

# 基于生物反应器探究制药废水中活的但非可培养状态细菌的组成

金夷<sup>1</sup>, 周小玲<sup>2</sup>, 翟竞余<sup>2</sup>, 蒋涛<sup>6</sup>, 李裕如<sup>6</sup>, 梅荣武<sup>6</sup>, 奚雯翼<sup>3</sup>, 蔡嫣然<sup>3</sup>, 王方园<sup>2</sup>, 横田明<sup>2,4</sup>, 张立新<sup>5\*</sup>, 丁林贤<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004; 2. 浙江师范大学地理与环境科学学院, 浙江金华 321004; 3. 浙江师范大学行知学院, 浙江金华 321004; 4. 日本东京大学分子细胞生物学研究所, 东京 113-0032; 5. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 6. 浙江省环境保护科学设计研究院, 浙江杭州 310007)

**摘要** [目的] 探究制药废水中活的但非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态细菌的组成与系统关系。[方法] 利用土质滤材构建生物反应器, 基于复苏促进因子(resuscitation promoting factor, Rpf)对VBNC细菌的复苏刺激生长作用, 采用MPN(most probable number)法, 稀释平板法分离其中复苏可培养化的VBNC菌株并解析其16S rRNA基因系统关系。[结果] 在MPN培养系中, Rpf对部分细菌有生长刺激作用。制药废水中存在对Rpf敏感、复苏可培养化的VBNC优势菌群; 制药废水中对Rpf敏感的VBNC优势细菌主要有革兰氏阳性放线菌 *Microbacterium*、*Gordonia* 和 *Leucobacter* 属近缘菌, 革兰氏阴性菌 *Candidimonas*、*Xanthobacter* 和 *Aminobacter* 属近缘菌, 其中菌株 ZYM1、ZYM3、ZYR4 和 ZYXR1 可能属于新种。[结论] 研究结果揭示了制药废水中存在VBNC状态细菌, 为研究其形成机理、复苏活性化机制以及制药废水的深度处理等提供重要的思路与方法。

**关键词** 制药废水; 生物反应器; VBNC菌; Rpf; 16S rRNA基因序列系统关系

**中图分类号** S181.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)11-3156-04

## Explore Viable but Non-culturable Bacteria in Pharmaceutical Wastewater Based on Bioreactor

JIN Yi, DING Lin-xian, ZHANG Li-xin et al (College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004; College of Geography and Environmental Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004; Environmental Science Research and Design Institute of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310007)

**Abstract** [Objective] To investigate the composition and phylogenetic relationship of viable but non-culturable bacteria in pharmaceutical wastewater. [Method] Applied soil filter to build the bioreactor, then used resuscitation promoting factor (Rpf) which promoted the resuscitation and growth of VBNC bacteria, combined with most probable number (MPN) method and dilution plating to isolate the VBNC bacteria and analyzed 16S rRNA gene phylogenetic relationship. [Result] In MPN culture system, Rpf could promote the resuscitation and growth of some bacteria. There were VBNC advantage floras that sensitive to Rpf in pharmaceutical wastewater. The major culturable VBNC bacteria in pharmaceutical wastewater belonged to the high GC gram positive actinomycetes including genera *Microbacterium*, *Gordonia* and *Leucobacter*, and negative bacteria including genera *Candidimonas*, *Xanthobacter*, *Aminobacter*. There were 4 strains ZYM1, ZYM3, ZYR4 and ZYXR1 could be potential novel species. [Conclusion] This research revealed there were VBNC bacteria in pharmaceutical wastewater. These results can provide important ideas and methods for further study on VBNC bacteria of the pharmaceutical wastewater, especially the formation mechanism and recovery mechanism of VBNC bacteria and the advanced degradation process improvement of pharmaceutical wastewater.

**Key words** Pharmaceutical wastewater; Bioreactor; VBNC bacteria; Rpf; 16S rRNA phylogenetic relationship

近几十年来,随着人类对药品需求量的快速增长,制药行业的迅猛发展导致了大量混合制药废水的排放。制药废水中含有高浓度的悬浮物、盐、难溶化合物、毒性物质、有机和无机物等,且化学需氧量高,化学法与物理法都难处深度处理制药废水<sup>[1]</sup>,所以高效微生物处理技术已成为研究热点。利用传统的微生物培养技术从环境中能分离培养的微生物只占总数的0.01%~10.00%<sup>[2]</sup>,其他为未培养或活的但非可培养(viable but nonculturable, VBNC)状态细菌,表明环境中绝大部分微生物尚处于未知状态。

自从1982年Xu等首次发现在环境中发现生存但不可培养的霍乱弧菌和大肠杆菌后,至今国内外已有大量文献报道了VBNC菌的相关内容<sup>[3]</sup>。细菌由于多种因素导致进入VBNC状态,且仍具有生物活性但用常规培养法无法检出,在一定条件下可以复苏并保持原有功能<sup>[4]</sup>。1998年Mukamolova等报道了藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)分泌的一种蛋白质能使该菌以及近缘的分枝杆菌(*Mycobacterium*)属的一些处于

VBNC状态的细胞复苏成为可培养化,这种蛋白质被命名为复苏促进因子Rpf(resuscitation promoting factor)<sup>[5]</sup>。已有研究表明,Rpf能复苏刺激大量革兰氏阳性菌的生长,包括 *Mycobacterium*、*Rhodococcus*、*Arthrobacter*、*Leifsonia*、*Bacillus*、*Nocardia*、*Kitasatospora*、*Streptomyces* 和 *Paenibacillus* 属的细菌<sup>[2-6]</sup>。丁林贤等研究表明,Rpf对难培养微好氧贫营养革兰氏阴性菌 *Curvibacter fontanus* 具有良好的促进生长的功能<sup>[7]</sup>。目前,对于Rpf及VBNC菌的研究主要集中在医学、流行病学、病原菌分子遗传学等,其他领域尚少见有报道。2013年苏等综述了丁等人在近10年对于VBNC细菌以及在环境治理与修复中所起潜在功能的研究,揭示了Rpf对挖掘环境微生物资源的特殊利用价值<sup>[8-9]</sup>。笔者从微生物学角度深入研究污水处理系统中VBNC菌体的形成机理,以期挖掘Rpf及其VBNC微生物资源的可利用性等提供重要的研究思路与理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 研究对象。** 制药废水,采集于浙江省某制药公司经前处理的废水,经生物反应器(串联多塔式)连续流运行30、61、183和361 d,分别从生物反应器最初出水段三点取样共

**基金项目** 浙江省自然科学基金(LY13C010002);浙江省环境保护科学设计研究院(2013F50005)。

**作者简介** 金夷(1989-),女,浙江金华人,硕士研究生,研究方向:环境资源微生物研究。\*通讯作者。

**收稿日期** 2014-03-04

取 3 g(折算为干重)至灭菌的 100 ml 锥形瓶中,加入 27 ml 灭菌蒸馏水搅拌 20 min 均匀制成悬液待用。

**1.1.2 试验菌种。**藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* IAM 14879 (= NCIMB 13267),由东京大学分子细胞生物学研究所国际菌种保藏中心提供。依据研究介绍的方法制备 *M. luteus* 的 DNA,确定 *rpf* 基因并在大肠杆菌中表达。*rpf* 基因阳性菌的培养液离心经 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤,作为含 Rpf 的试验处理组添加材料<sup>[6]</sup>。

**1.1.3 主要仪器。**PCR 反应扩增仪(TP600),购自日本 Takara 公司;凝胶成像系统(GelDoc-It),购自美国 UVP 公司;酶标仪(1510),购自美国 Thermo 公司。

**1.1.4 主要试剂。**UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 16S rRNA 基因 PCR 扩增所用酶、引物和试剂,均购于上海生工生物工程有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 培养基的制备。**MPN 培养系液体培养基为反硝化细菌培养基,其组成为(g/L):  $\text{KNO}_3$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g, 酒石酸钾钠 20.0 g, pH 7.2, 121  $^\circ\text{C}$ , 15 min 高压灭菌。MPN 培养系分离纯化用 PYM 培养基组成(g/L): 蛋白胨 5.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g, 酵母膏 3.0 g, 琼脂 20.0 g, pH 7.0~7.2, 121  $^\circ\text{C}$ , 15 min 高压灭菌。

**1.2.2 MPN 法和 MPN 培养系。**利用 MPN 法<sup>[10]</sup>和 MPN 培养系数计数样品可培养细菌总数。以 2.5~5.0 ml 透明玻璃瓶作为培养容器,添加浓度 10% 含 Rpf 制备液至液体培养基中作为处理组,以添加等量不含 Rpf 制备液作为对照组,将以浓度 10% 的样品悬液,以 10 倍浓度梯度稀释到  $10^{-6}$ , 每组重复 3 次, 30  $^\circ\text{C}$  静置培养。根据培养时间测定处理组与对照组吸光值的变化( $OD_{660}$ ),并以  $OD_{660}$  值以及肉眼判断,记录处理组与对照组培养液的浑浊情况,浑浊为阳性,不浑浊为阴性。利用 MPN 表查出 MPN 值对应的处理组与对照组中的细菌总数。

**1.2.3 Rpf 阈值与 VBNC 状态菌的判断。**以处理组与对照组 MPN 值分别对应的细菌总数之比作为 Rpf 阈值  $V_R$ 。当  $V_R > 5$  时(95% 置信度),处理组的最前方某稀释段培养液浑浊(阳性),而对照组与之相同稀释段为不浑浊(阴性)时,处理组浑浊培养液经稀释平板分离,纯化所得的菌为单位样品中总数处于优势的 VBNC 状态菌。当  $5 > V_R \geq 1$  时,处理组与对照组最前端浑浊的培养液分别进行稀释平板分离,判断对照组与处理组菌落形态特征的差异,认为处理组中特有的特征性菌落为 Rpf 敏感的 VBNC 菌。

**1.2.4 菌株分离纯化与保存。**经 3~10 d 静置培养并视 MPN 值趋于稳定时,将处理组与对照组中最前端呈浑浊的培养液稀释,利用平板分离法筛选、纯化获得相应的可培养化细菌。将纯化的细菌扩大培养用于细菌鉴定,以及添加 10% 的甘油做成冷冻甘油管在 -80  $^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.5 分离菌株 16S rRNA 基因序列与系统发育树的构建。**可培养化 VBNC 菌株的 DNA 提取按照生工 UNIQ-10 柱式细

菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行;PCR 扩增采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 7f (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1540r (5'-AGGAGGTGATCC AGCCGCA-3')。PCR 反应条件为:94  $^\circ\text{C}$  5 min;94  $^\circ\text{C}$  30 s,55  $^\circ\text{C}$  35 s,72  $^\circ\text{C}$  1 min,35 个循环;72  $^\circ\text{C}$  8 min,4  $^\circ\text{C}$  保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,根据结果切割所需 DNA 目的条带,用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收,PCR 纯化产物送上海生工生物工程有限公司测序。测序所得菌株 16S rRNA 基因序列结果在 DDBJ 登录取得菌株登录号码,在国际基因库 NCBI 和 EzTaxon server 中进行序列同源性检索,挑选同源性高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列为参比菌种,利用 MEGA 5,按照 Neighbor-Joining 法聚类,构建系统发育树。

## 2 结果与分析

**2.1 MPN 培养系中 MPN 值与样品细菌总数** 从制药废水连续流生物反应器中取样 4 次,MPN 培养系中处理组与对照组的 MPN 值与每克样品中的细菌总数见表 1,通过 VBNC 的复活率证实制药废水中存在利用一般培养基不能检出,但添加 Rpf 后对其敏感能复苏生长成为可培养化的 VBNC 状态细菌。

表 1 MPN 培养系中处理组与对照组的细菌总数及 VBNC 状态菌复活率

反应器运行时间//d	MPN <sup>*1</sup> 值	处理组细菌总数	MPN 值	对照组细菌总数	VBNC 菌复活率 <sup>*2</sup> %
30	3,3,2	$2.4 \times 10^7$	3,2,1	$1.5 \times 10^6$	93.8
61	3,3,3	$2.4 \times 10^8$	3,1,0	$4.3 \times 10^6$	98.2
183	3,3,3	$2.4 \times 10^8$	3,3,2	$1.1 \times 10^8$	54.2
361	3,3,1	$4.6 \times 10^7$	3,3,0	$2.4 \times 10^7$	47.8

注: \*1 为 MPN 值 3,3,3 分别表示为:第 3 个 3 表示试验重复 3 次最先端浑浊稀释段的 3 管全部浑浊,第 2 个 3 表示最先端浑浊段退后一档稀释段的 3 管全部浑浊,第 1 个 3 表示最先端浑浊段退后二档 3 管全部浑浊,并以第 1 个 3 表示的稀释段作为稀释倍数计数,以此类推。\*2 为 VBNC 菌复活率 = (处理组细菌总数 - 对照组细菌总数) / 处理组细菌总数  $\times 100$ 。

**2.2 Rpf 阈值及其培养液  $OD_{660}$  值的变化** 反应器运行 30、61、183 和 361 d 所取样构建的 MPN 培养体系的 Rpf 阈值  $V_R$  分别为 16.0,55.8,2.2 和 1.9,表明制药废水生物反应器中,取样点单位样品中存在对 Rpf 敏感的 VBNC 优势菌群。图 1 表明,培养系中各稀释段培养液的  $OD_{660}$  值,处理组均大于对照组,表明 Rpf 对培养系中的细菌有生长促进作用。

**2.3 分离菌株的 16S rRNA 基因序列同源性**与系统树构建 分离纯化菌种经测序后,利用国际基因库 NCBI 和 EzTaxon server 进行序列同源性检索,各分离菌株的检索结果见表 2。处理组中分离到的菌株类型更为丰富,其中 *Candidimonas*、*Microbacterium*、*Gordonia*、*Aminobacter*、*Xanthobacter* 和 *Leucobacter* 属的近缘菌 ZYM1、ZYM3、ZYZR2、ZYZR4、ZYR1、ZYR2、ZYR3 和 ZYXR1 在对照组同等数量级培养液中未发现,因而这些细菌可视为经 Rpf 复苏生长促进作用成为可培养化的 VBNC 细菌。

4 个阶段所分离的 17 株细菌属于 *Proteobacteria* 门和 *Actinobacteria* 门的两大系统发育类群,包含了高 GC 的革兰氏阳性菌的放线菌和革兰氏阴性菌,共 7 个科 10 个属,挑选同

源性高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列为参比菌株,构建的系统发育树见图 2。

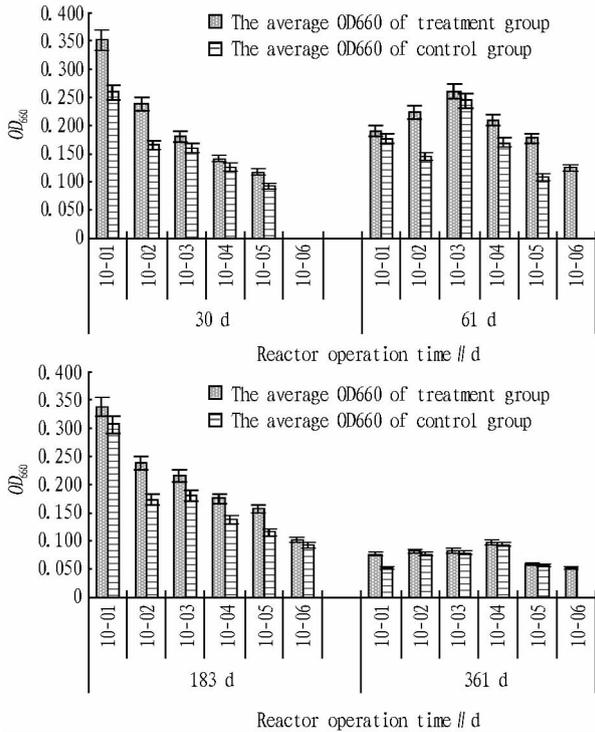


图 1 反应器运行 30、61、183 和 361 d 4 组 MPN 培养系中处理组与对照组的平均吸光值比较

**2.4 新种水平菌株的 16S rRNA 基因系统关系解析** 细菌多相分类学鉴定程序中,16S rRNA 基因序列相似性在 97% (或 98%) 以下一般认为有可能是新种。17 株分离菌株中发现菌株 ZYM1、ZYM3、ZYZR4、ZYYR1、ZYYNR1 和 ZYXR1 与已知近缘菌的同源性较低,可能有存在较大的遗传差异。特别是 ZYM1、ZYM3、ZYZR4 和 ZYXR1 这 4 株细菌构建系统树分析后发现极可能代表新的分类单元。菌株 ZYM1 的最近近缘标准菌是 *Candidimonas nitroreducens* SC-089<sup>T</sup> (FN556191), 序列相似性为 97.8%, 菌株 ZYM3 的最近标准菌也是 *Candidimonas nitroreducens* SC-089<sup>T</sup> (FN556191), 序列相似性为 97.4%, 但从系统树(图 2)中发现菌株 ZYM1、ZYM3 与 *Pusillimonas terrae* AS85<sup>T</sup> (AB727962) 离得最近, 且这 3 株菌单独构成了一个进化分支, 表明菌株 ZYM1 和 ZYM3 是新种的概率很高。菌株 ZYZR4 的最近标准菌是 *Gordonia otitidis* IFM 10032<sup>T</sup> (AB122026), 序列相似性为 96.6%, 且在系统树单独形成进化分支, 差异性显著达新种水平。菌株 ZYXR1 的最近标准菌是 *Leucobacter aridicollis* CIP 108388<sup>T</sup> (AJ781047), 序列相似性为 97.3%, 但从系统发育树中发现菌株 ZYXR1 单独形成进化分支, 有可能是 *Leucobacter* 属下的一个新种。对于分离到的这 4 株可培养化 VBNC 菌株我们将从多相分类学角度综合它们的形态特征、生理生化、化学分类和相关参比菌株的 DND-DNA 同源性以及其他关联基因等进化关系分析进行进一步的探讨。

表 2 分离菌株的 16S rRNA 基因序列同源性

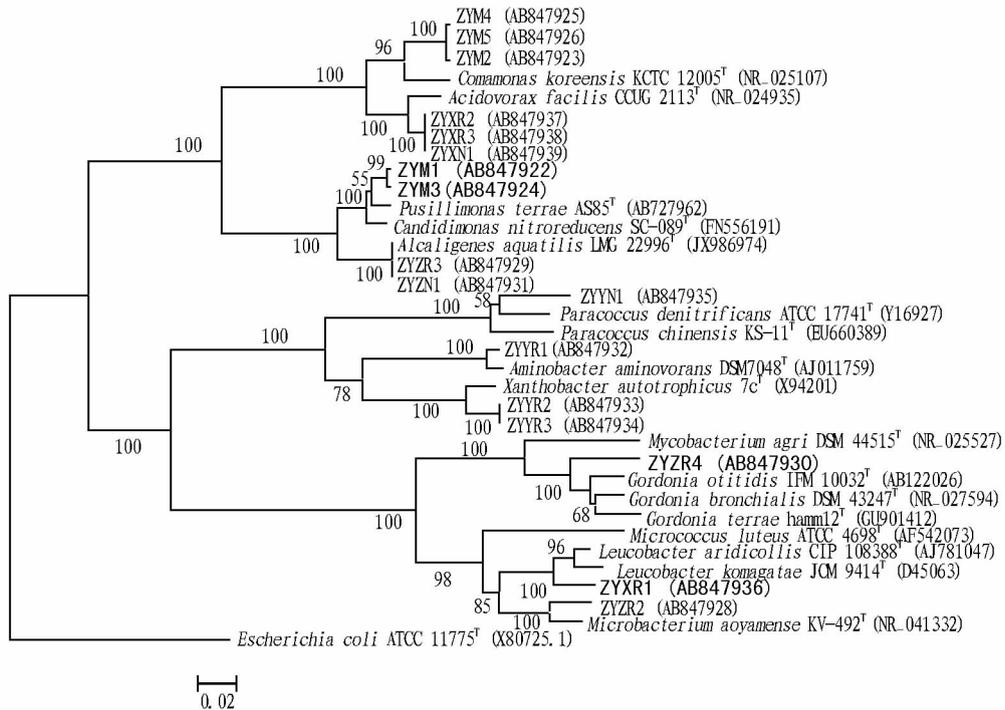
反应器运行时间//d	分离菌株编号(登入号)	最近形态菌(登入号)	同源性//%
30	<b>ZYM1 (AB847922)</b>	<i>Candidimonas nitroreducens</i> SC-089 <sup>T</sup> (FN556191)	97.8
	<b>ZYM2 (AB847923)</b>	<i>Comamonas thiooxydans</i> S23 <sup>T</sup> (DQ322069)	100.0
	<b>ZYM3 (AB847924)</b>	<i>Candidimonas nitroreducens</i> SC-089 <sup>T</sup> (FN556191)	97.4
	ZYM4 (AB847925)	<i>Comamonas thiooxydans</i> S23 <sup>T</sup> (DQ322069)	99.9
	ZYM5 (AB847926)	<i>Comamonas thiooxydans</i> S23 <sup>T</sup> (DQ322069)	99.9
61	<b>ZYZR2 (AB847928)</b>	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i> DCY37 <sup>T</sup> (EU873314)	99.2
	<b>ZYZR3 (AB847929)</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM12369 <sup>T</sup> (D88008)	99.2
	<b>ZYZR4 (AB847930)</b>	<i>Gordonia otitidis</i> IFM 10032 <sup>T</sup> (AB122026)	96.6
	ZYZN1 (AB847931)	<i>Alcaligenes faecalis</i> IAM12369 <sup>T</sup> (D88008)	99.4
183	<b>ZYYR1 (AB847932)</b>	<i>Aminobacter aminovorans</i> DSM 7048 <sup>T</sup> (AJ011759)	98.8
	<b>ZYYR2 (AB847933)</b>	<i>Xanthobacter flavus</i> 301 <sup>T</sup> (X94199)	99.9
	<b>ZYYR3 (AB847934)</b>	<i>Xanthobacter flavus</i> 301 <sup>T</sup> (X94199)	99.9
	ZYYN1 (AB847935)	<i>Paracoccus sphaerophysae</i> Zy-3 <sup>T</sup> (GU129567)	98.9
361	<b>ZYXR1 (AB847936)</b>	<i>Leucobacter aridicollis</i> CIP 108388 <sup>T</sup> (AJ781047)	97.3
	<b>ZYXR2 (AB847937)</b>	<i>Acidovorax temperans</i> CCUG 11779 <sup>T</sup> (AF078766)	99.7
	<b>ZYXR3 (AB847938)</b>	<i>Acidovorax temperans</i> CCUG 11779 <sup>T</sup> (AF078766)	99.7
	ZYXN1 (AB847939)	<i>Acidovorax temperans</i> CCUG 11779 <sup>T</sup> (AF078766)	99.7

注:加粗细菌为处理组中分离所得,其余为对照组中分离所得。

### 3 结论与讨论

研究报道了在土壤与城市污水处理系统中发现基于 Rpf 复苏可培养化近缘的放线菌,具有较强的硝化反硝化、生物除臭功能以及利用 Rpf 分离到的 VBNC 菌具有较强的生物絮凝作用<sup>[11-12]</sup>。苏等报导了从研究电器和电子废物的多氯联苯 PCBs 降解过程中发现活化的 VBNC 优势菌能使 PCBs

达到近乎 100% 的降解效果,揭示了 Rpf 与 VBNC 资源菌种的实际应用价值<sup>[9]</sup>。试验对可培养化 VBNC 优势菌种 ZYM1、ZYM3、ZYZR2、ZYZR4、ZYYR1、ZYYR2、ZYYR3 和 ZYXR1 的已知近缘菌种的功能进行了资料检索分析,推测其可能具有的潜在环境功能。除了菌株 ZYM1 和 ZYM3 的近缘菌在国内外尚未见有相关环境功能的报道外,菌株



注:节点处的数值是基于邻接法分析 1 000 次的自展值,只有高于 50% 的在图中显示。

图 2 基于 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建的分离菌株系统发育树

ZYXR2、ZYZR4、ZYYR1、ZYYR2、ZYYR3 和 ZYXR1 的近缘菌种对于制药废水中存在的木质素、酚类化合物、纤维素、卤代甲烷、菲、芘、萘、二苯并噻吩、甲基氯、乙烯等都有较强的降解功能,并且对于一些难降解农药甲胺磷及其他一些环境污染物都表现出了可观的降解作用<sup>[12-14]</sup>,对此试验将在以后的 VBNC 菌种的形成机理、潜在机能等探索试验中予以深入研究。基于生物反应器利用 Rpf 从制药废水中分离出 VBNC 菌株为深入研究与重新认识环境生态中微生物复合群集组成,形成机理,复苏活性化机制,直接获得微生物菌种资源以及类似难降解制药废水深度降解工程工艺的改进等研究提供重要的思路与方法。

#### 参考文献

- [1] CHELLIAPAN S, WILBY T, YUZIR A, et al. Influence of organic loading on the performance and microbial community structure of an anaerobic stage reactor treating pharmaceutical wastewater [J]. Desalination, 2011, 271(1): 257-264.
- [2] 丁林贤, 苏晓梅, 横田明. 活的但非可培养 (VBNC) 状态菌的研究进展 [J]. 微生物学报, 2011, 51(7): 858-862.
- [3] XU H S, ROBERTS N, SINGLETON F, et al. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment [J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313-323.
- [4] SERPAGGI V, REMIZE F, RECORBET G, et al. Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces* [J]. Food Microbiology, 2012, 30(2): 438-447.
- [5] MUKAMOLOVA G V, KAPRELYANTS A S, YOUNG D I, et al. A bacterial

- cytokine [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(15): 8916-8921.
- [6] 丁林贤, 张萍华, 洪华婷, 等. 藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白的制取及其对红球菌 VBNC 菌体的复苏作用 [J]. 微生物学报, 2012, 52(1): 77-82.
- [7] DING L, YOKOTA A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2010, 56(3): 267-271.
- [8] SU X, CHEN X, HU J, et al. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(12): 2213-2218.
- [9] SU X, DING L, HU J, et al. A novel approach to stimulate the biphenyl-degrading potential of bacterial community from PCBs-contaminated soil of e-waste recycling sites [J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 2-34.
- [10] FEGAN N, HIGGS G, VANDERLINDE P, et al. Enumeration of *Escherichia coli* O157 in cattle faeces using most probable number technique and automated immunomagnetic separation [J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38(1): 56-59.
- [11] SU X, SHEN X, DING L, et al. Study on the flocculability of the *Arthrobacter* sp., an actinomycete resuscitated from the VBNC state [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 91-97.
- [12] CÁ CERES T P, MEGHARAJ M, MALIK S, et al. Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. in pure culture and groundwater [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(10): 2732-2736.
- [13] FELFÖLDI T, SZÉKELY A J, GOR? L R, et al. Polyphasic bacterial community analysis of an aerobic activated sludge removing phenols and thiocyanate from coke plant effluent [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(10): 3406-3414.
- [14] WARNER K L, LARKIN M J, HARPER D B, et al. Analysis of genes involved in methyl halide degradation in *Aminobacter lissarensis* CC495 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 251(1): 45-51.