路培,李子宜,刘应书,于晗(4538)

基于 DOC + CDPF 技术的公交车燃用生物柴油气态物道路排放特性 楼狄明,张允华,谭丕强,胡志远(4545)

亚热带浅水池塘水-气界面甲烷通量特征 龙丽,肖尚斌,张成,张文丽,谢恒,李迎春,雷丹,穆晓辉,张军伟(4552)

浙江汤浦水库浮游植物季节演替及其影响因子分析 马沛明,施练东,张俊芳,胡菊香,赵先富(4560)

太湖典型沉水植物生理指标对水质的响应 高敏,胡维平,邓建才,胡春华(4570)

利用 UV-vis 及 EEMs 对比冬季完全混合下两个不同特征水库溶解性有机物的光学特性 黄廷林,方开凯,张春华,周石磊,曾明正,龙圣海,李扬,夏超,从海兵(4577)

三峡前置库汉丰湖试运行年水体水质现状及控制效果评估 杨兵,何丙辉,王德宝(4586)

太湖贡湖湾水域抗生素污染特征分析与生态风险评价 武旭跃,邹华,朱荣,王靖国(4596)

滇池不同湖区沉积物正构烷烃的分布特征及其环境意义 余丽燕,韩秀秀,黄晓虎,吴亚林,杨浩,黄涛,余艳红,黄昌春(4605)

洱海入湖河口湿地干湿季沉积物氮、磷、有机质垂向分布特征及污染风险差异性 王书锦,刘云根,王妍,侯磊,张超(4615)

蠡湖表层沉积物氮矿化过程及其赋存形态变化 赵丽,王书航,姜霞,黄晓峰,陈俊伊(4626)

三峡库区表层沉积物重金属含量时空变化特征及潜在生态风险变化趋势研究 卓海华,孙志伟,谭凌智,吴云丽,兰静(4633)

模拟巢湖流域氯菊酯的迁移转化和生态风险 刘亚莉,王继忠,彭书传,陈天虎(4644)

有机质胶体对卡马西平在多孔介质中迁移影响模拟实验 张思,何江涛,朱晓婧(4651)

无机型城市景观水体表观污染的悬浮颗粒物粒度分布特征:以中国运河苏州段为例 李倩倩,潘杨,贡丹燕,黄勇,夏侯刚(4662)

清水江流域岩石风化特征及其碳汇效应 吕婕梅,安艳玲,吴起鑫,吴永贵(4671)

南方典型农田区浅层地下水污染特征 郭卉,虞敏达,何小松,罗岳平(4680)

水化学和环境同位素在示踪枣庄市南部地下水硫酸盐污染源中的应用 马燕华,苏春利,刘伟江,朱亚鹏,李俊霞(4690)

粗放型绿色屋顶对多环芳烃的控制效果 沈庆然,侯娟,李田(4700)

超滤的预处理工艺对比研究:化学混凝与电絮凝 赵凯,杨春风,孙境求,李静,胡承志(4706)

QCM-D 与 AFM 联用解析 EfOM 在 SiO₂ 改性 PVDF 超滤膜表面的吸附机制 姜家良,王磊,黄丹曦,黄松,朱振亚,徐亚伟,李青青(4712)

群体感应淬灭菌的分离及其膜污染控制性能 赵畅,王文昭,徐期勇(4720)

水力负荷对生物沉淀池污染物净化性能的影响特性 王文东,马翠,刘荟,范银萍,刘国旗,张珂(4727)

外加微量 N₂H₄ 下 SBR 中硝化微生物特性 肖芄颖,张代钧,卢培利(4734)

部分半硝化 AGS-SBR 工艺的启动及其种群结构分析 鲁航,信欣,管蕾,邹长武,余静(4741)

典型油田多环芳烃污染对土壤反硝化微生物群落结构的影响 姚炎红,王明霞,左小虎,李振轮,罗锋,周志峰(4750)

生物强化膜生物反应器(MBR)处理邻苯二甲酸二乙酯(DEP)效果及微生物群落结构分析 张可,关允,罗鸿兵,陈伟,陈佳,陈强(4760)

开闭路条件下沉积物微生物燃料电池阳极细菌群落差异解析 吴义诚,邓全鑫,王泽杰,郑越,李岱霖,赵峰(4768)

全氟辛酸(PFOA)厌氧生物可降解性 李飞,陈轶丹,周真明,廖晓斌,马红芳,苑宝玲(4773)

水肥用量对玉米季土壤 CO₂ 排放的综合影响 杨硕欢,张保成,王丽,胡田田(4780)

福建西部山地水土流失区土壤呼吸的空间异质性 姚雄,余坤勇,曾琪,杨玉洁,张今朝,刘健(4789)

基于不确定性分析的土壤-水稻系统镉污染综合风险评估 杨阳,陈卫平,李艳玲,王美娥,彭驰(4800)

北京市不同地区土壤中的球囊霉素荧光特征及其与土壤理化性质的关系 柴立伟,刘梦娇,蒋大林,樊灏,曹晓峰,黄艺(4806)

准东煤炭产业区周边土壤重金属污染与健康风险的空间分布特征 刘芳,塔西甫拉提·特依拜,依力亚斯江·努尔麦麦提,王楠,杨春,夏楠,高宇潇(4815)

河北平原潮土中微生物对氮降解特征 张灿灿,庞会从,高太忠,张静,李晓玉,付胜霞(4830)

砷-非对蜈蚣草根不同碳基团的影响 廖晓勇,龚雪刚,阎秀兰,马旭,吴泽赢(4841)

碱性固体对污泥的调质堆肥影响及产品对土壤的改良潜力 蔡函臻,宁西翠,王权,张增强,任秀娜,李荣华,王美净, Mukesh Kumar Awasthi(4848)

不同热解及来源生物炭对西北黄土吸附敌草隆的影响 孙航,蒋煜峰,石磊平,慕仲锋,展惠英(4857)

南丹矿业活动影响区人群头发中重金属含量特征 田美玲,钟雪梅,夏德尚,伏凤艳,陆素芬,李黎,宋波(4867)

Mg-Al-Me (Me = La, Ce, Zr) 复合氧化物制备及其除氟性能 汪爱河,周康根,刘行,陈泉州,刘芳(4874)

铁锰复合氧化物/壳聚糖珠:一种环境友好型除磷吸附剂 付军,范芳,李海宁,张高生(4882)

不同粒径垃圾焚烧飞灰重金属毒性浸出及生物可给性 王春峰,陈冠飞,朱艳臣,姚丹,皇晓晨,王连军(4891)

《环境科学》第37卷(2016年)总目录 (4899)

《环境科学》征稿简则(4466) 《环境科学》征订启事(4699) 信息(4489,4881)

典型油田多环芳烃污染对土壤反硝化微生物群落结构的影响

姚炎红, 王明霞, 左小虎, 李振轮, 罗锋, 周志峰*

(西南大学资源环境学院, 重庆 400715)

摘要: 油田区土壤具有潜在的 PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) 污染风险, 而以硝酸根为电子受体的反硝化作用可能在 PAHs 的厌氧代谢中起到重要作用. 以具有 50 多年历史的江汉油田区域为对象, 从该油田的油井口附近采集了 9 个土壤样品, 编号为 JH-1 ~ JH-9, 以反硝化相关的 *nirK* (*Cu*-亚硝酸还原酶基因) 和 *nirS* (细胞色素 *cd₁*-亚硝酸还原酶基因) 为分子标识, 通过定量 PCR 及克隆文库结合 T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) 的方法, 研究典型油田区土壤反硝化微生物的群落结构, 并探讨其与土壤环境因子之间的关系. 结果表明, 该油田区土壤中 *nirK* 基因的丰度高于 *nirS* 基因, PAHs 含量最高的土壤样品 (JH-4) 中反硝化功能基因 *nirK* 和 *nirS* 的丰度均最低, 相关性分析表明, 土壤 *nirK* 及 *nirS* 基因的丰度均与土壤 PAHs 含量呈显著负相关 (*nirK*: $R^2 = 0.54$, $P < 0.05$; *nirS*: $R^2 = 0.58$, $P < 0.05$). 克隆文库及 T-RFLP 的结果则表明, 该油田土壤中 *nirK* 基因的群落组成在不同样品间的变异较大, 且 PAHs 含量最高的 JH-4 中该基因的群落组成与其它各样品有明显的不同, RDA (redundancy analysis) 的分析结果进一步表明除有效氮、有效磷外, 土壤 PAHs 含量也是影响 *nirK* 型反硝化微生物群落组成的重要因子. 相较于 *nirK*, 该油田区土壤中 *nirS* 基因的群落组成在不同样品间的差异较小, 但发现 *nirS* 型假单胞菌的丰度与土壤 PAHs 含量呈正相关, 表明具备较强有机污染物降解能力的假单胞菌属可能在该区域土壤 PAHs 的反硝化代谢中起到重要作用.

关键词: 油田土壤; 反硝化; PAHs; *nirK*; *nirS*; 群落结构

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)12-4750-10 DOI: 10.13227/j.hjxx.201606071

Effects of PAHs Pollution on the Community Structure of Denitrifiers in a Typical Oilfield

YAO Yan-hong, WANG Ming-xia, ZUO Xiao-hu, LI Zhen-lun, LUO Feng, ZHOU Zhi-feng*

(College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Agricultural soils in the oilfields have the potential risk of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) pollution, and the denitrification process with nitrate as the terminal electron acceptor might be important for soil PAHs elimination under anaerobic condition. In this study, 9 soil samples listed as JH-1 to JH-9 were collected from the JiangHan oilfield with a history of more than 50 years. Using the functional genes (*nirK*: *Cu*-nitrite reductase gene; *nirS*: *cd₁*-nitrite reductase gene) involved in denitrification as biomarkers, the community structure of soil denitrifiers was investigated by quantitative-PCR and T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) combined with clone library, and the relationship between soil properties and community structure of soil denitrifiers was discussed. The result indicated that the copy numbers of *nirK* were higher than those of *nirS* in all soil samples, and the lowest copy numbers of *nirK* and *nirS* were both detected in the JH-4 with the highest PAHs content. Meanwhile, the correlation analysis also showed a negative correlation between the copy numbers of those functional genes and soil PAHs content (*nirK*: $R^2 = 0.54$, $P < 0.05$; *nirS*: $R^2 = 0.58$, $P < 0.05$). Furthermore, the result of T-RFLP indicated that the *nirK* community structures in different soil samples varied significantly, which was obviously unique in the sample (JH-4) with the highest PAHs content. The subsequent RDA (redundancy analysis) also demonstrated that soil PAHs content as well as the available nitrogen and phosphorus belonged to the most important factors affecting the *nirK* community structure in this oilfield soil. Compared with *nirK*, little variation was shown about the *nirS* community structure among the soil samples. However, the abundance of *nirS*-harboring *pseudomonas* had a remarkably positive relation with the soil PAHs content, which indicated that *pseudomonas*, a well known bacterial genus with strong ability to degrade organic pollutants, might be an essential driver for PAHs degradation via denitrification process in this oilfield soil.

Key words: oilfield soil; denitrification; PAHs; *nirK*; *nirS*; community structure

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类广泛分布于环境中的由两个或两个以上苯环以线状、角状或簇状排列的稠环化合物, 因其具有强烈的致突变、致癌及致畸作用, 美国环境保护署和欧盟均已经将 PAHs 列入典型污染物之

收稿日期: 2016-06-12; 修订日期: 2016-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41371477); 中央高校基本科研业务费专项 (2014B047)

作者简介: 姚炎红 (1991 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: 1463721976@qq.com

* 通讯联系人, E-mail: zhouzhf@swu.edu.cn

列^[1,2]. 由于其毒性、生物蓄积性及半挥发性并能在环境中持续存在,也被列入典型持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs). 化石燃料的燃烧是 PAHs 的主要来源,由于人类对化石产品的不断开发利用,PAHs 持续向环境中排放,高温过程形成的 PAHs 大多排放到大气中,随着大气环流、大洋环流等循环而不断扩散从而导致空气、土壤及水体甚至南极、高山冰川等都不同程度受到 PAHs 的污染^[3~5]. 自然条件下的多环芳烃很难降解,且其抗降解能力随着分子中苯环数和分子量的增加而增强. PAHs 在环境中的降解或消除途径主要包括挥发、光氧化、生物富集、化学氧化、土壤吸附及微生物降解等^[2]. 其中微生物的降解在土壤、水体及沉积物等环境中的 PAHs 去除中起到了主导作用,是环境中 PAHs 衰减的主要途径之一^[6]. PAHs 的微生物降解可以在有氧、微氧及厌氧的条件下进行,其中有氧条件下微生物的降解已经得到大量研究,其降解效率高,降解机制也相对明确. 然而,在土壤、水体、沉积物等环境中,多数 PAHs 可能处于微氧或厌氧状态,因此,PAHs 的微氧及厌氧代谢在上述环境中极有可能起到了不可忽视的作用^[6].

在厌氧条件下, NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 CO_2 及 SO_4^{2-} 等均可作为与 PAHs 降解过程相偶联的电子受体,通过氧化还原反应将 PAHs 逐级降解^[7]. 由于硝酸盐通常在土壤、水体等环境中大量存在,因此 PAHs 的厌氧代谢过程与以其为电子受体的反硝化过程的偶联可能在缺氧或厌氧环境中 PAHs 的降解中起到重要的作用. 反硝化过程是反硝化微生物在一定条件下,将硝酸盐、亚硝酸盐逐级还原,最终将氮以一氧化氮(NO)、氧化亚氮(N_2O)或分子态氮(N_2)的形式释放出来的过程. 这一系列酶促反应分别由硝酸盐还原酶(nitrate reductase, Nar)、亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, Nir)、氧化氮还原酶(nitric oxidoreductase, Nor)和氧化亚氮还原酶(nitrous oxide reductase, Nos)所催化^[8]. 编码这些酶的相关功能基因也被广泛用作研究环境中反硝化微生物群落组成的分子标识物^[9,10]. Mihelcic 等^[11]在 1988 年首次报道了典型 PAHs(萘)可在反硝化条件下降解,此后,反硝化条件下 PAHs 的降解逐渐被人们所关注,一些研究也相继报道了多种大分子的复杂 PAHs 在反硝化条件下降解^[12~14]. 目前的研究表明,反硝化条件下 PAHs 的降解与 NO_3^- 的含量存在明显的相关性^[15~17]. 一些以反硝化过程中的功能基因作为分子标识的分子生态学研究进一步表明,

PAHs 的降解与反硝化微生物的丰度和群落结构密切相关^[9,18]. 由此可见,电子受体(NO_3^-)的浓度及反硝化相关的微生物群落结构均是反硝化条件下 PAHs 厌氧代谢的关键影响因子.

土壤是 PAHs 重要的汇,源于大气、水体及人为的原油泄漏均会造成土壤 PAHs 污染,同时土壤的复杂性也决定了厌氧的 PAHs 降解在 PAHs 的衰减中可能起到了不可忽视的作用. 当前,有不少关于土壤反硝化富集培养物厌氧降解 PAHs 的报道,针对田间自然土壤或沉积物中 PAHs 含量及相关反硝化功能微生物关系也逐渐为人们所关注. 如吴艳阳等^[18]以 *narG*、*nirS* 和 *nosZ* 基因为分子标识,探究了沉积物中 PAHs 对反硝化功能基因垂直分布的影响. 而 Guo^[9]等以 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 为分子标识物,研究了苾对农业土壤中反硝化微生物群落的影响,并发现土壤中苾的降解率与反硝化速率及反硝化功能基因的丰度之间具有密切的关联. 因此,本文选择具有 50 多年历史的江汉油田区域为研究对象,以反硝化的功能基因 *nirK* 及 *nirS* 为分子标识,利用定量 PCR 及克隆文库结合限制性末端多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)的方法,来探讨该油田区域土壤 PAHs 含量等环境因子与反硝化微生物群落结构之间的关系,以期为进一步深入研究土壤 PAHs 反硝化降解的微生物机制提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集

江汉油田位于湖北省的潜江市境内,已有 50 多年的油气开发历史,是新中国最早开发的油气田之一. 本研究的土壤样品在 2014 年 7 月采集于江汉油田区域不同出油井附近的农田(水稻-油菜轮作)表层(0~20 cm). 共选择了 9 个采样点(112°29'E~113°01'E, 30°04'N~30°49'N),编号为 JH-1~JH-9,在每个采样点中心周围 30 m² 的范围内,随机选择 9 个点,进行多点混合并初步剔除石块和杂物,以完成单个土样的采集,采样点的地理信息如图 1 所示. 采集好的样品装于自封袋后,置于放有冰袋的箱子中运回实验室. 随后,过 2 mm 筛后分装,部分保存于 4℃ 用于基本性质测定,部分置于 -20℃ 冰箱用于 DNA 的提取,剩余部分风干后用于有机质等的测定.

1.2 土壤基本性质及 PAHs 含量的测定

土壤的 pH 值采用 2.5:1 的水土比,用“PHS-3C

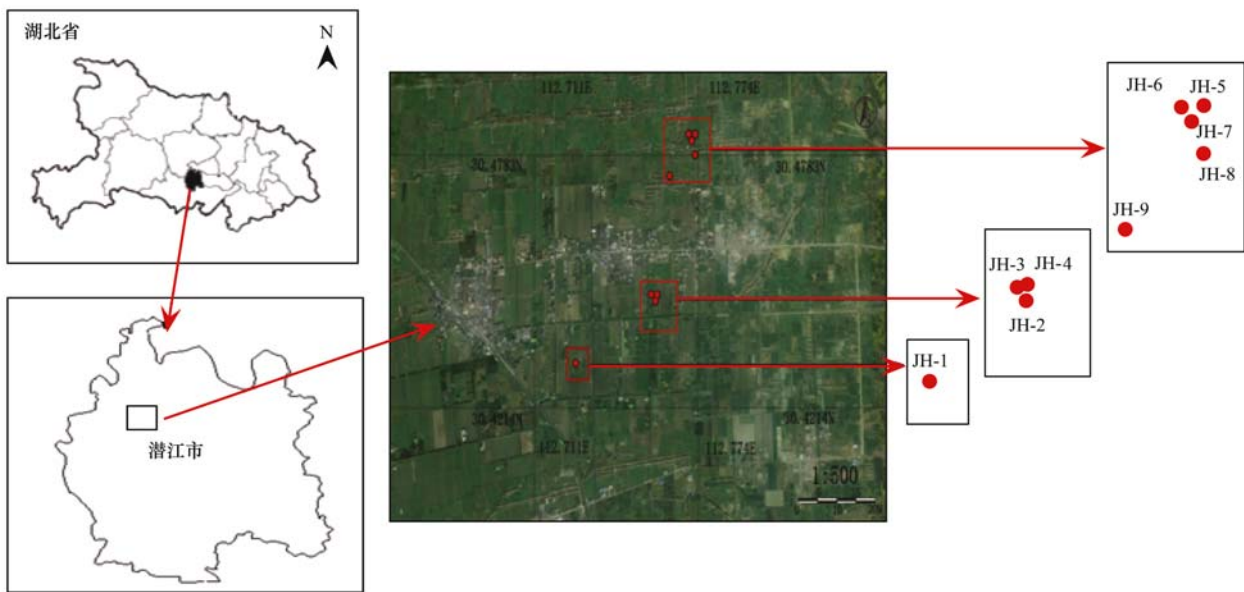


图1 土壤样品的地理信息

Fig. 1 Geographic information of soil samples

型”pH 仪测定. 总有机质、有效磷及含水量的测定参照文献[19]进行,分别采用重铬酸钾氧化还原滴定法、钼锑抗比色法及比重法进行. 氨氮和硝氮分别采用靛酚蓝分光光度法和萘乙二胺分光光度法测定^[19]. 土壤 PAHs 的测定参照曹启民等^[20]的方法进行,主要步骤如下:称取 10 g 预先于 -80°C 冷冻干燥的过 100 目筛的土壤样品于烧杯中,随后加入 10 g 无水硫酸钠和 2 g 铜粉至烧杯中混合均匀;无损移入滤纸桶,加入 70 mL 丙酮-正己烷(1:1)混合液浸泡土壤样品 12 h;将滤纸桶置于索氏提取器中 75°C 提取 6 h,再将提取液于 $\sim 46\text{ kPa}$, 45°C 下旋转蒸发浓缩至 1~2 mL,随后过装有 1 cm 石英砂、12 cm 活化硅胶、6 cm 中性氧化铝及 1 cm 无水硫酸钠的层析柱净化;以 15 mL 色谱级正己烷预洗后,用 70 mL 二氯甲烷和正己烷的混合液(3:7)洗脱;最后,收集洗脱液旋转蒸发浓缩并用甲醇定容至 1 mL,用高压液相色谱 HITACHI L-7100 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan)测定各样品 PAHs 含量.

1.3 土壤 DNA 的提取及 *nirK*、*nirS* 基因的定量 PCR

本实验中土壤样品 DNA 的提取,参照试剂盒说明书,使用 Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA) 试剂盒进行. 提取到的样品总 DNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并用 DU 800 spectrophotometer (Beckman Coulter, USA) 测定其浓度,最后保存于 -20°C 冰箱备用.

本研究中, *nirK* 及 *nirS* 基因丰度的检测用 SYBR GREEN 法,在荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500,

Applied Biosystems, USA) 上进行. 各基因扩增所用的引物序列及具体的扩增程序见表 1. 定量 PCR 按照 Premix Ex Taq[™] (TaKaRa Biotechnology, Japan) 的说明书进行,反应采用 25 μL 体系,其中含上下游引物各 1 μL , DNA 模板 1 μL . 实验中的标准曲线参照文献 [21] 的方法进行,在各反应完成后,设置了溶解曲线程序,用来检测 real-time PCR 产物的特异性,最后通过 ABI 7500 Software (version 2.0.6) 来分析所得的数据.

1.4 克隆文库的构建及 T-RFLP 分析

为了全面解析所采土样中 *nirK* 及 *nirS* 基因的种类,本研究中分别构建了 *nirK* 及 *nirS* 基因的混合克隆文库,通过对混合克隆文库的分析,可为后续 T-RFLP 分析中限制性内切酶的选择提供依据,同时也有助于确定 T-RFLP 分析中所获取的各末端片段所对应的类群. 现以 *nirK* 基因混合克隆文库的构建流程为例,简述如下:用不带 FAM 荧光标记的引物 (见表 1) 分别 PCR 扩增各样品的 *nirK* 基因,扩增采用 25 μL 体系,利用 EX-Taq (Takara, Japan),按说明书进行;分别取各样品的 *nirK* 基因产物 5 μL ,混合均匀,从而得到该基因的混合 PCR 产物;再以混合的 PCR 产物为对象,纯化后连接至 pGEM-T Easy 载体 (Promega, USA),转化大肠杆菌感受态细胞 JM109 (Takara, Japan),通过蓝白斑筛选,随机挑取 300 个左右的阳性克隆子,送上海生物工程有限公司进行测序,从而完成 *nirK* 基因混合克隆文库的构建. 获取的序列用 DNAMAN (Version 6.0.3.48) 软

件进行同源性分析,将同源性高于 95% 的序列归入同一操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU),选取各 OTU 的代表性序列,采用邻位相邻法 (Neighbor-Joining),用 MEGA (Version 6.0) 软件构建系统发育树^[22]. 之后,用 DNAMAN (Version 6.0.3.48) 对各代表性 OTU 的序列进行限制性酶切

位点分析,结果表明选择性内切酶 *Hae* III (Takara, Japan) 能够较好地对 *nirK* 及 *nirS* 基因克隆文库中各代表性 OTU 进行分型,可作为后续 T-RFLP 分析中的选择性内切酶. 将所获得的序列提交 GenBank 并获得相应的序列号, *nirK*: KX149075-KX149093, *nirS*: KX149049-KX149074.

表 1 扩增基因用引物及 PCR 扩增程序

Table 1 Primer sets and PCR procedures

| 基因 | 引物 | 引物序列(5'-3') | 长度/bp | 扩增程序 | 文献 |
|-------------|---------------|------------------------|-------|---|------|
| <i>nirK</i> | <i>nirK1F</i> | GCMATGGTKCCSTGGCA | 514 | 94°C 4 min; 94°C 1 min; 53°C 1 min; 72°C 1.5 min; 72°C 10 min; 35 个循环 | [23] |
| | <i>nirK5R</i> | GCCTCGATCAGRTTRTGG | | | |
| <i>nirS</i> | <i>Cd3aF</i> | G TSAACG TSAAGGARACSGG | 485 | 94°C 3 min; 94°C 30s; 52°C 40s; 72°C 1 min; 72°C 10 min; 40 个循环 | [24] |
| | <i>R3cd</i> | GASTTCGGRTGSGTCTTGA | | | |

在混合克隆文库构建完成的基础上,利用 5' 端带有 FAM 荧光标记的引物(表 1),分别对各样品的 *nirK* 及 *nirS* 基因进行 PCR 扩增,获取的目标产物经纯化后,在 37°C 用 *Hae* III 酶切 4 h,使用核酸测序仪 ABI PRISM3700 (Applied Biosystems, USA) 进行基因扫描,用 GeneMapper (Applied Biosystems, USA) 软件对 T-RFLP 图谱进行分析.

1.5 数据处理

实验数据的统计分析在 SPSS 17.0 软件中的单因素方差分析的 S-N-K (Student-Newman-Keuls test) 检验计算不同样品之间的差异显著性 ($P < 0.05$). 相关性用直线相关分析 (Bivariate 过程),采用 Spearman 相关系数计算,双尾显著性检验. 文中 *nirK* 及 *nirS* 基因群落结构与环境因子关系的分析用 CANOCO 4.5 软件中的冗余分析 (Redundancy analysis, RDA) 来完成.

2 结果与讨论

2.1 土壤样品的基本性质

土壤样品的基本性质如表 2 所示. 有机质含量在不同样品间存在显著差异,其中 JH-5 有机质含量最高 (101.56 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),其次为 JH-1、JH-3、JH-4 和 JH-8,它们的含量在 38 ~ 41 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间,其它各样品有机质含量均低于 30 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 样品 pH 值的测定结果表明,各样品均为碱性土壤. 有效磷含量较高的样品为 JH-4 (28.07 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 JH-8 (25.38 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),其次为 JH-6 (15.94 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 JH-7 (11.39 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),其余各样品的有效磷含量均低于 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. 铵态氮含量在各样点土壤样品间的变化不大,其含量范围为 4.03 ~ 4.60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. 硝态氮含量较高的为 JH-6 (21.84 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 JH-8

(29.91 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),其次为 JH-7 (10.81 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),其余各样品含量均低于 10.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. PAHs 含量在各样点间有明显的不同,其中 JH-4 中的含量 (8.10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 最高,其次为 JH-8 (2.01 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、JH-5 (1.65 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 JH-2 (1.23 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),JH-6、JH-7 和 JH-9 分别为 0.80、0.63 和 0.61 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,含量最少的为 JH-1 (0.22 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 JH-3 (0.21 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). 据报道,长江上游重庆金佛山土壤 16 种优先控制 PAHs 的含量范围为 0.24 ~ 2.12 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[25]. 而对下游的长江三角洲区域土壤 PAHs 含量的调查表明,该区域土壤总 PAHs 含量范围为 0.021 ~ 3.579 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[26]. 由此可见,除样品 JH-4 外,本研究多数样点土壤中 PAHs 含量均在上述调查结果的范围之内.

2.2 土壤样品 *nirK* 及 *nirS* 基因的丰度

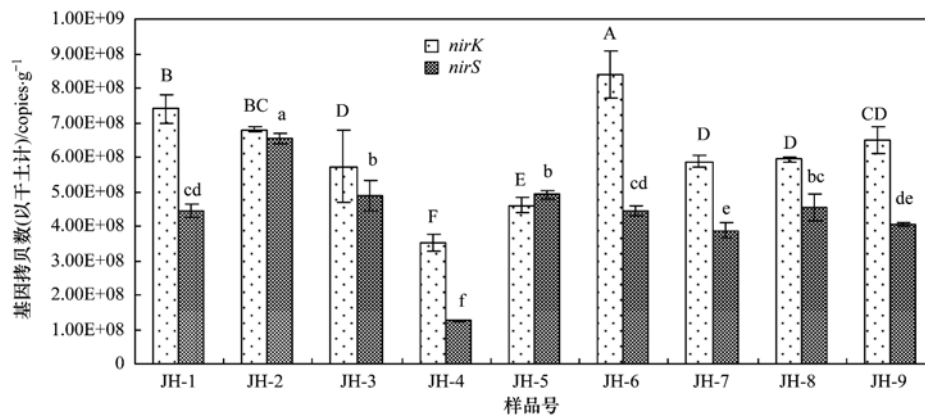
定量 PCR 的结果见图 2. 从中可知,各土壤样品中 *nirK* 基因的丰度 (以干土计,下同) 在 $3.51 \times 10^8 \sim 8.38 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间,其中 JH-6 丰度最高 ($8.38 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$),其次为 JH-1 ($7.39 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$) 和 JH-2 ($6.38 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$),而样品 JH-3、JH-7、JH-8、JH-9 中该基因的丰度差异不显著,含量在 $5.7 \times 10^8 \sim 6.9 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间,样品 JH-4 中 *nirK* 基因丰度显著低于其它各样品. 由图 2 还可看出,油田土壤样品中 *nirS* 基因拷贝数在 $1.25 \times 10^8 \sim 6.54 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间,且各样点土壤样品中 *nirS* 基因的丰度均低于 *nirK* 基因. 在样品 JH-2 中最高 ($6.54 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$),与 *nirK* 基因相同,样品 JH-4 中 *nirS* 基因的丰度也最低 ($1.25 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$),而其它各样点土壤样品中该基因的丰度均在 $3.86 \times 10^8 \sim 4.9 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间.

表 2 土壤样品的基本性质¹⁾

Table 2 Soil basic properties

| 样品 | 测定项目 | | | | | |
|------|------------------------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | 有机质/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | pH | 有效磷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 铵态氮/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 硝态氮/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | PAHs/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ |
| JH-1 | 41.31 ± 0.01b ¹⁾ | 8.94 ± 0.02a | 5.55 ± 0.21fg | 4.30 ± 0.09b | 4.59 ± 0.38fg | 0.22 ± 0.03g |
| JH-2 | 11.36 ± 0.09e | 8.88 ± 0.01a | 4.84 ± 0.18g | 4.17 ± 0.03bcd | 2.53 ± 0.09g | 1.23 ± 0.01d |
| JH-3 | 39.09 ± 0.48b | 8.75 ± 0.03b | 9.29 ± 0.13e | 4.26 ± 0.02bc | 3.58 ± 0.01g | 0.21 ± 0.01g |
| JH-4 | 38.68 ± 2.65b | 7.76 ± 0.04f | 28.07 ± 0.25a | 4.60 ± 0.01a | 7.13 ± 0.70ef | 8.10 ± 0.04a |
| JH-5 | 101.56 ± 1.00a | 8.14 ± 0.01d | 5.17 ± 0.77g | 4.03 ± 0.01e | 8.28 ± 0.11d | 1.65 ± 0.02c |
| JH-6 | 24.95 ± 0.26d | 8.18 ± 0.03d | 15.94 ± 0.59c | 4.16 ± 0.01cd | 21.84 ± 2.36b | 0.80 ± 0.01e |
| JH-7 | 30.01 ± 0.36c | 8.56 ± 0.01c | 11.39 ± 0.16d | 4.12 ± 0.02de | 10.81 ± 0.24c | 0.63 ± 0.05f |
| JH-8 | 41.09 ± 1.30b | 8.22 ± 0.02d | 25.38 ± 0.13b | 4.15 ± 0.06cde | 29.91 ± 0.41a | 2.01 ± 0.03b |
| JH-9 | 9.49 ± 0.22e | 8.03 ± 0.02e | 6.42 ± 0.41f | 4.05 ± 0.02de | 7.03 ± 0.09ef | 0.61 ± 0.01f |

1) 同一列中不同字母表示不同样品间存在显著性差异 ($P < 0.05$)



误差线为标准偏差 ($n=3$), 大写和小写字母分别指示 *nirK* 及 *nirS* 基因在各土壤样品间的差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 土壤样品中 *nirK* 及 *nirS* 基因拷贝数Fig. 2 Copy numbers of *nirK* and *nirS* in soil samples

从上述结果可以看出, 本研究中各样点土壤中 *nirK* 基因的拷贝数均高于 *nirS* 基因, 表明在江汉油田区域土壤中前者可能在亚硝酸盐还原酶基因中占有主导地位. Yoshida 等^[27] 在研究稻田土壤中反硝化微生物丰度时, 也发现其中 *nirK* 基因丰度显著高于 *nirS* 基因. 一般认为土壤的基本性质, 如有机质和硝酸根含量等^[28], 或水文等诸多因素均能影响到 *nirK* 及 *nirS* 基因的相对丰度^[29]. 此外, 在 PAHs 含量最高的样品 JH-4 中, *nirK* 及 *nirS* 基因的丰度均显著低于其它各样品, 这表明过高的 PAHs 含量可能会抑制土壤反硝化微生物的生长. 而土壤反硝化功能基因拷贝数与 PAHs 含量的相关性分析也表明它们之间存在明显的负相关 (*nirK*: $R^2 = 0.54$, $P < 0.05$; *nirS*: $R^2 = 0.58$, $P < 0.05$). Guo 等^[9] 在研究苈对农业土壤中反硝化微生物群落组成时也发现, 随着苈浓度的升高, 土壤中 *nirK* 及 *nirS* 基因拷贝数均随之减少, 这与本实验结果一致. 由此看来, 土壤反硝化相关 *nirK* 及 *nirS* 型反硝化微生物可能均对 PAHs 污染较为敏感, 能够被 PAHs 所抑制.

2.3 混合的 *nirK* 及 *nirS* 克隆文库分析

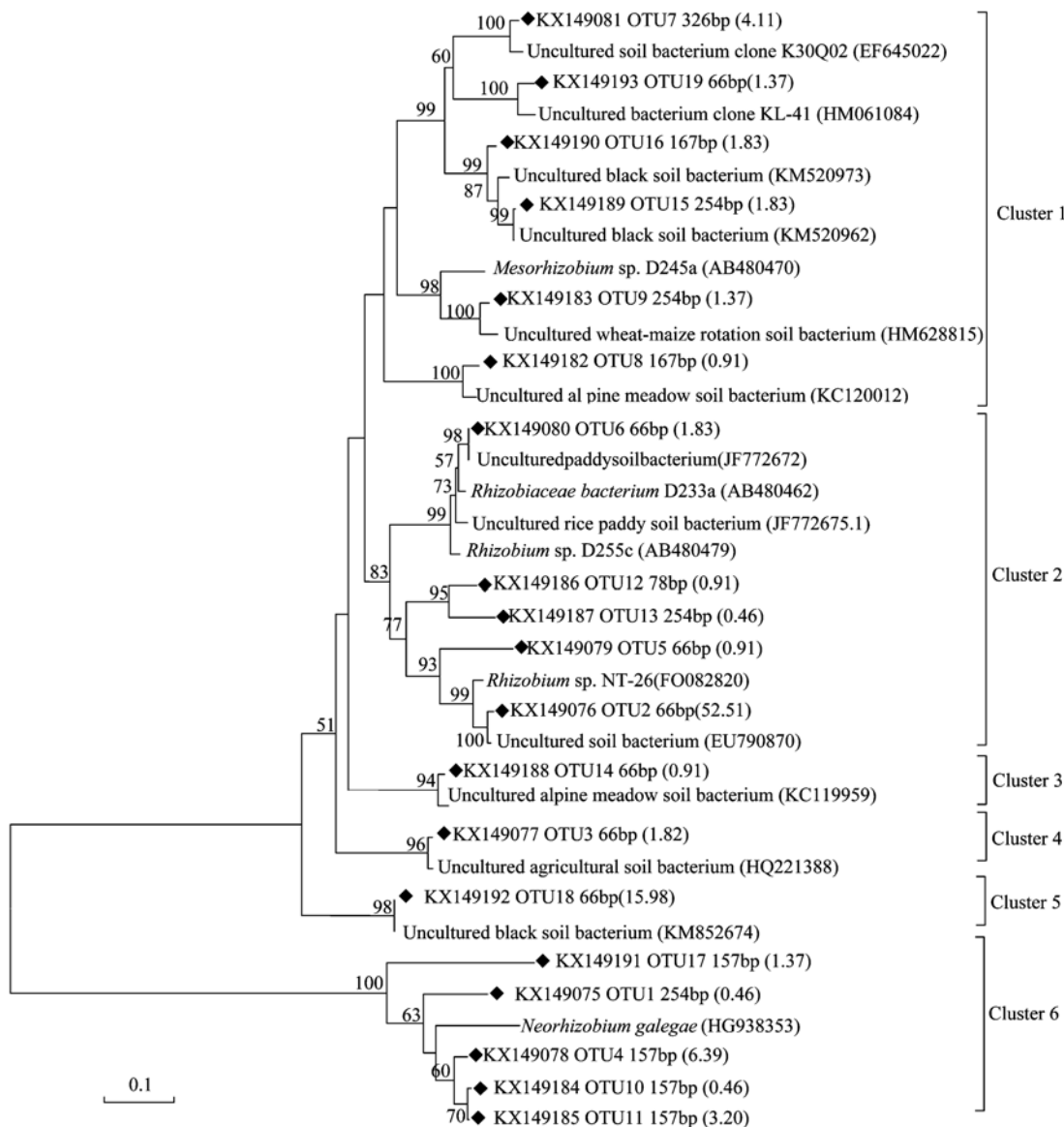
分别从 *nirK* 及 *nirS* 的混合克隆文库中随机挑选出 300 及 264 个阳性克隆进行测序, 最终分别获得 219 个 *nirK* 和 177 个 *nirS* 有效序列. 以 95% 的序列相似性划分操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs), 获取的 *nirK* 序列可分为 19 个 OTUs, *nirS* 则可分为 26 个 OTUs. 最后, 从每个 OTU 中挑选 1 个代表性序列来构建 *nirK* (图 3) 及 *nirS* (图 4) 基因的系统发育树. 如图 3 所示, 油田区域土壤中的 *nirK* 基因可分为 6 个 Clusters, 占克隆文库中序列数比例较高的有 Cluster 1 (254bp, 167bp, 11.42%), Cluster 2 (66bp, 56.62%) 和 Cluster 6 (157bp, 11.88%), 它们所含的序列共占克隆文库总序列数的 82%, 且分别与中生根瘤菌属、根瘤菌属、及新根瘤菌属根瘤菌有较高的同源性. 而 Clusters 3~5 共占克隆序列总数的 18.71%, 分别与高山草甸、农田和黑土土壤中的未培养 *nirK* 序列具有较高的同源性. 可见, 该油田区域土壤中的优势的 *nirK* 型反硝化微生物为根瘤菌科细菌.

由 *nirS* 基因系统发育树(图 4)可知,该油田区域土壤中 *nirS* 型微生物可分为 7 个 Clusters. 其中 Cluster 2(81 bp、141 bp)所含序列占克隆文库总序列数的 53.59%,且为未培养的土壤 *nirS* 型微生物. 其它含量较高的依次为 Cluster 1(141 bp、192 bp), Cluster 5(234 bp)和 Cluster 4(81、125、234 bp),所含序列分别占克隆文库序列总数的 22.26%、15.98%和 11.17%,且分别与红环菌科的脱氮单胞菌属、假单胞菌属及慢生根瘤菌属有较高的同源性. 其中,红环菌科的 *nirS* 型微生物被报道为沼泽和水稻土中的优势 *nirS* 型微生物类群^[30,31]. 所含序列比例较少的为 Cluster 3(81 bp)、Cluster 6(81

bp)和 Cluster 7(150 bp、234 bp),共占序列总数的 9.93%,它们分别与固氮弓菌属、未培养的 *nirS* 微生物及硫酸盐还原菌具有较高的同源性. 通过上述对 *nirK*、*nirS* 混合克隆文库及构建的系统发育树的分析,可为后续 T-RFLP 中确认和分析各样点土壤样品中不同长度的限制性末端片段所代表的 *nirK* 及 *nirS* 类群提供依据.

2.4 T-RFLP 结果分析

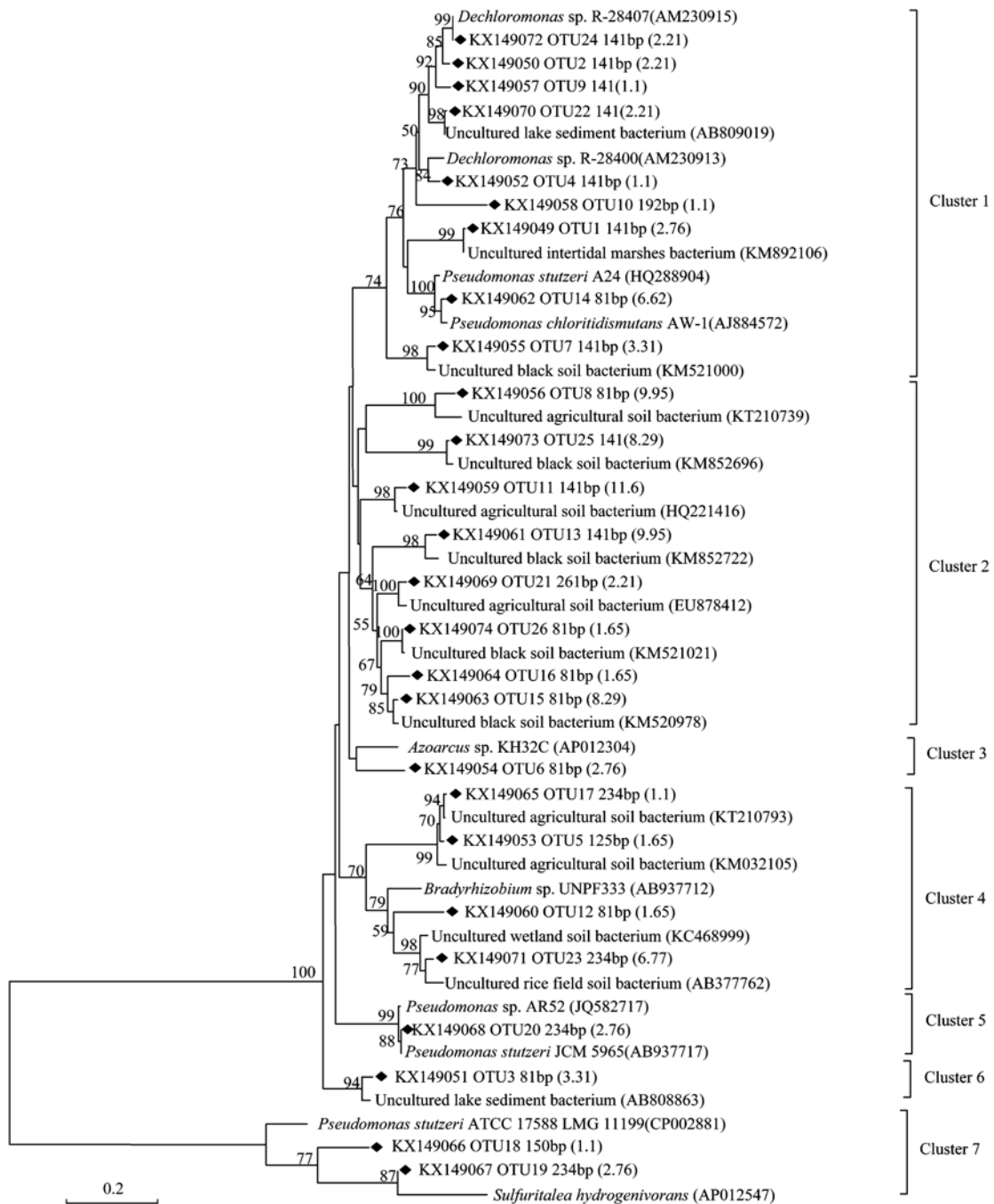
各样点土壤样品中 *nirK* 基因末端限制性片段图谱的组成(图 5)分析表明,样品 JH-1、JH-2、JH-3、JH-5、JH-7 中 *nirK* 基因的群落组成较为相似,157 bp 的限制性末端片段所代表的类群为它们的



实验获得的序列信息(序列号、酶切片段大小)用◆标记,括号中的数字为该序列占总序列的百分比(%)

图 3 基于 *nirK* 基因克隆文库构建的系统发育树

Fig. 3 Neighbour-joining phylogenetic tree of *nirK* based on the clone library



实验获得的序列信息(序列号、酶切片段大小)用◆标记,括号中的数字为该序列占总序列的百分比(%)

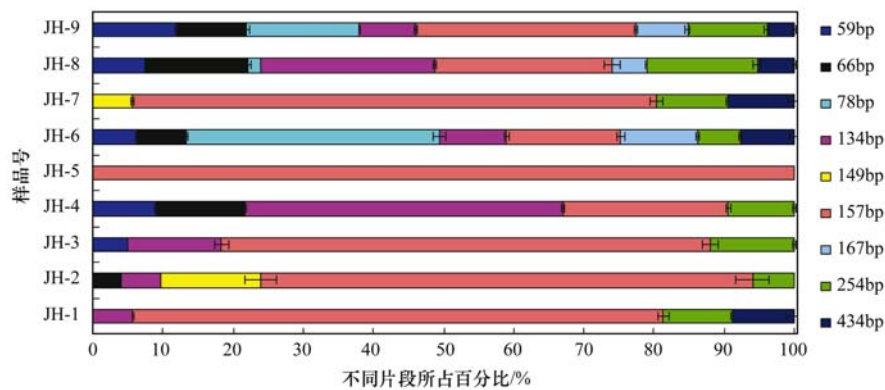
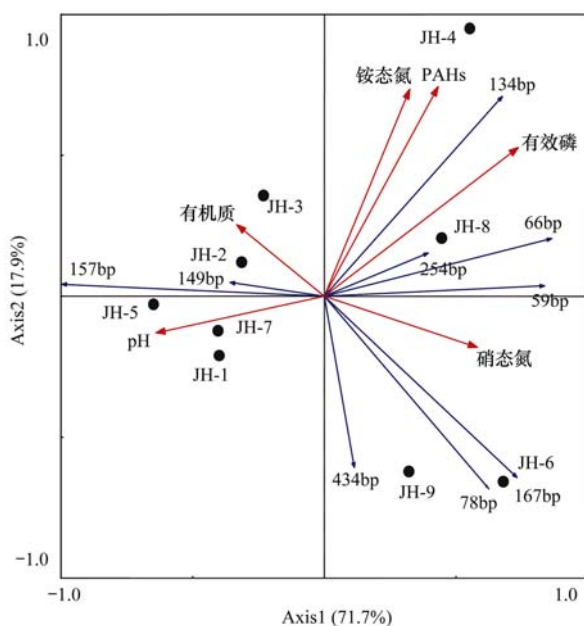
图4 基于 *nirS* 基因克隆文库构建的系统发育树

Fig. 4 Neighbour-joining phylogenetic tree of *nirS* based on the clone library

最优势 *nirK* 类群,在上述样品中的比例分别为 76%、70%、70%、100% 和 75%。参照 *nirK* 基因系统发育树(图 3)可知,157 bp 所代表的根瘤菌科的新根瘤菌属为上述样点土壤样品中的优势 *nirK* 类群。而样点 JH-6、JH-8 和 JH-9 中 157 bp 的末端片段所占比例大幅下降,且出现了特异性的 78 bp(未培养的 *nirK* 类群)和 167 bp(中生根瘤菌属)的片段。此外,PAHs 含量最高的 JH-4 具有与其它各样

点不同的 *nirK* 基因末端片段组成,134 bp 的片段所代表的类群(未培养的 *nirK* 类群)为其优势 *nirK* 种类,占其 *nirK* 基因 T-RFLP 末端片段总量的 45%。

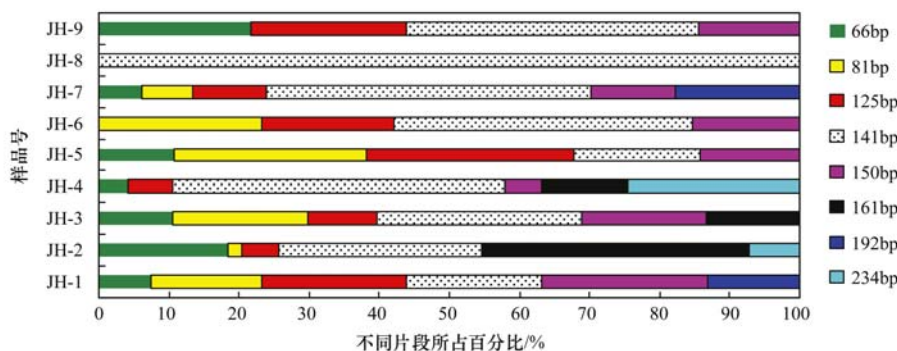
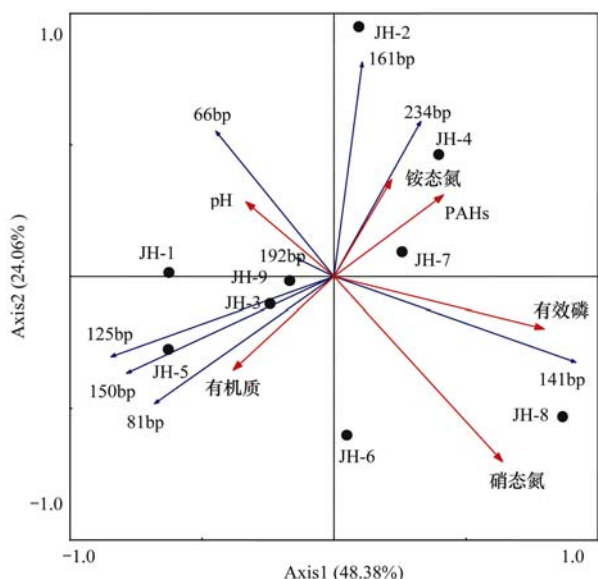
将土壤的理化性质及 T-RFLP 中的各限制性末端片段分别作为环境和物种变量,利用 CANOCO 4.5 软件对土壤环境因子与 *nirK* 型反硝化微生物群落结构进行冗余分析(图 6)。结果表明,样品 JH-1、JH-2、JH-3、JH-5 和 JH-7 之间的距离较近,JH-6 和

图5 土壤样品中 *nirK* 基因群落组成Fig. 5 Community composition of *nirK* in soil samples图6 土壤样品中 *nirK* 基因群落与土壤基本性质的 RDA 分析Fig. 6 RDA analysis based on the T-RFLP profiles and soil properties of *nirK*

JH-9 间的距离较近,而 PAHs 含量较高的样品 JH-4 和 JH-8 在一个象限,这与上述 T-RFLP 图谱组成分析的结果基本一致. 由图 6 还可看出,除能够作为微生物氮源及磷源的铵态氮和有效磷外,土壤 PAHs 含量同样也是影响该区域土壤 *nirK* 基因群落组成最重要的环境因子. 此外,RDA 分析还可看出,134 bp(不确定类群)和 66 bp(根瘤菌属)所代表的 *nirK* 类群与土壤 PAHs 含量呈正相关,表明它们可能在 PAHs 反硝化代谢中起到作用,其中根瘤菌属已经被证实能够在石油污染土壤中得到富集^[22]. 如 Keum 等^[32]从 PAHs 污染土壤中分离出根瘤菌,并发现其能够以菲为单一碳源生长,且能够有效降解萘和菲.

由基于 *nirS* 基因 T-RFLP 剖面的末端片段组成

分析(图 7)可知,相较于 *nirK*,*nirS* 基因群落组成在不同样点土壤样品中的差异并不明显,除 JH-8 全部为 141 bp 所代表的类群(脱氯单胞菌属)组成外,其余样品间均具有 3 种以上共有的末端片段类群. 此外,样品 JH-1 和 JH-7 中检测到了特异性的 192 bp(假单胞菌属),样品 JH-2、JH-3 和 JH-4 检测到特异性的 161 bp(不确定类群). 而在 PAHs 含量较高的样品 JH-2 和 JH-4 中检测到了特异性的 234 bp 类群(假单胞菌属),且在后者中比例最高. 基于 *nirS* 基因群落组成及土壤基本性质的 RDA 分析(图 8)表明,样品 JH-1、JH-3、JH-5 和 JH-9 在一个象限, JH-2、JH-4 及 JH-7 在一个象限, JH-6 和 JH-8 位于一个象限. 由此看来,PAHs 含量较高的 JH-4 和 JH-8 中 *nirS* 基因群落组成与其它样点的差异并不明显. 影响各样点土壤样品中 *nirS* 基因群落组成的主要环境因子为土壤硝酸盐和有效磷含量,硝酸盐是反硝化微生物电子传递链的末端电子受体,而有效磷是微生物生长不可或缺的大量元素之一,因此它们均有可能是限制土壤 *nirS* 型微生物群落结构的关键因子. 此外,由图 8 还可看出,141、161 和 234 bp 所代表的 *nirS* 类群与土壤 PAHs 含量呈正相关,除 161 bp 为不确定类群外,141 bp 为脱氯单胞菌属,234 bp 为假单胞菌属,这些属的微生物已经被证实能够在有氧及厌氧条件下对 PAHs 进行降解. 当前的研究表明,假单胞菌属在有机物污染环境普遍存在,它可以以这些有机污染物作为碳源和能源,在有氧及厌氧条件下对这些有机污染物进行降解^[33],且假单胞菌属对典型 PAHs(萘、蒽)的降解也已经为人们所证实^[34-36]. 脱氯单胞菌属经常从被污染物污染的地方分离得到,能够在厌氧及微氧条件下分解苯和甲苯^[37]. 由此看来,尽管 *nirS* 基因的群落结构对 PAHs 的响应并不积极,但 *nirS*

图7 土壤样品中 *nirS* 基因群落组成Fig. 7 Community composition of *nirS* in soil samples图8 土壤样品中 *nirS* 基因群落与土壤基本性质的 RDA 分析Fig. 8 RDA analysis based on the T-RFLP profiles and soil properties of *nirS*

型的假单胞菌有可能在油田区土壤 PAHs 的反硝化代谢中起到不可忽视的作用。

3 结论

(1) 油田区土壤中 *nirK* 基因丰度均高于 *nirS*, 且它们均与土壤的 PAHs 含量呈显著负相关。

(2) 油田区土壤中 *nirK* 型反硝化微生物的主要类群为根瘤菌科, 且土壤 PAHs 含量是影响 *nirK* 型反硝化微生物群落组成的关键因子。

(3) 与 *nirK* 型反硝化微生物相比较, 土壤 PAHs 含量并不是影响油田区 *nirS* 基因群落组成的关键因子, 硝酸盐及有效磷含量对其有显著影响, 但重要的有机污染物降解菌-*nirS* 型假单胞菌与土壤 PAHs 含量呈正相关, 表明 *nirS* 型假单胞菌在潜在 PAHs 污染的油田区土壤中 PAHs 的反硝化代谢中可能起到重要作用。

参考文献:

- [1] Eggen T, Majcherzyk A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998, **41**(2): 111-117.
- [2] Wild S R, Jones K C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment; a preliminary source inventory and budget [J]. Environmental Pollution, 1995, **88**(1): 91-108.
- [3] Zhou Q X, Hua T. Bioremediation: A review of applications and problems to be resolved [J]. Progress in Natural Science, 2004, **14**(11): 937-944.
- [4] Bamforth S M, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, **80**(7): 723-736.
- [5] Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review [J]. Engineering Geology, 2001, **60**(1-4): 371-380.
- [6] Li C H, Zhou H W, Wong Y S, *et al.* Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China [J]. Science of the Total Environment, 2009, **407**(21): 5772-5779.
- [7] Lu X Y, Zhang T, Fang H H P. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, **89**(5): 1357-1371.
- [8] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2002, **1577**(3): 355-376.
- [9] Guo G X, Deng H, Qiao M, *et al.* Effect of pyrene on denitrification activity and abundance and composition of denitrifying community in an agricultural soil [J]. Environmental Pollution, 2011, **159**(7): 1886-1895.
- [10] 梁丽华, 左剑恶. 反硝化功能基因——检测反硝化菌种群结构的分子标记 [J]. 微生物学通报, 2009, **36**(4): 627-633.
- [10] Liang L H, Zuo J E. Denitrifying functional genes—the molecular marker for detection of denitrifying community structure [J]. Microbiology China, 2009, **36**(4): 627-633.
- [11] Mihelcic J R, Luthy R G. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54**(5): 1188-1198.
- [12] McNally D L, Mihelcic J R, Lueking D R. Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions [J]. Environment Science &

- Technology, 1998, **32**(17): 2633-2639.
- [13] Eriksson M, Sodersten E, Yu Z T, *et al.* Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(1): 275-284.
- [14] Chang B V, Chang S W, Yuan S Y. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge [J]. Advances in Environmental Research, 2003, **7**(3): 623-628.
- [15] Dou J F, Liu X, Ding A Z. Anaerobic degradation of naphthalene by the mixed bacteria under nitrate reducing conditions [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, **165**(1-3): 325-331.
- [16] Lu X Y, Zhang T, Fang H H P, *et al.* Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, **65**(1): 204-211.
- [17] Yang X N, Ye J X, Lyu L M, *et al.* Anaerobic biodegradation of pyrene by *Paracoccus denitrificans* under various nitrate/nitrite-reducing conditions [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2013, **224**: 1578-1578.
- [18] 吴艳阳, 吴群河, 黄珊, 等. 沉积物中多环芳烃对反硝化功能基因垂直分布的影响 [J]. 环境科学, 2012, **33**(10): 3592-3597.
- Wu Y Y, Wu Q H, Huang S, *et al.* Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Vertical Distribution of Denitrifying Genes in River Sediments [J]. Environmental Science, 2012, **33**(10): 3592-3597.
- [19] 杨剑虹, 王成林, 代亨林. 土壤农化分析与环境监测 [M]. 北京: 中国大地出版社, 2008.
- [20] 曹启民, 陈桂珠, 缪绅裕. 多环芳烃的分布特征及其与有机碳和黑碳的相关性研究——以汕头国际湿地示范区三种红树林湿地表层沉积物为例 [J]. 环境科学学报, 2009, **29**(4): 861-868.
- Cao Q M, Chen G Z, Liao S Y. Distribution correlations of polycyclic aromatic hydrocarbons with organic carbon and black carbon in surface sediments of three mangrove wetlands in the Shantou Wetland Demonstration Site, China [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, **29**(4): 861-868.
- [21] He J Z, Shen J P, Zhang L M, *et al.* Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices [J]. Environmental Microbiology, 2007, **9**(9): 2364-2374.
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, **24**(8): 1596-1599.
- [23] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples [J]. Applied and Environmental Microbiology 1998, **64**(10): 3769-3775.
- [24] Michotey V, Mejean V, Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd(1)-denitrifying bacteria in environmental marine samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(4): 1564-1571.
- [25] 师阳, 孙玉川, 梁作兵, 等. 重庆金佛山土壤中 PAHs 含量的海拔梯度分布及来源解析 [J]. 环境科学, 2015, **36**(4): 1417-1424.
- Shi Y, Sun Y C, Liang Z B, *et al.* Altitudinal gradient distribution and source analysis of PAHs content of topsoil in Jinfo Mountain, Chongqing [J]. Environmental Science, 2015, **36**(4): 1417-1424.
- [26] 李静雅, 吴迪, 许芸松, 等. 长江三角洲区域表土中多环芳烃的近期分布与来源 [J]. 环境科学, 2016, **37**(1): 253-261.
- Li J Y, Wu D, Xu Y S, *et al.* Recent distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soils from Yangtze River Delta [J]. Environmental Science, 2016, **37**(1): 253-261.
- [27] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, *et al.* *NirK*-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harboring bacteria [J]. Microbes and Environments, 2010, **25**(1): 45-48.
- [28] Bárta J, Melichová T, Vaněk D, *et al.* Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of *nirK* and *nirS* denitrifiers in spruce forest soil [J]. Biogeochemistry, 2010, **101**(1-3): 123-132.
- [29] Levy-Booth D J, Winder R S. Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-Fir stands by using Real-time PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, **76**(21): 7116-7125.
- [30] Saito T, Ishii S, Otsuka S, *et al.* Identification of novel Betaproteobacteria in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing [J]. Microbes and Environments, 2008, **23**(3): 192-200.
- [31] Priemé A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(4): 1893-1900.
- [32] Keum Y S, Seo J S, Hu Y T, *et al.* Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, **71**(6): 935-941.
- [33] Ridgway H F, Safarik J, Phipps D, *et al.* Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, **56**(11): 3565-3575.
- [34] Rockne K J, Chee-Sanford J C, Sanford R A, *et al.* Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(4): 1595-1601.
- [35] Lee K, Park J W, Ahn I S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2003, **105**(1-3): 157-167.
- [36] Jacques R J S, Santos E C, Bento F M, *et al.* Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2005, **56**(3): 143-150.
- [37] Wolterink A, Kim S, Muusse M, *et al.* *Dechloromonas hortensis* sp. nov. and strain ASK-1, two novel (per) chlorate-reducing bacteria, and taxonomic description of strain GR-1 [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, **55**(5): 2063-2068.

CONTENTS

| | |
|--|--|
| Transport Loss Estimation of Fine Particulate Matter in Sampling Tube Based on Numerical Computation | LUO Li-na, CHENG Zhen, ZHU Wen-fei, <i>et al.</i> (4457) |
| Sources Analysis of Heavy Metal Aerosol Particles in North Suburb of Nanjing | QIN Xin, ZHANG Ze-feng, LI Yan-wei, <i>et al.</i> (4467) |
| Distribution Characteristics of Water Soluble Ions Under Different Weather Conditions During the Youth Olympic Games in Nanjing | SHI Yuan-zhe, AN Jun-lin, WANG Hong-lei, <i>et al.</i> (4475) |
| Seasonal Variation and Source Analysis of the Water-soluble Inorganic Ions in Fine Particulate Matter in Suzhou | WANG Nian-fei, CHEN Yang, HAO Qing-ju, <i>et al.</i> (4482) |
| Characteristics of Elements and Potential Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in PM _{2.5} at the Southwest Suburb of Chengdu in Spring | YANG Huai-jin, YANG De-rong, YE Zhi-xiang, <i>et al.</i> (4490) |
| Geochemical Characteristics and Source Apportionment of Rare Earth Elements in the Dustfall of Quanzhou City | ZHANG Zong-wei, YU Rui-lian, HU Gong-ren, <i>et al.</i> (4504) |
| ¹³ C-based Sources Partitioning of Atmospheric CO ₂ During Youth Olympic Games, Nanjing | XU Jia-ping, LI Xu-hui, XIAO Wei, <i>et al.</i> (4514) |
| Gaseous Emission Characterization of Civil Aviation Aircraft During Takeoff | HAN Bo, HUANG Jia-min, WEI Zhi-qiang (4524) |
| Pollution Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria from Atmospheric Environment of Animal Feeding Operations | ZHANG Lan-he, HE Yu-wei, CHEN Mo, <i>et al.</i> (4531) |
| Removing Nano Particles by Filtration Using Materials with Ordered Mesoporous Structure | XING Yi, WANG Cong, LU Pei, <i>et al.</i> (4538) |
| Emission Characteristics of Gaseous Pollutants from City Bus Fueled with Biodiesel Based on DOC + CDPF Technology in Real Road Conditions | LOU Di-ming, ZHANG Yun-hua, TAN Pi-qiang, <i>et al.</i> (4545) |
| Characteristics of Methane Flux Across the Water-air Interface in Subtropical Shallow Ponds | LONG Li, XIAO Shang-bin, ZHANG Cheng, <i>et al.</i> (4552) |
| Succession of Phytoplankton Assemblages and Its Influencing Factors in Tangpu Reservoir, Zhejiang Province | MA Pei-ming, SHI Lian-dong, ZHANG Jun-fang, <i>et al.</i> (4560) |
| Responses of Physiological Indices of Typical Submerged Macrophytes to Water Quality in Taihu Lake | GAO Min, HU Wei-ping, DENG Jian-cai, <i>et al.</i> (4570) |
| Optical Characteristics of Dissolved Organic Matter from Two Different Full Mixed Reservoirs in Winter Based on UV-vis and EEMs | HUANG Ting-lin, FANG Kai-kai, ZHANG Chun-hua, <i>et al.</i> (4577) |
| Hanfeng Pre-dam Commissioning Eutrophication Status and Control Evaluation in Three Gorges Reservoir | YANG Bing, HE Bing-hui, WANG De-bao (4586) |
| Occurrence, Distribution and Ecological Risk of Antibiotics in Surface Water of the Gonghu Bay, Taihu Lake | WU Xu-yue, ZOU Hua, ZHU Rong, <i>et al.</i> (4596) |
| Distribution Characteristics of <i>n</i> -alkanes in Sediment Core and Implication of Environment in Different Lakes of Dianchi | YU Li-yan, HAN Xiu-xiu, HUANG Xiao-hu, <i>et al.</i> (4605) |
| Vertical Distribution and Pollution Risk Assessment of Nitrogen, Phosphorus, and Organic Matter in Sediment of Inflowing Rivers of Erhai Lake Estuarine Wetland in Wet and Dry Seasons | WANG Shu-jin, LIU Yun-gen, WANG Yan, <i>et al.</i> (4615) |
| Variation of Nitrogen Forms in Sediments of Lihu Lake During Mineralization | ZHAO Li, WANG Shu-hang, JIANG Xia, <i>et al.</i> (4626) |
| Temporal and Spatial Variation Characteristics of the Heavy Metals Content in the Surface Sediment and the Potential Ecological Risk Trends in the Three Gorges Reservoir Area | ZHUO Hai-hua, SUN Zhi-wei, TAN Ling-zhi, <i>et al.</i> (4633) |
| Modeling the Environmental Behaviors and Ecological Risks of Permethrin in Chaohu Lake | LIU Ya-li, WANG Ji-zhong, PENG Shu-chuan, <i>et al.</i> (4644) |
| Simulation Experiment; Effect of Organic Colloid on Carbamazepine Transport in Porous Media | ZHANG Si, HE Jiang-tao, ZHU Xiao-jing (4651) |
| Grain Size Distribution Characteristics of Suspended Particulate Matter as Influenced by the Apparent Pollution in the Inorganic Type Urban Landscape Water: Taking the Canal of Suzhou Section as Example | LI Qian-qian, PAN Yang, GONG Dan-yan, <i>et al.</i> (4662) |
| Rock Weathering Characteristics and the Atmospheric Carbon Sink in the Chemical Weathering Processes of Qingshuijiang River Basin | LÜ Jie-mei, AN Yan-ling, WU Qi-xin, <i>et al.</i> (4671) |
| Pollution Characteristics Analysis in Shallow Groundwater of Typical Farmland Area, Southern China | GUO Hui, YU Min-da, HE Xiao-song, <i>et al.</i> (4680) |
| Identification of Sulfate Sources in the Groundwater System of Zaozhuang; Evidences from Isotopic and Hydrochemical Characteristics | MA Yan-hua, SU Chun-li, LIU Wei-jiang, <i>et al.</i> (4690) |
| Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Extensive Green Roofs | SHEN Qing-ran, HOU Juan, LI Tian (4700) |
| Comparative Study on Pretreatment Process of Ultrafiltration; Chemical Coagulation and Electrocoagulation | ZHAO Kai, YANG Chun-feng, SUN Jing-qiu, <i>et al.</i> (4706) |
| Adsorption Mechanisms Analysis of EOM on PVDF Ultrafiltration Membranes Modified by SiO ₂ Using QCM-D and AFM | JIANG Jia-liang, WANG Lei, HUANG Dan-xi, <i>et al.</i> (4712) |
| Isolation of Quorum Quenching Bacteria and Their Function for Controlling Membrane Biofouling | ZHAO Chang, WANG Wen-zhao, XU Qi-yong (4720) |
| Effects of Hydraulic Loading Rate on the Removal of Pollutants from an Integrated Biological Settling Tank | WANG Wen-dong, MA Cui, LIU Hui, <i>et al.</i> (4727) |
| Characteristics of Nitrobacteria in SBR with Trace N ₂ H ₄ Addition | XIAO Peng-ying, ZHANG Dai-jun, LU Pei-li (4734) |
| Start-up of Partial Nitrification AGS-SBR and Analysis of Its Microbial Community Composition | LU Hang, XIN Xin, GUAN Lei, <i>et al.</i> (4741) |
| Effects of PAHs Pollution on the Community Structure of Denitrifiers in a Typical Oilfield | YAO Yan-hong, WANG Ming-xia, ZUO Xiao-hu, <i>et al.</i> (4750) |
| Performance and Microbial Community Analysis of Bioaugmented Treatment of Diethyl Phthalate (DEP) in Membrane Bioreactor | ZHANG Ke, GUAN Yun, LUO Hong-bing, <i>et al.</i> (4760) |
| Comparative Analysis of the Bacterial Community on Anodic Biofilms in Sediment Microbial Fuel Cell Under Open and Closed Circuits | WU Yi-cheng, DENG Quan-xin, WANG Ze-jie, <i>et al.</i> (4768) |
| Anaerobic Biodegradability of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) | LI Fei, CHEN Yi-dan, ZHOU Zhen-ming, <i>et al.</i> (4773) |
| Comprehensive Effects of the Application of Water and Fertilizer Amount on CO ₂ Emission from Soils of Summer-maize Field | YANG Shuo-huan, ZHANG Bao-cheng, WANG Li, <i>et al.</i> (4780) |
| Spatial Heterogeneity of Soil Respiration in the Soil Erosion Area of West Mountains in Fujian Province, China | YAO Xiong, YU Kun-yong, ZENG Qi, <i>et al.</i> (4789) |
| Comprehensive Risk Evaluation of Cadmium in Soil-rice System Based on Uncertainty Analysis | YANG Yang, CHEN Wei-ping, LI Yan-ling, <i>et al.</i> (4800) |
| Fluorescence Properties of Glomalin and Its Relationship with Soil Physicochemical Characteristics in Different Regions of Beijing City | CHAI Li-wei, LIU Meng-jiao, JIANG Da-lin, <i>et al.</i> (4806) |
| Spatial Distribution Characteristics of Heavy Metal Pollution and Health Risk in Soil Around the Coal Industrial Area of East Junggar Basin | LIU Fang, Tashpolat Tiyp, Ilyas Nurmamat, <i>et al.</i> (4815) |
| Characteristics of Microbial Nitrogen Degradation in Fluvo-aquic Soil of Hebei Plain | ZHANG Can-can, PANG Hui-cong, GAO Tai-zhong, <i>et al.</i> (4830) |
| Influence of Arsenate and Phenanthrene on Carbon-groups of <i>Pteris vittata</i> L. Roots | LIAO Xiao-yong, GONG Xue-gang, YAN Xiu-lan, <i>et al.</i> (4841) |
| Effect of Alkali Solids Amendment on Sewage Sludge Aerobic Composting and the Potential of Related Products on Infertile Soil Amelioration | CAI Han-zhen, NING Xi-cui, WANG Quan, <i>et al.</i> (4848) |
| Adsorption and Influential Factors of Diuron on the Loess Soil by Adding Different Biochar Prepared at Varying Temperatures | SUN Hang, JIANG Yu-feng, SHI Lei-ping, <i>et al.</i> (4857) |
| Characteristics of Heavy Metal Contents in Human Hairs of Mine Contaminated Areas in Nandan County | TIAN Mei-ling, ZHONG Xue-mei, XIA De-shang, <i>et al.</i> (4867) |
| Preparation of Mg-Al-Me (Me = La, Ce, Zr) Composite Oxides for Efficient Fluoride Uptake | WANG Ai-he, ZHOU Kang-gen, LIU Xing, <i>et al.</i> (4874) |
| Fe-Mn Binary Oxide Impregnated Chitosan Bead (FMCB): An Environmental Friendly Sorbent for Phosphate Removal | FU Jun, FAN Fang, LI Hai-ning, <i>et al.</i> (4882) |
| Leaching Toxicity and Bioaccessibility of Heavy Metals in MSW Fly Ash with Various Particle Sizes | WANG Chun-feng, CHEN Guan-fei, ZHU Yan-chen, <i>et al.</i> (4891) |

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 赵进才

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 刘 毅 汤鸿霄 孟 伟 周宗灿 林金明
赵进才 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)

2016年12月15日 第37卷 第12期(卷终)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 37 No. 12 Dec. 15, 2016

| | | | | |
|---------|--|------------------|----|---|
| 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 | 赵进才 | Editor-in -Chief | | ZHAO Jin-cai |
| 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 | 中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱) | Foreign | | China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China |

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 120.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行