

研究报告

孔雀石绿脱色菌的分离鉴定及染料脱色后毒性研究

徐晓婷 卢平* 吴丹 李旭凯

(华南师范大学化学与环境学院 广东省环境保护环境功能材料重点实验室 广东 广州 510000)

摘要:【目的】从印染污水处理厂污泥中筛选孔雀石绿脱色菌,并分析比较染料脱色前后毒性。【方法】采用平板稀释涂布法筛选分离纯化菌株,通过扫描电镜、16S rRNA 基因序列分析对菌株进行初步鉴定,采用蚕豆根尖微核毒性试验和小球藻毒性试验对染料脱色前后毒性进行分析。【结果】从印染污水处理厂污泥中筛选出一株高效孔雀石绿脱色菌。经过 16S rRNA 基因序列分析,鉴定该菌株为 *Klebsiella* sp. JD。菌株的菌落边缘规则,圆形,灰白色粘稠,以接种环挑之,易拉成丝,表面光滑。通过对比小球藻在脱色前后的生长率和抑制率以及蚕豆微核率和污染指数分析出脱色后的染料毒性大大降低。【结论】筛选得到一株新的孔雀石绿脱色菌,该菌降解效率高,可降低染料毒性,对修复染料污染的水体有一定的现实意义。

关键词: 孔雀石绿, 克雷伯氏杆菌, 小球藻, 蚕豆微核, 毒性

Isolation, characterization and toxicity of a malachite green degradation bacterial strain

XU Xiao-Ting LU Ping* WU Dan LI Xu-Kai

(College of Chemistry and Environment, South China Normal University, Guangdong Key Laboratory of Function Materials for Environmental Protection, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: [Objective] An efficient malachite green degradation bacterial strain was isolated from the activated sludge sample collected from wastewater-treating system of dye manufacturer, and the toxicity of malachite green before and after decolorization was contrasted through some methods. [Methods] A decolor bacteria was isolated by dilution plating procedure and was then identified by scanning electron microscope (SEM) and 16S rRNA gene analysis. The toxicity of malachite green before and after decolorization was evaluated through biological toxicity tests using *Chlorella* and *Vicia faba* as test material. [Results] The strain separated from the wastewater-treating system of dye manufacturer was identified as *Klebsiella* sp. JD on the basis of 16S rRNA gene analysis. *Klebsiella* sp. JD biochemical colony which was gray and viscous shows a regular circle shape. With the touch of inoculation loop, the colony was draw into wire easily and the wire had a smooth surface. By comparing with the growth rate and inhibiting rate of *Chlorella*, the MCN‰ and PI of *Vicia faba*, it

Foundation item: Science and Technology Project of Guangzhou (No. 201510010006)

*Corresponding author: E-mail: luping@senu.edu.cn

Received: October 26, 2016; Accepted: January 28, 2017; Published online (www.cnki.net): February 08, 2017

基金项目: 广州市科技计划项目(No. 201510010006)

*通讯作者: E-mail: luping@senu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-26; 接受日期: 2017-01-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-08

could be found that the toxicity of malachite green decreased after decolorization. **[Conclusion]** A malachite green degradation bacterial strain is isolated in this research. The efficient strain can reduce the toxicity of dye, which has a practical significance in the remediation of dye contaminated water.

Keywords: Malachite green, *Klebsiella*, *Chlorella*, *Vicia faba*, Toxicity

三苯甲烷类染料被广泛地应用于工业生产中,孔雀石绿作为三苯甲烷染料的典型代表,不仅是一种工业染料,还被广泛作为杀菌和杀寄生虫的化学制剂用于水产养殖中^[1]。由于孔雀石绿具有独特的化学结构,难以在自然环境中被降解。孔雀石绿分子式为 $C_{23}H_{25}ClN_2$, 分子结构为中心碳原子上连接着 3 个苯环,如图 1 所示,侧链基团决定了染料的结构及其特性^[2]。许多研究结果^[2]表明,孔雀石绿具有高毒性、高残留性和“三致”作用,并能在环境中积累和富集通过食物链一步一步进入人体内,从而对人类健康造成严重损害。在很多国家和地区,孔雀石绿已被立法严禁使用,且被美国食品和药物管理局列为致癌性测试的优先化学物质之一。然而,由于孔雀石绿成本较低、稳定性强且使用效果较好,很难找到其替代物。因此,在很多其他国家和地区该染料仍然在广泛使用中。由此造成的环境污染问题也成为环境工作者的一个难以解决的问题^[3-6]。目前生物脱色法以其环境友好、无二次污染等优点备受青睐,发现的脱色菌株多达几十种,涉及到黑曲霉、少根根霉、米根霉等,其中以白腐真菌的研究最为广泛。本研究从印染污水处理厂污泥中分离到一株孔雀石绿高效脱色菌,对其进行分子生物学鉴定,并分析孔雀石绿脱色前后的毒性大小,为印染废水污染治理修复提供了实验依据和理论基础。

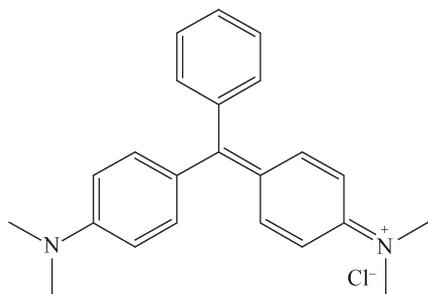


图 1 孔雀石绿分子结构式

Figure 1 The chemical structure of malachite green

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌群来源: 江门市某全生化印染污水处理厂生化处理池的活性污泥样品。

1.1.2 主要试剂和仪器: 孔雀石绿, 国药集团化学试剂有限公司。扫描电子显微镜, 日本电子(JEOL)。

1.1.3 培养基: 改良马丁培养基(g/L): KH_2PO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 尿素 5.0, 蔗糖 10.0, pH 自然。 1.13×10^5 Pa 灭菌 20 min 后使用, 现用现配。

1.2 方法

1.2.1 孔雀石绿脱色菌的分离纯化: 实验所用的备选菌群来自于江门市某全生化印染污水处理厂生物处理池的活性污泥样品,以孔雀石绿为模型化合物。污泥样品在改良马丁培养基中进行驯化,在培养基中加入孔雀石绿(浓度为 100 mg/L), 30 °C、180 r/min 振荡培养,反应体系总体积 100 mL,培养时间以 24 h 为一个周期,待完全脱色后,静置 10 min,将上层培养液缓缓倒入 100 mL 离心管中,4 000 r/min 离心 10 min。去上清液,将离心收集到的菌体加少量去离子水摇匀转接到新鲜培养基中,驯化期共计约 20 d,得到具有好氧脱色孔雀石绿染料能力的混合菌群。驯化后的菌群首先利用平板涂布法进行分离^[7-9], 35 °C 培养 48 h。将长出的不同菌落分别挑至含孔雀石绿(100 mg/L)的新鲜培养基中进行培养,待生长到一定浓度后,再次进行平板涂布,直至平板上的菌落形态、颜色一致,视为纯化完毕。

1.2.2 孔雀石绿脱色菌的鉴定: 经过一个月的分离、纯化,得到一株能够在液体及固体培养基上使孔雀石绿(100 mg/L)脱色的菌株,并作进一步鉴定。首先,对锥形瓶中菌液及平板上菌落进行形态观察和生理生化鉴定,并利用扫描电子显微镜(SEM)观

察细胞形态^[10]。同时,对菌株进行系统鉴定,采用16S rRNA 基因序列分析比对法:利用液氮研磨法提取菌的基因组 RNA,以纯化后的 RNA 作为模板^[11],通过聚合酶链式反应(PCR)扩增得到16S rRNA 基因序列片段(约1 409 bp),然后送至深圳华大基因有限公司进行测序,利用BLAST程序对测序结果进行分析比对,测序结果在GenBank上进行序列相似性比对分析,并通过最大简约法构建系统发育树。

1.2.3 小球藻毒性试验:设置对照组、试验组一、试验组二。对照组为小球藻培养体系中不加入孔雀石绿染料,作为空白对照;试验组一为小球藻培养体系中加入孔雀石绿染料,作为孔雀石绿脱色前毒性研究;试验组二为小球藻培养体系中加入孔雀石绿染料脱色后溶液,作为孔雀石绿脱色后毒性研究。于250 mL的锥形瓶中,先加入一定体积的藻液培养液^[12],再加入一定量处于生长对数期的藻液,使总培养体系为200 mL,此过程尽量保证每瓶的小球藻初始量相等。将小球藻培养体系置于光照培养箱中进行培养,光照强度为3 000 lx,光暗比12 h:12 h,培养温度为25 °C。将小球藻分别培养24、48、72、96 h后进行取样,通过显微镜用血球计数板对小球藻细胞密度进行计数,并在680 nm的波长下测定藻液的最大吸光值,建立不同藻细胞密度与吸光度之间的线性关系^[13]。根据Organization for economic co-operation and development标准,计算小球藻的生长率和抑制率。

1.2.4 蚕豆根尖微核试验:(1)蚕豆根尖培养:选择大小均匀、颗粒饱满的蚕豆种子,置于装有去离子水的烧杯中,放入25 °C恒温箱内24 h,期间换水3次。待种子吸胀后,将种子移至解剖盘内,用湿润的纱布覆盖保持其湿度,25 °C恒温催芽36–48 h,每隔12 h换水1次。待根尖长至2 mm–3 mm时,挑选出发芽良好的种子,再转移到新的湿纱布的解剖盘中,使根尖与去离子水接触,在25 °C条件下继续催芽,每天更换解剖盘中的去离子水,至大部分种

子根长至2 cm–3 cm,即可用于后续实验^[14]。(2)染毒处理:选取粒发育良好、根尖长短一致的种子放入装有待测试溶液的培养皿中,使液体浸泡根尖即可,染毒5 h。本实验设置5组实验,分别为对照组、实验组 I、实验组 II、实验组 III、实验组 IV,实验组 I 待测试溶液为50 mg/L孔雀石绿溶液,实验组 II 待测试溶液为100 mg/L孔雀石绿溶液,实验组 III 待测试溶液为50 mg/L孔雀石绿脱色后溶液,实验组 IV 待测试溶液为100 mg/L孔雀石绿脱色后溶液,对照组加入去离子水,用作空白对照^[14]。(3)根尖细胞恢复培养:将染毒后的种子,用去离子水浸洗3次,这个过程每次持续3 min。将洗净后的种子放在新铺好纱布的解剖盘内,在25 °C恒温培养24 h,期间注意保持一定的湿度,直至根尖细胞恢复^[14]。(4)根尖细胞固定:将恢复培养后的种子,用纱布吸干种子表面的水分,从种子根尖的顶端处开始切下长度为1 cm的幼根,用卡诺氏固定液固定^[14]。(5)解离染色:将固定好的根尖,用去离子水清洗3次,每次持续5 min。放入EP管,加入1 mol/L的盐酸,放入30 °C水浴锅水解,时长约为10 min,直至根尖软化即可。去离子水清洗2次,每次持续5 min。在载玻片上将幼根轻轻捣碎后,滴加一滴改良的苯酚品红染色^[14]。(6)制片镜检:向染色好的幼根滴入几滴浓度为45%的乙酸溶液,加盖玻片,轻轻敲打压片,注意不能有气泡。每个根尖至少观察2 000个细胞,记录微核数目。将制片置于低倍镜显微镜下,找到分生组织区细胞分散均匀、分裂项较多的部位,再换到高倍镜下进行观察。微核识别:在间期细胞中,凡在主核大小1/3以下,形态呈圆形、椭圆形或不规则形,与主核分离的小核,并且其着色与主核相似^[14]。(7)统计:对于微核试验,一般采用微核千分率(MCN%)或者污染指数(PI)来评价。MCN%在10%以下为基本没有污染;10%–18%区间为轻污染;18%–30%区间为中污染;30%以上为重污染。PI划分为3个等级,即1.5以下为未污染;1.5–2.0为轻污染;

2.0–3.5 为中度污染; 3.5 以上为重污染^[15-17]。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

从江门某印染污水处理厂生化处理池的活性污泥样品中经驯化、平板稀释涂布分离纯化, 得到一株纯培养, 能够在固体改良马丁培养基中脱色孔雀石绿的菌株, 命名为 *Klebsiella* sp. JD。其菌落形态如图 2 所示, 该菌落边缘规则, 圆形, 灰白色粘稠, 以接种环挑之, 易拉成丝, 表面光滑。此外, 生理生化鉴定结果表明(表 1)菌株为克雷伯氏杆菌。

经扫描电镜分析结果显示(图 3), 其细胞呈短杆状, 直径约 3 μm , 无芽胞, 无鞭毛。

PCR 扩增得到菌株 *Klebsiella* sp. JD 16S rRNA 基因序列片段, 长度约 1 409 bp, 所得序列在 GenBank 中 BLAST 进行同源性比对, 与克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella* sp. CCFM8383) 表现出 99% 的相似性, 确定菌株 *Klebsiella* sp. JD 为克雷伯氏杆菌(GenBank 登录号为 KT895608), 属于 Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, *Klebsiella*。进化树见图 4。

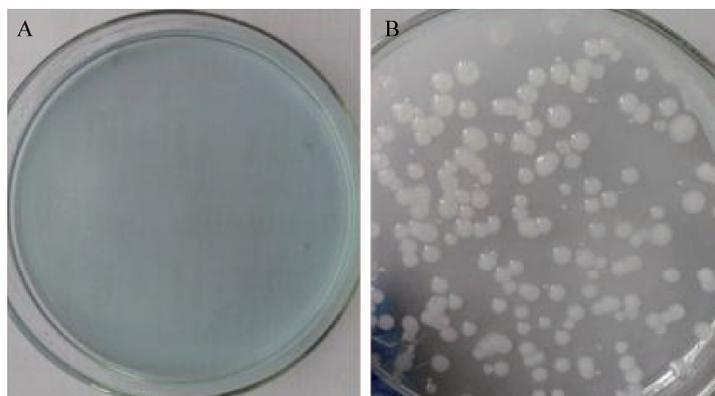


图 2 *Klebsiella* sp. JD 菌落形态

Figure 2 Colonies morphology of *Klebsiella* sp. JD

注: A: 脱色前; B: 脱色后.

Note: A: Before decolorization; B: After decolorization.

表 1 菌株 *Klebsiella* sp. JD 的生理生化特征
Table 1 Physiological and biological characteristics of strain *Klebsiella* sp. JD

项目 Item	结果 Result
氧化酶 Oxidase	-
吲哚 Indole	-
丙二酸 Malonate	+
柠檬酸盐 Citrate	+
甲基红 Methyl-red	-
VP	+
乳糖 Lactose	+
N-acetylglucosamine	+
Ribose	-
蔗糖 Sucrose	-
麦芽糖 Maltose	-
乳酸盐 Lactate	+

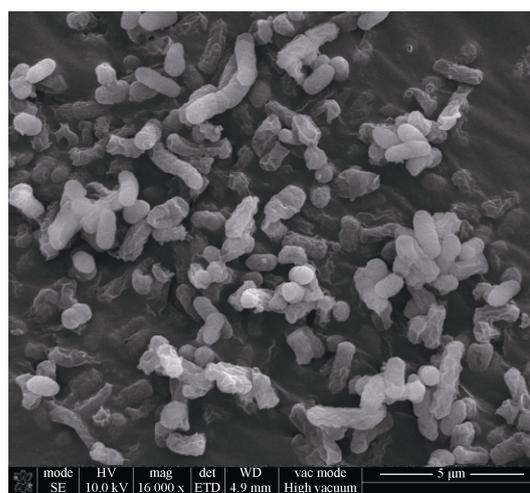
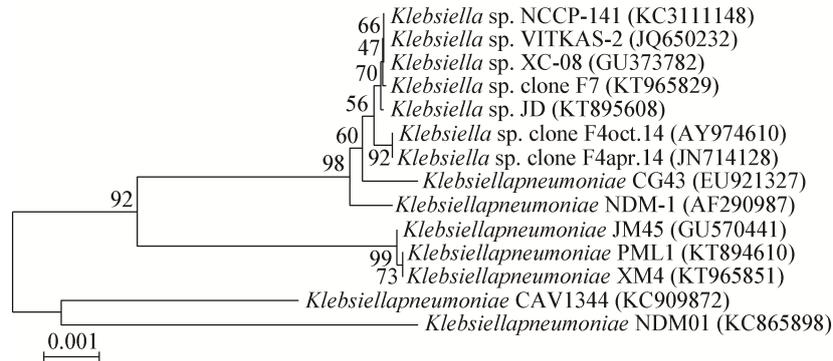


图 3 *Klebsiella* sp. JD 扫描电子显微镜(SEM)图

Figure 3 SEM images of strain *Klebsiella* sp. JD

图4 菌株 *Klebsiella* sp. JD 系统发育树Figure 4 Phylogenetic trees of *Klebsiella* sp. JD

注: 每一结点表示分类学单元; 分支长度表示该分支进化过程中变化的程度; 距离标尺表示序列之间差异的数字。

Note: Each node represents the taxonomic unit; The branch length indicates the extent of variation in the branch evolution; Distance figures indicate the difference between sequences.

2.2 不同时间菌株对孔雀石绿降解情况

从图5中可以看出, 当孔雀石绿浓度为 100 mg/L 时, 在 12 h 时脱色率达到 72.52%, 随着时间增加, 脱色率也呈增加趋势, 当 36 h 时, 脱色率达到 91.19%, 此时已几乎观察不到颜色, 同时脱色率也随着时间增加几乎达到完全脱色。

2.3 孔雀石绿对小球藻急性毒性试验

2.3.1 小球藻生长曲线: 从其生长曲线可知, 蛋白核小球藻在第 3 天开始进入生长对数期, 具有较高的活性, 从第 5 天开始进入稳定期。为保证实验的准确性, 实验应选取处在生长对数期的小球藻作为实验用藻, 因此选取第 3 天藻液作为实验用藻。

2.3.2 小球藻细胞浓度与吸光度间线性关系: 血球计数板法和分光光度法两者联合起来对小球藻的细胞浓度进行一一计数, 通过对小球藻的细胞浓度和吸光度值进行线性拟合, 得到它们的线性关系, 记为: $y=35.593x+0.1413$, 相关系数为 $R^2=0.9991$, 两者表现出较高的拟合性。由实验结果可得出: 在一定浓度范围内, 小球藻的细胞浓度与吸光度呈现线性关系, 在后续的小球藻急性毒性实验中, 可通过利用分光光度计法测定吸光度值, 通过换算可得出小球藻的细胞浓度, 即可对小球藻细胞数进行计数。

2.3.3 小球藻的生长率和抑制率: 从图 6 和图 7

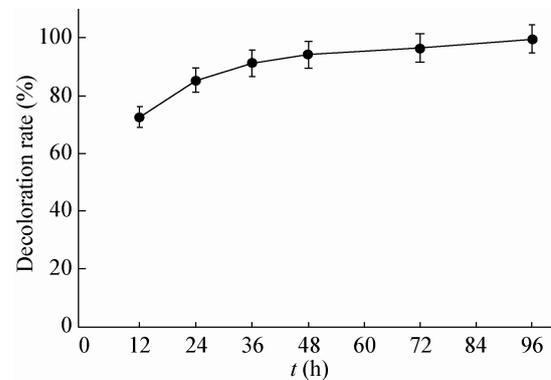


图5 不同时间孔雀石绿脱色率变化图

Figure 5 The decoloration rate of malachite green

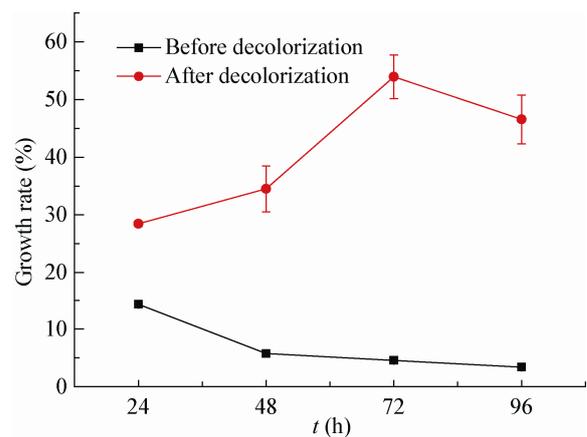


图6 染料脱色前后小球藻生长率变化图

Figure 6 Growth rate before decolorization and after decolorization

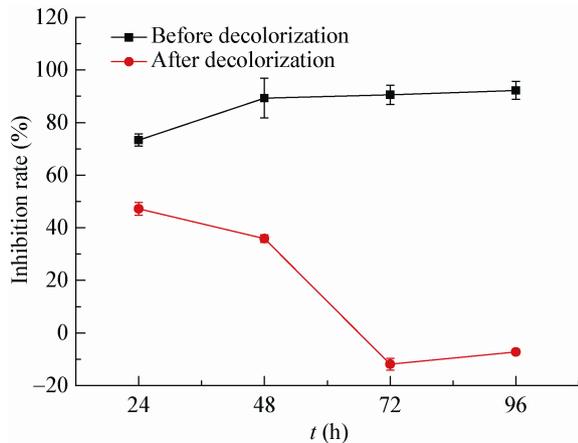


图7 染料脱色前后小球藻抑制率变化图

Figure 7 Inhibition rate before decolorization and after decolorization

可以看出,在处理24 h后小球藻的生长率为14.33%,处理48、72、96 h后小球藻的生长率分别为5.78%、4.58%、3.40%,小球藻的生长率逐渐下降。加入孔雀石绿染料脱色液,在处理24 h后小球藻的生长率为28.44%,处理48、72、96 h后小球藻的生长率分别为34.50%、53.94%、46.55%,小球藻的生长率先增长后下降。在处理24 h后小球藻的抑制率为73.32%,处理48、72、96 h后小球藻的抑制率分别为89.27%、90.50%、92.17%,孔雀石绿对小球藻表现出极高的抑制作用。加入孔雀石绿染料脱色液,在处理24 h后小球藻的抑制率为47.05%,处理48、72、96 h后小球藻的抑制率分别为35.82%、-11.91%、-7.26%,抑制率的数值由正值变为负值,即对小球藻的生长由抑制变为促进。同时由于养分的消耗,处理72 h后小球藻出现生长率下降的现象。由此可知孔雀石绿染料脱色前,小球藻的生长率随着处理时间的增加,大致呈现逐步下降的趋势,相对应小球藻的抑制率随着处理时间的增加,大致呈现逐步上升的趋势,孔雀石绿在脱色前对小球藻的生长表现出较强的抑制作用。孔雀石绿染料脱色后,小球藻的生长率随着处理时间的增加,大致呈现逐步上升的趋势,相对应小球藻的抑制率随着处理时间的增加,大致呈现逐步下降的趋势,孔雀石绿在脱色72 h后对小球藻的生长表现出一定

的促进作用。分析得出孔雀石绿对小球藻有毒性,能抑制藻细胞增殖,且抑制作用随着孔雀石绿浓度的增加而增强。脱色后的染料,分子结构在降解中破坏,对小球藻毒性大大降低。

2.4 孔雀石绿对蚕豆根尖微核毒性试验

2.4.1 孔雀石绿脱色前后蚕豆根尖细胞的微核细胞数:从表2可以看出,两组浓度染料相比脱色前,细胞微核数在脱色后明显减少,初步推断毒性下降。

2.4.2 孔雀石绿脱色前后蚕豆根尖细胞微核率及PI值:从微核率MCN%来看(表3),对于初始浓度为50 mg/L的孔雀石绿溶液,脱色前后蚕豆根尖的微核率分别为14‰和4‰,对于初始浓度为100 mg/L的孔雀石绿溶液,脱色前后蚕豆根尖的微核率分别为25‰和9‰。两种浓度下的孔雀石绿溶液在脱色后蚕豆根尖的微核率均有所减少。微核率在10%以下属于基本没有污染;10%–18%区间为轻污染;18%–30%区间为中污染;30%以上为重污染。因此,浓度为50 mg/L和100 mg/L的孔雀石绿溶液在脱色后毒性均明显降低。从污染指数来看,对于初始浓度为50 mg/L的孔雀石绿溶液,脱色前后蚕豆根尖的PI值分别为1.8和0.5,对于初始浓度为100 mg/L的孔雀石绿溶液,脱色前后蚕豆根尖的PI值分别

表2 孔雀石绿脱色前后蚕豆根尖细胞的微核细胞数
Table 2 The number of micronuclei in cells

组别 Group	浓度 Concentration (mg/L)	细胞总数 Cell number	MCN%
对照组 Control group	0	2 000	16
实验组 I Experimental group I	50 (脱色前)	2 000	28
实验组 II Experimental group II	100 (脱色前)	2 000	50
实验组 III Experimental group III	50 (脱色后)	2 000	8
实验组 IV Experimental group IV	100 (脱色后)	2 000	18

表3 蚕豆根尖微核率和 PI 值

Table 3 MCN% and PI

组别 Group	浓度 Concentration (mg/L)	MCN%	PI	污染程度 Pollution degree
对照组 Control group	0	8	—	—
实验组 I Experimental group I	50 (脱色前)	14	1.8	轻污染
实验组 II Experimental group II	100 (脱色前)	25	3.1	中度污染
实验组 III Experimental group III	50 (脱色后)	4	0.5	未污染
实验组 IV Experimental group IV	100 (脱色后)	9	1.1	未污染

为 3.1 和 1.1。初始浓度为 50 mg/L 的孔雀石绿溶液由脱色前的轻污染变为脱色后的未污染, 初始浓度为 100 mg/L 的孔雀石绿溶液由脱色前的中度污染变为脱色后的未污染, 由此可以看出^[18], 浓度为 50 mg/L 和 100 mg/L 的孔雀石绿溶液在脱色后对蚕豆根尖细胞的污染程度显著下降。文献显示^[19], 孔雀石绿降解后, 特征吸收峰下降或转移, 芳环断裂, 共轭多芳香化合物被降解。研究表明, 二苯甲酮是孔雀石绿降解的主要产物。由此猜测, 结构的变化是毒性降低的主要原因。

3 结论与讨论

目前, 国内外常用的染料废水处理的方法可以分为物理法、化学法和生物法。传统的物化法虽然效果好, 但较高的成本以及严重的二次污染限制了其在实际中的应用, 生物法以廉价、高效与环境友好等优势而广为应用。目前利用微生物处理染料废水的应用和研究居于首位, 许多研究者致力于高效脱色染料微生物的筛选、分离和驯化。近年来, 分离到的孔雀石绿脱色菌包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和白腐真菌^[20] (*Phanerochate chrysosporium*)等。目前有关克雷伯氏杆菌属对孔雀石绿脱色的研究较少, 尤其对毒性降解方面研究更少。其中以白腐真菌为代表的真菌对染料进行脱色的主要原理是通过其产生的各种染料降解相关酶对合成木质素或染料分子进行矿化, 这些降解相关的酶主要包括漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶, 但这些酶在不同真菌脱色染料过程中的相关贡献率不尽相同。本研究从

印染污水处理厂活性污泥中筛选出一株高效脱色孔雀石绿的菌株, 与克雷伯氏杆菌(*Klebsiella* sp. CCFM8383)表现出 99%的相似性。结合形态分析, 确定为克雷伯氏杆菌属, 命名为 *Klebsiella* sp. JD。当孔雀石绿浓度在 20–100 mg/L 时, 脱色率可以达到 90%以上, 肉眼已经观察不到颜色。此外, 由于孔雀石绿脱色前毒性大, 已被列为禁止使用化学品, 然而本研究中通过对脱色之后毒性进行研究得出脱色后染料毒性大大降低, 环境友好性强, 将为之后的孔雀石绿工业应用提供理论支持。该菌株可以将水溶液中的染料分子吸附在细菌细胞壁的表面, 同时也通过自身酶系对染料分子进行催化降解。菌株来源简单, 生长周期短, 易培养, 可通过基因工程菌技术将菌株对孔雀石绿有脱色效果的基因克隆, 则将在印染废水处理中有很大的应用前景。另外, 由于以前的研究中各种菌株对孔雀石绿的脱色效率不尽人意, 因此仍需广泛筛选孔雀石绿高效降解菌株, 尤其应当广泛筛选当孔雀石绿浓度较高时仍有较好降解效果的菌株。本研究中 *Klebsiella* sp. JD 的发现丰富了孔雀石绿的微生物脱色种群, 有利于染料污染水体的生物修复。

参考文献

- [1] Sun MY, Yang XQ, Cen JW, et al. Research progress of malachite green in fishery[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(2): 312-315 (in Chinese)
孙满义, 杨贤庆, 岑剑伟, 等. 水产品中孔雀石绿的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009(2): 312-315
- [2] Fang GH. Identification and degradation characteristics of an malachite green degradation bacterial strain *Arthrobacter* sp. M6[D]. Nanjing: Master's Thesis of Agricultural University of Nanjing, 2010 (in Chinese)

- 房桂华. 孔雀石绿降解菌 *Arthrobacter* sp. M6 的分离、鉴定及其降解特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010
- [3] Du LN. The characteristics and mechanism of dye decolorization by *Pseudomonas* sp. DY1 and *Micrococcus* sp. BD15[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2012 (in Chinese)
都林娜. *Pseudomonas* sp. DY1 和 *Micrococcus* sp. BD15 对染料的脱色特性及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2012
- [4] Chiari M, Etori C, Righetti Pier G, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids, as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [5] Song SK. Selection of high effective decolorizing bacteria and research on the mechanism of decolorization[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Institutes of Technology of South China, 2014 (in Chinese)
宋汕柯. 高效染料脱色菌的筛选与脱色机理研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2014
- [6] Zhai YX, Guo YY, Geng X, et al. Advances in studies on metabolic mechanism and bio-toxicity of malachite green[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(1): 27-32 (in Chinese)
翟毓秀, 郭莹莹, 耿霞, 等. 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(1): 27-32
- [7] Qiao JJ. Study on biodegradation of triphenylmethane dyes wastewater[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Technology, 2005 (in Chinese)
谯建军. 三苯甲烷类染料废水微生物降解研究[D]. 西安: 西安理工大学硕士学位论文, 2005
- [8] Omar HH. Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2008, 11(10): 1310-1316
- [9] Sarayu K, Sandhya S. Aerobic biodegradation pathway for Remazol Orange by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(4): 1241-1253
- [10] Zheng YL, Zhong YL, Xu S, et al. Isolation and characteristics of fungus on absorption and decolorization dye of direct scarlet 4BE[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(7): 14-17 (in Chinese)
郑永良, 钟玉林, 徐胜, 等. 直接大红 4BE 染料吸附脱色真菌的分离及特性研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(7): 14-17
- [11] Yin L, Chen ZH, Zhao SJ. Optimization of laccase production from *Geotrichum candidum* and decoloration of azo dyes by laccase[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2008, 32(16): 85-90 (in Chinese)
尹亮, 陈章和, 赵树进. 白地霉产漆酶条件优化及对偶氮染料的脱色[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2008, 32(16): 85-90
- [12] Tan L. Study of high-salt azo dye wastewater treatment by *Exiguobacterium* sp. TL and its performance[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2010 (in Chinese)
谭靓. *Exiguobacterium* sp. TL 的性能及其处理高盐偶氮染料废水的研究[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2010
- [13] Wang LY. Toxic effects of nano CuO on *Chlorella* sp.[D]. Qingdao: Master's Thesis of Chinese Marine University, 2013 (in Chinese)
王丽艳. 纳米 CuO 对小球藻的毒性效应研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2013
- [14] Zhang XL. Acute toxic effects of typical industry wastewater on four microalgae[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2013 (in Chinese)
张锡龙. 典型行业废水对四种微藻的急性毒性效应研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2013
- [15] Wang SY. Dissipation of carbendazim, chlorothalonil and chlorpyrifos in cucumber and soil inside the greenhouse and soil genotoxicity induced by the pesticides[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2015 (in Chinese)
王少云. 多菌灵、百菌清、毒死蜱在大棚黄瓜和土壤中的残留特征及其对土壤遗传毒性的影响[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2015
- [16] Chen KF. The toxicity of plant auxin on *Vicia faba*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Central China Normal University, 2011 (in Chinese)
陈凯峰. 植物生长素对蚕豆的毒害作用[D]. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文, 2011
- [17] Li AL, Jia P. Application and development of micronucleus detection technology in the root tip of broad bean[J]. Journal of Shaanxi Agricultural Science and Technology University, 2014, 60(5): 66-68 (in Chinese)
李爱玲, 贾盼. 蚕豆根尖微核检测技术的应用与发展[J]. 陕西农业科技大学学报, 2014, 60(5): 66-68
- [18] Xu XL, Yu SC, Ye JJ, et al. Research on the water quality-monitoring of the Southern Taihu Lake with Micronucleus Technique of *Vicia faba* root tip cell[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(17): 7839-7840,7843 (in Chinese)
徐雪丽, 于淑池, 叶杰君, 等. 蚕豆根尖细胞微核技术监测南太湖水质污染状况的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7839-7840,7843
- [19] Wu Y, Chen M, Liu J. Biodecolorization and biodegradation of malachite green by *Pleurotus eryngii* and degradation products analysis[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(8): 2844-2851 (in Chinese)
吴茵, 陈敏, 刘洁. 刺芹侧耳对孔雀石绿的脱色降解及其产物分析[J]. 环境科学学报, 2016, 36(8): 2844-2851
- [20] Du LN, Pan X, Li G, et al. Isolation, identification and characterization of the highly efficient Malachite Green-decolorizing strain[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(1): 143-151 (in Chinese)
都林娜, 泮琇, 李刚, 等. 孔雀石绿高效脱色菌株的筛选、鉴定与脱色特性研究[J]. 环境科学学报, 2014, 34(1): 143-151