

研究报告

苯系物降解菌 *Pseudomonas putida* SW-3 的筛选及其降解苯的研究

张燕可¹ 冯守帅^{1*} 杨海麟^{1*} 黄兴² 唐嘉鼎² 吴泉钱² 顾利星²

(1. 江南大学生物工程学院 教育部工业微生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 无锡市城市环境卫生有限公司 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】以苯、甲苯和苯乙烯为唯一碳源,从工业石油废水中筛选苯系物降解菌,分析其降解特性,探讨底物间相互作用对降解情况的影响。【方法】经生理生化和 16S rRNA 基因分析进行菌种鉴定,采用顶空气相色谱法测定苯系物含量,通过细胞的疏水性、乳化能力、排油圈及透射电镜观察分析菌株降解特性。【结果】经鉴定该菌为 *Pseudomonas putida*, 命名为 SW-3 菌株。最适降解条件下,单位菌体对苯、甲苯和苯乙烯的最大降解速率分别为 0.072、0.035 和 0.019 g/(L·h),苯系混合物的总降解率达 79.99%。底物降解实验表明,苯可促进甲苯和苯乙烯的降解,而苯乙烯则能抑制甲苯的降解。菌株的吸附、摄取和降解特性的研究发现,菌株 SW-3 在自身分泌的表面活性剂的协助下以耗能的方式运输苯。【结论】菌株 SW-3 具有产生表面活性剂和降解苯系物的能力,且底物间的相互作用能够显著影响菌株对不同底物的降解。

关键词: 苯系物,恶臭假单胞菌,生物降解,相互作用

Isolation and characterization of benzene degradation strain *Pseudomonas putida* SW-3

ZHANG Yan-Ke¹ FENG Shou-Shuai^{1*} YANG Hai-Lin^{1*} HUANG Xing²
TANG Jia-Ding² WU Quan-Qian² GU Li-Xing²

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Wuxi City Environmental Sanitation Co. Ltd., Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] The objective of this study is to isolate a bacterium strain from industrial oil

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21606110); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150133)

*Corresponding authors: FENG Shou-Shuai: Tel: 86-510-85326829; E-mail: fengss@jiangnan.edu.cn
YANG Hai-Lin: Tel: 86-510-85918119; E-mail: biocatalysis123@163.com

Received: November 30, 2016; Accepted: January 19, 2017; Published online (www.cnki.net): January 20, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21606110); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20150133)

*通讯作者: 冯守帅: Tel: 86-510-85326829; E-mail: fengss@jiangnan.edu.cn

杨海麟: Tel: 86-510-85918119; E-mail: biocatalysis123@163.com

收稿日期: 2016-11-30; 接受日期: 2017-01-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-20

wastewater with benzene, toluene and styrene as the sole carbon source, then to analyze the degradation characteristics of the strain and to study the effect of substrate interaction on the degradation. **[Methods]** The strain was identified with physiological-biochemical and 16S rRNA gene sequence analysis; HS-GC was used to determine benzene series concentration; the degradation characteristics of the strain were analyzed by the hydrophobicity, emulsifying ability, oil displacement and transmission electron microscopy. **[Results]** The strain was identified as *Pseudomonas putida*, named SW-3. The maximum degradation rates of benzene, toluene and styrene were 0.072, 0.035 and 0.019 g/(L·h), and the total degradation rate of benzene mixture was 79.99% under the optimum degradation conditions. The interactions between substrates indicated that the degradation of toluene and styrene was stimulated by benzene, while the degradation of toluene was inhibited in the presence of styrene. The analysis about characteristics of adsorption, uptake and degradation of SW-3 suggested that SW-3 could transport the benzene by the energy-dissipating vesicle transport with the aid of the secreted surfactants. **[Conclusion]** Strain SW-3 has the ability to produce surfactants and degrade benzene compounds, and the interaction between substrates can significantly affect the degradation of different substrates.

Keywords: Benzene series, *Pseudomonas putida*, Biodegradation, Interaction

苯系物是苯及其衍生物的总称, 被广泛用于油漆、纺织、合成橡胶等行业, 是人类活动排放的常见污染物, 代表性的有苯(Benzene)、甲苯(Toluene)、苯乙烯(Styrene)等。由于苯系物有较强的挥发性, 其生产和运输过程易造成大气污染, 形成光化学烟雾^[1]。许多苯系物对人体有较大毒性, 如苯、甲苯、苯乙烯不仅有遗传毒性还能够对中枢神经系统产生麻痹作用, 引起急性中毒, 其中苯、苯乙烯已经是明确的致癌物^[2]。

生物法处理苯系物废气的工艺简单, 成本低廉, 无二次污染, 因此受到广泛关注。段传人等^[3]筛选到的真菌 *Aspergillus versicolor* 8 d 内对 439.3 mg/L 苯的降解率达 78.56%。Jiang 等^[4]从工业石油废水中筛选到的细菌 *Comamonas* sp. 能够在 32 h 内将 150 mg/L 的 BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene 和 *o*-, *m*-, 和 *p*-Xylene) 完全降解。Reardon 等^[5]的研究显示, *Pseudomonas putida* F1 能够在 15 h 内将 15 mg/L 的苯和甲苯完全降解。已报道文献中, 菌种对较高浓度苯系物的降解周期偏长, 处理效率偏低, 菌株对苯系物的吸附、摄取鲜有研究。因此从典型工业现场筛选高效苯系物降解菌, 分析菌株的降解特性具有重要意义。本文以苯系物中具有代表性的苯、甲苯和苯乙烯

为唯一碳源, 从石化公司废水处理系统中筛选出一株苯系物降解菌, 研究其对苯系物的降解特性, 探讨底物间相互作用对降解情况的影响, 为苯系物的生物处理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

苯、甲苯和苯乙烯, 国药集团化学试剂有限公司。GC-2010 气相色谱仪, 岛津企业管理(中国)有限公司。

1.2 菌株和培养基

菌株筛选自中国石油辽阳石化分公司动力厂 450# 污水处理系统的污水。

无机盐培养基(g/L): K_2HPO_4 1.550, NaH_2PO_4 0.825, NH_4Cl 1.340, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.500, $CaCl_2$ 0.075, 1 mL 微量元素溶液(g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.500, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.148, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.258, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.024, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.022, $CuCl_2$ 0.013, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.100, H_3BO_3 0.062), 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 灭菌后添加经 0.22 μm 微孔滤膜过滤的苯、甲苯、苯乙烯的混合物(体积比为 1:1:1)作为碳源。无机盐固体培养基在液体培养基的基础上添加 2% 琼脂。LB 培养基配方参考于建明等^[6]的研究。

1.3 菌株的分离纯化

污水摇匀后以 5% (体积比)的接种量转接至含 200 mg/L 苯系混合物的无机盐培养基, 30 °C、170 r/min 条件下每 2 d 转接一次进行驯化培养。培养过程用封口膜密封瓶口, 防止苯系物挥发。驯化中的菌液稀释涂布无机盐固体培养基, 挑选单菌落进行平板划线分离。

1.4 菌株的鉴定

菌株的形态及生理生化特性的鉴定参考《常见细菌系统鉴定手册》^[7]。分子生物学鉴定以菌株基因组为模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTG TTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因^[8]。扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测得结果在 GenBank 中进行同源性比对, 利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.5 菌株对单一底物和混合底物的降解情况

向盛有 50 mL 无机盐培养基的 250 mL 锥形瓶中分别加入适量的单一底物苯、甲苯、苯乙烯以及等比例互相混合的苯、甲苯和苯乙烯, 使每个锥形瓶中的底物浓度为 200 mg/L, 定时测定培养液中残留的底物, 计算降解率。

1.6 菌株吸附、摄取苯的机理

采用 BATH 法^[9]测定细胞的疏水性。乳化能力和排油圈直径的测定参考文献^[10]。

以代表性的苯为研究对象考察 SW-3 对苯系物的吸附量及胞内储存量。菌悬液接种于含 200 mg/L 苯的无机盐培养基, 分别在 2、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50 min 时离心菌体 (4 000 r/min, 10 min), 无机盐培养基清洗 1 次, 乙醇/丁醇/氯仿(体积比 10:10:1)清洗 2 次, 再用无机盐培养基清洗 2 次, 合并清洗液(清洗液中的苯含量即为细胞表面吸附的苯含量); 对收集的菌体进行超声破壁并离心, 上清液中的苯含量即为胞内的苯富集量^[10]。

1.7 分析方法

1.7.1 苯系物浓度的测定: 称重法取 5 g 培养液于

20 mL 的顶空瓶中, 采用顶空气相色谱法测定苯、甲苯和苯乙烯的含量。顶空条件: 炉温 80 °C, 定量环温度 90 °C, 传输线温度 100 °C, 平衡时间 30 min, GC 循环时间 31 min。色谱条件: 色谱柱: HP-INNOWAX (30 m×0.25 mm×0.25 mm); 柱温: 40 °C 保持 3 min, 之后 15 °C/min 升温到 90 °C, 保持 3.5 min; 进样口温度: 220 °C; FID 检测器温度: 250 °C; 载气(N₂)流量 2 mL/min; H₂ 流量 30 mL/min; 空气流量 300 mL/min; 分流比 10:1。在该气相色谱条件下, 苯、甲苯和苯乙烯的出峰时间分别在 2.797、4.142 和 6.975 min。

1.7.2 降解率计算方法: 降解率=(苯系物减少量-苯系物挥发量)/(苯系物初始量-苯系物挥发量)×100%。

1.7.3 菌体生物量的测定: 采用可见分光光度法测定不同浓度培养液在 600 nm 下的吸光值 (OD₆₀₀), 同时测定不同浓度培养液对应的菌体干重, 每个浓度做 3 个平行, 绘制吸光值与细胞干重标准曲线, 根据不同吸光值计算细胞干重^[6]。

1.7.4 菌体的透射电镜观察: 将 SW-3 分别接种于 LB 培养基和含 200 mg/L 苯的无机盐培养基, 培养 32 h, 菌液经适当稀释后滴在铜网膜上, 待样品干燥后, 通过透射电镜观察不同培养条件下菌体的形态结构。

2 结果与分析

2.1 苯系物降解菌的分离和鉴定

经 3 次纯种分离纯化, 从工业石油废水筛得一株苯系物降解菌 SW-3。在 LB 固体培养基培养 36 h 可形成表面光滑、边缘整齐的浅黄色圆形菌落(图 1B)。观察 LB 培养基中菌体的透射电镜图(图 1C 和 1D)可知, SW-3 为杆菌, 大小约为 0.5 μm×1.6 μm, 具有单端鞭毛和不规则荚膜。菌株 SW-3 的具体生理生化特性如表 1 所示, 接触酶阳性、淀粉水解和甲基红试验阴性, 与於建明等^[6]报道的苯乙烯降解菌 *P. putida* 的生理特性一致。

对菌株 SW-3 的 16S rRNA 基因测序得到 1 398 bp 序列, 上传至 NCBI 获得 GenBank 登录号

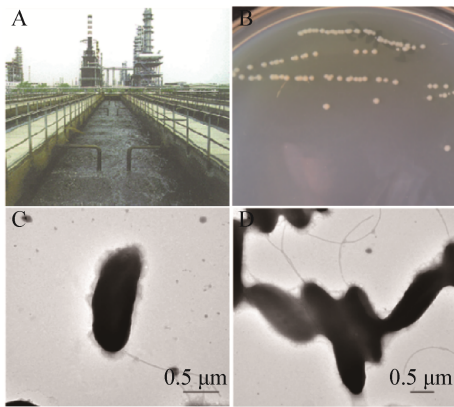


图 1 采样点和 SW-3 的菌落及透射电镜图
Figure 1 Sampling point, colony morphology and TEM photos of SW-3

注: A: 采样点; B: SW-3 的菌落形态; C、D: SW-3 透射电镜图。

Note: A: Sampling point; B: Colony morphology of SW-3; C, D: TEM photos of SW-3.

为 KU170625。系统发育树如图 2 所示, 菌株 SW-3 与 *Pseudomonas putida* D15 (EU046322.1) 的序列相似性达 100%, D15 是来源于土壤的铁载体产生菌, 菌落呈圆形、表面光滑且有一定黏性, 显微镜下细胞呈短杆状, 革兰氏染色阴性^[11]。结合 16S rRNA 基因分析和生理生化鉴定确定 SW-3 为恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*。

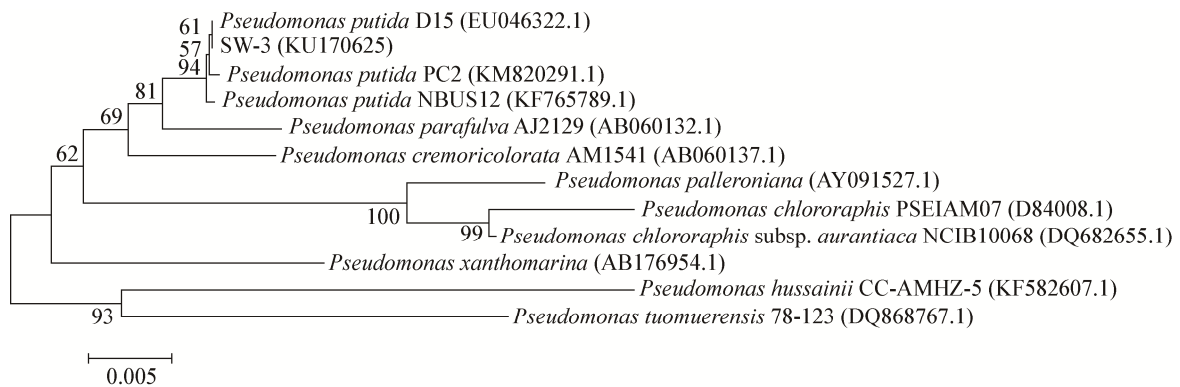


图 2 基于菌株 SW-3 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences of strain SW-3

注: 括号中的序列号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类至同一分支概率, 标尺刻度代表 0.5% 的序列差异。

Note: Number in parenthesis represent the sequence's accession number in GenBank. The numbers at each branch point in the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.5% sequence divergence.

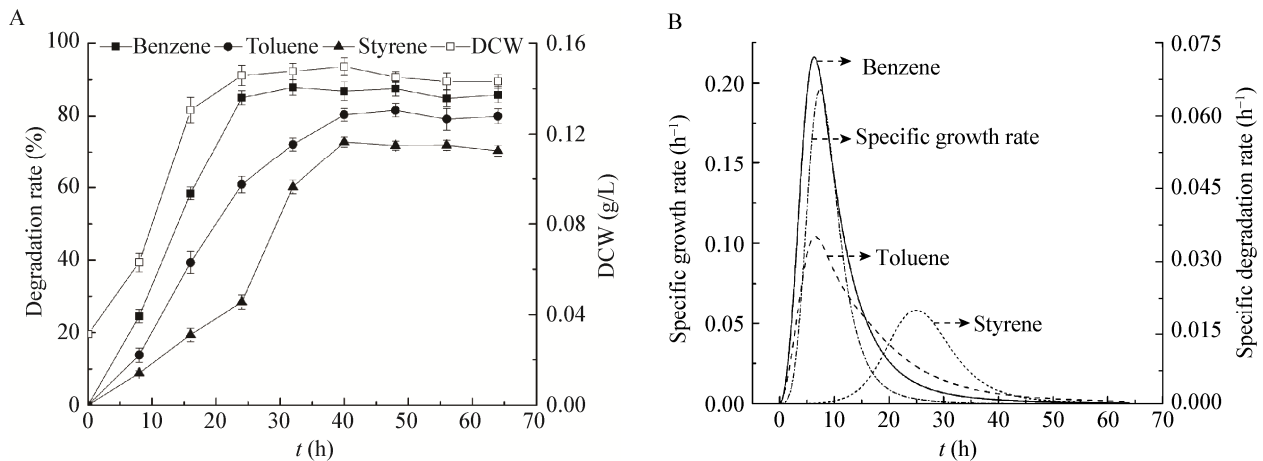
表 1 菌株 SW-3 的生理生化特性			
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain SW-3			
项目	结果	项目	结果
Item	Result	Item	Result
革兰氏染色	-	吲哚试验	-
Gram staining test	-	Indole test	-
接触酶试验	+	柠檬酸盐试验	+
Contact enzyme test	+	Citrate utilization test	+
尿素水解	-	H ₂ S 产生	-
Urea hydrolysis test	-	H ₂ S production	-
明胶水解	-	酪氨酸水解	-
Gelation hydrolysis	-	Tyrosine hydrolysis	-
甲基红试验	-	硝酸盐还原	+
Methyl Red test	-	Nitrate reduction test	+
V-P 试验	-	淀粉水解	-
V-P test	-	Starch hydrolysis	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

2.2 最适条件下 *P. putida* 降解苯系物的动力学特性

将菌悬液以 5% 的接种量投加到苯系物总浓度为 200 mg/L 无机盐培养基, 以预实验确定的最适降解条件 (30 °C、pH 7.0、170 r/min、底物浓度 200 mg/L) 进行培养。如图 3 所示, 苯的降解速率最高, 接种后 32 h 降解率达到 87.87%; 其次是甲苯, 48 h 达最大降解率 81.56%; 苯乙烯的降解在初始的 24 h

图3 *P. putida* 的动力学特性Figure 3 Kinetic characteristics of *P. putida*

注：A：苯系物的降解情况；B：菌株的比生长速率和底物的比降解速率。

Note: A: Degradation of benzene series; B: Specific growth rate of *P. putida* and specific degradation rate of substrates.

较为缓慢，随后迅速增加，在 40 h 时达最大降解率 72.81%。SW-3 最大比生长速率出现在第 7.5 h，最大值为 0.195 h^{-1} ，单位菌体(干重)对苯、甲苯和苯乙烯的最大降解速率分别为 0.072 、 0.035 、 $0.019 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。随着底物的消耗逐渐进入稳定期，在 40 h 时菌体量的积累达最大值 $0.145 \text{ g}/\text{L}$ 。

2.3 底物间相互作用对降解情况的影响

2.3.1 菌株对单一底物的降解：苯、甲苯、苯乙烯分别作为唯一碳源的降解情况如图 4A 所示，苯为唯一碳源的降解速度最快，没有明显滞后期，在接种 24 h 后降解率达 85.66%。甲苯为唯一碳源的降解经历了滞后期，在接种后 36 h 内菌体量及甲苯降解率均较低，之后迅速增加，在 72 h 时达到最大降解率 42.70%。苯乙烯作为唯一碳源的降解率明显低于苯和甲苯的降解率，接种 80 h 后降解率不足 20%，菌体量的积累也明显少于苯和甲苯为唯一碳源的情况，接种 60 h 后菌体干重仅为 $0.1 \text{ g}/\text{L}$ 。

2.3.2 菌株对混合苯系物的降解：将 SW-3 分别接种于以苯、甲苯和苯乙烯的双混合物和三混合物为碳源的培养基中，考察底物间的相互作用^[12]。与单一底物时的降解情况相比，甲苯与苯作为混合底物时(图 4B)，甲苯的降解受到促进，不再出现明显的滞后期，接种 72 h 降解率达 85.89%；甲

苯与苯乙烯作为混合底物时(图 4C)，甲苯的降解受到抑制，而苯乙烯的降解则受到轻微的促进；苯乙烯与苯作为混合底物时(图 4D)，苯乙烯的降解受到较强促进作用。由于苯系物降解酶系活性的高低大多受降解产物的诱导，易降解底物形成的中间产物能对其他底物的降解形成诱导^[13]。因此，在苯、甲苯和苯乙烯混合底物的降解实验中(图 3A)，甲苯和苯乙烯的降解率由于易降解底物苯的存在而明显提高。Jiang 等^[4]研究的 *Comamonas* sp. 能够降解 $150 \text{ mg}/\text{L}$ 混合苯系物，Reardon 等^[5]研究的 *Pseudomonas putida* F1 能够降解 $15 \text{ mg}/\text{L}$ 的苯和甲苯，而 SW-3 能够高效降解 $200 \text{ mg}/\text{L}$ 混合苯系物，此外，与高浓度苯系物降解真菌 *Aspergillus versicolor*^[3]相比，SW-3 的降解时间更短。

2.4 SW-3 吸附、摄取苯的机理

2.4.1 SW-3 对底物的摄取方式：乳化性和排油圈的大小可衡量培养液是否含表面活性物质，疏水性则表征细胞对底物的黏附性，高的疏水性使菌体更易与底物接触。从图 5 可以看出，SW-3 的乳化效果较好，48 h 后乳化性达 54.65%，排油圈直径达 5 cm 。通常排油圈大于 3 cm 即可认为菌液中有表面活性物质。随着反应进行，菌株的疏水性不断上升，最高达 48.94%。综上分析，

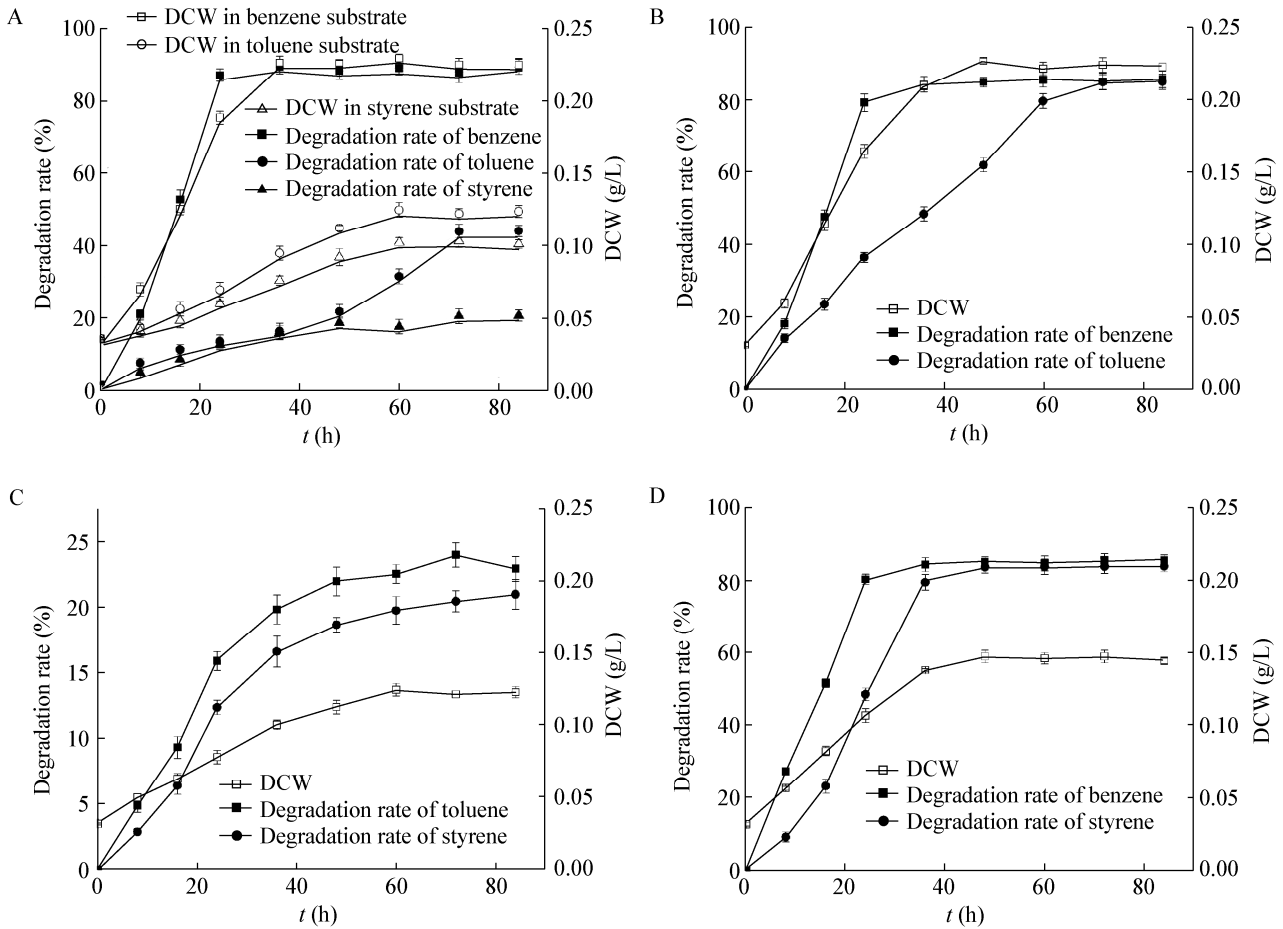


图 4 不同底物中的菌体干重和底物降解情况

Figure 4 DCW and degradation of substrates in different substrates

注：A：单一底物中的菌体干重和底物降解情况；B：苯和甲苯中的菌体干重和底物降解情况；C：甲苯和苯乙烯中的菌体干重和底物降解情况；D：苯和苯乙烯中的菌体干重和底物降解情况。

Note: A: DCW and degradation of each benzene series in the single substrate; B, C, D: DCW and degradation of each benzene series in benzene and toluene, toluene and styrene, benzene and styrene.

SW-3 在利用苯系底物的过程中产生表面活性物质，表面活性剂促进了底物的溶解，更利于菌体的摄取。

2.4.2 菌株对苯系物的吸附规律：实验考察 50 min 内菌体吸附苯的变化。从图 6A 可以看出，初期菌株对苯的吸附浓度较低，随后逐渐增加，10 min 后达到最大吸附浓度 2.1 mg/L，30 min 后吸附量趋于稳定。这与菌株对底物的摄取方式有关，在接种初期菌体代谢水平低，表面活性剂产量少，菌株疏水性不高，所以对苯的吸附浓度较低。菌株适应新环境后产生更多的表面活性剂分泌至胞外，

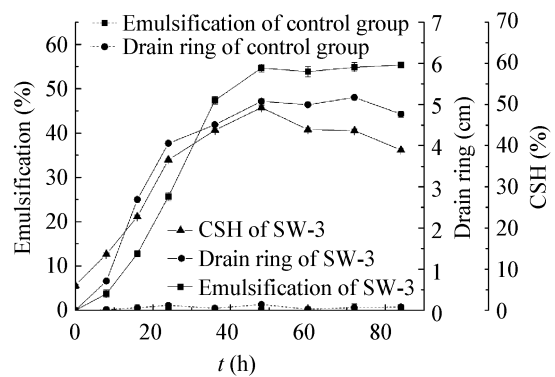


图 5 细胞乳化性、排油圈和疏水性随时间的变化
Figure 5 Change of emulsification, drain ring and CSH with time

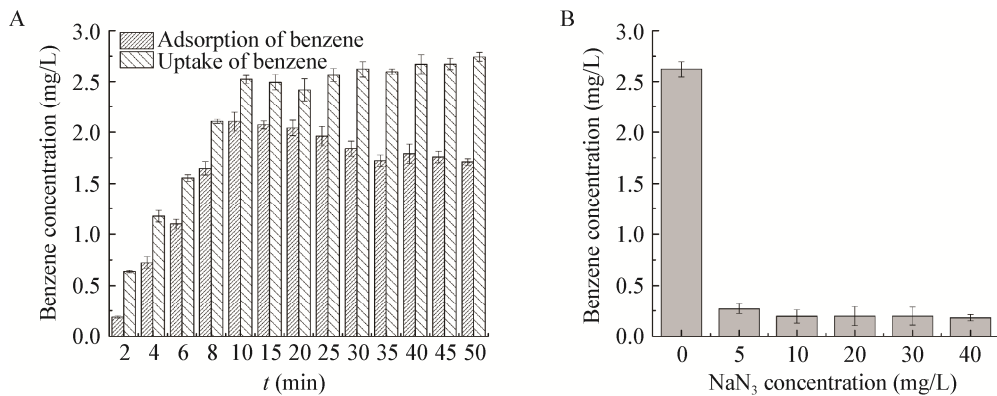


图 6 SW-3 对苯系物的吸附和摄取情况

Figure 6 Adsorption and uptake of benzene series by SW-3

注：A：吸附和富集苯浓度随时间的变化；B：NaN₃对SW-3富集苯的抑制作用。

Note: A: Change of adsorption and enrichment benzene with time; B: Inhibition of NaN₃ to SW-3.

分散乳化底物，使其更易被吸附，因此菌体对苯的吸附浓度不断增加。受底物和菌体量的限制，表面活性剂不会持续产生，所以苯的吸附浓度也保持基本稳定。

2.4.3 菌株对苯系物的运输方式：以 200 mg/L 苯为唯一碳源，比较 50 min 内 SW-3 吸附和富集苯浓度的区别。如图 6A 所示，在同一时间点吸附在菌体表面的苯浓度均少于富集于菌体内的，说明 SW-3 沿着逆浓度梯度向胞内运输苯。参考刘音颂^[10]的研究，采用氧化磷酸化抑制剂 NaN₃ 阻止 ATP 的生成来进一步验证苯的运输方式。在含不同浓度 NaN₃ 的培养基中培养 30 min 后测定细胞内的苯浓度。结果如图 6B 所示，少量 NaN₃ 的添加即能显著

减少菌体内苯的富集量，添加量越大，菌体内的苯富集量越少。该结果暗示 SW-3 对苯的运输过程是耗能的。

2.4.4 菌株的透射电镜分析：利用 TEM 观察以苯为碳源培养 32 h 的菌体，结果如图 7 所示。与 LB 培养基培养的菌体(图 1C, 1D)相比，菌株的细胞状态有较大改变，由原来的长杆状变为椭圆形或锥形，荚膜增厚，菌体内出现了透明的包含物^[14]。Rocha 等^[15]对柴油和烷烃降解菌的研究也观察到类似包含物，并推测其可能与有机底物的代谢废物或未降解底物的储存有关。培养过程中菌体周围黏附许多黏性物质，可能为细胞分泌的表面活性剂和被表面活性剂乳化的底物。

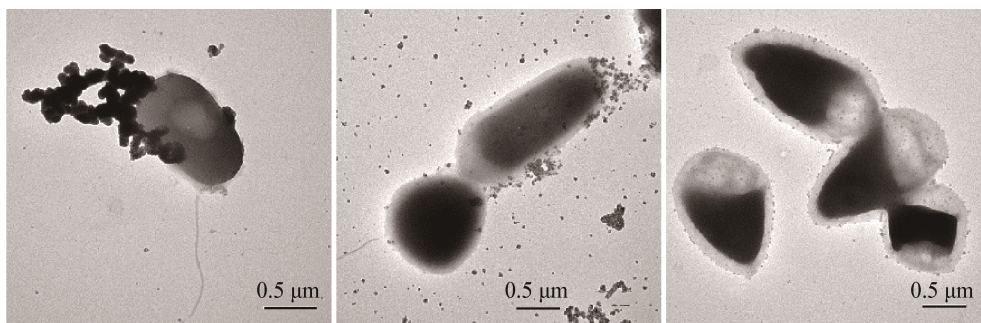


图 7 苯培养下的 SW-3 透射电镜图

Figure 7 TEM photos of SW-3 under benzene series

3 结论

(1) 以苯、甲苯和苯乙烯为唯一碳源, 筛选到一株苯系物降解菌。经鉴定, 该菌为 *Pseudomonas putida*, 命名为 SW-3 菌株。

(2) 在苯系物最佳降解条件下, SW-3 的最大比生长速率为 0.195 h^{-1} ; 单位菌体(干重)对苯、甲苯和苯乙烯的最大降解速率分别为 0.072、0.035 和 $0.019 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$, 接种 40 h 降解率分别达 86.83%、80.32% 和 72.81%。

(3) 菌 SW-3 能够降解单一底物的苯、甲苯和苯乙烯, 且对苯的降解效果最佳。在双底物降解实验中, 甲苯的降解能够被苯乙烯抑制, 而苯乙烯的降解在有苯和甲苯存在时显著提高。

(4) 乳化性、排油圈、细胞疏水性和透射电镜观察等分析表明 SW-3 在自身分泌的表面活性剂的协助下以耗能的方式运输苯。

参考文献

- [1] Asenjo NG, Álvarez P, Granda M, et al. High performance activated carbon for benzene/toluene adsorption from industrial wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 192(3): 1525-1532
- [2] Fuchs G, Boll M, Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(11): 803-816
- [3] Duan CR, Hu J, Song YA, et al. Isolation and identification of a benzene-degrading strain and choice of packing material during degradation of benzene in biofilter[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(7): 2388-2394 (in Chinese)
段传人, 胡江, 宋永安, 等. 高效苯降解菌的筛选鉴定及其在生物过滤塔处理苯的填料选择[J]. *环境工程学报*, 2012, 6(7): 2388-2394
- [4] Jiang B, Zhou ZC, Dong Y, et al. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-xylenes by the newly isolated bacterium *Comamonas* sp. JB[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(6): 1700-1708
- [5] Reardon KF, Mosteller DC, Rogers JB. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 69(4): 385-400
- [6] Yu JM, Liu L, Cai WJ, et al. Identification and characteristics of a *Pseudomonas putida* strain with the capable of efficiently degrade styrene[J]. *China Environmental Science*, 2014, 34(6): 1564-1571 (in Chinese)
於建明, 刘靓, 蔡文吉, 等. 一株苯乙烯高效降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. *中国环境科学*, 2014, 34(6): 1564-1571
- [7] Dong XZ, Cai MY. *Common Bacterial Manual System Identification*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 348-392 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 348-392
- [8] Feng SS, Yang HL, Xin Y, et al. Isolation of an extremely acidophilic and highly efficient strain *Acidithiobacillus* sp. for chalcopyrite bioleaching[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(11): 1625-1635
- [9] Lin J, Zeng JJ, Liu ST, et al. Cell surface hydrophobicity of *Ralstonia solanacearum*[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(1): 45-50 (in Chinese)
林娟, 曾金晶, 刘树滔, 等. 青枯菌细胞表面的疏水性[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(1): 45-50
- [10] Liu YS. Research on treatment efficiency and biodegradation mechanism of long chain alkanes in coal gasification wastewater by MBBR[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2014 (in Chinese)
刘音颂. 生物强化技术处理煤制气废水中链烷烃的效能及机理研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2014
- [11] Yu SF, Ding YQ, Yao LT, et al. Isolation, identification and resistant features of a siderophores producing bacteria from peanut rhizosphere[J]. *Letters in Biotechnology*, 2008, 19(5): 701-703 (in Chinese)
于素芳, 丁延芹, 姚良同, 等. 一株花生根际铁载体产生菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *生物技术通报*, 2008, 19(5): 701-703
- [12] Song J, Shin S, Jang HS, et al. Kinetics and simulations of substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, *p*-xylene and styrene[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2012, 47(7): 1027-1035
- [13] Huang XR, Zhang CW, Zhang RJ, et al. Isolation, identification and degrading properties of PAHs-degrading bacteria[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 965-973 (in Chinese)
黄兴如, 张彩文, 张瑞杰, 等. 多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 965-973
- [14] Zedelius J, Rabus R, Grundmann O, et al. Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(1): 125-135
- [15] Rocha CA, Pedregosa AM, Laborda F. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925[J]. *AMB Express*, 2011, 1: 9