

苯胺降解菌的筛选、降解特性及其发酵优化

郭南南^{*}, 杨传伦, 张心青, 蔡倩倩, 周倩, 张萧萧, 傅英甸, 田杰伟, 马春峰

黄河三角洲京博化工研究院有限公司, 山东 滨州 256500

郭南南, 杨传伦, 张心青, 蔡倩倩, 周倩, 张萧萧, 傅英甸, 田杰伟, 马春峰. 苯胺降解菌的筛选、降解特性及其发酵优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 983-996.

GUO Nannan, YANG Chuanlun, ZHANG Xinqing, CAI Qianqian, ZHOU Qian, ZHANG Xiaoxiao, FU Yingxun, TIAN Jiwei, MA Chunfeng. Screening, degradation characteristics, and fermentation optimization of aniline-degrading strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 983-996.

摘要: 【背景】近年来, 苯胺类化合物加重了生态环境的污染, 而生物法处理苯胺类废水具有较大发展潜力与广阔的应用前景。【目的】从长期受苯胺类化合物污染的活性污泥中分离获得一株能高效降解苯胺的菌株, 优化其培养基及降解条件, 为苯胺生物修复提供菌株与基因资源。【方法】采用平板法从富集驯化的菌株中筛选出以苯胺为唯一碳氮源和能源的高效降解菌, 通过 16S rRNA 基因测序鉴定菌种, 利用单因素筛选实验对降解条件进行优化, 通过正交试验优化培养条件。

【结果】筛选到一株苯胺降解菌 BA-6, 经鉴定为微杆菌属(*Microbacterium*)。菌株 BA-6 对初始浓度为 600 mg/L 苯胺的日降解率可达 98%以上。其高效降解的温度范围是 30–37 °C, pH 范围是 6.5–7.5。底物利用实验表明, 菌株 BA-6 具有降解多种苯胺类化合物的能力。发酵培养基优化实验获得一种发酵培养基, 活菌量高达 3.06×10^{10} CFU/mL。【结论】苯胺降解菌 BA-6 对苯胺有较强的降解能力和环境调节能力, 在修复苯胺类化合物的生态污染方面有一定的应用前景。

关键词: 苯胺; 微生物降解; 降解特性; 发酵优化

资助项目: 山东省重点研发计划(2018YYSP018); 山东省博士后创新人才支持计划(SDBX2020021)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2018YYSP018) and the Post Doctoral Innovation Talent Support Project of Shandong Province (SDBX2020021).

*Corresponding author. E-mail: nangua121@126.com

Received: 2022-07-08; Accepted: 2022-10-17; Published online: 2022-12-10

Screening, degradation characteristics, and fermentation optimization of aniline-degrading strain

GUO Nannan^{*}, YANG Chuanlun, ZHANG Xinqing, CAI Qianqian, ZHOU Qian, ZHANG Xiaoxiao, FU Yingxun, TIAN Jiewei, MA Chunfeng

Chambroad Chemical Industry Research Institute Limited Company, Binzhou 256500, Shandong, China

Abstract: [Background] In recent years, aniline compounds have aggravated the pollution of ecological environment, and biological treatment of aniline wastewater has great development potential and broad application prospect. [Objective] To isolate a strain that can degrade aniline efficiently from activated sludge contaminated by aniline compounds for a long term, and optimize its medium and degradation conditions to provide strain and gene resources for aniline bioremediation. [Methods] The high-efficient degrading bacteria with aniline as its sole carbon and nitrogen source and energy were screened out from the enriched and acclimated strains by plate method. The strain was identified by 16S rRNA gene sequence analysis. The degradation conditions were optimized by the single factor screening test, and the culture conditions were optimized by the orthogonal experiment. [Results] An aniline-degrading strain BA-6 was screened out and identified as *Microbacterium* sp. The strain removed more than 98% aniline with the initial concentration of 600 mg/L within 24 h. The efficient degradation temperature and pH for the strain BA-6 were 30–37 °C and 6.5–7.5, respectively. The substrate utilization test showed that the strain BA-6 had the ability to degrade many aniline compounds. The optimal fermentation medium was obtained, and the viability of the strain was up to 3.06×10^{10} CFU/mL. [Conclusion] Based on the strong abilities to degrade aniline and adjust to the environment, BA-6 strain has certain application potential in the remediation of ecological pollution of aniline compounds.

Keywords: aniline; microbial degradation; degradation characteristics; optimization of fermentation conditions

苯胺是农业、制造业、医药用品业、印染业等行业的一种重要的原料与中间体^[1-2]。由于苯胺自身的极性，使苯环上的电子密度减弱，从而使苯环的氧化更难。加之其化学性能稳定、生物降解较差、需求量增加等，导致环境中的苯胺持续累积^[3]。同时，相关文献报道苯胺能与偶氮苯、硝基苯等物质发生化学反应转化为更为稳定的二次污染物^[4-7]，更加重了环境污染现象。苯胺具有生物蓄积性、生物毒性大、致癌、致突变等特点，给人类的身体健康带来很

大的威胁^[8]。因此，在环境中必须严格控制苯胺的排放。

对苯胺类化合物的处理方法中，相较于物理与化学方法，微生物降解具有成本低、操作简便、处理效果较好及无二次污染的特点^[9]，所以该方法具有很大的发展潜力^[10-14]。目前，研究人员已从环境中分离出能降解苯胺或苯胺衍生物的菌，主要包括芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[15]、节杆菌(*Arthrobar* sp.)^[16]、食酸丛毛单胞菌(*Gomamonas acidovorans*)^[17]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[18]、

红球菌属 (*Rhodococcus*)^[19]、戴尔福特菌属 (*Delftia*)^[20]、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[21]和希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)^[22]等,但其中所涵盖的高效降解菌株并不多,并且只能降解部分苯胺衍生物,底物谱宽的更为稀少。如:*Gomamonas acidovorans* AN3^[17]只能利用苯胺和乙酰苯胺,不能利用其他取代类苯胺;*Pseudomonas* sp.^[23]只能利用苯胺和对氨基苯甲酸,但不能利用其他取代类苯胺化合物。近年来,微生物对苯胺的降解机理与降解相关酶基因的研究也有报道,有研究发现苯胺降解菌中与苯胺降解相关的基因紧密连锁成簇排列^[19,24-25]。微生物降解苯胺的途径主要有好氧降解和厌氧降解两种,即以苯胺为营养基质,在自身特有的降解酶作用下进行生化反应,从中获得生长和代谢所需的能量。

为进一步丰富具有不同降解谱的菌株与基因资源,本研究从长期受苯胺污染的活性污泥中分离具有高效降解苯胺的菌株,并研究其降解特性,采用正交分析法对菌株的发酵进行优化以提高发酵水平,以期对苯胺污染的水体与土壤修复提供材料和方法基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

样品采自山东省滨州市污水处理系统活性污泥。

1.1.2 培 养 基

富集培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 葡萄糖 10.0, K_2HPO_4 1.0, KH_2PO_4 1.0, NaCl 5.0, pH 7.0-7.5。无机盐培养基(g/L)^[26]: KH_2PO_4 0.09, K_2HPO_4 0.22, NaH_2PO_4 0.26, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.23, $CaCl_2$ 0.28, $FeCl_3$ 0.003, pH 7.0-7.2。选择培养基: 上述培养基添加琼脂粉 15 g/L, 苯胺浓度按需加入, pH 7.0-7.2。种子培养基(g/L): 胰化蛋白胨

10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0-7.2。

1.1.3 主要试剂和仪器

苯胺, 国药集团化学试剂有限公司; 快速 DNA 提取检测试剂盒和多重 PCR 扩增试剂盒, 天根生化科技有限公司。振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; 电热恒温培养箱, 上海三发科学仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 超净工作台, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; 光学显微镜, 徕卡(Leica)仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌种的驯化与筛选

取 10 mL 活性污泥加入 90 mL 富集培养基中, 35 °C、150 r/min 振荡培养 2 d。之后以 10% 的接种量转接再培养, 以 2-3 d 为一个驯化周期, 逐步增大苯胺浓度(100、200、400、600、800 与 1 000 mg/L)。驯化的菌悬液经稀释为不同浓度梯度(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6})后, 取 100 μ L 涂布于含 500 mg/L 与 800 mg/L 苯胺的选择培养基上。于 35 °C 恒温培养箱倒置培养 48 h, 挑取菌落形态明显不一致的单菌落于相同的平板上分离纯化, 获得可耐受高浓度苯胺的单菌落。

1.2.2 分析测定方法

将筛选出的对高浓度苯胺不敏感菌株接种至种子培养基中, 35 °C、170 r/min 摇床培养至对数生长期(OD_{600} 约为 0.6)时, 以 3% 的接种量接种至含苯胺的无机盐培养基中进行苯胺降解实验。

1) 苯胺的测定

通过测定实验前后苯胺含量的变化进行苯胺降解能力实验, 选择出一株可以高效降解苯胺的菌种。苯胺的浓度测定方法参考文献[27]。苯胺降解率表示菌株对苯胺的降解能力, 计算公式为: 降解率(%)=(苯胺初始浓度-苯胺剩余浓度)/苯胺初始浓度 \times 100。

2) 细菌生长的测定

未接种的无机盐培养基作空白对照, 采用紫外可见分光光度计测定培养 24 h 菌液的 OD_{600} 值, 用于间接反映液体培养基中微生物的生长状况。

1.2.3 菌株降解苯胺的性能优化

将种子液以 3% 的接种量接种至含苯胺的无机盐培养基中, 通过单因素实验考察不同温度(25、30、35、37、40 °C)、初始 pH(5.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、苯胺初始浓度(100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 mg/L)在 170 r/min 振荡培养 24 h 条件下降解菌的降解特性, 从而获得最适降解条件。

1.2.4 菌株的鉴定

1) 形态观察

将分离出的菌株在营养琼脂培养基上进行分离纯化, 于 35 °C 恒温培养箱倒置培养 48 h, 观察菌落形态和显微镜下的菌体特征。

2) 分子生物学鉴定

菌株的分子生物学鉴定采用 16S rRNA 基因进行测序分析, 菌株的总 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增及序列测定参照文献[28]进行。通过快速 DNA 提取检测试剂盒提取菌株基因组为模板进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 27F 和 1492R 引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ L, 2 \times PCR Mix 12.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 10.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至铂尚生物技术(上海)有限公司完成测序。测序结果提交 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行序列比对, 选取相似性较高的序列用 neighbor-joining 法进行分析, 采用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.2.5 菌株发酵培养基成分优化

1) 基础培养基的筛选

将种子液以 5% 的接种量接种至基础培养基中, 37 °C、170 r/min 摇床振荡培养 24 h。基础培养基有 5 种配方。

配方 1 (g/L): 葡萄糖 10.0, 玉米淀粉 5.0, 豆粕 40.0, 蛋白胨 5.0, 硫酸铵 5.0, 酵母粉 5.0, 硫酸锰 0.4, pH 7.0–7.4。

配方 2 (g/L): 葡萄糖 15.0, 玉米粉 20.0, 玉米浆干粉 10.0, 硫酸铵 4.0, 硫酸锰 0.4, 硫酸镁 0.5, 硫酸亚铁 0.05, 氯化钙 0.2, pH 7.0–7.4。

配方 3 (g/L): 葡萄糖 10.0, 玉米粉 15.0, 豆粕 40.0, 氯化铵 2.0, 硫酸锰 0.2, 硫酸镁 0.5, 硫酸亚铁 0.05, 氯化钙 0.2, pH 7.0–7.4。

配方 4 (g/L): 葡萄糖 10.0, 玉米淀粉 15.0, 玉米浆干粉 5.0, 蛋白胨 15.0, 硫酸镁 0.5, 磷酸二氢钾 0.5, 碳酸钙 6.0, pH 7.0–7.4。

配方 5 (g/L): 葡萄糖 15.0, 玉米淀粉 15.0, 豆粕 10.0, 蛋白胨 5.0, 硫酸铵 1.0, 硫酸镁 0.5, 硫酸锰 0.4, 磷酸二氢钾 0.2, 氯化钠 0.1, pH 7.0–7.4。

2) 碳源筛选

在筛选出的基础培养液中, 分别以 1.0% 的葡萄糖、蔗糖作为速效碳源, 以 1.5% 的玉米淀粉、玉米粉与可溶性淀粉作为缓效碳源, 取代培养液中的碳源进行筛选实验。

3) 氮源筛选

分别以 0.3% 的蛋白胨、酵母粉作为速效氮源, 以 2.0% 玉米浆干粉、豆粕作为缓效氮源, 取代培养液中的氮源进行筛选实验。

4) 四因素三水平试验

以单因素以及先前对菌株培养条件优化的实验为基础, 以单因素实验筛选出的最佳碳源和氮源为变异因素, 采用四因素三水平正交试验进行培养基优化实验, 从中选出菌株发酵液的最佳培养基配比。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的筛选和纯化

通过污泥样品的驯化培养, 共分离纯化出 21 株能以苯胺为唯一碳源和氮源的细菌。对菌株进行苯胺降解能力验证实验, 发现菌株 BA-6 可在以苯胺为唯一碳源和氮源的无机盐培养基中生长, 48 h 对苯胺的降解率达到 100%, 因此选用该菌株做后续研究。

2.2 菌株 BA-6 的形态和种属鉴定

菌株 BA-6 在营养琼脂培养基上生长为浅黄色菌落, 圆形, 边缘整齐, 有光泽(图 1)。将菌株 BA-6 的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 数据库, 序列登录号为 OP024282, 与 NCBI 数据库中的相关序列进行比对并构建系统发育树(图 2)。如图 2 所示, 菌株 BA-6 与菌株 *Microbacterium* sp. 相似性最高, 达 100%。根据此结果可鉴定菌株 BA-6 归属于微杆菌属。

2.3 菌株 BA-6 的降解特性

2.3.1 温度对菌株 BA-6 降解苯胺效果的影响

在苯胺 500 mg/L、初始 pH 7.0 条件下, 将



图 1 苯胺降解菌 BA-6 的形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of aniline degrading strain BA-6.

培养体系置于不同温度培养 24 h, 菌株 BA-6 生物量与苯胺的降解情况如图 3A 所示。菌株 BA-6 能在 30–37 °C 范围内对苯胺进行高效降解, 降解率高达 99% 以上; 在 35–37 °C 时可将苯胺完全降解, 效果最佳。温度大于 40 °C 或小于 30 °C 时, 该菌株对苯胺的降解率均有不同程度的下降。这可能是由于低温或高温能够影响酶活性^[29], 从而抑制其对苯胺的降解效果。

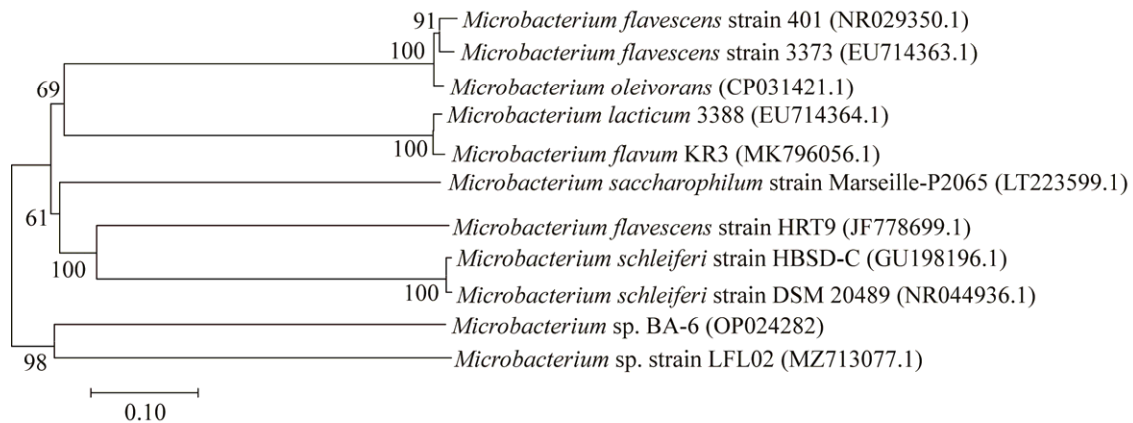


图 2 苯胺降解菌 BA-6 系统发育树的构建

括号中的序号为菌株登录号; 节点上的数值是自展值

(%); 刻度 0.10 代表序列差异度

Figure 2 Phylogenetic tree of aniline degrading strain BA-6. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; The value on the node is the self expanding value (%); The scale 0.10 represents the sequence difference.

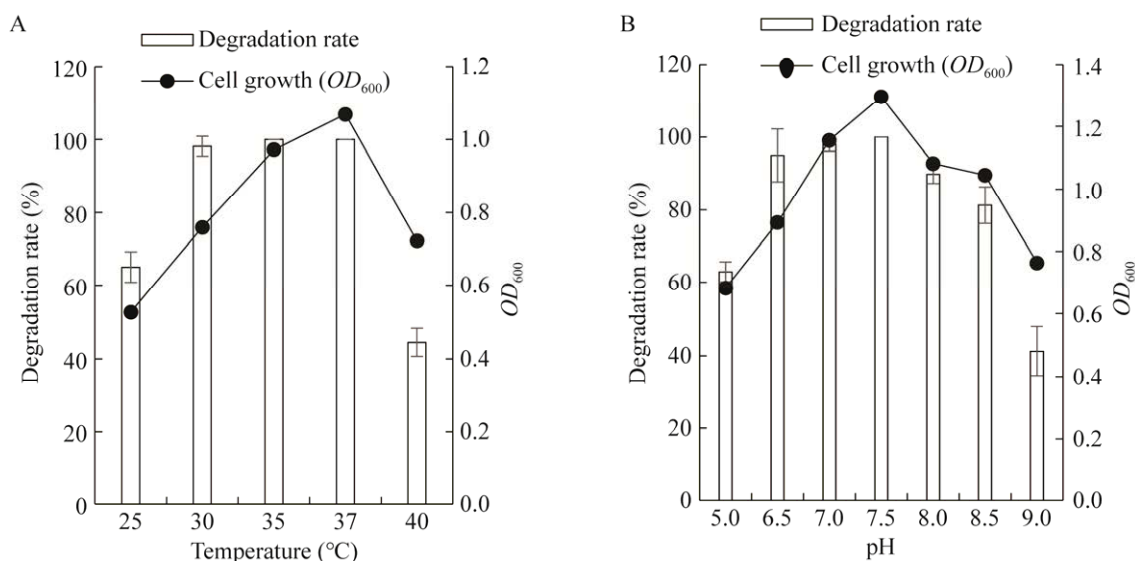


图3 不同温度(A)与初始 pH (B)对菌株 BA-6 生长和降解苯胺的影响

Figure 3 The cell growth and biodegradation of aniline by strain BA-6 under different temperatures (A) and initiative pH (B).

2.3.2 pH 对菌株 BA-6 降解苯胺效果的影响

在苯胺 500 mg/L、35 $^{\circ}C$ 条件下, 将培养体系置于不同 pH 培养 24 h, 菌株 BA-6 生物量与苯胺的降解情况如图 3B 所示, 该菌株能在 pH 6.5–7.5 范围内对苯胺进行高效降解, 降解率高达 95% 以上; 在 pH 值为 7.0–7.5 时降解效果最佳, 24 h 降解率达到 100%; 当 pH 值低于 6.5 或高于 8.0 时, 菌株对苯胺的降解效果较差, 其原因可能是 pH 影响菌株体内酶的催化活性, 过酸或过碱的环境会改变细胞表面电位, 甚至改变细胞结构^[30], 从而影响菌株 BA-6 对苯胺的降解率。因此, 菌株 BA-6 降解苯胺的最适 pH 值为 7.0–7.5。

2.3.3 不同初始浓度苯胺对菌株 BA-6 降解率的影响

在 35 $^{\circ}C$ 、初始 pH 7.5 条件下, 将培养体系置于不同苯胺浓度培养 24 h, 测定各体系的剩余苯胺浓度。如图 4 所示, 当苯胺初始浓度为 100–500 mg/L 时, 菌株 BA-6 在 24 h 内可将苯胺完全降解; 当苯胺初始浓度为 600 mg/L 时,

24 h 降解率可达 98% 以上; 当苯胺初始浓度为 1 000 mg/L 时, 24 h 降解率仅为 11.0%。随着苯胺浓度的增大, 其降解率呈现不同程度的降低, 可能原因是随着苯胺浓度的增加, 其对菌株生长产生了不同程度的抑制, 导致降解率降低。培养至 30 h, 初始浓度为 600、700、800、900

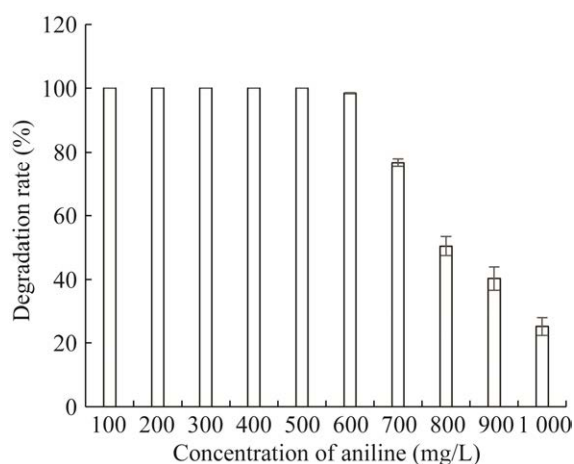


图4 菌株 BA-6 对不同浓度苯胺的 24 h 降解率
Figure 4 Degradation rates of different concentration of aniline in 24 h by strain BA-6.

和 1 000 mg/L 的组别降解率分别为 100%、100%、65.8%、55.4% 和 44.4%。培养至 48 h, 初始浓度为 1 000 mg/L 的组别降解率为 75.3%, 其余组剩余苯胺均未检出, 降解率达 100%。

2.3.4 菌株 BA-6 生长量与降解率随时间变化的关系

如图 5 所示, 在 35 °C、pH 7.5、170 r/min、3% 接种量、初始苯胺浓度为 580 mg/L 的无机盐培养基中, 菌株 BA-6 对苯胺的适应期较短, 仅为 4 h, 菌株生物量在 24 h 内逐渐增长, 20 h 时 OD_{600} 为 0.94, 降解率已高达 93%; 当培养 24 h 后, 培养液的 OD_{600} 为 1.0, 可将培养液中浓度为 580 mg/L 的苯胺完全降解。这说明苯胺的降解与菌株生物量成正相关, 降解菌的生长量与苯胺残留量的关系对于后续深入研究有着重要的指导意义。

2.4 降解菌株 BA-6 对不同底物的利用

在无机盐培养基中 170 r/min 振荡培养 48 h 后, 通过测定苯胺类化合物含量判断菌株利用

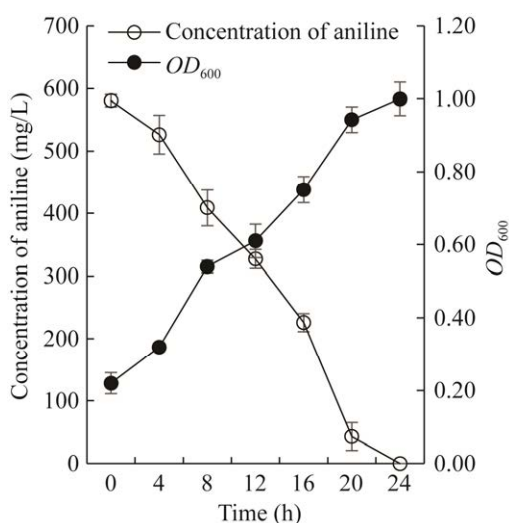


图 5 菌株 BA-6 的生长量和苯胺残留量随时间变化的关系

Figure 5 The relationship between the biomass of the strain BA-6 and the residual of aniline.

底物的能力, 菌株 BA-6 利用不同底物的情况如表 1 所示。菌株 BA-6 能利用 300 mg/L 的苯胺、邻甲基苯胺、2,3-二甲基苯胺、邻甲氧基苯胺、对甲氧基苯胺、对乙氧基苯胺、邻氟苯胺、间甲苯胺和 2,4-二甲基苯胺为唯一的碳源、氮源与能源, 但难利用对甲苯胺。

2.5 菌株 BA-6 的发酵优化

2.5.1 BA-6 基础培养基的筛选

选择 5 个配方进行菌株 BA-6 基础培养基的筛选, 种子液接种量为 5%, 在 37 °C、170 r/min 条件下培养 24 h。由图 6 可知, 通过检测各配方发酵液的菌量, 最佳基础培养基为配方 5, 24 h 菌量可达到 1.46×10^{10} CFU/mL。因此, 后期在此配方的基础上进一步优化配方, 即基础配方确定为配方 5 (g/L): 葡萄糖 15.0, 玉米淀粉 15.0, 豆粕 10.0, 蛋白胨 5.0, 硫酸铵 1.0, 硫酸镁 0.5, 硫酸锰 0.4, 磷酸二氢钾 0.2, 氯化钠 0.1, pH 7.0–7.4。

表 1 菌株 BA-6 利用底物的实验

Table 1 The test of strain BA-6 using the substrate

| 底物 Substrate | 利用情况 Utilization |
|-------------------------------|---------------------|
| 苯胺 Aniline | ++ |
| 邻氟苯胺 2-fluoroaniline | + |
| 间甲苯胺 m-toluidine | + |
| 对甲苯胺 p-toluidine | - |
| 邻甲基苯胺 o-toluidine | + |
| 邻甲氧基苯胺 o-anisidine | + |
| 对甲氧基苯胺 p-anisidine | + |
| 对乙氧基苯胺 4-ethoxyaniline | ++ |
| 2,3-二甲基苯胺 2,3-dimethylaniline | ++ |
| 2,4-二甲基苯胺 2,4-dimethylaniline | + |

++: 很好利用(降解率 60%以上); +: 可以利用(降解率 10%–60%); -: 难利用(降解率低于 10%)

++: Well used (degradation rate above 60%); +: Can be used (degradation rate 10%–60%); -: Difficult to use (degradation rate less than 10%).

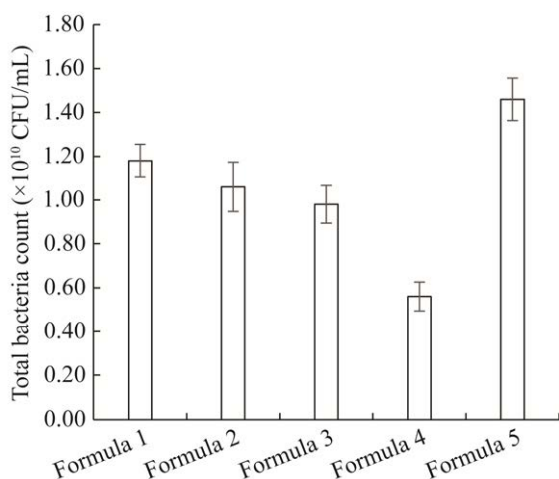


图 6 菌株 BA-6 基础配方筛选的结果

Figure 6 The results of the basic formula screening of strain BA-6.

2.5.2 菌株 BA-6 碳源筛选实验

根据前期筛选出的最佳基础培养基, 分别以葡萄糖、蔗糖作为速效碳源, 以玉米淀粉、玉米粉与可溶性淀粉作为缓效碳源进行筛选实验, 其余培养基组分不变, 培养 24 h 后对发酵液进行稀释涂布计数, 确定最佳碳源。图 7A 结果表明, 碳源为葡萄糖与玉米淀粉时菌量最高, 即最佳碳源为葡萄糖与玉米淀粉。

2.5.3 菌株 BA-6 氮源筛选实验

根据前期筛选出的最佳基础培养基, 分别以蛋白胨、酵母粉作为速效氮源, 以玉米浆干粉、豆粕作为缓效氮源进行筛选实验, 其余培养基组分不变, 培养 24 h 后对发酵液进行稀释涂布计数, 确定最佳氮源。图 7B 结果表明, 氮源为豆粕与酵母粉时菌量最高, 即最佳氮源为豆粕与酵母粉。

2.5.4 正交试验菌量测定

按四因素三水平正交方法及菌量的测定进行试验, 运用正交分析方法对结果进行分析。如表 2 可以看出, 各因素影响的主次顺序为: $A > C > D > B$, 即葡萄糖 > 豆粕 > 酵母粉 > 玉米淀粉; 菌量

最高的水平组合为: $A_1B_2C_2D_2$, 即确定最佳发酵培养基配方(g/L): 葡萄糖 10.0, 玉米淀粉 12.0, 豆粕 20.0, 酵母粉 4.0, 硫酸镁 0.5, 磷酸二氢钾 0.2, 硫酸锰 0.4, 氯化钠 0.1, 硫酸铵 1.0, pH 7.0–7.4。通过菌株 BA-6 的发酵优化实验, 获得了该菌株的最佳发酵培养基配方, 经过摇瓶 24 h 发酵, 活菌量高达 3.06×10^{10} CFU/mL, 极大地满足了工业化发酵生产的需求。

3 讨论与结论

本研究从长期受苯胺污染的污泥中成功分离出一株苯胺降解菌 BA-6, 其可以利用苯胺作为唯一的碳源、氮源与能源, 该菌株对 600 mg/L 的苯胺日降解率达 98% 以上, 对 500 mg/L 以下的苯胺日降解率达 100%, 经鉴定为 *Microbacterium* sp.。现有研究表明, *Microbacterium* sp. 具有较强的代谢活性, 在生物修复污染环境方面具有较为突出的应用价值, 如 *Microbacterium* sp. 可不同程度地降解对硝基苯胺^[31]、赤霉烯酮^[32]、邻苯二甲酸二丁酯^[33]、磺胺类抗生素^[34]等。但有关 *Microbacterium* sp. 在生物修复受苯胺类化合物污染环境方面的研究鲜有报道。近年来, 研究者从环境中分离筛选到不同种类的苯胺降解菌, 李大卉^[35]从长期受苯胺污染土壤中分离到一株 *Rhodococcus* sp., 在 48 h 时可将 500 mg/L 苯胺几乎完全降解。Liu 等^[36]从活性污泥中分离出一株能够使用苯胺或乙酰苯胺作为唯一碳、氮和能量来源的细菌 *Delftia* sp. AN3, 能够在苯胺浓度高达 5 000 mg/L 的条件下生长, 培养 7 d 后可完全去除。Jiang 等^[37]报道了一株假单胞菌 JA1, 该菌在最佳条件下(pH 7.0, 25 °C), 24 h 可将 800 mg/L 的苯胺几乎完全降解。菌株 *Dietzia natronolimnaea* JQ-AN 在含有乙酸钠的培养基中培养 120 h, 可将 300 mg/L 的苯胺降解 87%^[38]。*Erwinia* sp. HSA6 在 24 h

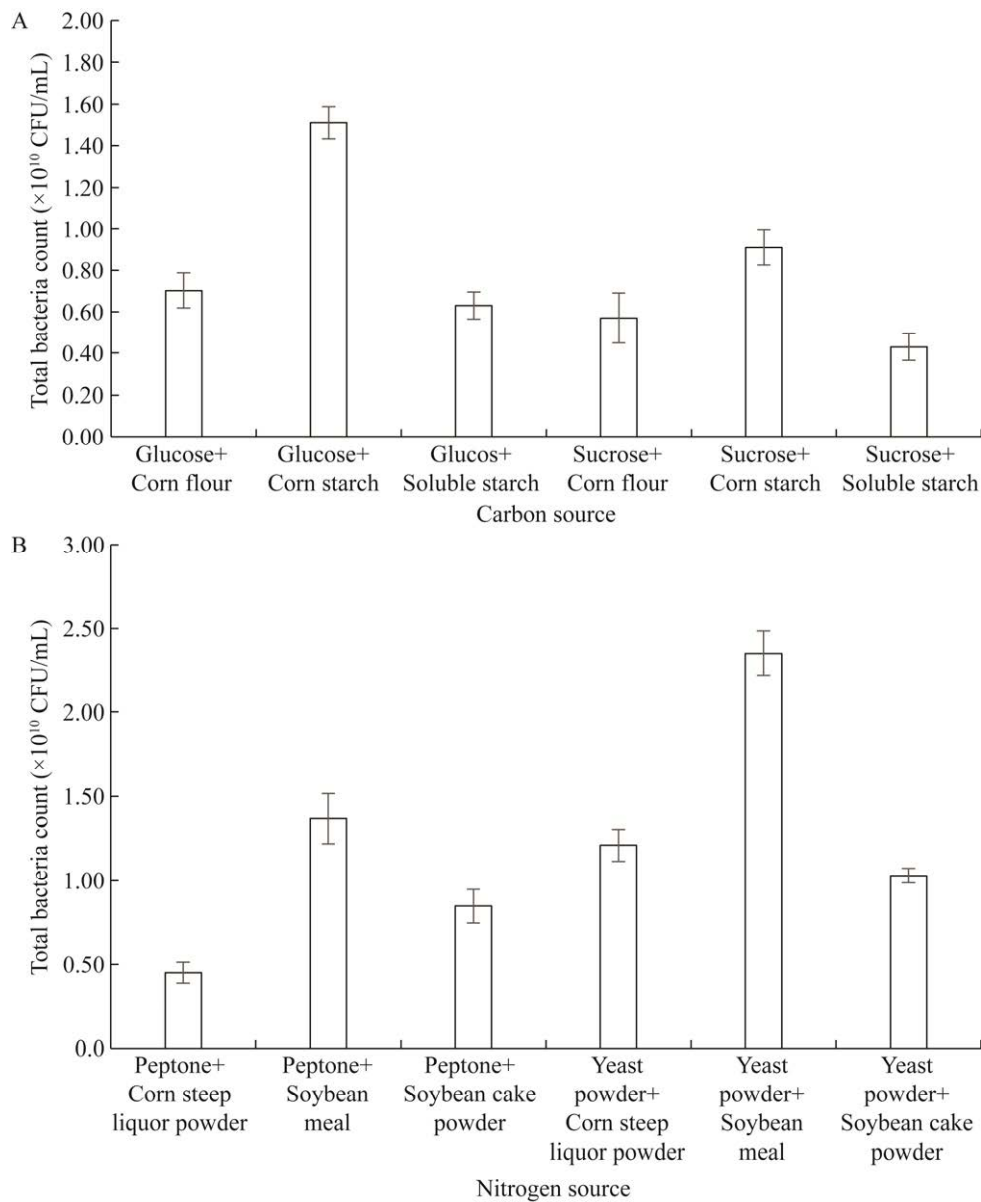


图7 菌株 BA-6 碳、氮源单因素试验 A: 菌株 BA-6 碳源单因素试验. B: 菌株 BA-6 氮源单因素试验
Figure 7 Carbon and nitrogen source single factor experiment of strain BA-6. A: Carbon source single factor experiment of strain BA-6. B: Nitrogen source single factor experiment of strain BA-6.

下可将 500 mg/L 苯胺完全降解^[39]。综上所述,国内外已分离出来能够降解苯胺的菌株不在少数,而且降解特性各有不同。与以往报道的苯胺降解菌不同,本研究分离的菌株 *Microbacterium* sp. BA-6 将成为环境治理与修复中降解苯胺的新资源,具有一定的研究开发与应用潜力。

本研究分离筛选出的苯胺降解菌 BA-6,其高效降解的温度范围是 30–37 °C,高效降解 pH 值范围是 6.5–7.5,降解率 95%以上,表明菌株 BA-6 有较强的环境调节能力,对温度、pH 有较广泛的适应范围,显示出较好的环境生存能力及对污染环境的清除能力,具有较好的生

表 2 正交试验数据

Table 2 Orthogonal experimental data

| 组别 Group | A 葡萄糖 A Glucose (%) | B 玉米淀粉 B Corn starch (%) | C 豆粕 C Soybean meal (%) | D 酵母粉 D Yeast powder (%) | 菌量 ($\times 10^{10}$ CFU/mL) |
|----------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 1 (1.0) | 1 (0.2) | 1.68 |
| 2 | 1 | 2 (1.2) | 2 (2.0) | 2 (0.4) | 3.06 |
| 3 | 1 | 3 (1.5) | 3 (3.0) | 3 (0.6) | 2.71 |
| 4 | 2 (1.5) | 1 | 2 | 3 | 2.66 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2.06 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2.29 |
| 7 | 3 (2.0) | 1 | 3 | 2 | 1.05 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.95 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.98 |
| 均值 1 Average 1 | 248 | 180 | 164 | 157 | |
| 均值 2 Average 2 | 234 | 202 | 223 | 213 | |
| 均值 3 Average 3 | 99 | 199 | 194 | 211 | |
| 极差 Range | 149 | 23 | 59 | 56 | |

物修复潜力。相较于刁刻等^[20]、李大卉^[35]与 Li 等^[39]的研究结果,菌株 BA-6 对苯胺的降解效果更为高效。与 Jin 等^[38]、张逸飞等^[40]的研究结果相比,菌株 BA-6 可以苯胺作为唯一的碳氮源,对氮源的选择无较多要求。另外,实际应用中常常是多种有机污染物共存,因此,考察菌株 BA-6 对各种取代苯胺类化合物的降解能力就显得尤为重要。虽然对于菌株利用苯胺类化合物已有很多报道,但是大多数菌只能利用范围较窄的底物,如李云翔等^[19]筛选出的红球菌属(*Rhodococcus* sp.)能利用苯胺、邻甲基苯胺、对甲基苯胺和 2,5-二氯苯胺,不能利用间甲基苯胺、2,4-二甲基苯胺; Fujii 等^[41]的研究表明, *Acinetobacter* sp. YAA 能利用苯胺和邻甲基苯胺,不能利用间甲基苯胺和对甲基苯胺; Fukumori 等^[42]与 Liang 等^[43]的研究表明, *Pseudomonas putida* UCC22 与 *Delftia tsuruhatensis* AD9 只能利用苯胺、间甲基苯胺和对甲基苯胺,不能利用邻甲基苯胺。然而本研究底物广谱性利用实验表明,菌株 BA-6 的底物谱相对较宽,

除了苯胺还能利用邻甲基苯胺、2,3-二甲基苯胺、邻甲氧基苯胺、对甲氧基苯胺、对乙氧基苯胺、邻氟苯胺、间甲苯胺和 2,4-二甲基苯胺,但难利用对甲苯胺,相关研究证实了这几种苯胺降解菌的底物谱不同,暗示菌株中负责降解苯胺的基因簇可能有不同程度的差异,从而导致菌株降解苯胺具有不同的分子机制。本研究为环境中苯胺的去除提供了优良菌种,丰富了苯胺降解菌的底物降解谱,后续可以继续研究其降解基因,或可通过遗传工程手段改良苯胺降解菌。

同时,本研究对苯胺降解菌 BA-6 的发酵培养基进行优化设计,以获得更高的发酵水平。有文献指出微生物的接种量对很多细胞培养和代谢物积累都起到重要的作用^[44]。强婧等^[45]研究表明,在降解过程中,降解率受菌体投加量的影响较大,但投菌量达到一定量时降解率比较接近。李静等^[46]指出接种量对底物降解率的影响较少,而对菌体生长量的变化影响较大。接种量过低时,菌体生物量增长较慢导致其底物

降解率不高; 接种量过高时, 由于体系中菌体大量增殖导致溶解氧消耗过快, 使菌体较早进入衰退期, 影响底物降解。最佳接种量的选择则综合考虑菌体生长及对底物的降解情况而定。陈涛等^[47]研究认为, 微生物接种量越大越有利于底物降解, 底物的残留率随着接种量的增大而减小。因此, 对不同菌种而言, 接种量与菌种的降解率呈现不一样的关系, 但研究者一致认为, 微生物接种量应达到一定的量才能更好地发挥降解性能, 这也说明降解菌的发酵水平对污水处理行业起着重要的影响。本研究通过单因素和正交试验对培养基组分进行了优化, 获得一种最优发酵配方, 其活菌量达到 3.06×10^{10} CFU/mL。此优化的发酵培养基为今后苯胺降解菌剂的开发利用奠定了基础, 可大大节约生产成本, 为其工业化应用提供了研究基础。

综上所述, 本研究筛选的菌株 BA-6 为环境中苯胺的去除提供优良菌种, 具有高效降解苯胺的能力, 对 600 mg/L 的苯胺 24 h 降解率达 98% 以上, 其高效降解的温度范围是 30–37 °C, pH 值范围是 6.5–7.5, 降解率达 95% 以上。该菌株的底物降解谱较广, 可利用多种苯胺类化合物, 丰富了苯胺降解菌的底物降解谱。同时通过发酵培养基优化获得了高活菌量配方, 在一定程度上为苯胺降解菌的工业化应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] HALLAS LE, ALEXANDER M. Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(4): 1234-1241.
- [2] 陈荣圻. 印染废水中苯胺来源[J]. *染料与染色*, 2016, 53(3): 40-44.
CHEN RQ. Sources of aniline in printing and dyeing wastewater[J]. *Dyestuffs and Coloration*, 2016, 53(3): 40-44 (in Chinese).
- [3] 孙彤, 高杰, 刘连利. 活性炭对苯胺、对硝基苯胺共吸附性能的研究[J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(3): 64-67.
SUN T, GAO J, LIU LL. Co-adsorption of aniline and p-nitroaniline on activated carbon[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(3): 64-67 (in Chinese).
- [4] ITOH N, MORINAGA N, KOUZAI T. Oxidation of aniline to nitrobenzene by nonheme bromoperoxidase[J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1993, 29(4): 785-791.
- [5] KEARNEY PC, PLIMMER JR, GUARDIA FS. Mixed chloroazobenzene formation in soil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1969, 17(6): 1418-1419.
- [6] LOIDL M, HINTEREGGER C, DITZELMÜLLER G, FERSCHL A, STREICHSBIER F. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains[J]. *Archives of Microbiology*, 1990, 155(1): 56-61.
- [7] MINARD RD, RUSSEL S, BOLLAG JM. Chemical transformation of 4-chloroaniline to a triazine in a bacterial culture medium[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1977, 25(4): 841-844.
- [8] 刘志培, 杨惠芳, 周培谨. 微生物降解苯胺的特性及其降解代谢途径[J]. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(S1): 5-9.
LIU ZP, YANG HF, ZHOU PJ. Characteristics and metabolism pathway of microbial degradation of aniline[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 1999, 5(S1): 5-9 (in Chinese).
- [9] 赵芝清, 杨玉飞, 杜祥君. 不适宜生长条件对混菌降解苯胺的影响[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(4): 1681-1686.
ZHAO ZQ, YANG YF, DU XJ. Effects of unsuitable growth conditions on mixed strains for aniline degradation[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(4): 1681-1686 (in Chinese).
- [10] 丁惠平. 微生物法处理苯胺工业废水[J]. *广东化工*, 2005, 32(12): 20-21, 24.
DING HP. Microorganism treatment industrial aniline sewage[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2005, 32(12): 20-21, 24 (in Chinese).
- [11] 吴勇民, 陈新才, 楼洪海, 沈晷. 印染废水中苯胺类化合物处理的研究进展[J]. *印染*, 2014, 40(2): 51-54.
WU YM, CHEN XC, LOU HH, SHEN W. Research progress in controlling of aniline compounds in dyeing effluents[J]. *Dyeing & Finishing*, 2014, 40(2): 51-54 (in Chinese).

- [12] 曾国驱, 任随周, 许玫英, 孙国萍. 微生物降解苯胺的研究现状[J]. 中国医学生物技术应用, 2003(4): 74-78.
ZENG GQ, REN SZ, XU MY, SUN GP. Recent research situation on microbialdegradation of aniline[J]. The Chinese Academic Medical Magazine of Organisms, 2003(4): 74-78 (in Chinese).
- [13] 蔡莉. 固定化高效苯胺降解菌的制备及处理苯胺印染废水的研究[J]. 印染助剂, 2017, 34(8): 33-37.
CAI L. Preparation of immobilized high efficient aniline degrading bacteria and treatment of aniline printing and dyeing wastewater[J]. Textile Auxiliaries, 2017, 34(8): 33-37 (in Chinese).
- [14] 王治业, 祝英, 季彬, 祁宏山, 周剑平, 王鸣刚. 生物强化技术处理苯胺废水难降解有机物的研究[J]. 环境工程, 2014, 32(S1): 16-18.
WANG ZY, ZHU Y, JI B, QI HS, ZHOU JP, WANG MG. A study on treatment of refractory compounds in aniline wastewater by bioaugmentation technology[J]. Environmental Engineering, 2014, 32(S1): 16-18 (in Chinese).
- [15] 刘志培, 杨彦希, 杨惠芳. 一株利用苯胺的细菌的分离筛选[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 221-223, 217.
LIU ZP, YANG YX, YANG HF. Isolation and screening of a strain of bacteria utilizing aniline[J]. Microbiology, 1998, 25(4): 221-223, 217 (in Chinese).
- [16] 李尔扬, 史乐文. 一株苯胺降解菌的研究[J]. 环境导报, 2000(6): 13-15.
LI EY, SHI YW. Studies on a bacterial strain of aniline degradation[J]. Environment Herald, 2000(6): 13-15 (in Chinese).
- [17] 刘志培, 杨惠芳, 周培瑾. 苯胺降解菌的分离和特性研究[J]. 环境科学学报, 1999, 19(2): 174-179.
LIU ZP, YANG HF, ZHOU PJ. Isolation and characterization of a bacterial strain for the degradation of aniline[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 1999, 19(2): 174-179 (in Chinese).
- [18] 盛多红, 张素琴, 刘海舟. 一株高浓度苯胺降解菌的分离[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(S1): 18-20.
SHENG DH, ZHANG SQ, LIU HZ. Isolation of a bacterium for degrading high concentration aniline[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 1999, 5(S1): 18-20 (in Chinese).
- [19] 李云翔, 陈雪婷, 周潮洋, 裴涛, 刘永闯, 洪青, 闫新, 李顺鹏. 苯胺降解菌 *Rhodococcus* sp. E2 的分离与苯胺氧化酶基因簇的初步鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(5): 882-889.
LI YX, CHEN XT, ZHOU CY, PEI T, LIU YC, HONG Q, YAN X, LI SP. Isolation of aniline-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. E2 and characterization of aniline dioxygenase gene cluster[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(5): 882-889 (in Chinese).
- [20] 刁刻, 吴琼, 邱业先. 一株苯胺降解菌的筛选及其降解效率研究[J]. 苏州科技大学学报(自然科学版), 2017, 34(2): 43-48, 54.
DIAO K, WU Q, QIU YX. Isolation and effect of an aniline-degrading bacterium named DK[J]. Journal of Suzhou University of Science and Technology: Natural Science, 2017, 34(2): 43-48, 54 (in Chinese).
- [21] 张浩, 刘玉香, 呼婷婷, 赵晶. 一株苯胺降解菌的分离及其降解特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(12): 6154-6160.
ZHANG H, LIU YX, HU TT, ZHAO J. Isolation and characterization of an aniline-degrading bacterium[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(12): 6154-6160 (in Chinese).
- [22] 任随周, 郭俊, 曾国驱, 岑英华, 孙国萍. 2株苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2006, 27(12): 2525-2530.
REN SZ, GUO J, ZENG GQ, CEN YH, SUN GP. Isolation and characterization of two aniline-degrading strains and compare of functional genes[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2006, 27(12): 2525-2530 (in Chinese).
- [23] 苗艳芳, 王忠彦, 胡承, 孟勇. 一株苯胺降解菌的筛选及其特性研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(4): 771-773.
MIAO YF, WANG ZY, HU C, MENG Y. Isolation and characterization of a bacterial strain for the degradation of aniline[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2003, 40(4): 771-773 (in Chinese).
- [24] KAHNG HY, KUKOR JJ, OH KH. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 190(2): 215-221.
- [25] 耿立召. *Delftia tsuruhatensis* AD9 苯胺降解基因表达调控研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2008.
GENG LZ. Study on expression regulation of aniline degradation gene of *Delftia tsuruhatensis* AD9[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese).
- [26] 陈建华, 许尚营, 李常行, 苏建文. 一株 N,N-二甲基酰胺高效降解菌的筛选鉴定及其生物降解特性[J]. 净水技术, 2016, 35(1): 43-47.

- CHEN JH, XU SY, LI CX, SU JW. Screening and identification of high-effective degradation strains and the biodegradation characteristics for DMF removal[J]. Water Purification Technology, 2016, 35(1): 43-47 (in Chinese).
- [27] 国家环境保护总局. 水质 苯胺类化合物的测定 N-(1-萘基)乙二胺偶氮分光光度法: GB 11889—1989[S]. 北京: 中国标准出版社, 1990.
- State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Water Quality-Determination of Aniline Compounds-Spectrophotometric Method with N-(1-naphthyl) eth: GB 11889—1989[S]. Beijing: Standards Press of China, 1990 (in Chinese).
- [28] 胡亚楠, 贺旭, 亚森·沙力, 罗明, 张宇宏, 张帅. 大蜡螟和黄粉虫肠道菌中聚乙烯地膜降解细菌的筛选及其降解性能[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4029-4041.
- HU YN, HE X, YASEN SL, LUO M, ZHANG YH, ZHANG S. Screening of polyethylene film-degrading bacteria from gut microbiota of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4029-4041 (in Chinese).
- [29] KARGI F, UYGUR A. Biological treatment of saline wastewater in an aerated percolator unit utilizing halophilic bacteria[J]. Environmental Technology, 1996, 17(3): 325-330.
- [30] 梁梦晓, 倪晋仁. SBR 中好氧颗粒污泥的培养及特性研究[J]. 应用基础与工程科学学报, 2009, 17(4): 502-512.
- LIANG MX, NI JR. Cultivation and characteristics of aerobic granular sludge in sequencing batch reactor[J]. Journal of Basic Science and Engineering, 2009, 17(4): 502-512 (in Chinese).
- [31] 沈晓莉, 王健鑫, 陈小龙, 赵芝清. 一株对硝基苯胺降解菌 *Microbacterium* sp. PNA8 的分离鉴定及其降解条件研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1496-1500.
- SHEN XL, WANG JX, CHEN XL, ZHAO ZQ. Condition of p-nitroaniline degrading *Microbacterium* sp. PNA8 and its degradation of p-nitroaniline[J]. Microbiology China, 2009, 36(10): 1496-1500 (in Chinese).
- [32] 徐天宇, 胡苏莹, 周峻岗, 吕红. 微杆菌 *Microbacterium* sp. FY1538 降解赤霉烯酮的活性研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 2016, 55(2): 223-231.
- XU TY, HU SY, ZHOU JG, LYU H. Analysis of zearalenone-degrading activities of *Microbacterium* sp. FY1538[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2016, 55(2): 223-231 (in Chinese).
- [33] ZHAO ZZ, LIU C, XU QQ, AHMAD S, ZHANG HY, PANG Y, AIKEMU A, LIU Y, YAN H. Characterization and genomic analysis of an efficient dibutyl phthalate degrading bacterium *Microbacterium* sp. USTB-Y[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2021, 37(12): 212.
- [34] RICKEN B, FELLMANN O, KOHLER HP E, SCHÄFFER A, CORVINI PFX, KOLVENBACH BA. Degradation of sulfonamide antibiotics by *Microbacterium* sp. strain BR1-elucidating the downstream pathway[J]. New Biotechnology, 2015, 32(6): 710-715.
- [35] 李大卉. *Rhodococcus* sp. DH-2 对苯胺和原油的降解及对重金属耐受性研究[D]. 天津: 天津理工大学硕士学位论文, 2021.
- LI DH. Degradation of aniline and crude oil by *Rhodococcus* sp. DH-2 and its tolerance to heavy metals[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [36] LIU Z, YANG H, HUANG Z, ZHOU P, LIU SJ. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN₃[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(5): 679-682.
- [37] JIANG Y, SHANG Y, ZHOU J, YANG K, WANG HY. Characterization and biodegradation potential of an aniline-degrading strain of *Pseudomonas* JA1 at low temperature[J]. Desalination and Water Treatment, 2016, 57(52): 25011-25017.
- [38] JIN Q, HU ZC, JIN ZF, QIU LQ, ZHONG WH, PAN ZY. Biodegradation of aniline in an alkaline environment by a novel strain of the halophilic bacterium, *Dietzia natronolimnaea* JQ-AN[J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 148-154.
- [39] LI JM, JIN ZX, YU BB. Isolation and characterization of aniline degradation slightly halophilic bacterium, *Erwinia* sp. strain HSA 6[J]. Microbiological Research, 2010, 165(5): 418-426.
- [40] 张逸飞, 顾挺, 王国祥, 钟文辉. 一株苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(2): 12-15, 36.
- ZHANG YF, GU T, WANG GX, ZHONG WH. Isolation and characterization of aniline-degrading bacterial strain AN₄[J]. Environmental Pollution & Control, 2008, 30(2): 12-15, 36 (in Chinese).
- [41] FUJII T, TAKEO M, MAEDA Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA[J]. Microbiology (Reading, England),

- 1997, 143(Pt 1): 93-99.
- [42] FUKUMORI F, SAINT CP. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN₁)[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(2): 399-408.
- [43] LIANG QF, TAKEO M, CHEN M, ZHANG W, XU YQ, LIN M. Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2005, 151(Pt 10): 3435-3446.
- [44] PAKNIKAR KM, NAGPAL V, PETHKAR AV, RAJWADE JM. Degradation of lindane from aqueous solutions using iron sulfide nanoparticles stabilized by biopolymers[J]. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2005, 6(3/4): 370-374.
- [45] 强婧, 尹华, 彭辉, 叶锦韶, 秦华明, 何宝燕, 张娜. 蒽降解菌烟曲霉 A10 的分离及降解性能研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(5): 1298-1305.
- 境科学, 2009, 30(5): 1298-1305.
- QIANG J, YIN H, PENG H, YE JS, QIN HM, HE BY, ZHANG N. Isolation of an anthracene-degrading strain *Aspergillus fumigatus* A10 and its degradation characteristics[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2009, 30(5): 1298-1305 (in Chinese).
- [46] 李静, 李文英. 喹啉降解菌筛选及其对焦化废水强化处理[J]. *环境科学*, 2015, 36(4): 1385-1391.
- LI J, LI WY. Screening of a highly efficient quinoline-degrading strain and its enhanced biotreatment on coking waste water[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(4): 1385-1391 (in Chinese).
- [47] 陈涛, 尹敏敏, 司雄元, 司友斌. PCB77 降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. *环境科学与技术*, 2012, 35(4): 9-13.
- CHEN T, YIN MM, SI XY, SI YB. Isolation, identification and characteristics of PCB77-degrading strain[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 35(4): 9-13 (in Chinese).