

焦化废水中酚降解菌及其降解基因的研究

曹军伟^{1,3}, 董纯明³, 曹宏斌^{2*}, 邵宗泽^{3*}

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院过程工程研究所湿法冶金国家工程实验室, 北京 100190; 3. 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 酚类化合物是焦化废水的主要污染物, 微生物降解在废水处理中起着主要作用. 为获得焦化废水活性污泥中主要降解菌, 本研究通过富集与平板涂布对某焦化公司的 2 个活性污泥中的降解菌进行了分离鉴定. 通过 BOX-PCR 和 16S rDNA 序列分析去除重复菌株后, 共获得分属于 20 个属的 28 个种的 28 株细菌, 它们主要为变形菌纲 β 和 γ 亚群, 其中 4 株菌可能是潜在的新种. 间甲酚富集后筛选得到 2 株高效降解菌株 *Pseudomonas monteilii* GCS-AE-J-1 和 *Pseudomonas plecoglossicida* GCS-AN-J-3; 前者在 48 h 内对 791 mg/L 间甲酚的降解率达到 94.6%, 而后者对 763 mg/L 间甲酚的降解率也达到了 92.2%. 通过 PCR 从菌株 GCS-AE-14、GCS-AE-J-1、GCS-AN-J-3 和 GCS-AN-3 得到了苯酚羟化酶基因序列. 本研究获得的降解菌新颖多样, 在工业焦化废水的处理中可能起着重要作用, 有进一步研究开发的价值.

关键词: 焦化废水; 苯酚; 间甲酚; 生物降解; 苯酚羟化酶基因

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)02-0560-07

Isolation of Phenol-degrading Bacteria from Coking Wastewater and Their Degradation Gene

CAO Jun-wei^{1,3}, DONG Chun-ming³, CAO Hong-bin², SHAO Zong-ze³

(1. College of Life Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. National Engineering Laboratory for Hydrometallurgical Cleaner Production Technology, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 3. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: Phenol and phenolic compounds are main pollutants in wastewater of coking factories. To identify the bacteria responsible for phenol removal in the activated sludge of a coking factory, we isolated bacteria from the sludge directly or after enrichment. From two samples from the aerobic and anaerobic pools, 28 strains belonging to 28 species of 20 genera were obtained after identification with BOX-PCR and further 16S rDNA sequence analyses. Most of them belonged to β - and γ -Proteobacteria, four of which are potential novel species of low 16S rDNA sequence similarity to corresponding type strains. From the *m*-cresol enrichment community, two strains identified and named as *Pseudomonas monteilii* GCS-AE-J-1 and *Pseudomonas plecoglossicida* GCS-AN-J-3 were obtained as the efficient degraders; The former can remove 94.6% *m*-cresol (791 mg/L) in just 48 h; while the latter metabolized 92.2% *m*-cresol (763 mg/L). Furthermore, the phenol hydroxylase gene was surveyed by PCR from the phenol-degrading strains, and 4 were positively detected. Summarily, quite diverse bacteria were proved of high capability to degrade phenol and phenolic compounds in this report, which play important role in biotreatment of phenol compounds.

Key words: coking wastewater; phenol; *m*-cresol; biodegradation; hydroxylase gene

焦化废水是含芳香族化合物与杂环化合物的典型废水, 其中苯酚类及其衍生物所占比例最大, 占有有机物质量分数的 60.08%^[1]. 苯酚、间甲酚对哺乳动物的毒性大, 并有致癌、致突变作用, 可以在人体和动物的脂肪组织内积蓄, 从而造成长期的危害. 含酚污水可使水中的生物死亡, 国内外相继把苯酚列入有毒污染物名单^[2,3].

对于苯酚生物降解的研究, 国外起步较早. 目前报道的降解菌类群包括藻类(*Ochromonas*)^[5]、丝状真菌^[6]、酵母菌(*Trichosporon*, *Candida*)^[7,8]、根瘤菌(*Rhizobia*)^[4]、不动杆菌(*Acinetobacter*)^[9]、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[10,11]、芽孢杆菌(*Bacillus*)^[12]、产

碱菌(*Alcaligenes*)^[9]、伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)^[10]、红球菌(*Rhodococcus*)^[9]、*Valivora*^[13]、*Corynebacterium*^[14]、*Micrococcus*^[15]、*Arthrobacter citreus*^[16]、*Ochrobactrum*^[17]、*Ralstonia*^[18,19]、*Geobacillus thermoglucosidasius*^[20]和 *Klebsiella oxytoca*^[21]等. 但是, 国内外对间甲酚的生

收稿日期: 2010-04-07; 修订日期: 2010-07-22

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07207-003, 2008ZX07208-004); 福建省科技计划项目(2009H0101)

作者简介: 曹军伟(1986~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: caojw2@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: shaozz@163.com; hbciao@home.ipe.ac.cn

物降解报道相对较少,已报道的降解菌主要有假单胞菌(*Pseudomonas*)^[22]、假丝酵母(*Candida*)^[23]、杂色云芝(*Coriolus versicolor*)^[24]、类假单胞菌的反硝化菌^[25]、法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)^[24]、鲸脱硫杆菌(*Desulfobacterium cetonicum*)^[26]、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)^[27]等。另一方面,间甲酚的生物降解比较难。目前报道的微生物能够降解间甲酚的最大浓度仅为 600 mg/L^[22,26],而已报道的微生物对苯酚的最高可降解浓度为 2 600 mg/L^[11,34]、最高耐受浓度为 3 000 mg/L^[10,15]。然而,焦化、石化、油制气、化纤、制药等行业排出含多元酚废水的酚浓度远比这高,如有的焦化工厂排放的废水中酚类物质的含量达几千甚至几万 mg/L^[3]。所以,亟需加强对含酚废水的高效降酚菌及其多样性的研究。为此,本研究对焦化废水处理厂活性污泥中的酚类降解菌进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 环境采样

焦化废水活性污泥取自某焦化公司废水处理厂,AE 号样品采自曝气池,AN 号样品采自厌氧池。样品置于 4℃ 下短期保存,置于 -80℃ 用甘油管长期保存。

1.2 培养基

LB 培养基参考文献[2];216 L 培养基:乙酸钠 1 g/L,硝酸铵 0.2 g/L,柠檬酸三钠 0.5 g/L,营养肉汤 0.5 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母膏 2 g/L,NaCl 10 g/L;无机盐培养基(添加不同碳源做为筛选培养基)具体配方见文献[29]。

1.3 降解菌分离

在有氧条件下,对活性污泥样品同时进行平板分离和富集分离。

平板分离:将污泥样品梯度稀释至 10^{-6} ,取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度各 0.1 mL,分别涂 LB、216L 平板,同时设置空白对照(不添加污泥样品,添加等量无菌水作对照)。平板放 28℃ 恒温箱倒置培养一周。挑取形态不同菌株,对应在 LB、216L 平板上划线纯化。

富集分离:采用逐渐提高间甲酚浓度的驯化方法,将污泥样品按 1% 的接入量接种于含有 10 mg/L 间甲酚的无机盐培养基(30 mL)中,摇床 175 r/min,28℃ 培养。3 d 后以 10% 接种量转接至间甲酚浓度为 40 mg/L 的无机盐培养基(30 mL)中,继续培养。以此方法连续循环,分别以间甲酚浓度为 133、267、400、600 和 800 mg/L 的无机盐

培养基(30 mL)进行驯化富集。含 800 mg/L 间甲酚的无机盐培养基(30 mL)接种、培养并变浑浊后,将菌液梯度稀释至 10^{-6} ,取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度各 0.1 mL 涂间甲酚(600 mg/L)无机盐平板,放 28℃ 恒温箱倒置培养,设置空白对照(不添加富集液,添加等量无菌水作对照)。3 d 后,间甲酚(600 mg/L)无机盐平板长出菌落,每个污泥样品随机挑取 3 株菌,在间甲酚(600 mg/L)无机盐平板划线纯化。

1.4 菌株酚降解能力的测定

熏蒸法验证:苯酚、间甲酚都具有一定的挥发性。将以上分离得到的单菌在无机盐平板上划线,在平板盖子上添加适量苯酚或间甲酚作碳源,28℃ 倒置培养,观察各菌对苯酚、间甲酚的利用情况。对能够生长的菌株进行摇瓶验证。

摇瓶初检:将熏法试验筛选得到的降解菌按 3% 接种量接种到含苯酚(200 mg/L)或间甲酚(100 mg/L)的 30 mL 无机盐培养液中,于 175 r/min,28℃ 培养 48 h。分别在 0、48 h 取样 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液,测定苯酚、间甲酚含量,计算降解率。

将降解性能较好的菌株及由富集驯化获得的菌种接种到 30 mL 苯酚(200 mg/L)、间甲酚(100 mg/L)无机盐培养液中,175 r/min,28℃ 培养 48 h。设置空白对照(添加等量无菌生理盐水作对照)分别在 0、24、48 h 取样,测定苯酚、间甲酚含量,计算降解率。每组试验设置 3 个平行重复。

1.5 苯酚、间甲酚含量的测定

苯酚、间甲酚含量通过紫外分光光度测定(SmartSpec 型),分别在 269 nm 和 221 nm 处测定吸光度^[30]。首先绘制 20 ~ 200 mg/L 浓度范围的标准曲线,然后取样品于 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液,测定苯酚、间甲酚含量。

1.6 BOX-PCR

菌落形态相似的菌株用 BOX-PCR 方法进行分析,方法参考文献[31]。

1.7 细菌 16S rDNA 分析

提取细菌总 DNA(硅胶柱型试剂盒,上海赛百盛基因技术有限公司);扩增细菌 16S rRNA 基因(约 1 500bp)^[31];扩增产物经纯化后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。利用 DNAMAN(6.0.40 版)进行序列分析,并在 NCBI 数据库进行序列 blast 比对分析,取其近缘菌的 16S rDNA 序列用 MEGA 4 软件构建系统发育树。

1.8 苯酚羟化酶基因分析

苯酚羟化酶基因扩增引物 (1)^[32]: P1: 5'-AGG CAT CAA GAT CAC CGA CTG-3'; P2: 5'-CGC CAG AAC CAT TTA TCG ATC-3'. 引物 (2)^[33]: mPhF: 5'-CGC CTG ACC ATG GAC GCC TAC-3'; mPhR: 5'-CGC CAG AAC CAC TTG TCG AT-3'. 扩增反应体系为: 无菌水 35 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μ L, dNTPs (各 10 mmol/L) 1 μ L, P1 (10 μ mol/L) 1 μ L, P2 (10 μ mol/L) 1 μ L, Red*Taq* DNA 聚合酶 2U, DNA 模板 1 μ L. PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 45 s; 58 $^{\circ}$ C, 40 s; 72 $^{\circ}$ C, 45 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 10 min. 测序及序列分析同上, 测序引物为 PCR 引物 P1.

2 结果与讨论

2.1 菌株分离及鉴定

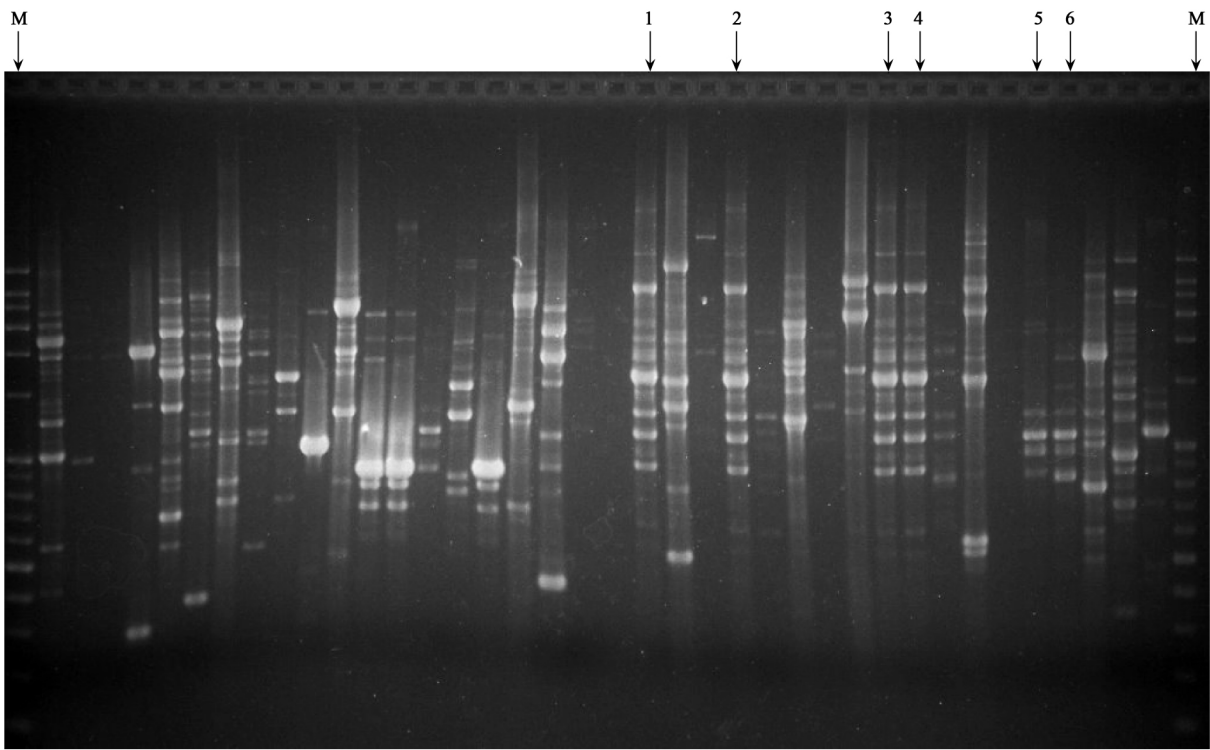
2.1.1 降解菌的分离

将经过平板酚熏法验证的菌株, 根据菌落形态进行分组, 对形态相似的菌株进行 BOX-PCR 扩增, 如图 1 所示. 从图 1 中看出, 1、2、3、4 的条带相同, 则认为它们对应菌株为同一菌株, 进而只保留其中一个菌株进行进一步研究; 而 5 和 6 比较相近, 需要从其 16S rDNA 序列上进行区分.

通过逐渐提高摇瓶中的间甲酚浓度, 最后浓度达到 800 mg/L, 将富集液稀释涂布间甲酚 (600 mg/L) 无机盐平板, 再在同样平板上划线纯化, 得到 5 株形态不同菌.

2.1.2 16S rDNA 鉴定

经 16S rDNA 序列测定, 从 2 个样品中共得到 28 株序列不同的菌株, 分属于 20 个属 28 个种 (表 1). 其中, 有 4 株是可能的新种 (见表 1 中加粗部分), 并经过了 2 次重复测序验证, 序列最高相似度与模式菌 < 97%.



M: 100 bp 和 500 bp 梯度; 1、2、3 和 4 条带相同; 5 和 6 条带相近

图 1 部分菌株的 BOX-PCR 比较

Fig. 1 BOX-PCR gel profile of some phenol-degrading isolates

将所获菌株的 16 S rDNA 序列及 NCBI 数据库中最高相似度模式菌株的 16 S rDNA 序列进行聚类分析, 构建系统发育树如图 2. 系统发育分析表明, 28 株菌分为六大类, 主要是属于变形菌纲 β 、 γ 亚

群, 分别占 35.7% 和 35.7%, 而其它四类则只占很小的比例, 分别为变形菌纲 α 亚群 (7.1%); 放线菌门 (Actinobacteria), 14.3%; 拟杆菌门 (Bacteroidetes), 3.6% 和 厚壁菌门 (Firmicutes),

3.6% . β 亚群包含 7 个属, 种属多样性十分丰富; γ 亚群包含了 5 个属. 其中的不动杆菌 (*Acinetobacter*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、真养产碱菌 (*Alcaligenes*) 都是常见的酚降解菌属.

表 1 酚降解菌的 16S rDNA 鉴定
Table 1 Identification of phenol-degrading bacteria by 16S rDNA

菌株编号	GenBank 中相似度最高的鉴定菌株	相似度 /%
GCS-AE-12	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> 58a ^T	97.888
GCS-AN-25	<i>Agromyces ulmi</i> XIL01 ^T	98.023
GCS-AN-16	<i>Alcaligenes aquatilis</i> LMG 22996 ^T	99.815
GCS-AE-36	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> IAM12369 ^T	99.181
GCS-AE-20	<i>Alicyciphilus denitrificans</i> K601 ^T	99.125
GCS-AN-40	<i>Alishewanella aestuarii</i> B11 ^T	99.189
GCS-AN-4	<i>Aquimonas voraii</i> GPTSA 20^T	94.208
GCS-AN-35	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 ^T	99.664
GCS-AE-7	<i>Brevibacterium epidermidis</i> NCDO 2286 ^T	99.862
GCS-AN-38	<i>Castellaniella defragrans</i> 54Pin ^T	100
GCS-AN-37	<i>Castellaniella denitrificans</i> NKNTAU ^T	99.932
GCS-AN-18	<i>Comamonas composti</i> CC-YY287^T	96.319
GCS-AN-8	<i>Comamonas denitrificans</i> 123 ^T	99.723
GCS-AN-3	<i>Diaphorobacter oryzae</i> RF3^T	95.565
GCS-AE-19	<i>Microbacterium natoriense</i> TNJL143-2 ^T	98.597
GCS-AN-21	<i>Paracoccus solventivorans</i> DSM 6637 ^T	99.573
GCS-AE-39	<i>Patulibacter minatonensis</i> KV-614 ^T	98.591
GCS-AE-31	<i>Pedobacter saltans</i> DSM 12145^T	96.06
GCS-AE-14	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> AL15-21 ^T	99.392
GCS-AE-28	<i>Pseudomonas mendocina</i> LMG 1223 ^T	99.241
GCS-AE-J-1	<i>Pseudomonas monteilii</i> CIP 104883 ^T	99.665
GCS-AN-J-3	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951 ^T	99.666
GCS-AE-23	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> DSM 50188 ^T	98.914
GCS-AN-6	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256 ^T	99.313
GCS-AN-5	<i>Pusillimonas noertemannii</i> BN9 ^T	97.321
GCS-AE-27	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> KRED ^T	99.867
GCS-AE-3	<i>Sphingobium cloacae</i> S-3 ^T	98.023
GCS-AN-39	<i>Thauera mechernichensis</i> TL1 ^T	99.254

2.2 酚降解能力分析

对初步筛选出的 8 株菌进行了苯酚、间甲酚降解活性的测定(表 2). 初步结果表明, 在以酚类物质为唯一碳源的培养基中, 菌株 GCS-AE-14 和 GCS-AN-8 的降解能力最好, 48 h 对苯酚(200 mg/L) 的降解率分别达到 80.5% 和 83.5%; 菌株 GCS-AE-31 在 59 h 内对 100 mg/L 间甲酚的降解率为 86.0%; 菌株 GCS-AN-8 在 48 h 内对 100 mg/L 间甲酚的降解率为 86.3%; 菌株 GCS-AN-38 在 72 h 内对 100 mg/L 间甲酚的降解率也达到 90.5% .

表 2 8 株分离株对苯酚和间甲酚降解活性的初步测定

Table 2 Tests on the degradation activity of 9 isolates

菌株编号	苯酚/%	间甲酚/%
GCS-AE-14	80.5	—
GCS-AE-19	—	28.5
GCS-AE-27	8.0	3.0
GCS-AE-31	—	86.0(59h) ¹⁾
GCS-AN-6	49.0	—
GCS-AN-8	83.5	86.3
GCS-AN-35	2.4	4.1
GCS-AN-38	—	90.5(72h) ²⁾

1) 摇瓶培养 59 h 的降解率; 2) 摇瓶培养 72 h 的降解率

进一步分析表明, 菌株 GCS-AE-J-1 和 GCS-AN-J-3 对间甲酚的降解效果最好. 菌株 GCS-AE-J-1 在 48 h 内降解 791 mg/L 间甲酚达到 94.6% , 而菌株 GCS-AN-J-3 对 763 mg/L 间甲酚的降解也达到了 92.2% . 它们降解间甲酚的初始浓度高于目前文献报道过的 600 mg/L^[22,26] . 同时, 它们对苯酚也有较好的降解效果, 菌株 GCS-AE-J-1 在 24 h 内将 1 098 mg/L 苯酚降解 72.8% , 48 h 降解率就达到 93.2% ; 菌株 GCS-AN-J-3 在 48 h 内对 1 090 mg/L 苯酚的降解率到达了 94.2% (表 3) .

表 3 6 株降解菌对苯酚、间甲酚的降解率测定

Table 3 Measurement of phenol and *m*-cresol degradation rate by 6 degrading bacteria

菌株编号	类型	初始浓度 /mg·L ⁻¹	24 h 降解率/%	48 h 降解率/%
GCS-AE-J-1	苯酚	1097.82	72.8	93.2
	间甲酚	790.77	2.2	94.6
GCS-AN-J-3	苯酚	1090.05	87.4	94.2
	间甲酚	762.75	1.7	92.2
GCS-AE-31	苯酚	203.51	89.4	—
	间甲酚	106.96	91.2	—
GCS-AN-8	苯酚	257.14	85.2	—
	间甲酚	126.28	89.6	—
GCS-AE-14	苯酚	244.61	87.7	—
	间甲酚	115.06	87.1	—
GCS-AN-38	苯酚	239.35	85.3	—
	间甲酚	127.42	89.4	—
无菌对照	苯酚	1055.48	4.9	5.8
	间甲酚	852.31	9.0	12.8

未经驯化的菌株 GCS-AE-14、GCS-AE-31、GCS-AN-8、GCS-AN-38 对苯酚、间甲酚也有一定的降解效果. 初步分析表明, 这 4 个菌株对 200 mg/L 苯酚、100 mg/L 间甲酚的降解率在 24 h 可达到 90% 左右.

2.3 苯酚羟化酶基因检测

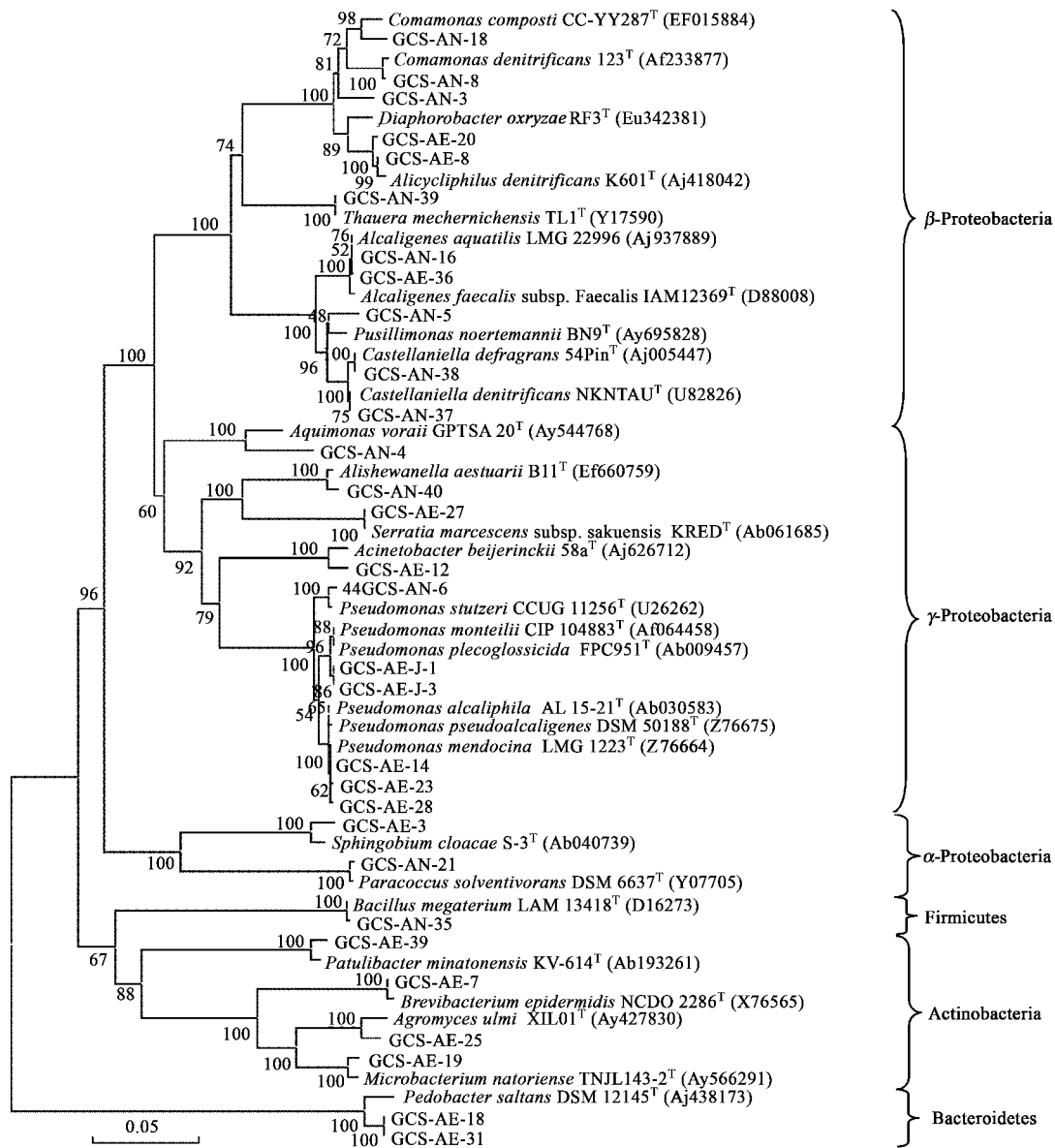


图2 焦化废水分离菌株的16S rDNA序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of culturable strains isolated from coking wastewater

对 GCS-AE-14 等 6 株菌进行了苯酚羟化酶基因的扩增. 结果表明, 有 4 株获得了预期序列. 其中, 菌株 GCS-AE-14 与 *Pseudomonas mendocina* PC3 的苯酚羟化酶基因序列的同源性最高, 达到 99%; 菌株 GCS-AE-J-1 和 GCS-AN-J-3 与 *Pseudomonas putida* KL33 的苯酚羟化酶基因序列的同源性最高, 均为 99%. 系统进化分析可见 (图 3), 来自假单胞属的序列聚集成一个簇, 而 GCS-AE-3 (*Sphingobium cloacae* S-3T, 98%) 的苯酚羟化酶基因序列与 *Diaphorobacter* sp. PCA039 的同源性最高 (99%), 但距离假单胞属较远.

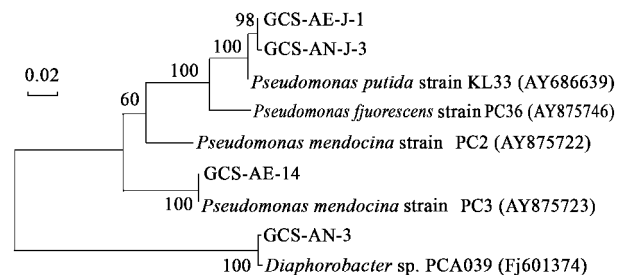


图3 4株菌的苯酚羟化酶大亚基基因部分片段的对比分析

Fig. 3 Analysis of phenol hydroxylase gene of the four strains

3 结论

(1) 本研究从焦化废水处理厂的 2 个活性污泥样品中分离、富集得到 28 株潜在的酚降解单菌, 分属于 6 大类、20 个属 28 个种. 其中的不动杆菌 (*Acinetobacter*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、真养产碱菌 (*Alcaligenes*) 都是已报道过的酚降解菌; 还有一些降解菌属, 如 *Pedobacter*、*Castellaniella* 等很少报道有酚降解能力, 特别是很少有报道降解间甲酚的能力. 已获得的酚降解菌丰富多样, 有潜在应用价值.

(2) 其中, 有 6 株对苯酚、间甲酚具有较好的降解效果. 它们是 GCS-AE-14 (*Pseudomonas alcaliphila* AL15-21, 99.392%)、GCS-AE-31 (*Pedobacter saltans* DSM 12145, 96.06%)、GCS-AN-8 (*Comamonas denitrificans* 123, 99.723%)、GCS-AN-38 (*Castellaniella defragrans* 54Pin, 100%)、GCS-AE-J-1 (*Pseudomonas monteilii* CIP 104883, 99.665%) 和 GCS-AN-J-3 (*Pseudomonas plecoglossicida* FPC951, 99.666%). 后面的 2 株菌对苯酚、间甲酚的降解效果最好, 并从中扩增得到了苯酚羟化酶大亚基基因. 菌株 GCS-AE-J-1 在 48 h 内对 791 mg/L 间甲酚的降解率达到 94.6%, 而菌株 GCS-AN-J-3 对 763 mg/L 间甲酚的降解率也达到了 92.2%. 此外, 从降解菌 GCS-AE-14 和 GCS-AN-3 也扩增到了苯酚羟化酶大亚基基因. 本研究结果丰富了酚类降解菌多样性, 并为含酚废水的生物治理提供了参考.

参考文献:

- [1] 杨红. 焦化废水优势菌的筛选及降解效果分析[D]. 大连: 大连理工大学, 2006.
- [2] 付柳, 任源, 韦朝海. 间甲酚高效降解菌的筛选及其降解特性[J]. 化工进展, 2008, 27(7): 1032-1037.
- [3] 李淑彬, 陈振军. 微生物降解酚类化合物的研究进展[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2005, (4): 136-142.
- [4] Latha S, Mahadevan A. Role of rhizobia in the degradation of aromatic substances[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 13(6): 601-607.
- [5] Semple K T, Cain R B. Biodegradation of Phenols by the Alga *Ochromonas danica* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(4): 1265-1273.
- [6] Atagana H I. Biodegradation of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(8): 845-849.
- [7] Wang G, Wen J, Yu G, et al. Anaerobic biodegradation of phenol by *Candida albicans* PDY-07 in the presence of 4-chlorophenol [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(11): 2685-2691.
- [8] Yotova L, Tzibranska I, Tileva F, et al. Kinetics of the biodegradation of phenol in wastewaters from the chemical industry by covalently immobilized *Trichosporon cutaneum* cells [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(3): 367-372.
- [9] Sandhu A, Halverson L J, Beattie G A. Identification and Genetic Characterization of Phenol-Degrading Bacteria from Leaf Microbial Communities [J]. Microbial Ecology, 2009, 57(2): 276-285.
- [10] El-Sayed W S, Ibrahim M K, Abu-Shady M, et al. Isolation and Characterization of Phenol-catabolizing Bacteria from a Coking Plant [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(9): 2026-2029.
- [11] Afzal M, Iqbal S, Rauf S, et al. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 149(1): 60-66.
- [12] 袁利娟, 姜立春, 彭正松, 等. 一株高效苯酚降解菌的选育及降酚性能研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 587-592.
- [13] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterisation of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11): 4396-4402.
- [14] Ho K L, Lin B, Chen Y Y, et al. Biodegradation of phenol using *Corynebacterium* sp. DJ1 aerobic granules [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(21): 5051-5055.
- [15] Zeng H Y, Jiang H, Xia K, et al. Characterization of phenol degradation by high-efficiency binary mixed culture [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2010, 17(5): 1035-1044.
- [16] Karigar C, Mahesh A, Nagenahalli M, et al. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus* [J]. Biodegradation, 2006, 17(1): 47-55.
- [17] 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]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 96(3): 310-312.
- [18] 吴志国, 王艳敏, 邢志华, 等. 固定化 *Ralstonia metallidurans* CH34 降解苯酚的研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 31-36.
- [19] Hino S, Watanabe K, Takahashi N. Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties [J]. Microbiology, 1998, 144(7): 1765-1772.
- [20] 唐赟, 刘沐之, 梁凤来, 等. 一株嗜热菌的分离鉴定以及苯酚降解特性[J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 39-44.
- [21] Wang Q, Ma P, Wang J, et al. Isolation and identification of a novel strain of *Klebsiella oxytoca* with phenol-degrading activity [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(S1): 56-57.
- [22] Saravanan P, Pakshirajan K, Saha P. Biodegradation of phenol and *m*-cresol in a batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly

- Pseudomonas* sp. [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99** (18): 8553-8558.
- [23] Wang G, Wen J, Li H, *et al.* Biodegradation of phenol and *m*-cresol by *Candida albicans* PDY-07 under anaerobic condition [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, **36** (6): 809-814.
- [24] 吴坤, 徐淑霞, 闵航, 等. 间甲酚对杂色云芝 (*Coriolus versicolor*) 生长及产漆酶能力的影响 [J]. *环境科学学报*, 2004, **24** (6): 1135-1141.
- [25] Bonting C F C, Schneider S, Schmidtberg G, *et al.* Anaerobic degradation of *m*-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium [J]. *Archives of Microbiology*, 1995, **164** (1): 63-69.
- [26] 彭丽花, 任源, 邓留杰, 等. 间甲酚降解菌 *Citrobacter farmeri* 的降解特性及代谢途径解析 [J]. *环境化学*, 2009, **28** (1): 44-48.
- [27] Müller J A, Galushko A S, Kappler A, *et al.* Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate [J]. *Archives of microbiology*, 1999, **172** (5): 287-294.
- [28] 白静. 粪产碱杆菌降解苯酚、间甲酚的特性及其动力学研究 [D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [29] Santos V L, Heilbuth N M, Braga D T, *et al.* Phenol degradation by a *Graphium* sp. FIB4 isolated from industrial effluents [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2003, **43** (3): 238-248.
- [30] 关晓燕. 苯酚降解菌的分离鉴定及其特性研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- [31] Ma Y, Wang L, Shao Z. *Pseudomonas*, the dominant PAH-degrading bacteria isolated from antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, **8** (3): 455-465.
- [32] 吴培诚. 苯酚降解细菌 GXP04 及其苯酚羟化酶基因的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2002.
- [33] 刘旭光, 邵世光. 苯酚降解菌的富集、分离与鉴定 [J]. *云南大学学报 (自然科学版)*, 2009, **31** (2): 195-199.
- [34] Jiang Y, Cai X, Wu D, *et al.* Biodegradation of phenol and *m*-cresol by mutated *Candida tropicalis* [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, **22** (4): 621-626.