

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,杜巨昌,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,杨廷钊,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,林岍璇,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(VOSC _s)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转化特征	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)

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^{1,2,*}, 范长征^{1,2,*}, 鲁伦慧^{1,2}, 王聪^{1,2}, 曾光明^{1,2}

(1. 湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082; 2. 环境生物与控制教育部重点实验室(湖南大学), 长沙 410082)

摘要: 从农业固体废物堆肥中分离得到1株高产漆酶的新菌株, 通过对其形态特征和 ITS 序列分析, 鉴定该菌株为哈茨木霉 (*Hypocrea lixii*)。以 Cu1AF 和 Cu2R 为引物对该菌株的漆酶基因进行扩增, PCR 产物回收克隆后测序得到长度为 148 bp 的漆酶基因片段。在液体培养条件下, 菌株漆酶活力可达到 $67.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对该菌株的漆酶酶学性质初步研究显示: 漆酶相对分子质量大约为 60×10^3 , 酶反应的最适温度为 35°C , 最适 pH 为 4.0; 在 60°C 时漆酶半衰期 $> 1 \text{ h}$; 漆酶氧化 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 的米氏常数 (K_m) 值为 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 金属离子对酶活的影响很大, Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活都有抑制作用。该菌株有很好的应用潜力来作农业废物堆肥处理系统的强化菌剂。

关键词: 堆肥; 漆酶; 木霉; 漆酶基因; 酶学性质

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)09-3220-08

Isolation, Identification and Enzymological Characterization of a New Fungal with High Laccase Production from Agricultural Waste Composting

REN Xiu-juan^{1,2}, FAN Chang-zheng^{1,2}, LU Lun-hui^{1,2}, WANG Cong^{1,2}, ZENG Guang-ming^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control (Hunan University), Ministry of Education, Changsha 410082, China)

Abstract: A new fungal strain with high laccase production was isolated from the agricultural waste composting. It was identified as *Hypocrea lixii* based on morphological analysis and ITS sequence. The partial laccase gene of the new strain was successfully amplified using the primer pair Cu1AF and Cu2R. After purification and cloning of the PCR product, a 148 bp fragment of laccase gene was obtained. The laccase activity of the strain reached a peak value of $67.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ in liquid medium. The molecular mass of the purified laccase was determined to be about 60×10^3 . The optimum temperature and pH for enzyme activity were 35°C and 4.0, respectively. The half-time of the enzyme was more than 1 h at 60°C . Under standard assay conditions, K_m values was $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ towards ABTS. Laccase activity was inhibited by several metal ions, such as Na^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} . This strain has a good potential for application as a bioaugmentation strain in the agricultural waste composting system.

Key words: composting; laccase; *Trichoderma*; laccase gene; enzymological characterization

农业固体废物中含有丰富的木质素、纤维素和半纤维素, 由于木质素的难降解性及其对纤维素和半纤维素的物理保护作用, 使得木质素的降解成为影响农业废物堆肥反应速度和堆肥质量的限制性步骤^[1,2]。对堆肥过程中木质素降解微生物进行研究不仅有利于深入理解堆肥过程中木质素降解的微生物学原理, 更为后续堆肥工艺的革新(如堆肥复合菌剂的接种以提高堆肥反应速度)提供理论指导。

漆酶是种含多个铜离子的多酚氧化酶, 广泛存在于高等植物、真菌、昆虫和某些细菌中^[3]。它作为木质素降解酶系中的一员, 对木质素的降解起着十分重要的作用。目前对漆酶的研究成果主要是来自白腐真菌的研究^[4], 但是堆肥中的混合微生物群落中担子真菌(白腐真菌)很少^[5], 显然堆肥化中非担子真菌在木质素降解中起着关键作用。因此, 研

究堆肥化过程中高效优势的产漆酶非白腐菌是全面认识堆肥化过程中木质素生物降解的重要方面。

本研究从农业废物堆肥中筛选得到1株高产漆酶的菌株, 经鉴定其为哈茨木霉 (*Hypocrea lixii*), 并对该菌产生的漆酶的酶学性质及编码的基因片段进行了研究, 以期利用该菌来加速堆肥进程提供理论依据。该菌株的获得丰富了农业废物堆肥中木质素降解菌株的多样性, 并为堆肥菌剂的开发提供了菌株资源。

收稿日期: 2011-11-08; 修订日期: 2012-01-07

基金项目: 湖南省研究生创新项目; 湖南省自然科学基金项目(10JJ7005); 湖南省重大专项项目(2009FJ1010); 国家自然科学基金项目(50908079, 50978088)

作者简介: 任秀娟(1988~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为固体废物资源化及环境微生物技术, E-mail: renxiujuan@126.com

* 通讯联系人, E-mail: fancz@hnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 培养基

PDA 培养基^[6]: 去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, 琼脂 18 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然。

筛选培养基^[7]: PDA 培养基加 0.01% 愈创木酚。

液体培养基^[8]: 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, 酒石酸铵 2.21 g, 微量元素混合液 10 mL (微量元素混合液每 1 L 含甘氨酸 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CuSO_4 0.1 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.18 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, H_3BO_3 0.01 g), 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然。

1.2 菌株的分离筛选与培养

参考文献[9]来制备农业废物堆肥, 每隔 2 d 取一次堆肥样品。将堆肥样品采用梯度稀释涂布于筛选培养基上^[10], 在 30℃ 下恒温培养, 观察菌落周围培养基颜色变化情况。将有红褐色菌圈出现的菌种挑出, 在筛选培养基上再次筛选, 在 PDA 培养基上反复分离纯化至单菌落。

1.3 产漆酶菌株的鉴定

1.3.1 形态特征鉴定

将待鉴定菌株接种到 PDA 培养基上, 30℃ 插片培养, 在第 3 d 取插片, 用奥林巴斯 BX61 显微镜观察形态。

1.3.2 ITS 序列分析

采用 CTAB 法^[11]提取真菌 DNA, 采用引物 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 进行 PCR 扩增^[12]。扩增体系 50 μL , 组成为 2 $\times$ PCR master mix 25 μL , 上游引物和下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 模板 DNA 2 μL , 最后加双蒸水至 50 μL 。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用多功能纯化试剂盒 (天根, 北京) 回收纯化后, 委托上海美吉生物有限公司测序。将测定的序列提交到 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 并与数据库中已知的相关序列进行 BLAST, 并下载同源性高的序列采用 MEGA 4.0 构建系统发育树^[13]。

1.4 漆酶基因片段的研究

采用引物 Cu1AF (5'-ACM WCB GTY CAY TGG CAY GG-3') 和 Cu2R (5'-G RCT GTG GTA CCA

GAA NGT NCC-3') 进行 PCR 扩增^[14]。扩增体系为 2 $\times$ PCR master mix 25 μL , 上游引物和下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 模板 DNA 2 μL , 最后加双蒸水至 50 μL 。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 48℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 120 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用多功能纯化试剂盒 (天根, 北京) 回收纯化后, 委托上海美吉生物有限公司克隆测序。

1.5 漆酶活力的测定

将实验菌株接种至液体培养基中, 30℃、120 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 10 d。将发酵酶液经 8 层纱布过滤除去菌丝体, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4℃ 离心 5 min 得到上清液, 即为粗酶液, 将所得粗酶液进行漆酶酶活的测定。

漆酶酶活测定以 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 为底物。3 mL 反应体系含: 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 (pH = 5.0) 2 mL, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 0.5 mL, 酶液 0.5 mL。于 $\lambda = 420 \text{ nm}$ 处测吸光度变化, 1 个酶活力单位 (U) 定义为每 min 氧化 1 μmol 的 ABTS 所需的酶量 [氧化产物的消光系数 ϵ 为 $3.6 \times 10^4 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]^[7]。

1.6 菌体干重及蛋白质含量测定

在液体培养过程中, 每天吸取 10 mL 培养液, 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集菌体, 用去离子水洗 2 次, 65℃ 烘干至恒重后称量。蛋白质含量的测定采用 Bradford 方法^[15], 以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.7 漆酶的酶学性质

1.7.1 漆酶的纯化

按粗酶液体积的 1/10 量加入 100% 三氯乙酸, 4℃ 沉淀过夜, 4℃ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min 后移出上清液, 重复沉淀一次。收集全部蛋白质沉淀, 加入 5 mL 80% 冷丙酮 (含 0.07% β -巯基乙醇, -20℃ 预冷), 放置 -20℃ 冰箱中 5 h 后, 4℃ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 弃上清, 收集沉淀, 用 20 mL 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH = 6.0) 溶解沉淀, 在磷酸盐缓冲液中透析过夜。将透析后的样品 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液。DEGE-52 纤维素离子交换柱用 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH = 6.0) 平衡, 将上步得到的酶液上柱, 用含 NaCl 浓度为 0 ~ 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液进行梯度洗脱, 流速为 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。将在 280 nm 处有吸收峰的管子收集起来, 测其酶活, 收集有酶活的部分, 透析浓缩^[16,17]。将纯化后的酶蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,

其中,分离胶的浓度为 12%,浓缩胶的浓度为 5%,用考马斯亮蓝 R-250 染色,电泳及染色方法参照文献[16].

1.7.2 酶反应的最适 pH

在 30℃ 下,将纯酶液置于不同 pH(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0)缓冲液中,按 1.5 节的方法测定漆酶酶活,以最高酶活为 100%.

1.7.3 酶反应的最适温度

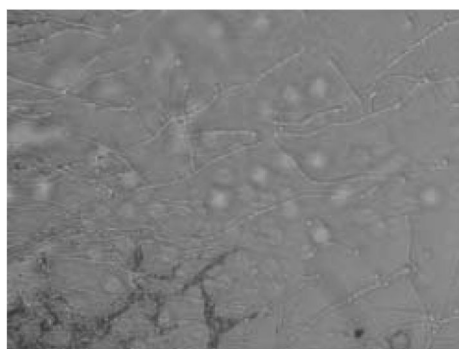
在不同温度(20、25、30、35、40、45、50℃)及最适 pH 条件下按 1.5 节的方法测定纯化后的漆酶酶活,以最高酶活为 100%.

1.7.4 酶的热稳定性

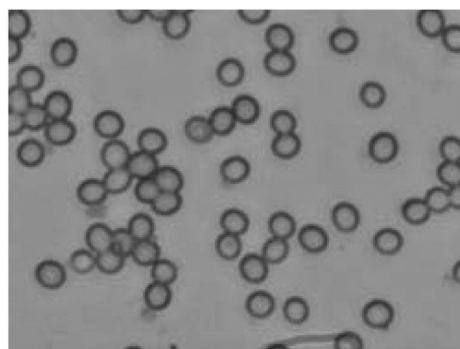
将纯酶液在 30、40、50、60、70℃ 各温度下保温不同时间(1~24 h)后,在最适 pH 条件下按 1.5 节的方法测定漆酶剩余酶活力,以最高酶活为 100%.

1.7.5 金属离子对酶活性的影响

在纯酶液中分别添加 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} ,使其终浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,保温 5 min 后在最适条件下测定漆酶酶活,以未添加金属离子的酶液的酶活为 100%.



(a) C2 的菌丝形态 ($\times 100$)



(b) C2 的分生孢子形态 ($\times 1000$)

图 1 菌株 C2 光学显微镜下形态

Fig. 1 Morphological characteristics of strain C2

2.1.2 菌株 C2 的序列分析与系统发育树的构建

菌株 C2 ITS 经测序其长度为 686 bp,在 GenBank 中的序列登录号为 HQ699075. 和其他菌株基因的同源性比较结果显示,菌株 C2 与数据库中木霉属(*Trichoderma*)关系最近,与各种木霉的相似度均在 95% 以上. 以菌株 C2、木霉属各个种为基础构建系统发育树(图 2),可以看出菌株 C2 在 ITS 序列中与 *Hypocrea lixii* (GenBank 登录号: JF304317)位于同一分支,亲缘关系最近,二者的相似度达到 98%. 根据文献[18],哈茨木霉分为有性

1.7.6 漆酶的动力学研究

以 ABTS 为底物,改变底物浓度($1/6$ 、 $1/3$ 、 $2/3$ 、 1 、 $4/3$ 、 $5/3$ 、 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),在最适温度和最适 pH 的条件下测定纯化后的漆酶在不同底物浓度时的酶活.

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定

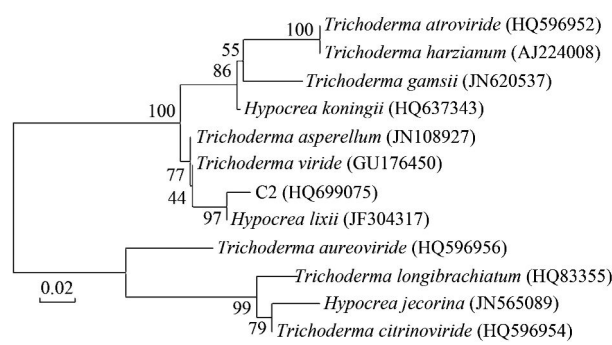
2.1.1 菌株的形态特征

将堆肥样品在筛选培养基上进行划线分离,挑取单菌落,反复纯化. 在得到产漆酶菌株中,C2 菌株在筛选培养基上生长迅速,3 d 后菌落可覆盖直径 8 cm 的平板,而且菌落周围产生的红褐色变色圈颜色深、直径大,因此选择 C2 作为进一步研究的菌株.

菌株 C2 在 PDA 培养基上生长时,菌落初呈白色绒状,后来从菌落中央产生绿色孢子,中央变成绿色,最后整个菌落全部变成绿色,反面淡黄色. 在光学显微镜下观察,C2 菌株的菌丝分枝繁复,透明无色,有明显的隔膜和分枝[图 1(a)]; C2 菌株的分生孢子呈球形或者椭圆形,孢子边缘圆滑无刺突[图 1(b)].

阶段(*Trichoderma harzianum*)和无性阶段(*Hypocrea lixii*),它的菌丝透明,孢子呈亚球形,这与菌株 C2 的形态特征相符,因此将 C2 菌株鉴定为哈茨木霉(*Hypocrea lixii*),并将其命名为 *Hypocrea lixii* sp. C2.

近年来,报道产漆酶的菌株主要有多孔菌、粗皮侧耳、毛栓菌等真菌和链霉菌等放线菌^[19],木霉菌产漆酶的报道并不多. 目前,已报道出的产漆酶木霉主要是里氏木霉、深绿木霉、绿色木霉等^[20~22],哈茨木霉产漆酶也有相关报道^[23].



分枝节点数值表示 bootstrap(1 000 次抽样)的支持百分率
图 2 菌株 C2 和其它相关菌株基于 ITS 序列的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of C2 and its related strains
based on the ITS sequence

2.2 漆酶基因片段的研究

漆酶一般含有 4 个铜离子. 漆酶蛋白质氨基酸序列同源差异性很大,但是与 4 个铜离子配位连接的 1 个半胱氨酸 (cysteine, C) 和 10 个组氨酸 (histidine, H) 及其周围的氨基酸序列非常保守^[24]. 而这 4 个铜离子结合区,即铜 I 区(cbr I)、铜 II 区(cbr II)、铜 III 区(cbr III)、铜 IV 区(cbr IV)已被确定作为漆酶的特征序列.

采用引物 Cu1AF 和 Cu2R 对 cbr I 区和 cbr II 区进行 PCR 扩增,PCR 产物回收后克隆测序,得到 148 bp 的漆酶片段,将测序结果提交到欧洲分子生物学实验室数据库(The European Molecular Biology Laboratory, EMBL)上,序列号为 HE605381. 将 *Hypocrea lixii* sp. C2 的漆酶氨基酸序列在 GenBank 进行比对,结果表明(表 1),菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 与 *Trichoderma* sp. C1 LL-2011 菌株的同源性最高,为 100%,但是与其它菌株的漆酶同源性不是很高,特别是与同种属木霉 *Trichoderma reesei* QM6a (GenBank 登录号: EGR46193)相比,同源性仅为 74%,由此可见,木霉种类不同,漆酶序列差别也较大. 经过序列比对可以发现,已报道出来的木霉漆酶序列并不多,因此对木霉漆酶基因进行研究意义很大.

通过 DNAMAN 软件将该序列与其它已报道出来的漆酶氨基酸序列进行同源性比较,结果见图 3. 图 3 中有 1 个铜离子结合区域(H-X-H),3 个铜离子结合位点(H),在 3 个组氨酸(H)之中或周围有几个氨基酸是完全相同的,例如在 17、18 位置上都是天冬氨酸 (aspartic acid, D) 和甘氨酸 (glycine, G),36 位置上酪氨酸 (tyrosine, Y). 通过序列比对和结构分析,可以确定本实验获得的序列是漆酶基因序列.

表 1 *Hypocrea lixii* sp. C2 与其它菌株漆酶氨基酸序列的同源性
Table 1 Homology of amino acid sequences for laccases from *Hypocrea lixii* sp. C2 and its related strains

GenBank 登录号	微生物来源	同源性/%
CCC33065	<i>Trichoderma</i> sp. C1 LL-2011	100
ACN22978	<i>Trichoderma hamatum</i>	84
CAF24981	Basidiomycete	83
ACL13638	<i>Calocera viscosa</i>	83
ACL13636	<i>Inocybe</i> sp. ST-2008	76
ACL13637	<i>Russula ochroleuca</i>	74
EGR46193	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	74
EFX01412	<i>Grosmannia clavigera</i> kw1407	71

2.3 漆酶的酶学性质

2.3.1 菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 液体培养

将 *Hypocrea lixii* sp. C2 接种至液体培养基中,30℃、120 r·min⁻¹恒温培养. 每天取样测定漆酶活力与菌体干重,结果如图 4 所示. 菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 在液体培养条件下,第 2 d 开始产酶,随着菌体的生长,产酶活力逐渐上升;在第 5 d 酶活达到最大值,为 67.5 U·mL⁻¹,此时菌体生长从指数期进入稳定期;之后,漆酶活力呈下降趋势,而菌体干重在第 6 d 达到最大值,随后便逐渐下降. 漆酶活力与菌体干重的下降可能是由于培养基中的营养物质被消耗以及液体培养过程中产生的微生物代谢物. 从菌体生长与产酶的关系上看,漆酶的合成与菌体的生长过程密切相关,属于生长偶联型合成. 当以 ABTS 为底物时,密孔菌属 (*Pycnoporus*) 的最大漆酶活力为 28.55 U·mL⁻¹^[25],云芝 (*Trametes versicolor*)

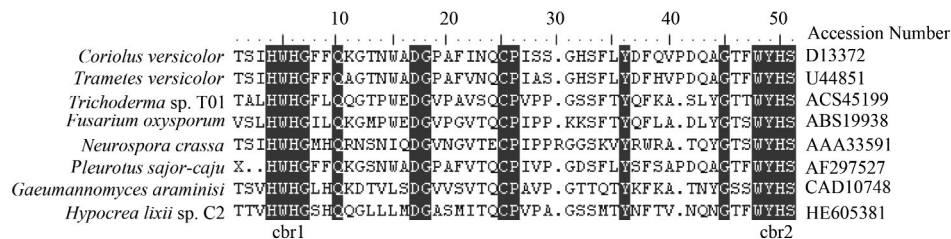


图 3 漆酶氨基酸序列 cbr I 区和 cbr II 区比对图

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of the conserved copper binding regions one (cbr I) and two (cbr II) in the laccases

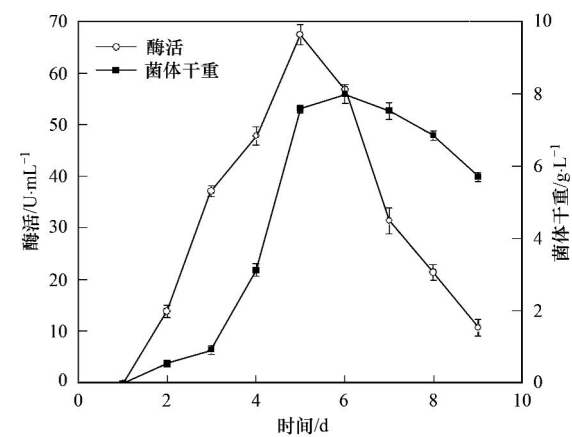


图 4 *Hypocrea lixii* sp. C2 的生长曲线和产漆酶曲线

Fig. 4 Growth and laccase production curves of *Hypocrea lixii* sp. C2

的最大漆酶活力为 $3.4\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[26], 凤尾菇 (*Pleurotus sajor-caju*) 漆酶的最大活力为 $40\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[27], 由此可

见, 菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 具有较高的漆酶活力.

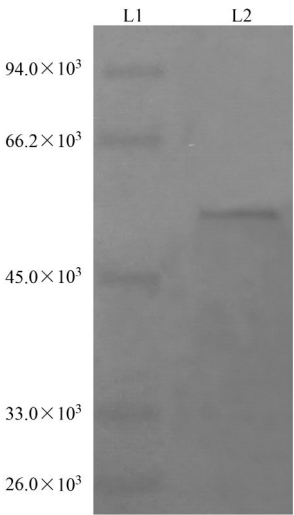
2.3.2 漆酶的分离纯化

漆酶的纯化结果见表 2. 在 DEGE-52 柱层析过程中, 在 280 nm 处有 2 个洗脱峰, 经检测, 其中一个具有较高的漆酶活性, 另一个为杂蛋白. 粗酶液经纯化后, 漆酶比活力从 $2.75\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 提高到 $36.3\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 纯化倍数为 13.2, 回收率 16.4%. 纯化的漆酶在 SDS-PAGE 图谱上呈单一条带 (图 5), 经计算, 其相对分子质量约为 60×10^3 ^[16]. 据报道, 漆酶的相对分子质量范围一般是 $50\times 10^3\sim 90\times 10^3$ ^[28], 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的漆酶相对分子质量为 67.8×10^3 ^[20], 深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) 的漆酶相对分子质量为 80×10^3 ^[21], 哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的漆酶相对分子质量为 79×10^3 ^[23], 与菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 的漆酶相对分子质量相差不大.

表 2 *Hypocrea lixii* sp. C2 漆酶的分离纯化

Table 2 Purification of laccase from *Hypocrea lixii* sp. C2

提纯步骤	总酶活/U	总蛋白含量/mg	比活力/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	10 000	3 636.4	2.75	1	100
三氯乙酸-丙酮沉淀	3 070	484.9	6.33	2.3	30.7
膜过滤	1 890	196.26	9.63	3.5	18.9
DEGE-52 纤维素离子交换柱	740	45.2	36.3	13.2	7.4



L1: 低相对分子质量蛋白标准; L2: 经纯化的漆酶蛋白

图 5 漆酶 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 SDS-PAGE of laccase

2.3.3 酶反应的最适温度和 pH

在不同温度及 pH 下测定菌株漆酶活力, 结果见图 6, 从中可以看出, 漆酶的最适 pH 为 4.0, pH 3.0~4.0 较适宜漆酶进行催化反应, 相对酶活力都在 80% 以上. 当反应体系的 pH 超过 6.0 时, 酶活

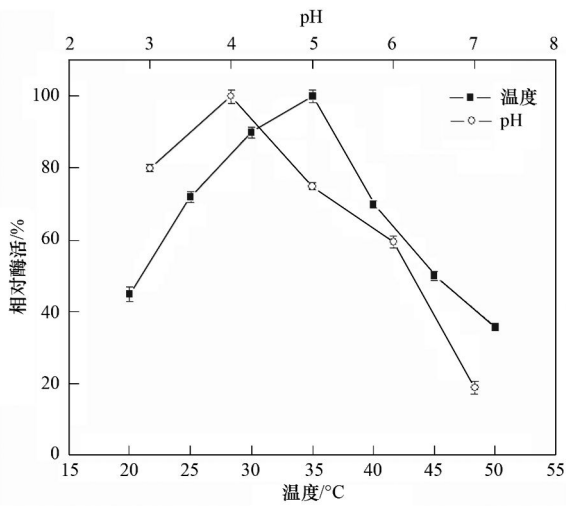


图 6 温度、pH 对漆酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature and pH on the activity of laccase

力下降较快. 酶反应最适温度为 35°C , 在 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 范围内酶活力变化不大, 超过 35°C 酶活力下降较快, 50°C 时相对酶活力仅为 36%. 一般来说, 真菌漆酶的最适温度范围是 $30\sim 50^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 范围是 $4.0\sim 6.0$ ^[20]. 据报道, 深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) 的最适温度为 50°C , 最适 pH 为 5.0 ^[21],

里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的最适温度为 45℃, 最适 pH 为 4.0^[20], 由此可见, 木霉种类不同, 其漆酶的最适温度和 pH 也不同.

2.3.4 酶的热稳定性

温度对漆酶稳定性的实验结果(图 7)表明, 在 30℃、40℃ 下保温 24 h, 酶活力损失不大. 50℃ 以上酶活力下降很快, 在 50℃ 保温 1 h 能保存 80% 的酶活, 但 24 h 后剩余酶活仅为 15%; 在 60℃ 时, 酶活的半衰期 >1 h, 保温 6 h 后酶活为 0; 70℃ 时漆酶半衰期为 30 min. 实验结果表明, 该漆酶对高温敏感. 一般来说, 真菌漆酶在 70℃ 时半衰期 <1 h, 在 80℃ 时半衰期 <10 min^[20], 这与本实验的结果相符. 不同漆酶的热稳定性差异很大, 例如, 在 60℃, 灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 漆酶迅速失活^[29], 而密孔菌属 (*Pycnoporus*) 漆酶半衰期可达到 21 h^[25]. 漆酶的热稳定性与漆酶产生菌的生活环境有关, 非洲的硬毛栓孔菌 (*Funalia trogii*) 在 50℃ 保温 2 h, 漆酶活性几乎没有变化^[29]; 而分离自白蚁巢的鸡枞菌 (*Termitomyces albuminosus*) 在 50℃ 保温 2 h 后漆酶活性就降为 0^[30].

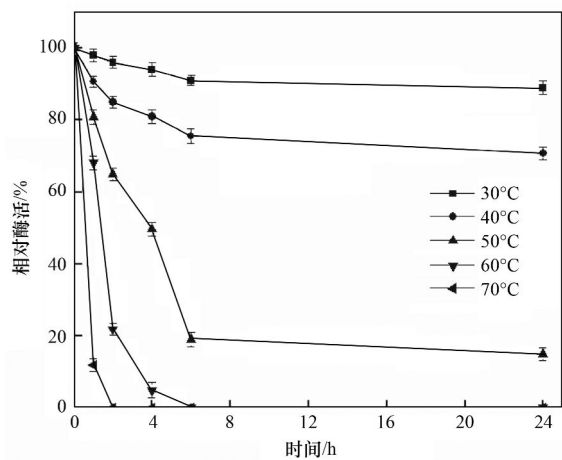


图 7 温度对漆酶稳定性的影响
Fig. 7 Effect of temperature on the stability of laccase

2.3.5 金属离子对酶活性的影响

金属离子与漆酶的相互作用对了解有毒物质的降解过程有着重要作用, 因此研究了几种金属离子对漆酶活性的影响(表 3). 实验结果表明, 当金属离子浓度为 1 mmol·L⁻¹ 时, K⁺、Mg²⁺ 对 *Hypocrea lixii* sp. C2 菌株漆酶有激活作用, Ca²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺ 对酶活力影响不大, Na⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Pb²⁺、Zn²⁺ 对酶活力都有抑制作用. 当金属离子浓度为 5 mmol·L⁻¹ 时, Cu²⁺ 对漆酶有激活作用, K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺ 对酶活力影响不大, Na⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、

Pb²⁺、Zn²⁺ 对酶活力都有不同程度的抑制作用. 由此可知, K⁺、Mg²⁺ 在低浓度时对酶有激活作用, 高浓度时则抑制酶活性. Na⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Pb²⁺、Zn²⁺ 在两个浓度均对酶有抑制作用, 其中 Pb²⁺、Zn²⁺ 在高浓度时几乎完全抑制酶活性.

Cu²⁺ 对漆酶的激活作用是不同来源漆酶的共性, 这是由于漆酶是一种含铜的酶, 酶催化反应中起关键作用的就是酶中含有的 3 种类型的铜: I 型铜、II 型铜和 III 型铜. Fe²⁺、Fe³⁺、Pb²⁺、Zn²⁺ 对漆酶活性有抑制作用, 这在多篇文献中已得到证实^[23,31]. 有文献报道^[23], Na⁺ 对木霉漆酶活性影响不大, 可是在本实验中发现, Na⁺ 对菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 的漆酶活性有较大的抑制作用, Na⁺ 对 *Hypocrea lixii* sp. C2 的抑制作用可能与该酶的特殊活性基团有关, 需进一步研究.

表 3 金属离子对漆酶活力的影响		
Table 3 Effect of metal ions on laccase activity		
金属离子	浓度/mmol·L ⁻¹	相对酶活/%
K ⁺	1	110
	5	75.1
Ca ²⁺	1	87.4
	5	70.1
Na ⁺	1	70.8
	5	54.9
Mg ²⁺	1	107.2
	5	92.4
Cu ²⁺	1	103.5
	5	117.6
Mn ²⁺	1	90.8
	5	86.7
Fe ²⁺	1	56.9
	5	40.9
Fe ³⁺	1	33.3
	5	15.4
Pb ²⁺	1	37.8
	5	9.4
Zn ²⁺	1	47.3
	5	18

2.3.6 漆酶的动力学研究

米氏常数 (K_m) 是酶的一个重要特征, 反映了酶同底物的亲和力大小. 本实验采用 ABTS 作为漆酶底物, 在最适温度和最适 pH 的条件下取不同浓度的 ABTS (S), 测定漆酶在不同底物浓度时的反应速度 (V), 用双倒数作图法 (Lineweaver-Burk), 求出米氏常数 (K_m). 结果见图 8, 漆酶对 ABTS 的 K_m 值为 1.00 mmol·L⁻¹.

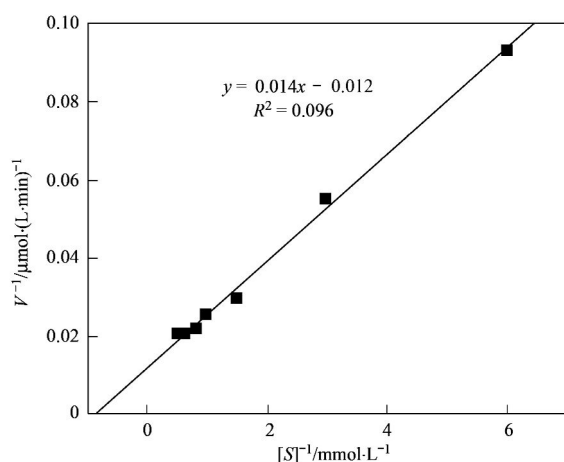


图 8 漆酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 8 Lineweaver-Burk plot of laccase

3 结论

(1) 从农业固体废物堆肥中筛选得到 1 株高产漆酶菌株, 经过形态观察和 ITS 序列分析, 鉴定该菌株为哈茨木霉 (*Hypocrea lixii*), 命名为 *Hypocrea lixii* sp. C2.

(2) 通过引物 Cu1AF 和 Cu2R 对该菌株漆酶基因进行扩增, 扩增产物回收克隆后测序得到 148 bp 的漆酶片段, 并对其氨基酸序列进行了同源性分析.

(3) 在液体培养条件下, *Hypocrea lixii* sp. C2 产漆酶活力最高出现在第 5 d, 达到 $67.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. 该菌株漆酶相对分子质量大约为 60×10^3 . 菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 产漆酶的最佳反应温度为 35°C , 最佳反应 pH 为 4.0. 40°C 下保温 24 h, 酶活力损失不大; 在 60°C 时, 酶活的半衰期 $> 1 \text{ h}$; 70°C 时漆酶半衰期为 30 min. 菌株 *Hypocrea lixii* sp. C2 受金属离子影响较大, Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活都有不同程度的抑制作用. 以 ABTS 为底物, 在最适温度和最适 pH 的条件下测得漆酶的 K_m 值为 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

参考文献:

- [1] 曾光明, 黄国和, 袁兴中, 等. 堆肥环境生物与控制[M]. 北京: 科学出版社, 2006. 3-4.
- [2] Huang D L, Zeng G M, Feng C L, et al. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting[J]. Bioresource Technology, 2010, **101**(11): 4062-4067.
- [3] Alexandre G, Zhulin I B. Laccases are widespread in bacteria[J]. Trends in Biotechnology, 2000, **18**(2): 41-42.
- [4] Petr B. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, **30**(2): 215-242.
- [5] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review[J]. Bioresource Technology, 2000, **72**(2): 169-183.
- [6] 郁红艳, 曾光明, 黄国和, 等. 木质素降解真菌的筛选及产酶特性[J]. 应用与环境生物学报, 2004, **10**(5): 639-642.
- [7] Erden E, Ucar M C, Gezer T, et al. Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of Remazole Marine Blue[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, **40**(2): 346-353.
- [8] Zhang M, Wu F, Wei Z Y, et al. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, **39**(1): 92-97.
- [9] 虞泳, 曾光明, 陈耀宁, 等. 农业废物好氧堆肥中氨氧化细菌的群落结构[J]. 环境科学, 2011, **32**(10): 3067-3072.
- [10] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 251-267.
- [11] 杨朝晖, 肖勇, 曾光明, 等. 用于分子生态研究的堆肥 DNA 提取方法[J]. 环境科学, 2006, **27**(8): 1613-1617.
- [12] Tao G, Liu Z Y, Hyde K D, et al. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae)[J]. Fungal Diversity, 2008, **33**(1): 101-122.
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, **24**(8): 1596-1599.
- [14] Kellner H, Luis P, Buscot F. Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in *Morchellaceae*: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **61**(1): 153-163.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, **72**(1-2): 248-254.
- [16] 李明元, 唐洁. 生物化学实验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008. 75-109.
- [17] Kuddus M, Ramteke P W. A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2008, **54**(6): 385-392.
- [18] 杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009. 128-131.
- [19] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry[J]. Trends in Biotechnology, 2006, **24**(5): 219-226.
- [20] Levasseur A, Saloheimo M, Navarro D, et al. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study[J]. BMC Biochemistry, 2010, **11**(1): 32.
- [21] Chakroun H, Mechichi T, Martinez M J, et al. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds[J]. Process Biochemistry, 2010, **45**(4): 507-513.
- [22] Liu M, Zhang M. Studies on screening, identification and fermentation condition of a laccase-producing strain[J]. Journal

- of Biology, 2008, **25**(3): 40-43.
- [23] Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K, *et al.* Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WLI [J]. Process Biochemistry, 2008, **43**(7): 736-742.
- [24] Suresh K S V, Prachant S P, Durani S, *et al.* Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, **83**(4): 386-394.
- [25] Wang Z X, Cai Y J, Liao X R, *et al.* Purification and characterization of two thermostable laccases with high cold adapted characteristics from *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 [J]. Process Biochemistry, 2010, **45**(10): 1720-1729.
- [26] Koschorreck K, Richter S M, Swierczek A, *et al.* Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008, **474**(1): 213-219.
- [27] Bettin F, Rosa L O, Montanari Q, *et al.* Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 [J]. Process Biochemistry, 2011, **46**(3): 758-764.
- [28] Ryan S, Schnitzhofer W, Tzanov T, *et al.* An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, **33**(6): 766-774.
- [29] Patrick F, Mtui G, Mshandete A M, *et al.* Purification and characterization of a laccase from the basidiomycete *Funalia trogii* (Berk.) isolated in Tanzania [J]. African Journal of Biochemistry Research, 2009, **3**(5): 250-258.
- [30] Zhou Y, Deng T F, Pan C Y, *et al.* Purification of a laccase from fungus combs in the nest of *Odontotermes formosanus* [J]. Process Biochemistry, 2010, **45**(7): 1052-1056.
- [31] Younes S B, Sayadi S. Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, **73**(1-4): 35-42.

《环境科学》编辑部关于启用编辑信息管理系统公告

《环境科学》编辑部已经开通本刊网站并启用编辑信息管理系统(网站地址:<http://www.hjcx.ac.cn>)。该系统能实现在线投稿、在线审稿、期刊浏览检索等功能,欢迎广大作者、读者和审稿专家使用。目前本刊所有来稿都通过网站编辑信息管理系统进行。作者使用编辑信息管理系统投稿时请先进行注册,注册完毕后以作者身份登录,按照页面上给出的提示投稿即可。如果您在使用过程中有问题,请及时与我刊编辑部联系。

邮政地址:北京市海淀区双清路18号《环境科学》编辑部

邮 编:100085

电 话:010-62941102,010-62849343

传 真:010-62849343

E-mail: hjcx@rcees.ac.cn

网 址: www.hjcx.ac.cn

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 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.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: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行人