

甲基叔丁基醚(MTBE)降解菌株的分离鉴定及降解动力学研究

张杏青, 朱妙军, 胡勤海*, 王丹, 武丽丽

(浙江大学环境工程系, 杭州 310029)

摘要 从银杏根部土壤中分离驯化出 1 株能以 MTBE 为唯一碳源生长的菌株 A_1 。经过 16S rDNA 序列分析后, 初步鉴定该菌株为鞣酐丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)。进一步试验研究了微生物接种量、pH 值、温度、MTBE 初始浓度等环境因素对 MTBE 降解的影响。结果表明, 菌 A_1 降解 MTBE 的最佳条件为: pH 值为 7.0, 温度 25℃, 接种量 2 mL($D_{600} = 2.523$ A), 初始 MTBE 浓度为 50 mg/L。在此降解条件下, 7 d 后 MTBE 去除率最高可达 98.89%(与空白实验对比, MTBE 挥发量占 46.55%)。菌 A_1 降解 MTBE 符合高浓度底物抑制的酶促反应类型, 其基本降解动力学参数 $r_{\max} = 0.872 \text{ d}^{-1}$, $K_m = 7.832 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_s = 130.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词 MTBE; 生物降解; 鞣酐丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*); 降解动力学

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)06- -

Isolation, Identification of Methyl *Tert*-Butyl Ether Degradation Strain and Its Degradation Kinetics

ZHANG Xing-qing, ZHU Miao-jun, HU Qin-hai, WANG Dan, WU Li-li

(Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract A methyl *tert*-butyl ether degradation strain A_1 was isolated from the soil under an old Ginkgo tree. It was identified preliminarily as *Comamonas testosteroni* by 16S rDNA sequence analysis. The main factors including inoculation amount of microbes, pH, temperature and MTBE concentration that may affect the degradation efficiency of MTBE were further studied. The results indicated that the optimum conditions were as following: pH 7.0, temperature 25℃, inoculation amount of microbes was 2 mL($D_{600} = 2.523$ A), initial MTBE concentration 50 mg/L. Under that condition, MTBE can be reduced by 98.89% with seven days(compared with the blank, the volatilization of MTBE was 46.55%). In addition, the biodegradation process of MTBE can be well described by enzymatic reaction of high concentration inhibition, with the maximum substrate utilization rate 0.872 d^{-1} , Michaelis-Menten constant $7.832 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, inhibitory constant $130.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively.

Key words MTBE; biodegradation; *Comamonas testosteroni*; degradation kinetics

甲基叔丁基醚(methyl tertiary butyl ether, MTBE)是目前世界上无铅汽油中应用最广的添加剂, 可显著增加汽油辛烷值, 提高燃烧效率^[1~3]。由于 MTBE 性质稳定、水溶性较强、土壤吸附性小等特征^[4~6], 渗透到土壤、地下水中, 可造成持久性污染。随着无铅汽油的广泛使用, MTBE 在生产、运输和储存过程中泄漏排放到环境水体中的数量也在不断增加^[7,8]。同时毒理学研究表明, MTBE 是一种动物致癌物质和人体可疑致癌物质^[9~13], 美国环保署(USEPA)已将其列为优先控制污染物之一^[14]。

生物修复是一种去除环境污染物经济有效的环境治理技术^[15~18], 但是微生物降解 MTBE 速度很慢, 因此国内外研究较少。但近年来随着 MTBE 降解菌株的发现^[19~25], 微生物降解 MTBE 技术倍受关注。本实验通过采集银杏根部土样中的土著微生物进行驯化分离, 得到降解性能高的单一菌株(代号 A_1)并试验其对 MTBE 的降解效果及动力学过程,

以期为进一步研究 MTBE 生物反应器及受 MTBE 污染水体的修复提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

MTBE 及其他试剂均为分析纯。气相色谱仪为 GC-6800A 型(山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司), 配 N2000 色谱工作站, FID 检测器, 石英毛细管柱 VB-624($30 \text{ m} \times 0.53 \text{ mm} \times 1 \mu\text{m}$), DK-S24 数控电显恒温水浴槽(上海精宏实验设备有限公司), pH0140 培养箱/干燥箱(上海益恒实验仪器有限公司)。

1.2 MTBE 分析方法

实验采用顶空气相色谱法测定 MTBE, 气相色谱工作条件为: INT = 200℃, DET = 250℃, 柱温

收稿日期: 2008-07-02; 修订日期: 2008-09-08

作者简介: 张杏青(1983 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境污染修复。E-mail: zxxq916@126.com

* 通讯联系人, E-mail: zqhhu@zju.edu.cn

70℃,载气(N₂)流速 43.5 mL/min,尾吹 2 mL/min,H₂流速 40 mL/min,Air 流速 340 mL/min,进样方式为分流进样,分流比 10:1.本实验以保留时间定性,峰面积外标法定量.

1.3 土样来源

土样来百年老银杏树根部土壤,除去表层 2 cm 部分,在 2~10 cm 之间取样而得.

1.4 培养基

BSM 培养基^[26](g/L):Na₂HPO₄ 5.57,KH₂PO₄ 2.44,NH₄Cl 2.0,MgCl₂·6H₂O 0.2,MnCl₄·4H₂O 0.000 4,FeCl₃·6H₂O 0.001,CaCl₂ 0.001.

驯化培养基:BSM 培养基+50 mg/L MTBE.
富集培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2~7.4.

1.5 菌种筛选分离

称取 2 g 土壤样本接种于 100 mL 驯化培养基中,以 MTBE 为唯一碳源.驯化方式为多次投加的方式,MTBE 浓度从 20 mg/L 依次增加到 50 mg/L,并置于 25℃,150 r/min 的恒温摇床中振荡培养 7 d.每个驯化培养周期结束后,取培养液离心(4 500 r/min)10 min,收集菌体,接入到 100 mL 新鲜培养基中,开始下个周期的培养.经过 6 周的驯化培养,在含 MTBE 的平板上进行多次划线分离,纯化后挑取单一菌落接种于斜面培养基 4℃ 冰箱保存.

1.6 16S rDNA 扩增和测序

本实验 16S rDNA 扩增的 PCR 反应引物为一对通用引物,正向引物为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'.PCR 反应体系(50 μL)为:聚合酶缓冲液 5 μL,dNTP mix 4 μL,引物 2 μL,Taq 酶 0.25 μL,DNA 模板 1 μL,无菌水 37.5 μL.反应条件:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 60 s,循环 29 次,72℃ 保温 10 min.产物进行电泳检测,纯化测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成.

1.7 不同因素对 MTBE 降解的影响

(1)MTBE 初始浓度 在含有不同 MTBE 质量浓度的 BSM 培养基中,pH 值为 7.0,接入 2 mL A₁ 菌液,于(25±1)℃,150 r/min 条件下好氧培养,每隔 1 d 取样分析,7 d 后对比各自降解情况.

(2)接种量 在 MTBE 初始浓度为 50 mg/L 左右,pH 值为 7.0 的 100 mL BSM 培养基中,分别添加 0.5、2、4 和 6 mL A₁ 菌悬液(D₆₀₀=2.523 A),于(25

±1)℃,150 r/min 摇床培养,分析方法同上,7 d 后对比各自降解情况.

(3)初始 pH 值 在 pH 值分别为 3.0、5.0、7.0、8.0 和 9.0 的 MTBE 初始浓度为 50 mg/L 左右的 BSM 培养基中,接入 2 mL A₁ 菌液,于(25±1)℃,150 r/min 摇床培养,7 d 后对比各自降解情况.

(4)温度 在含 50 mg/L MTBE,pH 值为 7.0 的 100 mL BSM 培养基中,接入 2 mL A₁ 菌液,于不同温度,150 r/min 摇床培养,7 d 后对比各自降解情况.

(5)共代谢基质 在含 50 mg/L MTBE,pH 值为 7.0 的 BSM 培养基中,接入 2 mL A₁ 菌液,分别添加 2 g 乙醇和 2 g 甲苯作为共代谢基质,同时以不添加共代谢基质作对照,于(25±1)℃,150 r/min 摇床培养,7 d 后对比各自降解情况.并用紫外分光光度计检测培养液 D 值,观察细胞生长情况.

2 结果与讨论

2.1 MTBE 降解菌的分离鉴定

本实验经分离纯化后得到 1 株能耐受 50 mg/L 左右 MTBE 质量浓度的细菌菌株 A₁.A₁ 菌株在固体培养基上生长时呈浅黄色,菌落直径为 2~3 mm,圆形,低凸起,表面呈干燥,边缘刺状,皱缩型菌落,细胞呈杆状,为革兰氏染色阴性.

结合菌株的形态和 16S rDNA 测序结果,初步鉴定 A₁ 菌株为 睾酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosterone*),其系统发育树如图 1 所示.

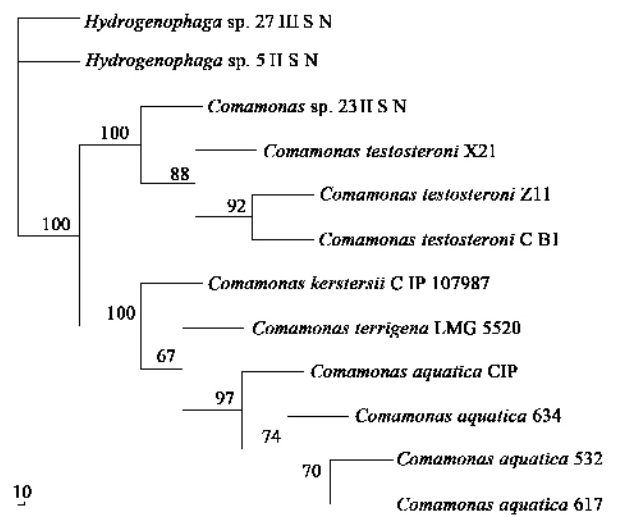


图 1 睾酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosterone*)系统发育树
Fig.1 Phylogenetic tree of *Comamonas testosterone*

2.2 初始浓度对 MTBE 降解的影响

图 2 为不同 MTBE 初始质量浓度下的降解情况

和空白对照实验(空白挥发为46.55%)。

可见,低浓度时, A_1 菌对MTBE的降解效率随着MTBE初始浓度的增大而增大,但在高浓度时,随着MTBE初始浓度的增加, A_1 菌的耐受性明显下降,降解速率也随之减小。原因可能是MTBE在低浓度时可供作基质,用于细胞生长,但在高浓度时则成为抑制剂,抑制细菌生长并干扰细菌的代谢,导致部分菌细胞的死亡,降解效率也随之下降。

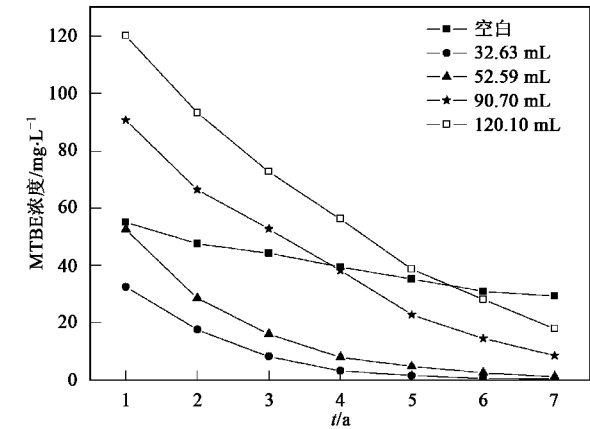


图2 初始浓度对MTBE降解的影响

Fig.2 Effect of the initial MTBE concentration on the degradation of MTBE by culture A_1

鉴于此,实际应用中,对低质量浓度(20~60 mg/L)的MTBE可直接进行生物处理,而当质量浓度较高时应先进行预处理后再进行生物处理,或者选择能耐受更高MTBE浓度的微生物进行修复治理。据此以下试验中均选择MTBE初始浓度为50 mg/L左右。

2.3 接种量对MTBE降解的影响

接种量对MTBE降解的影响见图3。

由图3可知,接种量由0.5 mL提高到4 mL,MTBE的降解率逐渐增大,但当接种量进一步增大时,MTBE降解率不再增加,反而有所下降。原因可能是本试验在密封条件下进行,总氧量一定,当菌株浓度大于一定值后,菌体间存在好氧竞争,单位菌体对应的电子受体就减少,对底物的降解率就降低。同时,菌体量过大,细胞代谢也会引起培养液环境恶化,迫使菌体降解率下降。

当接种量为2 mL和4 mL时,两者的降解速度相差明显。培养7 d后,溶液中MTBE浓度仅为初始浓度的2.21%和1.23%(MTBE挥发损失量为45.74%)。因此,本试验在不额外引入电子受体(如氧)的情况下,以添加2 mL接种量为佳。

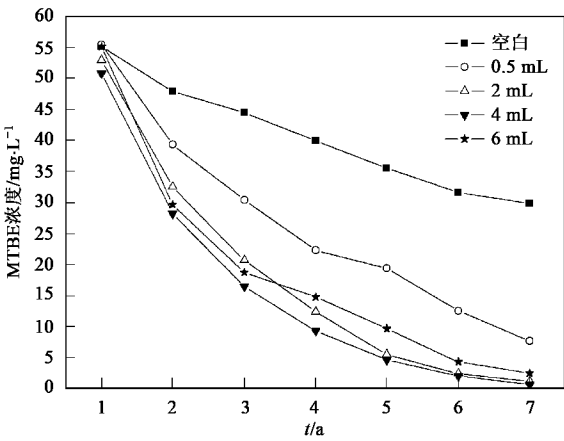


图3 接种量对MTBE降解的影响

Fig.3 Effect of inoculum on the degradation of MTBE by culture A_1

2.4 初始pH值对MTBE降解的影响

图4为不同初始pH值条件下MTBE的降解情况及空白对照实验(空白挥发损失量为44.72%)。

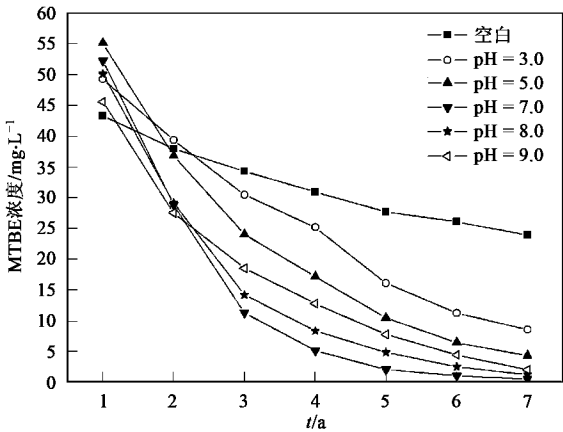


图4 pH对MTBE降解的影响

Fig.4 Influence of PH on the degradation of MTBE by culture A_1

由图4可知,当pH值为7.0时, A_1 菌对MTBE的降解率达到最大。但随着pH值的逐渐增大或降低,降解率开始下降,尤其是在 $pH < 7$ 的酸性条件下,降解率随着pH值的逐渐减小而减小的趋势较为明显。这说明 A_1 菌对碱性环境的适应性强于酸性。可见,培养液的酸碱度对生物降解有明显影响。当溶液中的pH值超过了生物酶的适应范围就有可能改变酶蛋白结构,从而抑制酶的活性。因此,过酸或过碱均不易于MTBE的降解,故在本试验中均选择初始pH值为7.0。

2.5 温度对MTBE降解的影响

温度对MTBE降解的影响见图5。从中可知,MTBE在25℃时降解效率最高,降解率可达97.78%

(与空白实验对比,MTBE 挥发量占 44.79%),35℃ 次之,5℃时最差.

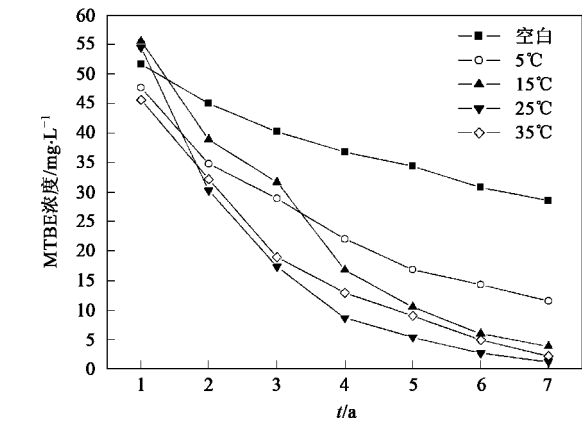


图 5 温度对 MTBE 降解的影响

Fig.5 Effect of temperature on the degradation of MTBE by culture A₁

可见,相同初始 MTBE 浓度下随着温度的升高,MTBE 的降解率也随之增加,但是当温度高于一定值后,降解率又开始下降.这是由于 MTBE 的降解主要是微生物的酶在起作用,而微生物产生的酶也有最适宜温度.低温条件下微生物生长缓慢,代谢活性差.随着温度的升高,酶的活性随之增加,当温度超过最适宜温度范围之后,酶就逐渐变性,失去活性,降解率便开始下降.因此,在本实验条件下,25℃左右为 A₁ 菌降解 MTBE 的最适宜环境温度.

2.6 乙醇、甲苯的添加对 MTBE 降解的影响

图 6 比较了乙醇、甲苯这两类物质的添加对 MTBE 降解的影响.

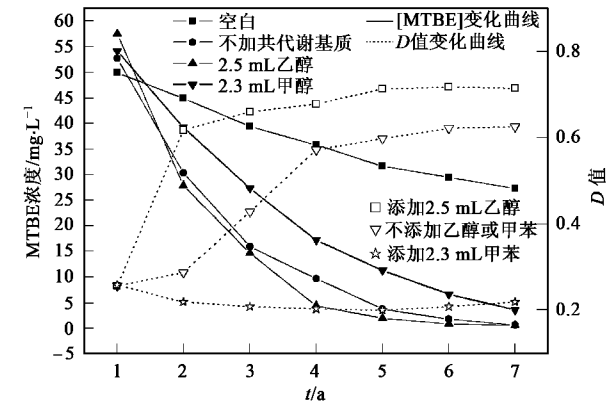


图 6 乙醇、甲苯的添加对 MTBE 降解的影响

Fig.6 Effect of the degradation of MTBE with presence of ethanol or toluene

从降解曲线看出,添加一定浓度的乙醇时,MTBE 的降解效率有一定提高.培养 7 d 后,添加乙

醇的培养液中 MTBE 浓度由 52.69 mg/L 下降到 0.63 mg/L,降解率为 98.8%(与空白实验对比,MTBE 挥发 45.36%).可见,添加一定浓度的乙醇对 MTBE 降解具有一定的促进作用.相比之下,添加甲苯的培养液中 MTBE 降解效率稍有下降,降解受到一定程度的限制.

从 D 值的变化曲线可以看出,当培养液中添加乙醇时,生物量得到迅速提高,反应第 3 d,微生物量便达到最大值,进入稳定期.可见,乙醇的添加给生物提供了足够的碳源,使生物量得到积累,从而促进了 MTBE 的去除.不添加乙醇和甲苯的培养液中微生物经过 1 d 的延滞期后,增长也较为迅速,第 4 d 就进入稳定期.可见,在接种之前,菌株经过长期的驯化培养后,已适应以 MTBE 为唯一碳源的生长环境.而添加甲苯的培养液中,细胞数相比原来还有所下降.原因可能是甲苯对微生物具有一定的毒害作用,抑制了酶的活性,使微生物产量下降,从而制约着溶液中 MTBE 的有效降解.

2.7 动力学分析

为考察 A₁ 菌降解 MTBE 的动力学方程,本试验通过 MTBE 在 0~50 mg/L 左右的浓度下进行底物浓度的酶动力学反应.结果显示不同初始质量浓度下菌株 A₁ 的降解反应符合一级动力学特征,故对 ln[MTBE] 和 t 做线性拟合,拟合结果显示了良好的线性关系,见图 7.

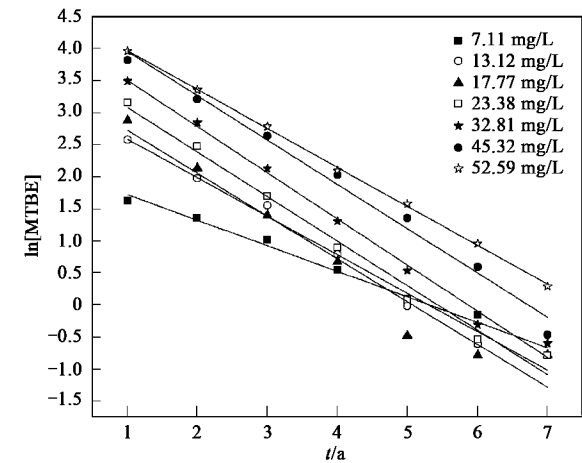


图 7 一级反应动力学线性拟合

Fig.7 First-order rate relationship between ln[MTBE] vs. time

表 1 列出了酶促反应速率常数、半衰期连同相关系数.结果显示,所得动力学方程能较好地描述 A₁ 菌降解 MTBE 的反应趋势.

表 1 A₁ 菌降解 MTBE 的实验结果分析

Table 1 Analytical result of degradation of MTBE under different initial concentrations by culture A₁

[MTBE] /mg·L ⁻¹	反应速率 k/d ⁻¹	相关系数 R ²	半衰期/t·d ⁻¹
5.04	0.398 7	0.989 6	1.613
13.12	0.600 94	0.984 7	1.202
17.77	0.668 36	0.954 7	1.103
23.38	0.695 33	0.986 5	1.057
32.81	0.720 92	0.992 6	1.02
45.32	0.691 7	0.988 4	1.062
52.59	0.608 4	0.999 3	1.19

由表 1 可知 ,在低浓度时 ,A₁ 菌反应速率随 MTBE 浓度的增大而增大 ,当 MTBE 浓度达到一定值后 ,反应速率达到最大值 ,继续增大 MTBE 浓度 ,反应速率又开始下降 .因此 ,从动力学上看 ,菌 A₁ 降解 MTBE 符合高浓度底物抑制的酶促反应类型 .方程式为 :

$$r_i = \frac{r_{\max}}{1 + \frac{K_m}{c} + \frac{c}{k_i}}$$

式中 ,*c* 为 MTBE 在溶液中的浓度(mg/L);*r_i* 为存在抑制剂时的酶促反应速率(d⁻¹);*r_{max}* 为不存在抑制剂时的最大酶促反应速率常数(d⁻¹);*K_m* 为米氏常数 ;*K_i* 为抑制常数 .

当底物浓度较低时 ,以 1/*r_i* 对 1/*c* 作图 ,如图 8 .由图中的直线斜率和截距求得动力学参数 *r_{max}* = 0.872 d⁻¹ ,米氏常数 *K_m* = 7.832 mg·L⁻¹ .当反应速率达到最大时 ,*c*² = *K_m* × *K_i* ,估算抑制常数 *K_i* = *c*²/*K_m* = 130.75 mg · L⁻¹ .因而得到 A₁ 菌 (*Comamonas testosterone*)降解 MTBE 的动力学方程为 :

$$r_i = \frac{0.872}{1 + \frac{7.832}{c} + \frac{c}{130.75}}$$

3 结论

- (1)成功地从银杏根部土壤中筛选出 1 株能降解 MTBE 的菌株 A₁ ,经初步鉴定为鞣酮丛毛单胞菌 (*Comamonas testosterone*) ,为生物降解 MTBE 提供了菌种资源 .
- (2)通过不同环境因素条件下对 A₁ 菌降解 MTBE 的特性研究 ,发现 A₁ 菌在 25℃ 时 ,pH 值为 7.0 ,MTBE 初始浓度为 50 mg/L 左右的条件下降解效果最好 .

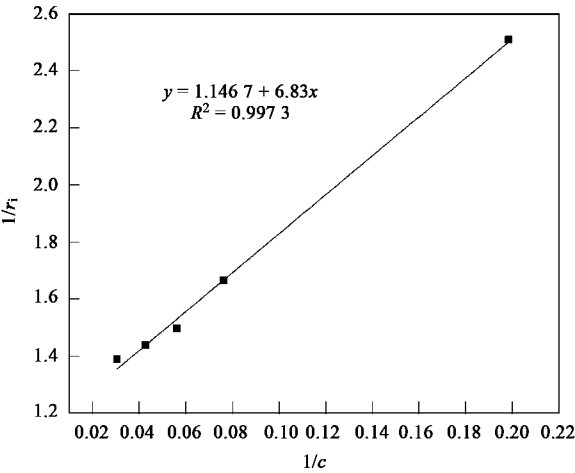


图 8 A₁ 菌在低 MTBE 浓度下 1/*c* 与 1/*r_i* 之间的关系
Fig.8 Relationship between 1[MTBE] vs. 1/*r_i* during low initial concentrations by culture A₁

(3)研究发现添加一定浓度的乙醇作为共代谢物质 ,能提高 A₁ 菌的生物积累量 ,并有利于 MTBE 降解效率的提高 .

(4)A₁ 菌降解 MTBE 的动力学方程符合高浓度底物抑制的酶促反应类型 .

参考文献 :

[1] 王理 .MTBE 装置的优越性[J].石油化工高等学校学报 ,1997 , 10(2) :18-19 .
[2] 刘俊华 ,曹祖宾 ,赵德智 ,等 .汽油抗爆剂的研究进展[J].辽宁石油化学大学学报 ,2004 ,24(3) :48-52 .
[3] Biggerstaff J P , Puil M L , Weidow B L , et al . A novel and in situ technique for the quantitative detection of MTBE and benzene degrading bacteria in contaminated matrices[J]. Journal of Microbiological Methods , 2007 , 68 :437-441 .
[4] Torsten C S , Mario S , Holger W , et al . Microbial degradation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-butyl alcohol in the subsurface[J]. Journal of Contaminant Hydrology , 2004 , 70 :173-203 .
[5] Rosell M , Lacorte S , Barcelo D . Analysis , occurrence and fate of MTBE in the aquatic environment over the past decade[J]. Trends in Analytical Chemistry , 2006 , 25(10) :1016-1029 .
[6] Martienssen M , Fabritius H , Balcke G U , et al . Determination of naturally occurring MTBE biodegradation by analysing metabolites and biodegradation by-products[J]. Journal of Contaminant Hydrology , 2006 , 87 :37-53 .
[7] Brenda N , Chisala , Nigel G T , et al . Evaluating the risks of methyl tertiary butyl ether(MTBE) pollution of urban groundwater[J]. Journal of Contaminant Hydrology , 2007 , 91 :128-145 .
[8] Kolb A , Puttmann W . Methyl *tert*-butyl ether(MTBE) in snow samples in Germany[J]. Atmospheric Environment , 2006 , 40 :76-86 .
[9] Cruzan G , Borghoff S J , DePeyster A , et al . Methyl tertiary-butyl ether mode of action for cancer endpoints in rodents[J]. Regul

- Toxicol Pharmacol ,2006 ,**22** :101-106.
- [10] Prah J , Ashley D , Blount B , *et al.* Dermal , oral and inhalation pharmacokinetics of methyl tertiary butyl ether(MTBE) in human volunteers[J]. Toxicological Sciences ,2004 ,**77** :195-205.
- [11] Yu X Z , Gu J D. Uptake , metabolism , and toxicity of methyl tert-butyl ether(MTBE) in weeping willows[J]. Journal of Hazardous Materials ,2006 ,**B137** :1417-1423.
- [12] Chen K F , Kao C M , Wang J Y , *et al.* Natural attenuation of MTBE at two petroleum-hydrocarbon spill sites[J]. Journal of Hazardous Materials ,2005 ,**A125** :10-16.
- [13] 刘爱芬 ,王德辉 ,吴振斌. 甲基叔丁基醚(MTBE)的环境毒理学研究进展[J]. 环境科学与技术 ,2005 ,**28**(5) :108-111.
- [14] Zang Y J , Farnood R. Photocatalytic Decomposition of Methyl Tert-butyl Ether in Aqueous Slurry of Titanium Dioxide [J]. Applied Catalysis B : Environmental ,2005 ,**57**(4) :275-282.
- [15] 沈德钟. 污染环境的生物修复[M]. 北京 :化学工业出版社 ,2002.
- [16] Martienssen M , Fabritius H , Stefan K , *et al.* Determin -ation of naturally occurring MTBE biodegradation by analyzing metabolites and biodegradation by-products[J]. Journal of Contaminant Hydrology ,2006 ,**87** :37-53.
- [17] Kuburovic N , Todorovic M , Raicevic V , *et al.* Removal of methyl tertiary butyl ether from wastewaters using photolytic , photocatalytic and microbiological degradation processes[J]. Desalination ,2007 ,**213** :123-128.
- [18] Schmidt T C , Schirmer M , Haderlein S B , *et al.* Microbial degradation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-butyl alcohol in the subsurface[J]. Journal of Contaminant Hydrology ,2004 ,**70** :173-203.
- [19] 钟卫鸿 ,路争 ,陈建孟 ,等. β -*Proteobacteria* 菌降解甲基叔丁基醚的条件及中间代谢产物研究[J]. 环境科学 ,2006 ,**27**(12) :2536-2542.
- [20] 张瑞玲 ,李鑫钢 ,欧志龙. 甲基叔丁基醚降解菌的驯化与筛选[J]. 环境工程学报 ,2007 ,**1**(1) :107-109.
- [21] Okeke B C , Frankenberger W T. Biodegradation of methyl tertiary butyl ether by a bacterial enrichment consortia and its monoculture isolates[J]. Microbiol Res ,2003 ,**158** :99-106.
- [22] 刘涉江 ,朱琳 ,姜斌. 甲基叔丁基醚(MTBE)的生物降解特性研究[J]. 农业环境科学学报 ,2007 ,**26**(2) :563-567.
- [23] 谢国建 ,陈效 ,方芳 ,等. 降解甲基叔丁基醚的 PM1 生物膜培养及性能研究[J]. 环境工程学报 ,2007 ,**1**(7) :15-18.
- [24] Zhong W H , Chen J M , Lu Z , *et al.* Aerobic degradation of methyl *tert*-butyl ether by a *proteobacteria* strain in a closed culture system [J]. Journal of Environmental Sciences ,2007 ,**19** :18-22.
- [25] Zhang R L , Huang G Q , Lian J Y , *et al.* Degradation of MTBE and TBA by a new isolate from MTBE-contami-nated soi[J]. Journal of Environmental Sciences ,2007 ,**19** :1120-1124.
- [26] Mo K , Lora C O , Wanken A E , *et al.* Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by pure bacterial cultures[J]. Appl Microbiol Biotechnol ,1997 ,**47**(1) :69-72. .