

Rhodococcus sp. Ns 对硝基苯酚的好氧生物降解

万年升^{1,2}, 顾继东^{1,3,4*}, 郝伏勤², 肖翔群²

(1. 中国科学院南海海洋研究所 LED 实验室, 广州 510301; 2. 黄河水资源保护科学研究所, 郑州 450003; 3. 香港大学生态学及生物多样性系, 香港; 4. 香港大学太古海洋研究所, 香港)

摘要:通过驯化富集培养, 从红树林底泥中分离出 6 株硝基苯酚降解菌, 其中 *Rhodococcus* sp. Ns 为对硝基苯酚(PNP)与邻硝基苯酚(ONP)的高效降解菌. 在好氧条件下该菌可以耐受小于 1.8 mmol/L 的 PNP, 能够利用 PNP 和 ONP 为唯一碳源、能源和氮源生长并将其完全矿化. 研究了 *Rhodococcus* sp. Ns 在不同 pH、盐度与浓度范围内, PNP 的降解特性并探讨了该菌降解 PNP 的途径. 实验得出该菌在盐度 < 5‰、pH > 5 的条件下能较快生长, 1.5 mmol/L 的 PNP 在 96h 内被完全降解, 并检测到至少 2 种中间产物 4-硝基儿茶酚(4-nitrocatechol)和 1,2,4-苯三酚(1,2,4-benzenetriol). 红树林底泥中固有的细菌对 PNP 和 ONP 具有高效降解作用.

关键词:对硝基苯酚; 邻硝基苯酚; 降解; 红球菌(*Rhodococcus* sp.)

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)02-0431-05

Degradation of *p*-nitrophenol by a Mangrove Bacterial *Rhodococcus* sp. Ns

WAN Nian-sheng^{1,2}, GU Ji-dong^{1,3,4}, HAO Fu-qin², XIAO Xiang-qun²

(1. LED, South China Sea Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Yellow River Water Resources Protection Institute, Zhengzhou 450003, China; 3. Department of Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Hong Kong, China; 4. The Swire Institute of Marine Science, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: A bacterium capable of utilizing *p*-nitrophenol (PNP) as the sole nitrogen, carbon, and energy source was isolated from mangrove sediment. This bacterium was confirmed based on 16S rDNA sequence analysis and taxonomic analysis as being a member of the genus *Rhodococcus* and was designated strain Ns. The strain Ns could tolerate high concentrations of PNP up to 1.5 mmol/L and complete degradation was achieved in four days at 30°C in the dark under aerobic conditions. Biodegradation of PNP quickly occurred at optimal pH above 5.0, and at least 5‰ salinity. Bacterial growth on PNP was observed with the simultaneous production of 4-nitrocatechol, which was also degraded by the same bacterium, as a degradation intermediate. Moreover, *Rhodococcus* sp. Ns was able to also deplete 2-nitrophenol(ONP) as the sole source of carbon, nitrogen and energy, but not 3-nitrophenol. The experimental results show that bacteria indigenous to the natural wetland sediment are capable of complete degradation of PNP and ONP.

Key words: *p*-nitrophenol; *o*-nitrophenol; degradation; *Rhodococcus* sp.

硝基芳香族有机化合物作为重要的化工原料, 广泛应用于农药、医药、合成材料、机械、染料和木材防腐等领域^[1]. 大多数硝基芳烃化合物有致癌、致畸、致突变作用^[2~4], 一些硝基化合物经过肝脏和肠道微生物代谢还可生成致癌物质和致癌物质的前体^[5~7]. 因此, 大多数硝基化合物严重影响环境安全和威胁人类健康^[8,9]. 在单硝基芳香族化合物中, 对硝基苯酚(PNP)和邻硝基苯酚(OPN)是农药、医药、合成材料、制革剂、染料和木材防腐剂等合成的主要成分^[10]. 在生产和使用的过程中进入土壤、空气和水体, 已成为环境中硝基化合物最大的污染源之一. PNP 和 OPN 在深层土壤和地下水中持留时间很长并在生物体富集, 可解除呼吸链中氧化磷酸化过程中 ATP 的形成, 浓度小于 10 $\mu\text{mol/L}$ 就能改变细胞的代谢过程^[11,12], 并对微生物、植物和动物生长和人体健康产生巨大的危害^[13], 因此美国环境保护署

(EPA)将 PNP 与 ONP 列为优先控制污染物^[14], 并且规定在自然水体的浓度低于 10 ng/L^[15]. 目前对此类污染物的处理技术是国内外研究热点之一.

硝基类芳香化合物易溶于水, 极性较强, 比较稳定, 难以用絮凝、活性炭吸附、氧化和光解等物理、化学方法彻底除去, 所以生物处理法受到人们的青睐. 硝基苯酚对生物体具有细胞毒性而且生物可降解性低, 利用生物法处理环境中硝基苯酚类污染物受到极大限制, 寻找高效降解菌成为解决生物处理硝基苯酚污染的关键. 尽管 PNP 的生物降解研究比较多, 但分离到完全矿化硝基苯酚化合物的微生物还不多, 并且大多数在低浓度情况下才有降解能力, 而

收稿日期: 2006-02-10; 修订日期: 2006-04-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601160); 国家自然科学基金委员会-水利部黄河水利委员会联合研究基金项目(50239010)

作者简介: 万年升(1970~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境与分子微生物学.

* 通讯联系人, E-mail: nianshengwan@yahoo.com.cn

利用硝基苯酚作为唯一碳源、能源和氮源生长的微生物还较少^[16~19],对近海环境中微生物降解硝基芳族化合物的研究更少^[20,21].由于工业和生活排污等原因,大量的污水与工业废水进入海洋,导致近海水域的严重污染.在近岸水体中能检测到许多酚类化合物,我国胶州湾和杭州湾表层海水中酚的含量分别高达3 mg/L和9 mg/L^[22].本实验从香港米埔红树林底泥驯化、分离、筛选出高效降解 PNP 的红球菌株(*Rhodococcus* sp. Ns),并探讨了该菌在不同浓度、pH 和盐度下,PNP 的好氧生物降解和可能的降解生化途径,以期为利用近海细菌进行环境生物修复研究打下良好的基础.

1 材料与方法

1.1 化合物及试剂

对硝基苯酚、邻硝基苯酚、间硝基苯酚(MNP)、4-硝基儿茶酚、*p*-苯醌和 1,2,4-苯三酚为美国 Aldrich Chemicals 公司(St. Louis, MO, USA)产品,纯度超过 98%.高效液相色谱的流动相甲醇为色谱纯,水为超纯水,其它试剂均为分析纯.

1.2 菌种的来源

用于本研究的微生物分离自香港米埔生态保护区红树林的底泥.由香港大学生态学及生物多样性系提供,置于冰箱保存备用.

1.3 培养基及培养方法

无机盐培养基: KH_2PO_4 0.7 g·L⁻¹; Na_2HPO_4 6.0 g·L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g·L⁻¹; 初始 pH 为 7.2 ± 0.1.

富集培养:将 5 g 红树林泥加入 50 mL 无机盐培养基中搅匀,取上清液作为接种液.在 250 mL 锥形烧瓶中加入 150 mL 无机盐培养基、1 mL 接种液、PNP (0.2 mmol·L⁻¹)作为唯一碳源、能源和氮源,将烧瓶用黑塑料包被避光置于摇床中(30.0℃ ± 0.5℃, 150 r/min)培养.富集的菌液约每 6 d 转接 1 次,每次将 10 mL 前 1 次富集的菌液转接到盛有 140 mL 新鲜无机盐培养基的烧瓶中,同时 PNP 的浓度从 0.2 mmol/L 增加到 2.1 mmol/L,如此转接 6 次以上.

菌株分离培养:将富集得到的培养菌液转接到含相应底物的固体平板培养基上,划线分离纯化,置于 30℃ ± 0.5℃ 下的培养箱中培养,如此重复直至得到纯菌株.

1.4 降解培养试验

将 0.6 mmol/L PNP 作为唯一的碳源、能源和氮

源加入上述无菌无机盐培养基中,在 150 mL 无菌无机盐培养基中加入 0.2 mL 含有 *Rhodococcus* sp. Ns 纯菌株的磷酸盐缓冲液作为接种菌,用黑塑料包被避光置于摇床中(30.0℃ ± 0.5℃, 150 r/min)培养.每个降解试验做 3 个平行样品和 3 个不接种菌株的对照样品.定期无菌操作取样,样品冷冻(-20℃)储藏待用.ONP、MNP 的生物降解试验是用 ONP、MNP 替代 PNP 作为唯一的碳源、能源和氮源,其它条件同 PNP 的生物降解试验.

1.5 分析方法

冷冻样品解冻后离心,经孔径为 0.2 μm 注射器滤膜(Pall Gelman, Ann Arbor, MI, Japan)过滤后,样品中底物的浓度用高效液相色谱(HPLC)法在 320 nm 波长用外标法进行定量.液相色谱仪为 HP1100 型,色谱柱为 Hypersil ODS C₈(4.0 mm × 125 mm, 0.5 μm),流动相为甲醇和水(水中含 0.1% 的乙酸),使用等梯度洗脱.流速 0.7 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 20 μL,二极管阵列复合波长检测器.硝基苯酚及其降解中间产物通过 HPLC 保留时间并结合其紫外吸收光谱与标准样品的吻合程度来定性.

微生物的生物量采用 UV2100 型分光光度计(上海尤尼柯公司)在 600 nm 处测其光密度值(*A*)进行定量.

1.6 16S rDNA 测序分析及菌种鉴定

细菌基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增 16S rDNA 序列引物设计参照 Wan 等描述方法^[23]进行.PCR 扩增产物使用 ABI PRISM 3100 基因分析仪(Applied Biosystems, RRC-West, MBRB 3260)进行分析测定.显微镜观察细菌革兰氏染色反应和菌体形态特征,并用 16S rDNA 法进行细菌鉴定.

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定

通过富集培养,从红树林底泥共分离纯化得到 6 株细菌,可以在 PNP 作为唯一碳源、能源和氮源的培养液中生长,其中 *Rhodococcus* sp. Ns 可在小于 1.8 mmol/L 的高浓度 PNP 中生长.经 16S rDNA 序列分析,与 GenBank 细菌 16S rDNA 序列库搜寻比较,得知该菌被鉴定为 *Rhodococcus* sp. Ns(相似性系数为 98%),*Rhodococcus* sp. Ns 是 1 种放线菌,革兰氏染色呈阳性,不形成孢子,胞外有荚膜,分枝菌酸是荚膜的主要成分,细胞在含 PNP 培养物上呈分枝状,但不是丝状.

2.2 PNP 的生物降解

当 *Rhodococcus* sp. Ns 接种到 1.5 mmol/L PNP 作为唯一碳源、能源和氮源的液体培养基中, 96 h 内培养液从开始的黄色转化为无色, 而对照组黄色维持不变, 这表明 PNP 的颜色消退是由于 *Rhodococcus* sp. Ns 作用的结果. 从图 1 可以看出, 在开始的 48 h 内, PNP 的浓度减少的速度很慢, 同时细菌 A_{600} 缓慢增加, 从 72 h 以后, PNP 的浓度迅速降低, 在 96 h 时 PNP 的浓度为 0, HPLC 检测和 UV-全波长扫描没有中间产物的积累, 与此一致细菌的生物量 A_{600} 呈直线上升, 在 96 h 时达到最大的生物量. 进一步说明 PNP 消除是 *Rhodococcus* sp. Ns 降解的结果, 该细菌可以利用 PNP 作为唯一碳源、能源和氮源生长. *Rhodococcus* sp. Ns 对高浓度的 PNP 有耐受作用, 且对 PNP 具有高效矿化能力, 因此可利用该菌治理 PNP 污染的环境.

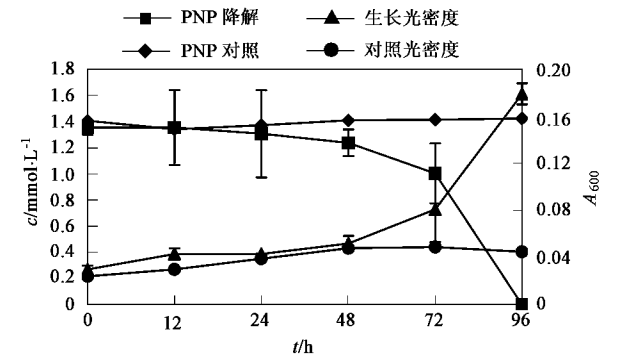


图 1 *Rhodococcus* sp. Ns 在 PNP 中的生长和降解曲线
Fig.1 Growth and degradation of PNP by *Rhodococcus* sp. Ns

分别用 0.6 mmol/L ONP 和 0.6 mmol/L MNP 作为唯一碳源、能源和氮源的上述无机盐培养液, 接种 *Rhodococcus* sp. Ns 后, 发现其不能降解 MNP, 而能够利用 ONP 生长, 表明 *Rhodococcus* sp. Ns 的降解酶具有较强的专一性.

2.3 盐度对降解 PNP 的影响

由于米埔红树林处于潮间带, 其淤泥中盐度较高且变化较大 (5‰ ~ 25‰), 因此研究了盐度对 *Rhodococcus* sp. Ns 降解 PNP 的影响. 结果显示 PNP 的降解速率在较低盐度范围内 (0 ~ 2.5‰) 随着盐度的增加而增大, 当盐度高于 2.5‰ 时其降解速率降低 (图 2). *Rhodococcus* sp. Ns 降解 PNP 的适宜盐度范围为 0 ~ 10‰, 最适盐度范围是 0 ~ 5‰. 当培养液中盐度为 2.5‰ 时, *Rhodococcus* sp. Ns 的降解速率达到最大值, 这可能与该菌在此条件下降解酶达到最大酶活有关. 试验中还发现在盐度 0 ~ 5‰ 范围里 PNP 的降解速率相差很小, 并在 48 h 里可将

0.6 mmol/L 的 PNP 完全降解, 当盐度大于 10‰ 时, 该菌对 PNP 的降解速率随盐度的增加而显著降低. 这一现象表明该菌处于高盐状态时不利于 PNP 的降解.

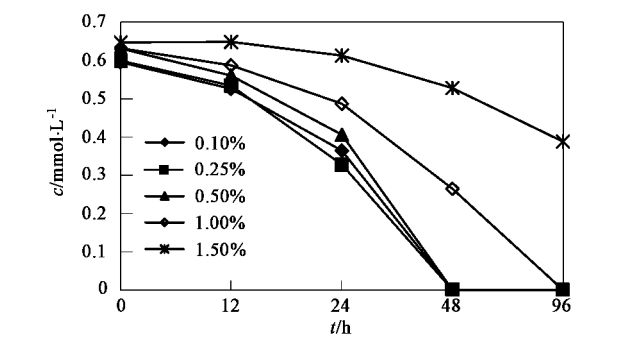


图 2 盐度对 *Rhodococcus* sp. Ns 降解硝基苯酚的影响
Fig.2 Effect of salinity on degradation of PNP by *Rhodococcus* sp. Ns

2.4 培养液 pH 值对底物降解速率的影响

Rhodococcus sp. Ns 对 PNP 的降解和培养液 pH 值之间的关系如图 3 所示. 当培养液的 pH 值从 5.0 增加到 7.0 时, PNP 的降解速率迅速增加, 在 pH = 7.0 时达到最大值. 从图 3 可以看出, 该菌降解 PNP 的最适 pH 为 7.0, 当 pH > 7.0 或 pH < 7.0 时, PNP 的降解速率降低, 并存在延滞期. Zeyer 等^[24] 报道硝基苯酚类化合物的毒性随 pH 的降低而增强, 在酸性的条件下其生物可降解性减小, 与之相反, 在碱性环境中硝基苯酚类化合物的毒性减小, 其生物可降解性提高, 从而有利于生物降解. pH 值对 *Rhodococcus* sp. Ns 降解 PNP 存在显著的影响, 在 pH 为 7.0 ~ 9.0 的环境条件中, 有利于 PNP 的生物降解.

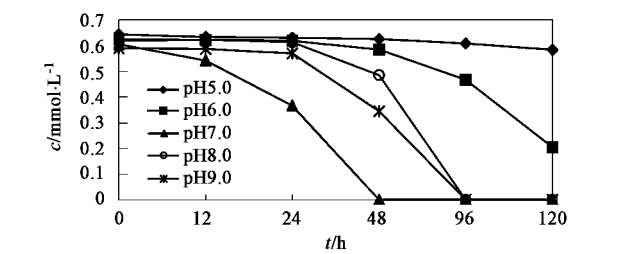


图 3 pH 对 *Rhodococcus* sp. Ns 降解硝基苯酚的影响
Fig.3 Effect of pH on degradation of PNP by *Rhodococcus* sp. Ns

2.5 PNP 浓度对降解的影响

大部分硝基化合物具有细胞毒性, 因此对 PNP 浓度与降解速率之间的关系进行了研究. *Rhodococcus* sp. Ns 降解 PNP 的速率随初始 PNP 浓

度的不同而不同, 0.6 mmol/L PNP 在 48 h 内可被该菌完全降解, 降解的速率为 0.012 6 mmol/(L·h). 当 PNP 的浓度增长为 1.5 mmol/L 时, 该菌需要 96 h 才将其完全分解, 整个生长期 PNP 的降解速率是 0.014 1 mmol/(L·h)(图 4). *Rhodococcus* sp. Ns 接种到 1.5 mmol/L PNP 的液体培养液中, 需要经过 1 个 12 h 的生长延滞期, 而且在开始的 48 h 内 PNP 降解的速度较慢, 可能与接种的菌种量较小有关, 或者是细菌接种高浓度的 PNP 培养液中, 需要调节细胞的结构与功能, 也可能是 PNP 具有毒性, 在高浓度时对细菌的生长产生抑制作用, PNP 的浓度越大, 对细菌的生长抑制作用越强. *Nocardioides* sp. NSP41 降解 PNP 的过程中, PNP 的降解速率与接种菌浓度有关, 接种的菌量越大, PNP 降解的速率越高, 细菌的延滞期缩短, 随着 PNP 的浓度升高, 细菌的生长的延滞期延长, 细菌生长缓慢, 降解 PNP 的速率减小^[25].

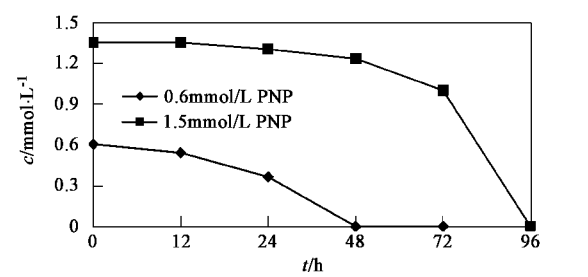


图 4 浓度对 *Rhodococcus* sp. Ns 降解硝基苯酚的影响
Fig.4 Effect of concentration on degradation of PNP by *Rhodococcus* sp. Ns

Rhodococcus 具有较强降解包括苯酚类、含氯和含硝基芳香族化合物等许多环境污染物的能力^[26, 27]. 含苯酚结构的化合物, 由于其在水中的溶解度较大, 对细菌的细胞膜有毒害作用, 当 PNP 的浓度大于 0.5 mmol/L 时可抑制大多数微生物的生长^[28]. 而 *Rhodococcus* sp. Ns 可在浓度小于 1.8 mmol/L 的 PNP 培养液里快速生长, 并且在 4 d 里将其矿化, 可以利用该菌去除环境中高浓度 PNP 污染物.

2.6 PNP 降解的中间产物与降解途径

Rhodococcus sp. Ns 接种入 PNP 培养液中, 在 0 h 时, 只有 13.206 min 1 个峰, 随着 PNP 的降解过程的进行, 在 9.003 min 和 6.836 min 出现 2 个新峰, 可能是 PNP 降解的中间代谢产物色谱峰. 根据高效液相色谱分析过程中峰的保留时间以及全波长紫外吸收光谱吸收结合分析, 发现 4-硝基儿茶酚(280 nm, 254

nm)与 1,2,4-苯三酚(240 nm, 254 nm)保留时间以及全波长紫外吸收光谱和它们相一致. *Rhodococcus* sp. Ns 在降解 PNP 的过程中, 4-硝基儿茶酚和 1,2,4-苯三酚的浓度不随 PNP 的降解而在培养液积累, 可能是细菌利用 PNP 为唯一碳源、能源和氮源生长, 降解的速度很快, 4-硝基儿茶酚和 1,2,4-苯三酚在降解过程中很快地被细菌利用. 为了进一步证实 4-硝基儿茶酚和 1,2,4-苯三酚是否是 *Rhodococcus* sp. Ns 降解 PNP 的中间代谢产物, 在上述的矿物培养液中分别加入 0.3 mmol/L 4-硝基儿茶酚作为唯一碳源、能源和氮源和 0.3 mmol/L 的 1,2,4-苯三酚为碳源与能源及 0.3 mmol/L 的亚硝酸钠为氮源, 发现对照组 4-硝基儿茶酚和 1,2,4-苯三酚的颜色与浓度保持不变, 而接入细菌的培养液中 4-硝基儿茶酚和 1,2,4-苯三酚颜色消退, 经 HPLC 分析 4-硝基儿茶酚和 1,2,4-苯三酚都被完全降解, 并且 4-硝基儿茶酚降解过程中出现 1,2,4-苯三酚中间产物. 因此, PNP 可能的降解过程为 PNP 首先在加氧酶作用下生成 4-硝基儿茶酚, 然后 4-硝基儿茶酚脱去硝基生成 1,2,4-苯三酚, 最终生成 CO₂ 和 H₂O. *Rhodococcus* sp. DK17 和 DK180 在降解苯时通过邻位双加氧酶开环^[29], 而 *Rhodococcus* sp. F1 在降解苯时通过间位开环^[30]. *Rhodococcus* sp. Ns 如何裂开芳环的机理还不清楚, 有待进一步研究.

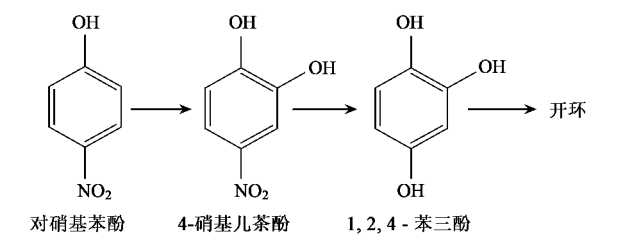


图 5 红球菌的对硝基苯酚的生物降解途径
Fig.5 Proposed biochemical degradation pathway for PNP by *Rhodococcus* sp. Ns

3 结论

通过驯化富集培养从红树林底泥分离出能够利用 PNP 和 ONP 为唯一碳源、能源与氮源生长的降解菌, 基于 16S rDNA 基因鉴定为 *Rhodococcus* sp. Ns. 该菌可以在 96 h 内将 1.5 mmol/L PNP 及其中间产物完全降解. 其可能的降解途径是首先生成 4-硝基儿茶酚, 然后脱去—NO₂ 生成 1,2,4-苯三酚, 最后生成 CO₂ 和 H₂O. 试验结果表明, 从红树林中分离的土著微生物 *Rhodococcus* sp. Ns 在盐度小于 10‰和 pH 为

中性或微碱性条件下,可以迅速地将较高浓度的 PNP 矿化为 CO_2 和 H_2O 。

参考文献:

- [1] Bhushan B, Chauhan A, Samanta S K, *et al.* Kinetics of biodegradation of p-nitrophenol by different bacteria[J]. Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, **274** (3): 626 ~ 630.
- [2] Mori M, Sayama M, Futagami M, *et al.* Mutagenicity of some hydroxylaminotoluene derivatives towards *Salmonella typhimurium* esterification systems[J]. Journal of Pharmacobio-dynamics, 1986, **9**(12): 1036 ~ 1039.
- [3] Sayama M, Mori M, Shoji M, *et al.* Mutagenicities of 2,4- and 2,6-dinitrotoluenes and their reduced products in *Salmonella typhimurium* nitroreductase- and o-acetyltransferase-overproducing Ames test strains[J]. Mutation Research, 1998, **420**(1 ~ 3): 27 ~ 32.
- [4] Spangord R J, Mortleman K E, Griffing A F, *et al.* Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and structure activity relationships of wastewater components emanating from the manufacture of nitrotoluene[J]. Environmental Mutagenesis, 1982, **4**(2): 163 ~ 169.
- [5] Decad G M, Coraichen M E, Dent J D. Hepatic microsomal metabolism and covalent binding of 2, 4-dinitrotoluene [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1982, **62**(2): 325 ~ 334.
- [6] Walia S K, Ali-Sadat S, Brar R, *et al.* Identification and mutagenicity of dinitrotoluene metabolites produced by strain *Pseudomonas putida* OU83 [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2002, **73**(3): 379 ~ 391.
- [7] Rafii F, Franklin W, Heflich R H, *et al.* Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, **57**(4): 962 ~ 968.
- [8] Dodard S G, Renoux A Y, Hawar J, *et al.* Ecotoxicity characterization of dinitrotoluene and some of their reduced metabolites[J]. Chemosphere, 1999, **38**(9): 2071 ~ 2079.
- [9] Yen J H, Lin K H, Wang Y S. Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organisms[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, **52**(2): 113 ~ 116.
- [10] Uberio V, Bhattacharya S K. Toxicity and degradability of nitrophenols in anaerobic systems[J]. Water Environment Research, 1997, **69**(2): 146 ~ 156.
- [11] Schwarzenbach R P, Stierli R, Folsom B R, *et al.* Compound properties relevant for assessing the environmental partitioning of nitrophenols[J]. Environmental Science and Technology, 1988, **22** (1): 83 ~ 92.
- [12] Shea P J, Weber J B, Overcash M R. Biological activities of 2,4-dinitrophenol in plant-soil systems[J]. Residue Reviews, 1983, **87**: 1 ~ 41.
- [13] Bruhn C, Lenke H, Knackmuss H J. Nitrosubstituted aromatic compounds as a nitrogen source for bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, **53**(1): 208 ~ 210.
- [14] Keith L H, Telliard W A. Priority pollutants I: A perspective view[J]. Environmental Science and Technology, 1979, **13**: 416 ~ 423.
- [15] Haghighi-Podeh M R, Bhattacharya S K, Qu M. Effects of nitrophenols on acetate utilizing methanogenic systems[J]. Water Research, 1995, **29**(2): 391 ~ 399.
- [16] Fernando T, Bumpus J A, Aust S D. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, **56**(6): 1666 ~ 1671.
- [17] Dickel O, Knackmuss H J. Catabolism of 1, 3-dinitrobenzene by *Rhodococcus* sp. QT-1[J]. Archives of Microbiology, 1991, **157** (1): 76 ~ 79.
- [18] Valli K, Brock B J, Joshi D K, *et al.* Degradation of 2, 4-dinitrotoluene by the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, **58**(1): 221 ~ 228.
- [19] Loeser C, Ait O M, Hertel T. Growth kinetics of the 4-nitrophenol-degrading strain *Pseudomonas putida* PNP1 [J]. Acta Biotechnologica, 1998, **18**(1): 29 ~ 41.
- [20] Boopathy R, Melancon E. Metabolism of compounds with nitrofunctions by *Klebsiella pneumoniae* isolated from a regional wetland[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, **54**(4): 269 ~ 275.
- [21] Alison B, Elie L N, Mary A M. Diversity of the ring-cleaving dioxygenase gene *pcaH* in a salt marsh bacterial community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(12): 5801 ~ 5809.
- [22] 杨桂朋, 戚佳琳. 硝基酚类化合物在海水中的光化学氧化研究[J]. 高等学校化学学报, 2002, **23**(6): 1180 ~ 1182.
- [23] 万年升, 顾继东, 黄锦辉, 等. *Achromobacter xylosoxidans* NS12 的分离和对硝基苯酚的降解[J]. 环境科学, 2007, **28**(2): 422 ~ 426.
- [24] Zeyer J, Kocher H P, Timmis K N. Influence of parasubstituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, **52**(2): 334 ~ 339.
- [25] Cho Y G, Rhee S K, Lee S T. Influence of phenol on biodegradation of p-nitrophenol by freely suspended and immobilized *Nocardioides* sp. NSP41 [J]. Biodegradation, 2000, **11** (1): 21 ~ 28.
- [26] Rehfuess M, Urban J. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, **28**(8): 695 ~ 701.
- [27] Warhurst A M, Clarke K F, Hill R A, *et al.* Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13259 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(4): 1137 ~ 1145.
- [28] Bhatti Z I, Toda H, Furukawa K. p-Nitrophenol degradation by activated sludge attached on nonwovens[J]. Water Research, 2002, **36**: 1135 ~ 1142.
- [29] Kim D, Kim Y S, Jung J W, *et al.* Regioselective oxidation of xylene isomers by *Rhodococcus* sp. strain DK17 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, **223**(2): 211 ~ 214.
- [30] Zylstra G J, McCombie W R, Gibson D T, *et al.* Toluene degradation by *Pseudomonas putida*: genetic organization of the tod operon[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54** (6): 1498 ~ 1503.