

酚降解菌株的分离、鉴定和在含酚废水生物处理中的应用

任河山, 王颖, 赵化冰, 蔡宝立*

(南开大学微生物学系 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要: 从石油化工厂的活性污泥和废水混合物中分离到 10 个降解酚的细菌菌株, 经 16S rRNA 基因序列分析, 5 个菌株(PD1、PD2、PD6、PD7 和 PD39)被鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.), 4 个菌株(PD4、PD5、PD8 和 PD9)为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.), 1 个菌株(PD3)为丛毛单胞菌(*Comamonas* sp.). 对假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)PD39 菌株的酚降解特性、最适生长条件、降解底物的范围、儿茶酚 1, 2-双加氧酶(C12O)和儿茶酚 2, 3-双加氧酶(C23O)活性、含酚废水的生物处理等, 进行了详细研究. 结果表明, PD39 菌株的最适生长和降解条件是, 培养基的起始 pH 为 7.0, 培养温度为 30℃, 酚浓度为 800 mg/L, 对酚的最大降解浓度为 1 200 mg/L. 酚浓度为 637 mg/L 的工业废水经 72 h 处理酚的去除率达到 99.96%. PD39 菌株有很好的应用潜力来作含酚废水活性污泥处理系统的强化菌株.

关键词: 酚; 生物降解; 假单胞菌 PD39; 废水; 生物处理

中图分类号: X172; X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0482-06

Isolation and Identification of Phenol-degrading Strains and the Application in Biotreatment of Phenol-Containing Wastewater

REN He-shan, WANG Ying, ZHAO Hua-bing, CAI Bao-li

(Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Ten phenol-degrading bacterial strains were isolated from mixture of activated sludge and wastewater of a petroleum chemical plant. The five isolates(PD1、PD2、PD6、PD7 and PD39) were identified as *Pseudomonas* sp., the four (PD4、PD5、PD8 and PD9) as *Acinetobacter* sp., and the one (PD3) as *Comamonas* sp. by 16S rDNA sequence. Biodegradation characteristics of phenol, optimal conditions for growth, substrate range, activities of catechol 1, 2-dioxygenase and catechol 2, 3-dioxygenase, and biotreatment of phenol-containing wastewater of *Pseudomonas* sp. PD39 were investigated in detail. The results indicated that the optimal conditions for growth and degradation of strain PD39 are beginning pH of medium 7.0, growth temperature 30℃, concentration of phenol 800 mg/L. PD39 was capable of metabolizing phenol at concentrations up to 1 200 mg/L and removing 637 mg/L in industrial wastewater by 99.96% in 72 h. This strain possesses a good application potential as a bioaugmentation strain in the activated sludge system for treatment of phenol-containing wastewater.

Key words: phenol; biodegradation; *Pseudomonas* sp. PD39; wastewater; biotreatment

苯酚(酚)是炼焦、炼油、制药、塑料、造纸和纺织等工业废水中一种常见的单环芳香烃污染物, 已被我国列入环境优先污染物名单. 用微生物降解法清除工业废水中的酚, 不仅经济、安全, 而且残留少, 无二次污染, 其应用前景被看好. 目前, 在含酚工业废水的生物处理中主要用活性污泥法, 将经过酚驯化的活性污泥投放到生化处理池中, 在好氧条件下污泥中的微生物对酚进行氧化分解. 活性污泥法的优点是它含有多种微生物, 除了能降解酚以外, 还能去除其它有机物. 其缺点是微生物对酚的耐受性和降解能力不是很高, 所以酚浓度较大的废水需要稀释后才能进行处理, 而且处理时间较长, 成本较高. 为了克服这些缺点, 可以采用生物强化法, 向活性污泥处理系统中投放高效酚降解菌, 提高对酚的耐受浓度和酚的去除率, 以及缩短处理时间^[1,2]. 为此, 分离

高效酚降解菌株引起广泛重视.

到目前为止, 已经从 10 多个细菌属中分离到降解酚菌株, 如 *Acinetobacter*^[3], *Alcaligenes*、*Arthrobacter* 和 *Klebsiella*^[4], *Azoarcus*^[5], *Bacillus*^[6], *Burkholderia*^[7], *Geobacillus*^[8], *Ochrobactrum*^[9], *Pseudomonas*^[10], *Ralstonia*^[11], *Rhodococcus*^[12], *Trichosporon*^[13], *Variovorax*^[14]. 最常见的酚降解菌是假单胞菌(*Pseudomonas*)和不动杆菌(*Acinetobacter*), 它们对酚的最大降解浓度一般在 1 200 mg/L 以下^[8,10,12]. 本研究从石油化工厂的活性污泥和废水混合物中分离并鉴定了 10 个降解酚的细菌菌株, 并对其中的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)PD39 菌株的降解特性和含酚废

收稿日期: 2007-03-28; 修订日期: 2007-06-12

作者简介: 任河山(1981~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物降解与环境生物技术, E-mail: heshanren2000@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: caibaoli@nankai.edu.cn

水的生物处理进行了详细分析.

1 材料与方法

1.1 培养基

用于酚降解菌分离和培养的无机盐(MM)培养基(g/L): KH_2PO_4 0.9, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4, 微量元素 1 mL^[15], 121℃ 高压灭菌 15 min, 冷却至室温后加入酚至终浓度为 500 mg/L.

1.2 酚降解菌的分离

用富集培养法分离酚降解菌株.将 10 g 天津石油化工厂的活性污泥和废水混合物加入到 50 mL 液体 MM 培养基中, 30℃ 振荡培养 2 d, 取 10 mL 培养液接种新的 50 mL 液体 MM 培养基, 30℃ 振荡培养 2 d, 然后重复接种和培养 3 次, 每次酚浓度提高 100 mg/L, 最后 1 次达到 800 mg/L. 选择浊度最大的培养液稀释后涂酚平板, 30℃ 培养 2 d, 长出的单菌落在酚平板上划线纯化 2 次, 得到纯培养菌株.

1.3 菌株鉴定

用 PCR 方法扩增分离菌株的 16S rRNA 基因, 插入 pUCm-T 载体(上海生工公司), 转化 *E. coli* DH5 α , 送北京三博志远公司测序, 所得序列与 GenBank 的 16S rRNA 基因序列进行 blast 比对, 初步确定其属名. 所用 PCR 引物: 27F, 5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3'; 1492R, 5'-CGGYTACCTTGTTACGAC TT-3'. PCR 反应条件见文献[16].

1.4 酚浓度测定

酚在酸性或中性溶液中于 270 nm 波长处有最大吸收峰而且比较稳定, 并且在 10~50 mg·L⁻¹ 浓度范围内有良好的线性关系, 所以本研究采用紫外分光光度法在波长 270 nm 处直接测定酚含量. 先制备酚浓度为 10~50 mg·L⁻¹ 的标准曲线, 将菌液离心除去菌体, 加水稀释, 控制酚浓度在 50 mg·L⁻¹ 以下, 测定 D_{270} , 通过标准曲线计算酚浓度^[17].

1.5 酚羟化酶大亚基基因的克隆和序列分析

用下列 PCR 引物扩增 PD39 菌株酚羟化酶大亚基基因的中心区: Phe1, 5'-AGGCATCAAGATCACC GACTG-3'; Phe2, 5'-CGCCAGAACCATTATCGATC-3'^[18]. PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物经纯化后插入 pUCm-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 送北京三博志远公司测序, 所得序列与 GenBank 中的类似序列进行 blast 比对.

1.6 最适生长条件筛选以及生长和降解曲线绘制

通过测定培养液的 D_{600} 来确定生长条件的好坏, D_{600} 值越高, 表明生长条件越好. 在确定最适温度实验中, 培养基的 pH 为 7.0, 酚浓度为 800 mg/L; 在确定最适 pH 实验中, 培养温度为 30℃, 酚浓度为 800 mg/L; 在确定最适酚浓度实验中, 培养基的 pH 为 7.0, 培养温度为 30℃; 在试验盐浓度对酚降解的影响时, 培养基 pH 为 7.0, 培养温度为 30℃, 酚浓度为 800 mg/L. 在最适生长条件下培养细菌, 定时取样, 测定 D_{600} 和酚残留率, 以时间(h)为横坐标, D_{600} 和酚残留率(%)为纵坐标, 绘制生长和降解曲线. 上述实验都使用 250 mL 三角瓶, 装 80 mL 含酚液体培养基, 菌株接种量为 2%(体积分数), 摇床转速为 180 r/min.

1.7 降解底物筛选

用其它单环芳香烃(苯甲酸、苯乙酸、对羟基苯甲酸等)代替酚作为细菌的唯一碳源, 制备液体培养基, 按 2%(体积分数)接种量接种, 振荡培养 2 d, 观察菌株是否生长, 测定 D_{600} , 以时间(h)为横坐标, D_{600} 为纵坐标, 绘制生长曲线.

1.8 儿茶酚 1,2-双加氧酶(C12O)和儿茶酚 2,3-双加氧酶(C23O)活力测定

测定方法见文献[3,7]. 1 个酶活单位定义为每 min 产生 1 μmol 产物所需要的酶量. 蛋白质测定方法见文献[19].

1.9 含酚废水的生物处理

将取自石家庄某制药厂的含酚废水分别加入 10%、20%、30%、40% 和 50% 的去离子水, 然后加入 1/10 体积的 5 倍浓度无酚 MM 培养基, 调解 pH 到 6.5~7.0, 接种 1/10 体积的 PD39 菌株过夜培养物, 30℃ 振荡培养 72 h, 测定酚残留量.

2 结果与讨论

2.1 酚降解菌株的分离和鉴定

用富集培养法, 从天津石油化工厂的活性污泥和废水混合物中分离到 40 个酚降解菌株, 对其中降解活力较高且稳定的 10 个菌株(PD1~PD9 和 PD39)进行了 16S rRNA 基因鉴定, 并对降解性能最好的 PD39 菌株进行了最适生长条件、底物范围、耐盐程度、C12O 和 C23O 活力、工业废水处理等进行了详细研究. 16S rRNA 基因鉴定结果表明, PD1、PD2、PD6、PD7 和 PD39 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中多个假单胞菌(*Pseudomonas*)的 16S rRNA 基因序列的同源性在 99% 以上, 所以它们被鉴定为

Pseudomonas sp.. 图 1 是这 5 个菌株及相关菌株的基于 16S rRNA 基因的系统进化树. PD4、PD5、PD8 和 PD9 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中多个不动杆菌(*Acinetobacter*)的 16S rRNA 基因序列的同源性在 97% 以上, 所以它们被鉴定为 *Acinetobacter* sp.. PD3 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中的丛毛单胞菌(*Comamonas*)WAB1945 的 16S rRNA 基因序列有 99.8% 的同源性, 所以它被鉴定为 *Comamonas* sp.. 在丛毛单胞菌属中发现酚降解菌, 本研究为首次报道. 上述 10 个菌株(PD1 ~ PD9 和 PD39)的 16S rRNA 基因序列 GenBank 注册号分别是 EF392658、EF412968、EF373535、EF412969、EF412970、EF412974、EF412971、EF412972、EF412973 和 DQ836052. PD39 的酚降解能力最强, 最大降解浓度为 1 200 mg/L. 降解能力最差的是 PD3, 最大降解浓度为 800 mg/L. 其它 8 个菌株在酚浓度为 1 000 mg/L 时, 能正常生长和降解.

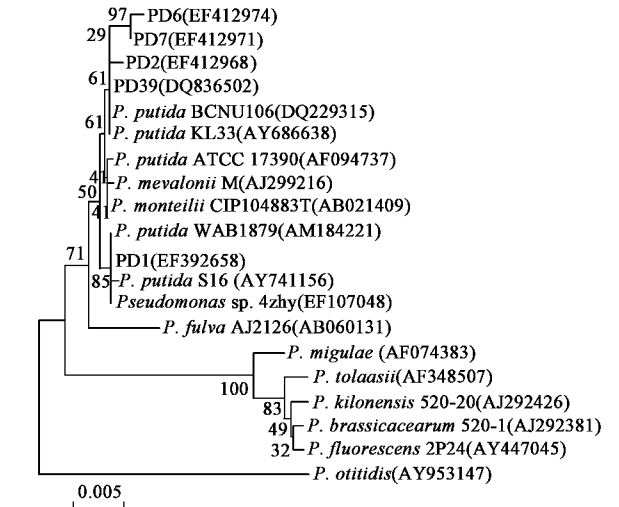


图 1 PD39 和其它相关菌株基于 16S rDNA 序列的系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of PD39 and its related strains

2.2 酚羟化酶大亚基基因的中心区序列

酚降解途径的第 1 步反应是在酚羟化酶的催化下, 将酚氧化成儿茶酚, 然后通过间位或邻位开环进一步降解. 大多数酚降解菌的酚羟化酶由 6 个亚基组成, 在 *Pseudomonas* sp. CF600 菌株中, 该酶的编码基因是 *dmpKLMNOP*, 其中 *dmpN* 编码由 517 个氨基酸残基组成的酚羟化酶大亚基^[20]. 研究表明, 从环境中分离的各种酚降解菌的酚羟化酶大亚基具有很高的保守性^[18]. 用 Phe1 和 Phe2 引物扩增的 PD39 菌株的酚羟化酶大亚基基因中心区的大小为 684 bp,

GenBank 注册号为 DQ852625. 与 GenBank 中相同基因的序列比对表明, PD39 的酚羟化酶大亚基基因中心区的核苷酸序列与其它假单胞菌相比, 同源性都在 80% 以上, 其中与 *Pseudomonas* sp. CF600 菌株的同源性最高, 为 99.7%. 但是, 与非假单胞菌来源的酚羟化酶大亚基基因相比, 其中心区序列的同源性较低, 例如, 与 *Acinetobacter* sp. PD12 菌株的酚羟化酶大亚基基因(GenBank 注册号: AY673995)相比, 同源性只有 73%(表 1).

表 1 假单胞菌 PD39 和其它菌株酚羟化酶大亚基基因的同源性
Table 1 Homology of phenol hydroxylase alpha subunit of *Pseudomonas* sp. PD39 and its related strains

GenBank 注册号	微生物来源	同源性
M60276	<i>P. putida</i> CF600	99%
AY686639	<i>P. putida</i> KL33	99%
X80765	<i>P. putida</i> H	98%
AY875729	<i>P. mendocina</i> PC9	98%
AY875738	<i>Acinetobacter</i> sp. PC19	98%
AY504972	<i>P. aeruginosa</i> JH104	98%
AY875746	<i>P. fluorescens</i> PC36	94%
AB016858	<i>P. putida</i> P-6	85%
AB051726	<i>Pseudomonas</i> sp. LAB-36	85%
DQ387868	<i>P. fluorescens</i> P69	81%
AY504973	<i>P. putida</i> A1w4'	81%
AY205602	<i>P. stutzeri</i> OX1	81%
AB051710	<i>Variovorax</i> sp. HAB-22	81%
AY504974	<i>P. veronii</i> A1YB2-4	80%
AB051713	<i>Variovorax</i> sp. HAB-27	79%
AB031996	<i>Ralstonia</i> sp. KN1	77%
AY673995	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12	73%

2.3 PD39 菌株最适生长条件筛选

因为 PD39 菌株是以酚为唯一碳源生长, 所以生长越好, 表明苯酚降解也越好. 温度对 PD39 菌株生长的影响见图 2. 从图 2 可见, 30℃ 培养的细菌生长最好, 23℃ 和 37℃ 次之, 在 40℃ 下细菌根本不能生长. pH 对 PD39 菌株生长的影响见图 3. 从图 3 可见, 培养基的起始 pH 为 4.5 和 8.0 时, 细菌基本不能生长, pH 为 5.0 时生长也很差, pH 为 7.0 时生长最好. 酚浓度对 PD39 菌株生长的影响见图 4. 从图 4 可见, 当酚浓度为 1 400 mg/L 时, 细菌根本不能生长. 酚浓度为 1 000 和 1 200 mg/L 时, 细菌能够生长, 但延迟期较长. 当酚浓度为 200、400 和 600 mg/L 时, 细胞浓度较低. 酚浓度为 800 mg/L 时细菌生长快而且细胞浓度最高. 从上述实验可知, PD39 菌株的最适生长和苯酚降解条件是, 培养基的起始 pH 为 7.0, 培养温度为 30℃, 酚浓度为 800 mg/L. PD39 菌株在这一最适条件下的生长和降解曲线见图 5. 从图 5 可

见,细菌的快速生长和酚降解发生在 10 ~ 14 h 之间,15 h 后酚降解率达到 95% 以上.本研究分离和鉴定的 *Pseudomonas* sp. PD39 能在 1 200 mg/L 苯酚中正常生长,65 h 的 D_{600} 达到 1.1,说明其对酚的耐受性和降解性都相当好,有很好的应用潜力.

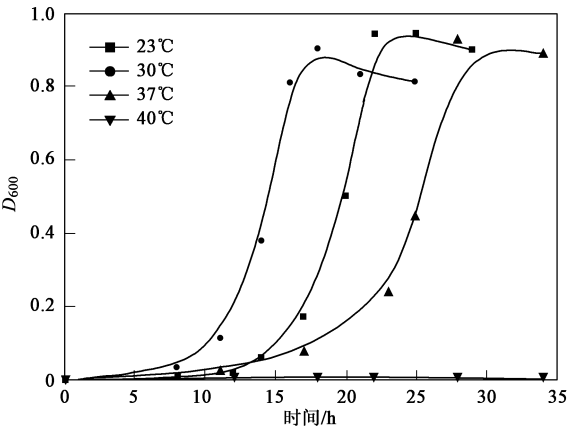


图 2 温度对 PD39 菌株生长的影响
Fig.2 Effect of temperature on growth of PD39

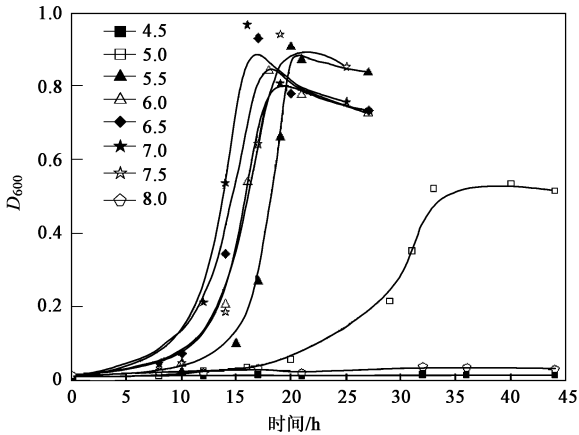


图 3 pH 对 PD39 菌株生长的影响
Fig.3 Effect of pH on growth of PD39

2.4 PD39 菌株的耐盐性试验

因为含酚工业废水中经常含有较高的盐分,给废水的生物处理增加难度,所以本研究对 PD39 的耐盐性进行了试验.结果表明,随着培养基中盐浓度的增加,细菌生长的延迟期也不断加长,最大耐盐浓度是 1.5%,当盐浓度为 2% 时,细菌不能生长(图 6).

2.5 PD39 菌株的降解除底物

试验结果表明,PD39 除了能降酚以外,还能降解苯甲酸、苯乙酸和对羟基苯甲酸(图 7),但不能降解间羟基苯甲酸、对氨基苯甲酸、对苯二甲酸、邻苯

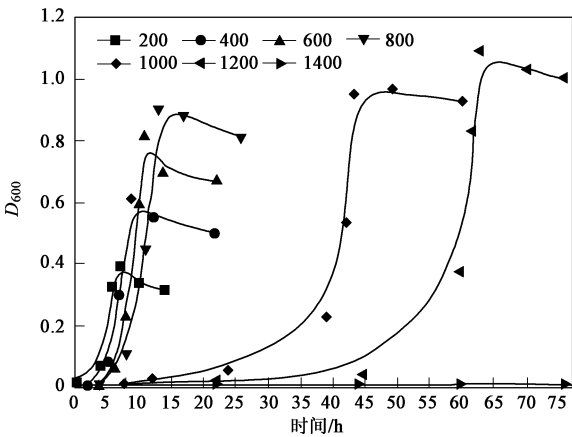


图 4 酚浓度对 PD39 菌株生长的影响
Fig.4 Effect of phenol concentration on growth of PD39

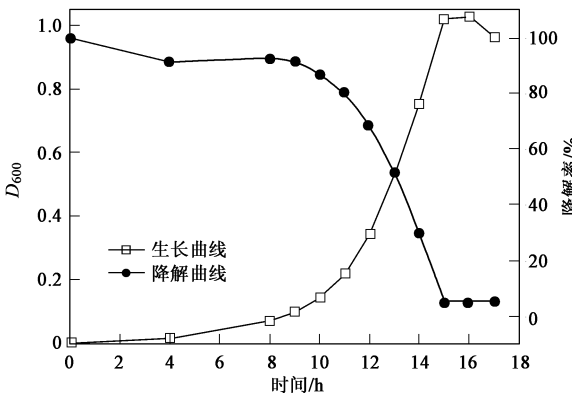


图 5 PD39 菌株的生长和降解曲线
Fig.5 Phenol-degrading and growth curves of PD39

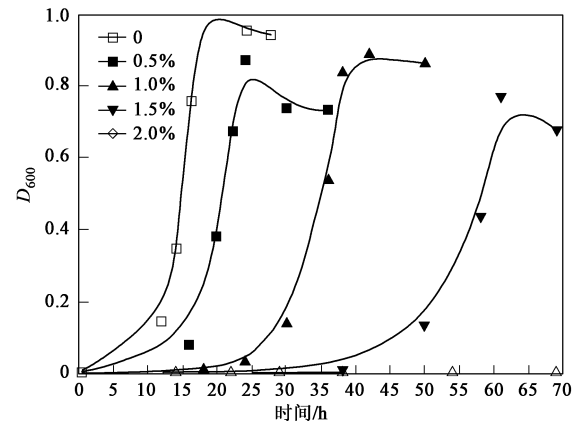


图 6 PD39 菌株对盐的耐受性
Fig.6 Salt tolerance of PD39

二甲酸、间苯二甲酸、邻甲酚、对硝基酚和邻硝基酚.与 *Acinetobacter* sp. PD12 菌株^[3] 相比,其降解除底物的范围较窄. PD12 可以降解苯甲酸、苯乙酸、对羟基苯

甲酸、间羟基苯甲酸、对苯二甲酸、邻苯二甲酸和间苯二甲酸。

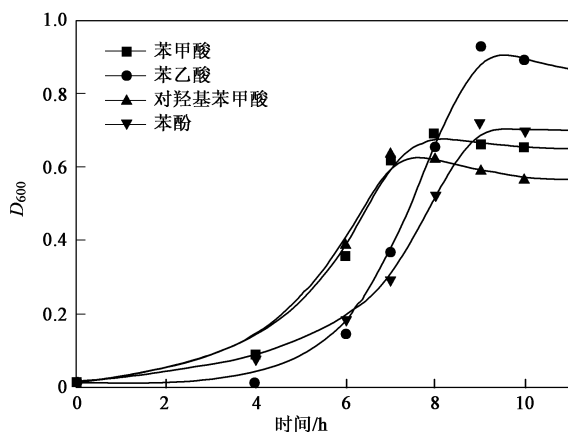


图 7 PD39 菌株对苯甲酸、苯乙酸和对羟基苯甲酸的生物降解

Fig.7 Biodegradation of benzoic acid, phenylacetic acid and *p*-hydroxybenzoic acid by PD39

2.6 PD39 菌株的 C12O 和 C23O 活力

细菌的酚好氧代谢有 2 种途径,一种是酚被酚羟化酶氧化成儿茶酚以后经邻位开环生成生成顺,顺-粘康酸,该反应由儿茶酚 1,2-双加氧酶(C12O)催化,称为邻位裂解途径;另一种是酚被酚羟化酶氧化成儿茶酚以后经间位开环生成 2-羟基粘康酸半醛,该反应由儿茶酚 2,3-双加氧酶(C23O)催化,称为间位裂解途径。通过测定这 2 种酶的活性,可以判断细菌采用何个途径降解酚。例如, *Acinetobacter* sp. PD12 的细胞裂解液显示 C12O 活力,所以该菌株是利用邻位途径降解酚^[3]。 *Pseudomonas aeruginosa* AT2 菌株的细胞裂解液显示 C23O 活力,所以它是利用间位途径降解酚^[7]。假单胞菌 PD39 菌株的细胞裂解液显示较高的 C23O 活力($0.17 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$),没有检测到 C12O 活力,这表明该菌株利用间位途径降解酚。

2.7 用 PD39 菌株处理含酚废水

由于高浓度酚对微生物具有毒性因而抑制其生长,所以在用活性污泥法处理含酚废水时需要对废水进行稀释,一般稀释到酚浓度为 $200 \sim 300 \text{ mg/L}$ ^[21]。直接用假单胞菌 PD39 菌株处理酚浓度为 910 mg/L 的制药厂废水时,由于酚浓度较高,抑制细菌的生长,另外废水中的其它有害成分也可能使细菌不能正常降解酚。试验表明,用 10% 和 20% 的水稀释上述废水,细菌仍不能生长。用 30% 以上的水稀释废水以后,酚的去除效果较好。用 30% 水稀释的含酚废水中酚浓度为 637 mg/L ,加入 1/10 体积的 5 倍浓度 MM 培养基,接种 1/10 体积的 PD39 菌株过夜

培养物, 30°C 振荡培养 72 h, 苯酚残留量为 0.25 mg/L , 去除率为 99.96%。所以,从对酚的耐受力和降解性两方面来看,PD39 有很好的潜力用做活性污泥法处理含酚废水的强化菌株。

3 结论

(1)从石油化工厂活性污泥和废水混合物中分离到 10 个能以酚为唯一碳源生长的细菌菌株,经 16S rRNA 基因序列分析,5 个菌株被鉴定为假单胞菌,4 个菌株为不动杆菌,1 个菌株为丛毛单胞菌。降解酚的丛毛单胞菌,本研究为首次报道。

(2)条件试验表明,假单胞菌 PD39 菌株的最适生长和酚降解条件是,培养基的起始 pH 为 7.0,培养温度为 30°C ,酚浓度为 800 mg/L 。该菌株的最大酚降解浓度是 1200 mg/L 。

(3)废水处理试验表明,酚浓度为 910 mg/L 的制药厂废水用 30% 水稀释后,经假单胞菌 PD39 菌株处理 72 h,可使酚的去除率达到 99.96%,所以,该菌株有很好的潜力用做活性污泥法处理含酚废水的强化菌株。

参考文献:

- [1] 朱永光,冯栩,廖银章,等.活性污泥系统处理苯酚废水的生物强化效果[J].应用与环境生物学报,2006,12(4):559-561.
- [2] Annadurai G, Juang R S, Lee D J. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge[J]. Waste Manage, 2002, 22(7): 703-710.
- [3] Wang Y, Tian Y, Han B, et al. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12[J]. J Environ Sci, 2007, 19(2): 222-225.
- [4] 高平平,陈迎春,刘彬彬,等.原废水培养基分离活性污泥中的苯酚降解细菌[J].应用与环境生物学报,2003,9(2): 189-192.
- [5] Van Schie P M, Young L Y. Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(7): 2432-2438.
- [6] Arutchelvan V, Kanakasabai V, Nagarajan S, et al. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater[J]. J Hazard Mater, 2005, B127: 238-243.
- [7] El-Sayed W S, Ibrahim M K, Abu-Shady M, et al. Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(9): 2026-2029.
- [8] 唐赞,刘沐之,梁凤来,等.一株嗜热菌的分离鉴定及其苯酚降解特性[J].微生物学通报,2006,33(5): 39-44.
- [9] El-Sayed W S, Ibrahim M K, Abu-Shady M, et al. Isolation and identification of a novel strain of the genus *Ochrobactrum* with phenol-degrading activity[J]. J Biosci Bioeng, 2003, 96(3): 310-312.

- [10] 龚斌, 刘津, 赵斌. 一株高效苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J]. 环境科学学报, 2006, **26**(12): 2008-2012.
- [11] Chen W M, Chang J S, Wu C H, *et al.* Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis* [J]. Res Microbiol, 2004, **155**(8): 672-680.
- [12] 沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究[J]. 环境科学学报, 2004, **24**(3): 482-486.
- [13] Godjevargova T, Ivanova D, Alexieva Z, *et al.* Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production waste waters by free and immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 [J]. Process Biochem, 2003, **38**(6): 915-920.
- [14] Futamata H, Nagano Y, Watanabe K, *et al.* Unique kinetic properties of phenol-degrading *Variovorax* strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat Enrichment culture[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**(2): 904-911.
- [15] 蔡宝立, 王淑芳, 黄今勇, 等. 黄杆菌 ND3 菌株的分离和降解苯的研究[J]. 环境化学, 1998, **17**(5): 434-438.
- [16] Cai B, Han Y, Liu B, *et al.* Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China[J]. Lett Appl Microbiol, 2003, **36**(5): 272-276.
- [17] Bastos A E R, Moon D H, Rossi A, *et al.* Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples[J]. Arch Microbiol, 2000, **174**(5): 346-352.
- [18] 徐玉泉, 方宣钧, 陈明, 等. 采用苯酚羟化酶基因特异引物检测苯酚降解菌[J]. 微生物学报, 2001, **41**(3): 298-303.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, **72**(1-2): 248-254.
- [20] Shingler V, Powlowski J, Marklund U. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3, 4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600[J]. J Bacteriol, 1992, **174**(3): 711-724.
- [21] 朱艳清. 活性污泥法处理含酚废水[J]. 一重技术, 2004, (1): 122-123.