

纳米铁为脱氯菌供电降解三氯乙烯实验研究

修宗明¹, 金朝晖^{1*}, 李铁龙¹, Pedro J. Alvarez²

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2. Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston, USA 77005)

摘要 采用一种从氯乙烯污染场址土壤中提取的脱氯菌种(*Dehalococcoides* spp.)进行三氯乙烯(TCE)降解实验,研究纳米铁厌氧腐蚀产氢为该脱氯菌种提供电子的可能性.结果表明,在甲醇做电子供体时,稀释25倍的菌液($2.0 \pm 0.44 \times 10^5$ cell/mL)可以在96 h内将20 mg/L TCE完全降解,并在190 h时有2.706 μ mol 乙烯产生.而在无甲醇做电子供体时,96 h内只有部分TCE转化为顺二氯乙烯(*cis*-DCE),且190 h时几乎无乙烯产生(0.159 μ mol),因此无电子供体时菌液脱氯活动不能维持.但在4 g/L纳米铁腐蚀产氢的情况下,脱氯菌可以利用纳米铁产生的阴极氢维持脱氯活动,在131 h内将20 mg/L TCE完全降解,并且其耦合的脱氯速率高于纳米铁单独降解时的速率.从乙烯的产量分析中可以看出,纳米铁供电时190 h后由脱氯菌产生的乙烯量为1.187 μ mol,明显低于甲醇做电子供体时乙烯的产量2.706 μ mol,表明纳米铁可能对微生物存在一定的毒性效应.同时反应190 h后乙炔的产量为0.109 μ mol,相对低于与纳米铁单独降解TCE时的产量0.161 μ mol,说明微生物在无电子供体的情况下,竞争利用了纳米铁与水反应产生的电子导致乙炔的生成量降低.上述结果表明4 g/L的纳米铁与水反应生成的活性氢可以为脱氯菌提供电子,并维持其脱氯活动.这对纳米铁和脱氯菌耦合应用于地下水的有机氯修复具有重要的实际意义.

关键词 纳米铁; 脱氯菌; TCE; 电子供体

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)06-

Microbial Reductive Dechlorination of TCE with Nano Iron Serving as Electron Donor

XIU Zong-ming¹, JIN Zhao-hui¹, LI Tie-long¹, Pedro J. Alvarez²

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston 77005, USA)

Abstract A trichloroethylene (TCE) dechlorinating enrichment (*Dehalococcoides* spp.), which was isolated from soil of chlorinated ethene contaminated site, was used to investigate whether nano-scale zero valent iron (NZVI) could serve as electron donor for this consortium via cathodic H₂ production during anaerobic corrosion. The results show that in the presence of methanol serving as electron donor, dechlorinating culture of 25 fold dilution [$(2.0 \pm 0.44) \times 10^5$ cell/mL] degraded 20 mg/L TCE completely in 96 h, which was accompanied by the production of 2.706 μ mol ethene in 190 h. Methanol-free control caused partial degradation of TCE to primarily *cis*-DCE in 96 h, with only 0.159 μ mol ethene produced in 190 h. This indicates bacteria can't reduce TCE to ethene without electron donor. But when 4 g/L NZVI was added as sole electron donor, this dechlorinating culture degraded 20 mg/L TCE into ethene and vinyl chloride (VC) in 131 h at a speed higher than that by NZVI alone. Compared to 2.706 μ mol ethene produced by *Dehalococcoides* spp. with methanol added as the electron donor, there was only 1.187 μ mol ethene produced by bacteria with NZVI serving as the electron donor, which means NZVI has a potential toxicity on *Dehalococcoides* spp. At the meantime, 0.109 μ mol acetylene was produced in 190 h, which was relatively lower than 0.161 μ mol produced by NZVI alone, indicating bacteria competed with NZVI under electron deficient condition. In conclusion, NZVI could serve as electron donor and support dechlorination activity for *Dehalococcoides* spp. which could enhance the application of NZVI and usage of dechlorinating culture as a polishing strategy in future ground water remediation.

Key words NZVI; dechlorinating culture; TCE; electron donor

三氯乙烯(TCE)作为一种重要的挥发性有机溶剂,被广泛的应用到电镀、干洗、金属加工等工业中,其广泛的应用和不合理的排放,给土壤和地下水环境造成了严重的污染^[1,2].近年来,国外学者从受有机氯污染的土壤和河流底泥中提取到可以高效降解TCE的厌氧脱氯菌种^[3~6],该菌种可以在厌氧条件下把TCE作为电子受体,以其他还原性物质(如甲醇、醋酸盐、氢气^[7~9]等)为电子供体,将TCE还原为

乙烯等产物,但脱氯过程中还原性物质的加入会给地下水修复带来二次污染和安全隐患,限制了微生物在地下水污染修复中的应用.

收稿日期: 2008-07-11; 修订日期: 2008-09-08

基金项目: 教育部博士点新教师基金项目(20070055053); 天津市重点基金项目(07JCZDJC01800)

作者简介: 修宗明(1980~),男,博士研究生,主要研究方向为污染环境修复技术, E-mail: xiuzongming@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: jinzh@nankai.edu.cn

与此同时,纳米铁修复地下水中 TCE 技术迅速发展,在实验室研究的基础上 Elliott 等^[10]已经开始将纳米铁及其复合金属注入到有机氯污染的地下水中,开展现场实验研究.但是纳米铁在土壤和地下水中移动性较差^[11,12],不能实现对 TCE 的彻底修复.作为一种强还原材料,纳米铁在自身还原脱氯的同时可以产生大量富余的活性氢,如果脱氯菌可以利用这些活性氢作为电子供体降解 TCE,不仅可以缓解氢气聚集造成的安全隐患^[13,14],同时可以作为纳米铁修复的“抛光剂”,将纳米铁修复后空隙中残留的 TCE 彻底修复.基于此,本研究将纳米铁与脱氯菌耦合进行降解 TCE 的试验,探讨纳米铁为脱氯菌提供电子的可行性,以期为土壤和地下水的实际修复提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 化学试剂及仪器

三氯乙烯(99%,Sigma),顺二氯乙烯(99%,Sigma),甲醇(HPLC级,Fisher Scientific),Hepes 缓冲试剂(Fisher Scientific).气体标准样品(体积比):乙炔(984×10^{-6}),乙炔($1\,030 \times 10^{-6}$)均购自 Alltech Associates 公司,以氦气平衡.纳米铁由日本 Toda Kogyo 公司提供($40 \sim 60\ \mu\text{m}$, $23\ \text{m}^2/\text{g}$).

1.2 分析方法

TCE 及其降解产物用 HP5890 气相色谱仪采用顶空法测定,以气密性进样针(VICI 公司)取 $100\ \mu\text{L}$ 顶空气体测定^[15].色谱柱类型:6ft. $\times$ 1/8 外径,60/80 Carbowack B/1% SP-1000.检测器为火焰离子化检测器(FID),检测温度为 $300\ ^\circ\text{C}$.气相色谱柱炉温度程序为: $50\ ^\circ\text{C}$ 保持 2 min,以 $40\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 速度升温至 $200\ ^\circ\text{C}$ 在 $200\ ^\circ\text{C}$ 持续 6 min^[13].氦气作为载气,流速 $14\ \text{mL}/\text{min}$.乙烯,乙炔等气体标准曲线采用气密性进样针直接进样制作.TCE, cis-DCE 等采用与实验完全相同的 250 mL 棕色血浆瓶制作.

1.3 微生物培养

实验采用的脱氯菌种为一种从氯乙烯污染场址土壤中提取、富集、培养的混合菌种,能够迅速有效的降解 TCE 等有机氯污染物,已经被成功的应用四氯乙烯污染源的生物强化实验研究^[16,17].菌种采用 20 L 高密度聚氯乙烯桶培养保存,每天将 $0.25\ \text{mmol}$ 的 TCE 溶于 $3\ \text{mmol}$ 的甲醇后注射到培养桶中,并以一定量的新培养液代替部分菌液,维持该培养器的水力停留时间为 80 d 左右.

脱氯菌培养液采用去离子水配制,分别取 10

mL 预先配制的浓缩溶液至 1 L 去离子水中:基础盐溶液($40\ \text{g}/\text{L}\ \text{KCl}$, $40\ \text{g}/\text{L}\ \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $40\ \text{g}/\text{L}\ \text{NH}_4\text{Cl}$, $14\ \text{g}/\text{L}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $2.5\ \text{g}/\text{L}\ \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);微量元素溶液 I($50\ \text{mg}/\text{L}\ \text{ZnCl}_2$, $50\ \text{mg}/\text{L}\ \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $50\ \text{mg}/\text{L}\ \text{H}_3\text{BO}_3$, $250\ \text{mg}/\text{L}\ \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $50\ \text{mg}/\text{L}\ \text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $50\ \text{mg}/\text{L}\ \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);微量元素溶液 II($1\,000\ \text{mg}/\text{L}\ (\text{NaPO}_3)_6$, $250\ \text{mg}/\text{L}\ \text{KI}$, $50\ \text{mg}/\text{L}\ \text{NH}_4\text{VO}_3$)^[15].培养液在高温高压下灭菌处理后,以氮气曝气 30 min 除氧,随后转移到厌氧箱中,加入碳酸氢钠($7 \sim 10\ \text{g}/\text{L}$)作为培养液缓冲溶液,另采用 $300\ \text{mg}/\text{L}\ \text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 和 $40\ \text{mg}/\text{L}\ \text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 来还原培养液^[18].所有脱氯实验均在此厌氧培养液中进行.

1.4 DNA 提取测定

微生物 DNA 样品采用 MoBioTM试剂盒(MoBio 公司)在实验开始前及实验过程中严格按照试剂盒的操作步骤提取,每个样品均采用 3 次平行样品对照. DNA 样品浓度和纯度(A_{260}/A_{280})采用分光光度计(Amersham 公司)测定.提取后的 DNA 样品保存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ (Kelvinator 公司)冷柜中.

采用 7500 型实时定量 PCR(AB 公司)测定 TCE 降解菌株 *Dehalococcoides* spp.的细胞浓度.每个 PCR 扩增混合液中含有 $1 \times$ Taqman PCR Master Mix[®](AB 公司); $0.5\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 的正向和反向突变引物, $0.25\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 探针, $4\ \mu\text{L}$ 样品 DNA,最后采用无 DNA 酶水定容至 $25\ \mu\text{L}$.正向逆向引物和探针(表 1)均从联合 DNA 技术公司获得. PCR 反应升温程序为: $50\ ^\circ\text{C}$ 保持 2 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 保持 10 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 40 循环,最后 $60\ ^\circ\text{C}$ 保持 1 min.

表 1 *Dehalococcoides* spp.引物及探针基因序列^[19-22]

Table 1 Gene sequence of primer and probe for <i>Dehalococcoides</i> spp.	
基因类型	基因序列
正向突变引物	5'-CTGGAGCTAATCCCCAAAGCT-3'
逆向突变引物	5'-CAACTTCATGCGAGCGGG-3'
探针	5'-FAM-TCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGAA-3'

采用纯种 *Dehalococcoides* spp.菌种,按照 10 倍序列稀释,以实时定量 PCR 测定其 16S rDNA 拷贝数 Ct 值,与已知 *Dehalococcoides* spp.菌种稀释序列浓度做标准曲线^[23].

1.5 实验方法

所有脱氯菌实验均采用 250 mL 棕色血浆瓶及气密性瓶盖(Supelco 公司)在手套式厌氧箱(Coy Laboratory Products 公司)中准备.将一定量混合脱氯菌液接种到棕色血浆瓶中,补充厌氧培养液至 100

mL 相应的加入一定量的纳米铁、纯 TCE 或溶于甲醇中的 TCE. 采用 Hepes 溶液控制反应液 pH 值为 7.2. 在 22℃ 条件下, 将反应瓶置于平板振荡器上, 以 200 r/min 转速振荡反应. 菌种接种之前, 采用混合气体 (20% CO₂, N₂ 平衡) 曝气 30 min, 吹掉所有残留的有机氯污染物^[24]. 采用高压稳定杀菌后的菌种作为空白, 定时测定反应瓶中 TCE 及其降解产物浓度.

2 结果与讨论

2.1 最佳脱氯菌浓度实验

与实验室制备的纳米铁相比, 日本 Toda Kogyo 公司的纳米铁反应活性较低, 因此其可以保证较长时间的产氢供电, 但是 4 g/L 的纳米铁仍然可以将 20 mg/L (15.2 μmol) 的 TCE 在 5 d 内完全降解^[13]. 而按照上述方法接种培养的脱氯菌在达到最大细胞浓度后, 可以在 24 h 内将 20 mg/L 的 TCE 迅速转化为乙烯和 cis-DCE 等产物, 因此要让纳米铁为微生物高效持续的提供电子, 必须寻找合适的接种脱氯菌浓度, 以使其脱氯速率与纳米铁释放氢气的速率相适应.

将脱氯菌培养至最大细胞浓度后, 在手套式厌氧箱中分别将菌液稀释 100、50、25、12.5 倍至 100 mL 厌氧培养液中, 注射 100 μL 溶于甲醇的 TCE 使其在反应液中的浓度为 20 mg/L. 在 22℃ 条件下将反应瓶置于平板振荡器上振荡反应. 同时在反应前后分别 3 次平行移取 1.8 mL 菌液至 2 mL 的 DNA 提取管中, 平行提取混合菌液 DNA, 测定与 TCE 降解有关的 *Dehalococcoides* spp. 菌种的细胞浓度.

由图 1 可以看出, 稀释 100、50、25、12.5 倍的脱氯菌种分别可以在 200、128、75、73 h 的时间内将 15.2 μmol 的 TCE 完全降解. 考虑到脱氯菌还需要较长时间将产物 cis-DCE 继续转化为 VC 和乙烯等产物, 实验选取稀释 25 倍的菌液与纳米铁进行耦合脱氯实验.

以菌液稀释倍数衡量的脱氯菌量只是一个估测的数值, 存在较大波动, 因此实验采用实时定量 PCR 测定 *Dehalococcoides* spp. 菌种细胞浓度, 以更加清楚的表达细胞浓度与脱氯速率之间的关系.

实验采用菌液的初始浓度为 $(5.1 \pm 1.1) \times 10^6$ cell/mL, 按上述相应比例稀释后进行脱氯反应, 反应后 *Dehalococcoides* spp. 菌种细胞数目均明显上升. 其中稀释 25 倍的反应瓶由初始的 $(2.0 \pm 0.44) \times 10^5$ cell/mL 上升至 $(4.61 \pm 0.8) \times 10^5$ cell/mL, 说明脱氯菌

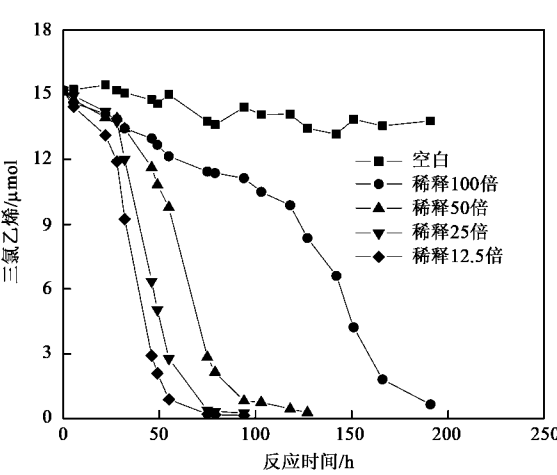


图 1 不同脱氯菌浓度降解 TCE 速率对比
Fig.1 Comparison of different dechlorination rate with different *Dehalococcoides* spp. concentration

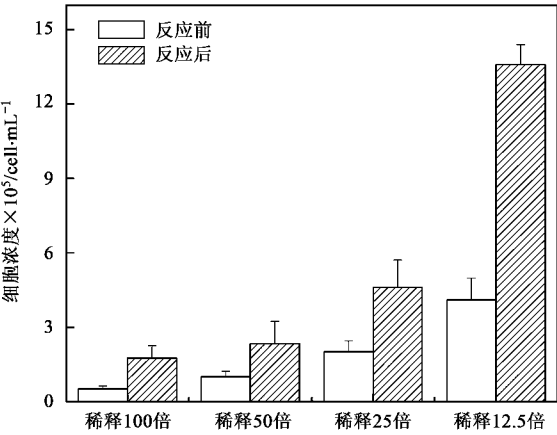


图 2 反应前后脱氯菌细胞浓度对比
Fig.2 *Dehalococcoides* spp. cell concentration before and after dechlorination

在降解 TCE 的同时自身生长繁殖.

2.2 有无电子供体降解实验对比

合适的电子供体是该脱氯菌种生长的重要条件. 在正常情况下, 该菌种不能在无电子供体的情况下降解 TCE, 因此在验证纳米铁是否可以为脱氯菌提供电子之前, 必须对该菌种在无电子供体时的降解情况进行研究. 在厌氧操作箱中分别准备两瓶以厌氧培养液稀释 25 倍的脱氯菌反应液 (100 mL), 注射 TCE 甲醇溶液和纯 TCE, 使反应液 TCE 终浓度均为 20 mg/L, 置于平板振荡器上反应.

由图 3(a) 的对比可以看出在有甲醇作为电子供体的情况下, 脱氯菌在 96 h 的时间内几乎将 TCE 完全降解, 而在无甲醇做电子供体的时候 TCE 降解

速率明显缓慢,在 190 h 时仍然有 3 μmol 的 TCE 未被降解转化.在无甲醇的情况下脱氯菌降解 TCE 的原因是接种菌液本身含有少量的初始电子供体,因此即使在无甲醇的情况下依然实现了对 TCE 的降解.但是从图 3(b) 乙烯的产量可以看出,虽然在无电子供体时脱氯菌降解了 TCE,但是在其自身的电

子供体耗尽后,脱氯几乎停止,190 h 后只有 0.159 μmol 的微量乙烯生成,而在有甲醇做电子供体的情况下,脱氯产物由 cis-DCE 继续降解为 VC 和乙烯.乙烯在 190 h 后达到 2.706 μmol ,这表明在无电子供体时脱氯反应不能维持,更不能实现 VC 和乙烯的完全转化.

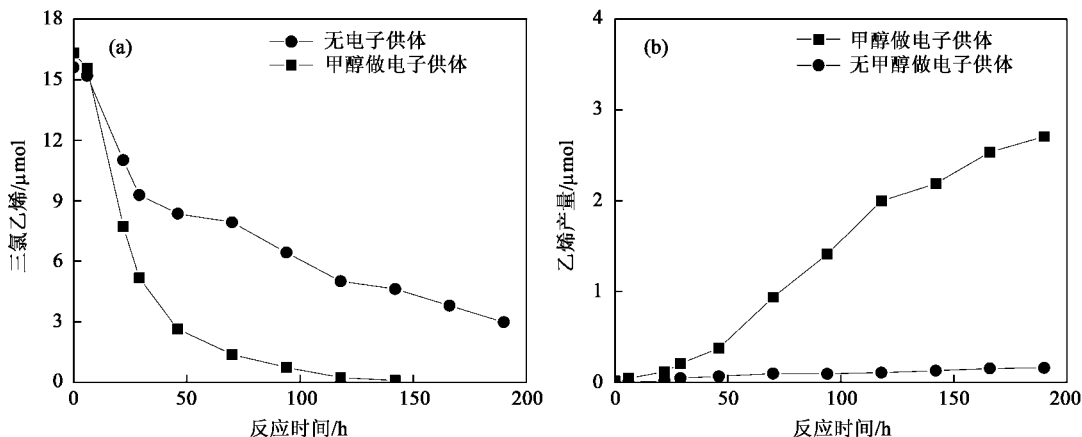
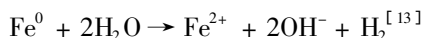


图 3 有无电子供体对脱氯的影响

Fig. 3 Effects of electron donor on dechlorination

2.3 纳米铁作为电子供体实验研究

纳米铁是一种活性很高的还原性材料,400 mg 的纳米铁与培养液接触后,会迅速与水反应生成 H_2 ,同时产生 OH^- ,导致溶液 pH 值升高至 9.44.



纳米铁腐蚀产生的氢气可以给脱氯菌提供电子,但同时 OH^- 引起的高 pH 值会抑制微生物的生长,因此在实验中需要采用相应的缓冲溶液来调节 pH 值.在手套式厌氧操作箱内,将接种菌液 400 mg 纳米铁以及二者的结合分别投加到棕色血浆瓶中.另投加 Hepes 缓冲溶液使其终浓度为 60 mmol/L,补充厌氧培养液至 100 mL.分别注射相应的 TCE 甲醇溶液或纯 TCE,以此对比研究纳米铁是否可以作为脱氯菌供电降解 TCE.

由图 4 可以看出,在纳米铁做电子供体的情况下,脱氯菌可以利用纳米铁腐蚀产生的 H_2 实现对 TCE 的降解,二者耦合的反应速率明显高于纳米铁单独降解 TCE 时的速率,这是纳米铁和微生物联合作用的结果.在理想的情况下,纳米铁供电时除脱氯菌降解 TCE 之外,其本身亦可以降解 TCE,因此其耦合降解速率应为二者速率之和.实验得到的结果未达到理想的脱氯速率,耦合降解速率低于甲醇做电子供体时的降解速率,其原因是脱氯菌与纳米铁耦合降解 TCE 时,其脱氯的主要产物为无毒的乙炔、乙烯以及微量

的 cis-DCE 和 VC 等,而脱氯菌单独降解的 TCE 的主产物为 VC、乙烯及少量的 cis-DCE,降解过程并不彻底.另外 VC 到乙烯的转化是脱氯菌脱氯的限速步骤,需要较长的时间才可以达到完全脱氯,因此脱氯终产物的不同造成脱氯速率的明显差异.

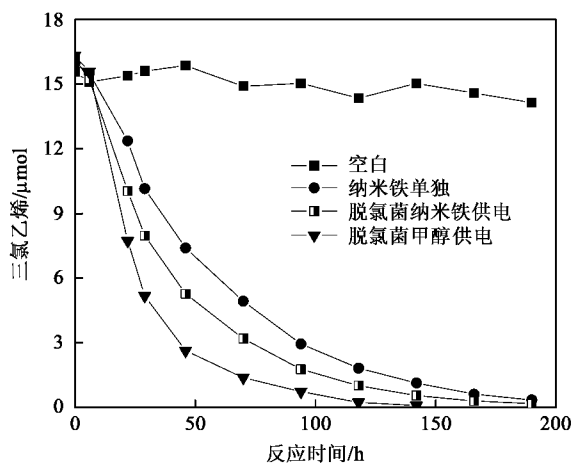


图 4 纳米铁、脱氯菌及其耦合脱氯效果对比

Fig. 4 Comparison on dechlorination effects of NZVI, bacteria and their combination

2.4 脱氯特征产物对照

在甲醇做电子供体时,微生物降解 TCE 的产物为乙烯和 VC 等产物,而在无甲醇做电子供体时,脱

氯反应几乎终止于 *cis*-DCE ,仅有微量的 VC 和乙烯生成.因此对比乙烯的产量不仅可以表明脱氯菌是否利用了纳米铁产生的活性氢,而且可以从侧面反应脱氯菌在与纳米铁接触后的活性.

由图 5 (a)可以看出脱氯菌与纳米铁耦合时产生的乙烯量明显高于甲醇供电时乙烯的产生量,其原因是纳米铁降解 TCE 时同样有产物乙烯生成.为便于对比脱氯菌在甲醇供电和纳米铁供电情况下的乙烯产量的差异,图 5 (a)中采用虚线粗略指示耦合反应中由脱氯菌降解 TCE 产生的乙烯量.由乙烯产量对比可以看出,在纳米铁作为电子供体时,脱氯菌可以将 TCE 降解为乙烯,但 190 h 时乙烯的产量为 1.187 μmol ,明显低于甲醇做电子供体时乙烯的产量 2.706 μmol ,这从侧面表明纳米铁对脱氯菌可能具有一定的毒性效应,使其降解活性受到抑制.相对于土壤和地下水中的产甲烷菌等其他菌种,脱氯菌 (*Dehalococcoides* spp.)较为敏感^[25],这是纳米铁应用于实际地下水修复过程中需要考虑的一个因素.

由图 5 (b)乙炔的产量看,脱氯菌与纳米铁耦合

时,反应 190 h 后乙炔的产量为 0.109 μmol ,相对较低.与纳米铁单独降解 TCE 时的产量 0.161 μmol ,这表明此时纳米铁脱氯活性同样受到了微生物的竞争抑制.其原因是微生物在没有电子供体的情况下,竞争利用了纳米铁与水反应产生的电子生成乙烯等产物,因此导致乙炔的生成量降低.

综合上述实验结果可知,脱氯菌可以利用纳米铁腐蚀产生的活性氢作为电子供体,将 TCE 还原为 *cis*-DCE 和 VC,并最终完全脱氯为无毒产物乙烯.这给土壤和地下水的修复提供了新的途径.在高浓度非水相有机污染源 (DNAPL)修复过程中,纳米铁因受移动性差的限制只能修复局部区域,而脱氯菌也受到高浓度污染物的毒性效应以及修复周期的限制.如果将纳米铁直接注射到 DNAPL 源核心区域进行迅速修复,而脱氯菌在 DNAPL 浓度降低后利用纳米铁提供的氢气做电子供体将残余在孔隙中的污染物进一步修复,则可以达到短期内迅速、彻底修复有机氯污染源的目标,这对地下水修复具有重要的实际意义.

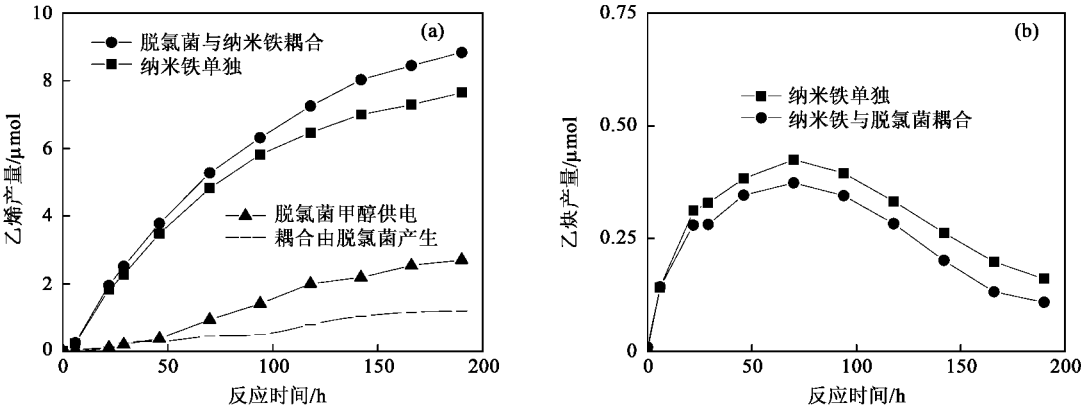


图 5 TCE 降解产物对比
Fig.5 Comparison of TCE degradation endproducts

3 结论

- (1)经批实验研究得出稀释 25 倍后的菌液 [(2.0 ± 0.44) × 10⁵ cell/mL] 可以将 TCE 转化为 *cis*-DCE,并在后续反应中将其转化为乙烯和 VC 等产物,其脱氯速率可以与 4 g/L 纳米铁供电的速率相适应.
- (2)在甲醇做电子供体时,TCE 在 96 h 后被降解,其中 190 h 时乙烯的产量为 2.706 μmol ,但在无甲醇做电子供体时 TCE 未被完全降解,仅有 0.159 μmol 乙炔产生,这表明在无外来电子供体的情况

- 下,脱氯菌虽然可以利用投加菌液中自身含有的微量电子供体将 TCE 转化为 *cis*-DCE,但其不能持续的实现 *cis*-DCE 向 VC 和乙烯的转化.
- (3)纳米铁投加量为 4 g/L 时,稀释 25 倍的脱氯菌可以有效利用纳米铁提供的活性氢,并且其耦合的脱氯速率高于纳米铁单独降解时的速率.从乙烯的产量分析中得出,190 h 时由脱氯菌产生的乙烯量为 1.187 μmol ,明显低于甲醇做电子供体时乙烯的产量 2.706 μmol ,这表明脱氯菌 (*Dehalococcoides* spp.) 相对较为敏感,纳米铁可能对其有一定的毒性效应,这是纳米铁应用于实际地下水修复过程中需

要考虑的一个因素.

参考文献：

[1] McCarty P L. Breathing with chlorinated solvents [J]. Science , 1997 ,**276**(6) :1521-1522 .

[2] Mohn W W ,Tiedje J M. Microbial reductive dehalogenation[J]. Microbiol Rev , 1992 ,**56**(3) :482-507 .

[3] Maymo-Gatell X ,Chien Y ,Zinder S H ,*et al.* Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene [J]. Science ,1997 ,**276**(6) :1568-1571 .

[4] Daprato R C ,Löffler F E ,Hughes J B ,*et al.* Comparative analysis of three tetrachloroethene to ethene halorespiring consortia suggests functional redundancy[J]. Environ Sci Technol 2007 ,**41**(7) :2261-2269 .

[5] He J ,Sung Y ,Löffler F E ,*et al.* Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2 , a trichloroethene(TCE)-and 1 ,2- dichloroethene-respiring anaerobe [J]. Environ Microbiol ,2005 ,**7**(9) :1442-1450 .

[6] Fennell D E ,Nijenhuis I ,Zinder S H ,*et al.* *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants [J]. Environ Sci Technol ,2004 ,**38**(7) :2075-2081 .

[7] Carr C S ,Hughes J B. Enrichment of high-rate PCE dechlorination and comparative study of lactate , methanol and hydrogen as electron donors to sustain activity [J]. Environ Sci Technol ,1998 ,**32**(12) : 1871-1824 .

[8] Fennell D E , Gossett J M ,Zinder S H ,*et al.* Comparison of butyric acid , ethanol , lactic acid , and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene [J]. Environ Sci Technol ,1997 ,**31**(3) :918-926 .

[9] Deweerd K A ,Concannon F ,Suflija J M. Relationship between hydrogen consumption , dehalogenaion and the reduction of sulfur oxyanions by desulfomonile tiedjei [J]. Appl Environ Microbiol , 1991 ,**57**(7) :1929-1934 .

[10] Elliott D W ,Zhang W. Field assessment of nanoscale bimetallic particles for groundwater treatment[J]. Environ Sci Technol ,2001 , **35**(24) :4922-4926 .

[11] Saleh N ,Kim H J ,Lowry G V ,*et al.* Ionic strength and composition affect the mobility of surface-modified Fe0 nanoparticles in water-saturated sand columns [J]. Environ Sci Technol ,2008 ,**42**(9) : 3349-3355 .

[12] Phenrat T ,Saleh N ,Lowry G V ,*et al.* Stabilization of aqueous nanoscale zero valent iron dispersions by anionic polyelectrolytes : adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation [J]. J Nanopart Res ,2008 ,**10**(5) : 795-814 .

[13] Liu Y ,Majetich S A ,Lowry G V ,*et al.* TCE dechlorination rates , Pathways and Efficiency of nanoscale iron particles with different properties [J]. Environ Sci Technol ,2005 ,**39**(5) :1338-1345 .

[14] Liu Y ,Lowry G V. Effect of Particle Age(Fe⁰ content) and Solution pH on NZVI Reactivity : H₂ Evolution and TCE Dechlorination [J]. Environ Sci Technol ,2006 ,**40**(19) :6085-6090 .

[15] Zheng D ,Carr C S ,Hughes J B. Influence of hydraulic retention time on extent of PCE dechlorination and preliminary characterization of the enrichment culture[J]. Bioremed J ,2001 ,**5**(2) :159-168 .

[16] Silva M L B Da ,Hughes J B ,Alvarez P J ,*et al.* Comparison of bioaugmentation and biostimulation for the enhancement of dense nonaqueous phase liquid source zone [J]. Bioremed J ,2006 ,**78**(13) :2456-2465 .

[17] Adamson D T ,McDade J ,Hughes J B. Inoculation of a DNAPL source zone to initiate reductive dechlorination of PCE [J]. Environ Sci Technol ,2003 ,**37**(11) :2525-2533 .

[18] Yang Y ,Mccarty P L. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture [J]. Environ Sci Technol ,1998 ,**32**(22) :3591-3597 .

[19] He J ,Ritalahti K M ,Löffler F E ,*et al.* Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species [J]. Appl Environ Microbiol ,2003 ,**69**(2) :996-1003 .

[20] Löffler F E ,Sun Q ,Li J R. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species [J]. Appl Environ Microbiol ,2000 ,**66**(4) :1369-1374 .

[21] Seshadri R ,Adrian L ,Zinder S H. Genome sequence of the PCE- dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes* [J]. Science , 2005 ,**307**(7) :105-108 .

[22] Kube M ,Beck A ,Zinder S H. Genome sequence of the chlorinated compound respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1 [J]. Nature Biotechnol ,2005 ,**23**(10) :1269-1273 .

[23] Ritalahti K M ,Amos B K ,Löffler F E ,*et al.* Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains [J]. Appl Environ Microbiol ,2006 ,**72**(4) :2765-2774 .

[24] Wu W ,Nye J ,Hickey R F ,*et al.* Anaerobic dechlorination of trichloroethylene(TCE) to ethylene using complex organic materials [J]. Water Res ,1998 ,**32**(5) :1445-1454 .

[25] Amos B K ,Hughes J B ,Löffler F E ,*et al.* Effect of Nonionic Surfactant Tween 80 on Microbial Reductive Dechlorination of Chlorethenes [J]. Environ Sci Technol ,2007 ,**41**(5) :1710-1716 .