

降解水源水中有机物的优势菌筛选及其特性

张多英^{1,2}, 李伟光³, 刘苗¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨, duo0314@163.com; 2. 黑龙江东方学院 食品与环境工程学部, 150086 哈尔滨; 3. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨)

摘 要: 为解决活性炭生物增强技术(BEAC)应用过程中接种高活性菌群稳定性差的问题, 必须分离出既具有有机物降解能力, 又具有种群竞争能力的菌株. 应用变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(DGGE)技术, 分析 BAC 滤池优势菌群结构, 结果表明, 有 4 种细菌占优势地位, 其中 2 种可降解有机污染物, 分别为 *Pseudomonas* sp. 和 *Bacillus subtilis*. 而从长期运行的普通生物活性炭(BAC)滤池中分离出 35 株细菌. 针对 BAC 滤池中的优势菌设计探针, 应用荧光原位杂交(FISH)技术快速鉴别优势菌. 结果分离菌株中仅 5 株细菌的种属与优势菌一致, 分别为 SRO 2 施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、SRO 11 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、SRO 19 穿孔假单胞菌(*Pseudomonas pertucinogena*)、SRO 20 巴利阿里假单胞菌(*Pseudomonas balearica*)、SRO 30 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*). 有机物降解试验表明, 该 5 株菌均具有有机物降解能力. 测定脱氢酶活性以确定优势菌的生物活性, 结果表明, 该 5 株菌的脱氢酶活性高于其他菌株. 可为 BEAC 长期稳定运行提供菌种资源.

关键词: 活性炭生物增强技术; 优势菌; 变性梯度凝胶电泳; 荧光原位杂交; 脱氢酶活性

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2011)08-0044-06

Isolation and characterization of bacteria with biodegradability of organic pollutants in surface water

ZHANG Duo-ying^{1,2}, LI Wei-guang³, LIU Miao¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China, duo0314@163.com; 2. Department of Food Science and Environment Engineering, East Collage, 150086 Harbin, China; 3. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China)

Abstract: During bioenhanced activated carbon (BEAC) process, the inoculated bacterial communities are dynamic. For solving this problem, bacteria with biodegradability and competitive power must be isolated. DGGE profiles of BAC filter indicated that there were 4 dominant bacteria, and 2 of them could degrade organic pollutants, which were *Pseudomonas* sp. and *Bacillus subtilis*. Thirty five bacteria were isolated from BAC filter using LB medium. Target probe of *Pseudomonas* sp. and *Bacillus subtilis* were designed for testing dominant bacteria quickly. After fluorescence in situ hybridization (FISH), 5 dominant bacteria were identified and they were SRO 2 (*Pseudomonas stutzeri*), SRO 11 (*Pseudomonas putida*), SRO 19 (*Pseudomonas pertucinogena*), SRO 20 (*Pseudomonas balearica*) and SRO 30 (*Bacillus subtilis*), respectively. The biodegradation test of organic pollutants in Songhuajiang water showed that the 5 bacteria could degrade organic pollutants. Dehydrogenase activities in these 5 bacteria were higher than other isolates, so that these five bacteria were valuable bacterial resource for applying in BEAC process.

Key words: bioenhanced activated carbon; dominant bacteria; DGGE; FISH; dehydrogenase activity

收稿日期: 2010-07-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51078106); 黑龙江省杰出青年基金资助项目(JC200708); 黑龙江省教育厅青年学术骨干支持计划项目(1251G049).

作者简介: 张多英(1980—), 女, 博士研究生, 讲师;
李伟光(1962—), 男, 教授, 博士生导师.

随着工业化进程的加快, 水环境污染问题日益严重. 2005 年, 国家环保局对 206 个水源地进行监测, 发现有 132 种有机污染物, 其中 103 种为国内外优先控制的有机污染物^[1]. 而以混凝、沉淀、过滤、加氯消毒为主的传统工艺对水中有机物

尤其是溶解性有机物去除能力有限.大量研究证实,采用活性微生物经生物降解作用可以有效去除水中有机物^[2-4].将自然界中筛选的高活性菌群固定于活性炭载体为核心的活性炭生物增强技术(Bioenhancement activated carbon, BEAC),可充分发挥微生物的生物吸附与生物降解作用^[5-6],增强对水中有机污染物的降解效能,提高降解速率,因而受到广泛关注^[7].有研究表明, BEAC上高活性菌群易受土著菌群干扰而失去优势作用,进而影响 BEAC 的处理效果^[8].如何筛选具有高效稳定性的优势菌种成为难题.生物活性炭(Biological activated carbon, BAC)上的菌群经过一段时间的生长,可逐渐根据环境条件调节自身的组成,形成适应于外界环境条件的区系^[9].由于 BAC 上菌群分布已经达到平衡,可避免种群间对生态位的竞争,可为 BEAC 的强化处理提供功能微生物资源.

本研究以长期稳定运行的 BAC 为目标,经 PCR-DGGE 分析,明确 BAC 上对有机物降解起主要作用的菌群,并对 BAC 上菌群富集分离后,应用荧光原位杂交(FISH)技术快速筛选优势菌株,并研究各优势菌株的降解特性与生物活性,最终确定在降解特性、生物活性和稳定性方面均具有优势的菌种资源.

1 试验

1.1 试验材料

1.1.1 生物活性炭(BAC)

本研究菌种筛选自运行 300 d 的生物活性炭(BAC)滤池.

1.1.2 培养基

菌种富集、分离所用培养基均为 LB 培养基,具体成分组成如下:蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0~7.2.

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和纯化

DNA 的提取采用 Zhou 等提出的 DNA 提取方法^[10],得到的 DNA 粗提液用 DNA 柱式胶回收试剂盒(TIANGEN)进行纯化.

1.2.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增

将纯化后的基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板,采用对大多数细菌 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F357-GC 和 R518^[11]进行扩增,引物序列分别为:F357-GC (5'-CGCCCGC-CGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCCGCCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), R518 (5'-AT-

TACCGCGGCTGCTGG-3'),扩增产物片段长约 250 bp. 25 μ L 的 PCR 反应体系组成如下:9.5 μ L 去离子水,12.5 μ L Master Mix (TaKaRa),2 种引物各 1 μ L,模板 1 μ L.采用降落 PCR 反应条件^[12]:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,前 20 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,65~55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 复性 1 min (每个循环,退火温度下降 0.5 $^{\circ}$ C),后 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 复性 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用 Bio-Rad 公司的 D-Code 基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行电泳分离.变性胶的制备:使用梯度胶制备装置,制备变性剂体积浓度从 30%~60% (100% 的变性剂为 40% 去离子甲酰胺,7 mol/L 尿素)的 8% 聚丙烯酰胺凝胶,变性剂体积浓度从上到下依次递增,倒完胶后,凝固 1 h;点样:先清洗点样口,在每个点样口中加入含 10% 加样缓冲液的 PCR 产物样品 15~20 μ L;电泳:150 V 电压下,60 $^{\circ}$ C,电泳 4 h;染色:采用硝酸银染色法;照相及观察.

1.2.4 DGGE 条带的回收克隆测序

DGGE 图谱中的条带回收,用 1 mL 灭菌的去离子水溶解,作为 PCR 模板.根据 1.2.2 中所叙述的方法进行 PCR,产物用胶回收试剂盒(TaKaRa)进行回收.将回收得到的 DNA 片段连接在 pMD18-T (TaKaRa)载体上,然后转化 *Escherichia coli* JM109 (TaKaRa)感受态细胞.

取克隆阳性菌液 1 mL 加入 1.5 mL 离心管中,由大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)进行序列测定,测序引物为 pMD18-T 载体通用引物.将测序结果提交至 GenBank 并获得接受号(FJ978001-FJ978004).利用 BLASTN 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)对测序结果进行同源性分析.

1.2.5 BAC 上优势菌群的富集与分离

取 5 g 生物活性炭,置入 50 mL LB 液体培养基中,于 30 $^{\circ}$ C、140 r/min 震荡培养 24 h 后,梯度稀释涂布于 LB 固体培养基上,挑取形态各异的菌落分离培养,并进一步纯化.

1.2.6 BAC 上优势菌群的荧光原位杂交(FISH)

选择对 BAC 滤池优势菌群 *Pseudomonas* sp. (5'-CCCTTCCTCCCAACTT-3') 和 *Bacillus subtilis* (5'-GTTCCCCAGTTTCCAATGACCC-3') 特异的探针^[13-15].于 *Pseudomonas* sp. 探针 5'

端标记罗丹明 Alexa Fluor 568,于 *Bacillus* sp. 探针 5'端标记 FITC. 按 Watanabe 等^[16]介绍的方法进行原位杂交. FISH 的结果采用 Zeiss Axioplan HBO 50 荧光显微镜检测. 该显微镜上连接摄像装置 KodakMDS 120 系统.

1. 2. 7 优势菌种鉴定

应用 SHERLOCK[®]全自动微生物鉴定系统,测定菌种的脂肪酸质量浓度,并与菌种库比对,明确细菌种属.

1. 2. 8 优势菌有机物降解能力分析

应用日本岛津公司 TOC - V_{CPN}型 TOC 检测仪. 具体操作按照湿法氧化法进行,分别测定总碳(TC)质量浓度和总无机碳(TIC)质量浓度,TC 与 TIC 之差即为 TOC.

1. 2. 9 优势菌世代时间与生物活性

应用常规培养方法^[17]测定并计算细菌的世代时间. 根据李今等^[18]的方法,测定细菌的脱氢酶活性,以反映细菌的生物活性.

2 结果与分析

2. 1 BAC 滤池优势菌群分析

取运行 300 d 的 BAC 滤池样品, DGGE 分析结果如图 1 所示. 运行 300 d 的 BAC 滤池菌群分布稳定,上、中、下层中均有 4 个明显的条带即由 4 株细菌占据. 回收图中 4 条条带后,克隆测序,

经过 NCBI 的 BLASTN 程序比对,结果表明,该 4 株菌分别属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、硝化螺旋菌属(*Nitrospira* sp.)和灰黄链霉菌(*Streptomyces flavogriseus*)(如表 1 所示). 硝化菌为化能自养菌,不能利用有机底物^[17],因此,无法用于处理有机污染物. 灰黄链霉菌为放线菌的一种,可产生多环口山酮类抗生素^[19],用于饮用水处理对供水安全具有潜在风险. 有研究表明,假单胞菌在降解某些特定难降解有机物方面具有较大优势^[20-22]. 亦有研究证实枯草芽孢杆菌不仅可对有机污染物起降解作用,且对不良环境有较强抗性^[23-24]. 因此,选择假单胞菌属与枯草芽孢杆菌作为菌株资源筛选目标,并设计假单胞菌与枯草芽孢杆菌特异性探针.

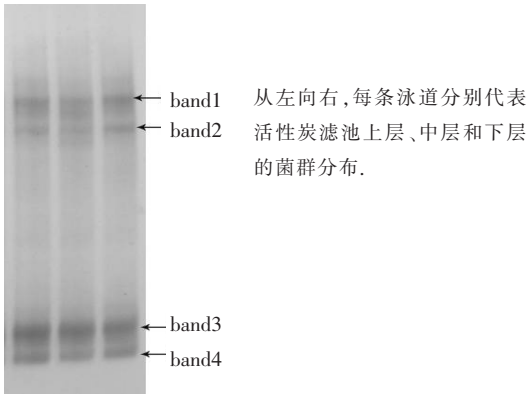


图 1 运行 300 d BAC 滤池菌群的 DGGE 图谱

表 1 克隆后测序结果比对(于 NCBI 进行 BLAST 比对)

条带		亲缘性		
序号	序列接收号	相似度/%	种属	序列接收号
1	FJ978001	96	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ167038
2	FJ978002	94	<i>Bacillus subtilis</i>	AM110930
3	FJ978003	99	<i>Nitrospira</i> sp.	AJ224044
4	FJ978004	99	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	NR_028988. 1

2. 2 优势菌群筛选与鉴定

应用 LB 培养基富集、分离、纯化后,共分离出细菌性菌株 35 株. 尽管在 DGGE 图谱中仅检测到有 4 株优势菌,但由于 BAC 滤池的进水中亦存在细菌,经过竞争未能在活性炭上占据优势地位,因此,菌量非常微小,以至于 DGGE 无法检测出. 但在 LB 培养基上经富集使其大量繁殖,导致分离出的细菌数量远多于 DGGE 的检测结果.

应用 LB 培养基,分别制备分离出的 35 株细菌各菌株的纯培养菌液,取 1 mL 菌液在 12 000 r/min 离心 5 min 后取沉淀用于荧光原位杂交(FISH). 经杂交后,有 5 株菌显阳性(如图 2

所示),分别为 SRO 2、SRO 11、SRO 19、SRO 20 和 SRO 30. 其中 4 株为假单胞菌属,1 株为枯草芽孢杆菌.

应用 SHERLOCK[®]全自动微生物鉴定系统进行鉴定,结果如图 3 所示. 将脂肪酸质量浓度与菌种库比对,结果见表 2, SRO 2 为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*), SRO 11 为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), SRO 19 为穿孔假单胞菌(*Pseudomonas pertucinogena*), SRO 20 为巴利阿里假单胞菌(*Pseudomonas balearica*), SRO 30 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),进一步验证了该 5 株菌的菌种类型.

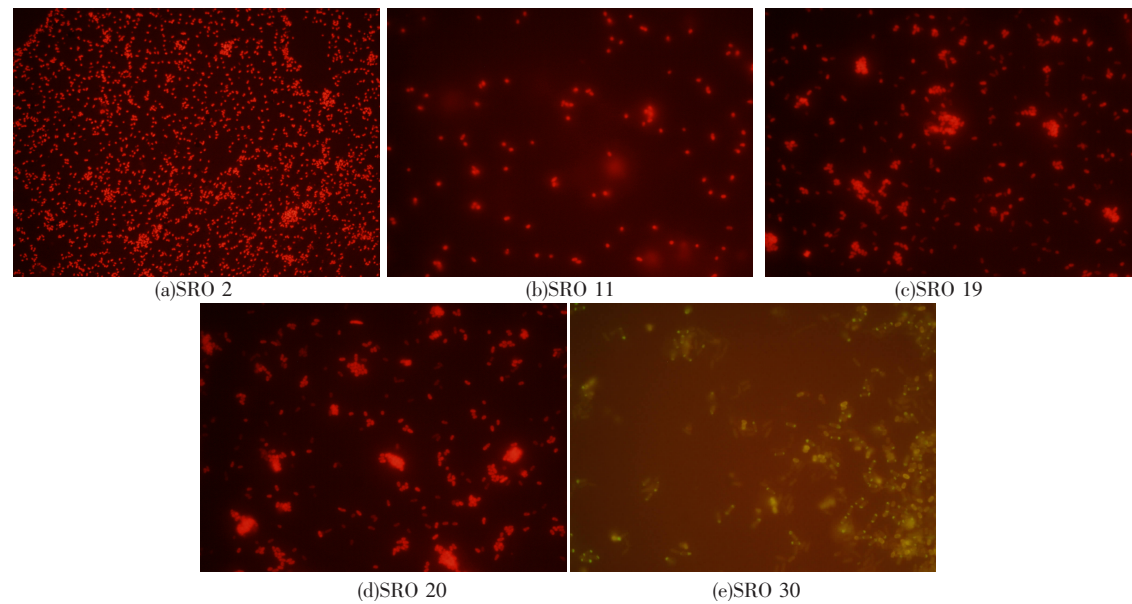


图 2 从活性炭上分离的优势菌的荧光原位杂交(1 000 ×)

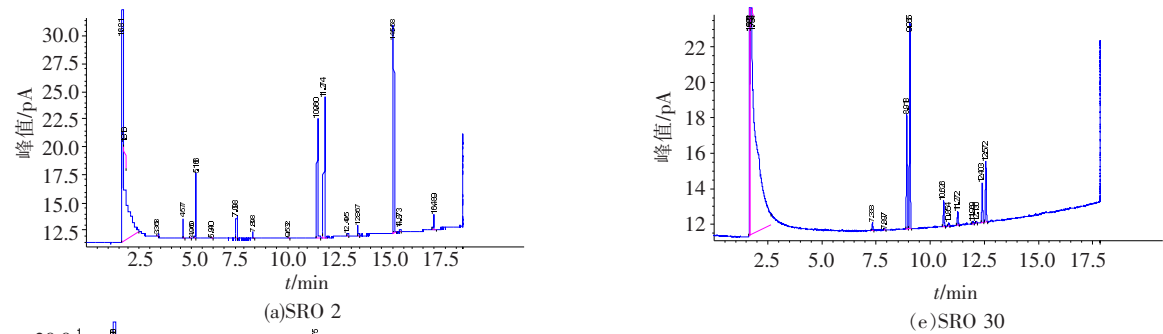


图 3 从活性炭上分离的优势菌的脂肪酸色谱图

表 2 从活性炭上分离的优势菌鉴定结果

优势菌号	数据库	相似度	菌种名称
SRO 2	TSBA6 6.00	0. 747	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
SRO 11	TSBA6 6.00	0. 639	<i>Pseudomonas putida</i>
SRO 19	TSBA6 6.00	0. 774	<i>Pseudomonas pertucinogena</i>
SRO 20	TSBA6 6.00	0. 638	<i>Pseudomonas balearica</i>
SRO 30	TSBA6 6.00	0. 692	<i>Bacillus subtilis</i>

2. 3 优势菌特性分析

2. 3. 1 优势菌有机物降解能力分析

对分离出的 35 株细菌进行有机物降解试验(测定对 TOC 的去除). 采用松花江水为原水,降解前测定水中 TOC 为 6. 69 mg/L. 取菌液 1 μL 接种于 10 mL 水样中,降解 24 h 后测定降解效果. 结果表明,分离出的 35 株细菌中仅有 12 株具有有机物降解能力(如表 3 所示),其中,5 株优势菌的降解能力相对较强,但非优势菌 SRO 12、SRO 14、SRO 16、SRO 25 也具有较好的降解效果,其中经 SRO 12 和 SRO 14 降解后,水中 TOC 可分别降至 5. 16 和 5. 33 mg/L,降解率可达 20% 以上,甚至高于优势菌 SRO 2、SRO 19 和 SRO 30.

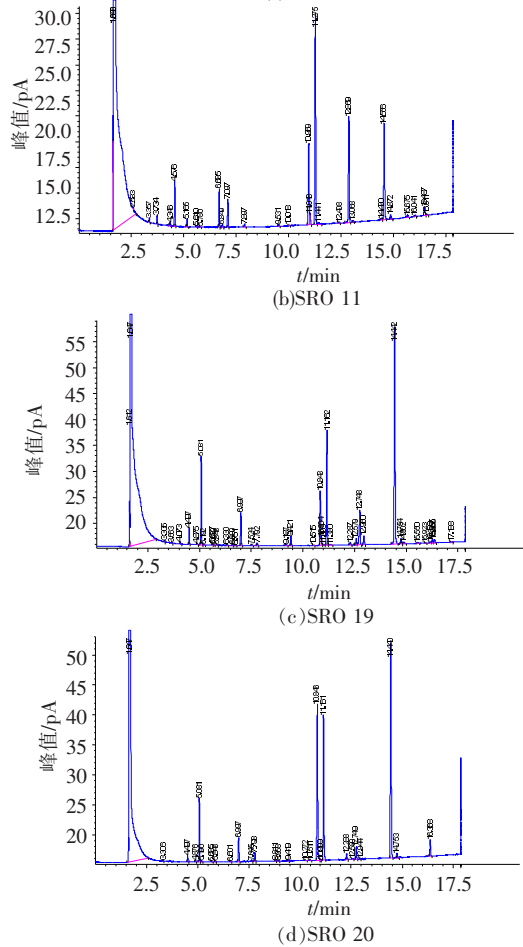


表 3 分离细菌对水源原水有机物的降解能力

菌株号	降解后水中 TOC/(mg · L ⁻¹)	TOC 去除率/%	菌株号	降解后水中 TOC/(mg · L ⁻¹)	TOC 去除率/%
SRO 2	5.45 ± 0.04	18.5 ± 0.04	SRO 20	5.21 ± 0.02	22.1 ± 0.02
SRO 11	5.34 ± 0.03	20.2 ± 0.03	SRO 25	5.58 ± 0.06	16.6 ± 0.06
SRO 12	5.16 ± 0.06	22.9 ± 0.06	SRO 29	5.65 ± 0.03	15.5 ± 0.03
SRO 14	5.33 ± 0.02	20.3 ± 0.02	SRO 30	5.62 ± 0.07	16.0 ± 0.07
SRO 16	5.56 ± 0.04	16.9 ± 0.04	SRO 31	5.65 ± 0.03	15.5 ± 0.03
SRO 19	5.68 ± 0.03	15.1 ± 0.03	SRO 33	6.09 ± 0.04	9.0 ± 0.04

表中数据均为 3 次重复的平均值。

2.3.2 优势菌世代时间及生物活性

测定具有有机物降解效果的 12 株分离细菌的世代时间,结果如表 4 所示。尽管 SRO 12、

表 4 分离细菌的世代时间

菌株号	世代时间/ (min · G ⁻¹)	菌株号	世代时间/ (min · G ⁻¹)
SRO 2	2.65	SRO 20	2.27
SRO 11	3.02	SRO 25	6.67
SRO 12	4.21	SRO 29	5.41
SRO 14	5.71	SRO 30	3.86
SRO 16	4.06	SRO 31	3.87
SRO 19	3.34	SRO 33	7.17

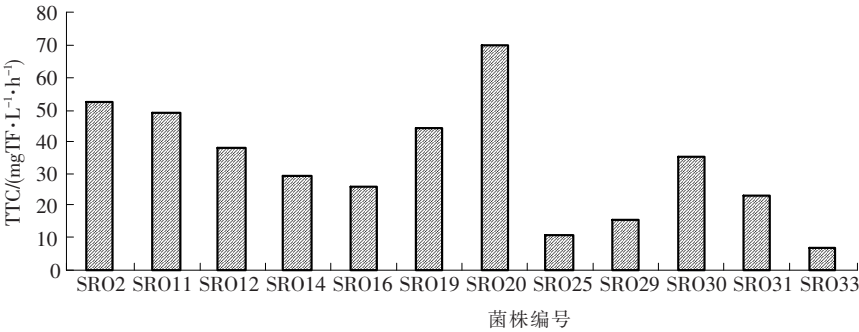


图 4 分离菌株脱氢酶活性比较

3 结 论

- 1) 根据 BAC 滤池中菌群分布特点,分离出 5 株优势菌,分别为 SRO 2、SRO 11、SRO 19、SRO 20和 SRO 30。其中 SRO 2、SRO 11、SRO 19 和 SRO 20 为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), SRO 30 则为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。
- 2) 该 5 株菌均可对有机物起降解作用,且世代时间较短,具有较高的脱氢酶活性,可为 BEAC 长期稳定运行提供有用的菌种资源。

参考文献:

[1] 郑丙辉,张远,付青. 中国城市饮用水源地环境问题与对策[J]. 中国建设信息:水工业市场,2007(10): 31-35.

SRO 14、SRO 16、SRO 25 对有机物降解能力与优势菌相同甚至高于优势菌,但世代时间与优势菌相比均较长。

脱氢酶在糖、脂肪、氨基酸、核苷酸的代谢中起重要作用,并且在能量转移和物质循环中也是必不可少的,微生物脱氢酶是微生物降解有机污染物获得能量的必需酶,能直接表示微生物对有机物降解能力的强弱^[25]。因此,为了比较各分离菌株的生物活性,同时测定了这 12 株细菌的脱氢酶活性。图 4 结果表明,优势菌 SRO 2、SRO 11、SRO 19、SRO 20 和 SRO 30 的脱氢酶活性均高于其余菌株。

[2] ROZLYN F Y,STEPHANIE M C, PHILLIP M F. Aerobic biodegradation of 2, 2' - dithiodibenzoic acid produced from dibenzothiophene metabolites[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1):491-496.

[3] HELEN C R, SASCHA E O, STEVEN A B, *et al.* Biodegradation processes in a laboratory - scale groundwater contaminant plume assessed by fluorescence imaging and microbial analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(12):3865-3876.

[4] JEONG M K, NGOC T L, BOK S C, *et al.* Influence of soil components on the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and o -, m -, and p - xylenes by the newly isolated bacterium *pseudoxanthomonas spadix* BD - a59[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(23):7313-7320.

[5] 刘水,李伟光,郜玉楠,等. 生物因子控制反冲洗对

- BEAC 滤池优势菌稳定性影响研究[J]. 环境科学, 2009,30(12):3573-3578.
- [6] SAÏD E F, SPIROS N A. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation [J]. Current Opinion in Microbiology, 2005,8(3):268-275.
- [7] 王锐. 活性炭生物增强工艺长期运行的稳定性研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 2006.
- [8] 张晓彦,陈井义,谷军. 生物增强活性炭处理微污染源水的稳定性研究[J]. 供水技术,2009,3(1):5-8.
- [9] 张阳,陶思源,潘晶,等. 阿特拉津微污染原水生物活性炭处理系统种群动态演替分析[J]. 化工学报, 2009,60(5):1281-1286.
- [10] ZHOU J, MARY B, JAMES M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:316-322.
- [11] MUYZER G, WAAL de E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:695-700.
- [12] ZWART G, HUISMANS R, ACTERYELD M P, *et al.* Divergent members of the bacterial division Verucomicrobiales in a temperate freshwater lake [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1998, 25:159-169.
- [13] AKIKO K, NOBUYASU Y, MASAO N. Enumeration of respiring *Pseudomonas* spp. in milk within 6 hours by fluorescence in situ hybridization following formazan reduction [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(5):2748-2752.
- [14] JEREMY L, HILARY M L, JONATHAN P, *et al.* Improved fluorescent in situ hybridization method for detection of bacteria from activated sludge and river water by using DNA molecular beacons and flow cytometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6):2020-2023.
- [15] NANCY M D, JULIA D R, CHRISTIAN T B. Species-specific oligonucleotides for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. Strain JS150, and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in biodegradation experiments [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(12):4994-4999.
- [16] KAZUYA W, KANAKO W, YUMIKO K, *et al.* Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(11):4803-4809.
- [17] 任南琪,马放,杨基先,等. 污染控制微生物学[M]. 3版. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, 2007.
- [18] 李今,吴振斌,贺锋. 生物膜活性测定中 TTC-脱氢酶活性测定法的改进[J]. 吉首大学学报:自然科学版,2005,26(1):37-39.
- [19] 赵子翰,李俊英,杨晓雁,等. SIIA-C2191-A and B, novel polycyclic xanthoneantibiotics produced by *Streptomyces flavogriseus* I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities [J]. 中国抗生素杂志,2003,10:627-632.
- [20] CHAO W, YI L. Incorporation of granular activated carbon in an immobilized membrane bioreactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29:1353-1356.
- [21] CHUN Y Y, MOHD K A, WAN M A W D. Review of modification of activated carbon for enhancing contaminant uptakes from aqueous solutions[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 52:403-415.
- [22] WEIHONG Z, CHENJING Z, MING S, *et al.* Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18):6935-6941.
- [23] 方式纯,郝瑞霞,鲁志强. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)降解萘的动力学研究[J]. 高校地质学报, 2007,13(4):682-687.
- [24] CHUNXIAO J, HONGWEN S, TIEHEN S, *et al.* Immobilization of cadmium in soils by UV-mutated *Bacillus subtilis* 38 bioaugmentation and NovoGro amendment [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009,167:1170-1177.
- [25] 解军,祁峰,裴海燕,等. 脱氢酶活性检测方法及其在环境监测中的应用[J]. 中国环境监测, 2006,22(5):13-18. (编辑 刘 彤)