



研究报告

降解 1,3-二甲基-2-咪唑烷酮细菌的分离及功能评价

张树林¹ 韩绍良² 张海亮² 郭雪娜³ 程艳飞³ 何秀萍^{*3,4}

1 沧州市康壮生物发酵制品有限公司 河北 沧州 061001

2 北京大北农科技集团股份有限公司 饲用微生物工程国家重点实验室 北京 100192

3 中国科学院微生物研究所微生物生理与代谢工程重点实验室 北京 100101

4 中国科学院大学生命科学学院 北京 100049

摘要:【背景】1,3-二甲基-2-咪唑烷酮(1,3-Dimethyl-2-Imidazolidinone, DMI)作为一种强极性非质子溶剂,在生产和应用过程的环境中有稳定残留问题,存在安全隐患。【目的】分离筛选具有降解 DMI 能力的微生物菌株,为清除环境中残留的 DMI 提供优良的微生物菌种资源。【方法】从 DMI 生产区域土壤采集样品分离 DMI 抗性微生物,采用形态学及分子生物学鉴定确定其分类地位,并对 DMI 降解能力进行测定。【结果】分离到最高能够耐受 5% (体积分数) DMI 的微生物菌株,形态学及分子生物学鉴定初步表明获得的菌株 DT-1 和 DT-2 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*);全细胞及细胞提取液均具有降解 DMI 的能力;其中菌株 DT-1 及其细胞提取液对 1% (体积分数) DMI 的降解率分别达到 48%和 68%。【结论】从 DMI 生产区域土壤中分离到具有 DMI 降解能力的芽孢杆菌,不但可为 DMI 污染的微生物治理提供优良微生物资源,而且扩展了人们对芽孢杆菌生物学功能的认识。

关键词: 1,3-二甲基-2-咪唑烷酮, 微生物降解, 贝莱斯芽孢杆菌

Isolation of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone degrading bacteria and evaluation of its function

ZHANG Shulin¹ HAN Shaoliang² ZHANG Hailiang² GUO Xuena³ CHENG Yanfei³
HE Xiuping^{*3,4}

1 Cangzhou Kangzhuang Bio-Fermentation Products Company Limited, Cangzhou, Hebei 061001, China

2 State Key Laboratory of Direct-Fed Microbial Engineering, Beijing Dabeinong Science and Technology Group Company Limited, Beijing 100192, China

3 Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone (DMI) is a nonproton solvent with strong polarity, which remains steadily in waste water from production and application processes and causes potential hazard to people's health. [Objective] Acquisition of DMI degrading microbial strains.

Foundation items: Cangzhou Science and Technology Project (181004002D, 142202001D)

***Corresponding author:** E-mail: hexp@im.ac.cn

Received: 11-05-2021; **Accepted:** 12-07-2021; **Published online:** 27-08-2021

基金项目: 沧州市科技计划项目(181004002D, 142202001D)

***通信作者:** E-mail: hexp@im.ac.cn

收稿日期: 2021-05-11; **接受日期:** 2021-07-12; **网络首发日期:** 2021-08-27

[Methods] Isolation and screen of DMI degrading microbial strains from the soil of manufacture plant by DMI tolerance assay. The strains were identified by morphological features and 16S rRNA gene sequence analysis. **[Results]** Two putative *Bacillus velezensis* strains tolerant to 5% (V/V) DMI were isolated from the soil samples, which were designated as DT-1 and DT-2 respectively. Both the whole cells and the cell-free extracts could reduce the DMI levels in the reaction systems. The degrading rates of whole cells and cell-free extract of strain DT-1 reached 48% and 68% respectively at 1% (V/V) DMI concentration. **[Conclusion]** DMI degrading *Bacillus* strains were obtained, which provided a basis for microbial degradation of DMI in the polluted environments. Moreover, the results in this study expand our knowledge of the biological function of *Bacillus*.

Keywords: 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone, microbial degradation, *Bacillus* sp.

微生物具有降解不同污染物的能力, 因此在环境污染的生物治理方面发挥着重要作用, 微生物修复技术是生物修复的核心^[1-3]。从受污染的环境及其周边土壤中分离筛选污染物耐受性微生物是实现污染物生物降解的基础。截至目前已发现大量能够降解不同污染物的微生物, 包括好氧型和厌氧型微生物^[4-10]。

1,3-二甲基-2-咪唑烷酮 (1,3-Dimethyl-2-Imidazolidinone, DMI) 是一种无色透明、低黏度的强极性非质子溶剂^[11] (图 1)。由于其对多种有机化合物和无机化合物均具有优良的溶解性能, 并能促进试剂活化, 提高反应速率, 因此广泛应用于医药、化工和微电子等领域, 同时也广泛用作染料、颜料和光刻胶等难溶解物质的溶解剂、清洗剂和剥离剂^[12]。尽管目前尚无 DMI 相关毒性的详细报道, 但通常认为皮肤接触及吞食有害, 尤其对眼睛有严重伤害。DMI 具有非常好的稳定性和水溶性, 在水溶液、热酸和热碱溶液中不易分解, 在光照和氧气暴露环境中能稳定存在。因此在 DMI 生产和应用过程中产生的废水或周边土壤中通常有 DMI 稳定残留问题, 存在安全隐患。然而目前还未见有关微生物降解 DMI 方面的研究报道。

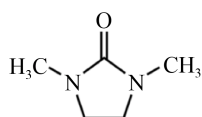


图 1 1,3-二甲基-2-咪唑烷酮的结构

Figure 1 Structure of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone

本研究从 DMI 生产企业浅层土壤中分离筛选具有 DMI 抗性的微生物菌株, 并对其菌种属性和 DMI 分解能力进行初步研究, 以期清除环境中残留的 DMI 提供优良的微生物菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

筛选耐受 DMI 微生物的土壤样品采自河北省沧州临港经济技术开发区河北康壮环保科技股份有限公司内的土壤, 采样深度为 0–20 cm。

1.1.2 培养基

筛选和培养细菌用 LB 培养基和 M9 培养基^[13], 筛选和培养真菌用 YPD 培养基^[14]。使用时按需要添加不同终浓度的 DMI。

1.1.3 主要试剂和仪器

1,3-二甲基-2-咪唑烷酮(DMI), 河北康壮环保科技股份有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PrimeSTAR Max Mix, 宝生物工程(大连)有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型), 碧云天生物技术公司; PCR 引物合成和 DNA 测序, 北京睿博兴科生物技术有限公司。多功能样品均质器, 欧姆尼有限公司; 分光光度计、气相色谱, 岛津公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 光学显微镜, 奥林巴斯(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离筛选

称取约 10 g 土壤样品置于 250 mL 灭菌的摇瓶中, 加入 50 mL 无菌水及 2 g 直径约 3 mm 的玻璃

珠, 在 30 °C、200 r/min 条件下处理 1 h, 然后静置 30 min。取上清液进行 10 倍比梯度稀释, 每个浓度梯度分别取 100 μ L 涂布到 LB 和 YPD 平板上, 30 °C 培养 72 h, 并观察记录不同稀释度的样品液在不同培养基平板上的生长情况。选择 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释度的菌液涂布到含 0.5%–5.0% (体积分数) DMI 的培养基平板上, 30 °C 培养 3–5 d。

将培养基平板上的单菌落转接于 1 mL 无菌水中, 室温静置 2 h, 然后分别接种在含 3.0%–10.0% (体积分数) DMI 的培养基平板上, 30 °C 培养 48 h, 检测不同单菌落对 DMI 的耐受性。挑取 DMI 耐受性高的单菌落在培养基平板上进行划线纯化培养。挑取单菌落于无菌水中, 做 10 倍比梯度稀释, 分别取 5 μ L 稀释度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的菌液接种到含 0–5% (体积分数) DMI 的 LB 培养基平板上, 37 °C 培养 48 h。

1.2.2 耐 DMI 微生物菌株的鉴定

细胞及菌落形态观察: 将待检测菌株在 LB 培养基平板上划线培养, 观察记录菌落形态特征。挑取少量菌体进行革兰氏染色, 光学显微镜下观察细胞形态。

芽孢形成分析: 将待检测菌株及作为阴性对照的大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和作为阳性对照的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) CGMCC1.3450 制成菌悬液, 在 80 °C 水浴中处理 20 min, 10 倍比梯度稀释后, 分别取 100 μ L 涂布在 LB 培养基平板上, 37 °C 培养 24 h。根据高温处理后细胞是否存活确定菌株产生芽孢的能力, 并通过对高温处理前后菌液的孔雀绿/番红染色进行芽孢观察。

微生物菌株的分子鉴定: 利用细菌基因组提取试剂盒提取待检测菌株的基因组 DNA, 利用 16S rRNA 基因通用引物 8F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTT ACGA-3')进行 PCR 扩增, PCR 反应体系及扩增条件参照 PrimeSTAR Max Mix 产品说明书。PCR 产物委托北京睿博兴科生物技术有限公司进行序列

测定。测序结果分别在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 EZ BioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/genome/>)上进行比对确定待测菌株的分类地位。

1.2.3 微生物对 DMI 的降解

将耐受 DMI 的菌株接种于 2 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 16 h; 按 10% (体积分数)接种量转接到 50 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h; 取 0.5 mL 菌液进行梯度稀释, 利用岛津分光光度计测定 OD_{600} , 按 OD_{600} 在 1.0 左右的稀释度计算原始菌液的浓度(OD_{600})。10 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 依据原始菌液浓度, 按最终 OD_{600} 分别为 10.0、20.0 和 50.0 的接种量转接到 2 mL 含 DMI 的 LB 培养基中, 使 DMI 的终浓度为 1% (体积分数), 37 °C、150 r/min 培养 24 h 或 36 h; 取样 0.5 mL, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清稀释 2 倍后进行 DMI 含量分析。以含 1% DMI 的 LB 培养基为对照。每个处理设 3 个重复。

1.2.4 DMI 含量检测

采用气相色谱法测定上清液中 DMI 含量。色谱柱为 GSBP-FFAP, 0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μ m; 载气为 He 气, 总流量 50 mL/min, 色谱柱流量 1 mL/min; 气化室和检测器温度均为 250 °C; 上样量为 1 μ L, 进样时间 1 min。依据峰面积变化计算样品中 DMI 含量。

DMI 降解率=(P_1-P_2)/ $P_1\times 100\%$, 式中, P_1 为同样条件下对照组的峰面积, P_2 为处理组峰面积。

1.2.5 微生物菌株 DT-1 和 DT-2 细胞提取液对 DMI 的降解

将菌株 DT-1 和 DT-2 接种于 2 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 16 h; 按 10% (体积分数)接种量转接到 50 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h。10 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)洗涤细胞 2 次, 然后以 OD_{600} 为 20.0 的终浓度将细胞重悬于 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中; 利用多功能样品均质器处理细胞悬液(3 500 r/min

30 s, 间隔 5 min, 处理 3 次), 12 000 r/min 离心 2 min 收集上清液。利用 BCA 蛋白定量试剂盒对上清液蛋白质水平进行定量。

将 DMI 和细胞提取液加入到 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中,使 DMI 终浓度为 1% (体积分数), 37 °C 反应 2 h 后, 加入反应液 50%体积的 NaOH 溶液(20 mmol/L)终止反应, 加水适当稀释, 过滤后经气相色谱检测 DMI 含量。以含 1% DMI 的磷酸钾缓冲液为对照。每个反应设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 抗 DMI 微生物菌株的分离筛选

利用含 1%–5% DMI 的 LB 和 YPD 培养基平板对土壤样品中的微生物进行初步分离筛选, 获得能够在含 3% DMI 的 LB 培养基上生长的微生物菌株(图 2A), 经 DMI 抗性复测获得 2 株最高能够耐受 5% DMI 的菌株, 划线纯化后, 所检测的单菌落均可以在含 5% DMI 的 LB 平板上生长(图 2B、2C)。相应菌株分别命名为 DT-1 和 DT-2。为了检测筛选到的菌株是否能够以 DMI 为碳源生长, 将 M9 培养基中的葡萄糖分别替换为 0.5%或 1%的 DMI, 通过固体平板培养法分析其生长情况。结果发现菌株 DT-1 和 DT-2 在 M9 培养基及含 1% DMI 的 M9 培养基平板上均能生长, 而不能在 M9 培养基的葡萄糖替换为 0.5%或 1% DMI 的培养基上生长(图 2D), 表明菌株 DT-1 和 DT-2 不能以 DMI 作为唯一碳源生长。

2.2 降解 DMI 能力分析

将菌株 DT-1 和 DT-2 以不同接种量分别接种在 DMI 终浓度为 1%的 LB 培养基中,使最终 OD_{600} 分别为 10.0、20.0 和 50.0。37 °C、150 r/min 培养 24 h 后检测培养液中的 DMI 浓度。结果发现, 在未接种微生物的对照中, 对应 DMI 的峰面积无明显变化, 表明 DMI 在该培养体系中是稳定的; 然而接种微生物的不同处理的 DMI 峰面积均有降低(图 3A), 表明分离筛选到的 2 个菌株均具有降低培养液中 DMI 浓度的能力, 其中菌株 DT-1 的效果更为显著。

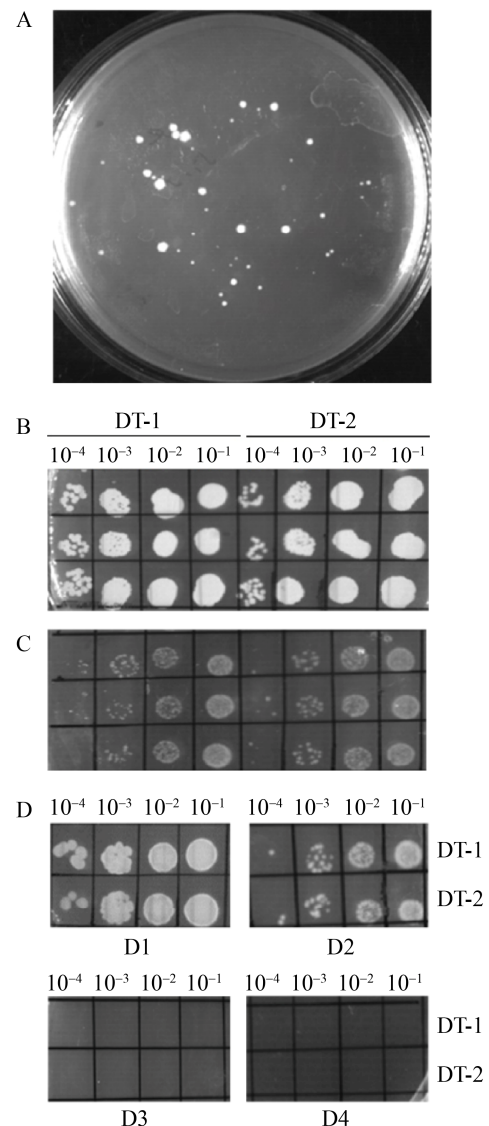


图 2 抗 DMI 菌株的分离筛选

Figure 2 Isolation and screen of DMI tolerant strains

注: A: 在含 3% (体积分数) DMI 的 LB 培养基平板上的单菌落; B: 菌株 DT-1 和 DT-2 单菌落在 LB 培养基平板上的生长; C: 菌株 DT-1 和 DT-2 单菌落在含 5% (体积分数) DMI 的 LB 培养基平板上的生长; D: 菌株 DT-1 和 DT-2 在 M9 培养基(D1)、含 1% (体积分数) DMI 的 M9 培养基(D2)、0.5% (体积分数) DMI 替换 M9 中葡萄糖的培养基(D3)、1% (体积分数) DMI 替换 M9 中葡萄糖的培养基(D4)上的生长比较

Note: A: Colonies on LB plate containing 3% (V/V) DMI; B: Growth of single colonies of strains DT-1 and DT-2 on LB plate; C: Growth of single colonies of strains DT-1 and DT-2 on LB plate containing 5% (V/V) DMI; D: Growth of strains DT-1 and DT-2 on M9 plate (D1), M9 plate containing 1% (V/V) DMI (D2), plates with replacement of glucose in M9 by 0.5% (V/V) DMI (D3) or 1% (V/V) DMI (D4) respectively

利用无细胞提取液进行体外反应检测 DMI 浓度变化,反应体系中添加不同体积的细胞提取液使蛋白质终浓度按比例递增。结果表明含 1% DMI 的磷酸钾缓冲液为对照的反应体系中 DMI 浓度无明显变化,而 2 个菌株的细胞提取液反应体系中的 DMI 浓度均有显著降低,而且降低趋势与蛋白质浓度呈正相关,随反应体系蛋白质浓度提高,DMI 降解率也提升(图 3B),进一步证明上述菌株均具有降解 DMI 的能力,而且菌株 DT-1 对 DMI 的降

解活性更高。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 形态学特征

在 LB 培养基平板上菌株 DT-1 和 DT-2 的单菌落均呈不透明状,边缘不规则,表面粗糙有隆起。液体静置培养有菌膜形成;显微镜下细胞呈长杆状,长约 2.0–2.5 μm ,宽约 0.5 μm ,革兰氏染色阳性(图 4A、4B);可形成芽孢,芽孢位于细胞的一端(图 4C、4D)。初步判断上述菌株应该属

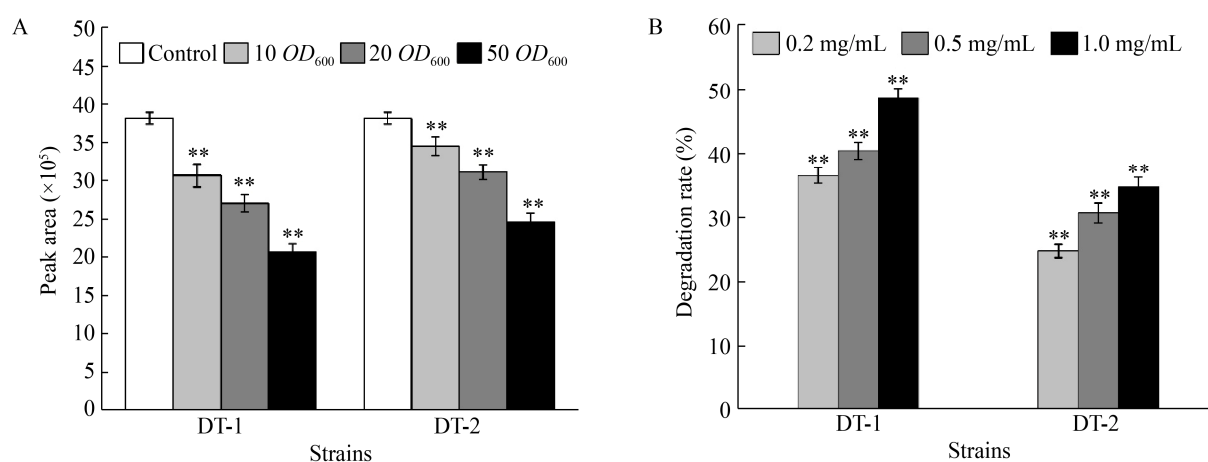


图 3 菌株 DT-1 和 DT-2 降解 DMI 能力分析

Figure 3 Analysis of DMI degrading ability of DT-1 and DT-2

注: A: 不同 OD_{600} 的全细胞培养体系; B: 不同蛋白质浓度的细胞提取液反应体系。数据为 3 次重复实验结果的平均值,误差棒为标准偏差。**: $P < 0.01$

Note: A: Culture system of whole cells with various OD_{600} ; B: Reaction system of cell-free extract with different protein concentrations. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars represent standard deviations ($n=3$). **: $P < 0.01$

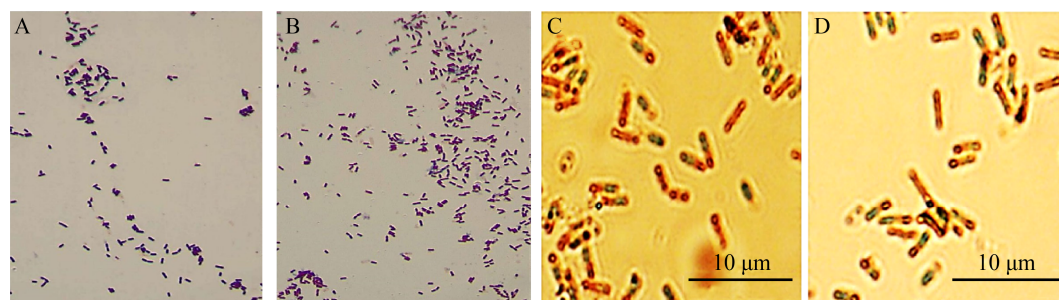


图 4 菌株 DT-1 和 DT-2 的显微形态特征

Figure 4 The microscopic features of strains DT-1 and DT-2

注: A: 菌株 DT-1 的革兰氏染色(100 \times); B: 菌株 DT-2 的革兰氏染色(100 \times); C: 菌株 DT-1 的芽孢染色; D: 菌株 DT-2 的芽孢染色

Note: A: The morphologic observation of strain DT-1 by Gram staining (100 \times); B: The morphologic observation of strain DT-2 by Gram staining (100 \times); C: The morphologic observation of strain DT-1 by spore staining; D: The morphologic observation of strain DT-2 by spore staining

于芽孢杆菌类。

2.3.2 分子生物学鉴定

利用 16S rRNA 基因通用引物 8F 和 1495R 从菌株 DT-1 和 DT-2 的基因组均扩增到约 1.4 kb 的 16S rRNA 基因片段。序列分析结果表明, 2 个菌株的 16S rRNA 基因序列完全相同, 在 NCBI 中的 BLAST 比对显示它们与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的 16S rRNA 基因序列具有最高的相似性。为了进一步明确菌株 DT-1 和 DT-2 的分类地位, 相应序列提交 EZ BioCloud 进行同源比较, 发现所测序列与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) CR-502(T)的序列具有最高的相似性, 达到 99.93%。

依据形态学及分子生物学鉴定结果初步认为菌株 DT-1 和 DT-2 均为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。由于菌株 DT-1 具有更高的 DMI 降解能力, 因此用作进一步研究。

2.4 DMI 降解条件的初步研究

2.4.1 处理时间的影响

按 OD_{600} 为 50.0 制备菌株 DT-1 的 LB 菌悬液, 加入终浓度为 1% (体积分数) 的 DMI, 处理不同时间取样分析。结果发现在 24 h 内, 处理时间和 DMI

降解率之间呈正相关, 24 h 后继续延长时间对 DMI 降解率无显著影响(图 5A)。

在蛋白质浓度为 1 mg/mL 的反应体系中考察反应时间对 DMI 降解率的影响, 结果发现, 随着反应时间延长, DMI 降解率不断提高, 反应 6 h 达到峰值(图 5B)。

2.4.2 DMI 浓度的影响

在 OD_{600} 为 50.0 的 DT-1 菌悬液中添加 DMI 使初始浓度分别为 1%、2% 和 3% (体积分数), 37 °C、150 r/min 培养不同时间取样分析 DMI 浓度。结果发现, 不同初始 DMI 浓度下菌株 DT-1 呈现出相似的降解时间曲线, 但随着 DMI 浓度升高, 菌株 DT-1 的降解活性显著降低(图 6A), 而且高浓度的 DMI 对细胞生长也产生了一定的抑制作用(图 6B), 表明高浓度 DMI 具有细胞毒效应。

3 讨论与结论

DMI 极强的稳定性和溶解性使得常规物理方法或化学方法不能有效去除, 导致 DMI 能够稳定持久残留, 具有极大的安全风险。生物修复技术可能是降解 DMI 最有效和可行的方法。鉴于目前还未见降解 DMI 相关微生物的报道, 本研究从 DMI

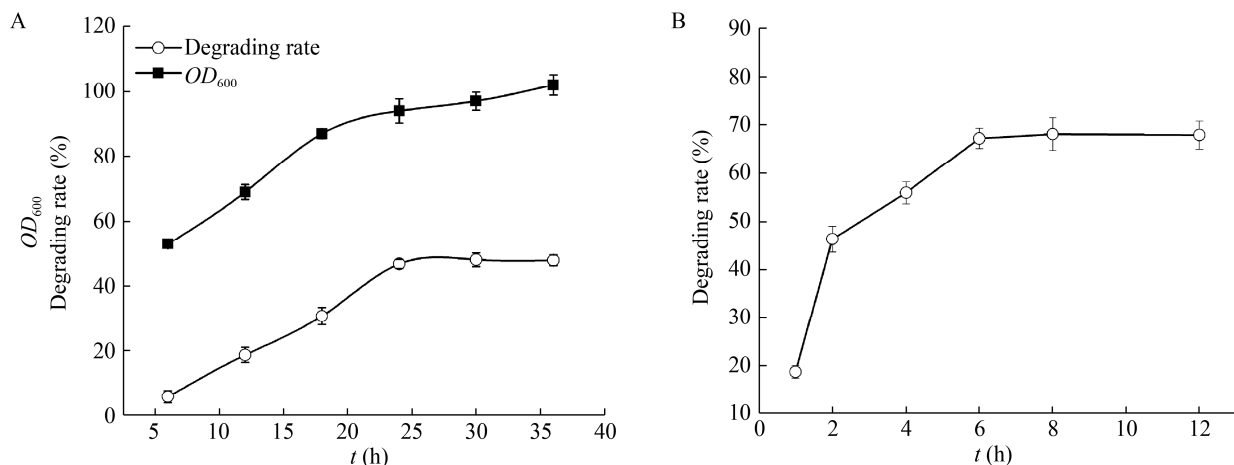


图 5 处理时间对 DMI 降解的影响

Figure 5 Influence of time on degrading rate

注: A: 全细胞培养; B: 细胞提取液反应。数据为 3 次重复实验结果的平均值, 误差棒为标准偏差

Note: A: Culture system of whole cells with OD_{600} of 50.0; B: Reaction system of cell-free extract with protein concentration of 1 mg/mL. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars represent standard deviations ($n=3$)

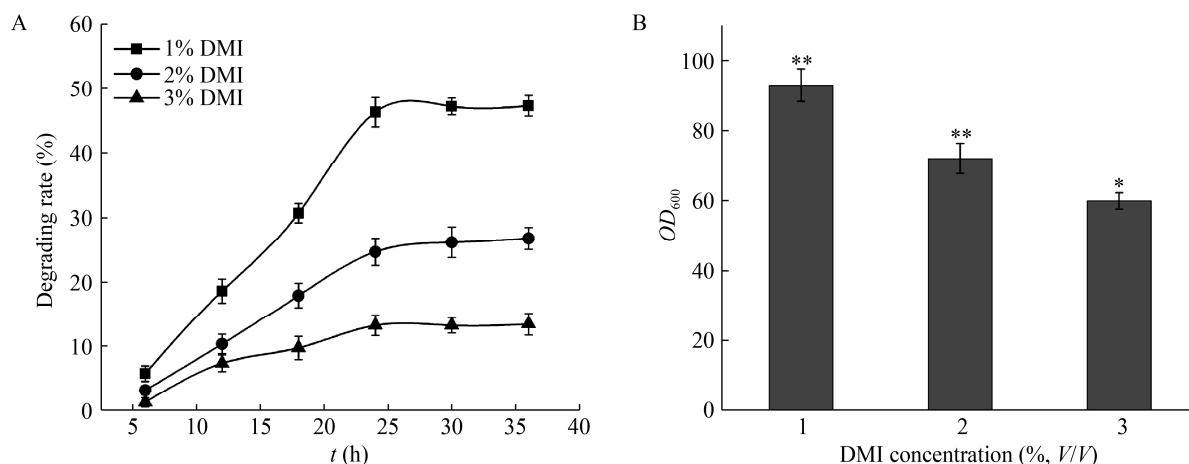


图6 DMI浓度对细胞生长和降解的影响

Figure 6 Effect of DMI concentration on cell growth and DMI degrading

注: 培养体系的初始 OD_{600} 设为 50.0。初始 DMI 浓度见图中标示。A: 降解率; B: 细胞生长。数据为 3 次重复实验结果的平均值, 误差棒为标准偏差。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Note: The initial OD_{600} of the culture system was set at 50. The initial concentrations of DMI are shown in the figure. A: Degrading rate of DMI; B: OD_{600} indicating cell growth. Data are presented as the means of the results of three independent experiments. Error bars represent standard deviations ($n=3$). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

生产企业的土壤中分离筛选到具有 DMI 降解能力的微生物菌株,通过形态学及分子生物学鉴定初步认为其为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)。贝莱斯芽孢杆菌是 2005 年由 Ruiz-García 等命名的芽孢杆菌属的一个新种,被认为是解淀粉芽孢杆菌的后期变异体^[15]。因其对多种动植物病原菌具有拮抗活性和促生长作用,被作为一种新型的生防菌广泛应用于植物病害防治及动物营养和微生态调节中^[16-19]。此外,研究表明贝莱斯芽孢杆菌还具有降解黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮等真菌毒素的功能^[20]。本研究获得了具有 DMI 降解活性的芽孢杆菌,为通过微生物降解修复治理受 DMI 污染的环境提供了基础微生物资源。作为强极性非质子溶剂,DMI 可能引起膜损伤,并通过亲核、氧化和还原等反应影响细胞内在反应活性^[11],从而对细菌产生一定的毒性。我们将进一步通过菌种改造提升对 DMI 的抗性和降解能力,并明确降解 DMI 的芽孢杆菌的准确分类地位,丰富对此类微生物生物学功能的认识。

当 DMI 浓度为 1% (体积分数)时,菌株 DT-1

全细胞反应体系的降解率达到 48%,无细胞提取液的反应体系降解率达到 68%。DMI 具有与尿囊素相似的核心骨架,推测参与尿囊素降解反应的酶可能在 DMI 降解转化中发挥作用,从而将 DMI 转化为乙醛酸、甲胺和 CO_2 。其中,乙醛酸和 CO_2 可通过糖异生和羧化反应作为碳源支撑微生物的生长和代谢,而甲胺可作为微生物生长和代谢的氮源,从而实现 DMI 的完全降解。本研究获得的降解 DMI 芽孢杆菌是利用内在的尿囊素降解系统促进 DMI 的降解还是具有特异性的 DMI 降解酶系,有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Kumar BL, Gopal DVRS. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment[J]. 3 Biotech, 2015, 5(6): 867-876
- [2] Bai R, Hu Y, Lei ZY, Wang XX, Yang M, Huang YY. Application of compound microbial preparation in environmental protection[J]. Applied Chemical Industry, 2017, 46(5): 1002-1006 (in Chinese)
白瑞, 胡阳, 雷振宇, 王晓雪, 杨茗, 黄瑶瑶. 复合微生物制剂在环保领域中的应用[J]. 应用化工, 2017, 46(5): 1002-1006
- [3] Huang X, He J, Yan X, Hong Q, Chen K, He Q, Zhang L,

- Liu XW, Chuang SC, Li SP, et al. Microbial catabolism of chemical herbicides: microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2017, 143: 272-297
- [4] Ruan ZP, Xu XH, Chen K, Qiao WJ, Jiang JD. Recent advances in microbial catabolism of persistent organic pollutants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(12): 2763-2784 (in Chinese)
阮哲璞, 徐希辉, 陈凯, 乔文静, 蒋建东. 微生物降解持久性有机污染物的研究进展与展望[J]. 微生物学报, 2020, 60(12): 2763-2784
- [5] Heimann AC, Batstone DJ, Jakobsen R. *Methanosarcina* spp. drive vinyl chloride dechlorination via interspecies hydrogen transfer[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2942-2949
- [6] Deng DY, Guo J, Sun GP, Chen XJ, Men DQ, Xu MY. Aerobic debromination of deca-BDE: isolation and characterization of an indigenous isolate from a PBDE contaminated sediment[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(3): 465-469
- [7] Nzila A. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria[J]. Environmental Pollution, 2013, 178: 474-482
- [8] Mizukami-Murata S, Sakakibara F, De Fujita K, Fukuda M, Kuramata M, Takagi K. Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil[J]. Chemosphere, 2016, 165: 173-182
- [9] Gao B, Liu WB, Jia LY, Xu L, Xie J. Isolation and characterization of an *Alcaligenes* sp. strain DG-5 capable of degrading DDTs under aerobic conditions[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2011, 46(3): 257-263
- [10] Xing CH, Cai MZ, Yu HB. The application of EM (effective microorganisms) technology in environment protection[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 93-97 (in Chinese)
邢承华, 蔡妙珍, 于洪波. EM 有效微生物技术在环境保护中的应用[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 93-97
- [11] Zhou XF, Tong GT, Mao WC. Improvement for synthesis of 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone[J]. Chemical Reagents, 2013, 35(10): 954-956 (in Chinese)
周小锋, 童国通, 毛伟春. 1,3-二甲基-2-咪唑烷酮合成方法的改进[J]. 化学试剂, 2013, 35(10): 954-956
- [12] Liu AM, Guo MX, Shi ZN, Liu YB, Liu FG, Hu XW, Yang YJ, Tao WJ, Wang ZW. Physicochemical properties of 1,3-dimethyl-2-imidazolinone-ZnCl₂ solvated ionic liquid and its application in zinc electrodeposition[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2021, 31(3): 832-841
- [13] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [14] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T. Methods In Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual[M]. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997
- [15] Zhang DF, Gao YX, Wang YJ, Liu C, Shi CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese)
张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649
- [16] Zhang Q, Sherzad Z, Tang CM. Biocontrol effect of *Bacillus velezensis* strain SZAD1 on *Verticillium dahliae*[J]. Cotton Science, 2020, 32(4): 329-338 (in Chinese)
张琼, Zabihullah Sherzad, 唐灿明. 贝莱斯芽孢杆菌 SZAD1 对大丽轮枝菌的生物防治效果[J]. 棉花学报, 2020, 32(4): 329-338
- [17] Cui WH, Chui CM, Sun X, Wei D, Li BG, Liu L. Bacteriostatic effects of *Bacillus velezensis* on soil borne diseases of fruits and vegetables[J]. Industrial Microbiology, 2020, 50(5): 15-20 (in Chinese)
崔文会, 炊春萌, 孙雪, 魏东, 李保国, 刘莉. 贝莱斯芽孢杆菌对果蔬土传病害的抑菌效果研究[J]. 工业微生物, 2020, 50(5): 15-20
- [18] Liu SN, Zhang B, Xiang DC, Zhao ZY, Chang YJ, Sha Q, Zhao YG. Effects of *Bacillus velezensis* on growth performance, fecal microbiota and metabolites in pigs[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(12): 5622-5635 (in Chinese)
刘韶娜, 张斌, 相德才, 赵智勇, 常雅洁, 沙茜, 赵彦光. 贝莱斯芽孢杆菌对猪生长性能、微生物群落和代谢产物的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(12): 5622-5635
- [19] Ren JW, Luo YY, Feng YY, Han M, An H, Cui CB, Zhang JT, Li B, Yang Y, An DR. Isolation and identification of *Bacillus velezensis* RJW-5-5 and gene cluster mining of bacteriocin and RiPPs[J]. Microbiology China, 2021, 48(3): 742-754 (in Chinese)
任建雯, 罗云艳, 冯印印, 韩猛, 安航, 崔传斌, 张家韬, 李斌, 杨洋, 安德荣. 贝莱斯芽孢杆菌 RJW-5-5 的分离鉴定及细菌素、抗菌肽基因簇挖掘[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 742-754
- [20] Wang MQ, Zhang CS, Yu LN, Gu B, Ding Y, Bi J, Sun J, Chi XY, Zhang JC, Gong KJ, et al. Screening and identification of aflatoxin B₁ degradation strain[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(1): 105-109 (in Chinese)
王明清, 张初署, 于丽娜, 顾博, 丁昱, 毕洁, 孙杰, 迟晓元, 张建成, 龚魁杰, 等. 一株黄曲霉毒素 B₁ 降解菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 105-109