

苯系化合物在硝酸盐还原条件下的生物降解性能

豆俊峰, 刘翔*

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要:运用驯化的反硝化混合菌群进行了苯系化合物(BTEX)的厌氧降解试验. 结果表明, 混合菌群能够在反硝化条件下有效降解苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯. BTEX 的降解规律符合底物抑制的 Monod 模型, 当初始浓度小于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 6 种受试基质的厌氧降解速率顺序为: 甲苯 > 乙苯 > 间二甲苯 > 邻二甲苯 > 对二甲苯 > 苯. 整个试验过程中 NO_3^- 的消耗与苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯及对二甲苯生物降解之间的摩尔比分别为: 9.47, 9.26, 11.14, 12.46, 13.36, 13.02. 混合菌群厌氧降解 BTEX 时需要 NO_3^- 为电子受体进行起始反应, 能够以 NO_3^- 或 NO_2^- 为电子受体进一步降解生成的中间产物.

关键词: 苯系物; 厌氧生物降解; 硝酸盐还原

中图分类号: X523 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2006)09-1846-07

Biodegradation of Benzene Series Compounds Under Nitrate Reducing Conditions

DOU Jun-feng, LIU Xiang

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A series of batch experiments were performed using mixed bacterial culture to investigate the biodegradability of benzene, toluene, ethylbenzene and the xylene isomers (BTEX) under denitrifying conditions. The results show that BTEX can be degraded effectively by the mixed bacterial culture. The biodegradation of BTEX could be modeled by the substrate inhibition Monod equation. When the concentrations of BTEX were less than $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the anaerobic degradation rates decreased with toluene > ethylbenzene > *m*-xylene > *o*-xylene > *p*-xylene > benzene. The ratio between the amount of nitrate consumed and the amount of the benzene, toluene, ethylbenzene, *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene degraded was 9.47, 9.26, 11.14, 12.46, 13.36 and 13.02, respectively. The electron acceptor needed in the initial anaerobic degradation of BTEX was nitrate, and then both nitrate and nitrite could be served as the electron acceptors for the further degradation of the intermediates of BTEX.

Key words: benzene series compounds; anaerobic biodegradation; nitrate reduction

地下储油罐泄漏及输油管线溢漏现象频繁发生, 导致地下水污染日渐严重, 其中单环芳烃苯系物(主要包括苯、甲苯、乙苯及二甲苯, 合称为 BTEX)污染最受人们关注^[1]. BTEX 的生物降解是一个氧化还原反应, 烃失去电子被氧化, 电子受体得到电子被还原. 地下水中许多组可作为电子受体, 包括 O_2 、 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 Mn^{4+} 、 SO_4^{2-} 、 CO_2 等, 其中 O_2 只能作为好氧菌的电子受体. 芳香烃的好氧生物降解是最快的, 然而地下含水层通常是厌氧状态或者由于有机污染物的好氧降解使氧迅速耗尽而很快变为厌氧状态, 使污染带中的好氧微生物被厌氧微生物所替代, 因此, BTEX 的厌氧生物降解比好氧生物降解更加可行且经济有效^[2]. 国外许多学者对硝酸盐还原条件下 BTEX 的厌氧降解进行深入的研究与探讨, 并取得了一定的研究成果, 如通过驯化、富集培养、筛选和基因工程等手段获得高效菌种^[3,4], 通过供应微生物生长的营养物质以加快 BTEX 污染物的降解速率^[5]; 而国内在这方面的研究比较薄弱^[6]. BTEX 的反硝化降解对于污染土壤和地下水

的原位修复均有很大意义, 在利用反硝化作用就地治理地下水 BTEX 污染时, 准确估计降解污染物所需的电子受体量尤为重要, 因为加入硝酸根的量不足会影响生物降解过程, 过量时会引起硝酸根及亚硝酸根离子的污染. 本研究从石油污染的土壤中驯化筛选出能反硝化降解 BTEX 的混合菌, 并考察了其对 BTEX 的反硝化降解性能, 以期对地下水 BTEX 污染的厌氧生物修复提供一定的理论依据和工艺思路.

1 材料与方法

1.1 菌种的驯化与筛选

取长期受石油污染的土壤 800 g, 加入 500 mL 去离子水, 向其中加入苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯各 600 μL , 混合均匀后密封厌氧

收稿日期: 2005-10-14; 修订日期: 2005-12-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(50178040)

作者简介: 豆俊峰(1975~), 男, 博士, 主要研究方向为土壤与地下水的生物修复, E-mail: doujif@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: x.liu@mails.tsinghua.edu.cn

静置5个月.向体积为100 mL的厌氧瓶内加入80 mL基础培养基、0.5 mL微量金属液和0.1 mL V_C 溶液^[3],用高纯氮气曝气3.5 h后加入40 mg Na_2S 除去残余的氧.基础培养基的组成为: NH_4Cl : 1.0 $g \cdot L^{-1}$; KH_2PO_4 : 1.0 $g \cdot L^{-1}$; $MgCl_2$: 0.1 $g \cdot L^{-1}$; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.05 $g \cdot L^{-1}$.微量金属液的组成为: $CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 30 $mg \cdot L^{-1}$; $CuCl_2$: 0.15 $mg \cdot L^{-1}$; H_3BO_3 : 5.7 $mg \cdot L^{-1}$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 20 $mg \cdot L^{-1}$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 2.5 $mg \cdot L^{-1}$; $NiCl_2 \cdot 2H_2O$: 1.5 $mg \cdot L^{-1}$; $ZnCl_2$: 2.1 $mg \cdot L^{-1}$.在充满氮气的厌氧手套箱内接种0.5 g上述静置驯化的土壤,并加入12 μL 苯系物(BTEX各2 μL),厌氧瓶于控温20℃的振荡器(100 r/min)中培养,每隔7~9 d转接1次.混合菌培养72 d(转接9次)后,通过静态试验考察其对苯系物的降解情况.

1.2 厌氧生物降解试验

共进行6组BTEX降解试验,分别以苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯作为基质.每

组试验分别设定6个不同浓度及3个对照(不加菌种、不加电子受体及改变电子受体),实验设计见表1所示.此外,再做1个只加菌种与电子受体而不加基质的对照试验.每个试验条件分别做3次平行试验,试验结果为3次平行试验的平均值.厌氧生物降解试验在体积为20 mL的厌氧瓶中进行,向厌氧瓶内加入10 mL基础培养基和0.1 mL微量金属液及试验设定的基质和电子受体浓度,然后用氟化橡胶塞密封瓶口,并用螺旋瓶盖拧紧.接种1 mL在硝酸盐还原条件下培养驯化的菌液(菌体浓度约为 10^7 个/mL).上述试验操作在充满氮气的厌氧手套箱中进行,然后将厌氧瓶于控温20℃的振荡器(100 r/min)中培养,定期测定厌氧瓶气相中苯系物浓度及液相中硝酸根离子和亚硝酸根离子的浓度.为证明在硝酸盐还原过程中是否有氮气生成,在苯系物初始浓度为25 $mg \cdot L^{-1}$ 左右时,以氩气代替氮气进行厌氧手套箱操作,试验结束后检测厌氧瓶液相中硝酸根离子和亚硝酸根离子的浓度及气相中氮气的含量.

表 1 降解试验的实验设计/ $mg \cdot L^{-1}$

Table 1 Experimental design of the degradation tests/ $mg \cdot L^{-1}$

基质类型	接种 1mL 混合菌液								接种灭活	不接种
	NO_2	NO_3	NO_3	NO_3	NO_3	NO_3	NO_3	NO_3	NO_3	NO_3
	107.6	0	101.6	247.6	496.6	998.6	998.6	998.6	247.6	247.6
苯	25.5	25.5	11.3	25.5	51.4	79.6	103.6	146.3	25.5	25.5
甲苯	26.3	26.3	10.9	26.3	49.7	82.9	102.7	148.6	26.3	26.3
乙苯	24.7	24.7	10.1	24.7	52.3	81.4	103.2	147.4	24.7	24.7
邻二甲苯	26.9	26.9	11.6	26.9	49.8	79.1	101.4	148.2	26.9	26.9
间二甲苯	25.4	25.4	10.4	25.4	49.2	79.3	98.2	153.8	25.4	25.4
对二甲苯	25.1	25.1	10.6	25.1	52.7	82.8	97.4	154.9	25.1	25.1

1.3 分析方法

苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯的浓度用岛津(Shimadzu)GC-14B气相色谱分析,分离柱为ULBON HR-1(0.25 mm×30 m)毛细管柱,检测器为氢火焰离子化检测器;分析条件为:毛细管柱100℃,进样室温度150℃,检测器温度150℃.氮气的测定用岛津(Shimadzu)GC-14C气相色谱分析,分离柱为不锈钢柱,检测器为热导池检测器,桥电流为75mA,载气为氩气.

硝酸根、亚硝酸根离子浓度用Dionex DX100型离子色谱测定,色谱柱类型为Iopac ASI4(4mm×250mm)分析柱,淋洗液为 Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ (3.5 $mmol \cdot L^{-1}$, 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$),流速1.2 mL/min.样品用0.45 μm 滤膜过滤后稀释到10 $mg \cdot L^{-1}$ 左右,取0.5 mL进样测定.

2 结果与分析

2.1 厌氧瓶密闭性和非生物降解影响的对照试验

由于BTEX具有易挥发的特点,而且BTEX的厌氧生物降解需要时间较长,所以对厌氧反应瓶的密闭性要求较高.此外,反应瓶与添加的微生物体对BTEX的吸附性造成非生物降解也需要进行试验确定.通过测定在空白对照试验条件下BTEX各组分随时间变化情况,得到了非生物降解等因素对BTEX各基质去除的影响.结果表明,在空白对照试验条件下BTEX各基质的变化情况相类似,由于篇幅所限,本文仅列出基质为甲苯时的试验结果(如图1所示).

由图1可见:①在不接种菌及接种灭活条件下,甲苯的浓度在反应时间范围内基本上没有降低,说

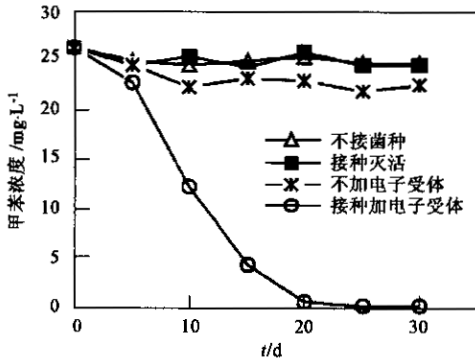


图 1 基质为甲苯时的对照试验结果

Fig. 1 Control experiment results when the substrate is toluene

究时间范围内由于泄漏或厌氧瓶及菌体吸附的基质可以忽略不计;②在接种但不加电子受体条件下,甲苯在开始有所降低,但接下来不再降低,这可能是由于在接种的 1 mL 菌体中带有少量电子受体使得开始时降解反应进行,当消耗完电子受体之后,降解反应停止;③在接种及加电子受体条件下,甲苯降解反应能够顺利进行,在 20 d 之后可以由 $26.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下. 因此,本试验中厌氧瓶所测得的 BTEX 各基质随时间变化的降解曲线可以反映出生物的厌氧降解作用.

2.2 BTEX 各基质的厌氧降解曲线

图 2 为苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯在不同初始浓度时的降解曲线. 由图 2 可以

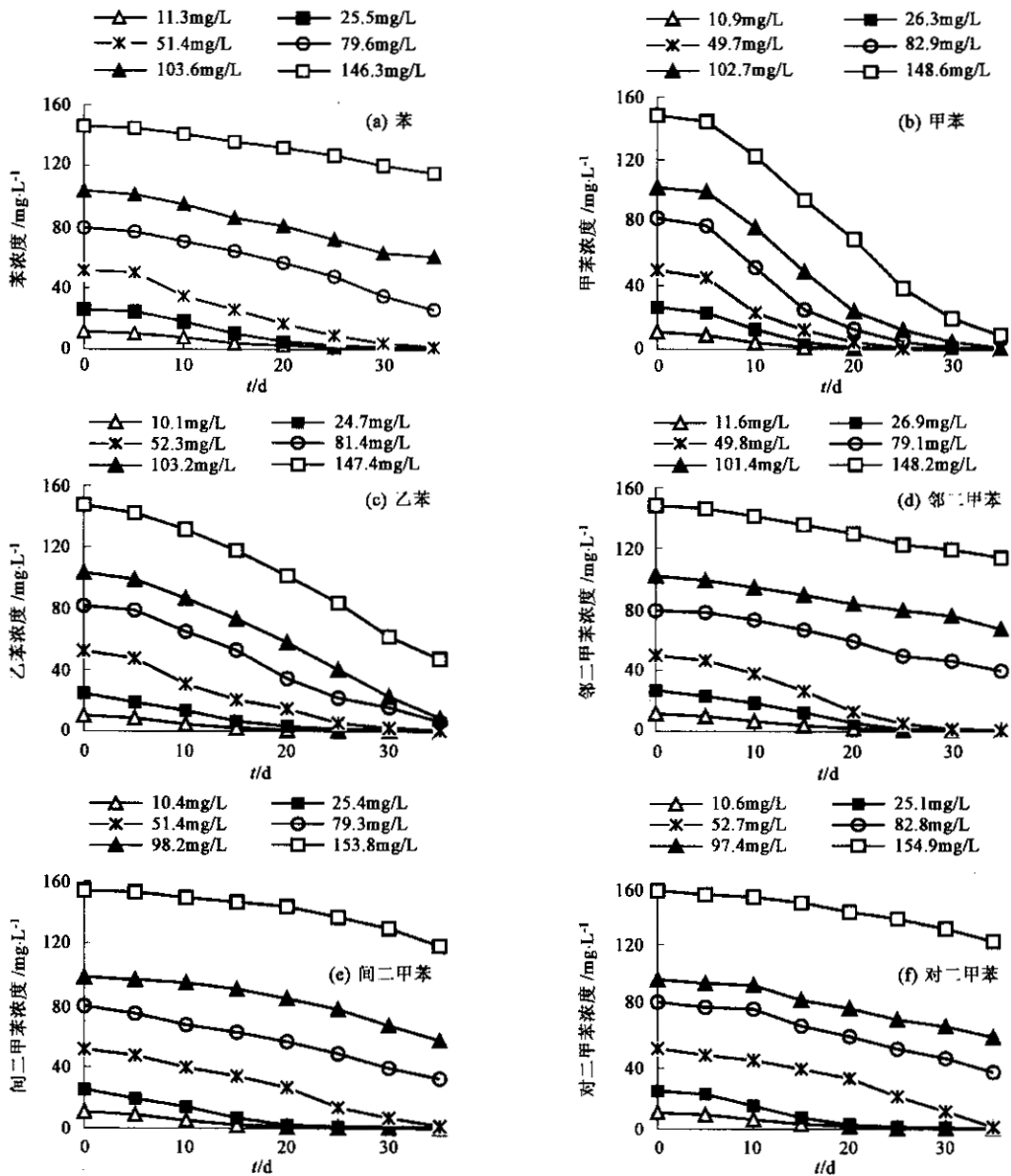


图 2 不同浓度 BTEX 的厌氧降解曲线

Fig. 2 Anaerobic biodegradation curves of BTEX at various initial concentrations

看出,随着底物初始浓度的增加,降解所需要的时间也相应延长,当底物初始浓度大于某一浓度时,底物的浓度降低明显开始减慢,这说明高浓度的底物对降解菌群产生了抑制作用。

2.3 硝酸根和亚硝酸根离子的变化曲线

图 3 为降解基质为苯时 NO_3^- 和 NO_2^- 随时间变化曲线(由于篇幅所限,其它降解基质情况未列出)。由图 3 可以看出,随着硝酸根离子浓度的降低,亚硝酸根离子的浓度增加。有报道 NO_2^- 的积累会对 BTEX 的微生物降解过程有抑制作用^[7],但本试验未发现抑制现象,即使 NO_2^- 的浓度达到 $368.92 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时也未对微生物产生抑制。对比图 2 (a)与图 3 可知,硝酸根离子浓度的降低与苯的降解之间具有一致的对应关系,这说明试验中发生了硝酸盐还原作用,混合菌群利用苯系物作为自己生长繁殖的碳源与能源,从而使其得以降解去除。然而在未接

种微生物或未加入 BTEX 基质的试验中 NO_3^- 的浓度在试验前后未发生变化,其原因是缺少降解微生物或有机碳源,硝酸盐还原作用不能发生,这可以从相反的角度证明 NO_3^- 与苯的去除之间具有一定的对应关系。

3 讨论

3.1 菌种对 BTEX 降解速率的比较分析

为了综合比较降解菌群对 BTEX 各基质的降解性能,定量描述底物浓度与降解速率之间的关系,可根据图 2 中的降解曲线计算出各底物在不同初始浓度条件下的降解速率,结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出:①当苯、邻二甲苯和对二甲苯的浓度小于 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,反应速率随着浓度的提高呈线性上升,当浓度大于 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,反应速率随着底物浓度的提高而减小,表现出了明显的底物

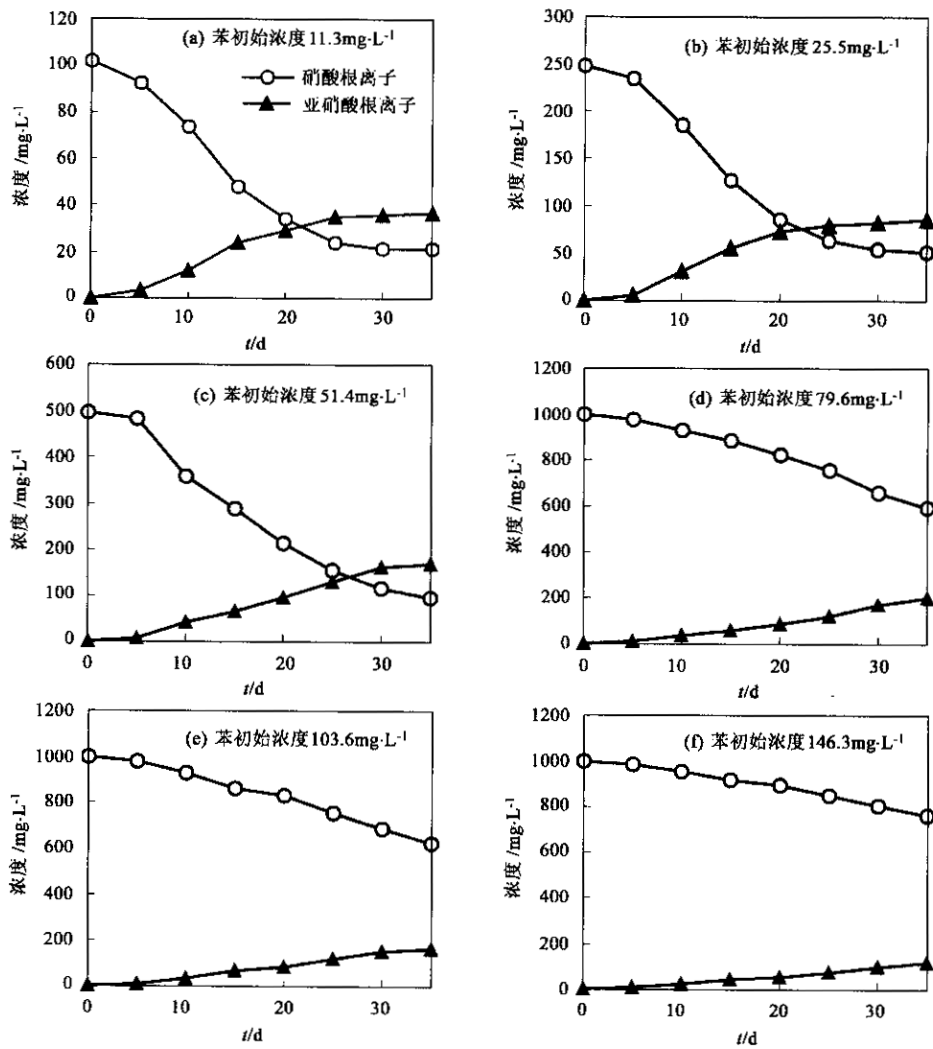


图 3 苯厌氧降解过程中硝酸根和亚硝酸根离子的变化曲线
Fig.3 Curve of nitrate and nitrite during anaerobic biodegradation of benzene

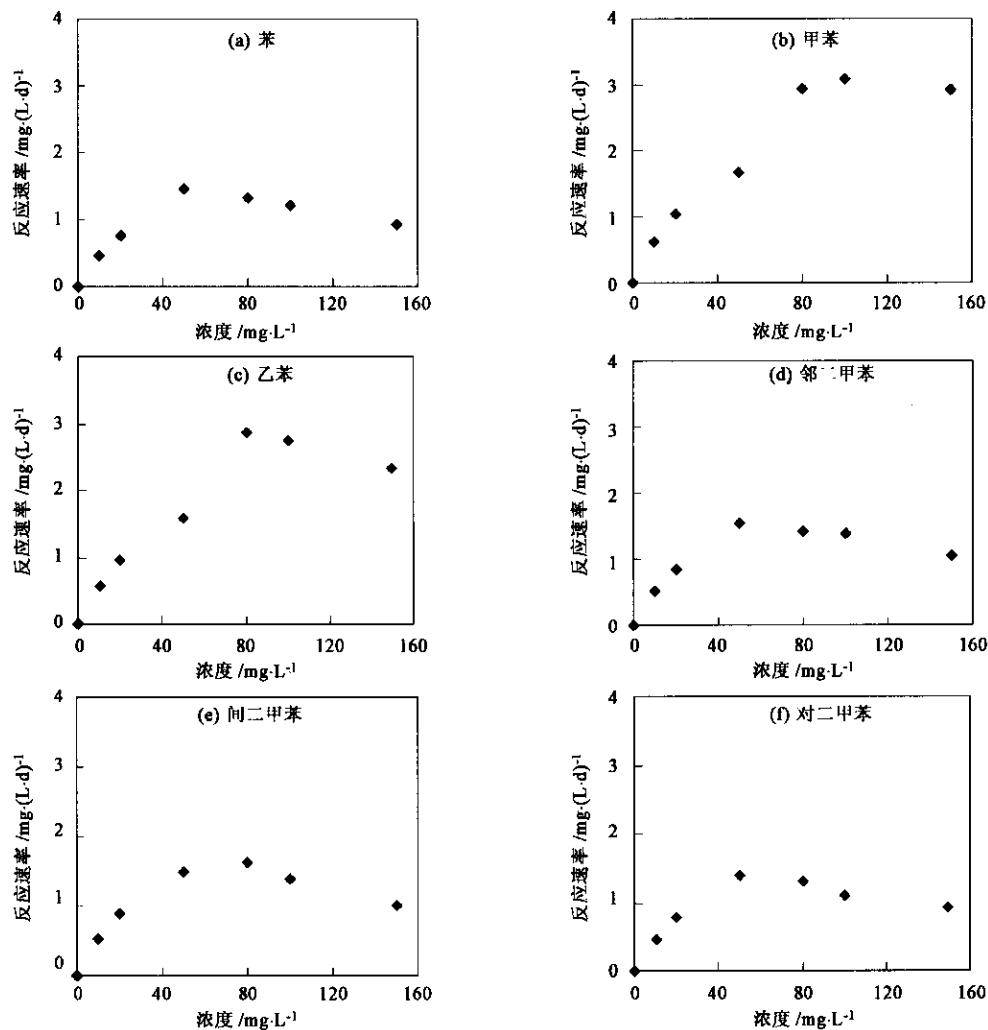


图 4 BTEX 的反应速率随浓度的变化关系

Fig. 4 Relationship between biodegradation rate and concentration of BTEX

抑制作用,这说明高浓度的苯、邻二甲苯和对二甲苯对筛选出的 BTEX 降解混合菌有抑制作用;②当间二甲苯的浓度小于 80 mg·L⁻¹时,反应速率随着浓度的增加而增加,当底物浓度大于 80 mg·L⁻¹时,反应速率随着底物浓度的提高而降低,这表明高浓度的间二甲苯对混合菌也表现出了抑制作用;③当甲苯、乙苯的浓度小于 100 mg·L⁻¹时,反应速率随着浓度的提高基本上成正比关系,当浓度大于 100 mg·L⁻¹时,反应速率不再随浓度的提高而增加;④在 6 种受试基质中当初始浓度小于 50 mg·L⁻¹时,其厌氧降解速率的顺序为:甲苯>乙苯>间二甲苯>邻二甲苯>对二甲苯>苯,这表明在反硝化条件下 BTEX 存在着降解性差异,基质降解速率与其结构及性质密切相关^[5],甲苯和乙苯最易于降解,其降解速率最快,而苯和对二甲苯的降解速率最慢。

3.2 混合菌种对 BTEX 厌氧降解过程的动力学分析

尽管筛选出的混合菌群经过 BTEX 驯化,但在 BTEX 的降解过程中,由于 BTEX 本身对微生物有一定的毒害作用,当浓度达到一定值时会对降解过程产生抑制作用.因此在建立其动力学模型时可以选择由 Andrews 提出的描述微生物菌体生长的底物抑制 Monod 模型^[8]:

$$\mu = \mu_{\max} / (1 + K_S / c + c / K_I),$$

式中, μ 为菌体生长速率[mg·(L·d)⁻¹], $\mu_{\max}$ 为无底物抑制的最大生长速率[mg·(L·d)⁻¹], c 为底物浓度(mg·L⁻¹), K_S 为底物饱和常数(mg·L⁻¹), K_I 为抑制常数(mg·L⁻¹).由于菌体的生长与基质的消耗具有一致性,因此在试验浓度范围内,6 种受试基质的降解规律可描述为^[9]:

$$v = v_{\max}/(1 + K_S/c + c/K_I)$$

式中, v 为降解速率 [$\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$], $v_{\max}$ 为最大降解速率 [$\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$]. 采用最小二乘法 and 拟牛顿法, 根据图 3 中的数据对 BTEX 各基质降解的动力学方程进行拟合, 可以得到降解动力学模型中各个参数的值, 如表 2 所示.

表 2 BTEX 各基质的降解动力学模型参数

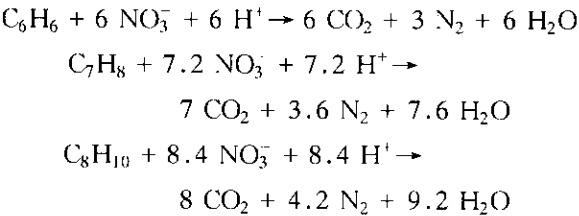
Table 2 Parameter of the kinetic model of anaerobic biodegradation of BTEX

基质类型	$v_{\max}$ / $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$	K_S / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	K_I / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
苯	2.44	55.74	92.79
甲苯	3.54	41.04	718.27
乙苯	3.43	45.21	407.86
邻二甲苯	2.73	50.04	102.62
间二甲苯	2.84	47.86	138.75
对二甲苯	2.54	54.43	89.52

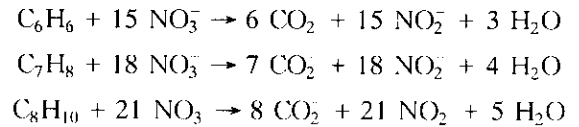
抑制常数 K_I 的值越小表明该物质对微生物的抑制性越强, 值越大抑制性越弱^[9]. 由表 2 可以看出苯和对二甲苯对该混合菌群的抑制性最强, 而该混合菌群对甲苯和乙苯表现出了很好的适应性. 底物的这种抑制性差异可能与底物对酶的作用过程有关^[10], 由于 BTEX 的厌氧降解过程首先通过生成中间产物苯甲酰辅酶 A 来进行的, 然后在苯甲酰辅酶 A 还原酶的作用下进行开环反应, 再经一系列的电子传递作用形成乙酰辅酶 A 后再进行彻底降解^[11], 但是不同的 BTEX 底物转变为苯甲酰辅酶 A 的途径不同, 这一过程是通过由不同底物诱导产生不同的酶来完成的, 该酶的产生受底物性质及其浓度的影响较大.

3.3 BTEX 反硝化降解与硝酸盐还原之间的比例关系

在 BTEX 的厌氧生物降解反应中, 硝酸根是被还原成亚硝酸根还是氮气, 是决定电子受体与降解基质比例关系的一个主要因素. 不考虑细胞生长时, 硝酸根离子被还原为氮气的反应式为:



被还原为亚硝酸根的反应式为:



根据上述反应式, 可得出各情形下 NO_3^- 还原与 BTEX 降解之间的理论摩尔比值 (如表 3 所示), 根据试验过程中硝酸根离子的消耗量与 BTEX 去除量可以计算出它们之间的实测摩尔比值, 结果见表 3.

表 3 NO_3^- 还原与 BTEX 降解之间的理论比值及实测比值

Table 3 Theoretical and experimental ratio between NO_3^- and BTEX

基质类型	还原为 N_2 的 理论比值	还原为 NO_2^- 的 理论比值	实测比值
苯	6	15	9.47
甲苯	7.2	18	9.26
乙苯	8.4	21	11.14
邻二甲苯	8.4	21	12.46
间二甲苯	8.4	21	13.36
对二甲苯	8.4	21	13.02

由表 3 可以看出, 实测比值介于 NO_3^- 还原为 N_2 与还原为 NO_2^- 的理论比值之间, 这表明 NO_3^- 还原为 NO_2^- 后, 部分 NO_2^- 又进一步还原为 N_2 . 从图 3 可知, 硝酸根离子的减少量大于亚硝酸根离子的生成量, 这从另一个侧面证明了部分 NO_2^- 还原为 N_2 . 在以氩气代替氮气进行厌氧操作的试验中, 检测到反硝化降解苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯时生成氮气的量分别为: 0.51 mg, 0.53mg, 0.46mg, 0.45mg, 0.53mg, 0.49mg, 由此可以计算出还原为氮气的硝酸根离子占参加反应硝酸根离子总量的比值分别为: 57.5%, 58.4%, 56.3%, 56.2%, 57.9%, 57.2%, 而根据生成亚硝酸根离子计算出的比值分别为: 56.4%, 57.2%, 56.1%, 56.4%, 55.7%, 56.2%, 二者非常相近. 在 BTEX 各基质的初始浓度为 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右时以亚硝酸根离子代替硝酸根离子, 其它试验条件不变, 试验结果表明未发现 BTEX 的降解, 同时亚硝酸根离子的浓度在试验前后也未发生变化, 这说明混合菌群对 BTEX 厌氧降解起始反应的电子受体只能是 NO_3^- , 而不是 NO_2^- . 但是当加入的 NO_3^- 还原为 NO_2^- 后, NO_2^- 可进一步还原为 N_2 , 这表明由 NO_2^- 还原为 N_2 的电子供体为 BTEX 降解产生的中间产物. 由此可以得出混合菌群降解 BTEX 时需要 NO_3^- 为电子受体进行起始反应, 生成的中间产物能够以 NO_3^- 或 NO_2^- 为电子受体进一步降解.

4 结论

- (1) 反硝化混合菌群能够对苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯进行有效的厌氧降解.
- (2) 混合菌群对 BTEX 的降解规律符合底物抑

制的 Monod 模型,当基质初始浓度小于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,6 种受试基质的厌氧降解速率顺序为:甲苯 > 乙苯 > 间二甲苯 > 邻二甲苯 > 对二甲苯 > 苯.

(3) 硝酸根离子消耗与苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯降解之间的实测摩尔比分别为:9.47, 9.26, 11.14, 12.46, 13.36, 13.02.

(4) 反硝化混合菌群厌氧降解 BTEX 时需要 NO_3^- 为电子受体进行起始反应,能够以 NO_3^- 或 NO_2^- 为电子受体进一步降解生成的中间产物.

参考文献:

- [1] Coates J D, Chakraborty R, McInerney M J. Anaerobic benzene biodegradation—a new area [J]. Res. Microbiol., 2002, **153**: 621~628.
- [2] Lovley D R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers [J]. J. Ind. Microbiol., 1997, **18**: 75~81.
- [3] Coates J D, Chakraborty R, Lack J G *et al.* Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas* [J]. Nature, 2001, **411**: 1039~1043.
- [4] Chakraborty R, Coates J D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, **64**: 437~446.
- [5] Boll M, Fuchs G, Heider J. Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons [J]. Curr. Opin. Chem. Bio., 2002, **6**: 604~611.
- [6] 吴玉成,钟佐荣,张建立.反硝化条件下微生物降解地下水中的苯和甲苯[J].中国环境科学,1999,**19**(6):505~509.
- [7] Lin B, Van Verseveld H W, Roling W F M. Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation [J]. Bio. Env. Science, 2002, **15**: 130~144.
- [8] Andrews J F. The Monod equation: a revisit and a generalization to substrate inhibition situation [J]. Biotech. Bioeng., 1968, **10**:707~711.
- [9] Oh Y-S, Sharcefdcen Z, Baltzis B C, *et al.* Interactions between benzene, toluene, and para-xylene (BTX) during their biodegradation [J]. Biotechnol. Bioeng., 1994, **44**: 533~538.
- [10] Heider J, Boll M, Breese K, *et al.* Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* [J]. Arch. Microbiol., 1998, **170**:120~131.
- [11] Harwood C S, Burchhardt G, Herrmann H, *et al.* Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway [J]. Fems. Microbiol. Rev., 1998, **22**: 439~458.