

海洋苯酚降解菌 *Candida* sp. P5 的分离鉴定 及其降解特性*

胡忠** 吴奕瑞 徐艳 黄通旺 郑天凌¹

汕头大学生物学系 广东汕头 515063; ¹厦门大学生命科学学院 福建厦门 361005

摘要 从海洋沉积物中分离、筛选到一株能以苯酚作为唯一碳源和能源的酵母菌 P5。根据菌落特征、菌体形态、生理生化特性和 18S rDNA 序列分析,确定菌株 P5 为假丝酵母菌属 (*Candida* sp.)。该菌株最适宜生长和降解苯酚的条件为:温度 25 ℃, pH 6.0~7.0, 摇床转速 100 r/min, 需氧;菌株 P5 能在较高浓度的苯酚条件下生长,在 72 h 内可以降解 95% 以上的苯酚。对苯酚代谢途径和相关酶的研究发现,菌株 P5 主要在邻苯二酚 1,2-双加氧酶作用下通过邻位途径进行苯酚代谢。图 7 表 2 参 24

关键词 苯酚;生物降解;假丝酵母菌 P5

CLC X830.2

Screening of a Marine Phenol-degrading Yeast *Candida* sp. P5 and its Biodegradation Characteristics*

HU Zhong**, WU Yirui, XU Yan, HUANG Tongwang & ZHENG Tianling¹

(Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, Guangdong, China)

(¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract Strain P5, capable of degrading phenol, was isolated from marine sediment and could use phenol as the sole carbon source for growth. It was identified as *Candida* sp. by its morphologic and physiological characteristics, especially by the analysis of 18S rDNA sequences. Its optimal conditions for growth and degradation were 25 ℃, pH 6.0~7.0, 100 r/min of shaking rate and oxygen required. Strain P5 could grow at a relative higher concentration of phenol and degrade over 95% of phenol within 72 h. The metabolism of phenol was catalyzed by catechol 1,2-dioxygenase of *Candida* sp. P5 through the *meta* pathway. Fig 7, Tab 2, Ref 24

Keywords phenol; biodegradation; *Candida* sp. P5

CLC X172

近些年来,科技和经济迅速发展,人们生活水平日益提高,导致大量的工农业、生活废水和废物排放,沿海河口、港湾地区的环境污染、生态破坏等问题日益恶化,有毒物质特别是有机毒物在环境中的积累及其通过食物链富集已成为当今一个不可忽视的环境问题。利用微生物对有机污染物的生物代谢作用为基础的生物修复来解决海洋环境中的污染问题,已经成为当今国际海洋环境科学与工程研究的热点之一^[1, 2]。

苯酚是工业上常见的污染物,具有一定的毒性和腐蚀性,即使是低浓度的酚也会对生物体产生危害,因此酚类化合物为优先控制的污染物^[3]。采用微生物降解含酚废水不会产生二次污染,且成本较低^[4, 5]。目前对苯酚降解菌的研究多集中在细菌方面,如假单胞菌^[6~9]、芽孢杆菌^[10, 11]等,而对降解苯酚的酵母菌的研究较少,尤其是从海洋污染环境分离的能降解

苯酚的酵母菌。研究^[4]表明,酵母菌降解苯酚的能力较强,同时又可以回收菌体,在实现废物的资源化方面具有重要的作用。本文从海洋沉积物中分离到一株能降解高浓度苯酚的酵母菌株,并对其形态、生理特征和降解性能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 降解菌的分离、筛选

1.1.1 样品的富集培养 实验富集用的样品来自海洋沉积物。取 5 g 样品添加到 45 mL 无菌水中,在 150 r/min 摇床中震荡 3 h 静置 30 min 后,移取 5 mL 上层液到 45 mL 含 1.0 g/L 苯酚的无机盐培养基 (pH 6.5) 中。将培养瓶置于 25 ℃、摇床 (150 r/min)、黑暗条件下培养,定期观察三角瓶中发生的浊度、颜色的变化。培养一定时间后,移取 5 mL 上层液到新配制的 45 mL、含相同浓度苯酚的无机盐培养基中,继续富集培养;如此富集驯化培养约 10 次。

1.1.2 降解菌的筛选和纯化 移取 0.1 mL 富集培养的混合菌液,涂布在含有苯酚的固体无机培养基 (pH 6.5) 上,于 25 ℃ 黑暗中培养。挑取单菌落划线于酵母培养基的平板上继续培养,连续划线分离 3 次,最终获得纯化菌株,接种在固体酵母培养基上 4 ℃ 保存。

收稿日期: 2005-11-11 接受日期: 2006-03-22

* 霍英东教育基金会基金 (No. 942002)、国家自然科学基金 (No. 40206015) 和广东省科技计划项目 (2005B33201008) 资助。Supported by the Fork Ying Tong Education Foundation (No. 94002), the National Natural Science Foundation of China (No. 40206015), and the Sci-Tech Planning Program of Guangdong, China (2005B33201008)

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: hzh@stu.edu.cn)

1.2 菌株特性研究

参考常规方法,对降解菌的菌落特征、菌体形态和生理生化反应进行鉴定^[12]。

1.3 降解菌 18S rDNA 序列分析

1.3.1 菌体总 DNA 的提取 挑取低温保存的单菌落到 20 mL 的液体酵母培养基中, 25、150 r/min 振荡培养 48 h 后, 离心、收集 1 mL 培养液中的菌体, 采用 CTAB/NaCl 法提取酵母细胞的总 DNA, 可直接用于 PCR 扩增。

1.3.2 18S rDNA 的 PCR 扩增 采用通用引物 NS1 (5'-GTAGTCAATATGCTTGTCTC-3') 和 NS8 (5'-TCCGCAAGGTCACCTACGGA-3') 对酵母细胞总基因组进行 PCR 扩增^[13]。反应总体积为 20 μ L, 其中 ddH₂O 13.1 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 4 μ L, 10 mmol/L 引物 NS1 和 NS8 各 0.8 μ L, Taq 酶 1 U, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L (约 200 ng)。PCR 扩增过程为: 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 55 退火 50 s, 72 延伸 2.5 min, 循环 30 次, 最后 72 延伸 10 min 结束。

1.4 降解菌的降解特性研究

1.4.1 降解菌对苯酚的降解效率 将低温保存的单菌落接种到 20 mL 的液体酵母培养基中, 25 黑暗条件下、150 r/min 振荡培养 48 h, 再继续接种到新鲜酵母培养基中, 培养到 OD_{460 nm} 值 1.0 左右, 分别按 1:100 (V/V) 的接种量加入到含 1.0 g/L 苯酚的液体无机培养基中, 于 25 黑暗条件下 150 r/min 振荡培养。每 24 h 测定一次降解菌的生长和苯酚降解效率, 用紫外分光光度计分别测定 270 nm、460 nm 波长下的 OD 值, 并计算出苯酚剩余量、降解菌的生长状况。

1.4.2 降解条件的优化 为进一步优化降解菌的最佳降解条件, 分别研究了不同温度 (25~37), pH 值 (pH 5.5~7.5) 和摇床转速 (0~200 r/min) 对降解菌生长和苯酚 (起始浓度 1.0 g/L) 降解效率的影响。

为探讨降解菌对苯酚的耐受程度, 分别将菌株接种到含有不同苯酚浓度 (0~2.0 g/L)、pH 6.5 的无机培养基中, 在 25、150 r/min 摇床上避光培养, 每 24 h 测定一次菌体的生长情况。

1.5 降解菌邻苯二酚双加氧酶活力的测定

1.5.1 粗酶液的制备 将菌体接种到 100 mL 含有 1.0 g/L

苯酚、pH 6.5 的无机培养基中, 分别在 25、150 r/min 振荡避光培养 24、48、72 和 96 h 后, 4、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 pH 6.5 磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次, 用同样的缓冲液 4 mL 悬浮并用超声波破碎细胞。细胞裂解液于 4、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 用于酶活力的测定。

1.5.2 酶活力的测定 邻苯二酚 1,2-双加氧酶和邻苯二酚 2,3-双加氧酶的活性分别以酶反应产物粘糠酸在 260 nm ($\epsilon_{260} = 16\ 000\ \text{mol}\ \text{L}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) 和 2-羟基粘糠酸半醛在 375 nm ($\epsilon_{375} = 12\ 000\ \text{mol}\ \text{L}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) 处的光吸收测定。酶活力单位定义为每分钟催化生成 1 μ mol 产物所需的酶量^[14, 15]。

反应体系参照 Spain 等^[16]的方法进行的。反应体系总体积为 3 mL, 其中含有 40 mmol/L EDTA 0.3 mL, 30 mmol/L 邻苯二酚 0.03 mL, 粗酶液 0.6 mL, 0.05 mol/L 的 pH 6.5 磷酸缓冲液 2.07 mL。反应混合物在 25 条件下反应, 采用分光光度计每隔 15 s 测定 260 nm 和 375 nm 的吸光度。粗酶液的蛋白含量采用 Bradford 方法测定^[17]。

2 结果与讨论

2.1 海洋苯酚降解菌的分离、筛选及形态特征

海洋沉积物样品在含苯酚的液体无机培养基 (pH 6.5) 中富集培养多代后, 进一步用于降解苯酚菌株的分离、筛选。将富集培养的微生物涂布在含苯酚的固体无机培养基上培养, 待菌落长出后, 挑取单菌落于固体酵母培养基上划线分离; 经过多次划线纯化后, 分离得到一株菌株, 具有圆形、边缘整齐、干燥不透明、乳白色等菌落特征, 能以苯酚为唯一碳源和能源利用, 编号为 P5。光镜下, 该菌体为椭圆形, 且含有圆形或椭圆形的子囊孢子, 有芽细胞和假菌丝。可以初步确定, 这株菌株属于酵母菌。

2.2 降解菌的鉴定

2.2.1 生理生化特性 对菌株 P5 的部分生理生化特性进行了分析, 结果如表 1 所示。可以发现, 菌株 P5 能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等多种糖类物质, 不能利用部分氨基酸物质, 且发酵不产生酸性物质, 具有氧化酶活性, 属好氧型。

表 1 菌株 P5 的部分生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain P5

底物 Substance	生长情况 Growth	底物 Substance	生长情况 Growth	底物 Substance	生长情况 Growth
糖类代谢 Sugar metabolism		果糖 Fructose	-	香豆酸 Coumaric acid	+
甘露糖 Mannose	+	鼠李糖 Rhamnose	-	其他 Others	
木糖 Xylose	+	树胶醛糖 Gum-aldose	-	氧化酶 Oxidase	+
棉子糖 Melitriose	-	有机酸代谢 Organic acid metabolism		三氯新 Triclosan	-
核糖 Ribose	-	尿素 Urea	-	乙酰氨 ACE	-
肌糖 Inose	-	丙二酸 Malonic acid	-	多粘菌素 B Polymyxin B	-
侧金盏花醇 Adonite	+	七叶树苷 ESC	-	硫化氢 H ₂ S	-
乳糖 Lactose	-	柠檬酸 Citrate acid	+	半乳糖苷酶 β -galactosidase	-
植物尿蓝母 Indican	+	氨基酸代谢 Amino acid metabolism		葡萄糖氧化 Glucose oxidation	+
麦芽糖 Maltose	+	苯丙氨酸 Phenylalanine	-	葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+
山梨糖 Sorbose	+	鸟氨酸 Ornithine	-	阳性生长控制 Growth control	+
甘露醇 Mannitol	+	赖氨酸 Lysine	-	产酸 Acid producing	-
蔗糖 Sucrose	+	精氨酸 Arginine	-		

+: 阳性 Positive; -: 阴性 Negative

2.2.2 18S rDNA 序列测定 采用改良的 CTAB /NaCl 法提取菌株 P5 的基因组总 DNA, 利用 18S rDNA 通用引物 NS1 和 NS8 进行 PCR 扩增, 得到了大小约 1 800 bp 的扩增产物; 进一步将产物纯化、克隆后测序, Blast 比对分析, 构建了菌株 P5 的 18S rDNA 系统进化树 (图 1)。结果表明, 菌株 P5 的 18S rDNA

片段序列与 GenBank 数据库中的 *Candida tropicalis* (Accession No. M55527) 及 *Candida sojae* (Accession No. AB013549) 等具有约 99% 的同源性。结合菌株的形态特性、常规生理生化鉴定结果, 可以初步确定菌株 P5 属于 *Candida* sp. (Accession No. DQ177818)。

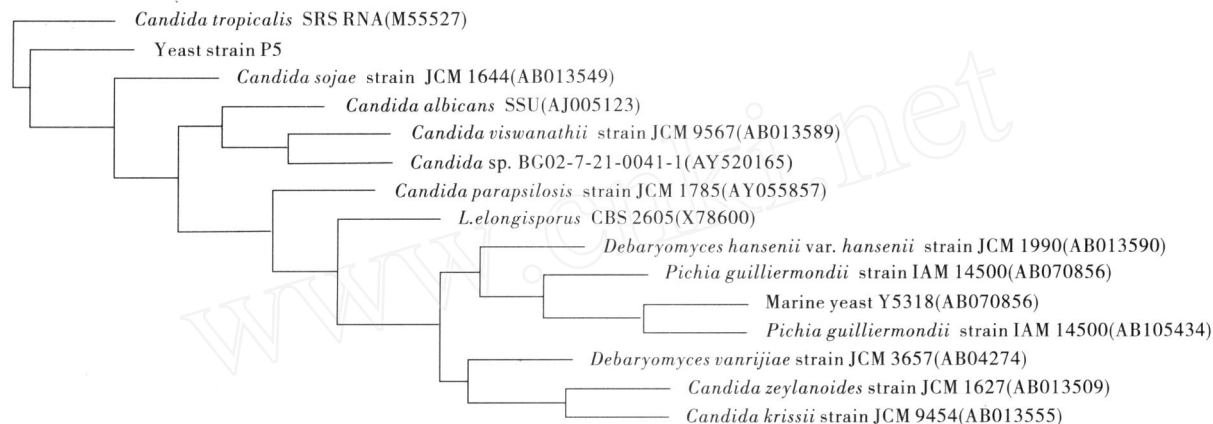


图 1 菌株 P5 的 18S rDNA 系统进化树

Fig 1 Phylogenetic relationship of strain P5 in the *Candida* based on 18S rDNA sequence comparison

2.3 降解菌的降解特性

2.3.1 菌株 P5 对苯酚的降解效率 菌株 P5 在 1.0 g/L 苯酚的液体无机培养基中培养一定时间后, 利用紫外分光光度法测定波长 270 nm 下苯酚的含量、波长 460 nm 下菌体的生长状况, 结果如图 2 所示。可以看出, 随着培养时间的延长, P5 菌体浓度不断增加, 培养液中苯酚的剩余量也相应地下降; 培养 72 h 后, 该菌株可以降解约 95% 的苯酚。这表明菌株 P5 具有较高的苯酚降解能力。

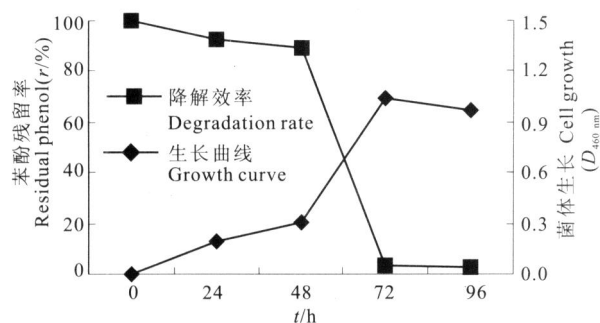


图 2 菌株 P5 对苯酚的降解

Fig 2 Degradation of phenol by strain P5

2.3.2 菌株 P5 对不同芳烃化合物的利用能力 将菌株 P5 接种到含不同芳烃化合物的无机培养基中, 培养一定时间后, 检测了菌株以不同芳烃化合物作为能源的生长情况。结果 (表

2) 发现, 菌株 P5 不但能利用苯酚, 还能以对苯二酚、间苯二酚和邻苯二酚等作为唯一碳源和能源生长; 但是菌株 P5 对萘和 3, 5-二羟基甲苯的利用能力较弱, 不能利用二苯胺、对二氯苯、硝基苯、对硝基苯酚作为唯一碳源进行生长。

2.3.3 培养条件对菌株 P5 降解苯酚的影响 温度: 将菌株 P5 接种到含有 1.0 g/L 苯酚、pH 6.5 的无机培养基中, 分别在 25、30、37 的温度于 150 r/min 摇床转速下避光培养, 苯酚的降解效果和菌的生长状况见图 3。从图中 P5 菌的生长情况来看, 菌体在温度 30 下的生长情况略优于 25 和 37 培养条件; 而对苯酚的降解效率, 25 培养下效果最好, 培养 48 h 时降解率可以达到 95%; 30 次之, 而 37 下降解率明显下降。

pH 值: 图 4 所示为不同 pH (5.5~7.5) 下菌株 P5 对苯酚的降解效果和菌体的生长状况。可以发现, 培养液的起始 pH 值对 P5 菌株的生长影响较小, 在所检测的 pH 范围中, 培养 96 h 的菌体在 460 nm 波长下 D 值都可达 0.9。然而培养液 pH 值的差异会影响到 P5 菌株对苯酚的降解结果, 其中 pH 6.0~7.0 范围对苯酚的降解效率影响不大, 过酸或偏碱的条件会延缓苯酚的降解过程。

摇床转速: 将菌株 P5 接种到含有 1.0 g/L 苯酚的 pH 6.5 的无机培养基中, 于 25 下分别以 0、50、100、150、200 r/min 的摇床转速进行避光培养, 分析菌株 P5 对苯酚降解的效果和菌体的生长状况。由图 5 可以发现, 菌株 P5 对苯酚的降解

表 2 降解菌 P5 对不同芳烃化合物的利用

Table 2 Utilization of different aromatic hydrocarbon compounds by strain P5

底物类型 Substance	利用情况 Utilization	底物类型 Substance	利用情况 Utilization	底物类型 Substance	利用情况 Utilization
对苯二酚 Hydroquinone	++	苯酚 Phenol	++	二苯胺 Diphenylamine	-
间苯二酚 Resorcinol	++	萘 Naphthalene	+	邻苯二甲酸 Phthalic acid	-
邻苯二酚 Catechol	++	苯甲酸 Benzoic acid	-	对硝基苯酚 Paranitrophenol	-
对二氯苯 Paradichlorobenzene	-	3, 5-二羟基甲苯 3, 5-Dihydroxytoluene	+		

++: 利用能力较强 Higher utilization; +: 利用能力较弱 Lower utilization; -: 不能利用 No utilization

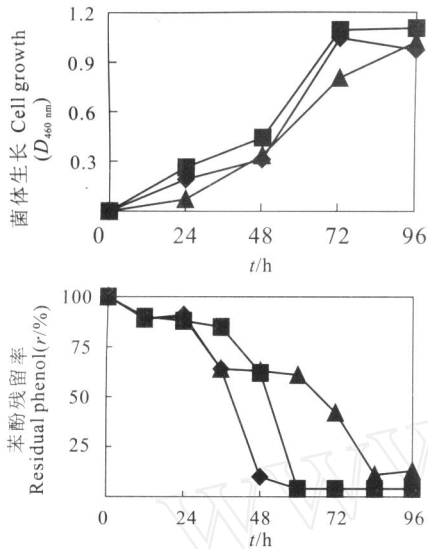


图3 温度对菌株 P5降解苯酚效率的影响

Fig 3 Effect of temperature on phenol degradation by strain P5
: 25 ; : 30 ; : 37

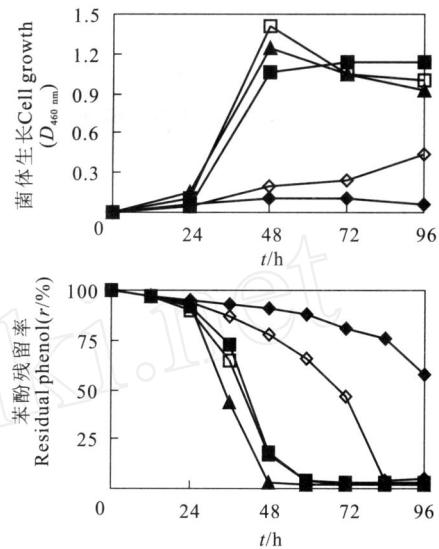


图5 培养过程中摇床转速对菌株 P5降解苯酚效率的影响

Fig 5 Effect of shake speed on phenol degradation by strain P5
: 0 r/min; : 50 r/min; : 100 r/min;
: 150 r/min; : 200 r/min

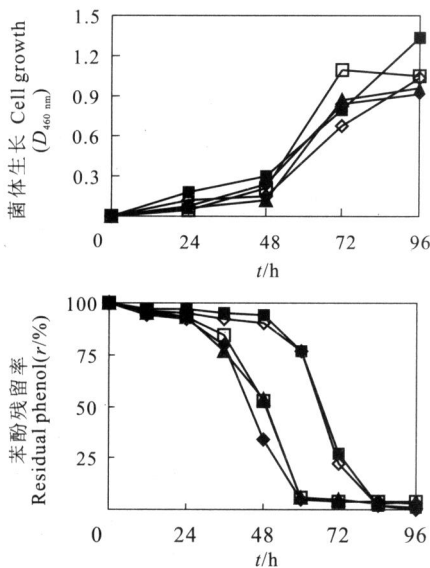


图4 pH值对菌株 P5降解苯酚效率的影响

Fig 4 Effect of pH value on phenol degradation by strain P5
: pH 5.5; : pH 6.0; : pH 6.5; : pH 7.0; : pH 7.5

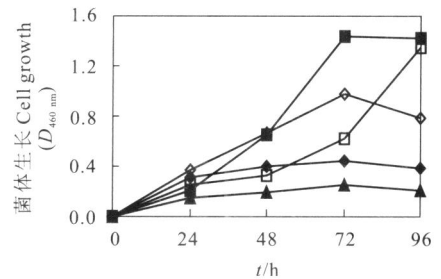


图6 菌株 P5对苯酚的耐受性

Fig 6 Phenol tolerance of strain P5
: 0 g/L; : 0.5 g/L; : 1.0 g/L; : 1.5 g/L; : 2.0 g/L

效率与其生长情况基本上保持一致。随着摇床转速的加快,菌体的生长速率、降解苯酚的效率越高,但是摇床转速超过 100 r/min后效果不太显著,因此在本实验中选用 100 r/min作为最佳摇床转速。这表明 P5菌株为好氧菌,因为摇床转速与培养基中的溶解氧浓度有关,转速越快,溶解氧浓度越高,有利于菌体的生长。这也进一步证明苯酚的降解过程需要有氧气的参与,与某种特定的加氧酶相关。

对苯酚的耐受性:苯酚虽然能够作为菌株在培养基中的唯一碳源被利用,但是苯酚自身对菌体也存在一定的伤害作用,因此在研究菌株对苯酚的降解效率的同时,有必要确定菌株对苯酚的耐受性程度。

将菌株 P5接种到含有 0~2.0 g/L苯酚、pH 6.5的无机培养基中,在 25、150 r/min摇床上避光培养,其生长曲线

见图 6。结果表明,菌株 P5可以在 1.5 g/L的苯酚浓度下生长,而苯酚浓度过高时会影响菌体的生长。Bastos等在亚马逊流域的土壤中分离到假丝酵母菌 (*Candida tropicalis*),可降解高达 1.5 g/L的高浓度苯酚^[20]。而 Lee等^[21]筛选得到的酵母菌 *Yarrowia lipolytica*,周治等^[15]分离到的瓶形酵母菌 (*Pityrospora* sp.)只能降解 1 g/L的苯酚。这说明假丝酵母菌属可能具有比其他酵母菌属高耐受性和高降解率的特点^[22-24],也为进一步研究该菌属微生物的降解功能和降解机制奠定基础。

2.4 菌株 P5苯酚代谢途径及酶特性的分析

苯酚的降解,或者通过邻苯二酚 1,2-双加氧酶 (C12O)在两个羟基之间开环(邻位途径,形成乙酰辅酶 A和琥珀酰辅酶 A),或者通过邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (C23O)在两个羟基之旁开环(间位途径,形成丙酮酸和乙醛),通过不同的下游途径进入三羧酸循环^[19]。结果发现,菌株 P5在以苯酚为唯一碳源的情况下,存在邻苯二酚 1,2-双加氧酶的活性,但却未测得 C23O的活性。

在含苯酚的培养基中,菌株 P5的 C12O酶活力变化曲线见图 7。结果发现,C12O的酶活力随着培养时间的延长而逐渐

增加,在培养后期,酶活力出现下降趋势,这与苯酚的降解和菌体的生长曲线成正相关。此外,在不含苯酚的酵母培养基中生长的 P5 菌株很难检测到 C12O 的活性(数据未显示),说明该菌株中此酶为诱导型酶,只有在苯酚存在的情况下诱导产生。

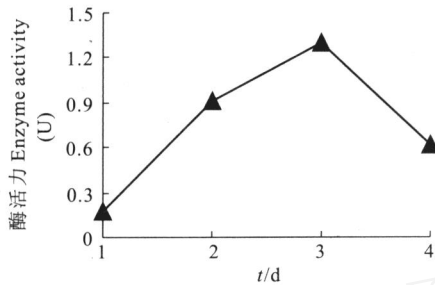


图7 菌株 P5 在苯酚培养基中的邻苯二酚 1,2-双加氧酶活力变化曲线

Fig 7 Specific activity of catechol 1,2-dioxygenase of strain P5 in phenol-contained medium

3 结论

通过对苯酚降解菌的富集培养、驯化筛选,从海洋污染环境中得到了一株能以苯酚作为唯一碳源、能源生长的酵母菌 P5,经过生理生化特性和 18S rDNA 分子鉴定,该菌株属于假丝酵母菌属 (*Candida* sp.)。该菌株能在 1.5 g/L 的苯酚浓度下生长,在 72 h 内降解苯酚高达 95% 以上。此外,菌株 P5 也可以利用对苯二酚、间苯二酚和邻苯二酚作为唯一碳源和能源生长,因为这些物质均有可能是苯酚降解过程中的中间产物。但是菌株对萘和 3,5-二羟基甲苯利用能力较弱,并不能利用二苯胺、对二氯苯、硝基苯、对硝基苯酚。

通过对苯酚降解过程的条件进行优化,菌株 P5 最适宜的降解条件为:温度 25℃, pH 6.0~6.5,摇床速率 100 r/min,为好氧菌。通过分析苯酚生物降解中的相关酶活性发现,菌株 P5 具有 C12O 活性,缺乏 C23O 的活性,它主要通过邻位途径在苯酚的两个羟基之间开环进行苯酚代谢;但是 P5 菌株 C12O 的活性在酵母培养基上检测不出,只有在苯酚存在的情况下才可以诱导产生。

References

- Paula M, Van Schie, Young LY. Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2432 ~ 2438
- Sparling GP, Ord BG, Vanghan D. Changes in microbial biomass and activity in soils amended with phenolic acid *Soil Biol Biochem*, 1981, **3**: 455 ~ 460
- Dean-Ross D. Bacteria abundance and activity in hazardous waste-contaminated soil *Bull Environ Contam Toxicol*, 1989, **52**: 655 ~ 678
- Wu D (吴笛), Zhang GD (张国冻), Sun LW (孙立伟), Chen YG (陈源高), Wu YL (吴玉磷), Shi XL (史小丽), Kong ZM (孔志明), Liu ZT (刘征涛). Toxicological study on phenol and O-methylphenol two kinds of environmental endocrine disrupting chemicals *J Nanjing Univ Nat Sci* (南京大学学报自然科学版), 2001, **37** (6): 719 ~ 723
- Zhou Z (周治), Yang LY (杨柳燕). Screening of phenol degrading yeast and its characteristics *J Nanjing Univ Nat Sci* (南京大学学报自然科学版), 2001, **37** (6): 724 ~ 729
- Powłowski J, Shingler V. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation*, 1994, **5**: 219 ~ 236
- Banerjee I, Modak JM, Bandopadhyay K. Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida* *Biotechnol*, 2001, **87**: 211 ~ 216
- Heinaru E, Truu J, Stoltmeister U, Heinaru A. Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol and *p*-cresol degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **31**: 211 ~ 218
- Mordocco A, Kuek C, Jenkins R. Continuous degradation of phenol at low concentration using immobilized *Pseudomonas putida* *Enzyme Microb Technol*, 1999, **25**: 530 ~ 541
- Duffner RM, Kirchner U, Bauer MP. Phenol and cresol by the thermophilic *Bacillus therooglucosidarius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*, 2000, **256**: 215 ~ 219
- Duffner RM, Muller R. A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the gene. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **161**: 37 ~ 48
- 沈萍, 范秀容等主编. 微生物学实验. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999. 42 ~ 44
- Hang XM (杭晓敏), Yang H (杨虹), Whiteby Come. PCR amplification of anaerobic fungal 18S rDNA from landfill sites *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, **17** (5): 515 ~ 519
- Chakrabarty AM. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas* *J Bacteriol*, 1972, **112** (2): 815 ~ 823
- Zhang J (张杰), Liu YS (刘永生), Feng JX (冯家勋), Bo XL (柏学亮), Zhang ZZ (张忠泽). Cloning, location and overexpression of catechol 2,3-dioxygenase gene. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, **9** (5): 542 ~ 545
- Spain JC, Nishino SF. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 579 ~ 583
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 ~ 254
- Ma ZH (马忠华), Luo RX (罗如新), Xia YF (夏怡丰), Wang WD (王文东), Chen WJ (陈文峻), Kuai BK (蒯本科). Cloning of a new catechol 1,2-dioxygenase gene (*fdC*) from *Plesiomonas* and its expression in the *E. coli* *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2000, **40** (6): 579 ~ 585
- Arai H, Akahira S, Ohishi T, Maeda M, Kudo T. Adaptation of *Candida testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation *Microbiol*, 1998, **144**: 2895 ~ 2903
- Bastos AE, Moon DH, Rossi A, Trevors JT, Tsai SM. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples *Arch Microbiol*, 2000, **174**: 346 ~ 352
- Lee JS, Kang EJ, Kim MO, Lee DH, Bae KS, Kim CK. Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol *Microbiol Biotechnol*, 2001, **11**: 112 ~ 120
- Vallini G, Frassinetti S, Scorzetti G. *Candida aquatextoris* sp. nov., a new species of yeast occurring in sludge from a textile industry wastewater treatment plant in Tuscany, Italy. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 336 ~ 340
- Corvini PF, Meesters RJ, Schaffer A, Schroder HF, Vinken R, Hollender J. Degradation of a *Nonylphenol* single isomer by *Sphingomonas* sp. strain TINP3 leads to a hydroxylation-induced migration product *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 6897 ~ 6900
- Tanghe T, Dhooze W, Verstraete W. Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (2): 746 ~ 751