

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第9期

Vol.33 No.9

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

我国4个WMO/GAW本底站大气CH ₄ 浓度及变化特征	方双喜,周凌晔,许林,姚波,刘立新,夏玲君,王红阳	(2917)
我国东北地区大气降水稳定同位素特征及其水汽来源	李小飞,张明军,马潜,李亚举,王圣杰,汪宝龙	(2924)
2010年广州亚运期间空气质量与污染气象条件分析	李婷苑,邓雪娇,范绍佳,吴兑,李菲,邓涛,谭浩波,蒋德海	(2932)
厦门市冬春季灰霾期间大气PM ₁₀ 中多环芳烃的污染特征及来源分析	钱冉冉,闫景明,吴水平,王新红	(2939)
气溶胶OCEC切割点确定方法改进及应用	王莉华,董华斌,闫才青,曾立民,郑玫,张延君,刘久萌,Weber R J	(2946)
松花江上游夹皮沟金矿土壤与大气汞污染特征	张刚,王宁,王媛,刘特,艾建超	(2953)
河北农居环境颗粒态汞污染特征及健康评估研究	赵亚娟,龚巍巍,栾胜基	(2960)
印刷电路板(PCB)厂挥发性有机物(VOCs)排放指示物筛选	马英歌	(2967)
烹调油烟中挥发性有机物的排放初探	何万清,田刚,聂磊,曲松,李靖,王敏燕	(2973)
生物滴滤塔降解甲苯废气长期运行生物膜相特性研究	胡俊,郑江玲,吴越新,张丽丽,陈建孟	(2979)
分期布液生物滴滤床净化H ₂ S废气性能研究	刘春敬,李坚,刘佳,彭淑婧,李超,陈英,何洪	(2987)
粉煤灰综合利用过程中汞的二次释放规律研究	孟阳,王书肖	(2993)
太湖、巢湖水体总悬浮物浓度半分析反演模型构建及其适用性评价	刘忠华,李云梅,檀静,郭宇龙,周莉,刘阁	(3000)
巢湖水质与流域农业投入的关联性研究	张燕,高翔,张洪	(3009)
巢湖十五里河水花生长区沉积物及间隙水中营养盐的基本特性	李如忠,李峰,周爱佳	(3014)
巢湖沉积物中磷蓄积时空变化及人为污染定量评价	刘恩峰,杜臣昌,羊向东,沈吉	(3024)
巢湖周边表土中有机质、全氮和全磷空间分布及其相关性	陈书琴,储昭升,胡社荣,刘俊,王长春,王曼	(3031)
丹江口水库典型入库支流氮磷动态特征研究	雷沛,张洪,单保庆	(3038)
水温分层对三峡水库香溪河库湾春季水华的影响	刘流,刘德富,肖尚斌,孔松,陈媛媛,方小凤	(3046)
平水期和丰水期殷村港污染物浓度时空变异比较研究	杨晓英,罗兴章,郑正,方淑波	(3051)
江苏西部湖泊沉积物营养盐赋存形态和释放潜力差异性分析	刘涛,胡志新,杨柳燕,肖琳,席北斗,许其功	(3057)
太湖西岸湖滨带沉积物氮磷有机质分布及评价	甘树,卢少勇,秦普丰,金相灿,焦伟,王佩	(3064)
南四湖流域种植业面源污染氮磷源解析研究	刘静,路风,杨延钊,徐娜,王田妮	(3070)
珠江水体中有机物分布、组成及与消毒副产物生成的关系	何洪威,周达诚,王保强,梁艳红	(3076)
东江流域典型乡镇饮用水源地重金属污染健康风险评价	王若师,许秋瑾,张炯,魏群山,颜昌宙	(3083)
深圳茅洲河表层沉积物卤代多环芳烃污染研究	孙建林,倪宏刚,丁超,曾辉	(3089)
福建罗源湾潮间带沉积物重金属含量空间分布及其环境质量影响	高文华,杜永芬,王丹丹,高抒	(3097)
渤海湾大型底栖生物群落结构变化及原因探讨	蔡文倩,刘录三,乔飞,林岫璇,周娟	(3104)
地下水污染防治区划体系构建研究	王俊杰,何江涛,陆燕,刘丽雅,张小亮	(3110)
北京市平原区地下水污染防治区划不确定性分析	陆燕,何江涛,王俊杰,刘丽雅,张小亮	(3117)
川东平行岭谷区典型岩溶含水系统中NO ₃ ⁻ 的存储和运移	杨平恒,袁道先,任幼蓉,谢世友,贺秋芳,胡晓风	(3124)
改性活性炭对水中PFOS的吸附去除研究	董锡臻,石宝友,解岳,王东升	(3132)
水溶液中臭氧和溴离子的反应研究	俞潇婷,张家辉,潘循哲,张仁熙,侯惠奇	(3139)
HPSEC-UV-TOC联用技术测定有机物相对分子质量分布	张晗,董秉直	(3144)
不同有机基质诱发的水体黑臭及主要致臭物(VOCs)产生机制研究	卢信,冯紫艳,商景阁,范成新,邓建才	(3152)
不同pH下纳米铁镍颗粒对生物降解苯酚的影响	况烨,周琰,王清萍,陈祖亮	(3160)
多级微氧生物流化床预处理高浓度丙烯酸废水	李莎,郑盛之,宋玉栋,周岳溪,朱长军,刘淑玲,潘玲,蒲文晶	(3167)
三级生物膜深度处理腈纶废水生化出水的脱氮研究	徐少阳,蒋进元,周岳溪,崔俊涛,段妮妮	(3172)
改性花生壳对水中镉的动态吸附研究	龙腾,易筱筠,党志	(3177)
硫氰酸根在粒状镁铝复合氧化物上的吸附性能	王秀娟,王海增,孙宝维,韩文军	(3182)
海水生物滤器氨氮沿程转化规律模型	罗荣强,侯沙沙,沈加正,陈珠,刘鹰	(3189)
营养物质缺乏引起的好氧颗粒污泥膨胀及其恢复	张著,高大文,袁向娟,勾倩倩	(3197)
生物表面活性剂强化污泥水解的研究	易欣,罗琨,杨麒,李小明,邓伟光,张植平	(3202)
厌氧氨氧化菌的富集培养与分子鉴定	刘冬英,邱艳玲,袁宪正,师晓爽,郭荣波	(3208)
阿特拉津降解菌株的分离、鉴定及降解特性研究	李绍峰,朱静,李铁晶	(3214)
农业废物堆肥中高产漆酶新菌株的分离鉴定及酶学性质研究	任秀娟,范长征,鲁伦慧,王聪,曾光明	(3220)
糖蜜酒精废水脱色微生物的筛选及鉴定	李必金,刘幽燕,贺锴,滕芳明,何熙璞,李青云	(3228)
餐厨垃圾乳酸发酵过程中的微生物多样性分析	刘建国,汪群慧,王爽,孙晓红,仇天雷,李焕	(3236)
共价功能化对单壁碳纳米管产生DNA损伤和活性氧的影响研究	吴仁人,陶雪琴,党志,李开明,蔡美芳	(3241)
<i>Geobacter sulfurreducens</i> 对汞的甲基化及其影响因素研究	邹嫣,司友斌,颜雪,陈艳	(3247)
单一与复合胁迫下油菜对镉、铅的吸收效应	武文飞,南忠仁,王胜利,赵转军,周婷	(3253)
金铜矿下游农户家养番鸭体内重金属分布特征及其评价	杭小帅,梁斌,王文林,王霞,李维新	(3261)
环境激素氯菊酯对萼花臂尾轮虫繁殖的影响	董学兴,杨家新,吕林兰,赵卫红,於叶兵	(3266)
地聚物固化生活垃圾焚烧飞灰固化体抗氧化硫杆菌腐蚀性能的研究	金漫彤,孙鑫,董海丽,金赞芳	(3272)
焚烧飞灰高温过程中重金属的挥发及其氯化特征	刘敬勇,孙水裕	(3279)
城市废弃物处理温室气体排放研究:以厦门市为例	于洋,崔胜辉,林剑艺,李飞	(3288)
NPEOs及其代谢产物在城市污水处理厂中的归趋分析	连静,刘俊新	(3295)
《环境科学》征订启事(3037)	《环境科学》征稿简则(3151)	信息(2999,3030,3096,3227)

糖蜜酒精废水脱色微生物的筛选及鉴定

李必金¹, 刘幽燕^{1, 2*}, 贺锴¹, 滕芳明¹, 何熙璞¹, 李青云^{1, 2}

(1. 广西大学化学化工学院, 南宁 530004; 2. 广西生物炼制重点实验室, 南宁 530003)

摘要: 从自然界中筛选能够脱色糖蜜酒精废水的微生物, 为实际废水的生物处理提供优良的脱色菌种. 以废水中较难降解的色素之一类黑精的模拟合成物为目标底物建立选育模型进行初筛, 以对未经厌氧处理的废水原液的脱色能力为复筛依据, 并通过摇瓶实验测试菌株的脱色性能, 凝胶过滤色谱测试脱色前后糖蜜酒精废水色素相对分子质量分布. 从采集的土壤样品中分离获得1株糖蜜酒精废水脱色菌株 A5P1, 经形态学分析和 ITS 序列分析鉴定为黄曲霉(*Aspergillus flavus*). 结果表明, 最佳脱色条件为: 接种量 4.3×10^4 个 $\cdot$ mL⁻¹, 培养基初始 pH 4.5, 培养温度 39℃, 菌株 A5P1 对未处理的糖蜜酒精废水 4 d 培养脱色率可达到 53.0%, COD 减少 80%. 凝胶过滤色谱结果表明菌株 A5P1 既可脱除糖蜜酒精废水色素中大分子质量组分, 又可减少小分子质量组分含量. 酶活测定实验发现菌体细胞中至少存在产过氧化氢酶、漆酶和不依赖锰的锰过氧化物酶等脱色相关酶. 初步认为菌株 A5P1 对色素有一定的吸附作用, 但脱色机制主要为生物降解.

关键词: 糖蜜酒精废水; 生物脱色; 黄曲霉; 筛选; 鉴定

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)09-3228-08

Screening and Identification of Microorganisms for Decolorization of Molasses Spent Wash

LI Bi-jin¹, LIU You-yan^{1, 2}, HE Kai¹, TENG Fang-ming¹, HE Xi-pu¹, LI Qing-yun^{1, 2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning 530003, China)

Abstract: Microorganisms were screened from the natural environment for decolorization of molasses spent wash, and the isolated strains were then employed in the treatment of actual wastewater. The primary screening was carried out on agar plates supplemented with synthesized melanoidin as the target substrate, since melanoidin is one of the most refractory pigments in wastewater. Promising microorganisms were further selected through secondary screening by decolorization of untreated actual wastewater in shaking flask cultures. Gel filtration chromatography was used to determine the molecular weight distribution of pigments in molasses spent wash before and after decolorization. A strain named A5P1 was isolated from the soil samples collected, showing a good ability of decolorizing molasses spent wash, and was later identified as *Aspergillus flavus* by morphology and ITS sequence analysis. Experimental study of factors affecting the decolorization performance of strain A5P1 gave the optimal conditions as follows: 4.3×10^4 mL⁻¹ of inoculum size, medium with initial pH of 4.5 and cultivation at 39℃. It could decolorize 53.0% of the pigments in the untreated molasses spent wash and decreased 80% of chemical oxygen demand after four-day incubation. The result of gel filtration chromatography demonstrated that both the large and small molecular weight fractions of pigments in the molasses spent wash could be removed by strain A5P1. Based on the measurement of enzyme activities, at least three different kinds of enzymes, i. e. the enzyme with H₂O₂-producing activity, laccase and manganese peroxidase were involved in the decolorization process. Therefore, the decolorization mechanism of strain A5P1 was preliminarily considered to be mainly biodegradation, with bioadsorption as a minor reaction.

Key words: molasses spentwash; decolorization; *Aspergillus flavus*; screening; identification

废糖蜜发酵生产酒精, 是制糖产业提高行业效益、解决糖蜜废料排放的重要途径之一, 但排放的废水(常称为糖蜜酒精废液)中累积了大量、复杂、稳定、不易被降解的色素, 主要有类黑精色素、焦糖色素和酚类色素等^[1, 2], 其中类黑精色素是糖和氨基酸发生美拉德反应而形成的一类褐色聚合物, 因其结构复杂和强抗氧化性而最难降解^[3]. 与其他染料等行业类似, 色素去除同样困扰着糖蜜酒精产业的发展. 通过微生物的代谢作用清除色素这类难降解的大分子物质具有条件温和、安全有效、环境

友好、成本较低等优点^[4, 5], 但是传统的厌氧好氧处理可消减 COD 和 BOD, 对难降解色素物质却不能有效脱除, 因此研究者一直在寻找优异的脱色微生物资源, 这是成功进行生物脱色的前提条件之一.

收稿日期: 2011-11-13; 修订日期: 2012-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(21066001); 广西研究生教育创新计划项目(105931003023)

作者简介: 李必金(1984~), 男, 硕士, 主要研究方向为环境生物工程, E-mail: libijin155@163.com

* 通讯联系人, E-mail: liuyouyangx@163.com

关于糖蜜酒精废水的生物脱色菌种方面国外有不少文献报道^[2], 如以类黑精色素为模型底物筛选获得的脱色微生物有希式乳杆菌^[6]、包氏颤蓝细菌^[7]、乳酸菌^[8]等细菌和米曲霉^[9]、丝核菌^[10]、毛云芝菌^[11]、黄孢原毛平革菌^[12]等真菌; 也有直接采用烟曲霉^[13]、恶臭假单胞菌^[14]、黑曲霉^[15]等菌株对厌氧处理后的废水进行脱色。而国内对糖蜜酒精废水生物脱色的研究多为云芝菌^[16~18], 其他菌种报道很少。另一方面, 研究者发现不同废水来源、不同生产季节、废水预处理方式都可能影响脱色效率和色值测定, 如 Ohmomo 等^[19]报道的嗜热烟曲霉 G-2-6 对透析处理过的废水脱色率达到 70%, 对未透析处理的废水脱色率仅有 40%; 产乙酸菌 No. BP103^[20]对废水原液和厌氧处理过的废水的脱色率差别很大, 分别为 32.3% ± 3.2% 和 73.5% ± 3.5%。由此可看出, 目前所报道各种菌株的脱色能力还远未达到工业化应用的要求, 特别是对于未处理的废水原液; 而且不同废水来源的复杂性使得很难对不同文献报道菌株的脱色效率做出比较。因此继续筛选高效脱色微生物以丰富可供选择的菌种资源, 具有重要的现实意义, 而相关生物脱色的基础研究对于类似色素脱除也可起到一定借鉴作用。

本研究从糖厂及酒精生产区域受污染的土壤中, 依次以类黑精和糖蜜酒精废水为筛选模型底物分离获得 1 株具有较好脱色能力的丝状真菌 A5P1, 通过形态学和系统发育分析鉴定菌株为黄曲霉, 发现其对于未处理的糖蜜酒精废水原液具有良好的脱色性能, 并通过凝胶过滤色谱和酶活测定对菌株脱色糖蜜酒精废水机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

土壤样品取自广西蒲庙造纸厂、广西上思糖厂、广西崇左龙州糖厂、广西柳州化工集团等, 糖蜜酒精废水取自广西上思糖厂。

1.1.2 主要试剂及仪器

葡萄糖、硝酸钠、磷酸二氢钾、硫酸镁购于西陇化工股份有限公司; 蛋白胨、酵母膏购于北京陆桥技术责任有限公司; 甘氨酸购于北京拜耳迪生物技术有限公司; 新华 1 号滤纸孔径 11 μm (杭州新华纸业有限公司); 可见分光光度计 VIS-7220 型 (北京瑞利仪器厂); 立式压力蒸汽灭菌锅 LS-B50L

型 (上海华线医用核子仪器有限公司); 电子分析天平 BSA224S 型 (赛多利斯科学仪器北京有限公司); 精密 pH 计 S20 型 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), Nikon 正置显微镜 50i 型。

1.1.3 培养基

(1) 平板培养基 葡萄糖 3%; NaNO₃ 0.2%; KH₂PO₄ 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.05%; 类黑精 25% (此时培养基 A₄₇₅ ≈ 3.5); 琼脂 2%; pH 6.0^[21]。

(2) 类黑精摇瓶培养基 葡萄糖 3%; NaNO₃ 0.2%; KH₂PO₄ 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.05%; 类黑精 10%; pH 6.0。

(3) 糖蜜酒精废水摇瓶培养基 葡萄糖 2.5%; NaNO₃ 0.2%; KH₂PO₄ 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.05%; 糖蜜酒精废水 15% (A₄₇₅ ≈ 3.5); pH 5.0。

(4) 斜管培养基 LB 培养基; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)。

(5) 查氏琼脂培养基 (czapek agar, CA) NaNO₃ 3 g; K₂HPO₄ 1 g; MgSO₄·7H₂O 0.5 g; KCl 0.5 g; FeSO₄·7H₂O 0.01 g; ZnSO₄·7H₂O 0.01 g; CuSO₄·7H₂O 0.005 g; 蔗糖 30 g; 琼脂 20 g; 蒸馏水 1 000 mL。

(6) 查氏酵母膏琼脂培养基 (czapek yeast extract agar, CYA) NaNO₃ 3 g; K₂HPO₄ 1 g; MgSO₄·7H₂O 0.5 g; KCl 0.5 g; FeSO₄·7H₂O 0.01 g; ZnSO₄·7H₂O 0.01 g; CuSO₄·7H₂O 0.005 g; 蔗糖 30 g; 酵母膏 5 g; 琼脂 20 g; 蒸馏水 1 000 mL。

1.2 模拟糖蜜酒精废水色素类黑精的制备

取 1 mol 葡萄糖、1 mol 甘氨酸和 0.5 mol 碳酸钠溶于 1 L 水中, 121℃ 反应 3 h, 冷却后调节 pH 至 7.0, 采用截留分子量 8 000 ~ 14 000 的透析袋自来水中透析 2 d, 蒸馏水中透析 1 d, 收集未透析部分即得类黑精色素溶液^[10]。

1.3 脱色微生物初筛

取土样 10 g, 加入 90 mL 无菌水混匀后, 按稀释度 10⁻¹ ~ 10⁻⁷ 进行梯度稀释, 每个稀释度取样 0.2 mL 涂布于含色素平板培养基上, 每个稀释度涂布 2 个平板, 放入 28℃ 培养箱中培养, 每隔 2 d 取出观察, 将有脱色圈的菌落进一步平板划线分离, 挑取单菌落转接斜管保藏, 细菌保藏用 LB 培养基, 真菌用 PDA 培养基。

1.4 脱色微生物复筛

(1) 类黑精摇瓶培养基复筛 将保藏的菌株转接至类黑精摇瓶培养基中 (30 mL 装液量/150 mL 锥形瓶), 39℃, 150 r·min⁻¹ 振荡培养 4 d, 取样 2

mL, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 1 mL, 10 倍稀释后测 475 nm 下吸光度, 与未接种的空白摇瓶对照, 计算脱色率. 将具有脱色能力的菌株进一步转接斜管保藏备用.

(2) 糖蜜酒精废水摇瓶培养基复筛 将有脱色类黑精能力的菌株接种至糖蜜酒精废水摇瓶培养基中, 培养基条件同类黑精摇瓶培养条件, 具有脱色能力的菌株即为目的菌株.

1.5 脱色微生物的鉴定

(1) 形态学分析 将菌株接种于查氏琼脂培养基和查氏酵母膏琼脂培养基, 培养一定天数后, 观察菌落形态. 挑取少许菌体制作显微形态观察切片, 于普通光学显微镜下观察产孢结构.

(2) 基因组 DNA 的提取 采用苯酚-氯仿法提取 DNA.

(3) PCR 扩增及 ITS (Internal transcribed spacer, ITS) 序列测定 PCR 扩增采用真菌 ITS 序列扩增通用引物^[22] ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 进行扩增. PCR 反应体系: $10\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL , dNTP ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , 引物 ITS1 和 ITS4 各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , *Taq* 酶 0.1 μL , 双蒸水 18.4 μL . 反应条件: 95°C 1 min, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 循环 30 次; 72°C 10 min. PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 扩增的 ITS 序列送至上海生工生物工程技术有限公司测序.

(4) 系统发育树构建 根据 ITS 序列测序结果, 以 NCBI 中 Blast 程序进行同源性比对分析, 从 GenBank 中选取曲霉属 18 个菌株的 ITS 序列用于系统发育分析. 使用 MEGA4.1 中的 CLUSTAL 软件包进行完全序列比对, 使用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 选择 p-distance 计算进化距离, 1 000 次重复抽样, 自举检验法评估系统发育树的置信度.

1.6 菌株 A5P1 脱色性能分析

(1) 孢子悬液制备 取培养 5 d 的试管斜面, 用 0.5% Tween80 溶液冲洗孢子, 倒入装有玻璃珠的摇瓶, 振荡分散孢子, 过滤得孢子悬液, 血球计数板测定孢子悬液浓度.

(2) 菌株 A5P1 脱色性能分析 采用糖蜜酒精废水摇瓶培养基, 调至 $A_{475}\approx 3.5$, 装液量 60 mL/250 mL 摇瓶. 接种一定量孢子悬液于糖蜜酒精废水摇瓶培养基中, 39°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养. 每天取样 1 瓶检测.

1.7 菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水机制初探

采用岛津高效液相色谱仪 CBM-10A, 柱为凝胶过滤色谱柱 (TSK-Gel G3000PW XL, 7.8 mm $\times$ 30 cm; Tosoh, Tokyo)^[23], 可见光检测器 SPD-10A, 检测波长为 475 nm. 柱先用纯水平衡然后以相同流动相常温条件下以 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速洗脱, 进样量 20 μL . 采用凝胶过滤色谱法 (GFC) 测试脱色前后糖蜜酒精废水中色素相对分子质量的分布, 根据脱色前后色素相对分子质量分布变化推测可能的脱色机制.

1.8 脱色相关酶活力测定

(1) 漆酶酶活 总反应体系 3 mL, 1.2 mL 培养过滤液, 1.5 mL $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 5.0), 300 μL $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 溶液, 37°C 反应, 每分钟测定 420 nm 条件下吸光度的变化. 一个酶活力单位定义为每分钟内氧化 1 μmol ABTS 所需要的酶量^[24].

(2) 不依赖锰的锰过氧化物酶酶活^[11] 在 H_2O_2 存在下, 利用漆酶的测定方法测定. 一个酶活力单位定义为每分钟内氧化 1 μmol ABTS 所需要的酶量.

(3) 产过氧化氢酶酶活^[11] 收集经糖蜜酒精废水摇瓶培养基培养的湿菌球 0.5 ~ 1.0 g, 用含有 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 6.0), $5.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖, $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酚红的酚红溶液 20 mL 洗涤菌球 2 次, 将洗后的菌球转移至 20 mL 酚红溶液中, 加入 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 辣根过氧化物酶, 28°C , $110\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡反应 20 min, 过滤后加入 0.3 mL $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 终止反应, 测定 610 nm 下的吸光度, 相同条件下以不加辣根过氧化物酶组作空白对照. 一个酶活力单位定义为每分钟内产生 1 μmol H_2O_2 所需要的酶量.

1.9 分析方法

(1) 脱色率测定 取 1 mL 经抽滤的培养液, 用乙酸-乙酸钠缓冲液 ($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.0) 10 倍稀释, 可见分光光度计测脱色前后 475 nm 处吸光度的变化. 脱色前吸光度为 A_0 , 脱色后吸光度为 A_1 ^[21].

$$\text{脱色率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

(2) 细胞干重测定 取出摇瓶培养基, 用已称重的干燥滤纸抽滤, 去离子水洗涤菌体 3 次, 将滤纸和菌体一起放入烘箱, 105°C 烘干 12 h, 干燥器中

冷却后称重，减去滤纸重量，即得细胞干重^[25]。
(3) 还原糖测定 3,5-二硝基水杨酸法^[26]。

2 结果与分析

2.1 脱色微生物筛选

经类黑精色素平板培养基初筛从采集的土壤样品中共分离获得 77 株菌，以类黑精摇瓶培养基进行复筛，其中 6 株菌显示出类黑精脱色活性；进一步采用糖蜜酒精废水原液进行脱色测试，发现 4 株具有废水脱色能力，结果如表 1。菌株 A5P1 脱色活性最高，因此选择菌株 A5P1 进行鉴定和脱色特性研究。

2.2 脱色微生物鉴定

2.2.1 形态特征

菌株 A5P1 在查氏琼脂 (CA) 上 [如图 1 (a)] 25℃ 培养 7 d 直径达 40 mm，菌落黄绿色，质地丝绒状，中心凸起呈絮状，分生孢子多，初期黄色，后期变草绿色，菌落反面无色。在查氏酵母膏琼脂 (CYA) 上 [图 1 (b)] 生长迅速，菌落草绿色，25℃ 培养 7 d 直径达 76 mm，菌落反面淡黄褐色，

表 1 糖蜜酒精废水脱色微生物筛选结果

Table 1 Screening of microorganisms for decolorization of molasses spent wash

菌株编号	类黑精脱色率/%	糖蜜酒精废水脱色率/%
A5P1	60.36	36.59
BP1	47.92	17.07
F12	38.39	29.09
B54	12.50	6.91
B14	16.67	Not detected
D41	14.33	Not detected

有黑褐色斑点。
在光学显微镜下，菌株 A5P1 的分生孢子头呈辐射型，分生孢子梗粗糙，顶囊多为球形，产孢结构单层或双层 [图 1 (c)]，分生孢子多为球形或近球形，直径 3.5 ~ 5 μm，壁稍粗糙 [图 1 (d)]。根据文献 [27,28] 曲霉属黄绿组中的形态描述，初步判断菌株 A5P1 为黄曲霉原变种中的一种。
2.2.2 ITS 序列测序及系统发育树构建
PCR 扩增获得了一条大小约为 540 bp 左右序列，ITS 序列测序结果为 538 bp，与实验结果相符。将 ITS 序列测序结果提交 GenBank，登录号为 HQ620618，以 NCBI 中 Blast 程序进行同源性比对

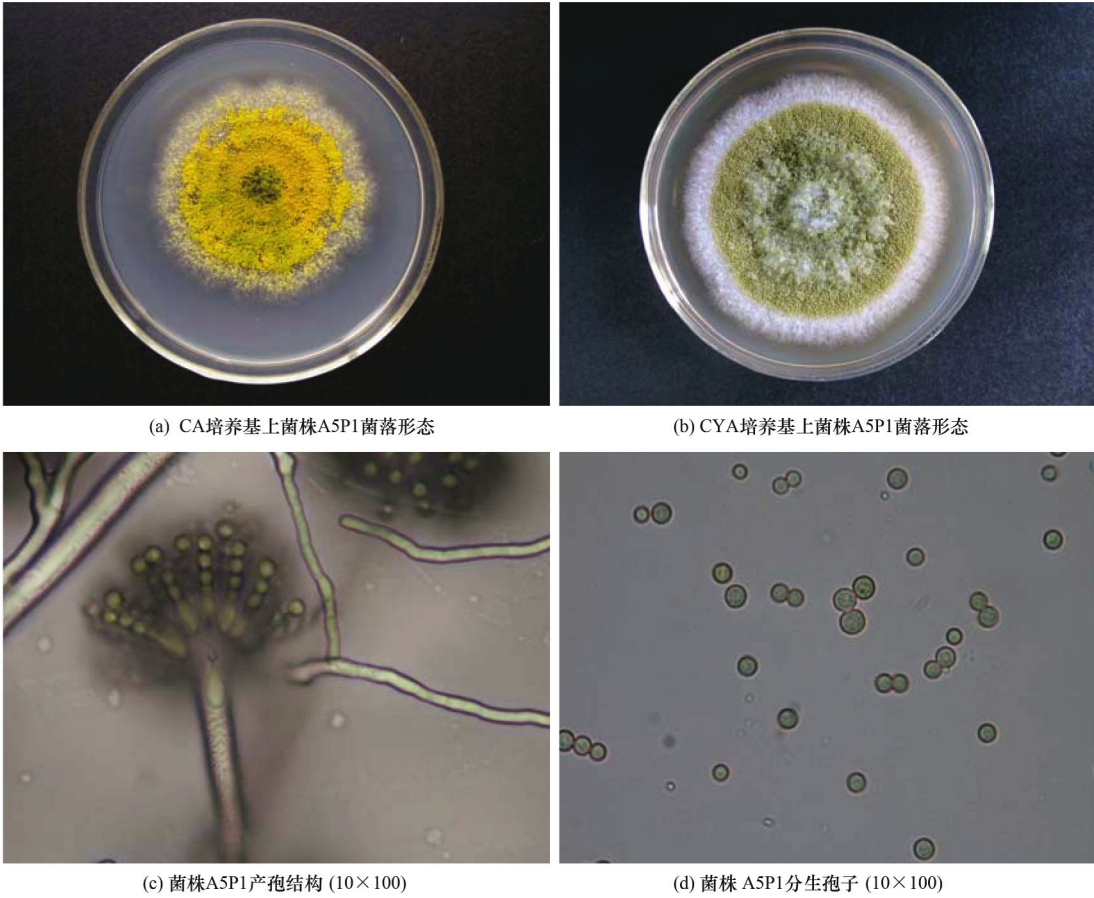


图 1 菌株 A5P1 的形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of strain A5P1

分析, 菌株 A5P1 与 GenBank 中登录号为 FJ878674.1 的菌株 *Aspergillus flavus* 和登录号为 GU120193.1 的菌株 *Aspergillus oryzae* 的 ITS 序列同源性均为 100%。从 GenBank 中选取曲霉属 18 个菌株的 ITS 序列用于系统发育分析。系统发育树结果如图 2, 结果显示菌株 A5P1 与黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的亲缘关系较近, 在 100% bootstrap 水平上属于同一分支, 结合形态学分析, 将菌株 A5P1 鉴定为黄曲霉, 命名 *Aspergillus flavus* A5P1。

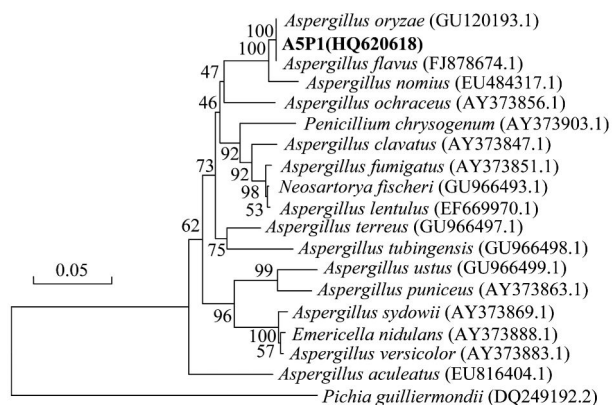


图 2 菌株 A5P1 基于 ITS 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the ITS sequence of strain A5P1

2.3 接种量对菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水的影响

分别考察了孢子悬液接种浓度为 4.3×10^3 、 4.3×10^4 和 4.3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 对菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水的影响。接种量对菌株 A5P1 脱色的影响如图 3, 从中可得, 接种量为 4.3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 时脱色率最高, 4 d 培养脱色率达到 50.90%, 接种量为 4.3×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 4 d 培养脱色率达到 50.12%, 当接种量为 4.3×10^3 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 5 d 培养脱色率最大, 达 48.19%, 说明接种量不仅影响脱色效率还影响脱色速率, 但接种量进一步增大, 并不能显著改进脱色率, 因此接种量 4.3×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 为最适接种量。

2.4 环境条件对菌株 A5P1 生长和脱色性能的影响

2.4.1 pH 的影响

分别在 pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0 下考察菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水和菌株生长。结果如图 4, 从中可得, 在 pH 4.5~7.0 较宽的范围都可以得到较好的脱色效果, 脱色率达到 50% 左右。随着初始 pH 升高, 生物量逐渐增大, pH 4.0 时生物量最小, 只有少量菌球, 说明此种 pH 条件下抑制了菌体生长, 脱色率最低; pH 4.5~7.0 条

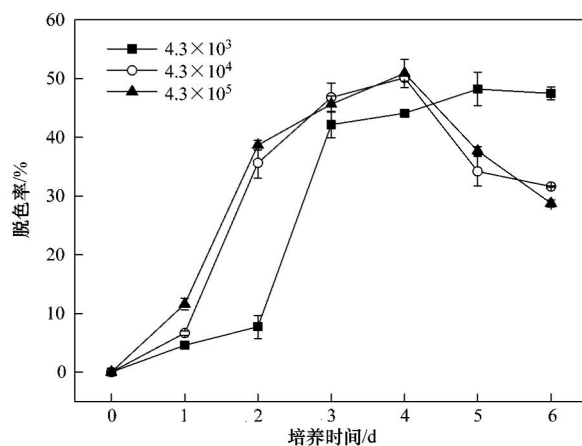


图 3 接种量对菌株 A5P1 脱色 MSW 的影响

Fig. 3 Effect of inoculum size on the decolorization of MSW by strain A5P1

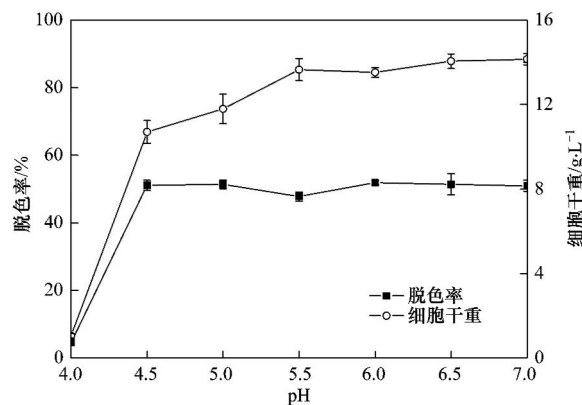


图 4 培养基 pH 对菌株 A5P1 脱色率和生物量的影响

Fig. 4 Effect of medium pH on the decolorization efficiency and biomass of strain A5P1

件下菌体大量生长, 说明菌株对 pH 有较广的适应范围。国外研究者^[29]在研究黄曲霉降解偶氮染料过程中也发现, 在酸性条件下都可得到较好的降解效果。由于糖蜜酒精废水初始 pH 为 4.21, 综合考虑调节 pH 用碱量、脱色率和菌体生长状态等因素, 选择培养基最佳初始 pH 为 4.5。

2.4.2 温度的影响

分别在 28、30、35、39、45、50℃ 培养条件下考察菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水和菌株生长。结果如图 5, 从中可得, 28~39℃ 条件下, 4 d 培养菌株 A5P1 脱色率都可达到 50% 左右, 39℃ 时脱色率最高。董新姣等^[30]在考察温度对黄曲霉脱色染料的影响中也表明温度对脱色影响不大。生物量随着温度升高逐渐增加, 35℃ 时生物量最大, 39℃ 时生物量略有减少, 之后随着温度升高, 菌体不能生长, 脱色率也降至 0。

2.5 菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水进程

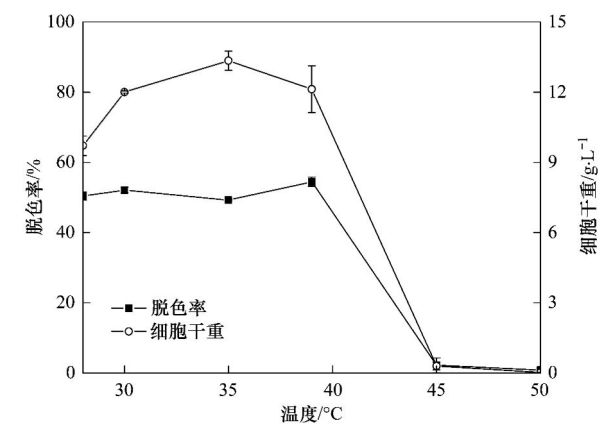


图5 温度对菌株 A5P1 脱色率和生物量的影响

Fig.5 Effect of temperature on the decolorization efficiency and biomass of strain A5P1

菌株 A5P1 对糖蜜酒精废水脱色进程结果如图 6, 随着培养进行, 脱色率逐渐增大, 培养 4 d 脱色率最大达 53.0%, 之后脱色率开始下降; COD 值逐渐降低, 培养 4 d 后 COD 减少约 80%; 生物量逐渐增加, 4 d 之后进入平衡期; 培养基 pH 随着培养进行一直升高. 由图 6 可知, 脱色率变化和生物量变化有一定相关性, 前期随着生物量增多, 脱色率逐渐升高, 后期脱色率降低, 分析是由于培养 4 d 后营养物质消耗完全, 菌球表面出现自溶, 菌球吸附的部分色素解吸出来, 取出摇瓶观察也发现 4 d 后摇瓶中有絮状菌丝片段. 后期生物量增加但脱色率并未增加, 生物量变化和脱色率变化不完全一致, 说明脱色过程可能存在不同的作用机制.

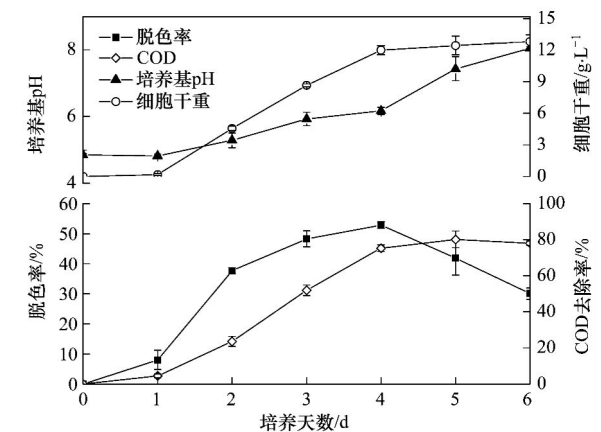


图6 菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水进程曲线

Fig.6 Time course of decolorization of molasses spent wash by strain A5P1

2.6 菌株 A5P1 脱色糖蜜酒精废水机制初探

根据文献[2]的报道结果, 生物脱色机制可以是生物吸附或生物降解. 为了确定菌株 A5P1 脱色

机制, 对脱色前后的糖蜜酒精废水进行凝胶过滤色谱分析, 结果如图 7. 从中可知, 脱色前后糖蜜酒精废水色素相对分子质量分布发生明显变化, 整体峰形改变, 说明菌株 A5P1 不仅可脱色糖蜜酒精废水色素中大分子质量组分, 对小分子质量组分也有消减作用. 收集脱色过程中的菌体细胞进行几种常见的脱色关联酶的酶活测定, 如表 2 所示, 发现在菌体中存在产过氧化氢酶、漆酶和不依赖锰的锰过氧化物酶等脱色相关酶活, 因此初步判断菌株 A5P1 具有生物降解脱色能力.

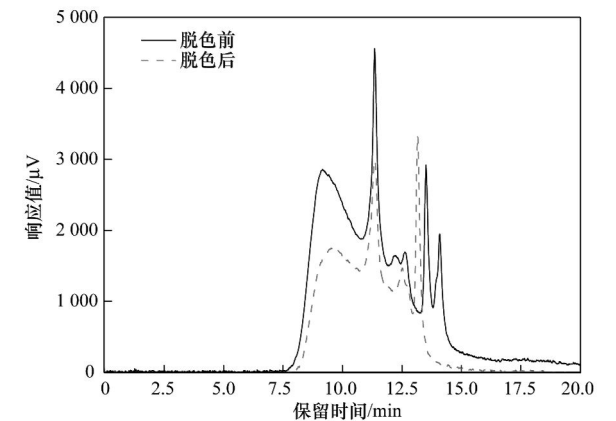


图7 MSW 脱色前后凝胶过滤色谱

Fig.7 Gel filtration chromatograms of MSW before and after decolorization by strain A5P1

表 2 菌株 A5P1 脱色过程中的酶活测定	
Table 2 Measurement of enzyme activity during the decolorization process mediated by strain A5P1	
酶种类	最大酶活/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
漆酶	15
不依赖锰的锰过氧化物酶	5
产过氧化氢酶	28

此外在实验过程中发现菌球经洗涤后由深色转为白色, 洗涤液变深, 认为是部分色素被洗脱下来; 后以灭活菌球进行脱色测试, 发现其对糖蜜酒精废水能达到 8% ~10% 的脱色率, 认为菌株 A5P1 也具有一定的吸附脱色能力.

3 讨论

类黑精是糖蜜酒精废水中的主要色素种类之一, 其相对分子质量分布广, 结构复杂, 具有强抗氧化性和细胞毒性, 传统活性污泥法很难有效降解^[2, 3]. 在脱色微生物筛选^[2]时相关报道多以天然的^[21]或合成的类黑精^[6]为目标底物, 或仅以经厌氧处理过的糖蜜酒精废水^[13]为底物. 在本研究中

则是采用以合成类黑精脱色为初筛模型、以未处理过的糖蜜酒精废水脱色为复筛模型的筛选策略,以获得既有利于主要污染物——类黑精的脱除、又能适应废水条件、具有综合脱色能力的菌株。从结果看,6株具有类黑精脱色能力的微生物中仅有4株可脱色未经处理的实际糖蜜酒精废水,可见与文献报道类似,废水组成可能会影响菌株的脱色效率,而且菌株对2种体系的脱色效率不成正比,如菌株BP1和F12对合成类黑精的脱色率分别为47.92%和38.39%,但是F12对实际糖蜜废水的脱色率高于BP1。最终选择对类黑精和实际废水脱色效率均较高的A5P1为后续研究菌株。

目前报道的具有较好糖蜜酒精废水脱色能力的微生物以曲霉属真菌为多,如Pant等^[24]使用1株黄曲霉对厌氧处理后的糖蜜酒精废水进行脱色,28d脱色率达到75%,Singh等^[15]优化了黑曲霉脱色经聚合氯化铝预处理的厌氧消化后糖蜜酒精废水的条件。本研究中的菌株A5P1则属于黄曲霉(*Aspergillus flavus*)。与一些报道的菌株^[4]相比,虽然A5P1的脱色率不是最高,但是它可直接用于未经厌氧处理的糖蜜酒精废水的脱色,而且培养时间短,对培养基无限制要求,有较宽的pH和温度适应范围,因此有着一定的应用价值。如国内报道的云芝菌对模拟糖蜜酒精废水的脱色率可达到70%,但对3倍稀释的糖蜜酒精废水原液基本不能脱色,5倍稀释废水的脱色率为50%^[17];菌株A5P1对未处理糖蜜酒精废水的4d脱色率为53.0%,还能降低废水的COD值。在后续研究中将进一步通过代谢调控优化,培养基优化,固定化技术等手段强化脱色效果。

生物脱色的机制主要分为生物吸附和生物降解两类。文献报道米曲霉^[9]、丝核菌^[10]等具有吸附脱色类黑精能力;生物降解一般则认为是微生物分泌的木质素过氧化物酶类和糖氧化酶^[2]等酶的作用,如利用木质素降解酶类可脱色厌氧消化过的糖蜜酒精废水^[31]。由于糖蜜酒精废水中色素种类繁多,又无法确定其分子结构,一些文献也从色素物质相对分子质量分布来分析脱色机制,如希式乳杆菌^[6]主要作用于类黑精中小相对分子质量组分,东方伊萨酵母^[32]则对糖蜜色素溶液中较大相对分子质量组分起作用,小相对分子质量组分仍留在溶液中。本研究中菌株A5P1不仅脱色糖蜜酒精废水色素中大相对分子质量组分,也脱色小相对分子质量组分。在对脱色关键酶的初步研究中发现此菌株中至少存

在产过氧化物酶、漆酶和不依赖锰的锰过氧化物酶等相关酶,这可进一步说明生物降解作用的存在。而灭活细胞对废水色素的吸附作用则属于物理作用,但是其脱色率仅有10%。因此对于脱色机制,初步认为是以生物降解为主。在未来工作中将对菌株脱色关键作用酶系和影响因素做深入研究,从而为调控和优化糖蜜酒精废水的生物脱色过程打下理论基础。

4 结论

(1)从采集土壤样品中共分离获得了6株具有脱色能力的微生物,其中菌株A5P1对未处理的糖蜜酒精废水显示了较好的脱色性能,经形态学和ITS序列分析鉴定为黄曲霉(*Aspergillus flavus*)。

(2)菌株A5P1在接种量 4.3×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,培养基初始pH4.5,培养温度39℃条件下对未处理的糖蜜酒精废水4d培养脱色率可达到53.0%,COD减少80%。

(3)凝胶过滤色谱结果表明菌株A5P1既可脱除糖蜜酒精废水色素中大分子质量组分,又可减少小分子质量组分含量。菌体细胞中至少存在产过氧化物酶、漆酶和不依赖锰的锰过氧化物酶等脱色关联酶,初步认为菌株脱色机制主要为生物降解作用。

参考文献:

- [1] 吴振强,梁世中. 糖蜜酒精蒸馏废液色素研究[J]. 环境污染与防治, 2002, 24(1): 13-15, 18.
- [2] Naik N M, Jagadeesh K S, Alagawadi A R. Microbial decolorization of spentwash: a review [J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(1): 41-18.
- [3] Chandra R, Bharagava R N, Rai V. Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4648-4660.
- [4] Pant D, Adholeya A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(12): 2321-2334.
- [5] Satyawali Y, Balakrishnan M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review [J]. Journal of Environmental Management, 2008, 86(3): 481-497.
- [6] Ohmomo S, Daengsubha W, Yoshikawa H, et al. Screening of anaerobic bacteria with the ability to decolorize molasses melanoidin[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(10): 2429-2435.
- [7] Francisca Kalavathi D, Uma L, Subramanian G. Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181[J]. Enzyme

- and Microbial Technology, 2001, **29**(4-5): 246-251.
- [8] Limkhuansuwan V, Chaiprasert P. Decolorization of molasses melanoidins and palm oil mill effluent phenolic compounds by fermentative lactic acid bacteria [J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, **22**(8): 1209-1217.
- [9] Ohmomo S, Kainuma M, Kamimura K, *et al.* Adsorption of Melanoidin to the Mycelia of *Aspergillus oryzae* Y-2-32 [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, **52**(2): 381-386.
- [10] Sirianuntapiboon S, Sihanonth P, Somchai P, *et al.* An absorption mechanism for the decolorization of melanoidin by *Rhizoctonia* sp. D-90 [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, **59**(7): 1185-1189.
- [11] Miyata N, Iwahori K, Fujita M. Manganese-independent and-dependent decolorization of melanoidin by extracellular hydrogen peroxide and peroxidases from *Coriolus hirsutus* pellets [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, **85**(5): 550-553.
- [12] Dahiya J, Singh D, Nigam P. Decolourisation of synthetic and spentwash melanoidins using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40 [J]. Bioresource Technology, 2001, **78**(1): 95-98.
- [13] Pazouki M, Shayegan J, Afshari A. Screening of microorganisms for decolorization of treated distillery wastewater [J]. Iranian Journal of Science & Technology, Transaction B, Engineering, 2008, **32**(B1): 53-60.
- [14] Ghosh M, Ganguli A, Tripathi A K. Decolorization of anaerobically digested molasses spent wash by *Pseudomonas Putida* [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, **45**(1): 68-73.
- [15] Singh S S, Dikshit A K. Optimization of the parameters for decolourization by *Aspergillus niger* of anaerobically digested distillery spentwash pretreated with polyaluminium chloride [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, **176**(1-3): 864-869.
- [16] 陈沃洪, 赵继伦. 云芝用于糖蜜废水脱色处理的研究 [J]. 现代食品科技, 2009, **25**(5): 487-490.
- [17] 冉艳红, 于淑娟. 蕈菌云芝用于酒精废液生物漂白及收获菌丝体的研究 [J]. 现代化工, 2004, **24**(4): 43-47.
- [18] 冉艳红, 于淑娟, 杨连生, 等. 云芝菌用于糖厂废水生物脱色及生产多糖的研究 [J]. 华南理工大学学报 (自然科学版), 2003, **31**(3): 40-44.
- [19] Ohmomo S, Kaneko Y, Sirianuntapiboon S, *et al.* Decolorization of molasses waste water by a thermophilic strain, *Aspergillus fumigatus* G-2-6 [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, **51**(12): 3339-3346.
- [20] Sirianuntapiboon S, Phothilangka P, Ohmomo S. Decolorization of molasses wastewater by a strain No. BP103 of acetogenic bacteria [J]. Bioresource Technology, 2004, **92**(1): 31-39.
- [21] Sirianuntapiboon S, Somchai P, Ohmomo S, *et al.* Screening of filamentous fungi having the ability to decolorize molasses pigments [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, **52**(2): 387-392.
- [22] 孙端方, 冉雪琴, 王嘉福. 一株产紫杉醇罗汉松内生真菌的分离和鉴定 [J]. 微生物学报, 2008, **48**(5): 589-595.
- [23] Nakajima-Kambe T, Shimomura M, Nomura N, *et al.* Decolorization of molasses wastewater by *Bacillus* sp. under thermophilic and anaerobic conditions [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, **87**(1): 119-121.
- [24] Pant D, Adholeya A. Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation [J]. Biodegradation, 2007, **18**(5): 647-659.
- [25] Sirianuntapiboon S. Some properties of *Coriolus* sp. No. 20 for removal of color substances from molasses waste water [J]. Thammasat International Journal of Science and Technology, 1998, **3**(2): 74-79.
- [26] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, **31**(3): 426-428.
- [27] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 132-134.
- [28] 齐祖同. 中国真菌志 (第五卷曲霉属及其相关有性型) [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 28-31, 78-80, 103-104.
- [29] Esmacili A, Kalantari M. Bioremoval of an azo textile dye, Reactive Red 198, by *Aspergillus flavus* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, **28**(3): 1125-1131.
- [30] 董新姣, 陈艳乐. 黄曲霉对酞菁染料脱色研究 [J]. 浙江师大学报 (自然科学版), 2000, **23**(1): 60-63.
- [31] Pant D, Adholeya A. Concentration of fungal ligninolytic enzymes by ultrafiltration and their use in distillery effluent decolorization [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, **25**(10): 1793-1800.
- [32] Tondee T, Sirianuntapiboon S, Ohmomo S. Decolorization of molasses wastewater by yeast strain, *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246 [J]. Bioresource Technology, 2008, **99**(13): 5511-5519.

CONTENTS

CH ₄ Concentrations and the Variation Characteristics at the Four WMO/GAW Background Stations in China	FANG Shuang-xi, ZHOU Ling-xi, XU Lin, <i>et al.</i> (2917)
Characteristics of Stable Isotopes in Precipitation over Northeast China and Its Water Vapor Sources	LI Xiao-fei, ZHANG Ming-jun, MA Qian, <i>et al.</i> (2924)
Study on Air Quality and Pollution Meteorology Conditions of Guangzhou During the 2010 Asian Games	LI Ting-yuan, DENG Xue-jiao, FAN Shao-jia, <i>et al.</i> (2932)
Characteristics and Sources of PM ₁₀ -bound PAHs During Haze Period in Winter-Spring of Xiamen	QIAN Ran-ran, YAN Jing-ming, WU Shui-ping, <i>et al.</i> (2939)
Improvement and Application of the Method for Determination of OCEC Split	WANG Li-hua, DONG Hua-bin, YAN Cai-qing, <i>et al.</i> (2946)
Characteristics of Mercury Pollution in Soil and Atmosphere in Songhua River Upstream Jia-pi-gou Gold Mining Area	ZHANG Gang, WANG Ning, WANG Yuan, <i>et al.</i> (2953)
Pollution Characteristics and Health Assessment of Particulate Mercury in Hebei Rural Households	ZHAO Ya-juan, GONG Wei-wei, LUAN Sheng-ji (2960)
Composition and Characteristics of Volatile Organic Chemicals Emission from Printed Circuit Board Factories	MA Ying-ge (2967)
Preliminary Study Concerning Emissions of the Volatile Organic Compounds from Cooking Oils	HE Wan-qing, TIAN Gang, NIE Lei, <i>et al.</i> (2973)
Characteristics of Biofilm Phase During the Long-term Degradation of a Toluene-contaminated Gas Stream Using BTF	HU Jun, ZHENG Jiang-ling, WU Yue-xin, <i>et al.</i> (2979)
Performance of Cross Flow Trickling Filter for H ₂ S Gas Treatment	LIU Chun-jing, LI Jian, LIU Jia, <i>et al.</i> (2987)
Study on Mercury Re-emissions During Fly Ash Utilization	MENG Yang, WANG Shu-xiao (2993)
Construction of Semi-analytical Model for Inversing Total Suspended Matter in Lake Taihu and Chaohu and Assessment of Its Applicability	LIU Zhong-hua, LI Yun-mei, TAN Jing, <i>et al.</i> (3000)
Association Study Between Water Quality of Chaohu Lake and Resources Input in Agriculture of Basin	ZHANG Yan, GAO Xiang, ZHANG Hong (3009)
Sediment and Pore Water Nutrient Characteristics in Growing Zones of <i>Alternanthera philoxeroides</i> in the Shiwuli River, Chaohu Lake	LI Ru-zhong, LI Feng, ZHOU Ai-jia (3014)
Enrichment Characteristic of Phosphorus in Surface and Core Sediments of Chaohu Lake and the Pollution Quantification	LIU En-feng, DU Chen-chang, YANG Xiang-dong, <i>et al.</i> (3024)
Spatial Distribution Characteristics and Correlation Analysis of Organic Matter, Total Nitrogen and Total Phosphorus in Topsoil Around Chaohu Lake	CHEN Shu-qin, CHU Zhao-sheng, HU She-rong, <i>et al.</i> (3031)
Dynamic Characteristics of Nitrogen and Phosphorus in the Representative Input Tributaries of Danjiangkou Reservoir	LEI Pei, ZHANG Hong, SHAN Bao-qing (3038)
Effects of Thermal Stratification on Spring Blooms in Xiangxi Bay of the Three Gorges Reservoir	LIU Liu, LIU De-fu, XIAO Shang-bin, <i>et al.</i> (3046)
Explore the Spatial and Temporal Patterns of Water Pollution in the Yincungang Canal of the Lake Taihu Basin, China	YANG Xiao-ying, LUO Xing-zhang, ZHENG Zheng, <i>et al.</i> (3051)
Analysis on the Forms and Release Potential of Nutrients in Sediments from Lakes in the West Jiangsu Province	LIU Tao, HU Zhi-xin, YANG Liu-yan, <i>et al.</i> (3057)
Spatial Distribution and Evaluation of Nitrogen, Phosphorus and Organic Matter in Surface Sediments from Western Lakeside Belt of Lake Taihu	GAN Shu, LU Shao-yong, QIN Pu-feng, <i>et al.</i> (3064)
Source Apportionment of Nitrogen and Phosphorus from Cropping Non-point Source Pollution in Nansi Lake Basin	LIU Jing, LU Feng, YANG Yan-zhao, <i>et al.</i> (3070)
Relationship Between Dissolved Organic Carbon and DBP in the Pearl River Water	HE Hong-wei, ZHOU Da-cheng, WANG Bao-qiang, <i>et al.</i> (3076)
Health Risk Assessment of Heavy Metals in Typical Township Water Sources in Dongjiang River Basin	WANG Ruo-shi, XU Qiu-jin, ZHANG Xian, <i>et al.</i> (3083)
Halogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments of Maozhou River, Shenzhen	SUN Jian-lin, NI Hong-gang, DING Chao, <i>et al.</i> (3089)
Distribution Patterns of Heavy Metals in Surficial Sediment and Their Influence on the Environment Quality of the Intertidal Flat of Luoyuan Bay, Fujian Coast	GAO Wen-hua, DU Yong-fen, WANG Dan-dan, <i>et al.</i> (3097)
Study on the Changes of Macrobenthos Communities and Their Causes in Bohai Bay	CAI Wen-qian, LIU Lu-san, QIAO Fei, <i>et al.</i> (3104)
Construction of Groundwater Contamination Prevention Mapping System	WANG Jun-jie, HE Jiang-tao, LU Yan, <i>et al.</i> (3110)
Uncertainty Analysis of Groundwater Protection and Control Zoning in Beijing Plain	LU Yan, HE Jiang-tao, WANG Jun-jie, <i>et al.</i> (3117)
Nitrate Storage and Transport Within a Typical Karst Aquifer System in the Paralleled Ridge-valley of East Sichuan	YANG Ping-heng, YUAN Dao-xian, REN You-rong, <i>et al.</i> (3124)
Adsorption of Perfluorooctanesulfonate (PFOS) onto Modified Activated Carbons	TONG Xi-zhen, SHI Bao-you, XIE Yue, <i>et al.</i> (3132)
Investigation of the Oxidation Reaction of O ₃ with Bromide Ion in Aqueous Solution	YU Xiao-ting, ZHANG Jia-hui, PAN Xun-xi, <i>et al.</i> (3139)
Determination of the Distribution of Relative Molecular Mass of Organic Matter by High Pressure Size Exclusion Chromatography with UV and TOC Detectors	ZHANG Han, DONG Bing-zhi (3144)
Black Water Bloom Induced by Different Types of Organic Matters and Forming Mechanisms of Major Odorous Compounds	LU Xin, FENG Zi-yan, SHANG Jing-ge, <i>et al.</i> (3152)
Effect of Fe and Fe/Ni Nanoparticles on the Biodegradation of Phenol by BFN at Different pH Values	KUANG Ye, ZHOU Yan, WANG Qing-ping, <i>et al.</i> (3160)
Pretreatment of High-Concentration Acrylic Acid Wastewater by the Multi-Stage Microaerobic Biological Fluidized Bed Reactor	LI Sha, ZHENG Sheng-zhi, SONG Yu-dong, <i>et al.</i> (3167)
Denitrification on Secondary Effluent of Acrylic Fiber Wastewater by Tri-Stage Biofilm Advanced Reactor	XU Shao-yang, JIANG Jin-yuan, ZHOU Yue-xi, <i>et al.</i> (3172)
Dynamic Adsorption of Cadmium (II) in Water on Modified Peanut Shells	LONG Teng, YI Xiao-yun, DANG Zhi (3177)
Adsorption Properties of Thiocyanate Anion on Granular Mg/Al Mixed Oxides	WANG Xiu-juan, WANG Hai-zeng, SUN Bao-wei, <i>et al.</i> (3182)
Model of Regularity of Ammonia Transformation Along Marine Biological Aerated Filter	LUO Rong-qiang, HOU Sha-sha, SHEN Jia-zheng, <i>et al.</i> (3189)
Aerobic Granular Sludge Bulking Due to the Lack of Nutrient and Its Recovery	ZHANG Zhu, GAO Da-wen, YUAN Xiang-juan, <i>et al.</i> (3197)
Enhanced Hydrolysis of Waste Activated Sludge by Biosurfactant	YI Xin, LUO Kun, YANG Qi, <i>et al.</i> (3202)
Enrichment and Identification of Anaerobic Ammonium Oxidation Bacteria	LIU Dong-ying, QIU Yan-ling, YUAN Xian-zheng, <i>et al.</i> (3208)
Isolation, Identification and Characterization of an Atrazine Degrading Bacterium	LI Shao-feng, ZHU Jing, LI Tie-jing (3214)
Isolation, Identification and Enzymological Characterization of a New Fungal with High Laccase Production from Agricultural Waste Composting	REN Xiu-juan, FAN Chang-zheng, LU Lun-hui, <i>et al.</i> (3220)
Screening and Identification of Microorganisms for Decolorization of Molasses Spent Wash	LI Bi-jin, LIU You-yan, HE Kai, <i>et al.</i> (3228)
Analysis of Microbial Community Structure in Lactic Acid Fermentation from Kitchen Waste	LIU Jian-guo, WANG Qun-hui, WANG Shuang, <i>et al.</i> (3236)
Effect of Covalent Functionalization on DNA Cleavage Activity and ROS Formation of Single-Walled Carbon Nanotubes	WU Ren-ren, TAO Xue-Qin, DANG Zhi, <i>et al.</i> (3241)
Research on Mercury Methylation by <i>Geobacter sulfurreducens</i> and Its Influencing Factors	ZOU Yan, SI You-bin, YAN Xue, <i>et al.</i> (3247)
Uptake Effect of Cd and Pb by Rape Under Single Cd/Pb and Cd-Pb Combined Stress	WU Wen-fei, NAN Zhong-ren, WANG Sheng-li, <i>et al.</i> (3253)
Distribution Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals in Farming Domestic Muscovy Duck Originated from Au/Cu Mining and Smelting Activities	HANG Xiao-shuai, LIANG Bin, WANG Wen-lin, <i>et al.</i> (3261)
Effects of the Environmental Hormone Cypermethrin on the Reproduction of <i>Brachionus calyciflorus</i>	DONG Xue-xing, YANG Jia-xin, LÜ Lin-lan, <i>et al.</i> (3266)
Research on Anti-Corrosion of <i>Thiobacillus</i> for the Geopolymer Solidification MSWI Fly Ash	JIN Man-tong, SUN Xin, DONG Hai-li, <i>et al.</i> (3272)
Chlorination Transformation and Volatilization of Heavy Metals in Fly Ash from the Incineration During the Disposal Process with Higher Temperature	LIU Jing-yong, SUN Shui-yu (3279)
Study on Greenhouse Gas Emissions from Urban Waste Disposal System; A Case Study in Xiamen	YU Yang, CUI Sheng-hui, LIN Jian-yi, <i>et al.</i> (3288)
Fate Analysis of NPEOs and Their Metabolites in Municipal Wastewater Plants	LIAN Jing, LIU Jun-xin (3295)

《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)

2012年9月15日 33卷 第9期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol.33 No.9 Sep. 15, 2012

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. sciencecp. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. 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: 70.00 元

国外发行代号: M 205

国 内 外 公 开 发 行