

Achromobacter xylosoxidans NS12 的分离和对硝基苯酚的降解

万年升^{1,2}, 顾继东^{1,3,4*}, 黄锦辉², 高传德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 *Achromobacter xylosoxidans* NS12 在好氧条件下可耐受小于 1.8 mmol/L 的邻硝基苯酚(ONP)或 3.0 mmol/L 的对硝基苯酚(PNP), 能以 PNP 和 ONP 作为唯一碳源、能源和氮源生长并将其完全矿化, 但该菌不能利用间硝基苯酚(MNP)作为唯一碳源和氮源生长. 研究发现 *A. xylosoxidans* NS12 在降解 PNP 和 ONP 组成的混合底物时, PNP 的存在可抑制 ONP 的降解, 同时 ONP 的存在也抑制 PNP 的降解. 此外, 在利用 PNP 和 ONP 的混合底物时, NS12 转化 PNP 的速率显著地高于转化 ONP 的速率. 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; 生物降解; *Achromobacter xylosoxidans*

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)02-0422-05

Isolation of *Achromobacter xylosoxidans* NS12 and Degradation of Nitrophenols

WAN Nian-sheng^{1,2}, GU Ji-dong^{1,3,4}, HUANG Jin-hui², GAO Chuan-de²

(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 nitrophenols-degrading bacterium, strain NS12, was isolated from a mangrove sediment by enrichment culture under aerobic conditions. Based on the analysis of 16S rDNA gene sequence the isolate was identified as *Achromobacter xylosoxidans*. Strain NS12 was able to metabolize both *o*-nitrophenol (ONP) and *p*-nitrophenol (PNP) as the sole source of carbon, energy and nitrogen. However, this strain was not able to use 3-nitrophenol (MNP) as the only source of carbon energy and nitrogen for growth. The study demonstrated that when PNP and ONP occurred as a mixed substrate PNP degradation restrained the degradation of ONP and caused the major carbon source shift from ONP to PNP. Moreover, the results showed nitrophenols could be degraded by the indigenous bacteria in mangrove sediment.

Key words: *p*-nitrophenol; *o*-nitrophenol; biodegradation; *Achromobacter xylosoxidans*

硝基苯酚是一类人工合成的、对生物生长有抑制作用、有毒且抗生物降解, 广泛应用于农业、化工、医药和染料等领域的化合物. 在硝基苯酚化合物中, 邻硝基苯酚是染料、油漆、橡胶与杀菌剂的重要原料, 而对硝基苯酚是制药、染料、制革、杀虫剂和杀菌剂的主要成分. 因此, 它们分布在工业和农业的废水或生活污水中. 此外, 在空气中, 也可通过光化学反应由苯酚或邻甲基苯酚等芳香化合物产生, 或者在生产、使用过程中, 由于微生物降解含有硝基苯酚的物质而生成^[1]. 硝基苯酚类污染物不断地在废水、河流、湖泊、土壤、空气和地下水中检出. 由于硝基苯酚化合物具有毒性和在酶作用下容易生成致癌物质亚硝基化合物或苯胺类物质, 严重地威胁人体健康和水体的安全. 美国环保局(EPA)将邻硝基苯酚(*o*-nitrophenol, ONP)和对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP)列为优先控制污染物之一, 规定其在水体中的最大浓度小于 10 ng/L^[2].

硝基苯酚类化合物具有高度稳定性和一定的水溶性, 用传统的处理污染物的物理和化学方法进行处理工艺复杂且不能完全清除污染物. 而暴露在硝基苯酚化合物环境中的微生物, 在环境的选择压力下可以降解硝基苯酚. 用生物去除法不仅能够完全降解硝基苯酚, 而且没有繁杂的前处理或抽提过程, 所以是一种理想的去除方法. 在生物降解硝基苯酚过程中, 有还原和氧化 2 种生化途径. 硝基类芳香化合物中硝基是吸电子基团, 使得苯环上的电子云密度大大下降, 使氧化酶的亲电子攻击大大受阻, 从而易于还原, 因此, 在厌氧的环境中, 降解 ONP 和 PNP 的报道较多^[3~5]. 硝基化合物对产甲烷细菌具有毒

收稿日期: 2006-03-22; 修订日期: 2006-05-11

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

性, ONP 在浓度为 50 ~ 100 mg/L 时对产甲烷菌产生抑制作用^[6], PNP 的浓度在 26.5 mg/L 可使甲烷细菌产生甲烷的量(IC_{50})减少一半^[7], 浓度为 50 mg/L 可导致甲烷细菌的停止生长并完全抑制甲烷的生成^[6]. 研究表明在还原反应途径中, 硝基苯酚的还原产物及进一步还原生成的化合物对真核细胞具有毒性和致突变性^[8,9].

硝基苯酚的细胞毒性和难生物降解性, 使单一菌株在有氧条件下很难降解 ONP 和 PNP. 因此, 细菌在有氧的条件下降解 ONP 报道很少. 尽管在有氧环境中, 已经分离出一些降解 PNP 的细菌, 但利用 PNP 作为唯一碳源和氮源生长的细菌较少, 对近海和海洋环境中降解硝基苯酚菌的研究更少, 且分离的大多数降解菌株只在低浓度下才能够发挥降解功能.

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、1, 4-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 微生物样品

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; $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ 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 °C ± 0.5 °C, 150 r·min⁻¹)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 °C ± 0.5 °C 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 °C ± 0.5 °C, 150 r·min⁻¹)培养. 每个降解试验做 3 个平行样品和 3 个对照样品. 定期无菌操作取样, 样品冷冻(-20 °C)储藏待用. ONP 和 MNP 的生物降解试验是用 ONP 和 MNP 替代 PNP 作为唯一的碳源、能源和氮源, 其他条件同 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 °C, 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(D_{600})进行定量.

1.6 16S rDNA 测序分析及菌种鉴定

将细菌接种于 LB 培养液中进行 24 h 培养, 取 1 mL 培养液, 离心收集菌体, 溶菌酶破坏细胞壁, 用酚/氯仿/异戊醇抽提, 然后 16 000 r/min 离心 5 min. 取上清液, 真空干燥后加入 50 μL 无菌蒸馏水在 -20 °C 保存备用. DNA 的浓度用 DyNA Quant 200 (Pharmacia)来测定.

用于 PCR 反应的正向引物为 5'-GAGAG TTTGA TCCTG GCTCA G-3'和反向引物是 5'-CTACG GCTAC CTTGT TACGA-3'. PCR 反应体系: 50 μL PCR 混合物中包含细菌 DNA, 0.5 μmol/L 引物各 1 μL, PCR 缓冲液(pH8.3 Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, 0.01% gelatin) 5 μL, 200 μmol/L dNTP 3 μL, Taq 聚合酶 1U. PCR 条件: 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s 如此扩增 30 个循环, 最后在 72 °C 保温延伸 10 min. 纯化后的 PCR 产物, 使用 ABI PRISM 3100 基因分析仪(Applied Biosystems, RRC-West, MBRB 3260)进行分析测定. PCR 产物的纯化和测序由香港

大学生态学与生物多样性学系完成.用显微镜观察菌体形态特征和细菌革兰氏染色反应,并用 16S rDNA 法进行细菌鉴定.

1.7 系统发育分析

将获得的部分序列与 GenBank 的核酸数据进行 BLAST 分析,再利用 ClustalX1.8 进行比对,通过 MEGA3 (<http://www.megasoftware.net>) 软件选用 Kimura 2-parameter 距离模型进行 NJ 法分析生成系统发育树,发育树用 Bootstrap 法(1000 次重复)检验.

2 结果与分析

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 株纯菌,可以利用 PNP 或 ONP 或 MNP 作为唯一碳

源、能源和氮源生长,其中 NS12 在有氧条件下可在小于 2.7 mmol/L 高浓度 PNP 中或小于 1.5 mmol/L ONP 中生长,但该菌株不能利用 MNP 为唯一碳源和氮源生长.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 *A. xylosoxidans* NS12 (相似性系数为 100%), *A. xylosoxidans* NS12 是一种无色杆菌,细胞呈杆状,革兰氏染色呈阴性,氧化酶为阳性和过氧化氢酶为阴性. *A. xylosoxidans* 在 1974 年被发现并命名为 *Alcaligenes denitrificans* 下的 *xylosoxidans* 亚种^[10],在 1974 和 1996 年重新命名为 *Achromobacter xylosoxidans* 下的 *xylosoxidans* 亚种^[10~12].根据 16S rDNA 的序列 *A. xylosoxidans* NS12 的分类地位和进化进程如图 1 所示.

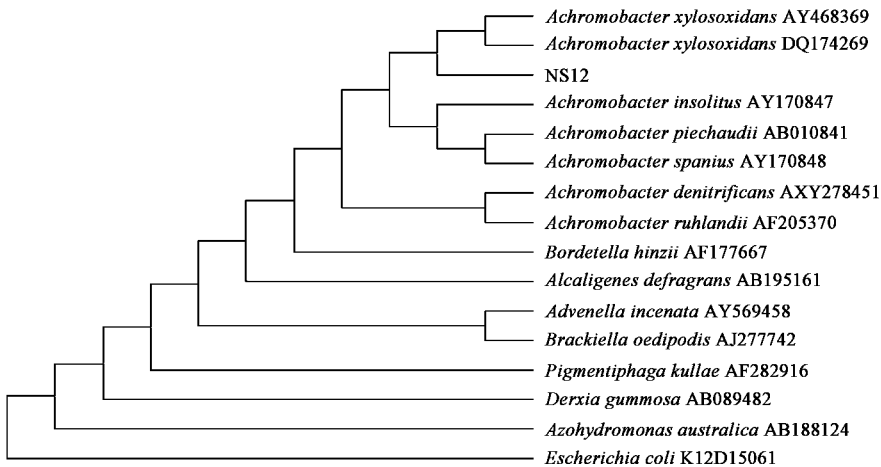


图 1 基于 16s rDNA 序列用邻位相连法构建的菌株 NS12 的系统发育树
Fig.1 Phylogenetic trees based on 16s rDNA sequences by neighbor-joining method

2.2 *A. xylosoxidans* NS12 对 ONP 的生物降解

为了验证 *A. xylosoxidans* NS12 对 ONP 是否完全降解,将该菌接入 0.5 mmol/L 含 ONP 作为唯一碳源和氮源的无机盐液体培养基中,经过 12 h 的延滞期后, *A. xylosoxidans* NS12 的生物量在 60 h 内从开始 0.035 增加到 0.105,与此同时 ONP 的浓度从起始的 0.45 mmol/L 减小到 0 (图 2),用 HPLC 检测和 UV-全光谱波长扫描没有发现中间产物的积累,而接入 *A. xylosoxidans* NS12 但不含 ONP 的对照组 D_{600} 几乎维持不变,没有接入该菌但含有 ONP 的对照组 ONP 的浓度在 21 d 没有任何改变.这表明了 *A. xylosoxidans* NS12 可以 ONP 为唯一碳源、能源和氮源生长并且将其完全降解.为了进一步证实 *A. xylosoxidans* NS12 是否完全降解 ONP,将该菌分别接入 0.6 mmol/L ONP 和 1.8 mmol/L 乙酸胺的液体培养

基中,细菌分别用它们作为唯一碳源和氮源生长,0.6 mmol/L 的 ONP 降解完全后,细菌的 D_{600} 为 0.121,而生长在 1.8 mmol/L 的乙酸胺中细菌最大 D_{600} 是 0.126. 进一步说明 ONP 可作为 *A.*

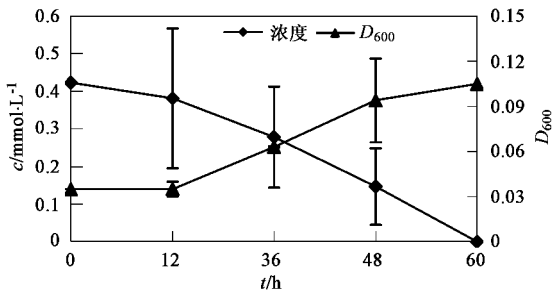


图 2 *A. xylosoxidans* NS12 在 ONP 中的生长和降解曲线
Fig.2 Growth and degradation on ONP by *A. xylosoxidans* NS12

xylosoxidans NS12 的能源并被完全利用没有多少能量损失.

2.3 *A. xylosoxidans* NS12 对 PNP 的生物降解

当 *A. xylosoxidans* NS12 接种到 0.6 mmol/L PNP 作为唯一碳源、能源和氮源的液体培养基中,96 h 时培养液从开始的黄色变化为无色,而对照组黄色保持不变,表明 PNP 的颜色变化是 *A. xylosoxidans* NS12 作用的结果.从图 3 可以看出,在开始的 72 h 内,PNP 的浓度减少的速度很慢,同时细菌生物量 D_{600} 缓慢增加,从 72 h 以后,PNP 的浓度快速降低,在 96 h 时 PNP 的浓度降低为 0,用 HPLC 检测和 UV-全光谱扫描没有发现可能的中间产物累积,与此一致细菌的生物量呈直线上升,在 96 h 时达到最大的生物量 0.111.与此同时接入 *A. xylosoxidans* NS12 不含 PNP 的对照组 D_{600} 几乎维持恒定,没有接入该菌但含有 PNP 的对照组 PNP 的浓度在 42 d 没有发生改变.这进一步说明 PNP 消除是 *A. xylosoxidans* NS12 降解的结果,该细菌可以利用 PNP 作为唯一碳源、能源和氮源生长并且能够将其完全分解.为了进一步证实 *A. xylosoxidans* NS12 是否完全转化 PNP,将该菌分别接入含 0.6 mmol/L PNP 和 1.8 mmol/L 乙酸胺的液体培养基中,细菌以它们作为唯一碳源和氮源生长,0.6 mmol/L 的 PNP 降解结束后,细菌的 D_{600} 为 0.116,24 h 时生长在 1.8 mmol/L 乙酸胺培养液中的细菌最大 D_{600} 是 0.121.进一步证明 PNP 作为 *A. xylosoxidans* NS12 的能源被完全利用并没有多少能量损失.

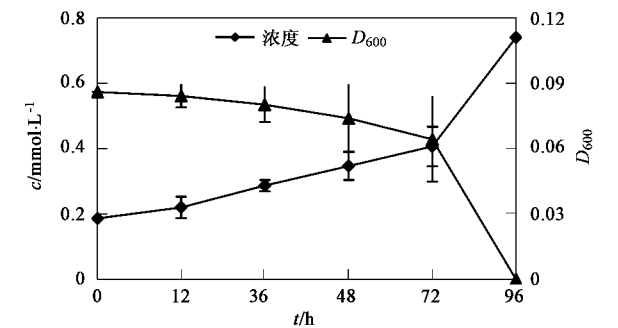


图 3 *A. xylosoxidans* NS12 在 PNP 中的生长和降解曲线
Fig.3 Growth and degradation of PNP by *A. xylosoxidans* NS12

2.4 *A. xylosoxidans* NS12 对 ONP 和 PNP 混合底物的生物降解

A. xylosoxidans NS12 能够矿化 1.5 mmol/L 的 ONP 或者 2.7 mmol/L 的 PNP,该菌是否可同时降解 ONP 与 PNP 的混合物? PNP 对 ONP 的降解是否存

在影响? 将 PNP 作为另 1 种有毒污染物加入含有 ONP 的液体无机盐培养基中, *A. xylosoxidans* NS12 可以同时降解 ONP 和 PNP.由图 4 可知,该菌株虽然同时降解 PNP 和 ONP,但在整个生长过程中降解 PNP 的速率从单一底物 0.012 mmol/(L·h)降低为混合底物中的 0.007 4 mmol/(L·h),与此同时降解 ONP 的速率也由单一底物的 0.007 1 mmol/(L·h)减小到混合底物的 0.001 4 mmol/(L·h). *A. xylosoxidans* NS12 在降解 PNP 和 ONP 的混合底物过程中,PNP 的降解可抑制 ONP 的降解,反之亦然.此外,该菌在降解 PNP 和 ONP 混合底物时,优先降解 PNP.

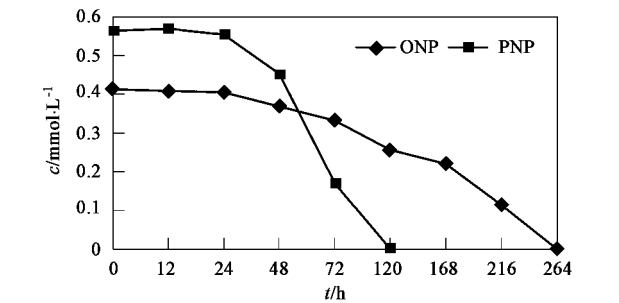


图 4 *A. xylosoxidans* NS12 降解混合底物 ONP 与 PNP 的曲线
Fig.4 Degradation of substrats of mixed ONP and PNP
by *A. xylosoxidans* NS12

3 讨论

通过富集培养从红树林的底泥中分离纯化了 6 株细菌,其中 *A. xylosoxidans* NS12 在有氧存在的条件下,可以完全降解小于 2.7 mmol/L 的 PNP 和低于 1.5 mmol/L 的 ONP,但该菌不能利用 MNP 为唯一碳源和氮源生长.由于 PNP 和 ONP 都具有对生物体的毒性,浓度高于 2.7 mmol/L 的 PNP 或大于 1.5 mmol/L 的 ONP 抑制 *A. xylosoxidans* NS12 的生长,并且在厌氧条件下降解高浓度的 ONP 和 PNP 及纯化分离单菌变得十分困难. Madhavi 等^[13]用 ONP、PNP 和 MNP 对从土壤中分离的藻类和蓝细菌进行毒性实验研究,发现藻类的 EC_{50} 值为 50 ~ 128 μ g/mL,蓝细菌的 EC_{50} 值是 32 ~ 82 μ g/mL.由于沿海许多地区没有对工业废水和生活污水的排放进行严格地限制,大量的废水与污水进入海洋,导致近海水域的严重污染. *Alcaligenes* 细菌可降解芳香族物质多环芳烃、苯酚和氯代苯酚^[14~16].到目前为止,还没有关于 *Alcaligenes* 细菌降解 ONP 与 PNP 的报道.而对 PNP 的有氧降解,已经报道有 2 种降解生化途径. PNP 在氧化酶作用下直接脱去 $-NO_2$, 分别生成 1,2,4-苯

三酚或 1, 4-苯醌^[17,18]. 对于 ONP, Zaidi 等^[19]发现 *Pseudomonas putida* B2 菌株在儿茶酚-1, 2-氧化酶的催化下, ONP 直接脱去硝基生成亚硝酸和儿茶酚. *A. xylosoxidans* NS12 降解 PNP 和 ONP 是否遵从上述同样的降解途径还有待进一步研究.

在污染的环境中, 有机污染物常常和其它自然界固有的或人工合成的有机物共同存在. 在污染的水体或土壤里, 通常包含有多种有毒的污染物, 一些有机污染物的降解动力学可能会由于其它污染物的存在而发生变化^[20]. 因此, 降解菌一个重要的特性是在其它的有毒污染物存在时, 目标污染物的降解能力是否依然存在、发生变化和如何改变是一个倍受关注的问题. 工业生产 PNP 过程中, 伴随着 ONP 的生成, 反之亦然. 所以, 研究 PNP 对 ONP 降解的影响具有重要的应用价值. ONP 作为一种常见的污染物广泛地存在各种工业废水和污水中, 与 PNP 相比, 微生物似乎更难降解 ONP. PNP 对混合底物中 ONP 降解的影响是首次进行研究. 当 ONP 和 PNP 的混合底物作为唯一碳源和氮源时, NS12 可以同时降解 PNP 和 ONP, 但是与 ONP 和 PNP 的单一底物作为唯一碳源及氮源相比, ONP 和 PNP 的降解速率都有所下降. 这可能因为有毒化合物的总浓度升高的结果^[19]. 已有研究报道, 当苯酚和 PNP 共同存在时, 苯酚和 PNP 的降解速率也同时降低, 并且 PNP 的降解动力学随着其它有毒化合物的浓度和微生物的种类发生改变^[20]. 同样的结果也在苯酚和 2, 4-二氯苯酚的混合底物的分批反应器转化中发现, 苯酚的存在可抑制 2, 4-二氯苯酚的降解, 从而导致 2, 4-二氯苯酚的去除率下降^[16].

4 结论

通过富集培养从红树林的底泥中分离纯化筛选出 *A. xylosoxidans* NS12 菌株, 其可利用 PNP 或 ONP 单一底物或者 PNP 和 ONP 混合底物作为唯一碳源和氮源进行生长, 并且能够将它们完全降解. 基于 16S rDNA 基因对该菌株的分类地位进行探讨, 为利用近海中土著菌群修复越来越严重的环境污染提供基础.

参考文献:

[1] Olariu R I, Klotz B, Barnes I, *et al.* FT-IR study of the ring-retaining products from the reaction of OH radicals with phenol, *o*-, *m*-, and *p*-cresol[J]. Atmos. Environ., 2002, **36**: 3685 ~ 3697.
[2] Environmental Protection Agency. Ambient water quality for nitrophenols[S]. 1980, EPA-440/5 80-063.

[3] Karim K, Gupta S K. Biotransformation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors[J]. Bioresour. Technol., 2001, **80**: 179 ~ 186.
[4] Karim K, Gupta S K. Effects of alternative carbon sources on biological transformation of nitrophenols[J]. Biodegradation, 2002, **13**: 353 ~ 360.
[5] Karim K, Gupta S K. Continuous biotransformation and removal of nitrophenols under denitrifying conditions[J]. Water Res., 2003, **37**: 2953 ~ 2959.
[6] Johnson L D, Young J C. Inhibition of anaerobic digestion by organic priority pollutants[J]. J. Water Pollut. Control Fed., 1983, **55**: 1441 ~ 1449.
[7] Kuscu O S, Sponza D T. Performance of anaerobic baffled reactor (ABR) treating synthetic wastewater containing *p*-nitrophenol[J]. Enzyme Microb. Technol., 2005, **36**: 888 ~ 895.
[8] Honeycutt M E, Jarvis A S, McFarland V A. Cytotoxicity and mutagenicity of 2, 4, 6-trinitrotoluene and its metabolites [J]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 1996, **35**: 282 ~ 287.
[9] Cutright T J, Lee S G. *In-situ* soil remediation-bacteria or fungi [J]. Energy Sources, 1995, **17**: 413 ~ 419.
[10] Yabuuchi E, Yano I, Tanimura E, *et al.* Description of *Achromobacter xylosoxidans* Yabuuchi and Ohya 1971[J]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1974, **24**: 470 ~ 477.
[11] Yabuuchi E, Kawamura Y, Kosako Y, *et al.* Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian *et al.*) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov.[J]. Microbiol. Immunol., 1998, **42**: 429 ~ 438.
[12] Duggan J M, Goldstein S J, Chenoweth C E, *et al.* *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature[J]. Clin. Infect. Dis., 1996, **23**: 569 ~ 576.
[13] Madhavi D R, Umamaheswari A, Venkateswarlu K. Effective concentrations of nitrophenolics toward growth yield of selected microalgae and cyanobacteria isolated from soil[J]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 1995, **32**: 205 ~ 208.
[14] 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.
[15] Cutright T J, Lee S G. Remediation of PAH-contaminated soil using *Achromobacter* sp.[J]. Energy Sources, 1994, **16**: 279 ~ 287.
[16] Quan X C, Shi H C, Zhang Y M, *et al.* Biodegradation of 2, 4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp.[J]. Separ. Purif. Technol., 2004, **34**: 97 ~ 103.
[17] Spain J C, Gibson D T. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp.[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57**: 812 ~ 819.
[18] Jain R K, Dreisbach J H, Spain J C. Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1, 2, 4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1994, **60**: 3030 ~ 3032.
[19] Zaidi B R, Mehta N K. Effects of organic compounds on the degradation of *p*-nitrophenol in lake and industrial wastewater by inoculated bacteria[J]. Biodegradation, 1995, **6**: 275 ~ 281.
[20] Menke B, Rehm H J. Degradation of mixtures of monochlorophenols and phenol as substrates for free and immobilized cells of *Alcaligenes* sp. A7-2[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, **37**: 655 ~ 661.