ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第4期

Vol.35 No.4

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

双奖期刊

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第35卷 第4期
2014年4月15日

目 次

2008 ~2012 年上海黑碳浓度变化特征分析 …… 王洪强,贺千山,陈勇航,亢燕铭(1215)
乌鲁木齐市东南郊一次降雪过程的化学组成及其悬浮态颗粒形态特征 …… 陆辉,魏文寿,崔彩霞,何清,王瑶(1223)
典型地区大气中多溴联苯醚和新型溴代阻燃剂的水平及组成分布 …… 吴辉,金军,王英,李明圆,何松洁,徐萌,孙一鸣(1230)
某焦化厂周边大气 PM_{10} 重金属来源及健康风险评价 …… 董婷,李天昕,赵秀阁,曹素珍,王贝贝,马瑾,段小丽(1238)
基于车流和大气污染物浓度同步增量的机动车平均排放因子估算方法 …… 李润奎,赵彤,李志鹏,丁文军,崔骁勇,许群,宋现锋(1245)
珠江三角洲地区硫和氮沉降临界负荷研究 …… 孙成玲,谢绍东(1250)
低温等离子体-生物法处理硫化氢气体研究 …… 李华琴,何觉聪,陈洲洋,黎宝仁,黄倩茹,张再利,魏在山(1256)
太子河流域莠去津的空间分布及风险评价 …… 郑磊,张依章,张远,朱鲁生,王志强(1263)
一种大批量测定沉积物微量间隙水样品中溶解态磷和铁含量的方法 …… 王燕,朱春刚,许笛,丁士明(1271)
外源营养盐输入后水体中营养盐浓度的时空变化 …… 傅玲, 赵凯,王国祥,欧媛,范娴, 毛丽娜,张佳, 韩睿明(1278)
基于物理过程的矿区地下水污染风险评价 …… 孙法圣,程品,张博(1285)
重庆典型岩溶地下水系统水文地球化学特征研究 …… 杨平恒,卢丙清,贺秋芳,陈雪彬(1290)
重庆老龙洞地下河流域氮、磷及微生物污染调查研究 …… 蓝家程,杨平恒,任坤,陈雪彬,徐昕,胡宁(1297)
苦草(*Vallisneria natans*)根系对沉积物中各形态磷的影响 …… 李振国,王国祥,张佳,马久远,魏宏农,俞振飞(1304)
循环流廊道湿地中氮归趋过程模拟研究 …… 彭剑峰,宋永会,袁鹏,张雪妍,胡小明(1311)
不同环境因素下太湖中四环素的自然消减 …… 段伦超,王风贺,纪菅雪,张帆,赵斌,王国祥(1318)
再生水中5种抗生素抗性菌的紫外线灭活及复活特性研究 …… 黄晶晶,汤芳,席劲瑛,庞宇辰,胡洪营(1326)
二级处理出水的 UV-TiO_2 消毒及大肠杆菌和粪肠球菌光复活试验 …… 王西峰,龚昕,胡晓莲,任伯帜(1332)
水中 C_{60} 纳米颗粒的稳定性研究 …… 方华,沈冰冰,荆洁,陆继来,王媛(1337)
XDLVO 理论解析不同离子条件下海藻酸钠微滤膜污染 …… 赵应许, 纵瑞强,高欣玉,谢慧君,殷永泉,梁爽(1343)
纳米零价铁催化过氧化氢强化修复4-氯硝基苯污染地下水的研究 …… 付融冰(1351)
共存氯苯类同系物对六氯苯厌氧降解活性的影响 …… 王琪,刘辉,姜林,唐军(1358)
硫酸盐还原生物滤池对含镉废水去除效果试验研究 …… 吴宣,谭科艳,胡希佳,顾运, 杨宏(1366)
基于氮平衡原理对南方污水处理厂中试脱氮工艺调控策略研究 …… 姜应和,刘佩炬,王磊,田中凯,刘小英(1372)
模拟电镀污泥阴离子浸出液对氧化亚铁硫杆菌活性的影响 …… 陈燕,黄芳,谢鑫源(1377)
电活性生物膜介导 Cu^{2+} 生物还原的试验研究 …… 刘毅,周顺桂,袁勇,刘志(1384)
模拟废旧线路板生物浸出液中铜的回收 …… 程丹,朱能武,吴平霄,邹定辉,邢翊佳(1391)
填埋垃圾浸提液与地下水污染物组成差异及成因 …… 何小松,余红,席北斗,崔东宇,潘红卫,李丹(1399)
化学合成施氏矿物与 H_2O_2 共存体系下光化学处理垃圾渗滤液的研究 …… 王鹤茹,宋永伟,徐峙辉,崔春红,周立祥(1407)
处理 BPA 模拟废水的 SBR 工况参数对污泥有机毒性的影响研究 …… 杨娜,陈秀荣,林逢凯,黄华,章斐,赵骏,丁毅(1414)
剩余污泥厌氧消化甲烷生成势与产甲烷菌群多样性的比较研究 …… 董慧峪,季民(1421)
锰氧化菌 *Aminobacter* sp. H1 的分离鉴定及其锰氧化机制研究 …… 晏平,姜理英,陈建孟,何智敏,肖少丹,蒋轶锋(1428)
1 株铁基质自养反硝化菌的脱氮特性 …… 王弘宇,杨开,张倩,季斌,陈丹,孙宇翀,田俊(1437)
碘普罗胺降解菌 *Pseudomonas* sp. I-24 共代谢降解性能研究 …… 徐冰洁,高品,薛罡,何梦琦,吴凡(1443)
利用流式细胞术研究鞘氨醇单胞菌 GY2B 降解菲过程中细菌表面特性的变化 …… 张梦露,党志,伍凤姬,梁旭军,郭楚玲,卢桂宁,杨琛(1449)
毒性有机物 BPA 与普通小球藻的相互影响特性研究 …… 陈善佳,陈秀荣,闫龙,赵建国,章斐,江子建(1457)
缺镁胁迫对普通小球藻光合生理及油脂积累的影响 …… 王珊,赵树欣,魏长龙,于水燕,史吉平,张保国(1462)
微囊藻毒素对水稻根系生长和抗氧化系统的影响 …… 王娓敏,邓珀,邹华,梁婵娟(1468)
东北春大豆品种东生1号对臭氧胁迫的响应 …… 张巍巍,王光华,王美玉,刘晓冰,冯兆忠(1473)
生物结皮的发育演替与微生物生物量变化 …… 吴丽, 张高科, 陈晓国, 兰书斌, 张德禄, 胡春香(1479)
老化土壤中铅对赤子爱胜蚓生长及繁殖的影响 …… 陈丽红, 刘征涛, 方征, 王晓南, 王婉华(1486)
土壤重金属镉标准值差异比较研究与建议 …… 赵晓军,陆泗进,许人骥,李伯芩,吴国平,魏复盛(1491)
藏北可可西里地区土壤元素背景值研究 …… 柏建坤,王建力,李潮流,康世昌,陈鹏飞(1498)
三峡库区香溪河消落带及库岸土壤重金属迁移特征及来源分析 …… 胥焘,王飞,郭强,聂小倩,黄应平,陈俊(1502)
浙江海宁电镀工业园区周边土壤重金属污染特征及生态风险分析 …… 厉炯慧,翁珊,方婧,黄佳蕾,陆芳华,卢宇浩,张洪铭(1509)
西湖景区土壤典型重金属污染物的来源及空间分布特征 …… 张海珍,唐宇力,陆骏,周虹,徐芸茜,陈川,赵赟,王美娥(1516)
生活垃圾焚烧厂周边土壤汞污染特征及评价 …… 解惠婷,张承中,徐峰,李海凤,田振宇,唐琛,刘文彬(1523)
上海滴水湖周边土壤和沉积物对磷的吸附特征 …… 诸葛祥真,毕春娟,陈振楼,张焕焕,倪玮怡(1531)
SDBS/Na^+ 对红壤胶体悬液稳定性的影响 …… 唐颖,李航,朱华玲,田锐,高晓丹(1540)
稳定化处理对矿渣中重金属迁移转化的影响研究 …… 赵述华,陈志良,张太平,潘伟斌,彭晓春,车融,欧英娟,雷国建,周鼎(1548)
藻类水体 Cd^{2+} 毒性快速监测新方法研究 …… 段静波,刘文清,张玉钧,赵南京,殷高方,肖雪,余晓娅,方丽(1555)
用于1,3-二硝基苯快速检测的免疫传感器研究 …… 龙峰, 施汉昌, 王洪臣, 盛建武(1561)
Mg/Al 水滑石微波共沉淀法合成及其对 BrO_3^- 吸附性能的研究 …… 钟琼, 李欢(1566)
污染场地修复决策支持系统的几个关键问题探讨 …… 廖晓勇, 陶欢, 阎秀兰, 赵丹, 林龙勇, 李尤(1576)
城市区域土壤铅含量空间变异的多尺度研究进展 …… 杨孟, 李凤英, 刁一伟, 吴丹(1586)
水中细菌内毒素污染特性及检测方法研究进展 …… 张灿,刘文君,张明露,田芳,杨毅,安代志(1597)
六价铬细菌还原的分子机制研究进展 …… 李斗,赵由才,宋立岩,尹雅洁,王洋清,徐中慧(1602)
农副食品加工业高浓度废水的厌氧膜生物反应器技术 …… 魏源送, 郁达伟,曹磊(1613)
《环境科学》征稿简则(1427) 《环境科学》征订启事(1497) 信息(1383, 1390, 1398, 1560)

利用流式细胞术研究鞘氨醇单胞菌 GY2B 降解菲过程中细菌表面特性的变化

张梦露[1],党志[1,2],伍凤姬[1],梁旭军[1],郭楚玲[1,2*],卢桂宁[1,3],杨琛[1,2]

(1. 华南理工大学环境与能源学院,广州 510006; 2. 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室,广州 510006; 3. 广东省水与大气污染防治重点实验室,广州 510655)

摘要: 微生物与污染物接触是生物降解的第一步,为进一步了解降解过程中有机污染物对降解菌的影响,通过对不同条件下鞘氨醇单胞菌 GY2B(*Sphingomonas* sp. GY2B)降解菲的研究,并结合 Propidium Iodide(PI)染料和流式细胞仪分析不同底物及污染物浓度对 GY2B 菌体细胞表面性质的影响. 结果表明,随着菲的降解, PI 染色的 GY2B 菌株细胞增多, 说明细菌膜结构受到一定的破坏,通透性不断增强. 污染物浓度越高,降解菌的膜完整性的破坏越为严重. 60 h 时,300 mg·L^{-1}浓度条件下,染色细胞/未被染色细胞的比值可达 12.44,而在 100 mg·L^{-1}和 1.2 mg·L^{-1}浓度条件下,比值分别为 1.95 和 1.11. 同时降解过程中细菌细胞的傅里叶红外光谱检测,死亡、受损和完整细胞的区分以及 Zeta 电位分析也进一步验证了细菌细胞表面性质的改变. 利用流式细胞术与染料结合分析降解过程中细菌细胞膜完整性的变化,从单细胞水平上了解细菌降解污染物过程中其细胞表面性质的改变,有助于更好地研究 GY2B 对菲的降解机制.

关键词:鞘氨醇单胞菌; 流式细胞术; 菲; 膜完整性; 傅里叶红外光谱; ζ 电位

中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2014)04-1449-08 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.2014.04.035

Using Flow Cytometry to Explore the Changes of *Sphingomonas* sp. GY2B Bacterial Surface Characteristics in the Process of Degrading Phenanthrene

ZHANG Meng-lu[1], DANG Zhi[1,2], WU Feng-ji[1], LIANG Xu-jun[1], GUO Chu-ling[1,2], LU Gui-ning[1,3], YANG Chen[1,2]

(1. School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. The Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 3. The Key Laboratory of Water and Air Pollution Control of Guangdong Province, Guangzhou 510655, China)

Abstract: The first step of biodegradation is the contact of microorganism and pollutants, in order to examine the influence of phenanthrene on *Sphingomonas* sp. GY2B's surface properties during its degrading process, the bacteria was cultivated at different conditions, and detected by flow cytometry combined with fluorescent dyes for its surface changes. The results indicated that, the membrane structure had been certainly damaged during the degrading process, leading to an increased membrane permeability. Moreover, the destruction of bacteria membrane integrity became more serious with a higher pollutant concentration. At the concentration of 300 mg·L^{-1}, the ratio of stained bacterial cells/unstained cells was 12.44 after cultured for 60 h, while at 100 mg·L^{-1} and 1.2 mg·L^{-1}, the ratios were 1.95 and 1.11, respectively. The results of fourier transform infrared(FT-IR) absorbance spectroscopy detection, the discrimination of death, injured and intact cells, and Zeta potential detection further verified the bacterial cell surface permeability changes. Flow cytometry combined with fluorescent dye propidium iodide was used to monitor the changes of bacterial membrane integrity on single-cell level which exhibited a good potential for exploring the changes of bacterial surface properties during the degrading progress and more deeply for investigating the degradation mechanism.

Key words: *Sphingomonas* sp.; flow cytometry; phenanthrene; membrane integrity; FT-IR; Zeta potential

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一大类广泛存在于环境中的有机污染物,也是一类潜在的化学致癌物[1,2]. 已有的研究报道表明,微生物降解是去除环境中多环芳烃的最主要途径[3,4]. 微生物降解的研究重点目前更多集中在污染物降解和降解效率等方面,而降解菌自身的变化主要采用细胞干重法、培养体系浊度测量(吸光度)等传统方法来反映. 但是这类方法通常只是从宏观的角度了解降解过程中微生物的生长状况,无法反映降解过程中微生物个体细胞的变化特征[5]. 微生物个体细胞的生理状态、代谢功能及繁殖能力,对于污染物降解过程的效果有着决定性的作用[6]. 因此,对降解过程中细菌个体细胞的状态进

收稿日期: 2013-07-19; **修订日期**: 2013-11-04

基金项目: 广东省自然科学基金项目(9351064101000001, S2012010008589); 广州市科技计划项目(2012J4100005); 广州珠江新星专项(2011J2200064)

作者简介: 张梦露(1989~),女,硕士研究生,主要研究方向为污染物的生物修复,E-mail:zhangmenglu1989@hotmail.com

* 通讯联系人,E-mail:clguo@scut.edu.cn

行研究能更好地了解微生物的降解机制,从而充分发挥微生物的降解能力.

在降解过程中,微生物与污染物的接触是其进行降解的第一步[7],污染物对细菌细胞壁及质膜的作用会改变微生物的疏水性、质膜通透性及表面 ζ 电位等,进而影响细菌的降解功能. Ramos 等[8]报道当有机溶剂的 $\lg K_{ow}$ 在 1.5 ~ 3 之间时,会改变细菌细胞膜的脂肪酸成分,破坏细胞膜的结构和通透性,从而导致细菌的溶解和死亡. Baumgarten 等[9]发现 *Pseudomonad putida* DOT-T1E 在 1-癸醇为碳源的条件下,其 ζ 电位及水相接触角发生变化,导致疏水性增强,使其形成生物膜,从而能更好地适应生长环境的改变. Wick 等[10]的研究表明当以固态蒽(anthracene)为唯一碳源时,菌株表面疏水性及所带负电荷程度较以葡萄糖为碳源培养条件下更高,这促进了 LB501T 菌对固态蒽的降解. 因此,探究降解过程中污染物对菌体细胞表面性质的影响,有助于了解微生物对污染物的适应机制,促进污染物的降解.

常用的检测细胞质膜通透性的方法有 β-半乳糖苷酶(ONPG)诱导法、硝酸镧(La)示踪法、LDH 释放法和电导率检测方法等[11,12],但这些方法存在着灵敏度和精确性不高或操作繁琐等缺点. 流式细胞术(FCM)因其快速准确的单细胞分析能力,近年来逐渐被应用到微生物领域. 相对于传统方法的宏观测量,流式细胞术与各种荧光染料结合能更好地从微观角度了解细菌的单细胞状态,如检测细胞周期变化、细胞数量及其群体结构变化[13~16],其检测的标准主要是基于对于细胞完整性、细胞生理功能不同程度变化的反应,可区分反应过程中的细胞状态(活细胞、受损细胞和死亡细胞)[17,18]. 本研究尝试结合流式细胞术与荧光染料检测高效菲降解菌 GY2B(*Sphingomonas* sp. GY2B)降解菲过程中膜通透性的变化; 同时,分析细菌细胞表面疏水性及 ζ 电位的变化,探究污染物菲对其降解菌 GY2B 个体细胞及其的表面性质的影响,了解降解过程中污染物对降解菌的影响,以期为更好地进行污染环境的微生物修复提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料及药品

实验菌种:鞘氨醇单胞菌 GY2B(*Sphingomonas* sp. GY2B,Genbank No. :DQ139343),革兰氏阴性菌株,由本课题组从广州地区受 PAHs 污染严重的土壤筛选得到[19].

菲贮备液:菲购自 Aldrich 公司,纯度为 98%,用正己烷配置浓度为 1 $g\cdot L^{-1}$、5 $g\cdot L^{-1}$和 10 $g\cdot L^{-1}$浓度的贮备液,4℃冰箱中保存备用.

无机盐基础培养液(MSM)[20]:5.0 $mL\cdot L^{-1}$磷酸盐缓冲液(8.5 $g\cdot L^{-1}$ KH_2PO_4, 21.75 $g\cdot L^{-1}$ $K_2HPO_4\cdot H_2O$, 33.4 $g\cdot L^{-1}$ $Na_2HPO_4\cdot 12\ H_2O$, 5.0 $g\cdot L^{-1}$ NH_4Cl),3.0 $mL\cdot L^{-1}$ $MgSO_4$ 水溶液(22.5 $g\cdot L^{-1}$),1.0 $mL\cdot L^{-1}$ $CaCl_2$ 水溶液(36.4 $g\cdot L^{-1}$),1.0 $mL\cdot L^{-1}$ $FeCl_3$ 水溶液(0.25 $g\cdot L^{-1}$),1.0 $mL\cdot L^{-1}$微量元素溶液[39.9 $mg\cdot L^{-1}$ $MnSO_4\cdot H_2O$, 34.7 $mg\cdot L^{-1}$ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$, 42.8 $mg\cdot L^{-1}$ $ZnSO_4\cdot H_2O$],pH 为 7.2.

磷酸盐缓冲液(PBS):56.78 $g\cdot L^{-1}$ Na_2HPO_4, 48 $g\cdot L^{-1}$ NaH_2PO_4, 8.77 $g\cdot L^{-1}$ NaCl, pH = 7.2, 0.22 μm滤膜过滤后灭菌 4℃冰箱中保存备用.

碘化丙啶(PI)母液:PI 染料购置于 Sigma 公司,用超纯水配制为浓度为 0.4 $mg\cdot mL^{-1}$的母液,4℃冰箱中保存备用.

1% 多聚甲醛溶液:称取 1.0 g 多聚甲醛至 100 mL PBS 溶液中, pH 调节至 7.2, 0.22 μm 滤膜过滤后,4℃冰箱中避光保存备用.

1.2 实验方法

1.2.1 菌株 GY2B 对菲的降解实验

向含有 1.2、100 及 300 $mg\cdot L^{-1}$菲的体系中加入 1 mL 培养至对数期 GY2B 菌悬液,总反应体系为 50 mL,于 150 $r\cdot min^{-1}$,30℃的摇床培养箱中恒温避光培养 5 d. 分别以灭菌含菲无机盐培养基和同等接种量细菌不含菲无机盐培养基作为空白对照.

1.2.2 菌体膜通透性(membrane permeability)的测定

本实验选用 PI 荧光染料与流式细胞仪结合检测 GY2B 菌细胞表面变化[17],分别于以上反应体系开始和结束后收集 GY2B 细胞. 8 000 $r\cdot min^{-1}$,离心 5 min 收集 GY2B 细胞(细胞数量约为 5×10^6 个$\cdot mL^{-1}$),预冷 PBS 洗涤 2 次, 1% 多聚甲醛固定于 4℃保存待检测[21].

进行流式检测之前,固定的细胞需用预冷 PBS 洗涤 2 次去除固定剂,然后加入 PI 染液使其终浓度为 50 $\mu g\cdot mL^{-1}$, 37℃ 避光孵育 30 min,过 400 目尼龙筛网后进行流式细胞仪(Beckman Coulter XCL-MCL)检测[21](激发光 488 nm, FL3 检测器测 605 ~ 635 nm 发射光强度), 计数10 000个细胞.

1.2.3 菌体完整、受损和死亡细胞的区分

本研究利用 SYTO9/PI 染料（LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit，Invitrogen）对所收集的细菌细胞进行染色，后利用流式细胞仪分析不同底物条件、不同菲浓度条件下 GY2B 细菌细胞的死亡、受损及活细胞的比例.

在6 000 r·min^{-1}，20℃条件下，离心 10 min 收集 GY2B 菌体，预冷 PBS 洗涤两次后，重悬于 1 mL PBS 中，加入 SYTO9/PI 染液（3 μL，比例为 1∶1），室温下，避光孵育 15 min，过 400 目尼龙筛网后上机检测[22]. 检测激发光为 488 nm，SYTO9 染料为 FL1 检测通道，PI 为 FL3 检测通道，计数10 000个细胞以上.

1.2.4　傅里叶红外光谱检测（Fourier Transform Infrared Spectroscopy，FI-RT）

6 000 r·min^{-1}，20℃条件下，离心 10 min 收集菌体，PBS 缓冲液洗涤 3 次，冷冻干燥 24 h 后进行检测[23]. 检测波段为4 000 ~ 600 cm^{-1}.

1.2.5　菌体表面 Zeta 电位的测定

在6 000 r·min^{-1}，20℃条件下，离心 10 min 收集菌体，用 10 mmol·L^{-1}磷酸盐缓冲溶液洗涤，重悬于缓冲液，振荡使得菌悬液均匀，然后用 Zeta 电位仪（马尔文 NANO ZS90）测定 Zeta 电位的变化；同时检测离心后的上清液 Zeta 电位的变化[24].

2　结果与讨论

2.1　流式检测方法的建立

2.1.1　PI 和流式细胞术结合检测细胞膜方法的建立

碘化丙啶（propidium iodide，PI）作为一种核酸染料，可以进入死亡的细胞与 DNA 或 RNA 结合，但 PI 染料不能进入完整膜结构细胞，因而，研究中常用 PI 染料来区分死亡细胞及活细胞[25]. 但是，Vives-Rego 等[17]进一步研究发现，PI 染色的细胞并不全为死细胞，一些膜通透性改变及膜结构受损的细胞也可以染上 PI 荧光而被检测到. Shi 等[26]的研究也发现，PI 染色的 *Sphingomonas* sp. LB126 菌株，大部分可在琼脂平板上再次生长. 因此，利用 PI 染料这一特性，对降解过程中细胞的膜通透性进行检测，可以了解细胞表面特性的变化.

本实验所用流式细胞仪为 Beckman Coulter XCL-MCL 型，其 PI 染料最佳检测通道为 FL3 通道，其各项检测参数如表 1 所示.

表 1　Beckman Coulter XCL-MCL 流式细胞仪各项检测参数

Table 1　Test parameters of Beckman Coulter XCL-MCL flow cytometer

项目	电压	增益
FSC(log)	55	2.0
SSC(log)	201	2.0
FL3	445	1.0
阈值	40	

实验中，设置未染色细胞为阴性对照及 70% 异丙醇作用 1 h 的 PI 染色细胞为阳性对照，用以区分 PI 染色细胞与未染色细胞，如图 1. 其中图 1(a)为未染色细胞所在位置；图 1(b)为死亡和受损细胞所在位置，此区域设置为 B 门，则实验中，处于 B 门中的细胞即为细胞膜通透性发生变化的细菌细胞.

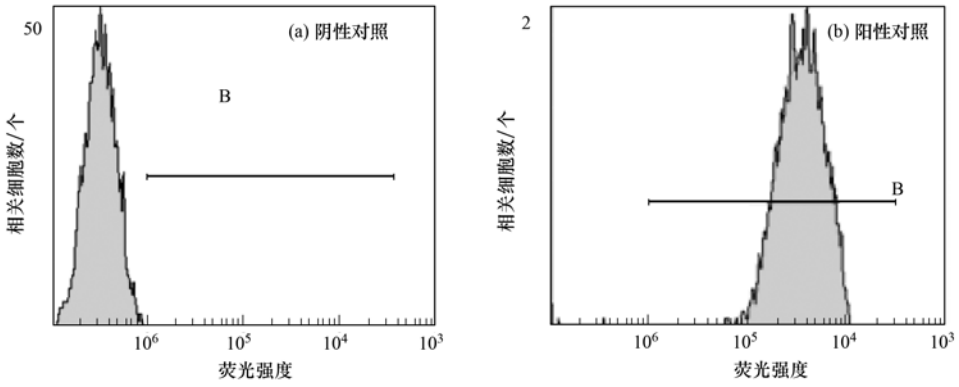


图 1　阴性及阳性对照

Fig. 1　Negative control and positive control

2.1.2　SYTO9/PI 双染法区分死亡、受损及完整的细菌细胞

SYTO9 作为一种绿色荧光核酸染料，其既可对完整膜结构细胞染色同时也可以染色膜受损细胞，通常被用于细菌细胞的计数. 相反，PI 染料则只能进入膜结构受损的细胞，当两者同时存在时，PI 染料会削弱 SYTO9 的荧光强度[27]. 利用两种染料的光谱特征及渗透健康细胞能力的不同，则可区分出死亡、受损及完整的细菌细胞.

本实验中采用 120℃高温作用的 GY2B 细菌细胞

作为 PI 阳性对照,培养至对数期的 GY2B 细菌细胞作为 SYTO9 阳性对照, 未染色的细胞则作为阴性对照. 并依据阳性对照的不同位置,确定出死亡、受损及完整细胞在流式图中所在的位置. 结果如图 2 所示.

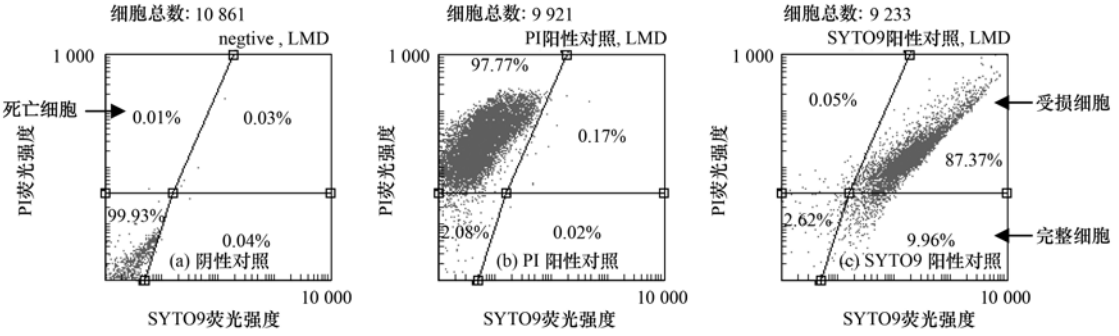


图 2 阴性对照及阳性对照

Fig. 2 Negative control and positive control

2.2 不同菲浓度条件下 GY2B 的生长曲线

利用平板计数法对 1.2、100 及 300 mg·L^{-1}的菲初始浓度条件下 GY2B 菌的生长情况进行检测,结果如图 2 所示. 初始浓度为 100 mg·L^{-1}时, 24 h 后菌密度不再出现明显的变化,进入稳定期; 而在初始浓度为 300 mg·L^{-1}时,菌密度在 36 h 达到了最大, 48 h 后急剧减少,到 72 h 时已经下降了约 2 个数量级. 通常,当细菌不再具有在细菌培养基上长出明显菌落的能力时,即认为细菌细胞已经死亡[28]. 因此,初始浓度为 300 mg·L^{-1}时, 72 h 后细菌开始大量死亡.

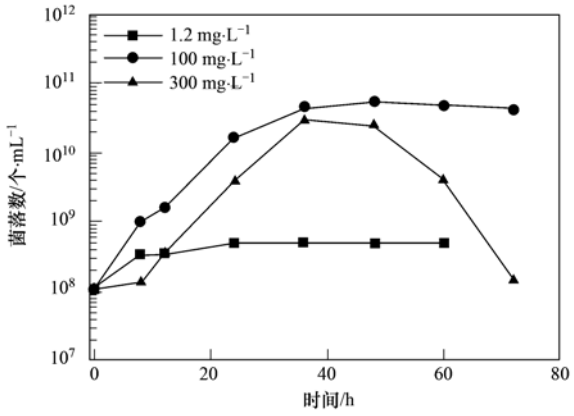


图 3 不同菲初始浓度条件下 GY2B 的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of strain GY2B at different initial phenanthrene concentrations

2.3 不同底物对 GY2B 膜通透性(membrane permeability)的影响

细胞膜的半透性使其在阻止细胞内物质释放到胞外的同时,也阻碍了营养物质的进入,这也导致了生物催化、发酵及生物修复等生物过程的效率的降低,因此,在不同的营养条件下,细菌的细胞膜通透性的变化将会导致不同营养条件下细菌生长情况的不同[29].

本实验检测了营养肉汤(NB)、100 mg·L^{-1}菲和无机盐培养基(MSM,不含碳源)这 3 种底物条件下 GY2B 菌的膜通透性变化. 如图 4 所示,当底物为无机盐培养基时,其细胞膜通透性除了在最初有一定下降,并未发生较大的变化; 而营养肉汤为底物的条件下,其膜受损细胞(PI 染色细胞数)所占比例较 MSM 培养条件及菲培养条件均要高.

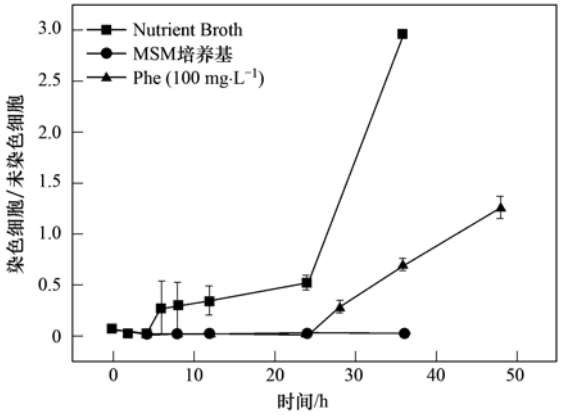


图 4 不同底物培养条件下 GY2B 膜通透性变化

Fig. 4 Changes of GY2B membrane permeability cultivated at different substrates

结合菌株生长曲线(图 5)分析,营养肉汤培养条件下 36 h 时 GY2B 已进入稳定期,至 48 h 后已出现死亡现象. 采用流式细胞仪分析相对应时期的死亡、受损及完整细胞时发现,对数期时,受损细胞的比例即达到 98.15%,到稳定期时,受损细胞所占的比例更增至 98.68%,衰亡期则出现大量的死亡细胞(图 6),这表明随着培养过程的进行, GY2B 细胞的通透性发生明显改变. 进一步采用傅里叶红外光谱对不同时期的细菌细胞表面物质进行检测(图

7)发现,稳定期及衰亡期时可检测到代表核酸分子存在的光谱(1 715 ~ 1 680 cm^{-1}),而代表细胞膜结构的多糖、脂多糖光谱信号 (1 200 ~ 900 cm^{-1})[30] 一直存在. 而根据文献报道, *Pseudomonas putida* 在邻二甲苯的培养条件下,表面的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)及蛋白结构发生改变,导致表面的疏水性及渗透性发生变化[31]. 傅里叶红外光谱检测的结果进一步证明,培养过程中 GY2B 细胞的膜结构依然存在,然而由于细胞膜通透性的改变使得完整性受到破坏,使得核酸分子泄漏,因此在细菌细胞表面可检测到代表核酸分子的官能团.

2.4　不同浓度菲对 GY2B 膜通透性的影响

图8为不同浓度污染物对菌体膜通透性的影响,当菲的浓度为 1.2 mg·L^{-1}及 100 mg·L^{-1}时,随着时间的变化,GY2B 菌的受损细胞所占比例在最初时有一定的下降,但最终其比例均会大于完整细胞,其中染色细胞/未染色细胞的比值分别为 1.11 和 1.95. 而 300 mg·L^{-1}时,在 8 h 染色细胞/未染色细胞的比值升高后又再一次降低,并最终两者间的比值达到 12.44. 对比生长曲线(图 3),发现菲初始浓度为 300 mg·L^{-1}时,36 h 后菌密度大幅度下降,而菲初始浓度为 1.2 mg·L^{-1}和 100 mg·L^{-1}的条件下,其分别在 8 h 及 24 h 后进入稳定期. 但图 8 的结果显示,随着微生物的生长过程的进行,PI 染色的

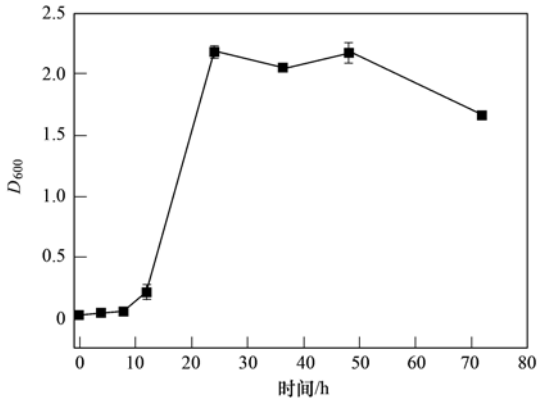


图 5　营养肉汤培养条件下 GY2B 生长曲线的变化

Fig. 5　Growth curves of strain GY2B cultivated at the condition of nutrient broth

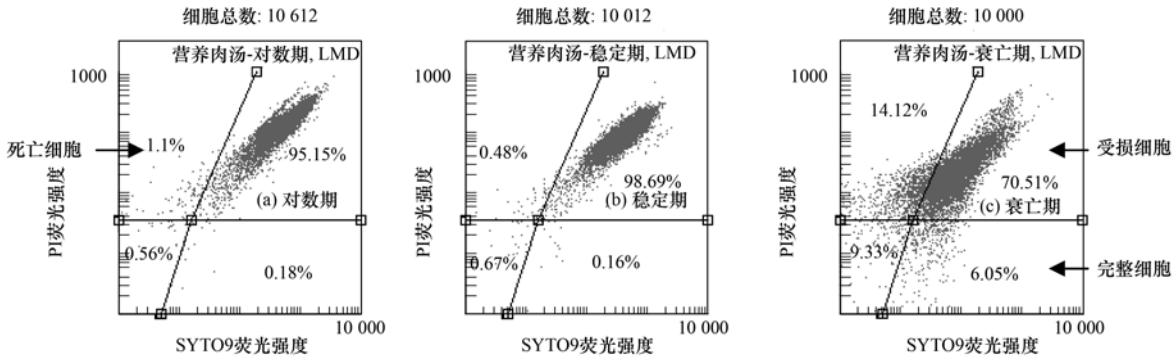
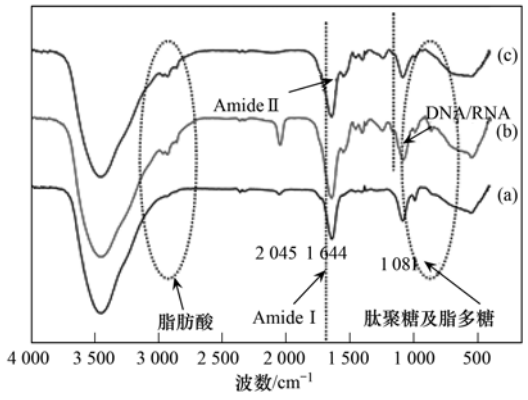


图 6　营养肉汤培养条件下不同时期的死亡、受损及完整细胞比例

Fig. 6　Proportion of death, damage and intact cell during different growth periods of GY2B cultivated under nutrient broth condition



(a)对数期; (b)稳定期; (c)衰亡期

图 7　营养肉汤条件下不同时期的傅里叶红外光谱检测

Fig. 7　Results of Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy detection of different growth periods of GY2B cultivated under nutrient broth condition

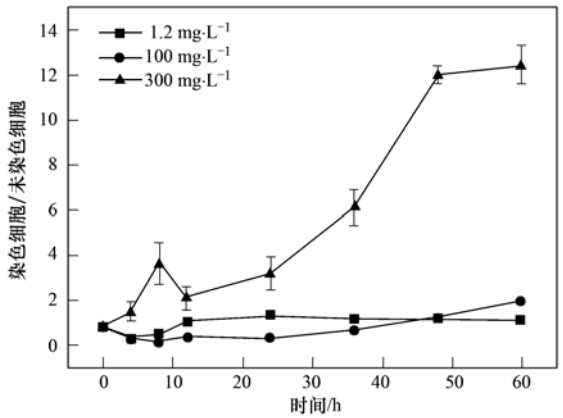


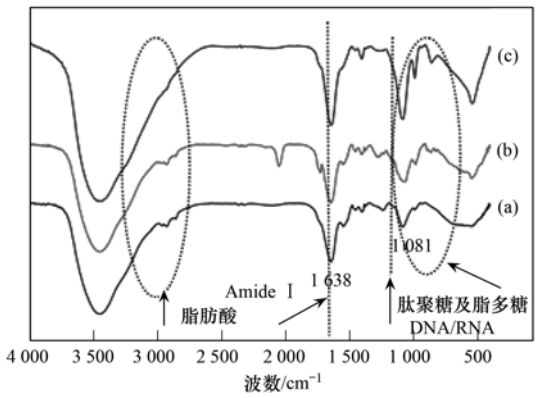
图 8　不同浓度菲对 GY2B 菌膜通透性的影响

Fig. 8　Effects of different phenanthrene concentrations on membrane permeability of GY2B

GY2B 菌细胞所占的比例在不断增加. 则可推测:随着降解过程的进行,污染物菲对 GY2B 细菌细胞的表面结构产生了影响,尤其是对细胞膜结构产生了破坏作用,导致膜通透性的增大,从而使得受损细胞所占的比例增大.

通过对 100 mg·L^{-1}、300 mg·L^{-1}菲初始浓度条件下的 GY2B 细菌细胞的红外检测(图 9 和图 10),发现随着降解的进行,100 mg·L^{-1}浓度条件下与营养肉汤培养条件下相似. 此外,通过对不同时期的死亡、受损及完整细胞比例检测发现,随着降解的进行,膜受损细胞比例不断增大,在 24 h 即有 90.62% 的受损细胞,这进一步说明主要为膜通透性的增大,促使菲进入细菌细胞内而被降解.

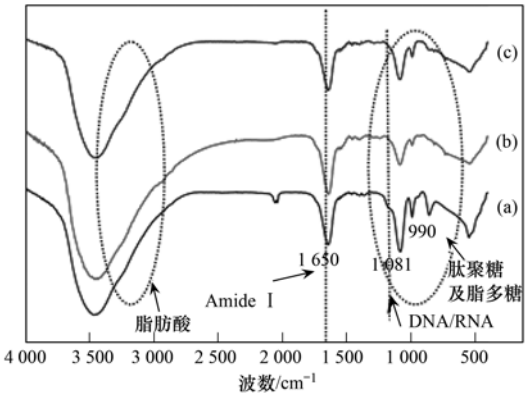
在 300 mg·L^{-1}浓度条件下, 48 h 时即出现了大量的死亡细胞(图 11),其比例约为 54.96%,这使得大量的 GY2B 细胞染上 PI 染料. 此外,红外光谱



(a)对数期; (b)稳定期; (c)衰亡期

图 9 100 mg·L^{-1}菲初始浓度条件下不同时期的傅里叶红外光谱检测

Fig. 9 Results of Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy detection of different growth periods of GY2B cultivated under 100 mg·L^{-1} phenanthrene



(a)对数期; (b)稳定期; (c)衰亡期

图 10 300 mg·L^{-1}菲初始浓度条件下不同时期的傅里叶红外光谱检测

Fig. 10 Results of Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy detection of different growth periods of GY2B cultivated under 300 mg·L^{-1} phenanthrene

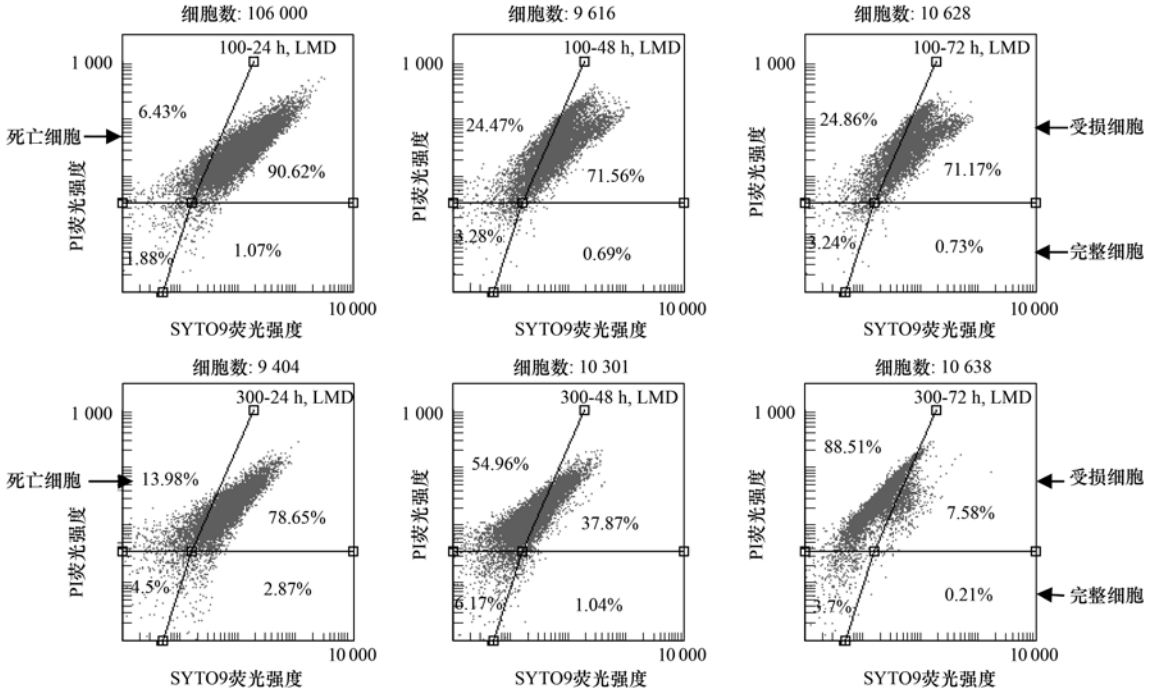


图 11 100 mg·L^{-1}和 300 mg·L^{-1}菲初始浓度条件不同时期的死亡、受损及完整细胞比例

Fig. 11 Proportion of death, damage and intact cell during different growth periods of GY2B cultivated under 100 mg·L^{-1} and 300 mg·L^{-1} phenanthrene

的检测显示，随着降解过程的进行，代表肽聚糖、脂多糖及磷酸分子结构的光谱区域（1 200 ~ 900 cm^{-1}）[30]的峰型发生变化，而在此浓度条件下并未检测到代表 DNA/RNA、脂肪酸及 Amide Ⅱ 的峰型，由此推断高浓度条件下，细胞膜结构的磷酸分子骨架、脂肪酸及蛋白等发生改变，细胞膜的结构受到破坏，出现细胞溶解现象[8]，陈烁娜等[32]在研究苯并[a]芘-铜对嗜麦芽窄食单胞菌细胞表面特性变化时也发现高浓度 BaP 单独存在时，使细胞表面形成孔洞导致细胞膜通透性瞬间增大. 而此时的检测结果也进一步验证高浓度的菲会使细胞表面形成孔洞导致细胞膜透性瞬间增大这一推论.

2.5　不同浓度污染物对 GY2B 菌表面 Zeta 电位的影响

降解过程中，污染物与细菌细胞的相互作用会改变细菌细胞表面的电荷，Zeta 电荷越低越不利于黏附，通过测定细菌的 Zeta 电位值可判断细菌表面所带电荷量的变化，了解污染物与细菌之间的相互作用，进一步了解菲对 GY2B 的表面结构的影响.

图 12 是不同浓度菲条件下菌体表面 Zeta 电位随时间的变化情况，在菲初始浓度为 1.2 $mg·L^{-1}$的条件下，随着降解的进行，GY2B 的 Zeta 电位先有一定的增高，并在 12 h 时达到最大值，此时 疏水性有机物菲与 GY2B 细胞表面最大程度黏附，48 h 后其表面所带负电荷减少，Zeta 电位值为 -5 mV. 其原因可能是：菲的毒性作用使得革兰氏阴性菌细胞膜结构被破坏，大量水分子及亲水性物质更易进入细胞内，使细菌细胞的体积和质量都增大，导致细胞电泳速度减小，从而出现了 Zeta 电位增大的现象[34]. 根据膜通透性实验也发现 48 h 时膜结构受损细胞（PI 染色细胞）的比例明显上升，进一步说明在降解过程中污染物处对细胞膜结构产生影响.

此外，从图 12 中还可以发现，初始浓度为 100 $mg·L^{-1}$和 300 $mg·L^{-1}$培养条件，其 Zeta 电位分别在 24 h 和 36 h 开始增大，并最终有趋于稳定的趋势. 实验中 Zeta 电位的降低，可能是由于菲不断地累积于脂质双层导致 GY2B 菌细胞膜肿胀[33]，使 100 $mg·L^{-1}$菲初始浓度条件下表面电势由 -9.345 mV 降低到 -16.8 mV，300 $mg·L^{-1}$条件下表面电势由 -5.73 mV 降低到 -20.3 mV，并且初始菲浓度越大，其表面电势减少的数值越大. Sikkemat 等[34]在环烃类有机物对大肠杆菌（*Escherichia coli*）膜结构作用的研究中就曾发现，亲脂性有机物会累积于脂质双层导致细胞膜肿胀，这使得 pH 及表面电势降低，其中表面电势由 -54 mV 降低到 -60 mV，使质子渗透率增大.

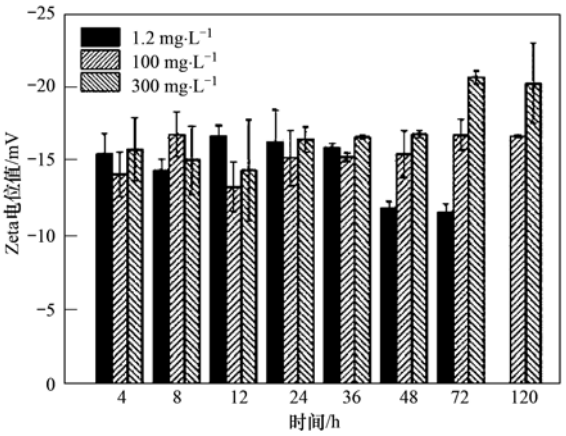


图 12　不同浓度菲条件下菌体表面 Zeta 电位随时间的变化

Fig. 12　Changes of cell-surface Zeta potential at different concentrations of phenanthrene

3　结论

（1）在 GY2B 降解污染物菲的过程中，随着降解过程的进行，PI 染色的细菌细胞增多，表明细胞膜通透性不断增大，膜结构受到一定的破坏.

（2）不同底物会对 GY2B 菌的细胞膜的通透性产生影响. 其中细菌细胞膜通透性在营养肉汤培养条件下较 MSM 及 100 $mg·L^{-1}$菲为碳源条件下要大.

（3）不同菲浓度条件下 GY2B 菌的细胞膜变化结果表明：随着降解的进行，GY2B 细胞的膜通透性均有所增加，利用傅里叶红外光谱及 Zeta 电位的检测也说明了细菌细胞表面渗透性发生了变化. 在一定程度上，这有利于 GY2B 菌对菲的降解. 但随着污染物浓度的升高，菲对降解菌的膜通透性的作用越大，且高浓度菲会使 GY2B 细胞膜瞬间产生孔结构，膜完整性受到严重破坏，造成 GY2B 细菌细胞大量溶解及死亡.

参考文献：

[1] Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon: a review[J]. Biodegradation, 1992, (8): 351-368.

[2] Nam J J, Song B H, Eom K C, *et al*. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea[J]. Chemosphere, 2003, **50**(10): 1281-1289.

[3] Halsall C J, Barrie L A, Fellin P, *et al*. Spatial and temporal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the arctic atmosphere[J]. Environmental Science and Technology, 1997, **31**(12): 3593-3599.

[4] Timmis K N, Steffan R J, Unterman R. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes[J]. Annual Review of Microbiology, 1994, **48**(1): 525-557.

[5] Czechowska K, Van der Meer J R. A flow cytometry based oligotrophic pollutant exposure test to detect bacterial growth inhibition and cell injury [J]. Environmental Science and Technology, 2011, **45**(13): 5820-5827.

[6] 刘晔, 牟伯中, 刘洪来. 烃的微生物摄取机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, **32**(2): 109-113.

[7] Saxon E, Carolyn R B. Cell surface engineering by a modified staudinger reaction [J]. Science, 2000, **287** (5460): 2007-2010.

[8] Ramos J L, Gallegos M T, Marqués S, *et al*. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors [J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, **4**(2): 166-171.

[9] Baumgarten T, Vazquez J, Bastisch C, *et al*. Alkanols and chlorophenols cause different physiological adaptive responses on the level of cell surface properties and membrane vesicle formation in *Pseudomonas putida* DOT-T1E [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, **93**(2): 837-845.

[10] Wick L Y, De Munia A, Springale D, *et al*. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, **58**(3): 378-385.

[11] Kato M, Hayashi R, Tsuda T, *et al*. High pressure-induced changes of biological membrane [J]. European Journal of Biochemistry, 2002, **269**(1): 110-118.

[12] 姚春艳, 刘美凤, 付瑞东, 等. 加压 CO_2 对大肠杆菌细胞膜的损伤作用[J]. 微生物学通报, 2013, **40**(2): 256-265.

[13] Schmid I, Uittenbogaart C H, Giorgi J V. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry[J]. Cytometry, 1994, **15**(1): 12-20.

[14] Alcon A, Santos V E, Casas J A, *et al*. Use of flow cytometry for growth structured kinetic model development: application to *Candida bombicola* growth [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, **34**(5): 399-406.

[15] Gray D R, Yue S, Chueng C Y, *et al*. Bacterial vitality detected by a novel fluorogenic redox dye using flow cytometry[EB/OL]. https://zh. invitrogen. com/etc/medialib/en/filelibrary/cell _ tissue _ analysis/pdfs. Par. 62303. File. tmp/RedoxSensor% 20Green% 20poster. pdf. html, 2005-6-9.

[16] Baatout S, Leys N, Hendrickx L, *et al*. Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research[J]. Acta Astronautica, 2007, **60**(4-7): 451-459.

[17] Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-Von C G. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, **24**(4): 429-448.

[18] Verthé K, Verstraete W. Use of flow cytometry for analysis of phage-mediated killing of *Enterobacter aerogenes*[J]. Research in Microbiology, 2006, **157**(7): 613-618.

[19] Tao X Q, Lu G N, Dang Z, *et al*. Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and characterization of phenanthrene metabolites [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, **23**(5): 647-654.

[20] Tao X Q, Lu G N, Dang Z, *et al*. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils [J]. Process Biochemistry, 2007, **42**(3): 401-408.

[21] Muller S, Nebe-Von-Caron G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, **34**(4): 554-587.

[22] Soejima T, Iida K, Takashi S, *et al*. Discrimination of live, anti-tuberculosis agent-injured, and dead *Mycobacterium tuberculosis* using flow cytometry[J]. Federation of European Microbiological Societies, 2009, **294**(1): 74-81.

[23] Al-Qadiri H M, Lin M, Al-Holy M A, *et al*. Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype typhimurium and *Listeria monocytogenes* using fourier transform infrared(FT-IR) spectroscopy(4 000 to 600 cm^{-1})[J]. Journal of Food Science, 2008, **73**(2): 54-61.

[24] Abbasnezhad H, Gray M R, Foght J M. Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudamonas fluorescens* LP6a, to an oil water interface [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, **62** (1): 36-41.

[25] Berney M, Hammes F, Bosshard F, *et al*. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73** (10): 3283-3290.

[26] Shi L, Günther S, Hübschmann T, *et al*. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria[J]. Cytometry Part A, 2007, **71A**(8): 592-598.

[27] Nocker A, Richter-Heitmann T, Montijn R, *et al*. Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing [J]. International Microbiology, 2010, **13**: 59-65.

[28] Hewitt C J, Nebe-Von-Caron G. The application of multi-Parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state [J]. Advanced Biochemical Engineering Biotechnology, 2004, **89**: 197-223.

[29] Kell D B, Ryder H M, Kaprelyants A S, *et al*. Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacterial cultures[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1991, **60**(3-4): 145-158.

[30] Lin M S, Al-Holy M, Al-Qadiri H, *et al*. Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, **52** (19): 5769-5772.

[31] Pinkart H C, Wolfram J W, Rogers R, *et al*. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to o-xylene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(3): 1129-1132.

[32] 陈烁娜, 尹华, 叶锦韶, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌处理苯并[a]芘-铜复合污染过程中细胞表面特性的变化[J]. 化工学报, 2012, **63**(5): 1592-1597.

[33] LaPolla R J, Haron J A, Kelly C G, *et al*. Sequence and structural analysis of surface protein antigen Ⅰ / Ⅱ (SpaA) of Streptococcus sobrinus[J]. Infection and Immunity, 1991, **59** (8): 2677-2685.

[34] Sikkemat J, De Bont J A M, Poolman B, *et al*. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membrane [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, **269**(11): 8022-8028.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 35 No. 4

Apr. 15, 2014

CONTENTS

Analysis of Characteristics of Black Carbon Concentration in Shanghai from 2008 to 2012 ····· WANG Hong-qiang, HE Qian-shan, CHEN Yong-hang, *et al.* (1215)

Chemical Characteristics and Insoluble Particulates' Surface Morphology of a Snowfall Process in the Southeastern Suburb of Urumqi ····· LU Hui, WEI Wen-shou, CUI Cai-xia, *et al.* (1223)

Comparative Study of the Level and Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers and New Brominated Flame Retardants in the Atmosphere of Typical Urban ····· WU Hui, JIN Jun, WANG Ying, *et al.* (1230)

Source and Health Risk Assessment of Heavy Metals in Ambient Air PM_{10} from One Coking Plant ····· DONG Ting, LI Tian-xin, ZHAO Xiu-ge, *et al.* (1238)

Estimation of Average Traffic Emission Factor Based on Synchronized Incremental Traffic Flow and Air Pollutant Concentration ····· LI Run-kui, ZHAO Tong, LI Zhi-peng, *et al.* (1245)

Study on Critical Loads of Sulfur and Nitrogen in the Pearl River Delta ····· SUN Cheng-ling, XIE Shao-dong (1250)

Hydrogen Sulfide Removal by the Combination of Non-Thermal Plasma and Biological Process ····· LI Hua-qin, HE Jue-cong, CHEN Zhou-yang, *et al.* (1256)

Spatial Distribution and Risk Assessment of Atrazine in Taizi River Basin, China ····· ZHENG Lei, ZHANG Yi-zhang, ZHANG Yuan, *et al.* (1263)

Development of a Method for Measuring Dissolved Reactive Phosphorus (DRP) and Dissolved Ferrous Iron in Large Batch in Pore Water Samples of Sediments with Micro-volumes ····· WANG Yan, ZHU Chun-gang, XU Di, *et al.* (1271)

Temporal and Spatial Variation of Water Nutrient Level After Exogenous Nutrient Input ····· FU Ling, ZHAO Kai, WANG Guo-xiang, *et al.* (1278)

Physical Process Based Risk Assessment of Groundwater Pollution in the Mining Area ····· SUN Fa-sheng, CHENG Pin, ZHANG Bo (1285)

Hydrogeochemical Characteristics of a Typical Karst Groundwater System in Chongqing ····· YANG Ping-heng, LU Bing-qing, HE Qiu-fang, *et al.* (1290)

Investigation of Nitrogen, Phosphorus and Microbial Contamination in Laolongdong Underground River System of Chongqing ····· LAN Jia-cheng, YANG Ping-heng, REN Kun, *et al.* (1297)

Effects on Phosphorus Fraction Distribution in Sediment by Roots of *Vallisneria natans* ····· LI Zhen-guo, WANG Guo-xiang, ZHANG Jia, *et al.* (1304)

Modeling Nitrogen Transformation in a Novel Circular-Flow Corridor Wetland ····· PENG Jian-feng, SONG Yong-hui, YUAN Peng, *et al.* (1311)

Natural Attenuation of Tetracycline in the Water of Taihu Lake Under Different Environmental Conditions ····· DUAN Lun-chao, WANG Feng-he, JI Ying-xue, *et al.* (1318)

Inactivation and Reactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria During and After UV Disinfection in Reclaimed Water ····· HUANG Jing-jing, TANG Fang, XI Jin-ying, *et al.* (1326)

Photoreactivation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in the Secondary Effluent Disinfected by UV-TiO_2 ····· WANG Xi-feng, GONG Xin, HU Xiao-lian, *et al.* (1332)

Stability of C_{60} Nanoparticles in Aquatic Systems ····· FANG Hua, SHEN Bing-bing, JING Jie, *et al.* (1337)

Fouling Behavior of Sodium Alginate During Microfiltration at Various Ionic Compositions: XDLVO Approach ····· ZHAO Ying-xu, ZONG Rui-qiang, GAO Xin-yu, *et al.* (1343)

Enhanced Remediation of 4-Chloronitrobenzene Contaminated Groundwater with Nanoscale Zero-valence Iron (nZVI) Catalyzed Hydrogen Peroxide (H_2O_2) ····· FU Rong-bing (1351)

Effect of the Coexistence of Chlorobenzene Homologue on Anaerobic Degradation of Hexachlorobenzene ····· WANG Qi, LIU Hui, JIANG Lin, *et al.* (1358)

Research on Removal Efficiency of Cd(Ⅱ)-bearing Wastewater by Sulfate-reducing Biological Filter ····· WU Xuan, TAN Ke-yan, HU Xi-jia, *et al.* (1366)

Control Strategies of Nitrogen Removal Process in a Pilot Test of the Southern WWTP Based on the Nitrogen Balance ····· JIANG Ying-he, LIU Pei-ju, WANG Lei, *et al.* (1372)

Effect of Simulated Inorganic Anion Leaching Solution of Electroplating Sludge on the Bioactivity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ····· CHEN Yan, HUANG Fang, XIE Xin-yuan (1377)

Microbial Reduction of Cu^{2+} Mediated by Electroactive Biofilms ····· LIU Yi, ZHOU Shun-gui, YUAN Yong, *et al.* (1384)

Copper Recovery from Artificial Bioleaching Lixivium of Waste Printed Circuit Boards ····· CHENG Dan, ZHU Neng-wu, WU Ping-xiao, *et al.* (1391)

Difference of Contaminant Composition Between Landfill Leachates and Groundwater and Its Reasons ····· HE Xiao-song, YU Hong, XI Bei-dou, *et al.* (1399)

Photochemical Degradation of Landfill Leachate Facilitated by Combined Schwertmannite and H_2O_2 ····· WANG He-ru, SONG Yong-wei, XU Zhi-hui, *et al.* (1407)

Effects of Operating Parameters on Organic Toxicity of Sludge Treating Synthetic Bisphenol A Wastewater ····· YANG Na, CHEN Xiu-rong, LIN Feng-kai, *et al.* (1414)

Comparative Study on Biological Methane Potential and Methanogen Biodiversity in the Anaerobic Digestion of Excess Sludge ····· DONG Hui-yu, JI Min (1421)

Isolation and Identification of Mn Oxidizing Bacterium *Aminobacter* sp. H1 and Its Oxidation Mechanism ····· YAN Ping, JIANG Li-ying, CHEN Jian-meng, *et al.* (1428)

Nitrate Removal by a Strain of Nitrate-Dependent Fe(Ⅱ)-Oxidizing Bacteria ····· WANG Hong-yu, YANG Kai, ZHANG Qian, *et al.* (1437)

Study on the Iopromide-Degrading Characteristics of Strain *Pseudomonas* sp. I-24 via Co-Metabolism ····· XU Bing-jie, GAO Pin, XUE Gang, *et al.* (1443)

Using Flow Cytometry to Explore the Changes of *Sphingomonas* sp. GY2B Bacterial Surface Characteristics in the Process of Degrading Phenanthrene ····· ZHANG Meng-lu, DANG Zhi, WU Feng-ji, *et al.* (1449)

Research on Characteristic of Interrelationship Between Toxic Organic Compound BPA and *Chlorella vulgaris* ····· CHEN Shan-jia, CHEN Xiu-rong, YAN Long, *et al.* (1457)

Effect of Magnesium Deficiency on Photosynthetic Physiology and Triacylglyceride(TAG) Accumulation of *Chlorella vulgaris* ····· WANG Shan, ZHAO Shu-xin, WEI Chang-long, *et al.* (1462)

Effects of Microcystins on Growth and Antioxidant System of Rice Roots ····· WANG Wei-min, DENG Yu, ZOU Hua, *et al.* (1468)

Responses of Soybean Cultivar Dongsheng-1 to Different O_3 Concentrations in Northeast China ····· ZHANG Wei-wei, WANG Guang-hua, WANG Mei-yu, *et al.* (1473)

Development and Succession of Biological Soil Crusts and the Changes of Microbial Biomasses ····· WU Li, ZHANG Gao-ke, CHEN Xiao-guo, *et al.* (1479)

Effects of Lead on the Growth and Reproduction of *Eisenia fetida* with Aged Soils ····· CHEN Li-hong, LIU Zheng-tao, FANG Zheng, *et al.* (1486)

Soil Heavy Metal Cadmium Standard Limit and Range of Background Value Research ····· ZHAO Xiao-jun, LU Si-jin, XU Ren-ji, *et al.* (1491)

Study on Soil Element Background Values of the Hoh Xil Area in North Tibet ····· BAI Jian-kun, WANG Jian-li, LI Chao-liu, *et al.* (1498)

Transfer Characteristic and Source Identification of Soil Heavy Metals from Water-Level-Fluctuating Zone Along Xiangxi River, Three-Gorges Reservoir Area ····· XU Tao, WANG Fei, GUO Qiang, *et al.* (1502)

Heavy Metal Pollution Characteristics and Ecological Risk Analysis for Soil Around Haining Electroplating Industrial Park ····· LI Jiong-hui, WENG Shan, FANG Jing, *et al.* (1509)

Sources and Spatial Distribution of Typical Heavy Metal Pollutants in Soils in Xihu Scenic Area ····· ZHANG Hai-zhen, TANG Yu-li, LU Jun, *et al.* (1516)

Distribution and Assessment of Mercury in the Ambient Soil of a Municipal Solid Waste Incinerator ····· XIE Hui-ting, ZHANG Cheng-zhong, XU Feng, *et al.* (1523)

Phosphorus Adsorption Characteristics of Soils and Sediments Surrounding Dishui Lake in Shanghai ····· ZHUGE Xiang-zhen, BI Chun-juan, CHEN Zhen-lou, *et al.* (1531)

Impact of SDBS/Na^+ on Red Soil Colloidal Stability ····· TANG Ying, LI Hang, ZHU Hua-ling, *et al.* (1540)

Effects of Stabilization Treatment on Migration and Transformation of Heavy Metals in Mineral Waste Residues ····· ZHAO Shu-hua, CHEN Zhi-liang, ZHANG Tai-ping, *et al.* (1548)

Study on a New Method of Fast Monitoring Toxicity of Cd^{2+} by Algal in Water ····· DUAN Jing-bo, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun, *et al.* (1555)

Immunosensor for Rapid Detection of 1,3-Dinitrobenzene ····· LONG Feng, SHI Han-chang, WANG Hong-chen, *et al.* (1561)

Mg/Al Layered Double Hydroxides Prepared by Microwave-Assisted Co-Precipitation Method for the Removal of Bromate ····· ZHONG Qiong, LI Huan (1566)

Discussion on Several Key Points of Decision Support System for Remediation of Contaminated Sites ····· LIAO Xiao-yong, TAO Huan, YAN Xiu-lan, *et al.* (1576)

A Review of Multi-Scale Studies on Spatial Variation of the Lead (Pb) Concentration in Urban Soils ····· YANG Meng, LI Feng-ying, DIAO Yi-wei, *et al.* (1586)

Review on Characteristics and Detecting Assay of Bacterial Endotoxin Contamination in Water Environment ····· ZHANG Can, LIU Wen-jun, ZHANG Ming-lu, *et al.* (1597)

Advances in Molecular Mechanism of Bacterial Reduction of Hexavalent Chromium ····· LI Dou, ZHAO You-cai, SONG Li-yan, *et al.* (1602)

Anaerobic Membrane Bioreactors for Treating Agricultural and Food Processing Wastewater at High Strength ····· WEI Yuan-song, YU Da-wei, CAO Lei (1613)

《环境科学》第 6 届编辑委员会

环 境 科 学

（HUANJING KEXUE）

（月刊　1976 年 8 月创刊）

2014 年 4 月 15 日　35 卷　第 4 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 35　No. 4　Apr. 15, 2014

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