

腐殖质还原菌的筛选及其对污染物的生物降解*

曹 静 李永慧 李玉成** 吴 涓 王 宁 窦月芹

(安徽大学资源与环境工程学院 合肥 230601)

摘 要 为研究腐殖质还原菌在污染物生物降解及污染环境生物修复中的作用, 在厌氧条件下从巢湖底泥中富集分离到一株腐殖质还原菌, 命名为F1. 通过电镜镜检、16S rDNA序列分析及还原活性研究, 结果表明, F1为克雷伯氏菌, 能够以腐殖质模式物蒽醌-2,6-双磺酸钠(AQDS)为唯一电子受体进行厌氧胞外呼吸, 还原AQDS的最适温度为25℃, 初始pH为8, 能较好利用乳糖, 对培养液中Cr(VI)具有很强的还原能力; 在添加AQDS时对培养液中的对硝基苯酚(PNP)去除率可以达到81.31%, 添加三价铁离子对土壤中PNP降解有一定的促进作用, 去除率可以达到93.26%. 研究为通过腐殖质微生物还原修复污染环境提供了数据和资料. 图9 表2 参17

关键词 腐殖质还原菌; 克雷伯氏菌; 生物修复; Cr(VI); 对硝基苯酚; Fe(III)

CLC X172

Isolation of a Humus-reducing Bacterium Strain and Its Biodegradation of Pollutants*

CAO Jing, LI Yonghui, YI Yucheng**, WU Juan, WANG Ning & DOU Yueqin

(School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601, China)

Abstract In this study, a strain of bacteria, named F1, was isolated from the sediment of the Chaohu Lake under anaerobic conditions to study the effect of microbial humus reduction on biodegradation of pollutants and bioremediation of contaminated environment. According to the results of electron microscope and 16S rDNA sequencing, F1 was identified as *Klebsiella*. It can utilize anthraquinone-2,6-double sodium sulfonate, the humus mode content, as the only electronic receptor for anaerobic extracellular respiration. The optimal temperature and initial pH is 25 °C and 8, respectively, for AQDS reduction of F1. F1 can utilize lactose, and has a strong reducibility of Cr (VI) in the nutrient solution. Its degradation rate for p-nitrophenol can be up to 81.31% when added with AQDS, and up to 93.26% when added with ferric iron ion. Fig 9, Tab2, Ref 17

Keywords humus-reducing bacterium; *Klebsiella*; bioremediation; Cr(VI); p-nitrophenol; Fe(III)

CLC X172

腐殖质还原菌是一类以环境中有机底物为电子供体, 能生物还原腐殖质的菌群, 这种微生物在自然水体特别是底泥沉积环境与地下厌氧环境中普遍存在^[1]. 1996年, Lovely最早发现 *Geobacter metallireducens* 和 *Shewanella alga* 在厌氧条件下能够以蒽醌-2,6-双磺酸 (anthraquinone-2,6-disulfonate, AQDS) 为唯一电子受体, 参与细菌的呼吸代谢过程, 并提出能进行腐殖质还原的微生物为腐殖质还原菌的概念^[2]. 目前已从环境中富集分离得到多株具有腐殖质还原活性的微生物. 腐殖质不仅可以直接作为电子供体、电子受体或是氧化还原中间体, 还能参与环境污染物的生物降解过程^[3]. 腐殖质微生物还原作用对环境污染治理具有极其重要的意义.

研究表明, 污染严重的湖泊沉积物腐殖化程度高, 沉积物中有机质的70%以上都是腐殖质^[4], 本研究拟从巢湖底泥中分离纯化腐殖质还原菌并考察其对腐殖质模式物蒽醌-2,6-双磺酸钠 (AQDS) 及对硝基苯酚的还原能力. 通过对

腐殖质还原菌的研究, 初步探讨以腐殖质及其模式物作为电子受体或电子穿梭物质, 利用腐殖质还原微生物厌氧还原重金属和降解有机污染物技术及其原理, 将对环境污染的生物修复过程具有重要的指导作用及其生态学意义^[5].

1 材料与方法

1.1 样 品

菌种筛选样品来自安徽省巢湖底泥沉积物.

1.2 菌种分离、纯化及鉴定

1.2.1 培养基 基础厌氧培养基 (BAS): NaHCO₃ 2.5 g, NH₄Cl 0.25 g, NaH₂PO₄ 0.6 g, KCl 0.1 g, 酵母浸提物 0.2 g, 维生素储备液10 mL, 蒸馏水1 L, pH = 7.4, 充氩气5 min 排氧.

维生素储备液: 生物素 0.002 g, 叶酸 0.002 g, 盐酸吡啶醇 0.01 g, 核黄素 0.005 g, 硫胺素 0.005 g, 烟酸 0.005 g, 对氨基苯甲醛 0.005 g, 泛酸 0.005 g, 蒸馏水 1 L.

富集培养基: NaHCO₃ 2.5 g, NH₄Cl 0.25 g, NaH₂PO₄ 0.6 g, KCl 0.1 g, 酵母浸提物0.2 g, 维生素储备液10 mL, 蒸馏水1 L, pH=7.4. 0.5 mmol L⁻¹ AQDS作为微生物厌氧呼吸的电子受体和5 mmol L⁻¹葡萄糖作为电子供体. 加入18%-20%的琼脂即成固体培养基, 用于菌种的分离纯化.

LB培养基: 蛋白胨10 g, 酵母提取物5 g, NaCl 10 g, 蒸馏

收稿日期 Received: 2012-08-22 接受日期 Accepted: 2012-11-20

*国家自然科学基金项目 (40972092, 41172121) 和国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2011ZX07103-005) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 40972092, 41172121), and the National Major Special Project on Water Pollution Control and Management of China (No. 2011ZX07103-005)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: liyc1988@yahoo.com.cn)

水 1 L, pH 7.4. 加入18%-20%的琼脂即成固体培养基。

1.2.2 菌种分离纯化 取巢湖底泥10 g于装有100 mL富集培养基中,充氩气5 min排氧,盖橡胶塞,于厌氧培养箱中30 ℃静置培养5 d. 然后采用梯度稀释法,分别按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 稀释菌液,厌氧条件下在基础厌氧培养基(BAS)上反复划线分离获得单菌株,命名为F1. 并用光学显微镜观察细菌形态及革兰氏染色情况。

1.2.3 菌种鉴定 以细菌总DNA为模板,以细菌通用引物27F-1492R扩增16S rDNA片段. 菌株16S rDNA的扩增、16S rDNA序列的测定以及BLAST对比参照文献[6]. 菌种DNA提取采用购自TIANGEN公司的DNA产物提取、纯化试剂盒. PCR产物测序由上海生物生物工程技术有限公司完成。

1.3 菌株生长特性研究

将所筛腐殖质还原菌F1接种于LB液体培养基中,于厌氧培养箱35 ℃培养,定期取菌液测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值. 同时考察不同初始pH、温度、电子供体种类条件下腐殖质还原菌F1对AQDS的还原活性的影响. 研究不同初始pH对实验菌株F1还原AQDS的影响,分别配制初始pH值为4、5、6、7、8、9、10的BAS培养液,在35 ℃、厌氧条件下培养5 d后,取样测定培养液中AQDS和 AH_2QDS 的浓度。

分别在温度为4 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃、45 ℃、50 ℃条件下进行菌株还原试验,考察不同温度对菌株F1还原AQDS性能的影响。

研究不同电子供体对菌株F1还原AQDS的影响,以起始 0.5 mmol L^{-1} AQDS为电子受体,分别配制浓度均为 5 mmol L^{-1} 的葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、乙酸钠作为电子供体的BAS培养基,厌氧培养5 d,取样测定培养液中AQDS浓度及 $OD_{600\text{ nm}}$. 以上每个样品取3个平行,重复实验3次。

1.4 菌株F1的还原活性研究

1.4.1 菌株F1对培养液中Cr(VI)及对PNP的还原作用 将菌株F1接种于50 mL BAS液体培养基,以 5 mmol L^{-1} 乳糖为电子供体, 0.5 mmol L^{-1} 的AQDS为电子穿梭物质,分别加入不同浓度的Cr(VI),定时取样测定培养液中Cr(VI)浓度。

将菌株F1接种于50 mL BAS液体培养基,以 5 mmol L^{-1} 乳糖为电子供体, 0.5 mmol L^{-1} 的AQDS为电子穿梭物, 10 mg L^{-1} PNP,于厌氧及兼性条件下培养,于不同条件下定时取样测定培养液中PNP含量. 另外设置不加菌种组为空白对照试验. 以上每组实验均设3组重复,每次样品取样3个平行,重复实验3次。

1.4.2 菌株F1对土壤中PNP的还原作用 (1)土壤样品及处理:土壤样品采自合肥市市郊废弃水田,采样深度为0-20 cm耕作土壤. 将土样去除杂物后,置阴凉处自然风干. 研磨过0.2 mm孔径筛,于阴暗处避光保存。

土壤为粘土,含水量为2.1%,有机质含量为2.16%,pH为8.35. 土壤含水量采用质量法测定;有机质含量采用灼烧法[7];土壤pH值采用水浸提电位测定法测定[18]。

(2)还原反应实验:准确称取5 g土样于试管中,121 ℃湿热灭菌4 h. 向灭菌土壤中加入1 mL 0.1 mol L^{-1} PNP标准溶液(甲醇为溶剂),再加入2 g土覆盖,于避光处静置一晚,待自然挥发去除溶剂后制得模拟PNP污染土样. 以 5 mmol L^{-1} 乳

糖作电子供体, 0.5 mmol L^{-1} AQDS的BAS液体培养基接种F1. 设置以下实验组: M_1 污染土壤+Fe(III)、 M_2 污染土壤+5 mL菌液、 M_3 污染土壤+5 mL菌液+Fe(III),同时以灭菌土壤为空白对照组 M_0 . Fe(III)为 $0.5\text{ mL } 1\text{ mol L}^{-1}$ 氯化铁溶液,菌液为上述BAS液体培养菌液,空白对照组加入同体积无菌水. 各实验组样品混合均匀,用聚四氟乙烯膜封口后在25 ℃恒温生化培养箱中反应. 定期取样测定土壤中PNP、 Fe^{3+} 及 Fe^{2+} 含量. 每处理组均设3个重复,每次样品取样3个平行,重复实验3次。

(3)样品处理:在反应后的样品中加入5 mL乙醇,旋涡混合器充分振荡萃取5 min;再以2 000 r/min离心10 min后取上清液[19],供HPLC分析。

1.5 实验方法

1.5.1 微生物厌氧培养方法 本研究中腐殖质还原菌的筛选培养采用厌氧培养. 首先将氩气通过一个装有 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜的细菌过滤器的充气袋冲入到血清瓶中,通气5 min,迅速加盖密封放入厌氧培养箱中。

1.5.2 实验分析测定方法 AQDS还原产物 AH_2QDS 的测定采用连二亚硫酸钠分光光度法[5],铁离子[Fe(III)和Fe(II)]浓度的测定采用邻菲罗啉分光光度法[10],Cr(VI)的测定采用二苯碳酰二肼分光光度法[11]。

对硝基苯酚的定性微量测定采用的是液相色谱法,流动相为甲醇/水=45:55(V/V);等度洗脱,流速为 1.0 mL/min ;紫外检测波长为275 nm;柱温35 ℃;进样体积 $20\text{ }\mu\text{L}$;甲醇为色谱纯,在使用之前超声波振动,去除其中的微小气泡。

1.5.3 PNP去除率计算 $\text{PNP去除率} = (\rho_0 - \rho_t) / \rho_0 \times 100\%$. 式中, ρ_0 一起始PNP浓度(单位: mg L^{-1}); ρ_t —取样PNP浓度(单位: mg L^{-1})。

1.5.4 统计学方法 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)实验数据, $P < 0.05$ 被认为显著差异性, $P < 0.01$ 被认为具有极显著差异性。

2 结果与分析

2.1 菌株F1形态及革兰氏染色结果

经富集培养的液体涂在固体培养基上分离纯化,再经过测定培养液中的AQDS,得出一株对AQDS还原效果较好的菌株,其AQDS还原率可以达到90%以上,命名为F1. 液体培养过程中培养基逐渐由红色变成深橙色. 其在LB固体培养基平板上培养24 h后,菌落表面光滑,半透明,边缘整齐,菌落直径1.5-3.0 mm. 革兰氏阴性菌,兼性厌氧,短杆状. 革兰氏染色及扫描电镜(5万倍)结果如图1所示。

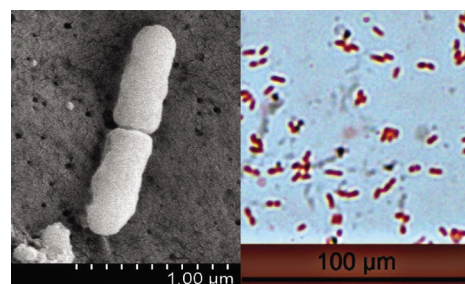


图1 菌株F1扫描电镜照片及革兰氏染色结果
Fig. 1 Stereoscan photograph and gram staining of F1

2.2 16S rDNA序列分析

提取细菌基因组DNA^[12]采用PCR技术扩增出16S rDNA, PCR扩增产物位于1 500 bp. 在NCBI采用BLAST将菌株的16S rDNA基因序列进行检索. 结果发现F1与GenBank数据库中的克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) 有较高的同源性 (表1).

表1 菌株F1的分离鉴定结果

Table 1 Isolation and identification results for F1

菌株 Strain	GenBank数据库中最大同源性菌株 The maximum homology strain in GenBank database	相似性 Similarity
F1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> stain OAJ	99%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> stain JDM-8	99%
	<i>Klebsiella</i> sp. 0103	98%

2.3 菌株F1的生长曲线及生长特性

2.3.1 菌株F1的生长曲线 菌株F1在液体LB培养基生长可以很快适应进入对数期, 并以较快的速率生长, 在第5天 (d 5) 进入稳定生长期, 稳定期较长 (图2).

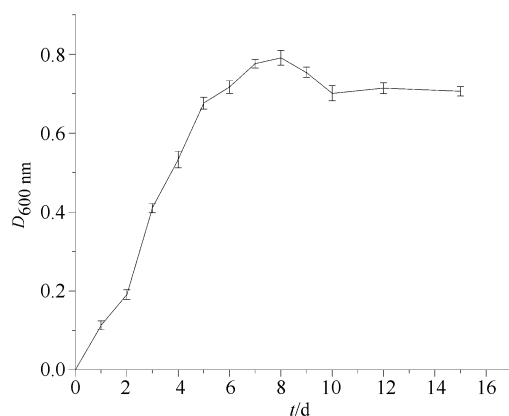


图2 菌株F1的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of the strain F1

纵条表示标准偏差 ($N=3$), 下同

Bars indicate standard deviation ($N=3$). The same below

2.3.2 初始pH及温度对腐殖质还原菌还原性能的影响 考察不同初始pH及温度对腐殖质还原菌F1还原AQDS性能的影响, 结果见图3和图4. 结果表明, F1菌还原AQDS的最适pH值为8.0. 在pH值小于8.0的情况下, AH_2QDS 的浓度随pH的增大而增大, 即AQDS的还原率逐渐增大, 而在pH大于8.0的碱性环境下, AH_2QDS 的浓度逐渐减少. 这可能是由于过酸或过碱的环境不利于菌体生长, 从而影响菌株F1的还原性能. 菌株F1可以在4-40 °C下生长, 还原AQDS的最适温度为25 °C. 微生物细胞的生长和还原反应是在各种酶的作用下进行的, 而酶活性的大小与温度有密切的关系^[13]. 另一方面, 这也可能与它生活在巢湖底泥中有关, 高温条件下菌株无法存活.

2.4 不同电子供体种类对腐殖质还原菌还原活性的影响

腐殖质还原菌F1在不同电子受体条件下还原AQDS为 AH_2QDS 的活性及生物量如图5所示. 结果显示以AQDS为电子受体 (起始浓度 0.5 mmol L^{-1}) 时, 厌氧培养10 d, F1能利用葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖, 几乎不能利用乙酸钠, 还原能力大小顺序为乳糖>麦芽糖>果糖>葡萄糖>乙酸钠, 支持菌体生长能力为乳糖>葡萄糖>麦芽糖>果糖>乙酸钠.

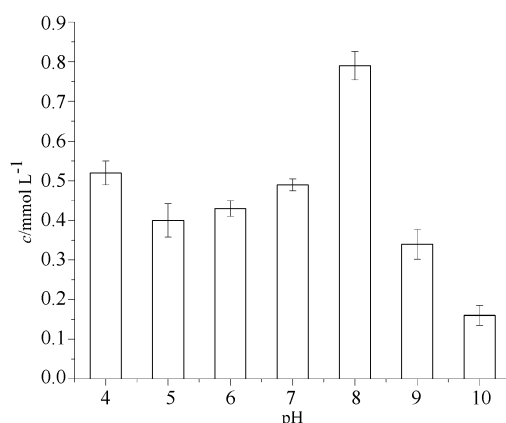


图3 pH对菌株F1还原AQDS的影响

Fig. 3 Effect of pH on reduction of AQDS

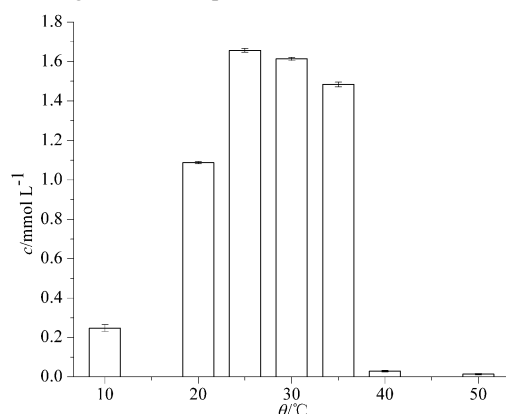


图4 温度对菌株F1还原AQDS的影响

Fig. 4 Effect of temperature on reduction of AQDS

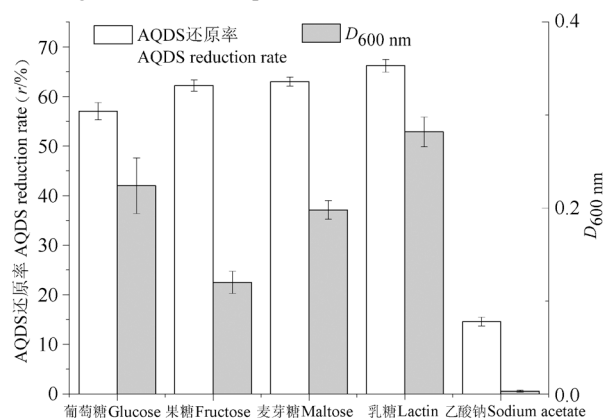


图5 不同电子供体对菌株F1浓度和AQDS还原的影响

Fig. 5 Influence of different electron donors on bacterial concentration and reduction of AQDS

2.5 腐殖质还原菌F1的还原活性

2.5.1 腐殖质还原菌对Cr(VI)的还原作用 菌株F1对不同初始浓度的Cr(VI)还原能力略有不同 (图6), 对低浓度的Cr(VI) (0.1 mmol L^{-1} , 1.0 mmol L^{-1}) 还原能力较强, 10 d能达到99%的还原率. 在菌体与腐殖质等微作用的环境中, Cr(VI)被还原成低毒的Cr(III), 有效降低了铬对菌体的毒性^[14]. 对于高浓度 (5.0 mmol L^{-1}) 的Cr(VI), d 16对其还原率可达到98%, 在d 25

左右时对其还原率达到99%。

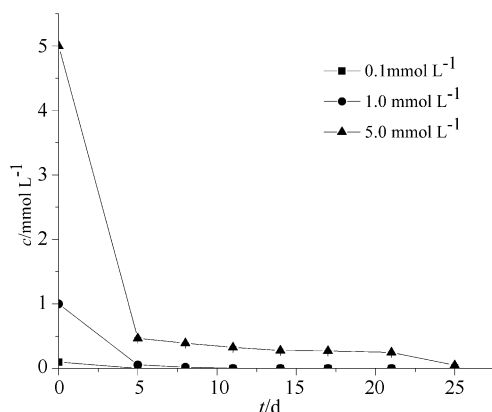


图6 菌株F1对不同浓度的Cr(VI)的还原情况

Fig. 6 The strain F1 reducing t Cr(VI) of different concentrations

2.5.2 F1对培养液中对硝基苯酚的降解情况 每隔2 d用灭菌注射器取样,经滤膜孔径为0.22 μm 的细菌过滤器,用液相色谱法测定培养液中PNP的含量。从图7中可以看出,无菌组的PNP几乎没有降解,PNP具有苯环结构较稳定,较难降解。添加腐殖质还原菌但未添加AQDS的培养液经过5 d的滞后期,其还原率才稍微有所增加,但降解仍较为缓慢,还原率不高,d 5才达到19.20%,d 14达到40.07%,最后趋于稳定趋势。严格厌氧条件下添加AQDS的腐殖质还原菌的培养液中PNP的还原率在1-3 d期间急剧升高,3-9 d时缓慢增加,9-14 d已经趋于平稳,在d 14左右能达到81.31%。另外,从结果可以看出菌株F1在兼性厌氧条件下也可以生长,并能较好地还原PNP,还原率可达到77.86%。

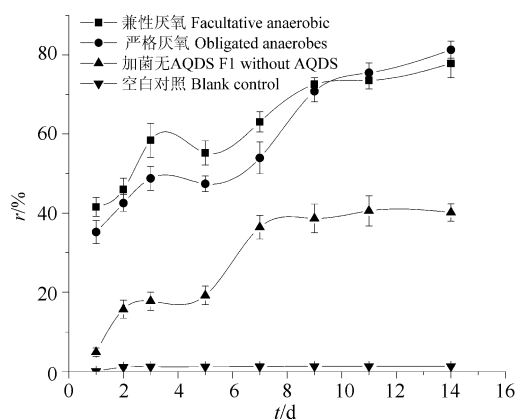


图7 不同条件下菌株F1对PNP的去除影响

Fig. 7 Removal of PNP by F1 under different conditions

2.5.3 腐殖质还原菌对土壤中硝基苯的还原作用 不同处理土壤中PNP的去除情况见表2。可见空白对照组 M_0 中PNP去除率很小。在 M_2 、 M_3 样品组中PNP从一开始就逐渐降解,起初降解稍慢,12 h后降解加快,从24 h开始去除率与空白对照组 M_0 相比都达到了极显著性水平($P < 0.01$),与 M_1 组相比也均达到显著性水平($P < 0.05$)。 M_3 组中PNP的去除率稍快,在24 h即反应1 d后去除率达到42.72%,最终 M_2 组中PNP去除率为80.40%,而 M_3 中PNP去除率达到了93.26%,此过程中Fe(III)也

得到了还原。从48 h开始 M_2 、 M_3 组PNP去除率达到显著性水平。分析Fe(III)的加入促进了PNP的还原降解。

表2 不同处理土壤中PNP的去除分析 ($N=3$)

Table 2 Removal of PNP ($N=3$) in soil with different treatment

t/h	PNP去除率 Removal rate of PNP (r/%)			
	M_0	M_1	M_2	M_3
12	2.98 $\pm$ 0.17	0.10 $\pm$ 0.11	7.57 $\pm$ 0.01	6.75 $\pm$ 0.05
24	2.98 $\pm$ 0.12	3.36 $\pm$ 0.08	27.36 $\pm$ 0.06 ^{bc**}	42.72 $\pm$ 0.05 ^{bc**}
48	6.29 $\pm$ 0.09	7.52 $\pm$ 0.10 ^a	47.54 $\pm$ 0.07 ^{bc**}	57.76 $\pm$ 0.05 ^{bc**}
72	6.37 $\pm$ 0.04	12.09 $\pm$ 0.07 ^a	67.35 $\pm$ 0.06 ^{bc**}	80.40 $\pm$ 0.03 ^{bc**}
96	8.67 $\pm$ 0.09	19.93 $\pm$ 0.07 ^a	85.01 $\pm$ 0.06 ^{bc**}	93.26 $\pm$ 0.02 ^{bc**}

M_0 : 空白对照组; M_1 : 污染土壤+ Fe(III); M_2 : 污染土壤+ 5 mL菌液; M_3 : 污染土壤+ 5 mL菌液+ Fe(III). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (与空白对照组比较); 小写字母: $P < 0.05$ (M_1 、 M_2 、 M_3 组间相比)

M_0 : Blank control; M_1 : Soil + Fe(III); M_2 : Soil + bacterium; M_3 : Soil + bacterium + Fe(III). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, compared with blank control; lower-case letters: $P < 0.05$, compared within M_1 , M_2 , M_3 groups

3 讨论

以乳糖作为电子供体,在d 14时腐殖质还原菌对培养液中PNP去除率可以达到81.31%,可能降解途径有以下两条:

(a) 腐殖质还原菌氧化乳糖将电子直接传递给PNP将其还原降解; (b) 通过AQDS的电子穿梭作用间接将电子传递给PNP将其还原降解(图8)。以乳糖为电子供体, AQDS为电子穿梭体,腐殖质还原菌氧化乳糖将电子传递给AQDS将其还原为 AH_2QDS ,还原态的AQDS再将电子传递给PNP使其被还原, AH_2QDS 再被氧化为AQDS,又可以继续起到穿梭电子的作用。

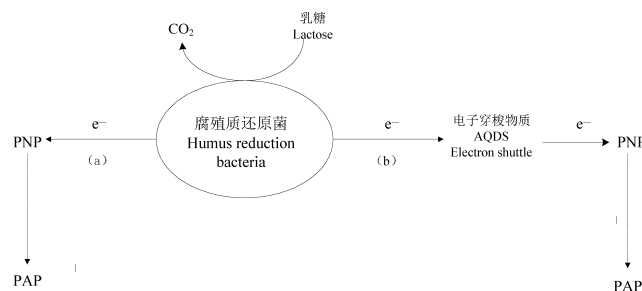


图8 腐殖质还原菌降解PNP的可能机制

Fig. 8 The possible mechanism of degradation of humus-reducing bacteria

在含有Fe(III)的土壤中, AQDS作为微生物与Fe(III)之间的电子传导中间体,辅助电子传递,与Fe(III)协同促进微生物降解有机物PNP,降解率可以达到93.26%。Boreh等研究发现以蔗糖作为电子供体时, AQDS/Fe(III)、Fe(III)能促进 *Cellulomonas* sp.对TNT的还原降解^[15]。AQDS已被认为是在非生命腐殖酸电子中介体的相似体,能以类似于腐殖质的方式刺激三价铁生物还原^[16]。Fe(III)将电子转移给AQDS来保存能量,支持生长,还原产物 AH_2QDS 能非生命地转移两个电子给Fe(III),从而再生AQDS^[6]。此过程中铁还原现象明显,而且AQDS与Fe(III)共同作用能进一步提高PNP的降解。可能反应机制如图9。

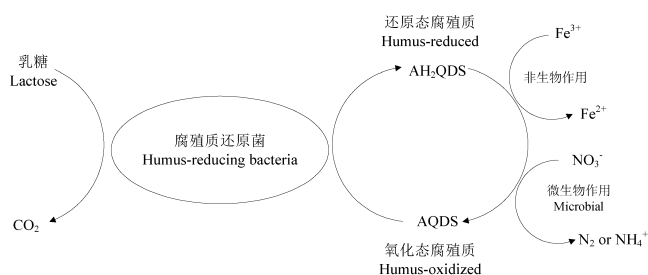


图9 腐殖质醌类物质在生物和非生物反应中作为氧化还原中间体的循环反应机制^[17]

Fig. 9 The cycle reaction mechanism of humic quinone as redox mediator in biologic and abiogenic reaction^[17]

4 结论

本研究通过在厌氧条件下从巢湖底泥中富集分离到腐殖质还原菌F1, 结合形态及生长特性、16S rDNA序列分析可知该菌为克雷伯氏菌。F1在25℃, 初始pH 8.0时对AQDS的还原能力最佳, 为兼性厌氧菌。以乳糖为电子供体时菌体生长及还原AQDS的效果均为最好。该株菌可以将Cr(VI)还原为Cr(III), 还原硝基芳香化合物对硝基苯酚。

本研究结果确定了腐殖质还原菌F1的分类学地位、培养条件及还原污染物特性, 为后续腐殖质还原微生物在污染物生物降解和污染环境生物修复中作用的深入研究奠定了基础。

参考文献 [References]

- 1 沈伟荣. 含腐殖质还原菌驯化污泥降解污染物的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007 [Shen WR. Study on the degradation of pollutants by the sludge enriched with humic acid reducing bacteria [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007]
- 2 吴鹏, 赵怡, 洪义国, 段舜山. 南海北部海域底泥微生物的腐殖质还原性能研究[J]. 生态环境学报, 2011, 20 (1): 132-136 [Wu P, Zhao Y, Hong YG, Duan SS. The humic-reducing characteristics of microorganisms in sediments of northern South China Sea [J]. *Ecol Environ Sci*, 2011, 20 (1): 132-136]
- 3 许志城, 罗微, 洪义国, 许玫英, 孙国萍. 腐殖质在环境污染物生物降解中的作用研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33 (6): 122-127 [Xu ZC, Luo W, Hong YG, Xu MY, Sun GP. Recent development in effects of the humic substances on the biodegradation of priority pollutants in environment [J]. *J Microbiol*, 2006, 33 (6): 122-127]
- 4 易文利, 王圣瑞, 杨苏文, 赵海超, 金相灿, 王国栋. 长江中下游浅水湖泊沉积物腐殖质组分赋存特征[J]. 湖泊科学, 2011, 23 (1): 21-28 [Yi WL, Wang SR, Yang SW, Zhao HC, Jin XC, Wang GD. Humus

distribution and forms in the sediments from shallow lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River [J]. *J Lake Sci*, 2011, 23 (1): 21-28]

- 5 徐志伟. 腐殖质微生物还原的影响因素及其去除污染物的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008 [Xu ZW. Influence factors of humic microbial reduction and its applications in pollutants removal [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008]
- 6 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (17): 3389-3402
- 7 李婧. 土壤有机质测定方法综述[J]. 分析实验室, 2008, 27 (Suppl): 154-156
- 8 李酉开. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1983. 394-433
- 9 邱罡, 陈宜菲, 陈少瑾. 不同前处理方式对铁屑还原降解土壤中对硝基苯酚的影响[J]. 环境工程学报, 2010, 4 (3): 654-658
- 10 MT/T 368-2005 煤矿水中铁离子的测定方法[S]
- 11 GB 7467-1987 水质六价铬的测定[S]
- 12 Bengrine A, Guilian N, Appi-Ayme C, Jedlicki E, Holmes DS, Chippaux M, Bonnefoy V. Sequence and expression of the rusticyanin structural gene from *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC33020 strain [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1443 (1-2): 99-112
- 13 高超, 吴涓, 李玉成, 芮传芳. 一株生物脱硫菌株的分离、鉴定及其脱硫活性的研究[J]. 生物学杂志, 2010, 27 (4): 39-41
- 14 叶锦韶, 尹华, 彭辉, 张娜. 高效生物吸附剂处理含铬废水[J]. 中国环境科学, 2005, 25 (2): 245-248 [Ye JS, Yi H, Peng H, Zhan N. Treatment of chromium containing wastewater by effective biosorbents [J]. *China Environ Sci*, 2005, 25 (2): 245-248]
- 15 Borch T, Inskeep WP, Harwood JA, Robin G. Impact of ferrihydrite and anthraquinone-2,6-disulfonate on the reductive transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by a gram-positive fermenting bacterium [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39 (18): 7126-7133
- 16 Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration [J]. *Nature*, 1996, 382: 445-448
- 17 Field JA, Cervantes FJ, van der Zee FP, Lettinga G. Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review [J]. *Water Sci Technol*, 2000, 42 (5-6): 215-222