

研究报告

响应面分析法优化沙雷氏菌(*Serratia* sp.) AXJ-M 对己烯雌酚的降解

安卫娟 钟敏 张庆华 邹金琦 柯淑芬 罗咏琪 钟春燕 安雪姣*

江西农业大学生物科学与工程学院 江西 南昌 330045

摘要:【背景】环境雌激素已成为目前干扰人类和动物内分泌系统而影响健康和生殖的一类新型环境污染物质,利用微生物的降解作用修复被其污染的环境具有重要的现实意义。【目的】以实验室保藏的一株己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)降解菌沙雷氏菌(*Serratia* sp.) AXJ-M 为对象,开展其对 DES 的降解特性及降解条件优化的实验研究。【方法】利用单因素试验、Plackett-Burman 因素筛选、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 设计相结合的方法优化 *Serratia* sp. AXJ-M 对 DES 的降解条件。【结果】(NH₄)₂SO₄、ZnCl₂、胰蛋白胨被分别选做无机氮源、额外金属离子和外加营养物质时,对 DES 降解有明显的促进作用。利用 Plackett-Burman 实验确定(NH₄)₂SO₄ 浓度、DES 浓度、pH 值为影响菌株 AXJ-M 降解 DES 的主要因素。在此基础上,采用最陡爬坡试验和 Box-Behnken 设计,确定菌株 AXJ-M 在(NH₄)₂SO₄ 浓度 1.48 g/L、ZnCl₂ 浓度 0.02 g/L、温度 30 °C、pH 7.19、DES 浓度 119.5 mg/L、接种量 3% (体积分数)下培养 7 d,菌株 AXJ-M 对 DES 的降解率达到 76.89%,较未优化前提高了 17.38%。【结论】*Serratia* sp. AXJ-M 具有较高的 DES 降解能力,该菌可为生物修复受 DES 或其他人工合成雌激素污染的环境提供优良的微生物资源。

关键词: 己烯雌酚, Plackett-Burman 设计, Box-Behnken 试验, 沙雷氏菌 AXJ-M, 降解特性

Degradation of diethylstilbestrol by *Serratia* sp. AXJ-M was optimized by Response Surface MethodologyAN Weijuan ZHONG Min ZHANG Qinghua ZOU Jinqi KE Shufen
LUO Yongqi ZHONG Chunyan AN Xuejiao*

College of Bioscience and Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

Abstract: [Background] Environmental estrogens, major components in the new types of environmental pollutants, threaten the health of humans and animals by their adverse effect on the functions of the endocrine system. Microbial degradation is considered an efficient method in the removal of estrogens and the bioremediation of polluted environments. [Objective] To improve diethylstilbestrol (DES) biodegradation efficiency, we studied the degradation characteristics of a DES-degrading bacterium

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (42007220); Science and Technology Research Project of Jiangxi Provincial Department of Education (J90182)

*Corresponding author: Tel: 86-791-83813459; E-mail: mds1999@163.com

Received: 22-01-2021; Accepted: 29-03-2021; Published online: 26-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(42007220); 江西省教育厅科技项目(J90182)

*通信作者: Tel: 0791-83813459; E-mail: mds1999@163.com

收稿日期: 2021-01-22; 接受日期: 2021-03-29; 网络首发日期: 2021-05-26

Serratia sp. AXJ-M. [Methods] The degradation conditions of DES by *Serratia* sp. AXJ-M were optimized by performing the single factor test, Plackett-Burman test, steepest ascent hill climb test, and Box-Behnken test. [Results] Application of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnCl_2 , and tryptone as inorganic nitrogen sources, additional metal ions, and added nutrients, respectively, significantly promoted the degradation of DES. The concentration of ammonium sulfate and DES and pH value were selected as the key parameters affecting the degradation of DES by performing the Plackett-Burman experiment. Box-Behnken experiment design and response surface methodology (RSM) analysis were adopted, the optimized conditions were $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.48 g/L, ZnCl_2 0.02 g/L, culture temperature 30 °C, pH 7.19, DES 119.5 mg/L, and inoculation biomass 3%. The degradation rate of DES under these conditions reached 76.89% within 7 d, which was 17.38% higher than initial conditions. [Conclusion] *Serratia* sp. AXJ-M, a highly efficient DES degrading strain, can be used as an excellent microbial resource for bioremediation of the environment polluted by DES or other synthetic estrogens.

Keywords: diethylstilbestrol, Plackett-Burman design, Box-Behnken design, *Serratia* sp. AXJ-M, degradation characteristics

近年来, 世界各国很多水体被曝出受不同程度的雌激素污染^[1-2]。目前, 养殖业畜禽粪便是导致环境中雌激素大量累积的重要因素, 大部分雌激素随畜禽粪便渗入生态圈, 严重污染周围的土壤、地表水和地下水, 威胁人类和动物的安全与健康, 也限制了畜禽粪便的高效利用^[3]。己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)是一种人工合成的非甾体类雌激素, 但极微量 DES 便可导致生物体严重受损。人体医学上 DES 常被作为治疗女性内分泌失调的药物和避孕药物, 在畜牧业中常被用作兽药^[4-5]。研究发现极微量 DES 就能对生物体造成严重伤害^[4], 被列为“三致物”; 据了解, 早在 1971 年美国已颁布禁止使用 DES 的相关法令, 随后于 1978 年欧盟也颁发相关禁止法令^[6]。为优化环境, 我国农业农村部于 2002 年也出台了相应的规定^[7]。国际癌症研究中心于 2012 年将 DES 分为 I 类人类致癌物^[8]。DES 在环境中不易降解, 并在水体、土壤和畜禽粪便等固体废物中富集, 造成环境污染^[9]。因此, 消除己烯雌酚对环境造成的污染已成为众多科研工作者关注的方向。

去除 DES 的方法有多种, 如化学氧化法、物理吸附法和生物降解法, 其中生物降解法相对于前 2 种方法具有温和、低成本、绿色、有效且无二次污染等优点, 因此受到越来越多的关注。通过筛选具有高效降解己烯雌酚功能的微生物, 有利于减少

其对环境的污染, 但截至目前国内外关于降解己烯雌酚的高效菌株及其降解特性的报道较少。仅见 Zhang 等^[10]从受污染的海水中筛选到一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) J51, 培养 6 d 后对 10 mg/L DES 的降解率为 36%; 徐冉芳等^[11]从污泥中筛选到一株沙雷氏菌(*Serratia* sp.) S, 培养 7 d 后对无机盐培养基中 50 mg/L DES 的降解率为 68.3%; 胡凯弟等^[12]从酱油曲中筛选到一株米曲霉(*Aspergillus oryzae*) M-4, 在基础盐培养基中培养 9 d 对 100 mg/L 的 DES 降解率为 93%。然而, 从已筛选出的降解菌中发现这些菌株降解 DES 的效果以及降解范围并不理想。因此, 筛选出具有高效降解能力且能够降解高浓度 DES 的细菌菌株, 研究其降解特性对提高其生物修复效果更具有现实意义。

本实验室筛选并保藏了一株能够降解造纸黑液木质素的高效菌种 *Serratia* sp. AXJ-M, 同时发现该菌对 DES 的降解能力也较强, 但有关 DES 降解特性的实验还需进一步探究。为了将此高效菌株在实际环境中得到更好的释放, 探究其对底物代谢通路的影响及生物修复潜力, 优化降解条件显得至关重要。Plackett-Burman 因素筛选结合 Box-Behnken 响应曲面分析法, 是一种工艺参数和实验条件有效优化的统计学方法, 能够快速准确地推算出被优化对象的最佳条件。

本研究先后通过单因素试验、Plackett-Burman

主因素筛选试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 设计优化了菌株 *Serratia* sp. AXJ-M 对 DES 的降解条件, 以期为其在环境修复应用中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株与主要试剂和仪器

供试菌株沙雷氏菌属(*Serratia* sp.) AXJ-M^[13] 为本实验室分离保藏, 具有环境雌激素 DES 降解能力。

DES 购自上海阿拉丁试剂有限公司(纯度 $\geq 98\%$); 甲醇购自广东光华公司, 色谱纯。数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 液相色谱系统, 岛津公司。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, NaCl 10.00, 自然 pH 值; 无机盐培养基(MS) (g/L): NH_4NO_3 1.50, NaCl 0.50, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.90, KH_2PO_4 0.60, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, 微量元素溶液 1 mL, 自然 pH 值。微量元素溶液(g/L): $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.45, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02。以上培养基均 1×10^5 Pa 灭菌 20 min^[14-15]。

固体培养基: 上述培养基添加 2% (质量体积分数) 琼脂粉, 按照实验要求调节 pH 值。

DES 降解培养基: DES 用甲醇溶解(10 g/L), 然后用 0.22 μm 滤膜对混合液过滤除菌, 取一定量已过滤除菌的溶液置于灭菌后的三角瓶中, 等待甲醇彻底挥发后添加灭菌后的无机盐液体培养基, 使 DES 的最终浓度达到所需浓度。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备

在无菌操作条件下, 取斜面保藏的 AXJ-M 菌种并挑取一环接种到 LB 培养基中, 置于 30 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养至对数生长期(菌体细胞数量为 3.2×10^6 CFU/mL), 取出 5 mL 菌液于 6 000 r/min 条件下离心 2 min, 收集菌体用磷酸缓冲液(0.2 mol/L)

洗涤 3 次, 最后用磷酸缓冲液调节菌体浓度至 OD_{600} 为 1.0 ± 0.1 。

1.2.2 DES 降解率的测定

DES 浓度的测定方法^[16]: 将整瓶培养液与同体积的甲醇混合; 超声波(40 kHz, 300 W)辅助提取 30 min; 取 2 mL 用甲醇定容至 10 mL 并混匀, 12 000 r/min 离心 15 min 后用 0.22 μm 滤膜对上清液进行过滤, 弃掉初滤液, 续滤液则用于高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)的 DES 残留质量浓度检测。

检测条件^[16]: 色谱柱采用 SepaxGP-C18 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5.0 μm), 柱温为 25 $^\circ\text{C}$; 流动相甲醇:水的体积分数为 70:30, 流速保持 0.7 mL/min, 进样量为 10 μL ; 检测器为紫外检测器($\lambda=242$ nm); DES 降解率公式为:

$$\text{DES 降解率}(\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

式中: A_0 为空白对照中 DES 总质量浓度(mg/L); A 为样品培养液中 DES 残留质量浓度(mg/L)。

1.3 单因素试验

以 MS 液体培养基为基础, 通过对培养基成分和培养条件的改变来探究降解菌株对 DES 降解的最适宜培养基成分及最佳培养条件。

培养基成分筛选: 添加 1.50 g/L 无机氮源在 MS 培养基中作为菌株的氮源, 在其他组分保持不变的情况下, 分别添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 KNO_3 、 NaNO_3 、 NH_4Cl ; 保持单一变量, 其他组分不变, 在最适无机氮源基础上分别添加 0.05 g/L 不同的微量元素 MnSO_4 、 ZnCl_2 、 CuSO_4 、 FeCl_3 、 CaCl_2 ; 在上述 2 个因素条件最佳的基础上, 保证单一变量的同时分别加入 3 g/L 的营养物质可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、胰蛋白胨、酵母浸粉。

培养条件优化: 将最适培养基成分中的各个因素按一定的浓度梯度进行优化: 无机氮源浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L; 微量元素浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/L; 营养物质浓度为 1、2、3、4、5 g/L; 培养温度为 25、30、35、40、45 $^\circ\text{C}$; 初始 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、

8.5、9.0; 接种量为 1%、2%、3%、4%、5%; 底物浓度为 30、60、90、120、150、180 mg/L。同时设置空白对照组, 为避免误差每组实验重复 3 次。

1.4 Plackett-Burman 因素筛选试验

基于上述试验, 为筛选出影响菌株降解 DES 的主要参数, 采用 Plackett-Burman (PB) 因素筛选试验。以此为基础, 选取可能对菌株降解能力造成影响的 7 个独立变量的水平值高低进行评估, 降解菌株培养 7 d 后测定 DES 浓度, 每组实验重复 3 次, 并将浓度换算成降解率作为响应值, 选出影响菌株降解 DES 的显著试验因素。Minitab 17.1 软件被用于统计学结果分析。依据 PB 试验得到各因子的显著性排序和回归方程设计最陡爬坡试验, 快速逼近响应最佳值区域^[17]。

1.5 Box-Behnken 响应面试验

根据 1.4 的试验结果, 利用响应面法(Response Surface Methodology, RSM) 中的 Box-Behnken Design (BBD) 模型设计 3 因素 3 水平的响应曲面试验, 以菌株对 DES 的降解率为响应值, 同时设置对照组。为防止实验误差, 每组实验重复 3 次。将试验数据输入到 Minitab 17.1 软件进行统计分析, 进而确定菌株降解 DES 的最佳降解条件。

1.6 数据分析

每组实验数据均由 3 次重复实验得到, 实验获得的数据用平均数±标准差(SD)表示, Origin 8.0、Minitab 17.1、SPSS 22 等统计学软件用于数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

单因素试验结果显示添加不同培养基成分对 *Serratia sp.* AXJ-M 降解 DES 均有着不同程度的影响。硝态氮和铵态氮是自然界中最普遍和最重要的氮源, 它们影响着微生物的细胞生长、代谢能力和对污染物的降解能力。由图 1A 可知, 硝态氮和铵态氮存在时均可促进菌株 AXJ-M 对 DES 的降解, 而不同无机氮源条件下 DES 降解率从高到低依次为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($P<0.05$) $>$ NH_4Cl $>$ NaNO_3 $>$ KNO_3 $>$ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 。其原因可能是因为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为微生物的生长提供了足够的能量, 诱导产生相关的代谢酶并促进降解基因的表达, 从而提高对 DES 的降解能力。然而其他氮源不能有效地促进 DES 降解, 可能因为微生物对某些氮源利用的偏好性以及氮源自身的易降解性^[18]。生物强化系统中存在某些金属离子, 它们有助于促进微生物的生长, 其原因是这些金属离子可作为菌体生长代谢过程中酶的激活剂

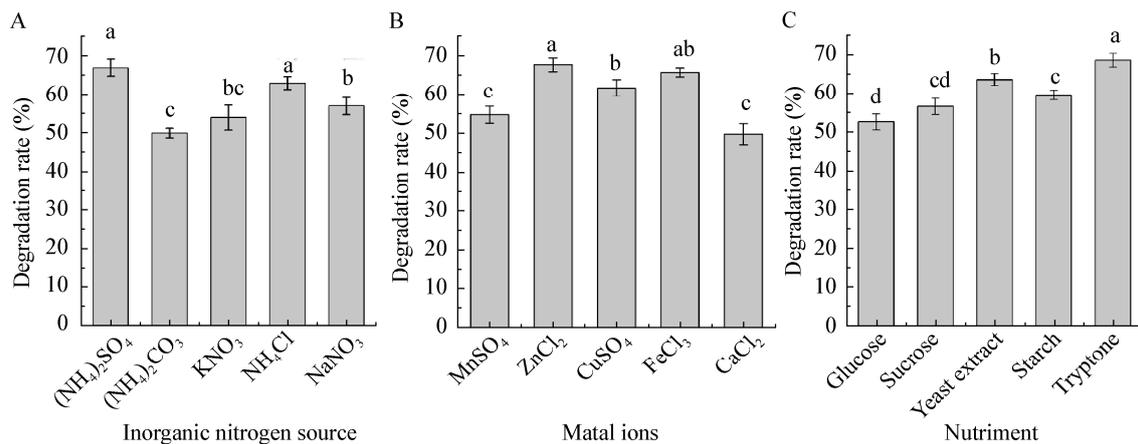


图 1 不同培养基成分对 *Serratia sp.* AXJ-M 降解 DES 的影响

Figure 1 Effects of different medium composition on degradation of DES by *Serratia sp.* AXJ-M

注: A: 无机氮源; B: 金属离子; C: 营养物质。小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: A: Inorganic nitrogen source; B: Metal ions; C: Nutrients. The difference of small letters is significant ($P<0.05$)

或微量元素^[19]。Zn²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Mn²⁺及 Ca²⁺是造纸废水处理系统中最常存在的金属离子^[20-21]，而且从目前的一些文献报道可知，这几种金属离子对微生物的繁殖代谢有很大的影响。因此，本实验初步分析了上述金属离子单一冲击下对菌株 AXJ-M 降解 DES 的影响。由图 1B 可知，不同金属离子条件下 DES 降解率从高到低依次为：ZnCl₂ ($P<0.05$)>FeCl₃>CuSO₄>MnSO₄>CaCl₂。由图 1C 可知，不同营养成分条件下 DES 降解率从高到低依次为：胰蛋白胨($P<0.05$)>酵母浸粉>可溶性淀粉>蔗糖>葡萄糖。综上所述，*Serratia* sp. AXJ-M 降解 DES 的最适培养基为无机氮源选择(NH₄)₂SO₄，额外金属离子选择 ZnCl₂，营养物质选择胰蛋白胨。

由图 2A 可知，当(NH₄)₂SO₄浓度为 1.5 g/L 时，DES 的降解率达到最大，所以选 1.5 g/L 作为 (NH₄)₂SO₄ 最佳添加浓度。分析认为相关元素匮乏的环境中加入相应的金属离子可在一定程度上促

进微生物的生长，进而促进难降解污染物的生物降解。由图 2B 可知，ZnCl₂浓度为 0.02 g/L 时 DES 降解率达到最大。如图 2C 所示，胰蛋白胨浓度为 2 g/L 时 DES 降解率达到最大。温度通过对微生物的生长产生影响，进而影响有机物的降解利用。菌株 AXJ-M 在 25–30 °C 及以 120 mg/L DES 为唯一碳源条件下培养 7 d (图 2D)，菌株 AXJ-M 的 DES 降解率随着温度的升高而增大；当温度超过 30 °C 时 DES 降解率逐渐降低，其原因可能是温度过高会影响微生物细胞膜的通透性及降解酶的催化活性，从而影响底物的降解效率，因此 30 °C 是菌株 AXJ-M 降解 DES 的最佳温度。除温度外，pH 也是影响微生物生长和降解的另一重要因素，其对菌株 AXJ-M 降解 DES 的影响如图 2E 所示。当 pH 值在 5.0–6.0 的范围时，DES 降解均处于较低水平，说明酸性条件不利于该降解菌生长；当 pH 值为 7.0 时，DES 降解率达到最大值；然而 pH 值达到

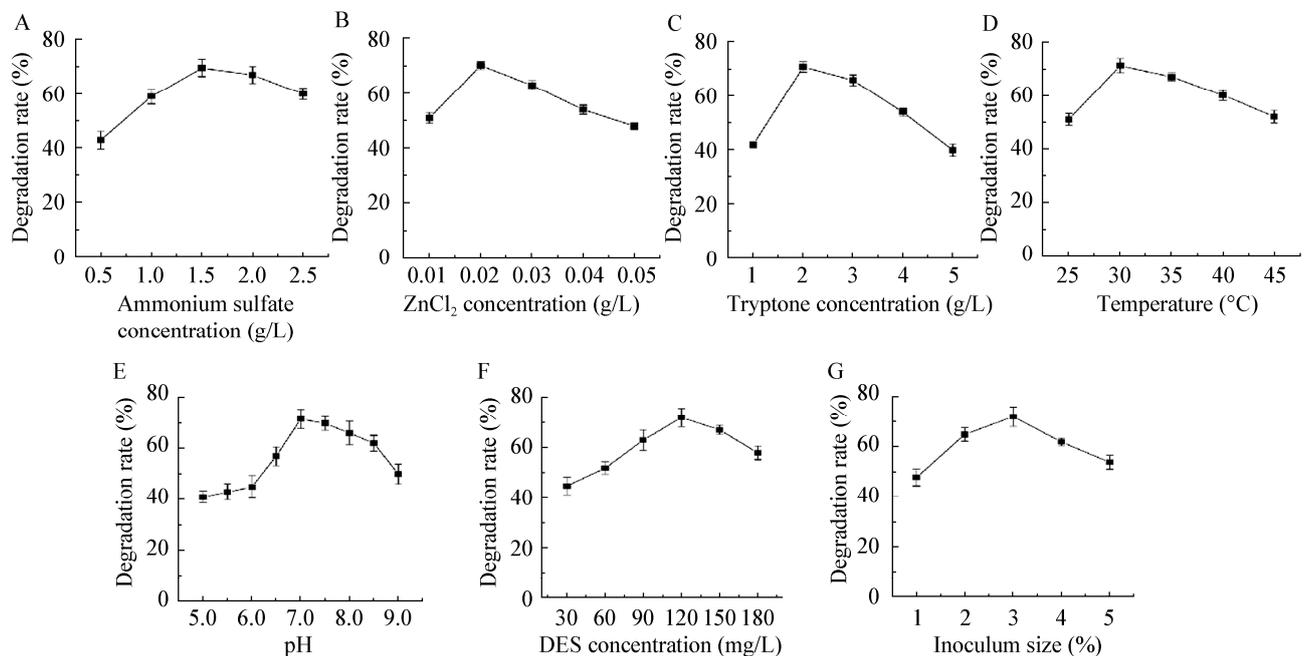


图 2 不同因素对菌株 AXJ-M 降解 DES 的影响

Figure 2 The influence of different factors on the degradation of DES by strain AXJ-M

注：A：(NH₄)₂SO₄ 浓度；B：ZnCl₂ 浓度；C：营养物质浓度；D：温度；E：pH；F：DES 浓度；G：接种量

Note: A: Ammonium sulfate concentration; B: ZnCl₂ concentration; C: Nutrient concentration; D: Temperature; E: pH; F: DES concentration; G: Inoculation size

9.0 时, DES 的生物降解率仍超过 45%, 其原因可能是化学作用和生物作用共同作用的结果, 结果说明菌株 AXJ-M 具有耐碱性, 综合考虑后确定菌株 AXJ-M 降解 DES 最适 pH 值为 7.0。微生物对污染物的降解受底物浓度的影响, 高浓度的污染物会对菌体生长产生抑制作用, 进而也会对降解酶产生底物抑制作用, 最终影响微生物的降解能力^[22]。由图 2F 可知, 底物浓度对菌株 AXJ-M 降解 DES 能力的影响相对较大, 当 DES 浓度范围为 30–120 mg/L 时, DES 降解率随着 DES 质量浓度的增加而逐渐增大; 当 DES 浓度达到 120 mg/L 时, DES 降解率达到最大; 随着 DES 浓度的继续增加, DES 降解率迅速下降, 根据实验结果确定试验中底物浓度为 120 mg/L。由图 2G 可知, 当接种量范围在 1%–3% 时, DES 的降解率随接种量的增大而增大, 接种量为 3% 时降解率达到最大; 当接种量超过 3% 以后, 菌株 AXJ-M 对 DES 的降解率逐渐降低, 降解率降低是因为最初接种量的增大会导致培养物中的菌体密度增大, 致使菌体生长所需的营养物质不足, 菌体之间产生竞争, 从而降低降解效率, 所以确定

菌株 AXJ-M 降解 DES 的最适接种量为 3%。

2.2 Plackett-Burman 试验显著因素筛选结果

利用 Plackett-Burman 试验从单因素的试验中筛选出影响 DES 降解的主要参数, 进而确定主因素筛选试验设计的各个因素和水平, Plackett-Burman 试验设计及响应值见表 1。以 DES 降解率为响应值进行评估, 得到一次拟合方程: $Y=67.5-12.24A-94.3B-0.619C-0.274D+3.364E-0.096F+2.356G$, 各因素显著性排序如图 3 所示。由表 2 可知, 主效应 P 值为 0.017, 表明通过 Plackett-Burman 主因素筛选试验所选取的指标水平范围对 DES 降解的影响显著, 同时决定系数 R^2 为 0.951 7, 表明试验设计可靠, 回归有效。同时, 由 P 值可以看出, $(NH_4)_2SO_4$ 浓度、pH 值和 DES 浓度是影响 *Serratia sp.* AXJ-M 降解 DES 的显著因素 ($P<0.05$), $(NH_4)_2SO_4$ 浓度和 DES 浓度表现为负相关性, 而 pH 值表现出正相关性。因此, 固定 $ZnCl_2$ 0.02 g/L、胰蛋白胨 2 g/L、培养温度 30 °C、接种量 3% (体积分数), 设计显著因素的爬坡方向和步长, 完成最陡爬坡实验。

表 1 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 1 Plackett-Burman test design and results

Run	A: (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	B: ZnCl ₂ (g/L)	C: Tryptone (g/L)	D: Temperature (°C)	E: pH	F: DES (mg/L)	G: Inoculum size (%)	Y: Degradation rate (%)
1	2	0.02	3	25	6.0	90	4	52.09
2	1	0.02	3	35	8.0	90	4	68.11
3	1	0.04	3	25	8.0	90	2	65.23
4	1	0.04	3	35	6.0	150	4	57.05
5	1	0.02	1	25	6.0	90	2	65.34
6	2	0.02	1	25	8.0	150	4	55.45
7	2	0.04	1	35	6.0	90	2	42.41
8	1	0.02	1	35	8.0	150	2	59.08
9	1	0.04	1	25	6.0	150	4	57.34
10	2	0.04	3	25	8.0	150	2	48.22
11	2	0.02	3	35	6.0	150	2	41.03
12	2	0.04	1	35	8.0	150	4	59.54

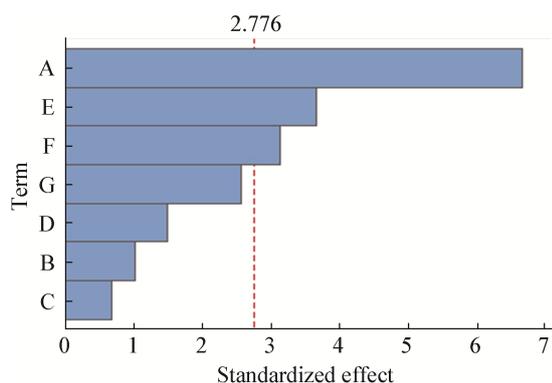


图3 Plackett-Burman 试验因素显著性排序

Figure 3 Significance ranking of factors tested in Plackett-Burman design

注: 红色线是参考线, 如果柱子超过参考红线, 则说明效应显著 ($P < 0.05$)

Note: The red line is the reference line, if the column exceeds the reference line, the effect is significant ($P < 0.05$)

2.3 最陡爬坡实验结果

根据表 2 中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度、pH 值和 DES 浓度 3 个因素估计系数的正负效应和大小: pH 值是正效应因素, 应依次增大; DES 浓度和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度是负效应因素, 应依次减小。表 3 爬坡实验结果显示, 随着 pH 值的增大, DES 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度逐渐减小, DES 降解率有先增大后减小的趋势, 实验 3 中 DES 降解率达到最高,

表 2 试验设计方差分析结果

Table 2 ANOVA of Plackett-Burman design experiments

Term	Effect	Coef	SE coef	T-value	P-value	VIF
Constant		55.908	0.913	61.23	0.017	1.00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	-12.235	-6.118	0.913	-6.70	0.003	1.00
ZnCl ₂ (g/L)	-1.885	-0.943	0.913	-1.03	0.360	1.00
Tryptone (g/L)	-1.238	-0.619	0.913	-0.68	0.535	1.00
Temperature (°C)	-2.742	-1.371	0.913	-1.50	0.208	1.00
pH	6.728	3.364	0.913	3.68	0.021	1.00
DES (mg/L)	-5.758	-2.879	0.913	-3.15	0.034	1.00
Inoculum size (%)	4.712	2.356	0.913	2.58	0.061	1.00
R^2	0.951					

由此以实验 3 中各因素水平为中心值设计后续的响应面实验。

2.4 响应面优化结果

以实验结果拟合建立描述响应值(Y)与自变量关系的多项式回归模型, 借助 Minitab 17.1 中的回归拟合, 得到响应值(DES 降解率)与自变量 [X_1 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度; X_2 : pH; X_3 : DES 浓度] 的回归方程为:

$$Y = 97347 + 235894X_1 + 17580X_2 - 5641X_3 - 113767X_1^2 - 1113.4X_2^2 + 23.32X_3^2 + 5977X_1X_2 + 487X_1X_3 - 87.1X_2X_3$$

表 4 是 Box-Behnken 试验设计与结果。表 5 为利用 Minitab 软件得出的响应面分析试验回归分析结果。 P 值表示显著性概率, $P > 0.05$ 时, 表示该因素对 DES 的降解无显著影响; $P < 0.05$ 时, 说明该因素对 DES 的降解具有显著影响; 当 $P < 0.01$ 时, 则该因素对 DES 的降解产生极显著的影响^[23-24]; F 值是一个统计量且服从 F 分布, F 值大则说明模型显著。由表 5 可知, 在响应面分析试验中独立变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的 P 值依次为 0.030、0.007、0.020, 由此可得出各考察变量对 DES 降解的影响作用依次为: $X_2 > X_3 > X_1$, 即 $\text{pH} > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度 $>$ DES 浓度; 在交互作用中 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_1X_3 的 P 值分别是 0.001、0.005、0.045, 即这些交互作用组合对 DES 的降解均产生显著影响, 其中 X_1X_2 的 P 值小于 0.01, 说明此交互组合对 DES 的降解产生极显著影响, X_2X_3

表 3 最陡爬坡路径试验结果

Table 3 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

Run	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	pH	DES (mg/L)	Degradation rate (%)
1	1.50	7.0	120.0	68.87
2	1.49	7.1	119.5	71.34
3	1.48	7.2	119.0	73.19
4	1.47	7.3	118.5	70.07
5	1.46	7.4	118.0	68.68
6	1.45	7.5	117.5	65.45

表 4 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 4 Results of Box-Behnken experiment design

Run	X_1 : (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	X_2 : pH	X_3 : DES concentration (mg/L)	DES degradation rate (%)
1	1.48	7.2	119.0	70.11
2	1.49	7.2	119.0	59.25
3	1.47	7.2	118.5	62.08
4	1.48	7.2	119.0	69.34
5	1.49	7.3	118.5	60.05
6	1.47	7.1	119.0	42.32
7	1.48	7.3	119.5	68.36
8	1.48	7.1	119.5	63.02
9	1.48	7.1	118.5	56.13
10	1.47	7.2	119.0	46.15
11	1.48	7.2	119.0	68.25
12	1.47	7.2	119.5	62.45
13	1.49	7.2	119.5	70.17
14	1.48	7.3	118.5	68.21
15	1.49	7.1	119.0	39.17

表 5 响应面设计回归模型方差分析

Table 5 Variance analysis for the fitted regression equation

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	P-value	Significance
Model	9	1 453.00	161.445	48.03	<0.000 1	**
Linear	3	135.06	45.019	13.39	0.008	**
X_1	1	30.58	30.576	9.10	0.030	*
X_2	1	66.07	66.068	19.65	0.007	**
X_3	1	38.41	38.413	11.43	0.020	*
Square	3	1 075.39	358.465	106.63	0.000	**
X_1^2	1	477.89	477.890	142.16	0.000	**
X_2^2	1	457.73	457.734	136.16	0.000	**
X_3^2	1	125.53	125.533	37.34	0.002	**
Interaction	3	242.55	80.851	24.05	0.002	**
$X_1 \times X_2$	1	142.92	142.922	42.52	0.001	**
$X_1 \times X_3$	1	23.77	23.766	7.07	0.045	*
$X_2 \times X_3$	1	75.86	75.864	22.57	0.005	**
Error	5	16.81	3.362			
Lack of fit	3	15.06	5.020	5.75	0.152	
Pure error	2	1.75	0.873			
Total	14	1 469.81				

注: *: $P < 0.05$, 差异显著; **: $P < 0.01$, 差异极显著Note: *: Significant value ($P < 0.05$); **: Extremely significant value ($P < 0.01$)

和 X_1X_3 的 P 值均小于 0.05, 说明这些交互组合对 DES 的降解产生显著影响。

通过编码单位对方程进行拟合, 系数 R^2 用来表达多项式模型方程拟合的性质, 响应面模型的相关系数 $R^2=0.9886$, 决定系数经校正后为 $R^2_{Adj}=0.9680$, 表明模型方程的可信度较高, 预测值与试验值拟合度良好, 由此可对降解 DES 的试验进行合理的预测; 方差分析结果显示该模型显著 ($P<0.0001$), 同时失拟值(Lack of Fit)不显著 ($P=0.152$)。回归方程为菌株 AXJ-M 降解 DES 的过程提供了一个合适的模型, 同时为了检验模型预测相对于实际取值是否准确, 后续需进行试验验证。

运用 Minitab 17.1 对回归模型进行规范性分析, 寻求最大 DES 降解对应的因素水平, 结合图 4 给出的回归方程的等高线图可知, 对应的 X_1 、 X_2 和 X_3 实际取值为 1.48、7.19 和 119.5, DES 降解率的最大估计值为 77.68%。即当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 1.48 g/L、pH 值为 7.19、DES 浓度为 119.5 mg/L 时, 该模型预测的最高 DES 降解率为 77.68%。此外, 可见 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度和 pH 的交互作用对 DES 降解的影响最显著。

2.5 响应面模型验证和优化

通过对模型预测值的进一步验证, 确定优化后的实验条件为: 无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 1.48 g/L, 微量元素 ZnCl_2 浓度为 0.02 g/L, 温度 30 °C, pH 值为 7.19, DES 浓度为 119.5 mg/L, 接种量 3% (体积分数)。在此优化条件下 *Serratia* sp. AXJ-M 对 DES 的降解率达到 76.89%, 预测值 (77.68%) 与优化后的降解率大致相同, 因此说明该响应面模型可行。同时, 优化后的降解率提高 17.38%, 进而表明设计降解条件优化的方案合理有效。

3 讨论

雌激素对环境造成极其严重的污染, 而 DES 作为人工合成的非甾体雌激素物质, 多数情况下被用于畜牧业、临床医学等方面。研究发现, DES 会

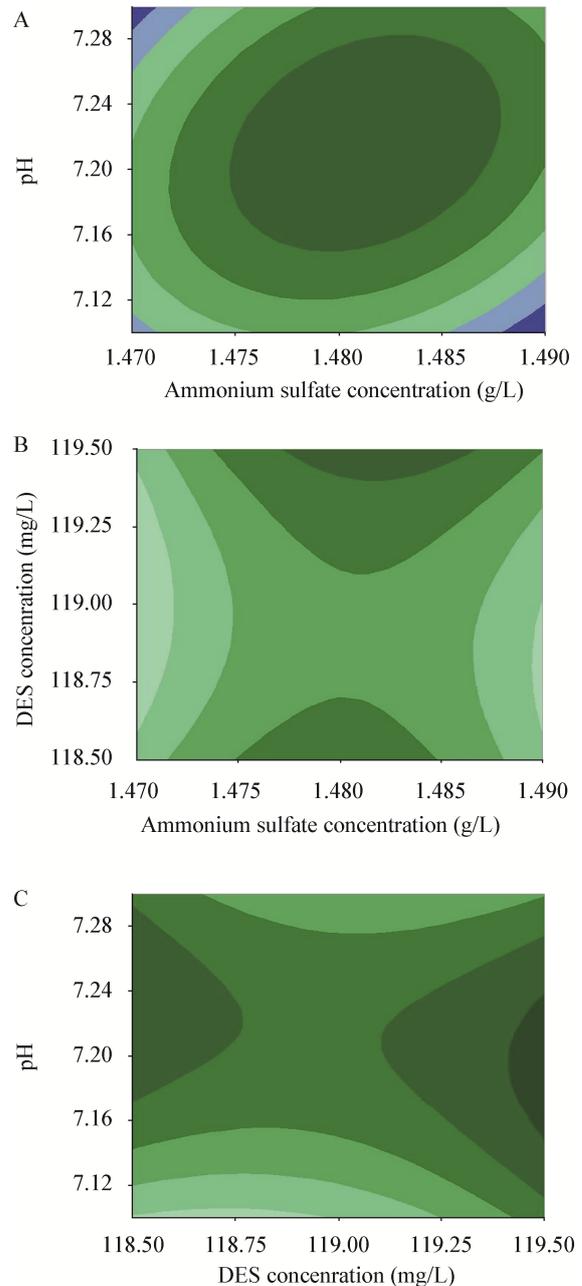


图 4 培养条件交互作用对 *Serratia* sp. AXJ-M 降解 DES 的等高线图

Figure 4 Response surface for the interaction effects of culture conditions on the DES degradation rate of *Serratia* sp. AXJ-M

注: A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度和 pH 值; B: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度和 DES 浓度; C: DES 浓度和 pH 值

Note: A: Ammonium sulfate concentration and DES concentration; B: Ammonium sulfate concentration and DES concentration; C: DES concentration and pH value

对动物和人体造成致畸、致癌、致突变的危害。微生物在环境雌激素降解过程中发挥重要作用,利用微生物降解对环境中残留的雌激素进行生物修复被认为是一种可持续发展、环境友好的理想方法。本课题组通过初步试验证明菌株 *Serratia* sp. AXJ-M 对 DES 具有较高的降解能力。有报道表明,沙雷氏菌属(*Serratia*)可以降解二嗪农、氯氰菊酯、多环芳烃类化合物和六氯丁二烯等多种污染物,而且降解效果良好^[25-29]。由此可见,沙雷氏菌属在微生物修复环境污染方面有巨大的应用价值。然而有关 *Serratia* sp. 在生物修复受 DES 污染环境方面的研究甚少,仅见徐冉芳等^[11]从污泥中筛选到一株沙雷氏菌(*Serratia* sp.) S, 当 DES 浓度为 60 mg/L 时,将此菌株培养 7 d 后其 DES 降解率达 63.0% 左右;当底物浓度超过 60 mg/L 时降解率呈下降趋势,因此 60 mg/L 为菌株降解 DES 的最适底物浓度。本研究中 *Serratia* sp. AXJ-M 在培养 7 d 时对 60 mg/L DES 的降解率可达 50%。虽然相同 DES 浓度下菌株 *Serratia* sp. S 比本研究中的菌株 AXJ-M 对 DES 降解效率高,但菌株 S 底物范围较窄,底物降解浓度最高为 100 mg/L (降解率为 40%),而菌株 AXJ-M 对 DES 降解范围可达到 180 mg/L,对高达 120 mg/L 的 DES 降解率可达到 71.9%。因此, *Serratia* sp. AXJ-M 具有修复雌激素造成的环境污染的潜在应用价值。

微生物可根据环境的不同而表现出不同的生长特性,因此,对菌株降解能力的测定需在不同条件(如温度、pH 等)下进行,这将为该菌株用于修复雌激素造成的环境污染提供参考依据。本研究前期分离获得的 *Serratia* sp. AXJ-M 在温度 25–30 °C、pH 值为 7.0–7.5 时对 DES 降解效果均较好。即使在较高的温度范围(40 °C 以上)内,DES 降解率仍在 50% 左右。前人报道过的菌株 *Serratia* sp. S 在 40 °C 时对 DES 的降解率仅为 22% 左右^[11]。因此,菌株 AXJ-M 具有较广泛的温度适应范围,而且具有一定的耐高温特性。微生物的生理活动在很大程度上会受到环境 pH 的影响,当 pH 值过高时,微生物的

生长及其降解酶的分泌会受到影响,从而导致微生物的酶活性及微生物对营养物质的吸收和利用程度降低;反之,当 pH 值过低时,微生物原生质膜电荷会发生明显变化。因此, pH 值过低或过高都可能导致微生物细胞对 DES 的生物降解速率下降^[30]。本研究结果显示,在 pH 值为 7.0–7.5 时菌株 AXJ-M 对 DES 有较高的去除率,特别在 pH 值为 7.0 时降解效果最佳。徐冉芳等^[11]的研究也同样表明, pH 为中性条件最有利于 DES 降解,这与本研究结果一致。

研究表明,为有效提高菌株的降解能力,可通过筛选优化菌株培养基组分及培养条件来实现。本研究以 MS 培养基为基础优化了 *Serratia* sp. AXJ-M 降解 DES 的条件,基于 Plackett-Burman 试验结果确定出影响 *Serratia* sp. AXJ-M 降解 DES 的重要因素,包括 DES 浓度、外加营养物质和 pH 值。当 DES 浓度过高时,通过抑制降解菌株的生长和降解酶的表达,从而使菌株的降解能力受限,如 *Bacillus thuringiensis* ZS-19^[31]、*Bacillus subtilis* BSF01^[32]和 *Catellibacterium* sp. CC-5^[33]等菌株也同样存在高浓度的底物抑制作用现象;在实际雌激素污染生物修复中,环境成分的复杂性会对微生物降解有害难降解污染物的去除率造成一定影响;除此之外,添加的碳源和氮源也会在某种程度上影响微生物的降解能力。由此可见,在添加外源物质情况下,研究微生物对有毒有害污染物的生物降解行为,有助于促进环境修复和治理效果。若有某种物质的存在抑制目标物质的降解,则需对工艺条件进行优化,使 2 种物质不会同时存在此修复系统中。相反,如果存在一些物质有助于促进污染物的降解,同时该种物质也是容易被利用的营养物质,则可补充这种物质到修复系统中,以提高目标物的可生物降解性。本研究考察了外加碳源、氮源对菌株 AXJ-M 降解 DES 效果的影响,结果表明营养物质的添加显著提高了 *Serratia* sp. AXJ-M 对 DES 的降解,由此说明外源物质作为第二碳源或氮源,可能对菌株降解 DES 产生了共代谢作用。共代谢是一种特殊的代谢

方式,此种方式在污染降解领域应用较多,共代谢作用对微生物降解较难利用物质的能力有促进作用。本研究结果与菌株 *Acinetobacter junii* LH-1-1 在添加其他碳源或营养物质后对拟除虫菊酯类农药的去除率显著提高^[34]和菌株 *Arthrobacter* sp. W1 在添加氮源后对吡啶、二苯并呋喃、二苯并噻吩三者的降解率得到提高^[35]的现象一致。因此,在将来的试验研究中,尚需对菌株 AXJ-M 是否存在共代谢机制进行进一步研究。目前许多科研工作者^[36-38]通过利用中心设计和响应面法在培养基及工艺条件的优化中取得了很好的效果。因此,通过借鉴前人的经验,本研究结合 Plackett-Burman 设计与响应面分析法,快速、有效地从影响 DES 降解率的因素中筛选出了关键因素,并实现了工艺条件的优化,得到的预测结果与试验结果吻合较好。

目前分离和筛选的可以降解 DES 的菌株仅有 3 株,包括 2 株细菌和 1 株真菌,一株是 Zhang 等^[10]分离的细菌 *Pseudomonas* sp. J51,另一株是由徐冉芳等^[11]从污泥中筛选到的细菌 *Serratia* sp. S,这 2 个菌株属于不同的属,但都属于革兰氏阴性菌。胡凯弟等^[12]从酱油曲中筛选到一株米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) M-4。截至目前,仅 Zhang 等^[10]初步研究了参与 DES 降解的基因及 DES 代谢产物,结果表明醌蛋白醇脱氢酶和异柠檬酸裂解酶参与了 DES 的降解,由于代谢物的分离检测条件受到限制,*Pseudomonas* sp. J51 对 DES 的降解代谢产物仅检测到了 DES-4-半醌。微生物降解 DES 及其生物修复工作目前仍处于初级研究阶段,存在高效降解菌株的匮乏、代谢机制模糊以及实际应用工作开展受限等诸多问题。本研究筛选的菌株 AXJ-M 对 DES 具有良好的降解效果,研究结果具有潜在的实际应用价值,但该菌对 DES 如何实现高效降解,包括降解酶的产生、降解酶的诱导、基因表达调控、酶的生化特性以及降解酶的合成、转运和分泌、降解产物有无毒性等诸多方面有待进一步深入研究和探讨。基于目前对于 DES 降解机理的深入研究尚未见

报道,所以后续的工作将在菌株 AXJ-M 降解 DES 优化的基础上,利用环境微生物组学测序技术及分子生物学手段联合探明其高效降解的分子调控机理,并将关键降解基因在微生物中克隆和表达,为合理利用微生物的代谢多样性解决实际环境污染进行生物强化提供新技术和新资源。

4 结论

(1) *Serratia* sp. AXJ-M 降解 DES 的最适培养基成分为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 ZnCl_2 、胰蛋白胨。

(2) 由单因素实验确定: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 最佳添加浓度为 1.5 g/L, ZnCl_2 最佳添加浓度为 0.02 g/L, 胰蛋白胨最佳添加浓度为 2 g/L, 最适底物浓度为 120 mg/L, 最适温度为 30 °C, 最适 pH 值为 7.0, 最适接种量为 3%。

(3) 利用 Plackett-Burman 试验确定菌株降解 DES 的 3 个主要因素为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度、DES 浓度和 pH 值,由中心组合试验设计、响应面分析及 Box-Behnken 试验设计三者综合分析确定菌株降解 DES 的最佳条件为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 1.48 g/L, ZnCl_2 浓度为 0.02 g/L, 温度 30 °C, pH 7.19, DES 浓度 119.5 mg/L, 接种量 3% (体积分数)。该条件下培养 7 d, 菌株 AXJ-M 对 DES 的降解率可达到 76.89%。

REFERENCES

- [1] Han B, Zhang M, Zhao DY. *In-situ* degradation of soil-sorbed 17 β -estradiol using carboxymethyl cellulose stabilized manganese oxide nanoparticles: column studies[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 223: 238-246
- [2] Zhang H, Shi JH, Liu XW, Zhan XM, Chen QC. Occurrence and removal of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in manure treatment facilities in East China[J]. *Water Research*, 2014, 58: 248-257
- [3] Isidori M, Bellotta M, Cangiano M, Parrella A. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment[J]. *Environment International*, 2009, 35(5): 826-829
- [4] Mitra MS, Philip BK. Diethylstilbestrol[A]//*Encyclopedia of Toxicology*[M]. Amsterdam: Elsevier, 2014: 143-145
- [5] Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC, Longo LD. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women

- 1971[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1999, 181(6): 1574-1575
- [6] Newbold RR, Hanson RB, Jefferson WN, Bullock BC, Haseman J, McLachlan JA. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(7): 1355-1363
- [7] Huang F, Ye SH, Gong ZM. The development of diethylstilbestrol[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2007, 34(2): 51-54 (in Chinese)
黄芬, 叶绍辉, 龚振明. 己烯雌酚的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2): 51-54
- [8] Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects[J]. Annals of Internal Medicine, 1995, 122(10): 778-788
- [9] Doherty LF, Bromer JG, Zhou YP, Aldad TS, Taylor HS. In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: An epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer[J]. Hormones and Cancer, 2010, 1(3): 146-155
- [10] Zhang WW, Niu ZL, Liao CY, Chen LX. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain capable of degrading diethylstilbestrol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 4095-4104
- [11] Xu RF, Sun MX, Liu J, Wang H, Li X, Zhu XZ, Ling WT. Isolation, identification and characterization of a diethylstilbestrol-degrading bacterial strain *Serratia* sp.[J]. Environmental Science, 2014, 35(8): 3169-3174 (in Chinese)
徐冉芳, 孙敏霞, 刘娟, 汪泓, 李欣, 朱雪竹, 凌婉婷. 己烯雌酚降解菌株沙雷氏菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境科学, 2014, 35(8): 3169-3174
- [12] Hu KD, Deng WQ, Chen SP, Chai XD, Liu AP, Zhuo WJ, Liu SL. Degradation characteristics of diethylstilbestrol by *Aspergillus oryzae* M-4[J]. Food Science, 2016, 37(17): 169-172 (in Chinese)
胡凯弟, 邓维琴, 陈树平, 柴先杜, 刘爱平, 卓文杰, 刘书亮. 米曲霉 *Aspergillus oryzae* M-4 降解己烯雌酚的特性研究[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 169-172
- [13] An XJ, Zhong B, Chen GT, An WJ, Xia X, Li HG, Lai FJ, Zhang QH. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality for papermaking black liquor by a new isolated thermophilic and alkali-tolerant *Serratia* sp. AXJ-M[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 406: 124285
- [14] Li F, Liang N, Sun JZ. Degradation characteristics of a novel aniline blue-discoloring bacterial strain MP-13[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 43-53 (in Chinese)
李锋, 梁念, 孙建中. 一株新型苯胺蓝降解菌 MP-13 的代谢特征[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 43-53
- [15] Yan JL, Chen HX, Yang Y, Zhang K, Wang L, Xiong L, Geng H, Liu DL. Isolation and characterization of a highly efficient DEHP-degrading bacterium[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1532-1540 (in Chinese)
严佳丽, 陈湖星, 杨杨, 张凯, 王丽, 熊丽, 耿辉, 刘德立. 一株高效 DEHP 降解菌的分离、鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1532-1540
- [16] Deng WQ, Li A, Peng X, Liu SS, Hu KD, Zhang MM, He L, Chen SJ, Han XF, Liu SL. Determination of diethylstilbestrol in microbial degradation systems by HPLC-UV[J]. Food & Machinery, 2016, 32(1): 51-55 (in Chinese)
邓维琴, 李阿霜, 彭贤, 刘霜霜, 胡凯弟, 张梦梅, 何利, 陈姝娟, 韩新锋, 刘书亮. 高效液相色谱-紫外检测法测定微生物降解体系中己烯雌酚含量[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 51-55
- [17] Sreedharan A, Ong ST. Combination of Plackett Burman and response surface methodology experimental design to optimize Malachite Green dye removal from aqueous environment[J]. Chemical Data Collections, 2020, 25: 100317
- [18] Chang JS, Lin YC. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain[J]. Biotechnology Progress, 2000, 16(6): 979-985
- [19] Sun ZY. Screening and degradation characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Cupriavidus* sp. S1[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Technology, 2017 (in Chinese)
孙智毅. 一株异养硝化-好氧反硝化 *Cupriavidus* sp. S1 的筛选及降解特性研究[D]. 太原: 太原理工大学硕士学位论文, 2017
- [20] Tian QW, Ran M, Fang GG, Ding LB, Pan AX, Shen KZ, Deng YJ. ZnAl₂O₄/BiPO₄ composites as a heterogeneous catalyst for photo-Fenton treatment of textile and pulping wastewater[J]. Separation and Purification Technology, 2020, 239: 116574
- [21] Celik A, Demirbaş A. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions via adsorption onto modified lignin from pulping wastes[J]. Energy Sources, 2005, 27(12): 1167-1177
- [22] Hou Y, Wang WY, Pei T, Niu MF, You XY, Lin JK, Zhang XG. Isolation, identification and characterization of clodinafop-propargyl degrading *Sphingopyxis* sp. WP68[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2529-2537 (in Chinese)
侯颖, 王维宇, 裴韬, 牛明福, 尤晓颜, 林靖坤, 张雪龚. 炔草酯降解菌 *Sphingopyxis* sp. WP68 的分离鉴定与降解特性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2529-2537
- [23] An XJ, Cheng Y, Huang MY, Sun YL, Wang HL, Chen X, Wang JM, Li DP, Li CY. Treating organic cyanide-containing groundwater by immobilization of a

- nitrile-degrading bacterium with a biofilm-forming bacterium using fluidized bed reactors[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 908-916
- [24] Song JL, Gu JG, Zhai Y, Wu W, Wang HS, Ruan ZY, Shi YH, Yan YC. Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 140: 243-248
- [25] Cycoń M, Wójcik M, Piotrowska-Seget Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(4): 494-501
- [26] Zhu XZ, Wang WQ, Crowley DE, Sun K, Hao SP, Waigi MG, Gao YZ. The endophytic bacterium *Serratia* sp. PW7 degrades pyrene in wheat[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(7): 6648-6656
- [27] Zhang C, Jia L, Wang SH, Qu J, Li K, Xu LL, Shi YH, Yan YC. Biodegradation of beta-cypermethrin by two *Serratia* spp. with different cell surface hydrophobicity[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3423-3429
- [28] Pandey AK, Chaudhary P, Singh SB, Arora A, Kumar K, Chaudhry S, Nain L. Deciphering the traits associated with PAH degradation by a novel *Serratia marcescens* L-11 strain[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2012, 47(5): 755-765
- [29] Li MT, Hao LL, Sheng LX, Xu JB. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 6878-6884
- [30] Hu Q, Tang J, Lei D, Wu M, Sun Q, Zhang Q. Isolation and identification of a deltamethrin-degrading bacteria and optimization of its degradation conditions[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 699-709 (in Chinese)
胡琼, 唐洁, 雷丹, 吴敏, 孙擎, 张庆. 一株溴氰菊酯降解菌的分离鉴定及其降解条件优化[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 699-709
- [31] Chen SH, Deng YY, Chang CQ, Lee J, Cheng YY, Cui ZN, Zhou JN, He F, Hu MY, Zhang LH. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8784
- [32] Xiao Y, Chen SH, Gao YQ, Hu W, Hu MY, Zhong GH. Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(6): 2849-2859
- [33] Zhao HY, Geng YC, Chen L, Tao K, Hou TP. Biodegradation of cypermethrin by a novel *Catellibacterium* sp. strain CC-5 isolated from contaminated soil[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 59(5): 311-317
- [34] Chen SH, Lai KP, Li YN, Hu MY, Zhang YB, Zeng Y. Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(4): 1471-1483
- [35] Shi SN. Cometabolic degradation of heterocyclic compounds by *Arthrobacter* sp. W1 and its application in coking wastewater treatment process[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2014 (in Chinese)
时胜男. *Arthrobacter* sp. W1 共代谢杂环芳烃及其强化处理焦化废水的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2014
- [36] Ekpenyong M, Antai S, Asitok A, Ekpo B. Response surface modeling and optimization of major medium variables for glycolipopeptide production[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 10: 113-121
- [37] Ekpenyong MG, Antai SP, Asitok AD, Ekpo BO. Plackett-burman design and response surface optimization of medium trace nutrients for glycolipopeptide biosurfactant production[J]. *Iranian Biomedical Journal*, 2017, 21(4): 249-260
- [38] Singh RS, Kaur N. Understanding response surface optimization of medium composition for pullulan production from de-oiled rice bran by *Aureobasidium pullulans*[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(5): 1507-1520