

表面活性剂对热带假丝酵母降解苯酚的影响

丁莹,袁兴中*,曾光明,刘智峰,钟华,王静

(湖南大学环境科学与工程学院,长沙 410082)

摘要 通过液态发酵培养法探讨了添加 2 种化学表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、曲拉通 X-100(Triton X-100)以及生物表面活性剂二鼠李糖脂(dirhamnolipid, diRL)对 1 株热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)降解苯酚的影响。结果表明,发酵液中苯酚的分解和菌体生长的不同步,反映了苯酚对该菌的毒性作用以及苯酚降解过程中中间产物的形成。CTAB 对热带假丝酵母具有毒性作用,抑制菌体对苯酚的降解。低浓度(0.1、0.3 CMC)的 Triton X-100 对 *C. tropicalis* 的生长及对苯酚的降解有一定的促进作用,分别将苯酚降解完全的时间由空白的 48 h 提前至 24 h 和 36 h;随着 Triton X-100 浓度增大(1.0、3.0 CMC),降解初期菌体的衰亡减缓,但使菌体生长滞后,苯酚分解完全的时间延长。生物表面活性剂 diRL 促进菌体对苯酚降解的同时显著地促进了 *C. tropicalis* 的生长,且促进作用随着加入 diRL 浓度的增大而增强,1.0、3.0 CMC 的 diRL 将苯酚降解完全的时间都提前到 24 h,而 diRL 在发酵过程中浓度也逐渐降低,这表明 diRL 很大程度上减弱了苯酚对菌体的毒性,并且可以共同作为碳源促进菌体的生长。

关键词 降解;苯酚;热带假丝酵母;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB);曲拉通 X-100;二鼠李糖脂(diRL)

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 0250-3301(2010)04-1047-06

Effects of Surfactants on the Biodegradation of Phenol by *Candida tropicalis*

DING Ying, YUAN Xing-zhong, ZENG Guang-ming, LIU Zhi-feng, ZHONG Hua, WANG Jing

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract The method of liquid fermentation culture was used to study the influence of two synthetic surfactants, cetyl trimethylammonium bromide(CTAB) and Triton X-100, and a biosurfactant, dirhamnolipid(diRL), on phenol degradation by *Candida tropicalis* CICC 1463. The results showed that at the beginning of degradation the yeast population decayed, phenol metabolization and bacterial growth did not occur simultaneously, which indicated the toxicity of phenol and formation of intermediate product. CTAB was toxic to *C. tropicalis*, and it restrained phenol removal. The phenol degradation was accelerated by Triton X-100 of low concentrations of 0.1 and 0.3 CMC, and the complete degradation was achieved at 24 h and 36 h, respectively, compared to 48 h of control. When Triton X-100 concentration was increased to 1.0 CMC or higher concentration, decay of yeast in the initial phase was weakened, but phenol removal and bacterial growth were lagged. The biosurfactant diRL enhanced phenol degradation and growth of the *C. tropicalis* markedly, and the effect increased with increasing of diRL concentration. Complete degradation was achieved at 24 h in the presence of 1.0 and 3.0 CMC diRL. The diRL concentration also decreased gradually during the fermentation. These results indicated that diRL could reduce phenol toxicity to a great extent and favor the bacterial growth as co-substrate.

Key words degradation; phenol; *Candida tropicalis*; cetyl trimethylammonium bromide(CTAB); Triton X-100; dirhamnolipid(diRL)

苯酚及其衍生物是重要的化工原料,为多种工业废水的主要有机污染物^[1,2]。苯酚及其衍生物毒性大,对皮肤粘膜有腐蚀作用,可使蛋白质变性,吸入人体作用中枢神经引起痉挛。因此,研究苯酚的降解方法有非常重要的意义^[3]。处理含酚废水的方法有很多种^[4],与物理和化学方法相比,生物降解的方法具有高效、低成本且无二次污染等特点^[5],近年来逐渐成为治理含酚废水的最普遍的方法^[3,6-8]。在苯酚的降解微生物中,热带假丝酵母因其高效降解性近年来逐渐成为国内外的研究热点^[9]。

表面活性剂是含有亲水基团和长链疏水基团的两亲性分子,它对疏水性有机物有核心增溶及吸附作用并且能促进菌体对疏水性有机物的降解,而苯

酚本身也是含有疏水性苯环和亲水性羟基的两性分子,它可以被表面活性剂聚集体所捕集而富集于聚集体中,表面活性剂的这种作用有可能影响苯酚的降解,但国内外关于这方面的研究却少有报道。本实验采用苯酚的高效降解菌热带假丝酵母作为降解菌,通过分析不同浓度表面活性剂对菌体生长、对苯酚的降解情况,研究了阳离子化学表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、非离子化学表面活性剂曲拉通 X-100(Triton X-100)和阴离子生物表面活性剂二鼠李糖脂(diRL)对热带假丝酵母降解苯酚

收稿日期 2009-06-05 修订日期 2009-09-07

基金项目 国家自然科学基金项目(50678062)

作者简介 丁莹(1985~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物技术,E-mail: dyy8632276@163.com

* 通讯联系人,E-mail: yxz@hnu.cn

的影响,探索了降解菌、表面活性剂以及降解底物的相互作用,以期表面活性剂应用于含酚废水的处理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

二鼠李糖脂(diRL)的产生菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC AB93066。实验室选用的降解菌种热带假丝酵母 CICC 1463 (*Candida tropicalis*),购自中国工业微生物菌种保藏中心,保藏号为 CICC 1463。该 2 株菌在 4℃ 条件下斜面保藏并每个月传代 1 次。

1.2 主要药品和试剂

CTAB 购于科密欧公司(中国天津,分析纯),Triton X-100 购于 BDH 公司(Poole, England, 纯度 > 99%),diRL 由 *P. aeruginosa* AB93066 产生,制取和提纯按文献[10]的方法;实验用纯水由 Lanconco Water Pro PS 纯水机(Kansas, USA)制取,电阻率 18.2 MΩ · cm⁻¹。其它试剂均为分析纯。

1.3 实验用培养基

热带假丝酵母富集培养液(YPD, g · L⁻¹):酵母膏 1.0,蛋白胨 2.0,葡萄糖 2.0, pH 6.0。

发酵培养液(MSM, g · L⁻¹):(NH₄)₂SO₄ 0.4, K₂HPO₄ 0.4, KH₂PO₄ 0.2, NaCl 0.1, MgSO₄ 0.1, MnSO₄ · H₂O 0.01, Fe₂(SO₄)₃ · H₂O 0.01, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.01, pH 6.0。培养条件均为 30℃ 振荡培养箱中恒温培养,转速 200 r/min。

1.4 实验方法

1.4.1 培养条件

降解实验在装有 50 mL 灭菌 MSM 的 250 mL 锥形瓶中进行。苯酚和表面活性剂过 0.22 μm 的微孔滤膜除菌后,加入灭菌后的发酵培养液中。苯酚的浓度为 500 mg · L⁻¹。表面活性剂在培养液中的浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1.0 和 3.0 CMC。3 种表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)分别为:CTAB 364.46 mg · L⁻¹, Triton X-100 200.5 mg · L⁻¹, diRL 60 mg · L⁻¹[10,11]。将在富集培养液中富集培养 12 h 后的 *C. tropicalis* 发酵液离心,倾去上清液以除去原有营养物质,溶于等体积无菌水中,按 2% 的接种量分别接种到含有 500 mg · L⁻¹ 苯酚-MSM-表面活性剂的发酵培养液中培养。

1.4.2 菌体生长量的测定

菌体吸光度采用 Shimadzu UV-2552 分光光度

计于 600 nm 测定其吸光度值(D_{600}),以无菌蒸馏水作为参比。发酵不同时间分别取菌体,在 10 000 r/min 下离心 10 min,收集离心后的发酵液上清液,清洗后将菌种分别分散到 5 mL 蒸馏水中用作后续实验。菌体吸光度与菌体重量关系确定方法:取富集培养液,于 10 000 r/min 下离心 10 min,收集菌种,清洗后将菌体溶解,在 600 nm 下调节菌体吸光度值,同时取相应菌液于 10 000 r/min 下离心 10 min,弃去上清液,于 105℃ 下烘 24 h,称重。通过菌体干重浓度与菌体 D_{600} 的关系得到菌体干重浓度。

1.4.3 苯酚浓度的测定(液相色谱法)

取上一步离心后的培养液,过 0.45 μm 滤膜,采用 HPLC Agilent 1100 测定(Agilent Technologies, California, USA),测定条件如下^[12]:色谱柱 C18 (250mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent);流动相, V(甲醇):V(水) = 4:3;流速 1.0 mL/min;紫外检测器,波长 280 nm。

1.4.4 CTAB 浓度的测定

采用苦味酸[C₆H₂(NO₂)₃OH]法^[11]测定 CTAB 浓度。取步骤 1.4.2 离心后的发酵液上清液 2.5 mL,加入 0.25 mL 的苦味酸溶液(0.1% 的苦味酸溶于 0.002 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液)和 2.5 mL 的二氯乙烷,充分振荡混合 5 min,静置分层后,吸出有机相,采用 Shimadzu UV-2552 分光光度计于 375 nm 测定二氯乙烷相的吸光度值。

1.4.5 Triton X-100 浓度的测定

对硫氰酸钴法^[13]进行部分修改后,测定 Triton X-100 浓度。取步骤 1.4.2 离心后的发酵液上清液 1.5 mL,加入 1.5 mL 的 Co-SCN 试剂[280 g · L⁻¹ Co(NO₃)₂ · 6H₂O 和 620 g · L⁻¹ NH₄SCN 的混合溶液]和 3.0 mL 二氯甲烷,充分混合振荡 2 min 后,于 2 890 r/min 离心 10 min,采用 Shimadzu UV-2552 分光光度计于 620 nm 测定二氯甲烷有机相吸光度值。

1.4.6 diRL 浓度的测定

采用苯酚-硫酸法^[14]测定 diRL 浓度。用 1 mol · L⁻¹ HCl 调节步骤 1.4.2 离心后的发酵液样品到 pH 2.0,加入等体积的乙酸乙酯,剧烈振荡 5 min,静置分层,吸出有机相,水相再用乙酸乙酯萃取,共萃取 3 次,有机相合并后在 60℃ 下烘干,得到的 diRL 溶解到 2.0 mL 0.05 mol · L⁻¹ 的 NaHCO₃ 溶液中,加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL,静置 10.0 min,摇匀,25℃ 下放置 20 min,采用 Shimadzu UV-2552 分光光度计于 480 nm 下测定其吸光度值。

1.4.7 菌体表面 Zeta 电势的测定

取对数期(本实验中发酵培养 60 h)的发酵液,离心后除去上清液,并用无菌的 MSM 洗菌 2 次,然后将菌体溶解在无菌的 MSM 中,调节菌体 D_{600} 至 0.6 ± 0.06 ^[15],采用 EN3600 Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK) 测定菌体在 3 种表面活性剂的浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、1.0 和 3.0 CMC 时的 Zeta 电势。

2 结果与讨论

2.1 CTAB 对 *C. tropicalis* 降解苯酚的影响

由图 1 可以看出,不添加表面活性剂时在 0 ~ 12 h 内菌体量迅速降低. 但随着 *C. tropicalis* 逐渐适应新的环境,经过大约 36 h 菌体开始有明显的生长. 在发酵液中添加不同浓度的 CTAB 表面活性剂时,菌体浓度迅速降低,且在整个后续培养阶段菌体的生长均受到严重抑制。

图 1 中使菌体量减少的原因有 2 个 :① 苯酚有一定的毒性,对菌体的生长产生了抑制作用,造成了细胞初始浓度的降低和细胞生长的延滞 ;② CTAB 是阳离子表面活性剂,阳离子表面活性剂溶于水后有很强的杀菌性。

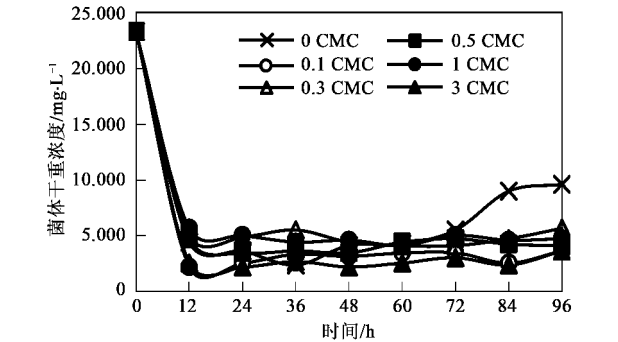


图 1 不同浓度 CTAB 作用时菌体干重浓度随时间的变化
Fig. 1 Cell dry weight concentration trend with different concentrations of CTAB added

由图 2 可以看出,苯酚单独被降解时,其平均残留率随着时间逐渐降低,在 48 h 时苯酚已经被完全降解. 但细胞的生长与苯酚的消耗并不同步,菌体在 36 h 后才开始生长. 这可能是因为 :① 苯酚对热带假丝酵母具有毒性,但该菌对苯酚的分解能力很强,即使菌体量很低也能达到很好的降解效果^[6,16] ;②有研究表明,在有氧条件下苯酚首先分解为邻苯二酚,邻苯二酚由邻位和间位途径开环裂解,最后进入三羧酸循环^[17~19]。

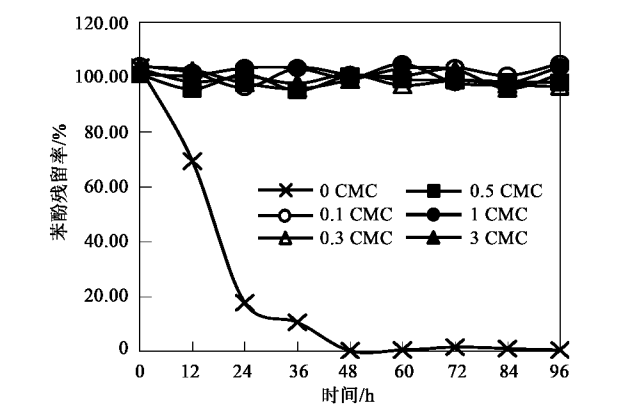


图 2 苯酚残留率随时间的变化 (CTAB)
Fig. 2 Residual rates of phenol vs time

在实验中苯酚的降解过程中有中间产物形成的过程,并且苯酚转化为中间产物有很高的速率,而菌体对中间产物的降解是苯酚降解的控制步骤,同时也是为菌体生长提供能量的主要步骤. 在苯酚转化基本完成、毒性减弱后,菌体再利用中间产物进行主要的生长. 发酵液中含有 CTAB 时,苯酚的平均残留率几乎没有变化,苯酚完全没有被降解,说明 CTAB 强烈抑制菌体对苯酚的降解。

在发酵过程中表面活性剂 CTAB 的残留率几乎没有变化(图略),说明菌体不能利用 CTAB. 从图 3 可以看出加入 CTAB 后菌体表面的 Zeta 电势增大. 这是由于 CTAB 是阳离子表面活性剂,在发酵液中电离形成的 $C_{16}H_{33}N(CH_3)^+$ 与细胞表面带负电的基团发生静电吸附作用,使细胞表面 Zeta 电势增加. 它能吸附在细胞表面改变菌体细胞膜的通透性,并且能吸附在蛋白质上,与氨基酸中的羧基作用,使溶解的蛋白质变性^[20]. 这是 CTAB 有很强杀菌性的原因。

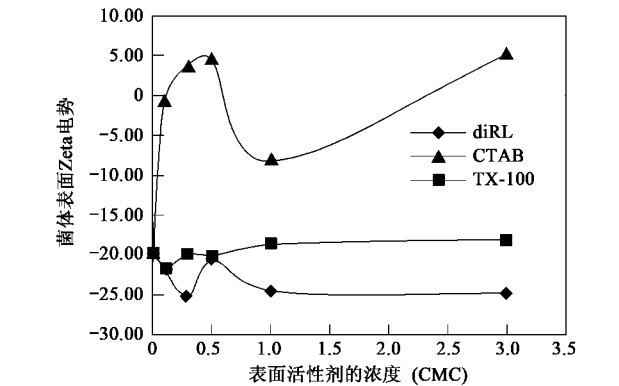


图 3 菌体表面 Zeta 电势随表面活性剂浓度的变化
Fig. 3 Changes of bacteria surface Zeta potential with the surfactant concentrations

2.2 Triton X-100 对 *C. tropicalis* 降解苯酚的影响

发酵液中添加 Triton X-100 时菌体 D_{600} 随时间变化如图 4 所示。在发酵最初的 12 h, 由于苯酚的毒性, 各组菌体量均减少。菌体经过适应期后开始生长, 但加入的 Triton X-100 浓度不同适应期长短不同。当加入 Triton X-100 的浓度较低时 (0.1 和 0.3 CMC) 菌体对苯酚的适应期较短, 12 h 后菌体量开始增大, 分别在 48 h 和 60 h 使菌体量达到最大; 当 Triton X-100 浓度增大, 菌体生长的适应期延长到 60 h 左右, 但菌体的生长更明显。

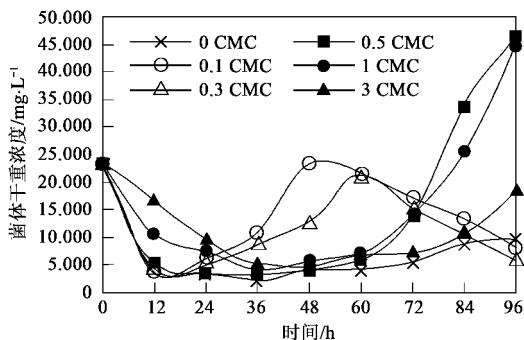


图 4 不同浓度 Triton X-100 作用时菌体干重浓度随时间的变化

Fig. 4 Cell dry weight concentration trend with different concentrations of Triton X-100 added

加入不同浓度的 Triton X-100 后苯酚的残留率见图 5。与菌体干重浓度相吻合, 加入的 Triton X-100 浓度为 0.1 和 0.3 CMC 时, 分别使苯酚降解完全的时间提前至 24 h 和 36 h。但随着加入的 Triton X-100 浓度增大, 菌体对苯酚的降解过程被抑制, 而且浓度越大抑制作用越强, 特别是当添加的 Triton X-100 浓度达到临界胶束浓度后, 抑制作用更加明显。在整个发酵过程中 (0 ~ 96 h) 发酵液中 Triton X-100 的浓度几乎没有变化 (数据略), 即实验条件下菌体不能降解 Triton X-100。由于 Triton X-100 是非离子表面活性剂, 它对细胞表面的 Zeta 电势几乎没影响 (图 3)。

Triton X-100 在培养液中形成聚集体, 它对苯酚的捕集作用使发酵液中游离的苯酚减少, 而聚集体中的苯酚因 Triton X-100 分子栅栏层的阻隔无法与菌体直接接触^[21,22], 因此可以降低苯酚对菌体的毒性作用, 所以随着 Triton X-100 浓度的增加, 苯酚的毒性减小, 特别在浓度高于 CMC 时, 菌体在初期的 24 h 内死亡明显趋缓。但另一方面这种作用降低了苯酚的可利用性, 抑制了苯酚的分解和中间产物的

形成, 使菌体的生长和苯酚的降解滞后 (如图 4)。

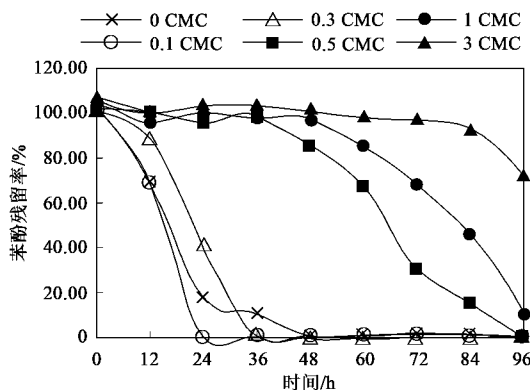


图 5 苯酚残留率随时间的变化 (Triton X-100)

Fig. 5 Residual rates of phenol vs time

2.3 diRL 对 *C. tropicalis* 降解苯酚的影响

由图 6 可以看出, 各浓度的 diRL 均明显地促进了菌体的生长, 而且加入的 diRL 浓度越大促进作用越明显, 0.1 和 0.3 CMC 的 diRL 均使菌体量在 12 h 分别达到最大, 而随着加入 diRL 浓度的增大 (0.5、1.0 和 3.0 CMC), 菌体生长的对数期延长到 18 h, 菌体干重浓度分别达到最高。由图 7 可知, diRL 可以被降解, 而且与图 6 中对菌体生长的促进作用相符, 加入的 diRL 浓度越高, diRL 的降解率越高。

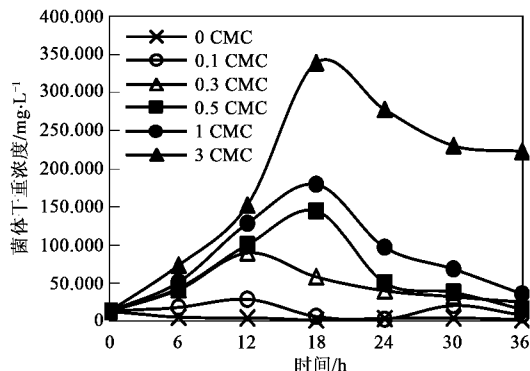


图 6 不同浓度 diRL 作用时菌体干重浓度随时间的变化

Fig. 6 Cell dry weight concentration trend with different concentrations of diRL added

由图 8 可以看出苯酚的残留率在发酵期间的变化。加入 diRL 时在最初的 6 h 内苯酚降解速率增大并不明显, 随着菌体生物量的增多降解速率增大。各浓度的 diRL 均使苯酚的降解速率增大, 而且当生物表面活性剂的浓度达到临界胶束浓度后降解速率更快, 高浓度 (1.0、3.0 CMC) diRL 的发酵液在 24 h 时苯酚的残留率接近 0.30 h 时其他浓度 diRL 的发酵液中苯酚也几乎被完全降解。而空白样在实验时

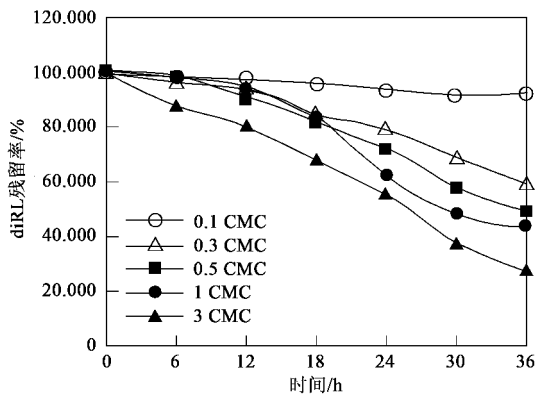


图7 发酵液中 diRL 的残留率随时间的变化

Fig.7 Residual rates of diRL vs time

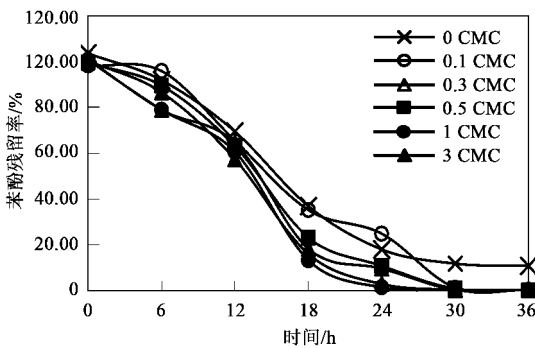


图8 苯酚残留率随时间的变化 (diRL)

Fig.8 Residual rates of phenol vs time

间范围内并没有将苯酚完全降解. diRL 使菌体表面的 Zeta 电势降低,这是因为 diRL 是阴离子表面活性剂,diRL 单分子或聚集体吸附在菌体细胞表面的原因(如图 3).

可以明显看出加入各浓度生物表面活性剂 diRL 均促进热带假丝酵母对苯酚的降解,经分析原因可能是:① diRL 与苯酚共同作为碳源而促进了菌体的生长^[23],进而促进了苯酚的降解;② diRL 在实验浓度范围内形成聚集体,同样减弱了苯酚对菌体的毒性,而且 diRL 的这种作用比 Triton X-100 的更为显著.综合以上两方面的原因,菌体量在降解初期并没有衰减,而是发生了迅猛生长,并且对碳源的利用效率非常高.在加入 diRL 时菌体均在作为碳源的苯酚和 diRL 并没有被降解完全时就进入了衰亡期.经分析这可能是由于:菌体以苯酚分解形成的中间产物为主要碳源进行生长,在菌体快速生长后,前期形成的中间产物已被消耗完,而剩余的苯酚在 diRL 聚集体中因可利用性差,分解速率慢,而无法满足高浓度菌体继续生长的需要.

3 结论

(1) CTAB 对 *C. tropicalis* 有毒性作用,导致大量菌体死亡,因此抑制了菌体对苯酚的降解作用.

(2) 低浓度的 Triton X-100 对 *C. tropicalis* 的生长及其对苯酚的降解有一定的促进作用;随着其浓度增大 Triton X-100 聚集体的捕集作用增强,减弱了苯酚对菌体的毒性作用,同时也使苯酚的可利用性降低,使得菌体衰亡趋缓但生长滞后,并且苯酚的降解滞后.

(3) diRL 生物表面活性剂很大程度上减弱了苯酚对菌体的毒性并且可以与苯酚共同作为碳源,因此也促进了菌体对苯酚的降解并极大地促进了 *C. tropicalis* 的生长.

参考文献:

- [1] Ha S R, Vinitnanthar S, Ozaki H. Bioregeneration by mixed microorganisms of granular activated carbon loaded with a mixture of phenols[J]. Biotechnol Lett, 2000, 22(13): 1093-1096.
- [2] Santos V L, Linardi V R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential[J]. Process Biochem, 2004, 39(8): 1001-1006.
- [3] Bajaj M, Gallert C, Winter J. Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor[J]. Bioresource Technol, 2008, 99(17): 8376-8381.
- [4] 佟丽萍, 唐霞, 朱宝花, 等. 含酚废水处理方法的选择[J]. 工业水处理, 1998, 18(5): 36-37.
- [5] Jiang H L, Tay J H, Maszenan A M, et al. Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation[J]. Appl Environ Microb, 2004, 70(11): 6767-6775.
- [6] Jia X Q, Wen J P, Jiang Y, et al. Modeling of batch phenol biodegradation in internal loop airlift bioreactor with gas recirculation by *Candida tropicalis*[J]. Chem Eng Sci, 2006, 61(11): 3463-3475.
- [7] Perron N, Welander U. Degradation of phenol and cresols at low temperatures using a suspended-carrier biofilm process[J]. Chemosphere, 2004, 55(11): 45-50.
- [8] Rocha L L, de Aguiar-Cordeiro R, Cavalcante R M, et al. Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil[J]. Mycopathologia, 2007, 164(4): 183-188.
- [9] Mangrulkar P A, Kamble S P, Meshram J, et al. Adsorption of phenol and o-chlorophenol by mesoporous MCM-41[J]. J Hazard Mater, 2008, 160(2-3): 414-421.
- [10] Zhong H, Zeng G M, Yuan X Z, et al. Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77

(2) 447-455.

[11] Yuan X Z, Ren F Y, Zeng G M, *et al.* Adsorption of surfactants on a *Pseudomonas aeruginosa* strain and the effect on cell surface lyphohydrophilic property [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **76**(5) 1189-1198.

[12] Jiang Y, Wen J P, Bai J, *et al.* Phenol biodegradation by the yeast *Candida tropicalis* in the presence of m-cresol [J]. Biochem Eng J, 2006, **29**(3) 227-234.

[13] Mata-Sandoval J C, Karns J, Torrents A. Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on the biodegradation of three pesticides in aqueous phase and soil slurries [J]. J Agric Food Chem, 2001, **49**(7) 3296-3303.

[14] Zeng G M, Fu H Y, Zhong H, *et al.* Co-degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix [J]. Biodegradation, 2007, **18**(3) 303-310.

[15] Zhong H, Zeng G M, Yuan X Z, *et al.* Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **77**(2) 447-455.

[16] Galindez-Mayer J, Ramon-Gallegos J, Ruiz-Ordaz N, *et al.* Phenol and 4-chlorophenol biodegradation by yeast *Candida*

tropicalis in a fluidized bed reactor [J]. Biochem Eng J, 2008, **38**(2) 147-157.

[17] 向述荣, 林敏. 苯酚的生物降解基因组成及其调控机制 [J]. 微生物学杂志, 2001, **21**(3) 48-53.

[18] 刘和, 吴坚阳, 陈英旭. 丛毛辜丸酮单胞菌 ZD 4-1 和铜绿假单胞菌 ZD 4-3 降解芳香烃化合物的机理 [J]. 微生物学报, 2004, **44**(1) 107-110.

[19] 胡忠, 吴奕瑞, 徐艳, 等. 海洋苯酚降解菌 *Candida* sp. P5 的分离鉴定及其降解特性 [J]. 应用环境生物学报, 2007, **13**(2) 243-247.

[20] 肖进新, 赵振国. 表面活性剂应用原理 [M]. 北京 : 化学工业出版社, 2003. 31-38.

[21] Roch F, Alexander M. Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants [J]. Environ Toxicol Chem, 1995, **14**(7) 1151-1158.

[22] Kollmer A, Schmid A, von Rudolf P R, *et al.* On liquid-liquid mass transfer in two-liquid-phase fermentations [J]. Bioprocess Biosys Eng, 1999, **20**(5) 441-448.

[23] Loh K C, Wang S J. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources [J]. Biodegradation, 1998, **8**(5) 329-38.