

混合菌的构建及其对 3,4-二氯苯胺的生物转化

倪金荧, 赵佳, 张跃, 卿青, 朱劼, 王利群*

(常州大学药学院, 江苏常州 213164)

摘要: 从染料废水中分离出以 3,4-二氯苯胺 (3,4-DCA) 为唯一碳源和能源生长的革兰氏阴性菌, 筛选其中两株形态差异较大的菌株 P11-1 和 L13 构建混合菌群, 用于 3,4-DCA 的转化实验以削减其毒性。通过优化两株菌配比构建混合菌群, 混合菌群对 3,4-DCA 转化率达 73.33%, 明显高于单菌。经菌株形态观察和 16S rDNA 序列分析, 确定两株菌均为铜绿假单胞菌。以单因素实验考察混合菌群在 3 d 内对 100 mg/L 3,4-DCA 的转化能力, 并通过正交实验进一步优化转化条件, 得出最佳条件组合为: 接菌量 3% (体积分数), 温度 30 °C, pH=8.0, 摇床转速 190 r/min, 在该条件下 3,4-DCA 转化率达 89.26%, 其中 pH 对菌群转化能力影响最大。GC-MS 分析菌群代谢产物主要为 3,4-二氯乙酰苯胺, 酶活分析发现 *N*-乙酰基转移酶 (NAT) 活性较高, 即菌群通过乙酰化对 3,4-DCA 进行解毒。

关键词: 3,4-二氯苯胺; 铜绿假单胞菌; 转化; *N*-乙酰基转移酶; 3,4-二氯乙酰苯胺; 生物工程

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 05-0915-06

Construction of mixed bacterial strain and its biotransformation of 3,4-dichloroaniline

NI Jinying, ZHAO Jia, ZHANG Yue, QING Qing, ZHU Jie, WANG Liqun*

(School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China)

Abstract: Gram-negative bacteria growing on 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) as the only carbon source and energy were isolated from dye wastewater. Two strains with great morphological differences, P11-1 and L13, were screened to construct mixed bacterial strain, which was used to the transformation of 3,4-DCA to reduce the toxicity of 3,4-DCA. By optimizing the proportion of the two strains to construct mixed bacterial strain, the conversion rate of 3,4-DCA reached 73.33%, obviously higher than that of single strain. Both strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa* by morphology observation and 16S rDNA sequence analysis. The transformation ability of mixed strain to 100 mg/L 3,4-DCA in 3 d was evaluated by single factor experiment. The transformation conditions were further optimized by orthogonal experiment. The results showed that the best conditions was obtained as follows: inoculum amount 3% (volume fraction), 30 °C, pH=8.0, shaking velocity 190 r/min. Under these conditions, the transformation rate was up to 89.26%. Especially, pH had the greatest effect on the transformation ability of mixed strain. GC-MS result revealed that the main metabolite of mixed strain was 3,4-dichloroacetanilide. Enzyme activity analysis indicated that the mixed strain had higher *N*-acetyltransferase (NAT) activity, that is, it detoxified 3,4-DCA by acetylation.

Key words: 3,4-dichloroaniline; *Pseudomonas aeruginosa*; transformation; *N*-acetyltransferase; 3,4-dichloroacetanilide; biological engineering

3,4-二氯苯胺 (3,4-DCA) 作为一种卤代芳香族化合物, 是多种精细化工产品的主要中间体, 广泛用于生产染料、药物、杀虫剂等有机产品, 因其易

残留于生产废水中, 常通过工业和城市废水进入环境中累积^[1-4]。3,4-DCA 为剧毒化学品, 在土壤和水中具有高持久性和低生物降解性^[5-6], 通过食物链影

收稿日期: 2021-11-21; 定用日期: 2022-01-19; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211186

作者简介: 倪金荧 (1995—), 女, 硕士生, E-mail: 1824529633@qq.com。联系人: 王利群 (1972—), 女, 教授, 硕士生导师, E-mail: wlq@cczu.edu.cn。

响野生动物和人类的内分泌系统^[7],因而,从源头上去除废水中的 3,4-DCA 具有重要意义。

在以往的研究中,微生物在清除污染环境中的化学品残留物及其代谢物方面发挥着重要作用^[8-11]。WANG 等^[12]发现,蛋白核微藻能够通过乙酰化和甲酰化 3,4-DCA 进行解毒,4.6 mg/L 底物在 7 d 内的去除率达 75%; TRAVKIN 等^[13]利用荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 26-K 处理质量浓度为 75 mg/L 的 3,4-DCA,在不加葡萄糖的条件下,15 d 内去除率达 40%;此外,部分真菌也被报道用于处理氯代苯胺,如木质素降解菌白腐真菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 经过 33 d 培养能够去除 50% 的 3,4-DCA^[7]。以上研究中都存在底物去除率不高的问题,且真菌处理 3,4-DCA 会产生毒性更强的四氯偶氮苯^[14]。宋彩霞^[15]经过一系列条件优化,将恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) S1 对 30 mg/L 3,4-DCA 在 3 d 内的去除率提高到 63.82%; LI 等^[16]筛选的类香味菌 (*Myroides odoratimimus*) LWD09,4 d 内对 100 mg/L 3,4-DCA 的去除率为 80%。这两种菌株对底物的去除率相对较高,但未对底物去除机制进行探讨,未阐明底物是彻底降解还是转化为其他物质。

针对以上问题,本研究从染料制造厂生化池废水中筛选出能够以 3,4-DCA 为唯一碳源生长的菌株,经形态学观察和 16S rDNA 序列分析鉴定菌株,通过构建混合菌群以及条件优化提高菌株对底物的去除率。经 GC-MS 分析和相应酶活检测确定菌株代谢的最终产物并探讨其毒性,以期达到高效去除废水中的 3,4-DCA 并解除其毒性的效果。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

K₂HPO₄·3H₂O、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、MnCl₂·4H₂O、ZnSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O、NaCl、二氯甲烷 (AR)、琼脂粉 (BR)、甲醇 (色谱级),国药集团化学试剂有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物,BR,安琪酵母股份有限公司;5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)、盐酸胍 (质量分数 98%),天津希恩思生化科技有限公司;乙酰辅酶 A 钠盐 (质量分数 93%),上海麦克林生化科技有限公司。

SPX-250BSH-II 型生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;THZ-072HT 型数控恒温摇床,上海博彩生物科技有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 5975-7890 气相色谱-质谱联用仪,美国 Agilent 科技公司;RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;VCX-500 型超声破碎仪,美

国 Sonics 公司;TGL-21M 型高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;Spark 10M 型多功能酶标仪,瑞士帝肯集团。

1.2 菌株来源

某分散染料制造厂生化池废水。

1.3 培养基

LB 液体培养基 (g/L): 胰蛋白胨为 10,酵母提取物为 5,NaCl 为 10。

LB 固体培养基 (g/L): 胰蛋白胨为 10,酵母提取物为 5,NaCl 为 10,琼脂粉 17。

MSM 培养基 (g/L): NaCl 为 1, K₂HPO₄·3H₂O 为 1, (NH₄)₂SO₄ 为 1, MgSO₄ 为 0.2, 1 mL 缓冲盐溶液。缓冲盐溶液 (g/L): FeSO₄·7H₂O 为 1, MnCl₂·4H₂O 为 1, ZnSO₄·7H₂O 为 1。

1.4 3,4-DCA 转化菌的筛选及纯化

将废水 10 mL 接种于 90 mL 3,4-DCA 质量浓度为 100 mg/L 的 MSM 培养基中,于 30 °C, 180 r/min 振荡培养至浑浊,用无菌水梯度稀释后涂布于含 100 mg/L 3,4-DCA 的 LB 固体培养基上,30 °C 培养 2~3 d,挑取生长良好,形态和颜色不同的单菌落,经划线分离 3~5 次得到纯培养菌落。

1.5 菌株鉴定

菌株经革兰氏染色后光学显微镜下观察细菌形态,16S rDNA 序列由上海生工生物工程公司测定,与 GenBank 数据库中相应序列进行 BLAST 比对,用 MEGA 5.0 构建系统进化树。

1.6 混合菌转化 3,4-DCA 的特性

1.6.1 菌悬液的制备

将纯化后的菌株接种到 LB 液体培养基中,30 °C、180 r/min 摇床培养 12 h,12000 r/min 离心 5 min,弃上清,生理盐水洗涤 3 次,菌体用于制备在 600 nm 处光密度值 (OD₆₀₀) 为 1.6 的菌悬液。

1.6.2 3,4-DCA 转化率的测定

按接种量 2% (体积分数,下同) 将 1 mL 菌悬液转接到 49 mL MSM 培养基 (含 100 mg/L 3,4-DCA) 中,30 °C、180 r/min 摇床培养 3 d,检测菌液 OD₆₀₀ 及 3,4-DCA 质量浓度。3,4-DCA 质量浓度采用高效液相色谱法 (HPLC, 外标法) 测定,液相色谱柱: C₁₈ 柱,4.6 mm×250 mm, 5 μm; 流动相 V(甲醇): V(水)=60:40; 流量 1.0 mL/min; 柱温 37 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。3,4-DCA 转化率的计算式如下所示:

$$D/\% = \frac{\rho_1 - \rho_2}{\rho_1} \times 100 \quad (1)$$

式中: D 为 3,4-DCA 转化率,%; ρ₁ 为处理前 3,4-DCA 的质量浓度, mg/L; ρ₂ 为处理后 3,4-DCA 的质量浓度, mg/L。

1.6.3 混合菌群的构建

结合菌株形态及转化性能, 选取形态及颜色差异较大的两株菌(可能是功能不同的菌株)构建混合菌群。按 1.6.1 节分别制备单一菌株的菌悬液, 按 1.6.2 节测定混合菌群对 3,4-DCA 的转化率, 混合菌群接种量保持 2% 不变, 两种菌悬液的体积比分别为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3。

1.6.4 3,4-DCA 转化条件的优化

单因素预实验: 以 1.6.2 节中的转化条件(温度 30 °C、自然 pH、接菌量 2%、摇床转速 180 r/min)为基础, 以 3,4-DCA 转化率为指标, 初步考察接菌量(1%、2%、3%、5%、7%)、转化温度(25、30、35、40 °C)、初始 pH(5、6、7、8、9)、摇床转速(100、150、180、200、250 r/min)对混合菌(P11-1 与 L13 体积比为 1:1)转化 3,4-DCA 的影响。

正交实验: 选取单因素实验中的摇床转速、温度和 pH 3 个因素, 每个因素设置 3 个水平(其中: 摇床转速为 190、200、210 r/min; 温度为 28、30、32 °C; pH 为 7、8、9)。通过 $L_9(3^4)$ 正交实验(表 1)确定混合菌的最佳转化条件组合, 结果用 SPSS 软件进行统计分析。

表 1 正交实验设计
Table 1 Orthogonal experimental design

序号	影响因素		
	摇床转速/(r/min)	温度/°C	pH
1	190	28	7
2	190	30	8
3	190	32	9
4	200	28	8
5	200	30	9
6	200	32	7
7	210	28	9
8	210	30	7
9	210	32	8

1.7 代谢产物的测定

取转化过程中的培养液经 12000 r/min 离心, 取上清液用二氯甲烷按体积比 1:1 萃取两次, 萃取液旋转蒸发后用甲醇(色谱级)溶解, 得到的有机物溶液经高效液相色谱分离后再进行 GC-MS 分析。最后, 将气相色谱中检测到的各物质的保留时间和质谱图与美国标准质谱数据库(NIST)进行比对, 分析代谢产物的分子结构。

1.8 菌株酶活测定

粗酶液的制备: 取振荡培养 3 d 后的混合菌转化液 50 mL (OD_{600} 为 0.91), 于 12000 r/min 离心 5 min, 细胞沉淀用检测缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)洗涤并重悬, 400 W 超声破碎 90 次(破碎 3 s, 间隔 3 s), 4 °C 下 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液

为粗酶液。

采用 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)测定游离辅酶 A (CoA) 的方法可以测定 *N*-乙酰基转移酶活性^[17-18]。酶反应体系如下: 粗酶液 50 μ L、3,4-DCA 25 μ L (终浓度 500 μ mol/L)、乙酰辅酶 A 25 μ L (终浓度 400 μ mol/L) 于 96 孔板中孵育不同时间, 以 100 μ L 6.4 mol/L 盐酸胍溶液终止反应, 加入 100 μ L 5 mmol/L DTNB 显色后, 于 412 nm 处测定吸光度, 定义每分钟 1 μ mol 底物转化为产物所需的酶量为一个国际制酶活单位(U)。其他条件相同的情况下, 以检测缓冲液代替酶液作为对照。

游离 CoA 生成量的测定: 以不同浓度的 L-半胱氨酸标准溶液制备标准曲线, 根据标准曲线方程计算与吸光度变化相对应的游离 CoA 生成量。酶活计算公式为:

$$\text{酶活}/(\text{U/L})=n/(t \times V) \quad (2)$$

式中: n 为 CoA 的生成量, μ mol; t 为酶促反应时间, min; V 为酶液用量, L。

2 结果与讨论

2.1 3,4-DCA 转化菌的筛选与鉴定

通过 1.4 节分离纯化, 筛选得到 5 株 3,4-DCA 转化菌株, 并按照 1.6.1 节制备菌悬液, 按照 1.6.2 节进行 3,4-DCA 的转化实验, 结果见图 1。

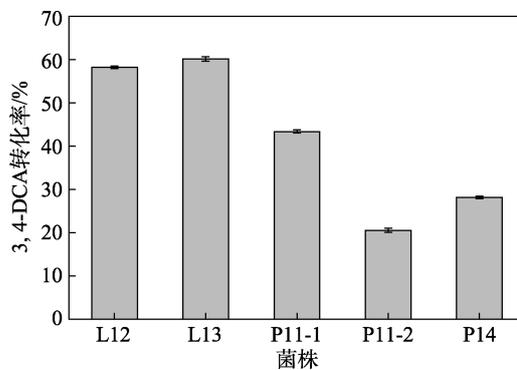


图 1 不同菌株对 3,4-DCA 转化的能力

Fig. 1 Transformation ability of different strains to 3,4-DCA

根据图 1 挑选转化能力较强, 形态与颜色差异较大的 L13 与 P11-1 作为实验菌株, 进行混合菌群的构建。两株菌在 LB 固体培养基上 30 °C 培养 48 h 后的形态见图 2。菌落单一, P11-1 呈均一黄色, 圆形隆起, 较为湿润; L13 呈蓝绿色, 扁平湿润, 表面略褶皱。两株菌革兰氏染色均显阴性, 显微镜下呈长短不一的杆状。

将菌株 16S rDNA 序列与 GenBank 中报道的 16S rDNA 序列进行同源性比对, 结果显示与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)相似度达 99% 以上。采用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树(图 3), 结合菌落形态, 初步鉴定为 *Pseudomonas aeruginosa*。



图 2 P11-1 (a) 与 L13 (b) 菌落形态
Fig. 2 Colony morphology of P11-1 (a) and L13 (b)

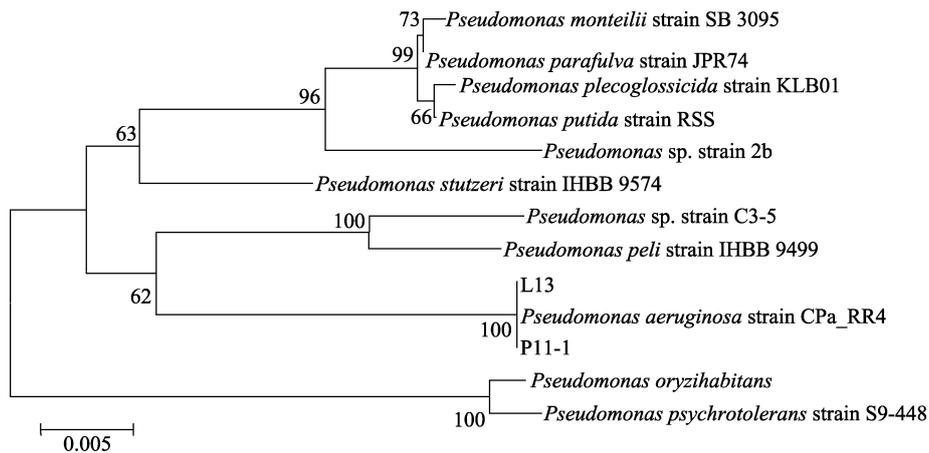


图 3 菌株 P11-1、L13 的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain P11-1 and L13

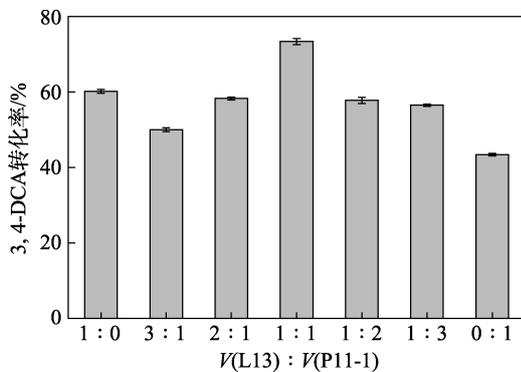


图 4 不同接种比例混合菌对 3,4-DCA 的转化能力
Fig. 4 Transformation ability of 3,4-DCA by mixed bacteria with different inoculation proportions

2.2 混合菌的构建

不同体积比混合菌对 3,4-DCA 的转化能力如图 4 所示。在相同培养条件下,当菌株 L13 与 P11-1 体积比为 1 : 1 时,混合菌群对 3,4-DCA 转化率最高,达到 73.33%。同时,该混合菌群对 3,4-DCA 的转化率较单一菌株 L13 (1 : 0) 和 P11-1 (0 : 1) 的转化率分别提高 13.33% 和 29.95%, 效果显著。混合菌的生长曲线及转化曲线如图 5 所示。菌株大量生长和对底物的转化主要发生在前 3 d, 后趋于稳定。

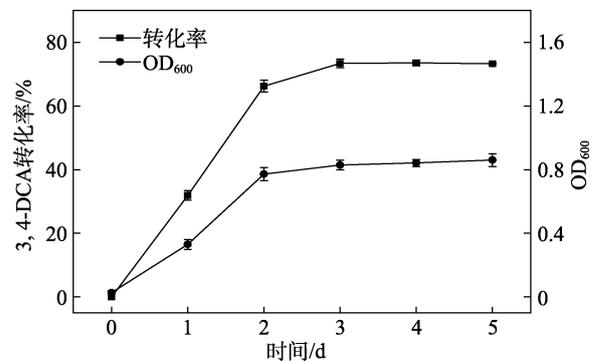


图 5 混合菌的生长曲线及 3,4-DCA 转化率曲线
Fig. 5 Growth curve of mixed bacteria and transformation rate curve of 3,4-DCA

2.3 3,4-DCA 转化条件的优化

根据 1.6.4 节单因素预实验结果,当接菌量从 1% 提高到 3% 时,3,4-DCA 转化率从 64.91% 增加到 81.62%;当接菌量进一步提高时,转化率几乎不变;故确定最佳接种量为 3%,不再纳入正交实验考察因素。3,4-DCA 转化率最高的其他条件分别为:温度 30 °C、pH 8、摇床转速 200 r/min。据此确定正交实验范围:温度 28~32 °C、pH 7~9、摇床转速 190~210 r/min。

正交实验设计及结果如表 2 所示,方差分析

结果见表 3。根据分析结果,最佳条件组合为:摇床转速 190 r/min, 温度 30 °C, pH 8.0, 在此条件下 3,4-DCA 转化率为 89.26%。R_{pH}>R_{转速}>R_{温度},表明 pH 对混合菌转化率影响最大,摇床转速其次,温度影响最小。提高摇床转速,则氧气的转移速率增加,从而促进混合菌对底物的利用^[11];pH 和温度过高或过低都可能影响相应酶的活性。

方差分析(表 3)表明,3 个因素对转化率均有显著影响(P<0.05),其中 pH 的 F 值最大,说明其

对混合菌转化率的影响最大, 与直观分析结果一致。

表 2 正交实验设计及结果
Table 2 Orthogonal experimental design and results

序号	影响因素			3,4-DCA 转化率/%
	摇床转速/(r/min)	温度/°C	pH	
1	190	28	7	65.08
2	190	30	8	89.26
3	190	32	9	79.84
4	200	28	8	83.17
5	200	30	9	77.74
6	200	32	7	65.05
7	210	28	9	70.43
8	210	30	7	63.24
9	210	32	8	82.01
K_1	78.06	72.90	64.45	
K_2	75.32	76.74	84.82	
K_3	71.89	75.63	76.00	
R	6.17	3.84	20.37	

表 3 正交实验方差分析结果

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

因素	平方和	df	均方	F	P
摇床转速	57.277	2	28.639	119.755	0.008
温度	23.595	2	11.798	49.333	0.020
pH	625.335	2	312.668	1307.443	0.001
误差	0.478	2	0.239		

2.4 代谢产物分析

混合菌在最佳转化条件下转化 3,4-DCA 2 d, 其代谢产物的 HPLC 和 GC-MS 分析结果如图 6 和图 7 所示。在混合菌转化底物的过程中, 随着底物浓度的下降, 体系中形成并积累了新的化合物, 跟踪监测发现该化合物浓度后续趋于稳定, 不再变化。

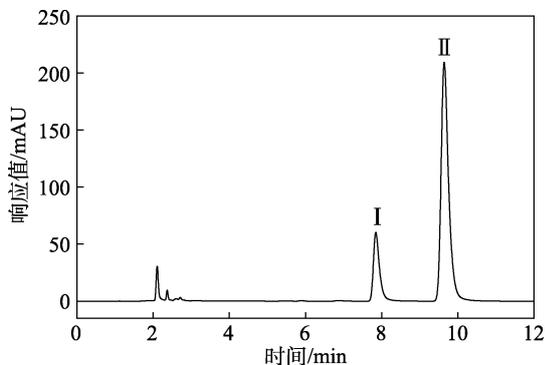
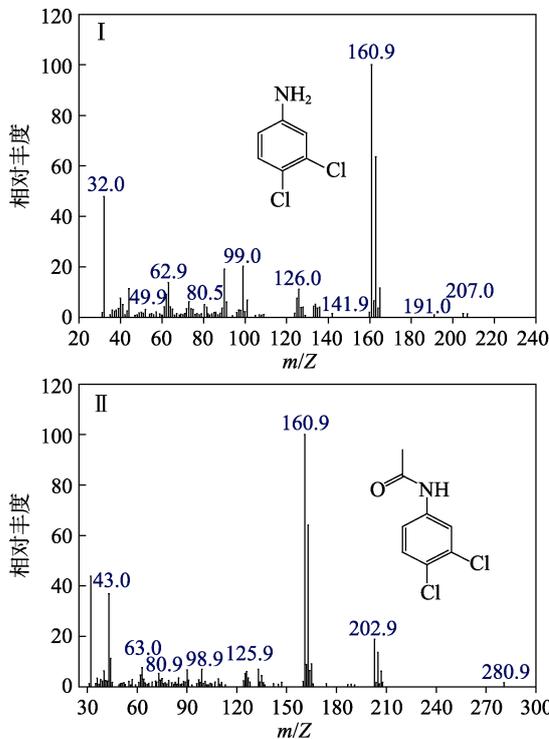


图 6 3,4-DCA 代谢产物的 HPLC 谱图

Fig. 6 HPLC chromatogram of metabolites of 3,4-DCA

由图 6 可见, 化合物 I 保留时间为 7.7 min, 经 GC-MS (图 7) 分析为残留未转化的 3,4-DCA; 化合物 II 保留时间为 9.4 min, 经 GC-MS 分析为形成的新

化合物 3,4-二氯乙酰苯胺 (3,4-DCAA), 即混合菌群以 3,4-DCA 为原料, 经乙酰化反应生成主要的代谢产物为 3,4-DCAA。3,4-DCAA 毒性很小, 植物能够在含有 3,4-DCAA 的土壤中生长期, 而在含有 3,4-DCA 的土壤中无法生长^[17]。很多文献报道乙酰化是微生物的一种有效解毒机制^[17-20]。



I—图 6 中化合物 I 的 GC-MS 分析结果; II—图 6 中化合物 II 的 GC-MS 分析结果

图 7 3,4-DCA 主要代谢产物 GC-MS 分析

Fig. 7 GC-MS analysis of main metabolites of 3,4-DCA

然而, 分析两种化合物的物质的量的变化发现, 仅 85% 的 3,4-DCA 转变为 3,4-DCAA。对照实验结果显示 3,4-DCA 的蒸发损失小于 2%, 因此, 推测其余 15% 的 3,4-DCA 中的大部分发生了矿化, 即被完全降解为二氧化碳和水^[5,10], 但因其中间产物浓度较低而未被检测出来。

2.5 酶活的测定

N-乙酰基转移酶可催化 3,4-DCA 乙酰化生成 3,4-DCAA, 同时乙酰辅酶 A 水解生成 CoA, 采用 DTNB 检测 CoA 的生成量 (图 8), 并通过 CoA 生成量来测定 N-乙酰基转移酶活性。如图 8 所示, 对照组几乎没有 CoA 的生成, 而样品中有明显的 CoA 生成, 在 0~5 min 内, CoA 生成量与时间呈正比例关系, 此时酶活为 138 U/L; 随后, 随着底物浓度的下降及产物浓度的增加, 酶的表现活性呈下降趋势。此结果进一步证明了混合菌主要通过乙酰化途径转化 3,4-DCA。MARTINS 等^[17]通过有针对性的基因阻断实验表明, 真菌依赖 N-乙酰基转移酶实现对

3,4-DCA 的解毒, 而本实验证明细菌中同样存在 *N*-乙酰基转移酶介导的生物修复系统。

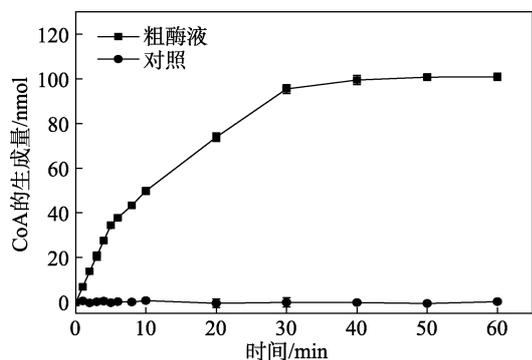


图 8 DTNB 测定乙酰辅酶 A 的水解

Fig. 8 Determination of hydrolysis of acetyl-CoA

3 结论

本研究从染料废水中筛选出能够转化 3,4-DCA 的菌株, 并利用其中两株菌构建混合菌群, 对混合菌群转化条件进行了优化, 并进一步通过代谢产物的分析探讨了转化机理, 得出以下结论:

(1) 通过形态学观察及 16S rDNA 序列分析, 初步推断两株菌均为铜绿假单胞菌, 混合菌群对 3,4-DCA 转化率明显高于单菌。

(2) 混合菌群对 3,4-DCA 具有较强的转化代谢潜力, 3 d 内对 100 mg/L 3,4-DCA 的转化率达到 89.26%。

(3) 混合菌群主要通过乙酰化途径转化 3,4-DCA, 代谢产物为 3,4-DCAA。

与单一菌株相比, 混合菌群对 3,4-DCA 的转化能力更强, 但机理尚不明确, 且乙酰化产物无法进一步降解, 需后续实验进一步探索。

参考文献:

- [1] ALBERS C N, BANTA G T, HANSEN P E, *et al.* Effect of different humic substances on the fate of diuron and its main metabolite 3,4-dichloroaniline in soil[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42: 8687-8691.
- [2] KUIPER J, HANSTVEIT A. Fate and effects of 3,4-dichloroaniline (DCA) in marine plankton communities in experimental enclosures[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1984, 8: 34-54.
- [3] BREUGELMANS P, LEORY B, BERS K, *et al.* Proteomic study of linuron and 3,4-dichloroaniline degradation by *Variovorax* sp. WDL1: Evidence for the involvement of an aniline dioxygenase-related multicomponent protein[J]. *Research in Microbiology*, 2010, 161: 208-218.
- [4] VARJANI S, RAKHOLIYA P, NG H Y, *et al.* Microbial degradation of dyes: An overview[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 314: 123728.
- [5] YUAN Y, ZHANG P, SCHMIDT B, *et al.* 3,4-Dichloroaniline revisited: A study on the fate of the priority pollutant in a sediment-water system derived from a rice growing region in Italy[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 574: 1012-1020.
- [6] CARVALHO G, MARQUES R, LOPES A R, *et al.* Biological treatment of propanil and 3,4-dichloroaniline: Kinetic and microbiological characterisation[J]. *Water Research*, 2010, 44: 4980-4991.
- [7] TASCIA A L, FLETCHER A. State of the art of the environmental behavior and removal techniques of the endocrine disruptor 3,4-dichloroaniline[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2018, 53: 260-270.
- [8] ZHANG T(张涛), LIU S J(刘双江), LIU Z P(刘志培). A novel metabolism pathway for the biodegradation of chloroanilines[J]. *Microbiology China (微生物学通报)*, 2007, 47(1): 83-87.
- [9] DENG L(邓林), LIU Y L(刘延岭), WANG Z Y(王忠彦), *et al.* Screening and identification of a nitrile degrading bacterium strain and its degradability[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2004, 21(12): 913-916.
- [10] ZHANG J, SUN J Q, YUAN Q Y, *et al.* Characterization of the propanil biodegradation pathway in *Sphingomonas* sp. Y57 and cloning of the propanil hydrolase gene *prpH*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 196: 412-419.
- [11] LI H(李恒), WANG D M(王大明), GONG J S(龚劲松), *et al.* Catalytic properties of resting cells from nitrilase producing microorganism *Pseudomonas putida* XY4[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2014, 31(12): 1466-1470.
- [12] WANG S J, POON K, CAI Z W. Biodegradation and removal of 3,4-dichloroaniline by *Chlorella pyrenoidosa* based on liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2013, 20: 552-557.
- [13] TRAVKIN V V M, SOLYANIKOVA I I P, RIETJENS I I M C M, *et al.* Degradation of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2003, 38(2): 121-132.
- [14] XIAO H X, KUCKELKORN J, NÜBER L K, *et al.* The metabolite 3,4,3',4'-tetrachloroazobenzene (TCAB) exerts a higher ecotoxicity than the parent compounds 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) and propanil[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 551/552: 304-316.
- [15] SONG C X(宋彩霞). Characteristics and function of S1 in degrading 3,4-dichloroaniline[D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2014.
- [16] LI T, DENG X P, WANG J J, *et al.* Biodegradation of 3,4-dichloroaniline by a novel *Myroides odoratimimus* strain LWD09 with moderate salinity tolerance[J]. *Water Air Soil Pollut*, 2012, 223: 3271-3279.
- [17] MARTINS M, RODRIGUES-LIMA F, DAIROU J, *et al.* An acetyltransferase conferring tolerance to toxic aromatic amine chemicals: Molecular and functional studies[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(28): 18726-18733.
- [18] BROOKE E W, DAVIES S G, MULVANEY A W, *et al.* An approach to identifying novel substrates of bacterial arylamine *N*-acetyltransferases[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, 11: 1227-1234.
- [19] CASTILLO J M, NOGALES R, ROMERO E. Biodegradation of 3,4-dichloroaniline by fungal isolated from the preconditioning phase of winery wastes subjected to vermicomposting[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 267: 119-127.
- [20] YAO X F, KHAN F, PANDEY R, *et al.* Degradation of dichloroaniline isomers by a newly isolated strain, *Bacillus megaterium* IMT21[J]. *Microbiology*, 2011, 157: 721-726.