

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



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, 崔晓勇, 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, 范嫻, 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 (<i>Vallisneria spiralis</i>) 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, 王凤贺, 纪莹雪, 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, 席劲璇, 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, 任伯帆 (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, 顾远, 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 ₂ O 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多样性的比较研究	董慧岭, 季民 (1421)
锰氧化菌 <i>Aminobacter</i> 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, 蒋铁锋 (1428)
1 株铁基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 <i>Pseudomonas</i> sp. I-24 共代谢降解性能研究	徐冰洁, 高品, 薛翌, 何梦琦, 吴凡 (1443)
利用流式细胞术研究鞘氨醇单胞菌 GY2B 降解非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	王妮敏, 邓琦, 邹华, 梁婢娟 (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, 刘晚冰, 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, 李伯苓, 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, 赵赞, 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)	

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

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032)

摘要: 从某水厂的生物除锰滤池中分离出 1 株新的高效锰氧化菌, 命名为 H1。通过生理生化及 16S rDNA 序列对比分析鉴定为氨基杆菌(*Aminobacter* sp.), 国内外未曾有对该菌株具有锰氧化能力的相关报道。本文对 *Aminobacter* sp. H1 的微生物特性、锰氧化机制及生成的生物氧化锰的性质进行了研究。结果表明, *Aminobacter* sp. H1 的锰耐受浓度高达 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可完全去除浓度低于 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Mn}(\text{II})$ 。菌株 H1 对 $\text{Mn}(\text{II})$ 的氧化主要是通过产生锰氧化活性因子和碱性代谢产物提高 pH 两个因素共同作用的结果, 活性因子细胞内合成后分泌到细胞外起作用。氧化过程中发现有 $\text{Mn}(\text{III})$ 中间体出现, XRD、XPS、SEM-EDX 等分析菌株 H1 介导生成的生物氧化锰发现, 生物氧化锰与菌体结合紧密, 弱结晶、无固定形态, 成分主要为 MnCO_3 、 MnOOH 、 Mn_3O_4 和 MnO_2 等。

关键词: 锰氧化细菌; 氧化机制; 生物氧化锰; 锰氧化活性因子; $\text{Mn}(\text{III})$

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)04-1428-09 DOI: 10.13227/j.hj.kx.2014.04.032

Isolation and Identification of Mn Oxidizing Bacterium *Aminobacter* sp. H1 and Its Oxidation Mechanism

YAN Ping, JIANG Li-ying, CHEN Jian-meng, HE Zhi-min, XIAO Shao-dan, JIANG Yi-feng

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: A bacterium with high manganese oxidizing activity was isolated from a biological manganese removal filter and named as H1. Based on its characteristics and the analysis of 16S rDNA sequence, the strain H1 belonged to the genus *Aminobacter* sp. and its manganese oxidizing ability had never been reported. In this paper, the microbiologic properties of the strain H1, the manganese oxidation mechanisms and characteristics of biogenic manganese oxides were investigated. The results showed that the maximal tolerant Mn concentration of strain H1 was $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and $\text{Mn}(\text{II})$ could be completely removed by strain H1 when the concentration was lower than $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Strain H1 could oxidize Mn^{2+} by both the production of manganese oxidizing activity factor and alkaline metabolites during growth, which were synthesized in the cell and then secreted into extracellular culture medium. During the oxidation process, the intermediate of soluble $\text{Mn}(\text{III})$ was detected. SEM showed that the biogenic manganese oxides were amorphous and poorly-crystalline, and it closely combined with bacteria. The components of the biogenic manganese oxides produced by strain H1 were identified as MnCO_3 , MnOOH , Mn_3O_4 and MnO_2 by XRD, XPS and SEM-EDX.

Key words: manganese oxidizing bacteria; oxidizing mechanism; biogenic manganese oxides; manganese oxidizing activity factor; $\text{Mn}(\text{III})$

锰在陆地和水生系统中含量丰富, 是生物体不可缺少的微量元素之一^[1,2]。但锰浓度过高, 人体会慢性中毒, 并引发多种脑神经疾病; 生产产品质量受影响, 造成经济损失^[3,4]。自然环境中主要以 $\text{Mn}(\text{II})$ 存在, 可通过氧化生成不溶的锰氧化物矿物。锰氧化是一个高活性成矿阶段, 形成的锰氧化物是环境中已发现的几种天然强氧化剂之一, 在生物地球化学循环中扮演重要角色。由微生物介导的锰氧化过程的氧化速率远远高于非生物氧化, 且在去除环境中锰的同时, 生成的生物氧化锰能氧化自然界中各种有机和无机化合物, 清除重金属及充当无氧呼吸的电子受体, 在重金属及有机物污染环境的治理和修复中具有很高的应用价值^[5~7]。

自然界中许多细菌和真菌都具有锰氧化能力, 且对它们的锰氧化特性的研究报道很多, 特别是对生盘纤发菌 *Leptothrix discophora* SS-1 和 SP-6、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* MnB1 和 GB-1 和芽胞杆菌 *Bacillus* sp. SG-1 等 3 种模式菌株已进行了深入的研究^[8~10]。虽然它们的生物氧化机制没有统一的结论, 但相关研究表明, 多数锰氧化细菌含有锰氧化有关的基因, 通过胞外聚合中的多铜氧化酶或锰

收稿日期: 2013-08-13; 修订日期: 2013-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(211107097); 浙江省自然科学基金项目(Y5110118); 浙江省环保科研计划项目(2011B16)

作者简介: 晏平(1986~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制, E-mail: yanpingdoris@163.com

* 通讯联系人, E-mail: jiangly@zjut.edu.cn

过氧化物酶来催化氧化 $\text{Mn}(\text{II})$ 成为 $\text{Mn}(\text{III/IV})$, 其氧化速率 ($10 \cdot \text{h}^{-1} \sim 10^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) 比化学催化速率 ($10^{-3} \cdot \text{h}^{-1} \sim 10^{-5} \cdot \text{h}^{-1}$) 高 1 000 倍^[11~14]. $\text{Mn}(\text{III})$ 主要以瞬时中间产物存在, 是环境中一种重要的强氧化剂^[15]. 不同细菌氧化锰的机制很复杂, 包括直接氧化和间接氧化, 但深度研究主要都致力于氧化 Mn^{2+} 的胞外酶的作用, 而对微生物介导形成的锰氧化物矿物的关注较少^[13, 16, 17]. 生物形成的氧化锰 (生物氧化锰) 的最初形态为层状锰矿物, 与六边形水钠锰矿类似, 结晶弱, 粒径小, 锰氧化度高, 结构中的有很多八面体空穴和夹层锰原子, 因而比化学氧化锰有更强的吸附和氧化能力^[18~22]. 由于其稳定的化学性质、高的比表面积和良好的吸附氧化性能, 对重金属及有机物在环境中的迁移转化有重要影响, 因而具有重要的环境意义.

本研究从某水厂运行良好的生物除锰滤池中分离 1 株新的高效锰氧化菌, 利用 16S rDNA、Biolog 及系统发育树等手段鉴定表明该菌属于氨基杆菌 (*Aminobacter* sp.), 国内外文献中还未曾有对该菌株具有锰氧化能力的相关报道. 故本研究通过考察该氨基杆菌的微生物特性、锰氧化特性, 同时对其氧化 $\text{Mn}(\text{II})$ 的机制和生成的生物氧化锰的性质特点进行了初步分析, 以期对 $\text{Mn}(\text{II})$ 生物氧化提供新性能菌株, 为锰污染治理提供理论基础. 另外, 也可作为生物氧化锰可能存在的潜在应用能力 (如重金属及有机物污染环境的修复) 提供菌种新来源和基础研究.

1 材料与方法

1.1 菌种及培养条件

污泥取自沈阳开发区某水厂运行稳定的生物除锰滤池的成熟锰砂池, 驯化和试验培养基配方 (PYCM)^[23] 为: 0.8 g 蛋白胨, 0.2 g 酵母粉, 0.2 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g K_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g NaNO_3 , 0.1 g CaCl_2 , 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 1L 超纯水, pH 为 6.8~7.2, 121℃ 湿热灭菌 20 min. 为防止 MnCl_2 在高温灭菌时被氧化, 待已灭菌的无锰培养基冷却至室温后, 再将 MnCl_2 通过 0.22 μm 微孔膜过滤加入. 含铁的 PYCM 培养基在上述培养基加入柠檬酸铁铵 ($1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). 将采集的污泥按 20% (体积比) 的量接种到高锰含铁培养基中, 于 30℃, 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 富集培养, 每 5 d 换一次营养液, 经稀释涂布、平板划线获得纯锰氧化细菌.

1.2 16S rDNA 序列分析及 Biolog 鉴定

收集处于对数生长期菌体, 采用 3S 柱离心式环境样品 DNA 回收试剂盒 V2.2 (上海申能博彩生物科技有限公司) 对细菌总 DNA 进行提取和纯化. 以纯化后的总 DNA 为模板, 选用细菌通用引物 27F/20; 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 和 1492/20; 5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3' 进行 PCR 扩增^[24]. PCR 反应体系 (50 μL): 5 μL 10 × PCR Buffer ($\text{Mg}^{2+} 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 4 μL dNTP Mixture ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 μL 引物 1 BSF27/20 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 μL 引物 2 BSR1492/20 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.25 μL Taq DNA 聚合酶、1 μL DNA 模板, 37.5 μL dd H_2O . 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 30 个循环 (94℃ 变性 60 s, 53℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 120 s), 最终 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保温 10 min. PCR 产物测序工作由上海华大生物技术有限公司完成. 将测序结果与 GenBank 数据库中的基因序列进行比对后, 用 Clustelx (1.81) 对选取的长度 1 400 bp 左右的序列进行同源性分析, 再用 MEGA5 软件采用邻位连接法建立系统发育树, 进行系统学分析, 确定菌株种属情况及其在遗传学上的地位.

在进行 16S rDNA 分析的同时, 运用 Biolog 技术对微生物属名进行验证, 提高菌株鉴定的可靠性. 将待测菌株活化后接入新鲜的 BUG + B 培养基, 30℃ 培养过夜. 用无菌棉签挑取已培养好的菌落接种到浊度管 (选用 IF-A 接种液) 中, 调整浊度后再用排枪接种到 Biolog 碳源板 (选用 GN-III), 于 30℃ 恒温培养. 分别在培养 4~6 h、16~24 h 后用 Biolog 鉴定仪读取相应的数据, 得到菌株鉴定结果. BUG + B 培养基配置如下: 250 mL 锥形瓶中加入 95 mL 超纯水, 5.7 g BUG 琼脂培养基, 煮沸溶解后 (冷却后 pH 一般为 7.3 ± 0.1), 121℃ 灭菌 15 min, 冷却至 45~50℃ 后, 加 5 mL 新鲜的脱纤羊血.

1.3 菌株生理生化、生长特性及 $\text{Mn}(\text{II})$ 耐受性研究

生理生化实验参照文献^[25].

将菌悬液 ($D_{600} = 0.1$) 按 1% 量 (体积比) 接种于有锰 ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PYCM 培养基中, 于 30℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、pH 为 6.8~7.2 条件下培养, 相隔一定时间取样用分光光度计测 D_{600} , 绘制生长曲线. 同时测定培养液中 pH 变化并用 LBB 指示剂法测定生物氧化锰的生成量^[23].

锰耐受性实验培养基 Mn^{2+} 初始浓度分别为: 0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在上述同样条件培养, 于 60 h 和 5 d 取样, 分别测 D_{600} 、生物氧化锰生成量和锰离子剩

余量。

考察有锰($1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的PYCM培养基中各形态锰在不同阶段的含量变化,实验中不同形态锰的测定方法:①取 5 mL 菌悬液,于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件下离心 10 min ,上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后原子吸收法测锰,为培养基中剩余的 Mn(II) 浓度;②离心后的菌体用等体积的 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CuSO}_4$ 溶液复溶,振荡反应过夜,待吸附的 Mn^{2+} 彻底被 Cu^{2+} 置换出后,于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件下离心 10 min ,上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后原子吸收法测锰,为被吸附的 Mn(II) 浓度;③再将离心后沉淀用等体积的 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸羟胺处理 10 h 以上,将高价态的锰氧化物还原成 Mn^{2+} ,于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件下离心 10 min ,上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后原子吸收法测溶液中 Mn^{2+} ,为被生物氧化成生物氧化锰的 Mn(II) 浓度。

1.4 菌株对 Mn(II) 氧化的条件优化

将菌悬液($D_{600}=0.1$)按 1% 量(体积比)接种于PYCM培养基中,转速为 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在考察最适温度实验中,培养基 pH 为 7.0 , Mn^{2+} 浓度为 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,控制不同培养温度(10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 45°C);在探究最适 pH 实验中,温度为 30°C , Mn^{2+} 浓度为 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,控制不同 pH 值(4.0 、 5.0 、 6.0 、 7.0 、 8.0 、 9.0 、 10.0);在探究最适含铁量实验中,培养基 pH 为 7.0 ,温度为 30°C , Mn^{2+} 浓度为 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,控制不同铁浓度(0 、 0.25 、 0.5 、 0.75 、 1.0 、 1.25 、 1.5 、 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。以上实验中菌体培养 60 h 后取样测 D_{600} ,培养 5 d 后取样经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后原子吸收法测锰离子浓度,计算锰氧化率,分析确定最适温度、 pH 、含铁量(3次平行实验)。

1.5 菌株氧化 Mn(II) 过程中 Mn(III) 的捕捉

在生成的高价生物氧化锰中或其生成的过程中,氧化活性很高的 Mn(III) 中间体可能存在并起到重要作用。 Mn(III) 能与有机酸络合,这些络合物再从酶的活性部位扩散开来,成为一类重要的氧化剂。由于 Mn(III) 能与焦磷酸钠形成稳定的络合物,且该络合物在 480 nm 处有最大吸收峰,本实验用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 焦磷酸钠作为捕捉剂对氧化过程中可能存在的 Mn(III) 进行捕捉^[26]。将菌悬液按 1% 量(体积比)接种于含铁的高锰($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)PYCM培养基中,在 pH 为 7.0 、温度为 30°C 和转速为 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下培养 5 d 后,加入焦磷酸钠($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),反应 4 h 后经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,用分

光光度法于波长 480 nm 处检测 Mn(III) -焦磷酸钠络合物的情况。

1.6 锰氧化活性因子分布定位

将菌株接种于有锰($1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和无锰两种加铁PYCM培养基中, 30°C 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 3 d ,获得培养液。①将培养液于 4°C 、 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,弃去沉淀物,获得上清液;②将培养液于 4°C 、 $2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min ,弃去沉淀物,上清液于 4°C 、 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,收集菌体沉淀。菌体用 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次,除去菌体表面粘附物,再用 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液制成菌悬液;③取少量上述所得菌悬液,用超声波处理使细胞破裂,再 $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,弃沉淀,获得细胞裂解液(注:有锰的菌体记为YJ,有锰上清液记为YS,有锰菌液记为YP,有锰裂解液YL,无锰菌体WJ,无锰上清液WS,无锰菌液WP,无锰裂解液WL,空白记为KB)。将 $500\text{ }\mu\text{L}$ $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MnCl}_2$ 母液分别加入上述培养物中,于 30°C 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床反应 2 h ,测定锰氧化率。

1.7 生物氧化锰SEM-EDX、XRD、XPS分析

将含生物氧化锰的菌悬液 $2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min ,弃沉淀,上清液(含有吸附生物氧化锰的菌体)于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 10 min ,沉淀于 2.5% 戊二醛溶液中 4°C 固定过夜,然后经预处理,采用Philip XL-30-ESEM(EDX)环境扫描电镜对细菌表面的生物氧化锰进行表征。

将含生物氧化锰的菌悬液 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 10 min ,收集含生物氧化锰沉淀,用无菌水洗涤 3 遍后低温(-50°C)冷冻干燥,粉末压片处理后,采用X'Pert Pro高分辨多晶X射线衍射仪($\text{CuK}\alpha$ 源、 $\lambda=0.154\text{ nm}$ 、Ni滤波)对样品进行X射线衍射(XRD)测试。管电流为 40 mA ,管电压为 40 kV ,扫描速度为 $4^\circ\cdot\text{min}^{-1}$, 2θ 扫描范围 $10^\circ\sim 80^\circ$ 。

同时对上述冷冻干燥粉末进行X射线光电子能谱(XPS)分析。X射线光电子能谱仪条件为:双阳极 Al/Mg 靶X射线源及单色化 Al 靶X射线源,最大功率 450 W ,样品分析室最小压强小于 $3\times 10^{-10}\text{ Torr}$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离、鉴定

从用锰定向驯化的活性污泥中,经初筛、复筛、分离纯化获得 1 株锰氧化菌株,命名为H1。通过透射电镜观察和革兰氏染色发现H1呈无芽胞短杆

状,侧生鞭毛,是革兰氏阴性菌(见图 1). 按照文献 [27,28]对 H1 进行生理生化分析,结果如表 1 所示. PCR 产物的 16S rDNA 基因序列长度与电泳检测结果吻合,16S rDNA 序列在 GenBank 进行 BLAST 同源性对比发现,H1 与多株 *Amimobacter* sp. 有 99% 的同源性,结合生理生化特征,确定 H1 为氨基杆菌 (*Amimobacter* sp.),获得 GenBank 登录号为

JX457318,中国典型培养物保藏中心(武汉)保藏号为 M2012296. 以 16S rDNA 序列为基础,应用 Glustalx1.2.0 进行同源性排列,再利用 MEGA5 软件构建的系统发育树如图 2. Biolog 分析同 16S rDNA 的分析结果基本一致. 查阅相关文献,国内外还未有 *Aminobacter* sp. 菌株具有 Mn^{2+} 氧化能力的相关研究报道.

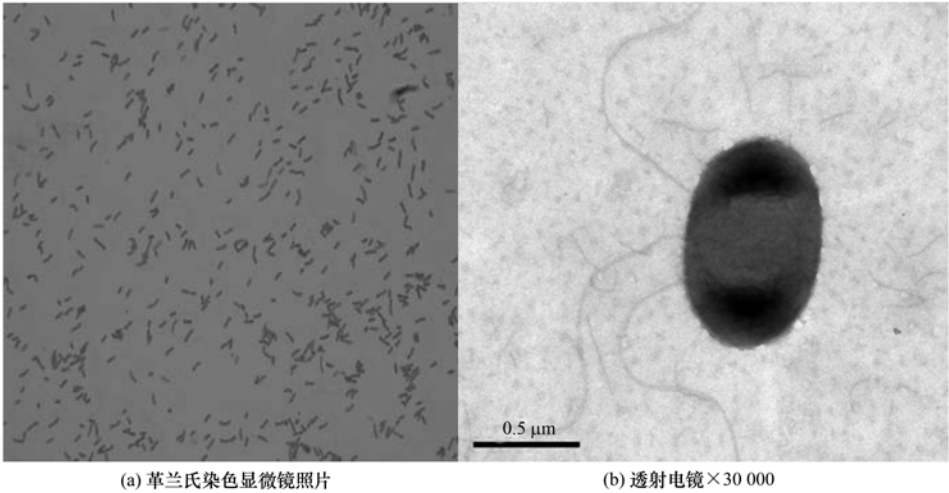


图 1 菌株 H1 微观形态
Fig. 1 Microscopy images of strain H1

表 1 菌株生理生化结果 ¹⁾	
Table 1 Physiological and biochemical responses of strain H1	
试验项目	结果
革兰氏染色	-
淀粉水解试验	-
吡啶试验	-
甲基红试验	-
V-P 试验	-
氧化酶试验	+
明胶液化试验	-
过氧化氢酶试验	+
硫化氢试验	-
产氨试验	+
硝酸盐还原试验	+

1) “+”表示阳性,“-”表示阴性

2.2 *Aminobacter* sp. H1 生长特性研究

2.2.1 生长曲线、菌液 pH 变化及生物氧化锰生成情况

由图 3 可知,*Aminobacter* sp. H1 生长的各阶段较明显,约 48 h 后进入稳定生长期,72 ~ 80 h 开始呈现下降趋势,细菌繁殖速度变慢,死亡个体数增多,进入衰亡期. 培养基中 $Mn(II)$ 在 12 h 内就有少量被氧化,但直到 42 h 生物氧化锰的生成量仍很少,约 $0.015\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 42 h 后氧化速率显著提高,80 h 时基本稳定,生物氧化锰量超过 $0.16\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 后续实验中也发现 $Mn(II)$ 一开始就大量减少,由此可推出菌 H1 通过吸附作用吸附 $Mn(II)$,待生长到一定阶段后再把其氧化. 同时从图 3 中也可看出在

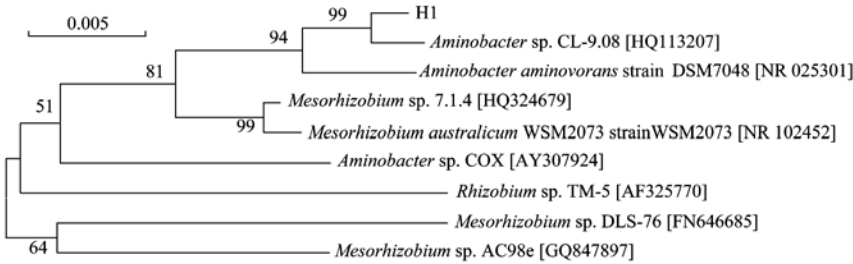


图 2 菌株系统发育树图
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain H1

细菌生长过程中,菌液 pH 值不断发生变化,呈上升趋势,80 h 内 pH 值从 6.5 上升到 8.6,这可能是因为在生长过程中产生或分泌碱性物质,pH 值升高能促进 H1 对锰的氧化,同时对菌的生长也会产生一定的影响.而空白实验中生物氧化锰量和 pH 都没有变化,说明锰氧化和 pH 升高是菌株 H1 作用的结果.

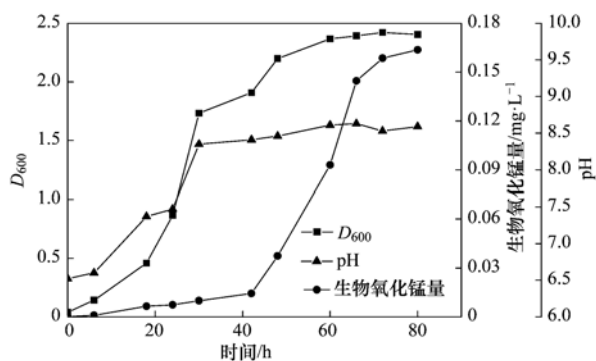


图 3 H1 生长曲线、生物氧化锰生成、菌液 pH 变化

Fig. 3 Growth curve of strain H1, production of biogenic Mn oxide and pH variation in PYMC medium

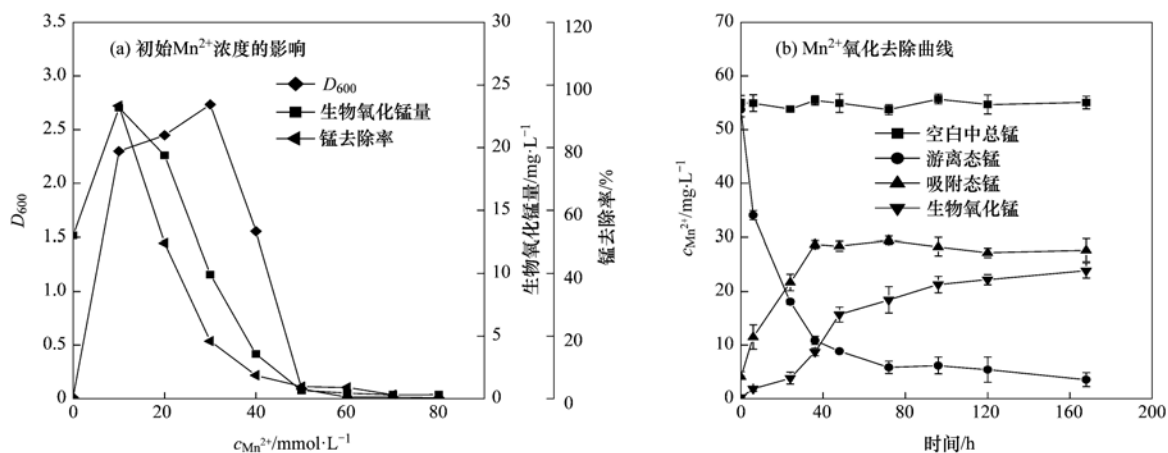


图 4 菌株 H1 的 Mn(II) 耐性及其对锰的氧化去除

Fig. 4 Mn(II) tolerance, oxidation and removal curve of strain H1

和,这可能与菌生长达到稳定期,菌体总表面积有限有关.生物氧化锰的量则持续增加,到 168 h 时生物氧化锰量仅稍小于吸附态锰.说明锰的氧化滞后于锰的吸附,H1 首先通过吸附大量去除培养基中的锰,然后再把吸附的锰氧化成生物氧化锰或作为自身生长所需要的营养元素.

2.3 *Aminobacter* sp. H1 锰氧化活性表达的优化研究

图 5(a) 可见,pH 从 4.0 上升到 10.0,菌的生物量和锰氧化率都是先增大再减小,在 7.0 时达到最大,锰氧化率为 61.5%.由此可知,在 pH 为 6.0 ~ 8.0 的条件下,菌株 H1 能较好生长,且对 Mn^{2+} 氧化

2.2.2 *Aminobacter* sp. H1 对 Mn(II) 耐受性及锰的去除率

由图 4(a) 可知,当培养基中 Mn^{2+} 浓度为小于 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 H1 生长几乎不受影响且具有较高的锰氧化活性;但当 Mn^{2+} 浓度为 $40 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 H1 生长和锰氧化活性均受到明显抑制; Mn^{2+} 浓度升至 $60 \sim 70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 H1 已不能生长且对 Mn^{2+} 无氧化作用. Mn^{2+} 对菌株 H1 影响的最低抑制浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,此高锰耐受性菌株在工程中具有潜在的应用价值.

另一方面,锰氧化菌在不同生长阶段的锰氧化能力有较大差异,各形态锰在不同阶段的量如图 4(b).从游离态锰变化曲线可看出 H1 能够快速而高效地去除锰,6 h 时即有 38% 的锰被去除,到 168 h 时,培养基中 95% 的锰已被去除.另外,24 h 内游离态锰量迅速减少,吸附态锰的量相应增加,而生物氧化锰量仍很少,可知道这一阶段主要是菌体对锰的吸附.24 h 后生物氧化锰量开始增加,但吸附态锰仍然远远多于生物氧化锰,36 h 时吸附渐渐达到饱

率均在 40% 以上,最高达到 62%.这可能由于 H1 对锰的氧化是酶促反应,过酸或过碱会使 H1 所分泌的起氧化作用的酶分子结构或表面基团发生变化,导致酶活性降低或酶与底物的结合受阻.同时培养基的 pH 也会引起细胞膜电位的变化,影响菌株对营养物质的摄取及代谢过程中酶的活性.

由图 5(b) 可知,温度为 35°C 时,菌的生长和 Mn^{2+} 氧化效果最佳,氧化率为 62.3%,菌的生物量也最大;温度低于 35°C 时,菌株的生长量和对 Mn^{2+} 氧化率都随培养温度降低而减少;当温度超过 35°C 时,菌株的生长和对 Mn^{2+} 氧化率都受到明显抑制.

温度的影响主要是因为,随着温度的升高,生化反应的速率加快,但另一方面,核酸、酶等功能物质的分子结构可能会受到不可逆破坏变性或失活,温度过低也同理。

图 5(c) 所反映的为菌株 H1 在不同铁含量培养基中培养 5 d 后的锰氧化率。从中可看出,随着培养基中铁浓度增大,锰氧化率也增大,0.1 ~ 1.0 g·L⁻¹ 增大趋势最明显,至 1.0 g·L⁻¹ 时, Mn²⁺ 的氧化率迅速长至 58%, 之后基本保持稳定。培养过程中还发现, 1 ~ 2 d 即产生大量红褐色絮状铁泥, 而铁浓度为 0 的对照中锰氧化物出现的量少且较晚, 说明菌株 H1 能够同时氧化铁和锰, 且对铁的氧化能力强于锰。铁是铁锰氧化细菌重要的营养元素, 参与代谢, 保证铁锰氧化细菌具有高效而稳定的锰氧化能力, 同时絮状铁泥对培养基中 Mn²⁺ 有较强的吸附等作用, 加强了体系的除锰能力。

2.4 锰细菌 H1 氧化 Mn(II) 的机制研究

2.4.1 菌株氧化 Mn²⁺ 过程中 Mn(III) 的捕捉

对于 Mn(III) 是否在体系中起到关键作用, 以往的研究有很多猜测和不同的研究结果。Johnson 等^[29] 在对 1 株海洋锰氧化菌 *Erythrobacter* sp. SD21 研究时发现 Mn(III) 是酶促反应的初级产物, Webb 等^[30] 用焦磷酸捕捉到了 *Bacillus* sp. SG-1 氧化 Mn(II) 的过程中瞬时 Mn(III) 中间体的存在, Mn(II) 的氧化是一系列单电子传递过程。而 Barbar 等^[31] 的研究却没有发现 Mn(III) 的形成。本实验中用 10 mmol·L⁻¹ 焦磷酸钠捕捉菌株 H1 培养 3 d 后培养液中的 Mn(III), 样品的紫外扫描图[图 6(a)] 显示, 480 nm 处有明显吸收峰, 说明样品中有 Mn(III) 与焦磷酸钠形成的络合物。培养液 D₄₈₀ 结果如图 6(b) 所示, 实验组(有菌有锰) 菌株 H1 经培

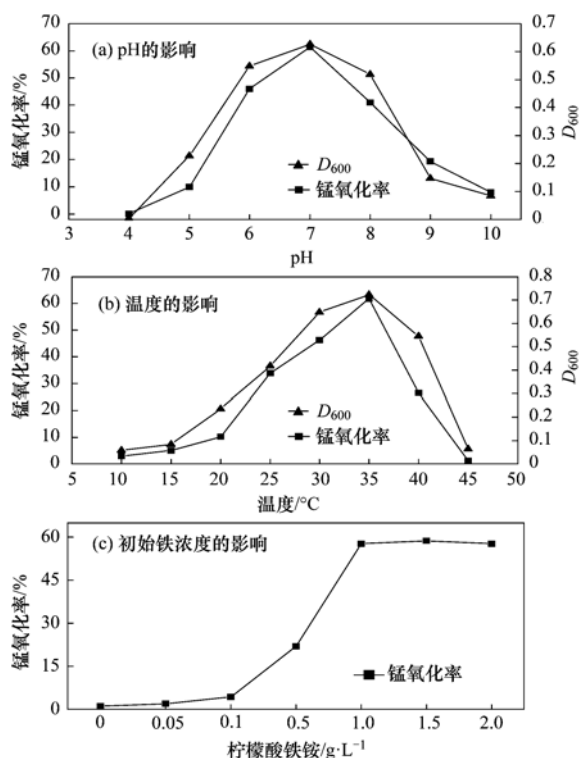


图 5 pH 值、温度、Fe 初始质量浓度对锰氧化率的影响

Fig. 5 Effects of initial pH, temperature and Fe concentration on Mn oxidation

养 5 d D₄₈₀ 显著增大, 而对照组中 D₄₈₀ 的值很小且不随时间改变。说明菌体 H1 在氧化 Mn(II) 的过程中有 Mn(III) 中间体的产生。由此可推测, 菌株 H1 首先在酶的催化作用下首先把 Mn(II) 氧化成 Mn(III), 然后迅速发生歧化反应, 生成 Mn(II) 和 Mn(IV)。也可能菌株 H1 先将 Mn(II) 氧化成 Mn(III), 再把 Mn(III) 氧化成 Mn(IV) 是两个单电子传递过程, 由两种不同的酶来催化, 这个过程比两个电子同时传递所需的能量更低, 因而 Mn(II) 氧化活

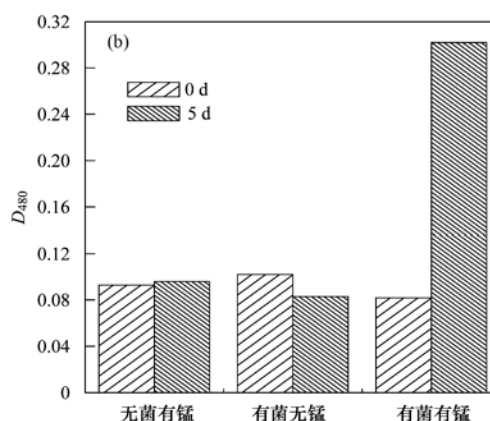
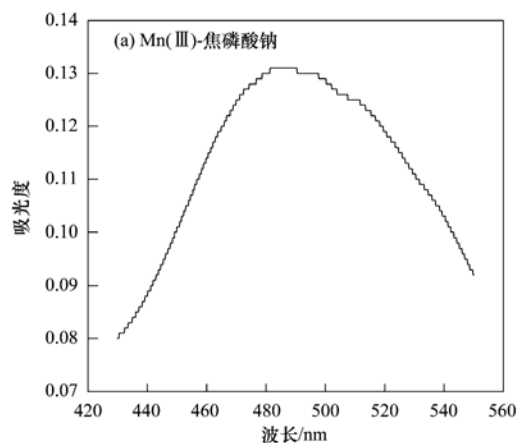


图 6 焦磷酸钠捕捉菌悬液中 Mn(III) 的量

Fig. 6 Absorbance value of Mn(III)-pyrophosphate in the bacterium suspension

性更高.

2.4.2 氧化活性因子定位

对锰氧化活性因子的分布进行定位研究,各部分的锰氧化效果如图7所示,有锰和无锰体系各部分对锰的氧化活性强弱表现出一致性,即菌株 H1 的培养液、上清液、菌体和细胞裂解液催化 Mn^{2+} 氧化的活性由强到弱依次为:细胞裂解液 < 上清液 < 菌体 < 菌液,其中细胞裂解液活性远低于后三部分,而菌液、菌体、上清液的活性较高且相差不大,由此可推测菌株对 Mn^{2+} 的氧化主要是菌株释放的锰氧化活性因子的作用结果. 锰氧化活性因子在细胞内合成,后分泌到细胞外环境或菌体表面发生作用,且由于经 Tris-HCl 洗过的菌体仍有很高活性,可知锰氧化活性因子大部分先强烈吸附在细胞表面,再慢慢释放到溶液中.

2.5 生物氧化锰的表征

采用透射电镜能谱 (SEM-EDX)、X 射线衍射 (XRD) 和 X 射线光电子能谱 (XPS) 分析对生成的生物氧化锰进行表征.

扫描电镜如图8所示,无锰培养基中培养的 H1 菌体表面光滑[图8(a)],而含锰培养基中的 H1 菌体[图8(b)]虽经多次洗涤,仍发现有大量的无定形不溶物紧密结合在细胞表面,该不溶物可能为被

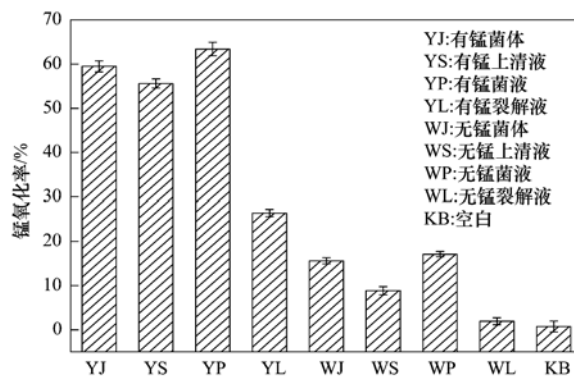


图7 菌株 H1 锰氧化活性因子定位

Fig. 7 Location of the $\text{Mn}(\text{II})$ oxidation factor in strain H1

菌体吸附的 Mn^{2+} 及氧化的生物氧化锰沉淀,与 Tebo 等^[1]报道一致. 沉淀中可能还有大量的被菌 H1 氧化的铁氧化物,图8(a)的 EDX 中元素分析证实了大量铁氧化物的存在. 在收集的锰氧化物沉淀中, Mn 含量为 8.8% (质量分数),占了较大比例,但 Mn 元素的吸收峰远小于铁元素 (质量分数为 33.5%),再次证明铁是 *Aminobacter* sp. H1 的必需元素. 另外氧元素的吸收峰仅次于铁,质量分数为 32.74%,这可能是因为沉淀中有大量的细菌个体的缘故,细菌把锰和铁同时或分步氧化后吸附在细菌表面,铁锰氧化也相互胶结而难以分离.

从生物氧化锰的 XRD 图谱[图9(a)]可以看

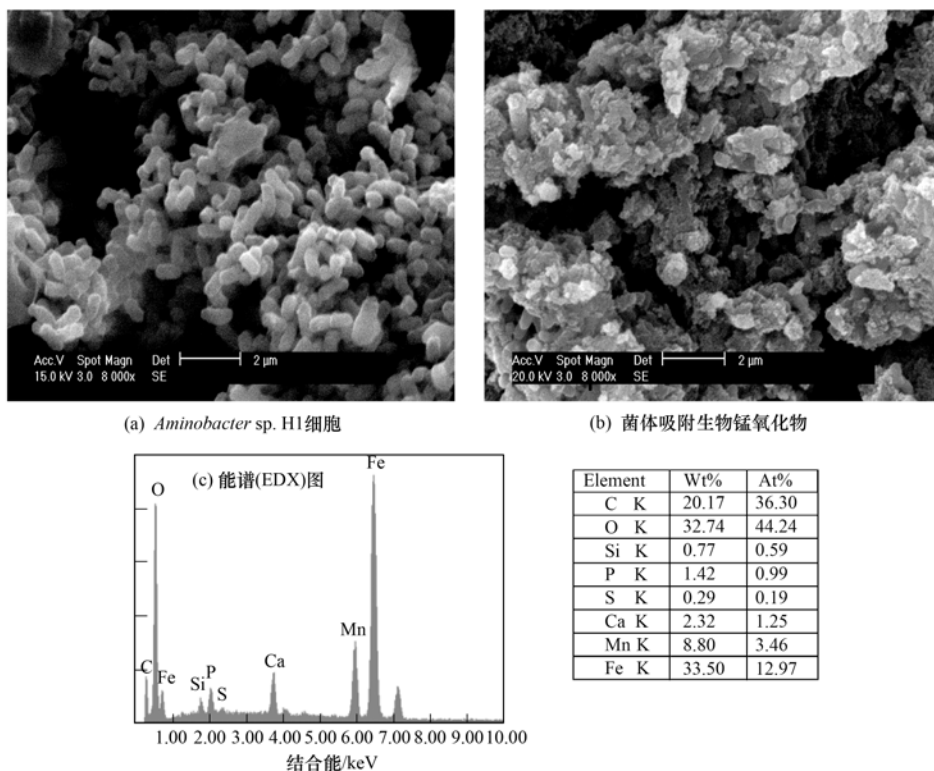


图8 生物氧化锰的扫描电镜和能谱 (SEM-EDX) 图

Fig. 8 SEM-EDX analysis of biogenic Mn oxide by strain H1

出,样品在 2θ 为 24.138° 、 31.082° 、 37.131° 、 37.243° 处出现一系列特征峰,且衍射峰较尖锐,其对应的晶面间距和相对强度与 XRD 标准卡片及相关文献相吻合. 可以确定 *Aminobacter* sp. H1 产生的生物锰氧化物成分较复杂,含有 MnCO_3 、 MnOOH 、 Mn_3O_4 和 MnO_2 等成分,由图谱中其他的尖锐峰可推断还存在其他物质. 根据 XPS 图谱[图 9(b)]对生物氧化锰中锰元素的价态进行分析,

$\text{Mn}2p$ 的结合能有 2 个主峰 $\text{Mn}2p_{3/2}$ 和 $\text{Mn}2p_{1/2}$,其中 $\text{Mn}2p_{3/2}$ 谱峰不对称, Mn 应该存在 1 种以上的化学状态,且对应的结合能分别为 650.8 eV 和 638.7 eV,用污染碳 $\text{C}1s = 281.8$ eV 校准后的峰值为 653.5 eV 和 641.4 eV,为 Mn(II) 和 Mn(IV) 的特征吸收峰,但未见 Mn(III) 的吸收峰,可能由于 Mn(III) 为中间体,存在时间较短,不稳定而不易捕捉.

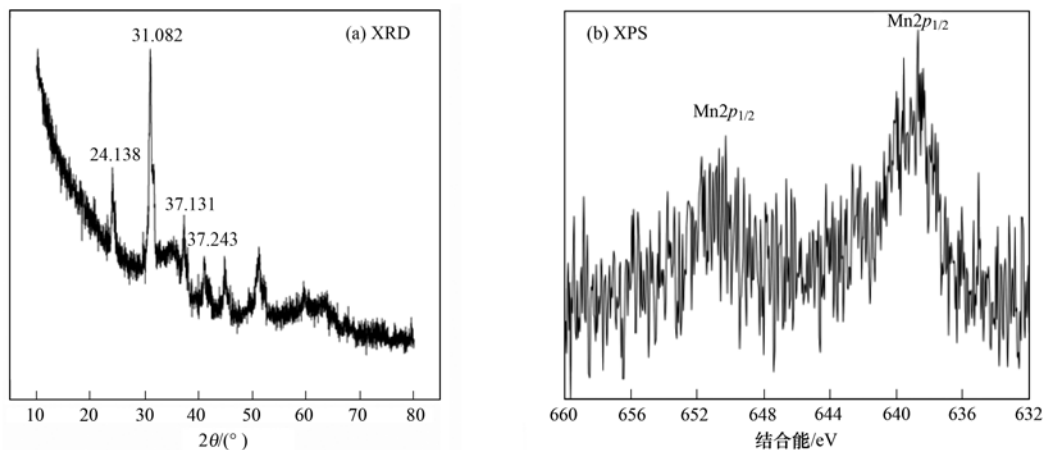


图9 生物氧化锰的 XRD、XPS 图谱

Fig. 9 XRD and XPS analysis of biogenic manganese oxides

3 结论

(1) 分离筛选出 1 株高效氧化 Mn(II) 的菌株 *Aminobacter* sp. H1, 最佳条件下, 锰耐受浓度可达 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可完全去除浓度低于 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Mn(II). 首先通过吸附作用大量去除培养基中的锰, 然后再把吸附的锰氧化成生物氧化锰或作为自身生长所需要的营养元素.

(2) *Aminobacter* sp. H1 对锰的氧化可能为酶促反应, 受 pH 和温度影响显著, 最适温度和 pH 分别为 35°C 、7.0, Mn^{2+} 和 Fe 是 *Aminobacter* sp. H1 生长代谢的必需元素, 氧化 Mn(II) 的过程中发现有 Mn(III) 瞬时中间体产生.

(3) *Aminobacter* sp. H1 主要通过产生锰氧化活性因子和释放碱性代谢产物提高体系 pH 两种方式催化氧化 Mn(II). 起氧化作用的物质在细胞内合成后再释放到胞外起作用, 菌液、细胞裂解液、菌体和上清液均具有氧化 Mn(II) 的活性, 且表现为细胞裂解 < 液上清液 < 菌体 < 菌液.

(4) 生物氧化锰的表征结果显示, 生物氧化锰与菌体结合紧密, 弱结晶、无固定形态, 其中铁含量较高, 锰元素以 MnCO_3 、 MnOOH 、 Mn_3O_4 和 MnO_2

形态存在.

参考文献:

- [1] Tebo B M, Clement B G, Dick G J. Biotransformations of manganese [A]. In: Manual of Environmental Microbiology [M]. (3rd ed.). Washington DC: ASM Press, 2007. 1223-1238.
- [2] Keren N, Kidd M J, Penner H J E, et al. A light-dependent mechanism for massive accumulation of manganese in the photosynthetic bacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Biochemistry, 2002, 41(50): 15085-15092.
- [3] 王悦, 段春礼, 张海燕, 等. 氯化锰对大鼠中脑多巴胺神经元毒性的研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2001, 17(1): 57-61.
- [4] 荆俊杰, 陆晓菁, 陈敏, 等. 锰对小鼠脑和肝脏脂质过氧化及其钙、铁、锌的影响 [J]. 毒理学杂志, 2009, 32(2): 138-140.
- [5] Nealson K H, Rosson R A, Myers C R. Mechanisms of oxidation and reduction of manganese [C]. Metal Ions and Bacteria, 1989. 383-413.
- [6] Vodyanitskii Y N. Mineralogy and geochemistry of manganese: a review of publications [J]. Eurasian Soil Science, 2009, 42(10): 1170-1178.
- [7] He J Z, Meng Y T, Zheng Y M, et al. Cr(III) oxidation coupled with Mn(II) bacterial oxidation in the environment [J]. Journal of Soils and Sediments, 2010, 10(4): 767-773.
- [8] Blandino A, Macias M, Cantero D. Formation of calcium alginate gel capsules; Influence of sodium alginate and CaCl_2

- concentration on gelation kinetics[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, **88**(6): 686-689.
- [9] Toner B, Fakra S, Villalobos M, *et al.* Spatially resolved characterization of biogenic manganese oxide production within a bacterial biofilm[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(3): 1300-1310.
- [10] Toner B, Manceau A, Webb S M, *et al.* Zinc sorption to biogenic hexagonal-birnessite particles within a hydrated bacterial biofilm[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2006, **70**(1): 27-43.
- [11] El Gheriany I A, Bocioaga D, Hay A G, *et al.* Iron requirement for Mn(II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, **75**(5): 1229-1235.
- [12] 孟佑婷, 郑袁明, 张丽梅, 等. 环境中生物氧化锰的形成机制及其与重金属离子的相互作用[J]. 环境科学, 2009, **30**(2): 574-582.
- [13] Dick G J, Torpey J W, Beveridge T J, *et al.* Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase *MnxG*, from spores of several different marine *Bacillus* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(5): 1527-1534.
- [14] Miyata N, Maruo K, Tani Y, *et al.* Production of biogenic manganese oxides by anamorphic ascomycete fungi isolated from streambed pebbles[J]. Geomicrobiology Journal, 2006, **23**(2): 63-73.
- [15] Zouni A, Witt H T, Kern J, *et al.* Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution[J]. Nature, 2001, **409**(6821): 739-743.
- [16] Ridge J P, Lin M, Larsen E I, *et al.* A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067[J]. Environmental Microbiology, 2007, **9**(4): 944-953.
- [17] 杨宏, 钟洁, 纪娟, 等. Mn(II)氧化细菌的微生物学研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2008, **14**(1): 143-146.
- [18] Wang W M, Shao Z Z, Liu Y J, *et al.* Removal of multi-heavy metals using biogenic manganese oxides generated by a deep-sea sedimentary bacterium - *Brachybacterium* sp. strain Mn32[J]. Microbiology, 2009, **155**(6): 1989-1996.
- [19] Forrez I, Carballa M, Verbeken K, *et al.* Diclofenac oxidation by biogenic manganese oxides[J]. Environmental Science & Technology, 2010, **44**(9): 3449-3454.
- [20] Saratovsky I, Gurr S J, Hayward M A. The Structure of manganese oxide formed by the fungus *Acremonium* sp. strain KR21-2[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009, **73**(11): 3291-3300.
- [21] 许旭萍, 王芳, 李敏. *Arthrobacter echigonensis* 介导生物氧化锰形成的机制及生物氧化锰的成分[J]. 环境科学, 2011, **32**(6): 1772-1777.
- [22] 刘凡, 冯雄汉, 陈秀华, 等. 氧化锰矿物的生物成因及其性质的研究进展[J]. 地学前缘, 2008, **15**(6): 66-73.
- [23] Krumbein W, Altmann H. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms[J]. Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, 1973, **25**(2-3): 347-356.
- [24] Geets J, De Cooman M, Wittebolle L, *et al.* Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, **75**(1): 211-221.
- [25] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [26] Klewicki J K, Morban J J. Kinetic behavior of Mn(II) complexes of pyrophosphate, EDTA and citrate[J]. Environmental Science and Technology, 1998, **32**(19): 2916-2922.
- [27] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [28] Whitman W B, Goodfellow M, Kampfer P, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. New York: Springer, 2009.
- [29] Johnson H A, Tebo B M. In vitro studies indicate a quinone is involved in bacterial Mn(II) oxidation[J]. Archives of Microbiology, 2008, **189**(1): 59-69.
- [30] Webb S M, Dick G J, Bargar J R, *et al.* Evidence for the presence of Mn(III) intermediates in the bacterial oxidation of Mn(II)[J]. Proceedings of the National Academy, 2005, **102**(15): 5558-5563.
- [31] Bargar J R, Tebo B M, Villinski J E. In situ characterization of Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2000, **64**(16): 2775-2778.

CONTENTS

Analysis of Characteristics of Black Carbon Concentration in Shanghai from 2008 to 2012	WANG Hong-qiang, HE Qian-shan, CHEN Yong-hang, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (1256)
Spatial Distribution and Risk Assessment of Atrazine in Taizi River Basin, China	ZHENG Lei, ZHANG Yi-zhang, ZHANG Yuan, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (1271)
Temporal and Spatial Variation of Water Nutrient Level After Exogenous Nutrient Input	FU Ling, ZHAO Kai, WANG Guo-xiang, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (1290)
Investigation of Nitrogen, Phosphorus and Microbial Contamination in Laolongdong Underground River System of Chongqing	LAN Jia-cheng, YANG Ping-heng, REN Kun, <i>et al.</i> (1297)
Effects on Phosphorus Fraction Distribution in Sediment by Roots of <i>Vallisneria natans</i>	LI Zhen-guo, WANG Guo-xiang, ZHANG Jia, <i>et al.</i> (1304)
Modeling Nitrogen Transformation in a Novel Circular-Flow Corridor Wetland	PENG Jian-feng, SONG Yong-hui, YUAN Peng, <i>et al.</i> (1311)
Natural Attenuation of Tetracycline in the Water of Taihu Lake Under Different Environmental Conditions	DUAN Lun-chao, WANG Feng-he, JI Ying-xue, <i>et al.</i> (1318)
Inactivation and Reactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria During and After UV Disinfection in Reclaimed Water	HUANG Jing-jing, TANG Fang, XI Jin-ying, <i>et al.</i> (1326)
Photoreactivation of <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> in the Secondary Effluent Disinfected by UV-TiO ₂	WANG Xi-feng, GONG Xin, HU Xiao-lian, <i>et al.</i> (1332)
Stability of C ₆₀ Nanoparticles in Aquatic Systems	FANG Hua, SHEN Bing-bing, JING Jie, <i>et al.</i> (1337)
Fouling Behavior of Sodium Alginate During Microfiltration at Various Ionic Compositions; XDLVO Approach	ZHAO Ying-xu, ZONG Rui-qiang, GAO Xin-yu, <i>et al.</i> (1343)
Enhanced Remediation of 4-Chloronitrobenzene Contaminated Groundwater with Nanoscale Zero-valence Iron (nZVI) Catalyzed Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	FU Rong-bing (1351)
Effect of the Coexistence of Chlorobenzene Homologue on Anaerobic Degradation of Hexachlorobenzene	WANG Qi, LIU Hui, JIANG Lin, <i>et al.</i> (1358)
Research on Removal Efficiency of Cd (II)-bearing Wastewater by Sulfate-reducing Biological Filter	WU Xuan, TAN Ke-yan, HU Xi-jia, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (1372)
Effect of Simulated Inorganic Anion Leaching Solution of Electroplating Sludge on the Bioactivity of <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	CHEN Yan, HUANG Fang, XIE Xin-yuan (1377)
Microbial Reduction of Cu ²⁺ Mediated by Electroactive Biofilms	LIU Yi, ZHOU Shun-gui, YUAN Yong, <i>et al.</i> (1384)
Copper Recovery from Artificial Bioleaching Lixivium of Waste Printed Circuit Boards	CHENG Dan, ZHU Neng-wu, WU Ping-xiao, <i>et al.</i> (1391)
Difference of Contaminant Composition Between Landfill Leachates and Groundwater and Its Reasons	HE Xiao-song, YU Hong, XI Bei-dou, <i>et al.</i> (1399)
Photochemical Degradation of Landfill Leachate Facilitated by Combined Schwertmannite and H ₂ O ₂	WANG He-ru, SONG Yong-wei, XU Zhi-hui, <i>et al.</i> (1407)
Effects of Operating Parameters on Organic Toxicity of Sludge Treating Synthetic Bisphenol A Wastewater	YANG Na, CHEN Xiu-rong, LIN Feng-kai, <i>et al.</i> (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 <i>Aminobacter</i> sp. H1 and Its Oxidation Mechanism	YAN Ping, JIANG Li-ying, CHEN Jian-meng, <i>et al.</i> (1428)
Nitrate Removal by a Strain of Nitrate-Dependent Fe (II)-Oxidizing Bacteria	WANG Hong-yu, YANG Kai, ZHANG Qian, <i>et al.</i> (1437)
Study on the Iopromide-Degrading Characteristics of Strain <i>Pseudomonas</i> sp. I-24 via Co-Metabolism	XU Bing-jie, GAO Pin, XUE Gang, <i>et al.</i> (1443)
Using Flow Cytometry to Explore the Changes of <i>Sphingomonas</i> sp. GY2B Bacterial Surface Characteristics in the Process of Degrading Phenanthrene	ZHANG Meng-lu, DANG Zhi, WU Feng-ji, <i>et al.</i> (1449)
Research on Characteristic of Interrelationship Between Toxic Organic Compound BPA and <i>Chlorella vulgaris</i>	CHEN Shan-jia, CHEN Xiu-rong, YAN Long, <i>et al.</i> (1457)
Effect of Magnesium Deficiency on Photosynthetic Physiology and Triacylglyceride (TAG) Accumulation of <i>Chlorella vulgaris</i>	WANG Shan, ZHAO Shu-xin, WEI Chang-long, <i>et al.</i> (1462)
Effects of Microcystins on Growth and Antioxidant System of Rice Roots	WANG Wei-min, DENG Yu, ZOU Hua, <i>et al.</i> (1468)
Responses of Soybean Cultivar Dongsheng-1 to Different O ₃ Concentrations in Northeast China	ZHANG Wei-wei, WANG Guang-hua, WANG Mei-yu, <i>et al.</i> (1473)
Development and Succession of Biological Soil Crusts and the Changes of Microbial Biomasses	WU Li, ZHANG Gao-ke, CHEN Xiao-guo, <i>et al.</i> (1479)
Effects of Lead on the Growth and Reproduction of <i>Eisenia fetida</i> with Aged Soils	CHEN Li-hong, LIU Zheng-tao, FANG Zheng, <i>et al.</i> (1486)
Soil Heavy Metal Cadmium Standard Limit and Range of Background Value Research	ZHAO Xiao-jun, LI Si-jin, XU Ren-ji, <i>et al.</i> (1491)
Study on Soil Element Background Values of the Hoh Xil Area in North Tibet	BAI Jian-kun, WANG Jian-li, LI Chao-liu, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (1502)
Heavy Metal Pollution Characteristics and Ecological Risk Analysis for Soil Around Haining Electroplating Industrial Park	LI Jiong-hui, WENG Shan, FANG Jing, <i>et al.</i> (1509)
Sources and Spatial Distribution of Typical Heavy Metal Pollutants in Soils in Xihu Scenic Area	ZHANG Hai-zhen, TANG Yu-li, LU Jun, <i>et al.</i> (1516)
Distribution and Assessment of Mercury in the Ambient Soil of a Municipal Solid Waste Incinerator	XIE Hui-ting, ZHANG Cheng-zhong, XU Feng, <i>et al.</i> (1523)
Phosphorus Adsorption Characteristics of Soils and Sediments Surrounding Dishui Lake in Shanghai	ZHUGE Xiang-zhen, BI Chun-juan, CHEN Zhen-lou, <i>et al.</i> (1531)
Impact of SDBS/Na ⁺ on Red Soil Colloidal Stability	TANG Ying, LI Hang, ZHU Hua-ling, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (1555)
Immunosensor for Rapid Detection of 1,3-Dinitrobenzene	LONG Feng, SHI Han-chang, WANG Hong-chen, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (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, <i>et al.</i> (1586)
Review on Characteristics and Detecting Assay of Bacterial Endotoxin Contamination in Water Environment	ZHANG Can, LIU Wen-jun, ZHANG Ming-lu, <i>et al.</i> (1597)
Advances in Molecular Mechanism of Bacterial Reduction of Hexavalent Chromium	LI Dou, ZHAO You-cai, SONG Li-yan, <i>et al.</i> (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

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

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