

1 株 BTEX 降解新菌株的分离鉴定及其降解特性研究

杨卫兵,朱润晔,张丽丽*,何丹,陈建孟

(浙江工业大学生物与环境工程学院,杭州 310032)

摘要 :取自炼油污水处理曝气池的活性污泥经过苯系物定向驯化后,选育到 1 株能同时高效降解苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯(BTEX)的菌株 byf-4,基于形态特征、生理生化、16S rDNA 序列系统学分析和 Biolog 鉴定,可确定该菌株为染料分枝杆菌 *Mycobacterium cosmeticum*,其为新发现的 1 株具有降解 BTEX 性能的菌株.该菌株最佳生长温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.0,其对 4 种苯系物的降解优先顺序为苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯;菌株降解苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯的比耗氧速率分别为 165.3、170.5、49.3 和 57.4 $\text{mg} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$,菌株降解 BTEX 的过程遵循 Haldane 动力学模型,对苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯的最大比降解速率分别为 0.518、0.491、0.443 和 0.422 h^{-1} ,菌株最大比生长速率分别为 0.352、0.278、0.172 和 0.136 h^{-1} .

关键词 :苯系物;降解;分枝杆菌属;比耗氧速率;动力学

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)03-0821-07

Isolation, Identification and Biodegradation Characteristics of A New Bacterial Strain Degrading BTEX

YANG Wei-bing, ZHU Run-ye, ZHANG Li-li, HE Dan, CHEN Jian-meng

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract :A bacterial strain able to efficiently degrade benzene, toluene, ethyl benzene and *o*-xylene(BTEX) compounds, was isolated by acclimating and enriching the activated sludge from the aeration tank in refinery wastewater treatment plant using BTEX as the sole carbon source. Based on the morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, sequence analysis of 16S rDNA and Biolog identification system, the isolate was identified as *Mycobacterium cosmeticum* which was a newly discovered species able to degrade BTEX. The optimal conditions for the growth of the strain were at 30℃ and pH 7.0. The order of BTEX degradation by this isolate is benzene, toluene, ethyl benzene and *o*-xylene. The specific oxygen utilization rates (SOUR) of the strain degrading benzene, toluene, ethyl benzene and *o*-xylene were 165.3, 170.5, 49.3 and 57.4 $\text{mg} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$, respectively. The degrading process of the strain followed the Haldane kinetic model. The maximum specific degradation rate degrading benzene, toluene, ethyl benzene and *o*-xylene were 0.518, 0.491, 0.443 and 0.422 h^{-1} , respectively. Accordingly, the maximum specific growth rate 0.352, 0.278, 0.172 and 0.136 h^{-1} , respectively.

Key words :benzene, toluene, ethyl benzene, and *o*-xylene(BTEX); biodegradation; *Mycobacterium* sp.; specific oxygen utilization rates; kinetics

苯系化合物是一类易挥发的单环芳香类化合物,包括苯、甲苯、乙苯、二甲苯等,简称 BTEX,广泛应用于石油、化工、农药、纺织、造纸、油漆、制鞋等工业生产过程,是环境中分布较广的一类有毒化合物^[1]. BTEX 具有“三致效应”,被许多国家列入优先控制污染物,且已被确认为强致癌物质^[2]. 目前,生物降解技术是降解这类物质的主要技术之一^[3].

已报道的降解苯系物的细菌包括假单胞菌(*Pseudomonas*)^[4~6]、不动杆菌(*Acinetobacter*)^[7]、红球菌(*Rhodococcus*)^[8]、罗尔斯通氏菌(*Ralstonia*)^[9]、产碱杆菌(*Alcaligenes*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)等,真菌主要有孢瓶霉属真菌(*Cladophialophora*)、诺卡氏菌(*Nocardia*)等^[10,11]. 虽然苯系物的降解菌已有较多报道,但大部分菌株仅能降解某 1 种或 2 种苯系化合物,且其降解效率有

待进一步提高^[12],而对 BTEX 各物质均能实现高效降解的菌株并不多见. 仅 *Pseudomonas* 和相近种属被报道能同时降解 BTEX^[13,14]. 经检索相关文献,未发现分枝杆菌 *Mycobacterium* 降解 BTEX 的相关报道. 本研究选育能同时降解苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯的高效菌株 *Mycobacterium cosmeticum*,并对其降解特性和动力学行为进行分析,以期在实际应用提供理论依据.

收稿日期:2009-08-10;修订日期:2009-10-13

基金项目:国家高新技术研究发展计划(863)项目(2006AA06A310);浙江省科技计划项目(2008C23082,2008C23084);浙江省分析测试科技项目(2007F70040)

作者简介:杨卫兵(1985~),男,硕士研究生,主要方向为废气生物处理技术, E-mail: xiaoyu0534@126.com

* 通讯联系人, E-mail: zhang@zjut.edu.cn

1 材料与方法

1.1 活性污泥

活性污泥取自中石化镇海炼化污水处理厂曝气池,SVI 值为 151.39 mL/g,MLSS 为 9 924 mg/L.

1.2 培养基

污泥定向驯化培养基:0.11 g/L K_2HPO_4 ,0.167 g/L Na_2HPO_4 ,0.04 g/L KH_2PO_4 ,0.025 g/L NH_4Cl ,0.067 g/L $MgSO_4$,0.036 g/L $CaCl_2$,0.25 mg/L $FeCl_3$,0.033 9 mg/L $MnSO_4$,0.042 8 mg/L $ZnSO_4$,0.034 7 mg/L 钼酸铵,pH 7.2~7.4. 添加一定浓度苯系物作为唯一碳源.

苯系物降解菌筛选培养基成分:0.5 g/L KH_2PO_4 ,0.5 g/L K_2HPO_4 ,0.01 g/L $NaCl$,1.0 g/L NH_4Cl ,0.2 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,0.026 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,0.339 mg/L $MnSO_4$,0.428 mg/L $ZnSO_4$,0.347 mg/L 钼酸铵,15.0 g/L 琼脂,pH 7.0~7.2. 苯系物另外添加,分别为苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯各 200 mg/L.

菌株降解性能评价培养基: NH_4Cl 0.1 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.08 g/L, K_2HPO_4 0.25 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g/L,苯系物另外添加,分别为苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯各 100 mg/L.

1.3 菌株的分离纯化

取 5 mL 定向驯化后能高效稳定降解苯系物的活性污泥,用玻璃珠振荡,然后进行梯度稀释,涂布于菌株筛选培养基上,每个梯度做 3 个平行样,30℃ 培养.4~5 d 后,挑取平板上的单菌落,置于降解性能评价培养基中,30℃,160 r/min 培养,将具有苯系物降解能力的菌株进行分离纯化,最后 4℃ 斜面保藏.

1.4 菌株常规生理生化分析

菌株的生理生化实验方法参考《常见细菌系统鉴定手册》

1.5 菌株的 Biolog 鉴定

菌株的 Biolog 实验方法参考文献[15],采用 GN2 微孔板鉴定.

1.6 菌株耗氧速率的测定

取菌株的种子液接种于液体培养基中,过夜培养.用 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)调整菌悬液浓度,使菌悬液 D_{600} 为 5.0,置于冰上.将终浓度 1 mmol/L 的苯系物加入预先氧饱和的 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液中.将该溶液加入反应器中,保持温度于 30℃.加入菌悬液于反应器中,使终浓度为 $D_{600} =$

1.0.插入 Clark 氧化电极(OXYTHERM),30℃ 下测定耗氧速率,检测时间为 5 min.在反应混合液中,不加苯系物测定菌株的内源呼吸.

1.7 菌株对苯系物的降解特性

分别从固体培养基斜面上接菌到含苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯的 MM 培养液中,苯和甲苯浓度为 100 mg/L,乙苯和邻二甲苯浓度为 50 mg/L,30℃,160 r/min 摇床培养 24 h,进入对数生长期,作为种子液备用.将种子液以 2% 的接种量接入 50 mL 无机盐培养液中,根据菌对底物的耐受性及底物的水溶性,每种底物取一系列浓度,每个浓度做 3 个平行样,并做空白对照,30℃,160 r/min 定时取样,检测苯系物浓度及菌浓度.

1.8 检测与分析方法

(1) pH 使用便携式 pH 计(WTW,pH 330i)测定.

(2) 菌株形态观察 Nikon 普通光学显微镜、Philip XL-30-ESEM 环境扫描电镜、JEOL JEM-1230-TEM 透射电镜.

(3) 苯系物定量分析 ① 液相中苯系物浓度用有机溶剂萃取法取样,萃取 3 mL 的苯系物样品中加入 3 mL 正己烷,在漩涡振荡器上振荡混合 10 min,静置 5 min,待其完全分层,取上层有机相进行气相色谱分析.② 气相色谱分析条件:采用 Agilent 6890 分析苯系物液相浓度和气相浓度,色谱柱为 HP-Innowax 毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.5 μm).汽化室、检测器(FID)和柱箱温度分别为 210、200 和 90℃,柱流量 1 mL/min,进样量 1.0 μL. N_2 为载气,总流量为 33.4 mL/min,分流比为 30:1.氢气流量和空气流量分别为 30 mL/min 和 400 mL/min.

(4) 菌株生长浓度 使用 722 型可见分光光度计测定 D_{600} 值,再根据事先做好的标准曲线得出菌株生长浓度.

(5) 菌株 16S rDNA 鉴定与分析 细菌 DNA 提取和纯化采用 3S 柱离心式环境样品 DNA 回收试剂盒(V2.2,上海申能博彩生物科技有限公司),从细菌基因组中对 16S rDNA 进行序列 PCR 扩增,选用细菌通用引物 BSF8/20 和 BSR1541/20,引物合成由宝生物工程(大连)有限公司完成,序列分别为 BSF8/20:5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3'; BSR1541/20 5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'.PCR 产物由上海英俊生物技术有限公司完成测序,然后将测序结果同 GenBank 中的基因序列进行同源性比较分析,选取 1 400 bp 左右长度进行比对

[Clustelx (1.81)], 采用邻位连接 (Neighbour Joining, NJ) 法进行系统学分析 (MEGA), 大致确定菌株种属情况.

2 结果与分析

2.1 降解菌的形态特征与生理生化分析

通过初筛与复筛, 选育到 1 株能同时高效降解 BTEX 混合物的菌株, 编号为 byf-4, 对该菌株进行常

规的生理生化实验, 并观察其菌落形态特征.

实验结果表明, 菌株革兰氏染色显阴性, 淀粉水解酶、吲哚实验、硝酸盐还原、葡萄糖、H₂S 实验、明胶实验均为阳性, 甲基红实验和乳糖实验为阴性.

菌株的菌落形态为圆形, 淡乳白色, 半透明, 边缘整齐, 光滑湿润. 菌株的革兰氏染色和扫描电镜图如图 1 所示, 菌株呈杆状, 大小为 (0.8 ~ 1.0) μm × (1.5 ~ 2.0) μm, 无鞭毛, 无荚膜, 无芽孢.

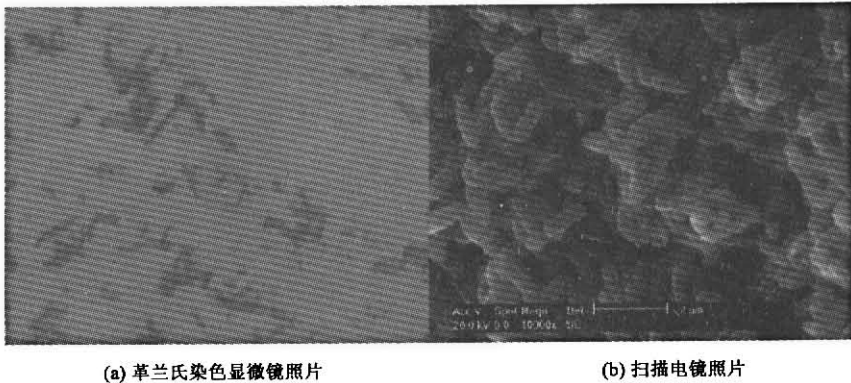


图 1 菌株 byf-4 微观形态图
Fig. 1 Microscopy images of microbial strain byf-4

2.2 菌株 16S rDNA 序列分析及其系统发育树建立

菌株 byf-4 的 16S rDNA 在经过扩增和测序后, 同 GenBank 中的基因序列进行同源性比对, 再通过系统发育树的建立从而确定其在系统发育学上的地位. 通过对菌株 byf-4 的 1 464 bp 大小的 16S rDNA 的分析, 表明该菌株属于 *Mycobacterium* sp., 且同 *Mycobacterium cosmeticum* 似度高达 100%. 菌株 byf-4 与 *Mycobacterium* sp. 中其他相近的模式株比对结果

见图 2. 结合菌株生理生化实验与 16S rDNA 序列系统学的分析结果, 菌株 byf-4 可鉴定为 *Mycobacterium cosmeticum*. 查阅相关文献, 未发现利用该菌株降解 BTEX 的报道. 由此可见, byf-4 可能是新发现的能降解 BTEX 的新菌株, 其 1 464 bp 的基因序列已上传到 GenBank 并获得了登录号: FJ169473, 该菌株并于 2008-10-27 保藏在中国典型培养物保藏中心, 编号为 CCTCC M 208180.

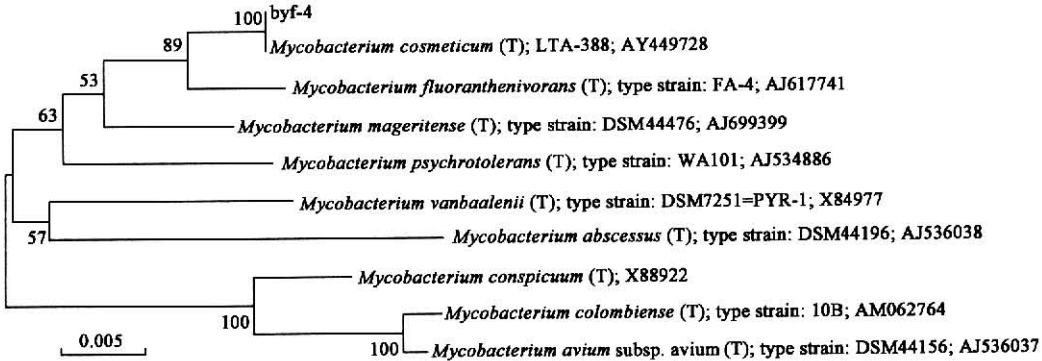


图 2 byf-4 与 *Mycobacterium* sp. 中典型菌株的系统发育树图
Fig. 2 Phylogenetic tree of the strain byf-4 with type strains of *Mycobacterium* sp.

2.3 菌株 Biolog 鉴定

本研究运用 Biolog 技术分析菌株对 95 种碳源的代谢指纹图, 从而进一步确定其种属特征, 提高菌

株鉴定的可靠性. 通过与 Biolog 系统数据库 MicroLog Software (Release Version 4.20.04) 比对, 菌株 byf-4 属于 *Mycobacterium cosmeticum* (染料分枝

杆菌),SIM (Similarity) = 0.75 ,DIS(distance) = 4.32. SIM 和 DIS 表示测试结果与相应数据的匹配程度 培养 6 h 后 ,DIS < 5.0 ,SIM > 0.75 为良好的匹配. 结合 16S rDNA 序列分析 ,可进一步确定菌株属于 *Mycobacterium cosmeticum*.

2.4 菌株 byf-4 对苯系物降解特性

2.4.1 菌株生长和降解苯系物的最佳条件

不同温度和 pH 下菌株 byf-4 对苯系物的降解和生长速率如图 3. 结果表明菌株 byf-4 生长和降解苯系物的最适温度范围为 25 ~ 32℃ ,在30℃ 时达到

了最高的菌株生长率和苯系物降解率 48 h 后对混合物中各苯系物去除率分别为苯、98.2% ,甲苯、95.6% ,乙苯、78.3% ,邻二甲苯、68.4% . 在 pH 为 5.0 ~ 9.0 时 ,菌株 byf-4 都能以苯系化合物为唯一碳源生长 ,但生长和降解速率表现出明显不同. 在 pH 为 5.0 和 9.0 时 ,菌株 byf-4 的生长率和对苯系物去除效率均较低 ;在 pH 为 7.0 时 ,菌株 byf-4 的生长和降解速率最快 ,培养 48 h 后对苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯的去除率分别为 97.4%、95.8%、86.5% 和 60.5% .

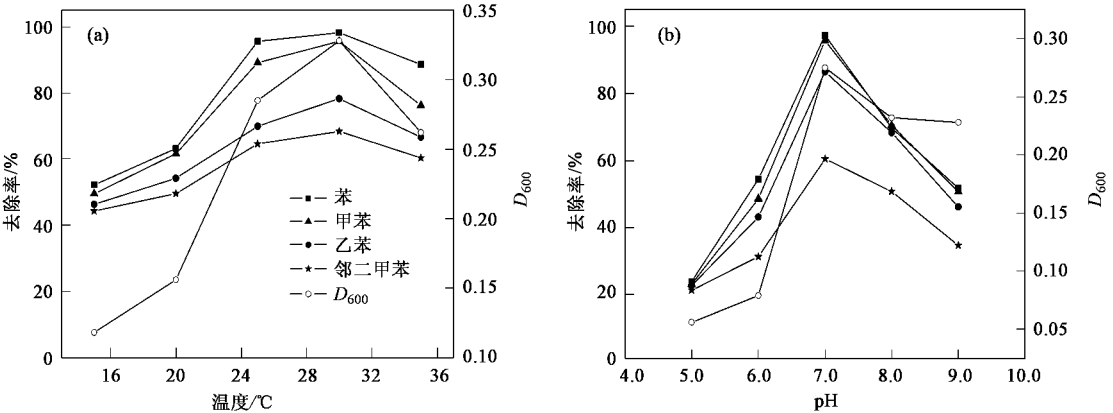


图 3 温度和 pH 对菌株 byf-4 降解苯系物及其生长速率的影响

Fig.3 Effect of temperature and pH on BTEX degradation by the strain

2.4.2 菌株降解不同初始浓度的苯系物

图 4 中 (a) ~ (d) 分别为菌株以不同浓度苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯为唯一碳源的降解曲线. 菌株 byf-4 可对初始浓度低于 500 mg/L 苯实现高效降解 ,其去除率仍大于 95% ;由于甲苯在水中的溶解度较苯低 ,其最高初始浓度设为 300 mg/L ,当甲苯浓度 ≤ 300 mg/L 时 ,该菌株也可快速地降解甲苯 ,该菌株也可降解乙苯和邻二甲苯 ,但乙苯、邻二甲苯浓度分别大于 200 mg/L 和 125 mg/L 时 ,其生长降解受到明显抑制. 上述实验结果表明 ,菌株 byf-4 可分别降解苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯 ,但其对各苯系物的最高降解浓度和降解速率存在明显区别.

2.4.3 菌株对混合苯系物的降解顺序

实验控制总 BTEX 浓度为 100 mg/L ,其中各组分浓度相等. 菌株 byf-4 能降解以混合体系存在的 BTEX ,其对各组混合苯系物的降解先后顺序见表 1 (降解曲线未给出). 实验结果表明 ,不论在二元还是四元混合底物中 ,苯和甲苯首先被降解 ,菌株对苯系物的降解先后顺序为苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯 ,

表明其对苯系物的降解难易程度为邻二甲苯 > 乙苯 > 甲苯 > 苯. 已报道的降解菌株(如 Deeb 等^[16]筛选到的红球菌)和 Mathur 等^[17]报道的生物滴滤塔也表现出对邻二甲苯较低的降解效率 ,邻二甲苯是 6 种苯系物中最难于生物降解的物质 ,这可能与自身的化学结构有关.

2.5 菌株耗氧速率

菌株 byf-4 的呼吸速率通过氧电极测定分子氧的吸收率来检测. 内源呼吸为不加目标碳源时菌株自身的呼吸速率. 耗氧速率一定程度上可表征菌株对底物的降解速率及降解能力. 菌株 byf-4 内源呼吸的耗氧速率为 29 mg · (min · mg)⁻¹ ,对苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯的耗氧速率分别为 165.3、170.5、49.3 和 57.4 mg · (min · mg)⁻¹ (表 2) ,明显高于 Kwapisz 等^[18]报道的菌株的耗氧速率. 菌株细胞利用底物的耗氧速率值可从本质反映底物的氧化和降解速率. 菌株 byf-4 降解苯和甲苯的耗氧速率明显高于乙苯和邻二甲苯 ,表明菌株对苯和甲苯的降解能力和降解速率远高于乙苯和邻二甲苯 ,符合上文获

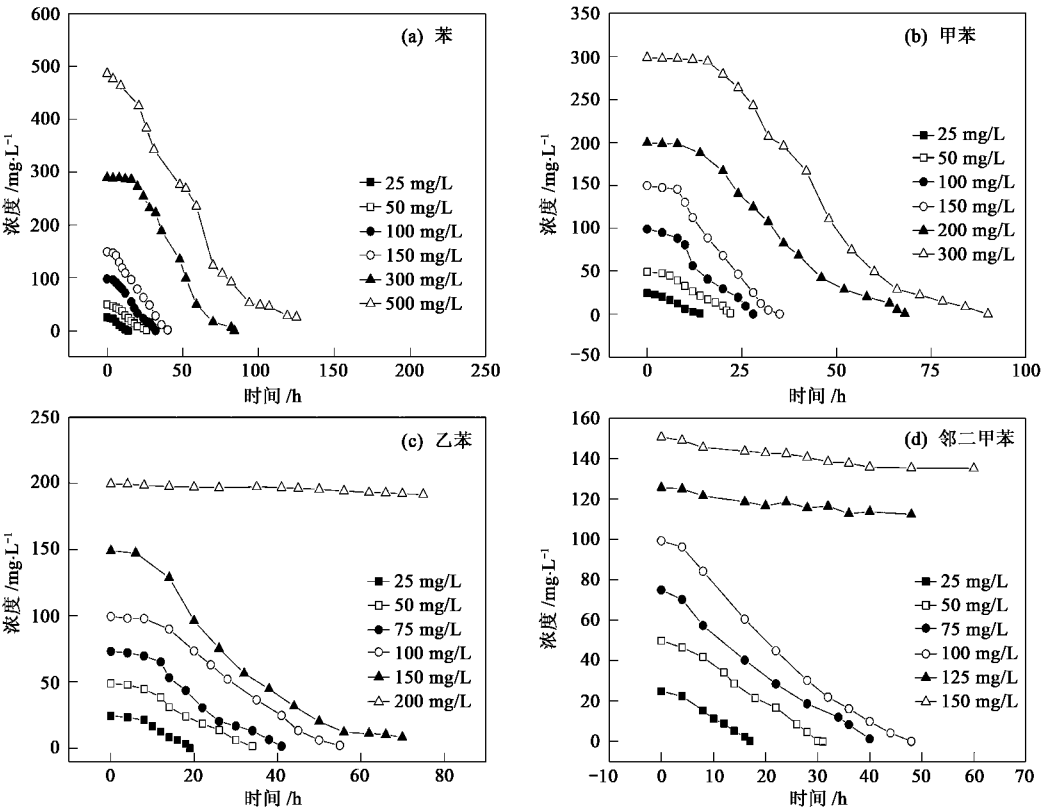


图 4 菌株对不同浓度苯系物的降解曲线

Fig. 4 Degradation curves of the strain for BTEX at different initial concentrations

表 1 菌株 byf-4 对苯系物的降解顺序¹⁾

项目	苯	甲苯	乙苯	邻二甲苯
苯 + 甲苯	1	2		
苯 + 乙苯	1		2	
苯 + 邻二甲苯	1			2
甲苯 + 乙苯		1	2	
甲苯 + 邻二甲苯		1		2
乙苯 + 邻二甲苯			1	2
4 种混合物	1	2	3	4

1) 1、2、3、4 表示降解的先后顺序

表 2 菌株 byf-4 对不同苯系物的耗氧速率/(mg · (min · mg)⁻¹)

苯	甲苯	乙苯	邻二甲苯	内源呼吸
165.3	170.5	49.3	57.4	29

得的实验结果.

2.6 菌株 byf-4 降解苯系物的动力学

菌株对不同初始浓度苯系物的降解过程,采用 Haldane 模型进行拟合,其表达式如下^[19-21]:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + S^2/K_i}$$
$$v = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = \frac{v_{\max} S}{K_s + S + S^2/K_i}$$

式中 μ :菌株比生长速率, h^{-1} ; v :菌株比降解速率, h^{-1} ; X :菌浓度, mg/L ; t :时间, h ; S :底物浓度, mg/L ; $\mu_{\max}$:菌株最大比生长速率, h^{-1} ; K_s :半饱和系数, mg/L ; K_i :抑制系数, mg/L ; $v_{\max}$:最大比降解速率, h^{-1} .

对不同初始浓度苯系物的降解,菌株比生长动力学拟合结果如图 5 所示,其中(a)~(d)分别为降解苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯的比生长曲线.在相同浓度情况下,菌株降解苯和甲苯的比生长速率要大于乙苯和邻二甲苯,其最大比生长速率 $\mu_{\max}$:苯 > 甲苯 > 乙苯 > 邻二甲苯;抑制常数 K_i :苯 > 甲苯 > 乙苯 > 邻二甲苯.

菌株 byf-4 对不同浓度苯系物的比降解动力学拟合结果如图 6 所示,其中(a)~(d)分别为菌株降解苯、甲苯、乙苯和邻二甲苯的比降解动力学模型曲线.拟合的比降解动力学结果表明,菌株降解苯和甲

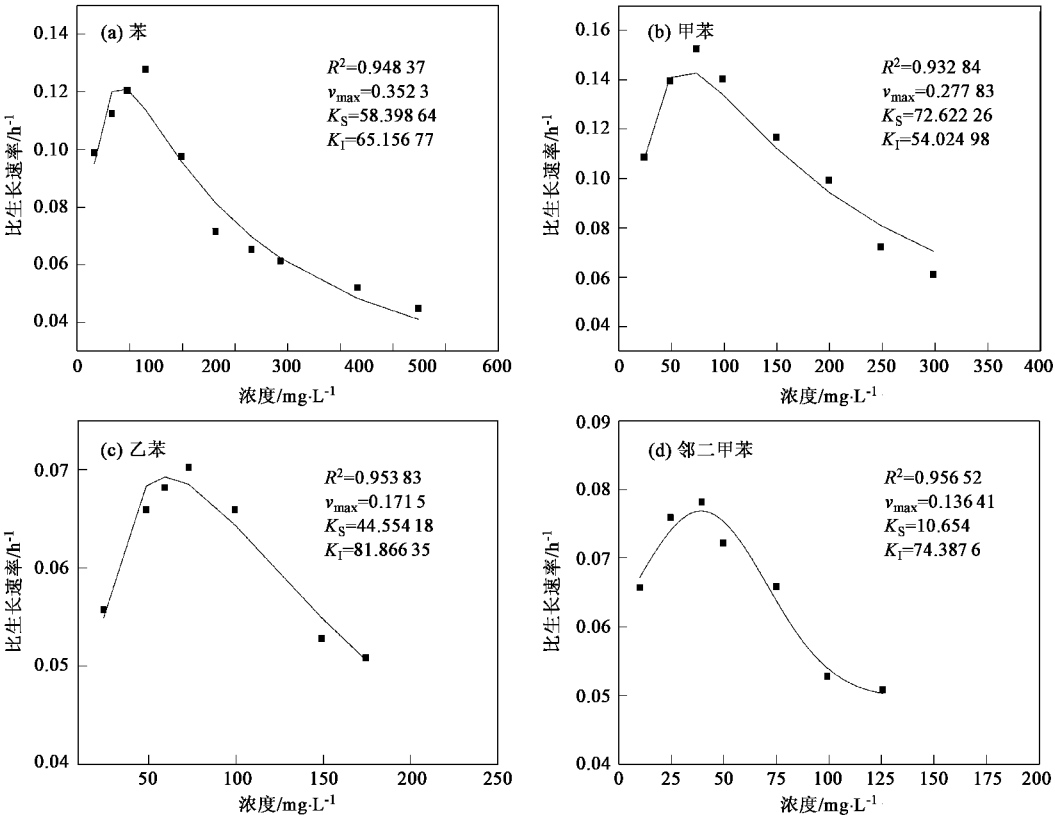


图 5 菌株降解苯系物比生长动力学曲线

Fig. 5 Specific growth kinetic model for strain byf-4 degrading BTEX

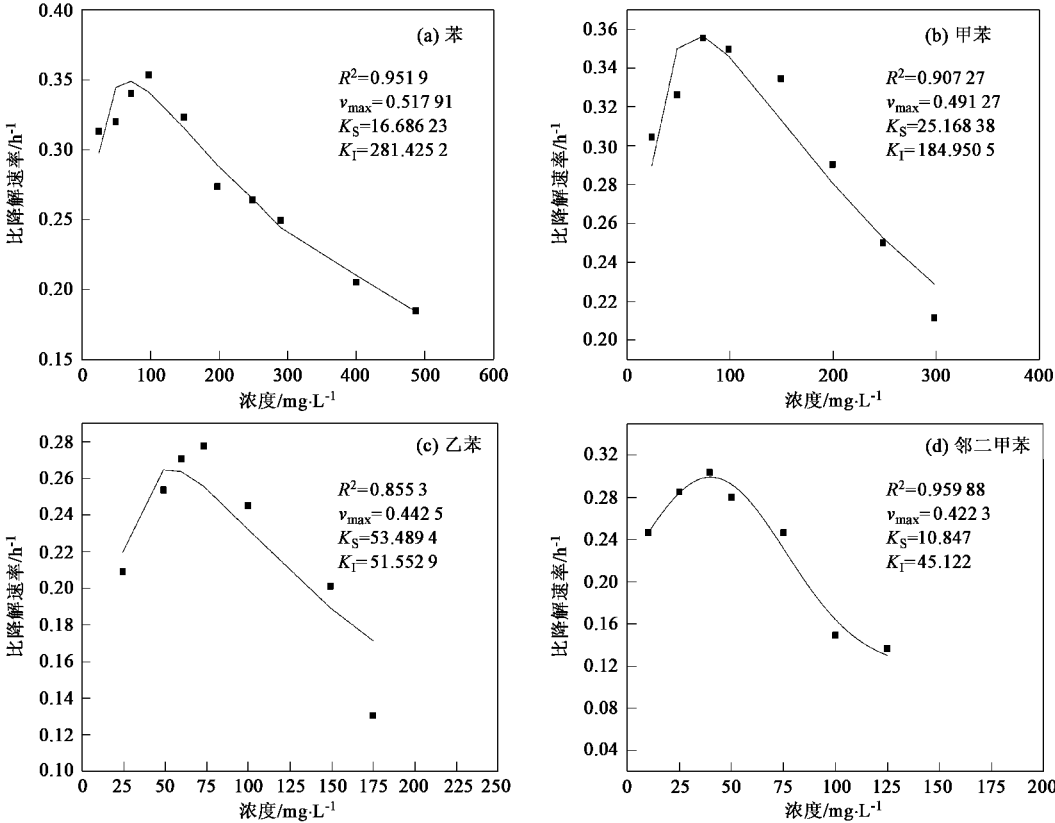


图 6 菌株降解苯系物比降解动力学曲线

Fig. 6 Specific degradation kinetics model for strain byf-4 degrading BTEX

苯的比降解速率要明显大于乙苯和邻二甲苯 ,菌株降解苯系物的最大比降解速率 $v_{\max}$:苯 > 甲苯 > 乙苯 > 邻二甲苯 ;抑制常数 K_i :苯 > 甲苯 > 乙苯 > 邻二甲苯.

3 结论

(1)选育到 1 株能高效降解 BTEX 菌株 byf-4 ,基于菌株形态、生理生化特征、16S rDNA 序列分析及其系统发育树和 Biolog 鉴定 ,可确定菌株 byf-4 为染料分枝杆菌 *Mycobacterium cosmeticum* ,为新发现的降解 BTEX 的菌株.

(2)菌株 byf-4 的最佳生长和降解温度为30℃ ,最佳 pH 为 7.0 ;该菌株可分别降解 4 种苯系化合物 ,其对苯和甲苯的降解浓度和速率均高于乙苯和邻二甲苯 ;在混合降解体系中 ,该菌株对苯系物的降解优先顺序为苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯 ,菌株降解苯和甲苯的耗氧速率高于乙苯和邻二甲苯.

(3)菌株 byf-4 对苯系物的降解速率及降解过程中菌株的生长速率符合 Haldane 动力学方程 ,其最大比生长速率和比降解速率值符合下述规律 :苯 > 甲苯 > 乙苯 > 邻二甲苯.

参考文献 :

[1] Xu Z ,Mulchandani A ,Chen W. Detection of benzene ,toluene ,ethyl benzene ,and xylenes(BTEX) using toluene dioxygenase-peroxidase coupling reactions[J]. Biotechnol Prog ,2003 ,**19** : 1812-1815.

[2] Abuhamed T ,Bayraktar E ,Mehmetoglu T. Substrate interactions during the biodegradation of benzene ,toluene and phenol mixtures [J]. Process Biochem 2003 ,**39** 27-35.

[3] 李国文 ,胡洪营 ,郝吉明 ,等. 生物炭降解苯和甲苯混合废气性能研究[J]. 环境科学 2002 ,**23** (5) :13-17.

[4] Shim H ,Hwang B ,Lee S S. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions[J]. Biodegrad 2004 ,**16** 319-327.

[5] Abuhamed T ,Bayraktar E ,Mehmetoglu T. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene ,toluene and phenol biodegradation[J]. Process Biochem 2004 ,**39** 983-988.

[6] Reardon K F ,Mosteller D C ,Rogers J B ,*et al.* Biodegradation Kinetics of Aromatic Hydrocarbon Mixtures by Pure and Mixed Bacterial Cultures[J]. Environ Health Perspect ,2002 ,**110**(6) : 1005-1011.

[7] David R N ,Andrew J D. Dynamic simulation of benzene vapor

treatment by a two-phase partitioning bioscrubber[J]. Biochem Eng J 2007 ,**36** 250-261.

[8] In G J ,Chang H P. Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the Biodegradation of Benzene ,Toluene ,*m*-Xylene (BTX) ,and Their Mixtures[J]. J Biosci Bioeng ,2004 ,**97**(6) : 429-431.

[9] Gunaseelan A ,Robert C. Substrate Inhibition Kinetics for Toluene and Benzene Degrading Pure Cultures and a Method for Collection and Analysis of Respirometric Data for Strongly Inhibited Cultures [J]. Biotechnol Bioeng 2003 ,**83**(7) 798-809.

[10] Stapleton R D ,Bright N G ,Sayler G C. Catabolic and Genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers[J]. Microb Ecol 2000 ,**39**(3) 211-221.

[11] Kim D ,Kim Y S ,Kim S K ,*et al.* Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17[J]. Appl Environ Microbiol 2002 ,**68**(7) 3270-3278.

[12] 张小啸 ,王红旗 ,刘敬奇 ,等. 土壤微生物对苯的降解研究 [J]. 环境科学 2005 ,**26**(6) :148-153.

[13] Attaway H H ,Schmidt M G. Tandem Biodegradation of BTEX Components by Two *Pseudomonas* sp.[J]. Curr Microbiol 2002 , **45** 30-36.

[14] Reardon K F ,Mosteller D C ,Rogers J. Biodegradation Kinetics of Benzene ,Toluene ,and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1[J]. Biotechnol Bioeng ,2000 ,**69**(4) : 385-400.

[15] Zhang L L ,Zhu R Y ,Chen J Y ,*et al.* Seawater-retting treatment of hemp and characterization of bacterial strains involved in the retting process[J]. Process Biochem 2008 ,**43** :1195-1201.

[16] Deeb R A ,Alvarez C L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched *Consortia* and *Rhodococcus rhodochrous* [J]. Biotechnol Bioeng ,1999 ,**62**(5) 526-536.

[17] Mathur A K ,Majumder C D. Biofiltration and kinetic aspects of a biotrickling filter for the removal of paint solvent mixture laden air stream[J]. J Hazard Mater 2008 ,**152** :1027-1036.

[18] Kwapisz E ,Wszelaka J ,Marchut O *et al.* The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7 [J]. Int Biodeterior Biodegrad ,2008 ,**61** : 214-222.

[19] Marie C D ,Josiane N ,Louise B *et al.* A new method to determine themicrobial kinetic parameters in biological air filters[J]. Chem Eng Sci 2008 ,**63** :4126-4134.

[20] Littlejohns J V ,Daugulis A J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium[J]. Process Biochem 2008 ,**43** :1068-1076.

[21] Okpokwasili G C ,Nweke C O. Microbial growth and substrate utilization kinetics[J]. Afr J Biotechnol 2006 ,**5** 305-317.