华中农业大学

硕士学位论文

焦化废水中酚类降解菌及其降解机制的初步研究

姓名：曹军伟

申请学位级别：硕士

专业：微生物学

指导教师：邵宗泽

201206

摘要

苯酚及其衍生化合物是一类重要的环境污染物，具有很大的毒性和致癌、致突变作用。随着经济的发展，未经处理的含酚废水对人类的生存环境已经造成了严重的威胁。微生物法处理含酚废水与物理法和化学法相比，具有效率高、成本低并且无二次污染等优点，微生物降解在废水处理中起着主要作用。因此，开展酚降解菌的研究对于认识和利用微生物在含酚废水处理过程中的作用具有重要意义。

本研究利用 LB、216L 和以苯酚或间甲酚为唯一碳源的无机盐固体培养基，从首钢焦化废水污泥样品中分离得到 26 株可能的降解菌。同时，以间甲酚为唯一碳源，通过富集驯化方法筛选得到能高效降解间甲酚、苯酚的菌株 AEJ1 和 ANJ3。菌株 AEJ1 在 48 h 内对间甲酚（790.77 mg/L）的降解率达到 94.6%，而菌株 ANJ3 对 762.75 mg/L 间甲酚的降解率也达到了 92.2%。通过 16S rRNA 基因序列分析，从 2 个供试污泥样品中共获得了 28 株不同单菌，分属于 20 个属的 28 个种，主要为变形菌纲 β 和 γ 亚群，其中 4 株菌可能属于新种。本研究对其中 2 株潜在新种 AN3 和 AE31 进行了系统的分类鉴定，结果显示菌株 AN3 是 *Ottowia* 属的一个新种，并命名为 *Ottowia beijingensis* AN3^T。菌株 AE31 为 *Pedobacter* 属的一个新种，并命名为 *Pedobacter beijingensis* AE31^T。

对部分菌株通过 PCR 扩增、分析其基因组 DNA 苯酚羟化酶基因，结果只从菌株 AE14、AN3、AEJ1 和 ANJ3 得到了苯酚羟化酶基因序列。菌株 AE14 与 *Pseudomonas mendocina* PC3 苯酚羟化酶基因的序列相似性达到 99%；菌株 AN3 与 *Diaphorobacter* sp. J5-51 的苯酚羟化酶基因序列相似度为 100%；菌株 AEJ1 和 ANJ3 与 *Pseudomonas putida* KL33 苯酚羟化酶基因的序列相似性均为 99%。

本研究对苯酚、间甲酚降解菌 AN3^T 进行了基因组草图的测序，并分析了其中与苯酚、间甲酚降解相关的功能基因。菌株 AN3^T 基因组中有大量苯酚、间甲酚降解相关基因，其中 *orf*1610 至 *orf*1642 共有 13 个基因可能参与苯酚的生物降解，构成了间位裂解途径的完整基因簇。推测菌株 AN3^T 的苯酚降解途径为苯酚间位降解途径，而对间甲酚可能采取两条独立的代谢途径。

综上所述，本研究从焦化废水活性污泥样品中分离的酚降解菌种资源多样丰富，具有一定的应用价值，特别是菌株 AEJ1 和 ANJ3 对苯酚、间甲酚降解效果很好，有待进一步深入研究。

关键词：活性污泥；苯酚；间甲酚；生物降解；苯酚羟化酶基因

Abstract

Phenols and phenolic compounds are a major source of environmental pollutants, which are very toxic, carcinogenic and mutagenic. More and more phenol wastewater without treatment is threatening the environment seriously with the development of economy. Compared with physical and chemical methods, microorganism biodegradation of phenol wastewater is more effective, lower in cost, and without secondary pollution. Thus, the isolation and identification of phenol-degrading bacteria are very important, especially in promoting the phenol sewage treat process.

Together, 26 possible phenol-degrading bacteria were isolated from the activated sludge through LB、216L and phenol, *m*-cresol inorganic salt medium. Two other degrading bacteria named AEJ1 and ANJ3 were obtained by enrichment with gradual increase of *m*-cresol dosage as the sole source of carbon. Strain AEJ1 was able to metabolize 94.6% *m*-cresol with initial concentration 790.77 mg/L in just 48 h; while ANJ3 metabolized 92.2% *m*-cresol with initial concentration 762.75 mg/L in 48 h.

Analysis of 16S rRNA gene sequence showed that the isolates belonged to 28 different strains of 28 species of 20 genera. Most of them belonged to *β*- and *γ*-Proteobacteria. Four of them possibly belonged to novel species based on their low 16S rDNA sequence similarity to the described type strains. Results of systematic classification and identification of strain AN3 showed that it represents a novel species in the genus *Ottowia*, of which the name *Ottowia beijingensis* sp. nov. is proposed. Results of systematic classification and identification of strain AE31 showed that it represents a novel species in the genus *Pedobacter*, of which the name *Pedobacter beijingensis* sp. nov. is proposed.

PCR analyses revealed the encoding genes of phenol hydroxylase, the nucleotide sequence of PCR fragment from strain AE14 shared 99% homology with the phenol hydroxylase of strain *Pseudomonas mendocina* PC3, and AN3 shares 100% homology with the phenol hydroxylase of phenol-degrading strain *Diaphorobacter* sp. J5-51, while AEJ1 and ANJ3 both shares 99% homology with the phenol hydroxylase of strain *Pseudomonas putida* KL33. The existence of the key enzymes further confirmed the phenol-degrading capability at molecular level.

Whole genome sequencing of strain AN3^T with phenolic degradation effect and preliminary analysis of the genome was carried out. Lots of phenol and *m*-cresol degradation genes were found, including 13 genes (*orf*1610 to *orf*1642) which may be involved in phenol degradation *meta*-cleavage pathway. *Meta*-cleavage pathway for

phenol degradation in strain AN3^T was proposed, while maybe there are two independent pathways for *m*-cresol degradation.

In summary, lots of phenol and *m*-cresol degrading bacteria were isolated from activated sludge, and of practical application. Particularly, strain AEJ1 and ANJ3 are excellent phenol and *m*-cresol degrader, and need further study.

Key words: Activated sludge; phenol; *m*-cresol; biodegradation; hydroxylase gene

1 前言

1.1 焦化废水的来源与组成

焦化废水是焦化工厂在其生产过程中产生的废水，如炼焦生产过程中剩余的氨水、精制净化过程中的废酸废碱液、化产工艺过程中的分离水等，来源复杂（韦朝海等，2011）。焦化废水含有大量有机物和无机物，其水质组成与生产工艺、运行管理及地域等因素密切相关。焦化废水是典型的难降解、强毒强害的有机废水，其中有机物包括芳香族化合物、杂环化合物等，其特征性有机污染物有氨氮、氰化物、酚类、油分和硫化物等，含量最多的是酚类物质，生化处理过程中很难把这些有机污染物完全降解，至今仍是各国的水处理难题（陈春，2011；韦朝海等，2011）。

1.2 苯酚、间甲酚的来源及其危害

苯酚（phenol），又称石炭酸，分子结构式如图 1-1 所示，是一种半透明的白色针状晶体，具有特殊的令人呕吐的甜辣芳香气味，广泛存在于钢铁厂废水、石化废水、纺织厂废水、化工厂废水和制药厂废水等工业废水中，是一种各国优先控制的环境污染物。苯酚容易燃烧和爆炸，当空气中混有 3%-10%苯酚时，就可能引起爆炸（Zeng 等，2010；关晓燕，2008）。

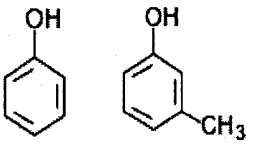

图 1-1 苯酚（C00146）和间甲酚（C01467）的分子结构式

Fig. 1-1 Molecular structure of phenol (C00146) and *m*-cresol (C01467)

间甲酚（*m*-cresol），又称 3-甲酚，是苯酚的单甲基衍生物，是酚类化合物中具有代表性的一种环境污染物质，具有特殊的芳香气味，分子结构式如图 1-1 所示。间甲酚是生产速灭威、倍硫磷、二氯苯醚菊酯、杀螟松等杀虫剂以及防腐剂、树脂、消毒剂、彩色胶片、香料、维生素 E 和增塑剂的中间体，广泛存在于杂芬油和其他多种工业废水中，会造成土壤和水源的污染。间甲酚存在对甲酚（*p*-cresol）和邻甲酚（*o*-cresol）2 种同分异构体，它们都具有强烈的毒性及腐蚀性（Jiang 等，2010；付柳等，2008）。

苯酚、间甲酚都是人类饮用水水源中急需严格控制的环境污染物，具有极大的毒性和致癌、致突变作用。含酚废水常常会污染饮用水水源和农田土壤，可使鱼虾等动物死亡，抑制农作物生长（龚斌，2006）。它们都具有较差的水溶性和较好的脂

溶性，可以透过细胞膜、细胞质，并在人体和动物的脂肪组织内积蓄，从而对脾脏、胰脏和肾脏等器官造成长期的深度危害。酚会使蛋白质凝固，水溶液中的酚能够被皮肤细胞吸收，进而对人的皮肤粘膜造成腐蚀，还可以作用于中枢神经而引起痉挛，对人类的健康造成严重威胁（Zeng 等，2010）。当饮用水水源中酚类物质的质量浓度达到 0.002 mg/L，加氯消毒时就会产生氯酚恶臭味；当质量浓度超过 0.005 mg/L 时，水就不能饮用了（李绍峰等，2004）。

因此，酚类物质的可降解性引起了研究者的极大兴趣，世界各国相继把酚类物质列入有毒环境污染物名单，并投入大量资金治理酚类环境污染，制定了严格的含酚污水排放标准，规定饮用水水源含挥发性酚的浓度不得高于 0.001 mg/L，其他水源水体中含酚类最高容许浓度为 0.002 mg/L（Zeng 等，2010；龚斌，2006；关海滨，2007）。

1.3 苯酚、间甲酚的生物降解及其降解菌

相对于化学方法、物理方法来说，利用微生物的新陈代谢作用对酚类物质进行生物降解是目前应用最为普遍的含酚工业废水处理技术，可将酚类污染物降解成 CO_2、H_2O 或转化为其他无毒中间产物从而实现无害化的目的。生物降解技术利用微生物生态优势高效降解酚类污染物，并很少产生有害副产物，经济高效（Wang 等，2009；向述荣等，2001）。

对于苯酚生物降解的研究，国外起步比较早，已经分离得到许多苯酚降解菌。目前已分离和鉴定的苯酚降解菌包括藻类（*Ochromonas*）（Semple 等，1996）、真养产碱菌（*Alcaligenes eutrophus*）（Kim 等，1997）、丛毛单胞菌（*Comamonas*）（Arai 等，1998）、根瘤菌（*Rhizobia*）（Chen 等，2004；Wei 等，2008）、酵母菌（*Trichosporon*）（Kalin 等，1992；Kirimura 等，2010）、假单胞菌（*Pseudomonas*）（Kotresha 等，2008；Kukor 等，1990；Powlowski 等，1994）、醋酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）（Paller 等，1995；Zhan 等，2012）、反硝化菌（Bonting 等，1995）、*Ralstonia eutropha*（Tepe 等，2008）以及一些微生物菌群（Lee 等，2011）。

由于我国工业化起步较晚，对环境微生物学的研究起步也比较晚，目前国内研究者对于苯酚生物降解的研究还基本上处于起步阶段。国内分离得到了很多苯酚降解菌，并进行了初步的研究。潘利华等从某印染厂的下水道污泥中分离得到一株高效苯酚降解菌，并初步鉴定归为微球菌属（*Micrococcus*）（潘利华等，2003）。沈锡辉等从大连星海湾附近的污泥中分离得到一株能以苯甲酸、萘、对甲酚、苯酚为唯一碳源和能源生长，同时能够降解单环和双环芳烃的菌株 NPAN5，经鉴定归为红球菌属（*Rhodococcus*）（沈锡辉等，2004）。徐玉泉等从工业废水中分离得到一株能以苯酚为唯一碳源和能源的高效苯酚降解菌 PHEA-2，通过 16S rDNA 序列分析，鉴定为醋酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）（徐玉泉等，2000）。顾立锋等从江

苏泰兴化工厂污泥中分离得到一株德氏酵母菌（*Debaryomyces* sp. Gb），该菌可以在浓度范围0-20%的Na_2SO_4环境中以苯酚为唯一碳源和能源生长（顾立锋等，2004）。曹军伟等从首都钢铁集团的焦化废水中分离得到 *Pedobacter*、*Castellaniella*、*Diaphorobacter*、*Pseudomonas* 等属多株潜在的酚降解菌，其中有4株潜在的新种（曹军伟等，2011）。

然而，由于间甲酚生物毒性很强，目前较少看到有关间甲酚生物降解的研究报道。工业废水中的高浓度间甲酚毒性较强，抑制微生物的生长进而使废水处理的停滞时间延长，处理效率很低。传统的微生物处理方法一般只适用于酚浓度在500 mg/L以内的工业废水处理。目前报道能降解间甲酚的菌种主要有假单胞菌（*Pseudomonas*）（Hopper等，1975）、真养产碱杆菌（*Alcaligenes eutrophus*）（Hughes等，1984）、热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）（Jiang等，2010）、杂色云芝（*Coriolus versicolor*）（吴坤等，2004）、白色假丝酵母（*Candida albicans*）、花金龟脱硫杆菌（*Desulfobacterium cetonicum*）（Muller等，1999）和一些厌氧产烷微生物等（付柳等，2008）。天津大学的闻建平、姜岩等（Bergauer等，2005；Jiang等，2007b；吴坤等，2004）报道了一株热带假丝酵母在52 h内将280 mg/L的间甲酚完全降解。

目前文献报道的微生物降解间甲酚的最大浓度仅有600 mg/L（Saravanan等，2008；彭丽花等，2009），已报道的微生物降解苯酚的最高浓度达到2600 mg/L（Afzal等，2007；Jiang等，2010）、最高耐受浓度达到了3000 mg/L（El-Sayed等，2003；Zeng等，2010）。然而，石化、焦化、化纤、油制气、制药等工厂排污口排出含酚废水的酚类浓度远比这高，如有些工厂排放的焦化废水中酚类物质的含量达数万mg/L（李淑彬等，2005）。所以，还急需加强对含酚工业废水的高效酚降解菌及其生物多样性、遗传多样性的研究。

1.4 苯酚、间甲酚降解基因、酶和降解途径

对于苯酚生物降解机制的研究，最早的报道是有关菌株 *Pseudomonas* U（Dagley等，1965），后来又有很多研究者对苯酚的生物降解进行了深入研究。苯酚降解基因通常成簇排列于质粒上（Powlowski 等，1994；Shingler 等，1989），也有一些位于染色体上（Kukor 等，1991；Ng 等，1994）。苯酚生物降解过程的关键基因是苯酚羟化酶（phenol hydroxylase）基因，它编码了降解途径中的第一个酶，负责将苯酚单加氧生成儿茶酚（即邻苯二酚，catechol）；接下来将儿茶酚开环的是儿茶酚 1,2 双加氧酶或儿茶酚 2,3 双加氧酶，它们分别对儿茶酚进行邻位（*ortho*）开环或间位（*meta*）开环，其对应的降解途径分别称为邻位途径（*ortho*-pathway）和间位途径（*meta*-pathway）。

通过间位裂解途径降解苯酚的代表菌株是 *Pseudomonas* sp. CF600（Powlowski 等，1994），菌株 CF600 的苯酚降解基因位于质粒 pVI150 上的 1.5 kb 区域内，形成

了一个 *dmpKLMNOPQBCDEFGHI* 操纵子。如图 1-2 所示，儿茶酚在儿茶酚 2,3 双加氧酶（Catechol 2,3-dioxygenase）作用下生成 2-羟基粘康酸半醛（2-Hydroxymuconate semialdehyde），随后降解过程中的中间产物又经过 2-Hydroxymueonic semialdehyde dehydrogenase、2-Hydroxymuconie semialdehyde hydrolase、4-Oxalocrotonate isomemse、4-Oxalocrotonate decarboxylase 、2-Oxopent-4-dienoate hydratase 、4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolas、Aldehyde dehydrogenase (acylating)等一系列酶系的作用，最终生成乙酰辅酶 A（Acetyl-CoA）进入 TCA 循环。除了假单胞菌以外，其他属的细菌也有通过间位裂解途径降解苯酚的报道，如 *Bacillus*（Banerjee 等，2010；Duffner 等，2000）、*Alcaligenes*（Essam 等，2010；Kim 等，1997）、*Geobacillus*（Omokoko 等，2008）、*Comamonas*（Arai 等，1998）、*Rhodococcus*（沈锡辉等，2004）和某些酵母菌（Jiang 等，2007a）等。

与间位降解途径不同，微生物降解苯酚的邻位降解途径中儿茶酚苯环的裂解发生在两个羟基之间（Ahamad 等，1996；Ehrt 等，1995），产生不同于间位裂解途径的代谢产物，如粘康酸（*cis,cis*-Muconate）、3-Oxoadipate、乙酰辅酶 A 等，因此也就需要不同于间位裂解途径的酶系，如 Catechol 1,2-dioxygenase、Muconate cycloisomerase、3-Oxoadipate enol-lactonase 和 3-Oxoadipate CoA-transferase 等，如图 1-3 所示。

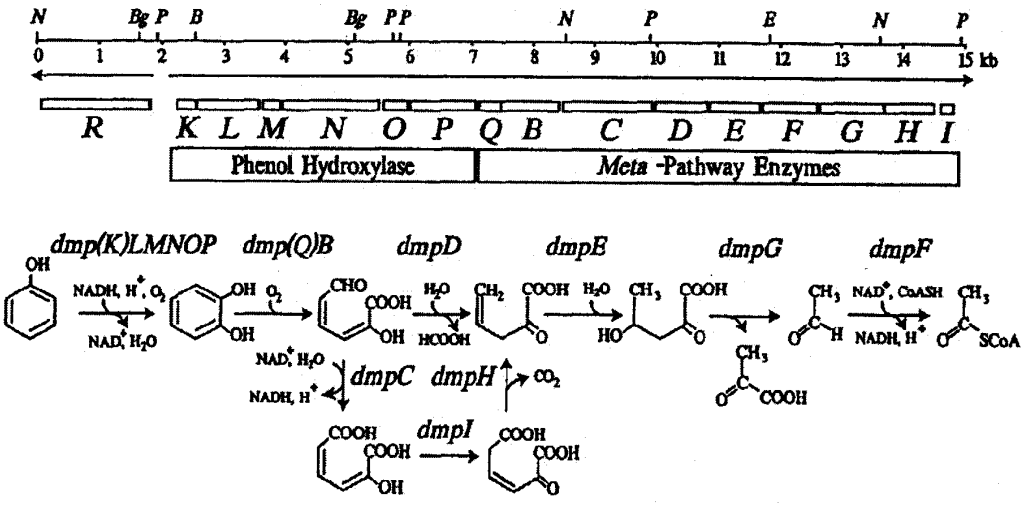

图 1-2 *Pseudomonas* sp. strain CF600 的苯酚间位降解途径及其相关基因

Fig. 1-2 *Meta*-cleavage pathway for phenol degradation in *Pseudomonas* sp. strain CF600 and the degradation genes

图中的箭头方向表示调控基因 *dmpR* 的转录方向与 *dmpKLMNOPQBCDEFGHI* 操纵子的转录方向相反。各个酶的功能见表 1-1。最上面显示为酶切位点：N，*Not*I；P，*Pvu*II；Bg，*Bgl*II；B，*Bam*HI；E，*Eco*RI（Powlowski 等，1994）

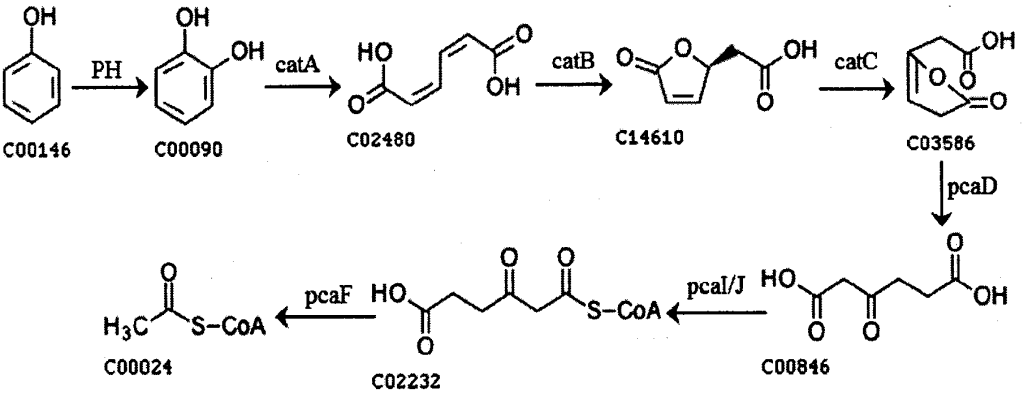

图 1-3 苯酚的邻位降解途径

Fig. 1-3 *Ortho*-cleavage pathway for phenol degradation

PH: Phenol hydroxylase; catA: catechol 1,2-dioxygenase; catB: muconate cycloisomerase; catC: muconolactone D-isomerase; pcaD: 3-oxoadipate enol-lactonase; pacIJ: 3-oxoadipate CoA-transferase; pcaF: 3-oxoadipyl-CoA thiolase（Ahamad 等，1996; Camara 等，2007; Ehrt 等，1995）

表 1-1 *Pseudomonas* sp. strain CF600 的苯酚降解操纵子基因及其功能

Table 1-1 Summary of the genes and gene products of the *dmp* operon

基因	氨基酸	功能	参考文献
dmpK	92	Unknown	（Nordlund 等，1990a）
dmpL	331	Phenol hydroxylase component	（Nordlund 等，1990a）
dmpM	90	Phenol hydroxylase component	（Nordlund 等，1990a）
dmpN	517	Phenol hydroxylase component	（Nordlund 等，1990a）
dmpO	119	Phenol hydroxylase component	（Nordlund 等，1990a）
dmpP	353	Phenol hydroxylase component	（Nordlund 等，1990a）
dmpQ	112	Ferredoxin-like protein	（Shingler 等，1992）
dmpB	307	Catechol 2,3-dioxygenase, EC 1.13.11.2	（Bartilson 等，1989）
dmpC	486	2-Hydroxymueonic semialdehyde, dehydrogenase, EC 1.2.1 .-	（Nordlund 等，1990b）
dmpD	283	2-Hydroxymuconie semialdehyde hydrolase	（Nordlund 等，1990b）
dmpE	261	2-Oxopent-4-dienoate hydratase, EC 4.2.1.80	（Shingler 等，1992）
dmpF	312	Aldehyde dehydrogenase (acylating), EC 1.2.1.10	（Shingler 等，1992）
dmpG	345	4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolase, EC 4.1.3.-	（Shingler 等，1992）
dmpH	264	4-Oxalocrotonate decarboxylase, EC 4.1.1 .-	（Shingler 等，1992）
dmpI	63	4-Oxalocrotonate isomemse, EC 5.3.2.-	（Shingler 等，1992）

间甲酚的生物毒性较大，有关间甲酚生物降解机制的研究相对较少。*Pseudomonas* sp. strain CF600 不仅能降解苯酚，还能以苯酚的甲基衍生物（间甲酚、

邻甲酚、对甲酚等）为唯一碳源和能源生长（Powlowski 等，1994；Shingler 等，1989）。菌株 CF600 对间甲酚的降解也是由 *dmp* 操纵子负责的，同样采用间位裂解途径降解这些苯酚的单甲基衍生物。然而邻位降解途径不能有效降解苯酚的单甲基衍生物，这一类微生物就先将甲基氧化成羧基，然后通过龙胆酸途径，用一系列不同于儿茶酚邻位降解途径的酶系将羟基苯甲酸彻底降解（Lack 等，1992；Londry 等，1997；Poh 等，1980；彭丽花等，2009）。详见图 1-4。

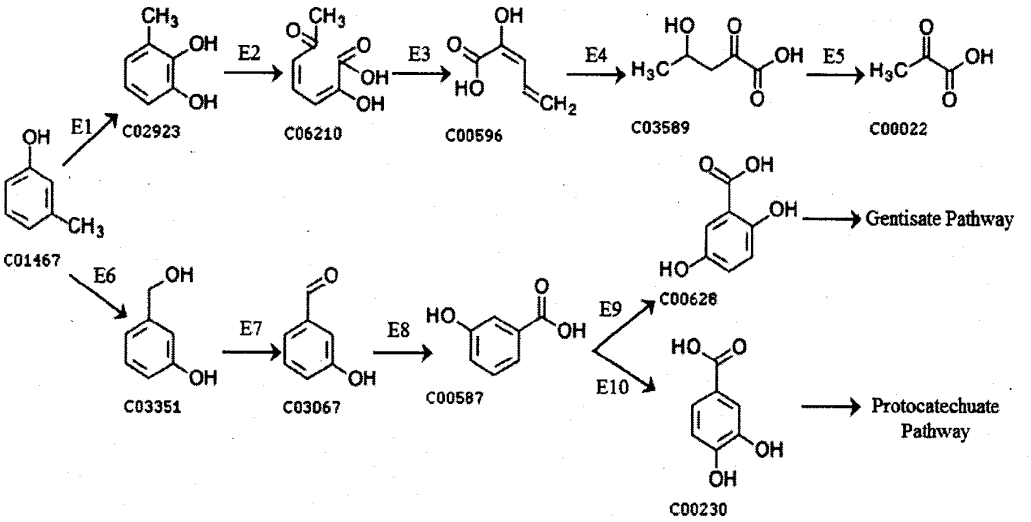

图 1-4 间甲酚的微生物降解途径

Fig. 1-4 Metabolic pathways for *m*-cresol degradation by microorganisms

E1：phenol 2-monooxygenase；E2：3-Methylcatechol:oxygen 2,3-oxidoreductase(decyclizing)；E3：2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydroxylase；E4：2-keto-4-pentenoate hydratase；E5：4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase；E6：xylenol methylhydroxylase；E7：3-Hydroxybenzyl-alcohol:$NADP^+$ oxidoreductase；E8：3-hydroxybenzaldehyde:$NAD(P)^+$ oxidoreductase；E9：3-hydroxybenzoate,NADH:oxygen oxidoreductase (6-hydroxylating)；E10：3-hydroxybenzoate 4-hydroxylase（Hopper 等，1975；Hughes 等，1984；Kukor 等，1991；Poh 等，1980；Stephens，2011；姚海艳，2011）

1.5 细菌的分类鉴定

微生物在生态食物链中充当分解者的地位，是组成生物圈的重要成员，微生物的分类鉴定与其理论研究和实际应用有同等重要的地位。目前自然界中可培养的微生物数量不到 1%，大多数细菌的分类鉴定仍然需要建立在纯培养的基础上，然后再根据一系列规范的分类特征进行鉴定（金光等，2011），其一般的流程如图 1-5 所示。细菌的分类鉴定一般分为 4 个水平：1、细菌细胞形态特征和生活习性，例如观察其形态特征、酶反应、运动型、生长条件、营养要求、代谢特性、致病性、抗原性和生态特性等；2、细菌细胞的组分水平，例如细胞壁、脂类、光合色素和醌类等成分

分析，采用的技术有常规技术，也有气相色谱、红外光谱、质谱分析和高效液相色谱（HPLC）等新技术；3、蛋白质水平，例如凝胶电泳、各种免疫标记技术和氨基酸序列分析等；4、核酸水平，包括 DNA 分子杂交、GC 含量（G+C mol%）的测定、16S rDNA 序列分析、16S-23S rRNA 中间（ITS）序列分析、rRNA 聚合酶的 Sigma 因子 rpoD 和促旋酶基因（*gyrB*）等重要基因的序列分析以及全基因组测序等（袁军，2008；周德庆，2002）。细菌的拉丁文名需要遵循国际微生物学学会制定的国际细菌命名标准（International Code of Nomenclature of Bacteria），并在国际微生物学会主办的杂志 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology（即 IJSEM）上发表后即会获得认可，或在其他刊物发表后向 IJSEM 编辑部申请并获得认可。

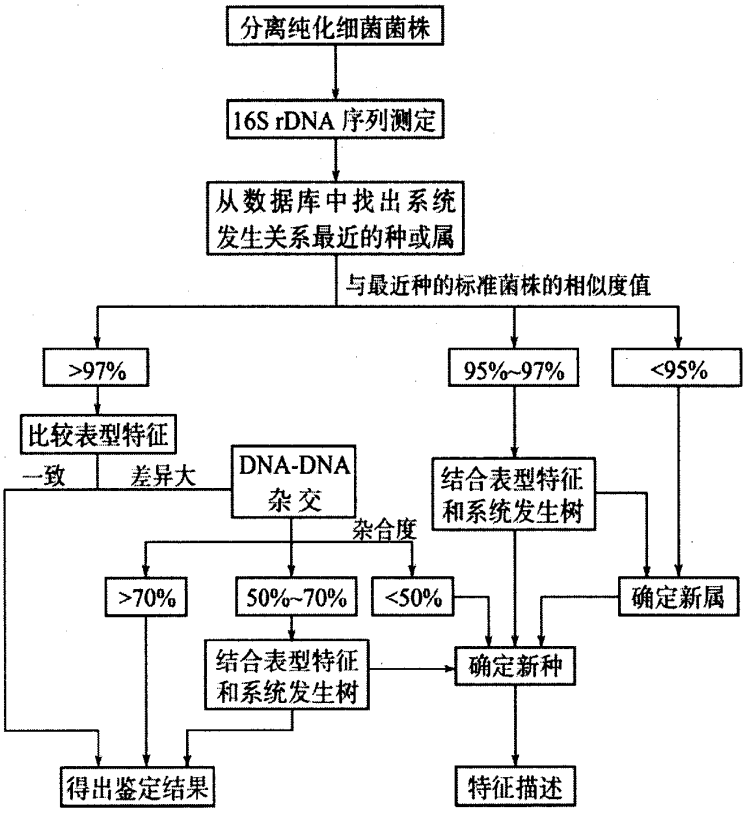

图 1-5 细菌新种（属）分类鉴定的流程图（金光等，2011）

Fig. 1-5 Flow chart of general typing of bacteria

1.6 基因组测序

近年来随着科学技术的发展，新一代基因组测序技术突飞猛进，基因组学研究也取得了重大突破和进展。跟随人类基因组计划的实施，微生物基因组学的研究也逐步发展起来，1994 年美国能源部便启动了微生物基因组计划（Microbial Genome Project）。之后有大量微生物的全基因组序列得到测定，包括重要的工业微生物、病

原微生物、极端微生物和一些重要的模式微生物（Bolotin 等，2001；Fleischmann 等，1995；Shimizu 等，2002）。目前研究者对微生物基因组的研究主要集中在：1. 发现并阐明独特新基因；2. 基因组组织结构和调控；3. 微生物代谢网络；4. 基因水平转移和微生物进化等几个方面（袁军，2008）。目前对一些微生物基因组的分析研究表明，很多细菌都携带有一至数个不同的基因簇（Kim 等，2008；Yan 等，2009），也就可以通过不同的代谢途径降解多种多样的环境有机污染物（如芳香族化合物）。对这些降解菌基因组的分析研究，可以使我们更全面的认识细菌对有机化合物的降解能力、发现新的代谢途径以及新的降解酶系等等。人们已经有能力从基因组水平上理解生物的生理生化和遗传特性，甚至从全局水平上理解微生物之间、微生物与环境之间以及微生物与其寄主之间的相互作用。

1.7 本工作的目的和意义

如前所述，焦化废水对环境极具危害，其中苯酚是含量最多的有机化合物，而间甲酚是较难降解的有机化合物。想要提高生物法对高浓度酚类废水的处理效率，一方面要改进传统工艺，另外有必要进行高效酚降解菌种的选育工作。基于这种考虑，本文从焦化废水处理厂的污泥样品中分离降解苯酚、间甲酚的菌株，研究其降解率、降解基因，并通过对其中一株苯酚、间甲酚降解菌 *Ottowia beijingensis* AN3^{T} 基因组草图的分析研究，以期能够揭示该菌的降解基因，推断其降解苯酚、间甲酚的代谢路径，阐明新的基因和其功能，甚至发现新的调控因子、新的基因间相互作用等。这对于我们以后更好的认识、利用并进一步改造这些降解菌有着重要意义，最终希望所有工作能够服务于实际的废水处理过程。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 活性污泥

焦化废水活性污泥采集于首都钢铁集团污水处理厂，AE 号样品采自好氧池，AN 号样品采自厌氧池。样品于 4℃短期保存，于-80℃用甘油管长期保存。

2.1.2 培养基

LB 培养基（赖其良，2007）：NaCl 10 g，YEAST EXTRACT 5 g，TRYPTONE 10 g，用自来水定容至 1000 mL。固体培养基添加 1.5%（W/V）的琼脂粉。121℃灭菌 20 min。

216L 培养基（袁军，2008）：氯化钠 10 g，乙酸钠 1g，柠檬酸三钠 0.5 g，硝酸铵 0.2 g，营养肉汤 0.5 g，TRYPTONE 10 g，YEAST EXTRACT 2 g，用自来水定容至 1000 mL。固体培养基添加 1.5%（W/V）的琼脂粉。121℃灭菌 20 min。

无机盐培养基（Santos 等，2003）：$(NH_4)_2SO_4$ 3 g，KH_2PO_4 0.5 g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.3 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g，微量元素溶液 1 mL，pH 值 7.0，蒸馏水 1000 mL。121℃灭菌 20 min。接种前加入一定量的 20 mg/mL 苯酚溶液。固体培养基加入 1.5%（W/V）的琼脂粉。微量元素溶液：$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g，$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.15 g，$ZnSO_4$ 0.14 g，$CoCl_2$ 0.2 g，蒸馏水 1000 mL。

2.1.3 常用溶液

50×TAE 缓冲液：	Tris-乙酸	2 mol/L
	EDTA	50 mmol/L
TE 缓冲液：	Tris-HCl	10 mmol/L (pH 8.0)
	EDTA	1 mmol/L
溶菌酶：	溶菌酶	0.1 g/mL
	Tris-HCl	10 mmol/L (pH 8.0)
蛋白酶 K	蛋白酶 K	20 mg/mL
	去离子水配制，终浓度 1 mg/mL	

2.1.4 仪器与试剂

表2-1 实验仪器表

Table 2-1 List of experimental instruments

仪器	生产厂家
JM-250型电泳仪	大连捷迈科贸有限公司
HSJ-A型通风柜	嘉宏顺科学实验室设备（深圳）有限公司
电子天平	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
Sup-250型生化培养箱	上海精宏试验设备有限公司
ZHJH-110型垂直超净工作台	上海智城分析仪器制造有限公司
ZHWY-211型摇床	上海智城分析仪器制造有限公司
UB-7型酸度计	DENVER INSTRUMENT, America
ELGA PURELAB Classic超纯水系统	ELGA, ENGLAND
iCycler型PCR仪	BIO-RAD
SmartSpec型核酸蛋白测定仪	BIO-RAD
ACURA 825可调容量精密移液器	SOCOREX, Swiss
Biolog浊度仪	BioSurplus, Inc. San Diego
Minispin 台式离心机	Eppendorf, Germany
Bioscreen全自动生长曲线分析仪	芬兰
QP2010型气质联用仪（GC-MS）	日本岛津公司

表2-2 实验试剂表

Table 2-2 List of experimental reagents

试剂	纯度	生产厂家
NaCl	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
硝酸铵	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
乙酸钠	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
$ZnSO_4$	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
$CoCl_2$	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
$(NH_4)_2SO_4$	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
$MnSO_4 \cdot H_2O$	分析纯 AR	中国医药（集团）上海化学试剂公司
KH_2PO_4	分析纯 AR	汕头市达濠精细化学品公司

柠檬酸三钠	分析纯 AR	汕头市达濠精细化学品公司
YEAST EXTRACT	-	OXOID LTD., ENGLAND
TRYPTONE	-	OXOID LTD., ENGLAND
营养肉汤	生物纯 BR	广东环凯微生物科技有限公司
琼脂粉	-	GENE TECH (SHANGHAI) COMPANY LIMITED
琼脂糖	电泳级	MBI
苯酚	分析纯 AR	汕头市西陇化工厂
间甲酚	99%	Alfa Aesar
细菌基因组 DNA 提取试剂盒（硅胶柱型）	-	上海赛百盛基因技术有限公司
PCR 产物纯化及胶回收试剂盒（硅胶柱型）	-	上海赛百盛基因技术有限公司
AxyPrep PCR 清洁试剂盒	-	AXYGEN BIOSCIENCES, America
API ZYM 试剂条	-	法国梅里埃生物技术公司
API20NE 试剂条	-	法国梅里埃生物技术公司
Biolog	-	U.S.A.
RedTaq DNA Polymerase	-	上海赛百盛基因技术有限公司
Fermentas Taq DNA Polymerase	-	TaKaRa
RNase A	-	Sigma

2.1.5 网络资源

BLAST 检索：http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi；细菌 16S rDNA 序列比对网站 EzTaxon-e：http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/；苯酚、间甲酚代谢途径分析：http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html、http://umbbd.msi.umn.edu/index.html。

2.1.6 分析软件

Chromas Lite 2.01：Windows XP/Win 7 系统下查看 DNA 测序结果的峰值图。

DNAMAN 6.0.40、MEGA 4 和 CorelDRAW 12：Windows XP/Win 7 系统下用于 DNA 序列和蛋白质氨基酸序列分析、同源性分析、系统进化分析等。

AlphaEaseFC：EB 染色琼脂糖凝胶图片拍摄。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

20 mg/mL 苯酚储存液：将苯酚整瓶放入 60℃水浴，融化为液体后量取 1.9 mL 加入到 98.1 mL 无菌水中，混匀至苯酚完全溶解。放 4℃避光保存。

20 mg/mL 间甲酚储存液：量取 1.9 mL 间甲酚液体加入到 98.1 mL 无菌水中，混匀至间甲酚完全溶解。放 4℃避光保存。

生理盐水：称取 0.9 g NaCl，溶解于 100 mL 超纯水中，121℃灭菌 20 min 备用。

微量元素溶液：称取 0.05 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$，0.014 g $ZnSO_4$，0.015 g $MnSO_4 \cdot H_2O$，0.02 g $CoCl_2$，溶解于 100 mL 蒸馏水中。放 4℃冰箱备用。

2.2.2 菌种保存

短期保存：分离得到的菌株在 LB 固体培养基上划线，生长得到新鲜菌体，4℃冰箱保存 1 个月左右。

长期保存：从平板上挑取适量新鲜菌体，充分混合于 0.5 mL 灭菌的 16%甘油+5%海藻糖混合液中，放-80℃保存。

MCCC 保存：按照中国海洋微生物菌种保藏管理中心（MCCC）的要求，以液氮超低温冻结法、-80℃冰箱冻结法和真空冷冻干燥法等方法长期保存。

2.2.3 培养条件

固体平板培养：28℃恒温培养箱倒置培养。

液体摇瓶培养：28℃恒温摇床振荡培养（180 r/min）

2.2.4 菌株分离

平板直接分离：将活性污泥样品梯度稀释至 10^{-6}，取 10^{-4}、10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度样品各 100 μL，分别涂布于 LB 和 216L 平板。同时设置空白对照（不添加活性污泥样品，添加等量无菌水作为对照）。固体平板放 28℃恒温箱倒置培养一周。挑取菌落形态不同的菌株，相应在 LB、216L 固体平板上划线纯化。

富集后分离：采用逐步提高富集液中间甲酚浓度的驯化法。按 1%的接入量将活性污泥样品接种于 30 mL 无机盐培养基（含 10 mg/L 间甲酚）中，摇床 180 r/min，28℃培养。三天后以 10%的接种量将第一次富集液转接至含 40 mg/L 间甲酚的无机盐培养基（30 mL）中，摇床 180 r/min，28℃继续培养。同理，以此方法不断循环，分别用含 133、267、400、600 和 800 mg/L 间甲酚的无机盐培养基（30 mL）进行富集驯化培养。最终含 800 mg/L 间甲酚的无机盐培养基培养至富集液浑浊后，将富集液梯度稀释至 10^{-6}，分别取 10^{-4}、10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度各 100 μL，涂布含 600 mg/L 间甲酚的无机盐平板，放于 28℃恒温培养箱倒置培养。同时设置空白对照（不添加间甲酚富集液，添加等量无菌水作为对照）。三天后，无机盐固体平板（含 600 mg/L 间甲酚）上长出单菌落，每个活性污泥样品随机挑取 3 株表型不同的菌株，在间甲酚（600 mg/L）无机盐固体平板上划线纯化。

2.2.5 摇瓶种子的制备

从固体平板上挑取新鲜菌体接种到 20 mL（100 mL 三角瓶）LB 液体培养基中，摇床 180 r/min，28℃振荡培养 20 h。LB 液体培养基浑浊后，取 1 mL 菌液于 1.5 mL 无菌离心管中，10000 r/min 离心 2 min。用 1 mL 生理盐水重悬菌体，重悬液做为种子。

2.2.6 菌株降酚功能的初步验证

熏法验证：苯酚和间甲酚在常温下都具有一定的挥发性。将平板分离得到的菌株在不含碳源的无机盐固体平板上划线，在平板盖子上添加适量碳源（苯酚或间甲酚），放入 28℃恒温培养箱中倒置培养，初步考察各个菌株对苯酚和间甲酚的利用情况。

摇瓶初检：经过熏法验证实验，得到能在无机盐平板上较好生长的潜在苯酚、间甲酚降解菌。将这些菌株的 1 mL 种子液接种到 30 mL 含苯酚（200 mg/L）、间甲酚（100 mg/L）的无机盐液体培养基中，摇床 180 r/min，28℃振荡培养 48 h。分别在 0 和 48 h 两个时刻取样，12000 r/min 离心，留取上清测定苯酚和间甲酚残余含量，计算 48 h 降解率。

2.2.7 细菌基因组 DNA 的提取

用 LB 固体培养基或 LB 液体摇瓶培养细菌至对数生长期，然后采用赛百盛细菌基因组 DNA 提取试剂盒（硅胶柱型）提取细菌基因组 DNA，提取方法按试剂盒说明书进行。放于-20℃备用。

2.2.8 BOX-PCR

引物（赖其良，2007）：5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'。

采用 30 μL PCR 体系，如下：

无菌超纯水	21.25 μL
10×PCR Buffer	3 μL
$MgCl_2$（25 mM）	2.4 μL
dNTPs（各 10 mM）	0.75 μL
引物（10 μM）	1.2 μL
Fermentas Taq DNA Polymerase	2 U
DNA 模板	1 μL

BOX-PCR 扩增程序：95℃，3 min；（94℃，30 s；53℃，30 s；65℃，8 min）×35 循环；65℃，10 min；10℃，hold。

设置空白对照。PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳（100 bp DNA Ladder和500 bp DNA Ladder作为Marker），EB染色后拍照检测。

2.2.9 细菌16S rDNA序列扩增与分析

16S rRNA基因扩增通用引物（赖其良，2007）：16SF：5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'；16SR：5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT-3'

16S rRNA基因PCR采用50 μL体系，如下：

无菌超纯水	35 μL
10×PCR Buffer	5 μL
$MgCl_2$（25 mM）	4 μL
dNTPs（各10 mM）	1 μL
16SF（10 μM）	1 μL
16SR（10 μM）	1 μL
RedTaq DNA Polymerase	2 U
DNA模板	1 μL

16S rRNA基因PCR扩增程序：94℃，3 min；（94℃，30 s；55℃，30 s；72℃，90 s）×30循环；72℃，5 min；10℃，hold。

设置空白对照。PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳（Marker 3作对照）、EB染色后拍照检测。PCR扩增产物用PCR产物纯化试剂盒（硅胶柱型）及胶回收试剂盒（硅胶柱型）进行纯化，将纯化后的产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序（测序引物为P300、RP500和PKCT。P300：5'-CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG C-3'；RP500：5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3'；PKCT：5'-TGC ATG GCT GTC GTC AGC TCG TG-3'）。

利用生物软件Chromas Lite和DNAMAN进行16S rDNA序列分析。在http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi和http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/（Kim等，2012）两个网站上进行16S rDNA序列比对。

取不同菌株16S rDNA序列，以及NCBI数据库中与它们具有最高序列相似度的模式菌株的16S rDNA序列，用DNAMAN进行多序列比对，然后输出Clustal格式的多序列比对结果，再用MEGA 4采用邻位加入法（neighbor-joining）构建16S rDNA系统发育树，再用CorelDRAW 12进行文字字体格式的修改，得到系统发育树。

2.2.10 苯酚、间甲酚含量的测定

先将样品离心（12000 r/min，2 min），留取上清液，放4℃以备测定苯酚、间甲酚含量。

苯酚、间甲酚含量使用 SmartSpec 型核酸蛋白测定仪（紫外分光光度计）进行测定。苯酚在 269 nm 处有最大吸收峰，即苯酚含量用在 269 nm 处测定的吸光度（Abs_{269}）表示（关晓燕，2008）。间甲酚在 221 nm 处有最大吸收峰，即间甲酚含量用在 221 nm 处测定的吸光度（Abs_{221}）表示。

2.2.11 苯酚、间甲酚标准曲线的绘制

将 20 mg/mL 的苯酚、间甲酚储存液梯度稀释成 25、40、50、100 和 200 mg/L，分别在 λ=269 nm 和 λ=221 nm 处，用紫外分光光度计测定吸光度。绘制吸光度对应苯酚或间甲酚浓度的标准曲线（关晓燕，2008）。

2.2.12 苯酚、间甲酚生物降解实验

经过摇瓶初检实验，我们得到几株酚降解性能较好的细菌。将这些菌株的 1 mL 种子液分别接种到 30 mL 苯酚（200 mg/L）、间甲酚（100 mg/L）无机盐液体培养基中，180 r/min，28℃摇床振荡培养 24 h。设置空白对照（不接种种子液，添加等量无菌生理盐水作为对照），分别在 0、24 h 时刻取样，测定苯酚、间甲酚含量，计算 24 h 降解率。选取 1100 mg/L 苯酚和 800 mg/L 间甲酚的无机盐液体培养基，做富集分离实验而得菌株的酚降解实验。每组实验均设置三个平行重复，实验结果取其平均值。

2.2.13 苯酚羟化酶基因的 PCR 克隆与分析

苯酚羟化酶基因扩增引物（吴培诚，2002）：P1：5'- AGG CAT CAA GAT CAC CGA CTG-3'；P2：5'-CGC CAG AAC CAT TTA TCG ATC-3'。

扩增反应体系如下：

无菌超纯水	35 μL
10×PCR Buffer	5 μL
$MgCl_2$（25 mM）	4 μL
dNTPs（各 10 mM）	1 μL
P1（10 μM）	1 μL
P2（10 μM）	1 μL
RedTaq DNA Polymerase	2 U
DNA 模板	1 μL

PCR 扩增程序：95℃，2 min；（95℃，45 s；58℃，40 s；72℃，45 s）×30 循环；72℃，10 min；10℃，hold。

PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳（Marker 3 作对照）、EB 染色后拍照检测。PCR 扩增产物用 AxyPrep PCR 清洁试剂盒纯化，将纯化产物送上海生工生物工程技

术服务有限公司测序(测序引物为PCR引物P1)。利用Chromas Lite查看测序效果，测序结果在http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi网站上进行序列比对。

2.2.14 苯酚、间甲酚降解菌的系统分类与鉴定

菌株AN3和AE31的培养及其一系列生理生化实验所用的培养基是LB培养基，配方如前所述。

16S rDNA的PCR扩增与系统发育树的构建，方法如前所述。

新菌的表型分析：菌株AN3和AE31的菌落形态是菌株在LB固体培养基上于28℃恒温培养48 h后得到的单菌落。进行电子显微镜观察时，收集处于对数生长早期的细菌细胞，用无菌生理盐水洗涤菌体2-3次，再用无菌超纯水洗涤1次，离心后用无菌滤纸片吸干上清液。洗涤后的菌体用磷钨酸（PTA）进行负染，用H-600型透射电子显微镜在100 KV条件下进行观察拍照。

最适生长温度的测定：将菌株接种于含5 ml无菌LB液体培养基的试管中，置于41℃水浴锅中静置培养。接种20 μL菌液至装有200 μL LB液体培养基的100孔板（Bioscreen全自动生长曲线分析仪专用）中，置于8℃、15℃、25℃、30℃和37℃摇床中，180 r/min培养24 h后用Bioscreen全自动生长曲线分析仪测定生长状态。

最适盐度和pH的测定：将20 μL菌液接种于含200 μL LB液体培养基的100孔板（Bioscreen全自动生长曲线分析仪专用）中，28℃×180 r/min摇床振荡培养24小时后，用Bioscreen全自动生长曲线分析仪测定生长状态。其中LB的NaCl浓度(W/V)设置为以下梯度：0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5和6%；pH值设置以下梯度：3、4、5、6、7、8、9、10、11和12。

利用API ZYM和API 20NE试剂条测定菌株的常规酶活、标准化常规测试和同化实验。利用Biolog微生物鉴定系统鉴定菌株对不同碳源的利用情况。

通过纸片法（Shieh等，2003）测定菌株的抗生素抗性实验。制备菌株的菌悬液均匀涂布在LB固体平板上，每块固体平板上均匀贴上5种抗生素纸片，放置于28℃恒温培养48小时后记录抑菌圈大小（直径）。一共测试了以下28种抗生素（μg per disc）：氨苄青霉素（10）、头孢氨苄（30）、羧苄青霉素（100）、头孢哌酮（30）、氯霉素（30）、头孢拉定（30）、环丙沙星（5）、复方新诺明（25）、氯林肯霉素（2）、红霉素（15）、氧氟沙星（5）、诺氟沙星（10）、青霉素G（10）、利福平（5）、头孢三嗪（30）、哌拉西林（100）、四环素（30）、强力霉素（30）、万古霉素（30）、头孢唑啉（30）、卡那霉素（30）、庆大霉素（10）、林可霉素（2）、米诺四环素（30）、甲硝唑（5）、苯甲异噁唑青霉素（1）、链霉素（10）和多粘菌素B（30 IU）。

参考《常见细菌系统鉴定手册》（东秀珠等，2001）测定菌株的接触酶活性和氧化酶活性。

脂肪酸成分的分析，参照参考文献（Sasser，1990）。

菌株脂肪酸抽提步骤：

刮菌：菌株在LB固体平板上划线培养至长出单菌落后，挑取单菌落转划至LB固体平板上，28℃恒温培养48 h左右，用无菌长牙签将菌苔刮至脂肪酸测定管的底部，菌体湿重不少于0.4 g。

皂化：在测定管内加入1 mL试剂1，往管内充入氮气5-10 s后将管盖拧紧，涡旋振荡20 s；在超声破碎仪内超声破碎10 min，再充分振荡，放入100℃水浴锅中热处理25 min；每5 min取出振荡5-10 s；之后放入冷水中快速冷却。

甲基化：往测定管内加2 mL试剂2，迅速拧紧管盖（将会生成挥发性物质），涡旋振荡20 s；80℃水浴保温10 min；之后放入冷水中快速冷却。

萃取：往测定管内加1.25 ml试剂3，拧紧管盖，涡旋振荡10 min使萃取更充分；静置3-5 min，待溶液分层后将下层溶液丢掉，保留上层液。

洗涤：往上述溶液中加3 mL试剂4，拧紧管盖涡旋振荡3-5 min，静置10-15 min使溶液分层（如果静置很久后仍不分层，则需加入500 μL饱和NaCl溶液，振荡后再静止分层），用玻璃吸管吸取约2/3上清液加入到GC-MS样品瓶中，盖紧瓶盖。

附录：

试剂1：	氢氧化钠（符合ACS标准）	45 g
	甲醇（色谱纯）	150 mL
	超纯水	150 mL
试剂2：	盐酸（6 mol/L）	325 mL
	甲醇	275 mL
试剂3：	正己烷（色谱纯）	200 mL
	甲基叔丁基醚（色谱纯）	200 mL
试剂4：	氢氧化钠（符合ACS标准）	10.8 g
	超纯水	900 mL
饱和氯化钠溶液：	氯化钠（符合ACS标准）	40 g
	超纯水	100 mL

分析条件：使用QP2010型（日本岛津公司）气质联用仪（GC-MS）；RTX-5MS，30 m×2 mm毛细管柱，膜厚度0.25 μm；以氦气为载气，柱流量1.5 mL/min；进样口温度260℃，气质接口温度260℃，保持10 min。质谱条件：电离源为EI，电离能量70 eV，离子源温度200℃，扫描范围50-500 amu，进样量1 μL，分流比为50:1。

2.2.15 基因组草图的测定

细菌基因组草图的测序和基本注释由美吉生物(Majorbio)公司完成，采用Solexa高通量测序技术。

3 结果与分析

3.1 菌株分离及初步鉴定

3.1.1 平板分离及初步鉴定

通过 LB、216L 固体平板分离菌株并用无机盐平板熏法验证。

通过菌株菌落形态对分离得到的所有菌株进行分组，对菌落形态、颜色等特征相似的菌株 BOX-PCR 扩增其基因组 DNA 的重复性片段，剔除条带相同的菌株。图 3-1 是部分菌株 BOX-PCR 比较的结果，从图中看出分离得到的菌株中有部分是重复的，如 1、2、3 和 4 对应菌株的 BOX-PCR 条带一致，则认为它们为同一菌株，只保留其中一株菌进入下一步研究；菌株 5 和 6 的 BOX-PCR 条带比较近似，需要根据其 16S rRNA 基因序列来区分它们是否为同一菌株。

3.1.2 富集驯化分离实验及菌株初步鉴定

逐渐提高富集液中间甲酚的浓度，经过 17d 的富集、驯化，最终富集液中间甲酚浓度达到了 800 mg/L，之后将富集液梯度稀释涂布含间甲酚（600 mg/L）无机盐固体平板，挑取单菌落在含间甲酚（600 mg/L）无机盐固体平板划线纯化，最后得到 5 株形态不同单菌，扩增其 16S rDNA 序列进行鉴定。

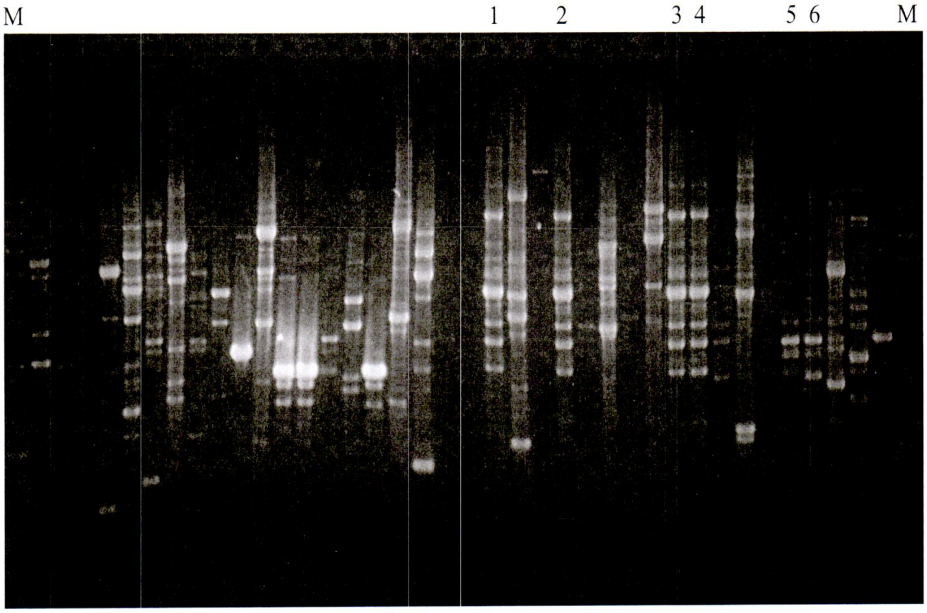

图 3-1 部分菌株的 BOX-PCR 图谱比较

Fig. 3-1 BOX-PCR profiles of partial isolated strains

M：100 bp 和 500 bp Ladder；1、2、3 和 4 为同一菌种；5 和 6 为可能为同一菌种

3.1.3 16S rDNA 序列鉴定

抽提各菌株基因组 DNA，扩增其 16S rDNA 序列。PCR 产物纯化后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序（测序引物为 P300、RP500、PKCT）。测序结果利用 Chromas Lite 和 DNAMAN 进行序列处理分析。从测序结果中去掉 16S rDNA 序列完全一样的菌株，将不完全一样的 16S rDNA 序列提交到 EzTaxon-e 网站 http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/进行序列比对。选择与其 16S rDNA 序列相似度最高的模式菌株作为参照，最终从 2 个活性污泥样品中共得到 28 株不同菌株，分属于 20 个属 28 个种，具体如表 3-1 所示。其中菌株 AEJ1 和 ANJ3 是经过间甲酚富集分离而来，详见表 3-2。

一般认为 16S rDNA 序列与模式菌株的最大相似度在 97%以下就有可能是新物种，但是最终确定还需要看 DNA 杂交结果，DNA 杂交结果在 70%以下才能断定为新种。通过 16S rDNA 序列初步分析，分离所得菌株中有 4 株菌属于潜在的新种，具体情况如表 3-3 所示。分别对这 4 株菌重新抽提基因组 DNA、PCR 扩增其 16S rDNA 序列并测序，将第二次测序结果与第一次测序结果进行比对，结果表明测序无误。

表 3-1 LB 和 216L 平板法分离所得酚降解菌

Table 3-1 The phenol-degrading bacterial isolates on LB and 216L plates

菌株编号	GenBank 中相似度最高的模式菌株	相似度（%）
AE12	*Acinetobacter beijerinckii* 58a^T	97.888
AN25	*Agromyces ulmi* XIL01^T	98.023
AN16	*Alcaligenes aquatilis* LMG 22996^T	99.815
AE36	*Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* IAM12369^T	99.181
AE20	*Alicycliphilus denitrificans* K601^T	99.125
AN40	*Alishewanella aestuarii* B11^T	99.189
AN4	***Aquimonas voraii* GPTSA 20^T**	**94.208**
AN35	*Bacillus megaterium* IAM 13418^T	99.664
AE7	*Brevibacterium epidermidis* NCDO 2286^T	99.862
AN38	*Castellaniella defragrans* 54Pin^T	100
AN37	*Castellaniella denitrificans* NKNTAU^T	99.932
AN18	***Comamonas composti* CC-YY287^T**	**96.319**
AN8	*Comamonas denitrificans* 123^T	99.723
AN3	***Ottowia pentelensis* RB3-7^T**	**96.210**

AE19	*Microbacterium natoriense* TNJL143-2^T	98.597
AN21	*Paracoccus solventivorans* DSM 6637^T	99.573
AE39	*Patulibacter minatonensis* KV-614^T	98.591
AE31	***Pedobacter saltans* DSM 12145^T**	**96.14**
AE14	*Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T	99.392
AE28	*Pseudomonas mendocina* LMG 1223^T	99.241
AEJ1	*Pseudomonas monteilii* CIP 104883^T	99.665
ANJ3	*Pseudomonas plecoglossicida* FPC951^T	99.666
AE23	*Pseudomonas pseudoalcaligenes* DSM 50188^T	98.914
AN6	*Pseudomonas stutzeri* CCUG 11256^T	99.313
AN5	*Pusillimonas noertemannii* BN9^T	97.321
AE27	*Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* KRED^T	99.867
AE3	*Sphingobium cloacae* S-3^T	98.023
AN39	*Thauera mechernichensis* TL1^T	99.254

表 3-2 富集筛选得到的间甲酚高效降解菌

Table 3-2 The *m*-cresol-degrading bacteria isolated through enrichment culture

菌株编号	GenBank 中相似度最高的模式菌株	相似度（%）
AEJ1	*Pseudomonas monteilii* CIP 104883^T	99.665
ANJ3	*Pseudomonas plecoglossicida* FPC951^T	99.666

表 3-3 首钢焦化废水活性污泥中分离到的可能新种

Table 3-3 The possible novel strains isolated from activated sludge

菌株编号	GenBank 中相似度最高的模式菌株	相似度（%）
AN4	*Aquimonas voraii* GPTSA 20^T	94.208
AN18	*Comamonas composti* CC-YY287^T	96.385
AN3	*Ottowia pentelensis* RB3-7^T	96.21
AE31	*Pedobacter saltans* DSM 12145^T	96.06

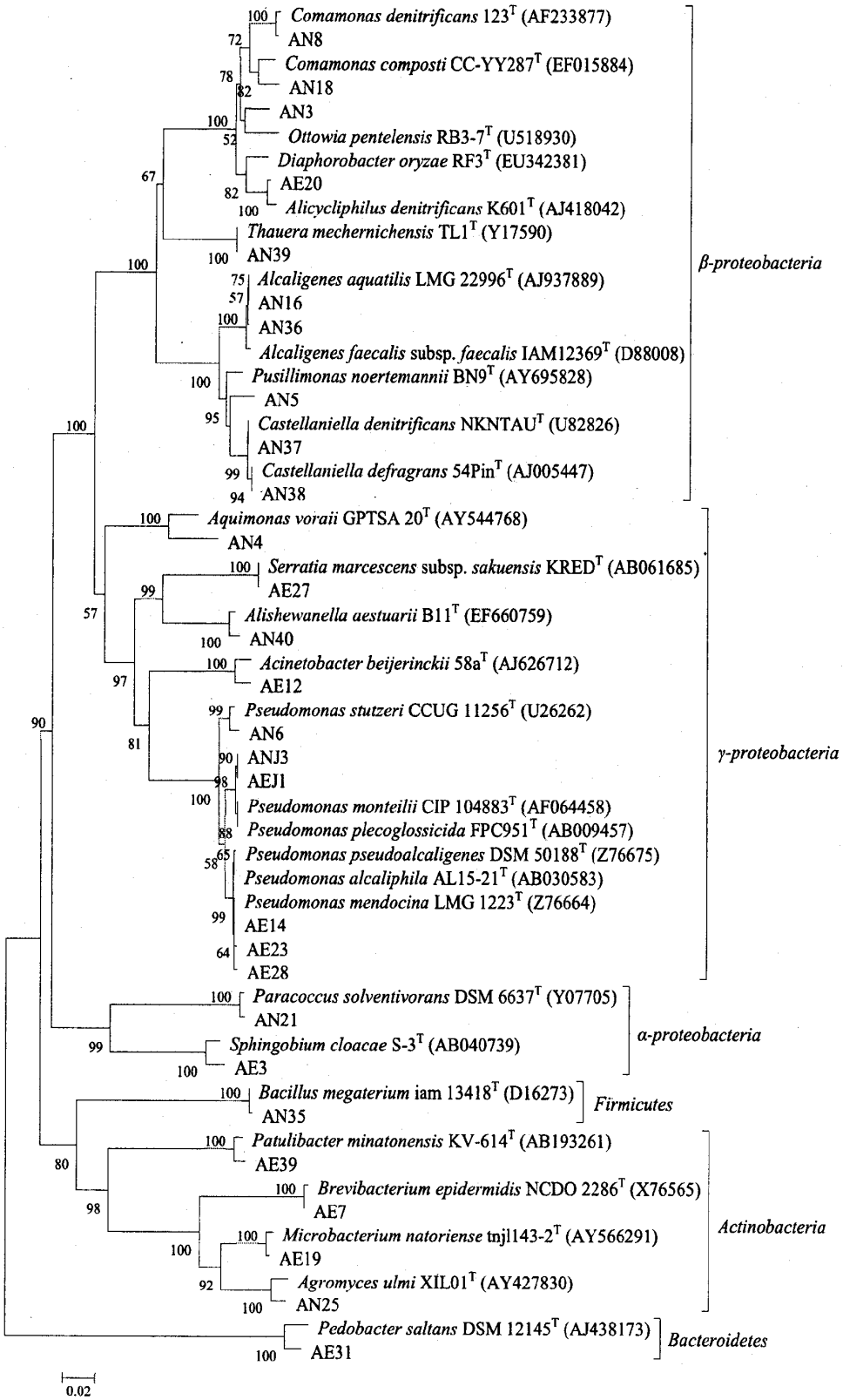

图 3-2 焦化废水分离菌株的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3-2 Phylogenetic tree of culturable strains isolated from coking wastewater

3.2 菌株的 16S rDNA 序列系统进化分析

将各菌株 16S rDNA 序列及 NCBI 数据库中与其具有最高序列相似度的模式菌株的 16S rDNA 序列进行聚类分析，构建其系统发育树，如图 3-2 所示。

按大类群可将这 28 株菌分为六大类，如图 3-2 所示。它们主要属于变形菌纲 β 和 γ 亚群，分别占 35.7%和 35.7%，其它四大类则只占很小比例，分别为变形菌纲 α 亚群（*α-proteobacteria*，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 亚群包含其中 7 个属的 10 个种，γ 亚群也包含了 5 个属的 10 个种，种属多样性十分丰富。其中的假单胞菌（*Pseudomonas*）、不动杆菌（*Acinetobacter*）和产碱菌（*Alcaligenes*）等都是常见的苯酚、间甲酚降解菌属。

3.3 酚降解实验结果

3.3.1 苯酚、间甲酚标准曲线的绘制

配制浓度为 25、40、50、100、200 mg/L 的苯酚水溶液，用紫外分光光度计在波长 λ=269 nm 处测定吸光度。用 Microsoft Excel 绘制吸光度对应苯酚浓度的标准曲线，得到回归方程：y=0.0133x，其中 y：Abs_{269}；x：苯酚浓度（mg/L），见图 3-3。

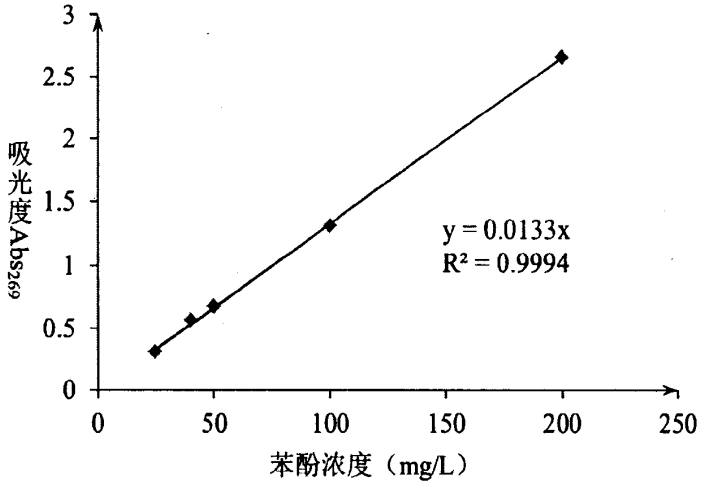

图 3-3 苯酚标准曲线

Fig. 3-3 Calibration curve of phenol

配制浓度为 25、40、50、100、200 mg/L 的间甲酚水溶液，分别用紫外分光光度计在波长 λ=221 nm 处测定吸光度。用 Microsoft Excel 绘制吸光度对应间甲酚浓度的标准曲线，得到回归方程：y=0.0383x，其中 y：Abs_{221}；x：间甲酚浓度（mg/L），如图 3-4 所示。

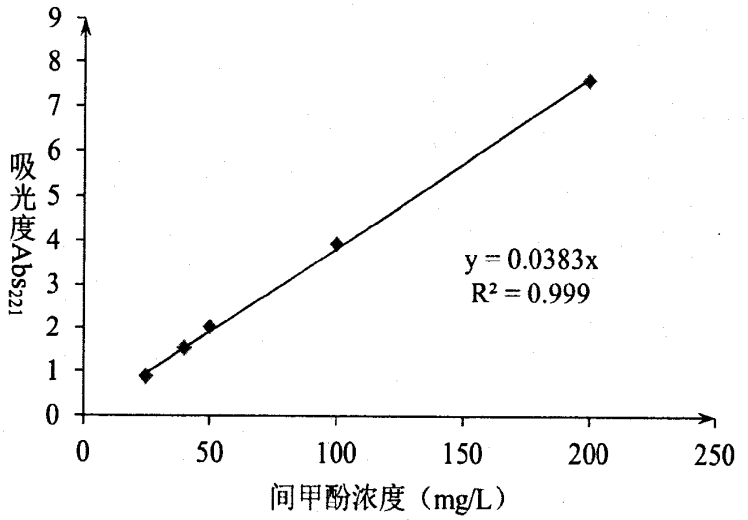

图 3-4 间甲酚标准曲线

Fig. 3-4 Calibration curve of *m*-cresol

3.3.2 无机盐培养液摇瓶初检

通过苯酚（200 mg/L）、间甲酚（100 mg/L）无机盐培养液摇瓶初检，结果见表 3-4。菌株 AE14 和 AN8 在 48 h 内对 200 mg/L 苯酚的降解率分别为 80.5%和 83.5%；菌株 AE31 在 59 h 内对间甲酚（100 mg/L）的降解率为 86.0%；菌株 AN8 在 48 h 内对间甲酚（100 mg/L）的降解率为 86.3%；菌株 AN38 在 72 h 内对间甲酚（100 mg/L）的降解率也达到 90.5%。因此，选择这些降解效果较好的菌株做进一步酚生物降解实验。

表 3-4 8 株菌株对苯酚和间甲酚降解能力的初步测定

Table 3-4 Tests on the degradation capability of 8 isolates

菌株编号	苯酚（200 mg/L）48 h 降解率（%）	间甲酚（100 mg/L）48 h 降解率（%）
AE14	80.5	-
AE19	-	28.5
AE27	8.0	3.0
AE31	-	86.0(59 h)[a]
AN6	49.0	-
AN8	83.5	86.3
AN35	2.4	4.1
AN38	-	90.5(72 h)[b]

[a] 摇瓶培养 59 h 降解率，[b] 摇瓶培养 72 h 降解率

3.3.3 酚降解实验

根据摇瓶初检的实验结果，选取降解效果较好的菌株 AE14、AE31、AN8、AN38 及富集驯化而得的菌株 AEJ1 和 ANJ3，进行酚生物降解实验。由于 AEJ1 和 ANJ3 是经过富集驯化筛选得到的，降解实验中采用较高的酚浓度；而 AE14、AE31、AN8 和 AN38 未经过驯化过程，降解实验中则采用较低的酚浓度。结果如表 3-5 所示。

分析表明，菌株 AEJ1 和 ANJ3 对间甲酚有着很好的降解效果，菌株 AEJ1 在 48 h 内对 790.77 mg/L 间甲酚的降解率达到 94.6%，而菌株 ANJ3 对 762.75 mg/L 间甲酚的降解率也达到了 92.2%。这两株菌降解间甲酚的初始浓度高于目前文献（Tallur 等，2006；彭丽花等，2009）报道过的 600 mg/L。同时，它们对苯酚也有很好的降解效果，菌株 AEJ1 在 24 h 内将 1097.82 mg/L 苯酚降解 72.8%，48 h 降解率达到 93.2%；菌株 ANJ3 在 48 h 内对 1090.05 mg/L 苯酚的降解率到达 94.2%。而且这些数据都是在未经优化的培养参数下的降解率，培养参数优化后的降解效果应该会更好。对照组由于酚的挥发，酚浓度只是稍有下降。

未经驯化的菌株 AE14、AE31、AN8、AN38 对苯酚和间甲酚也有一定的降解效果。各菌株对 200 mg/L 苯酚、100 mg/L 间甲酚的降解率在 24 h 内就达到了 90%左右，如表 3-5 所示。

表 3-5 6 株降解菌对苯酚、间甲酚降解率的测定

Table 3-5 Phenol and *m*-cresol degradation rates by 6 degradation isolates

菌株编号	底物	初始浓度（mg/L）	24 h 降解率（%）	48 h 降解率（%）
AEJ1	苯酚	1097.82	72.8	93.2
	间甲酚	790.77	2.2	94.6
ANJ3	苯酚	1090.05	87.4	94.2
	间甲酚	762.75	1.7	92.2
AE31	苯酚	203.51	89.4	-
	间甲酚	106.96	91.2	-
AN8	苯酚	257.14	85.2	-
	间甲酚	126.28	89.6	-
AE14	苯酚	244.61	87.7	-
	间甲酚	115.06	87.1	-
AN38	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

3.4 苯酚羟化酶基因的PCR克隆与分析

抽提各单菌的基因组DNA，扩增其苯酚羟化酶大亚基基因部分片段的序列。从酚降解菌AN3、AE14、AEJ1和ANJ3的基因组DNA扩增出600 bp左右的基因片段，PCR产物纯化后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果在http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi网站上进行序列比对，结果见表3-6。

同源比对结果发现，AN3、AE14、AEJ1和ANJ3的扩增片段与苯酚羟化酶基因存在高度的序列相似性，其中AN3（*Ottowia pentelensis* RB3-7^T，96.21%）与*Diaphorobacter* sp. J5-51的苯酚羟化酶基因序列相似度最高（100%）；菌株AE14的苯酚羟化酶基因与*Pseudomonas mendocina* PC3的相似度最高，达到99%；菌株AEJ1和ANJ3与*Pseudomonas putida* KL33苯酚羟化酶基因的相似度最高，均为99%。从而证明PCR产物是苯酚羟化酶基因的同源片段，由此从基因水平上再次验证了这三株菌的酚降解能力。扩增得到的苯酚羟化酶大亚基基因部分片段的系统进化树见图3-5，由图可知来自假单胞属的苯酚羟化酶基因序列聚集成一个簇，而AN3（*Ottowia pentelensis* RB3-7^T，96.21%）的苯酚羟化酶基因序列与*Diaphorobacter* sp. J5-51的序列相似度最高（99%），距离假单胞菌属较远。

表3-6 苯酚羟化酶大亚基基因部分片段测序的比对结果

Table 3-6 Blast of phenol hydroxylase large subunit gene fragment

菌株编号	GenBank中的鉴定菌株	相似度
AN3	*Diaphorobacter* sp. J5-51	100%
	Diaphorobacter sp. PCA039	99%
	Bacterium 7ENR100	92%
AE14	*Pseudomonas mendocina* PC3	99%
	Pseudomonas mendocina PC2	92%
	Pseudomonas putida KL33	87%
	Pseudomonas fluorescens PC36	87%
AEJ1	*Pseudomonas putida* KL33	99%
	Pseudomonas fluorescens PC36	94%
	Pseudomonas mendocina PC2	89%
ANJ3	*Pseudomonas putida* KL33	99%
	Pseudomonas fluorescens PC36	93%
	Pseudomonas mendocina PC2	89%

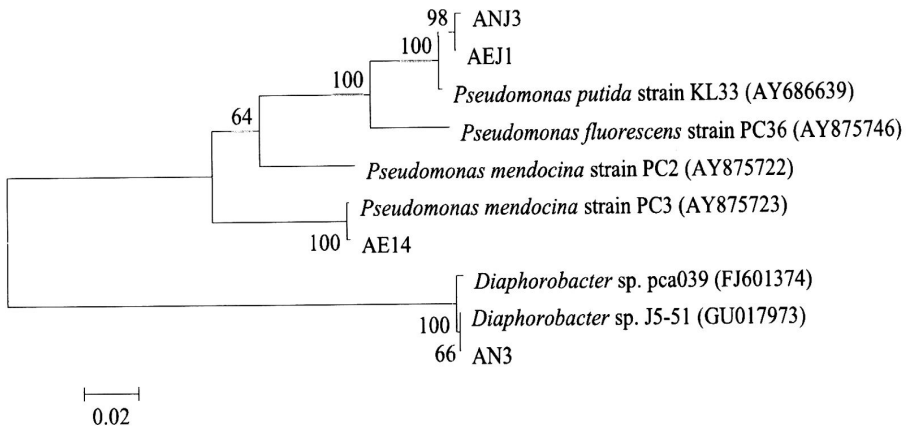

图 3-5 4 株菌的苯酚羟化酶大亚基基因部分片段的对比分析

Fig. 3-5 Analysis of phenol hydroxylase gene of the 4 isolates

3.5 一株酚降解菌新种 AN3^T 的研究

3.5.1 菌株 AN3^T 的分离

菌株 AN3^T 分离自首都钢铁集团焦化废水污水处理厂厌氧池的活性污泥样品(曹军伟等，2011)。活性污泥样品经梯度稀释后涂布于 LB 和 216L 固体培养基，后经酚熏蒸法筛选，分离纯化后得到单菌。其 16S rDNA 序列 Blast 结果表明，它与模式菌株 *Ottowia pentelensis* RB3-7^T 具有最高序列相似性，为 96.21%，可能是该属的一个新种。

图 3-6 菌株 AN3^T 的菌落形态

Fig. 3-6 Colony morphology of strain AN3^T

3.5.2 菌落形态观察

菌株 AN3^T 在 LB 固体平板上生长 72 h 后，形成直径 0.5-0.8 mm 的特征性菌落：土褐色、不透明、边缘规则、表面光滑（图 3-6）。在透射电子显微镜下观察，菌株 AN3^T 呈椭圆形，无鞭毛，菌体长 0.9-1.1 μm，宽 0.5-0.6 μm（图 3-7）。

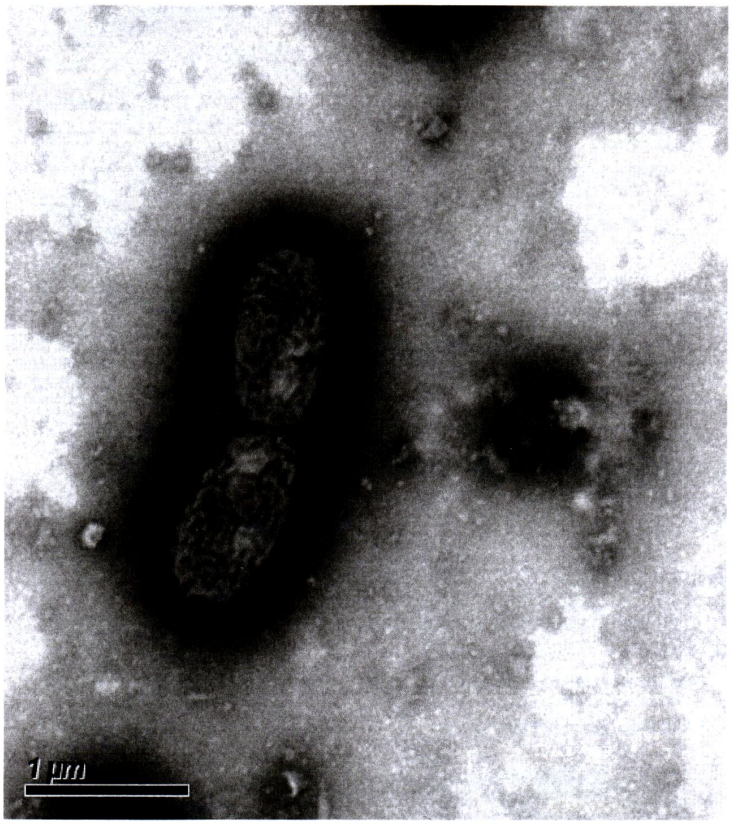

图 3-7 菌株 AN3^T 的电子显微镜照片

Fig. 3-7 Transmission electron micrograph of strain AN3^T

3.5.3 16S rDNA 序列系统发育分析

PCR 扩增得到菌株 AN3^T 接近全长的 16S rRNA 基因序列（1489 bp），利用网站 EzTaxon-e（Kim 等，2012）将该序列与 GenBank 中的基因序列进行 Blast 比对，结果发现它与模式菌株 *Ottowia pentelensis* RB3-7^T 具有最高序列相似性，为 96.21%。与菌株 AN3^T 近缘的模式菌株还有 *Ramlibacter tataouinensis* TTB310^T（95.28%），*Diaphorobacter oryzae* RF3^T（95.22%），*Hylemonella gracilis* ATCC 19624^T（95.20%）和 *Variovorax dokdonensis* DS-43^T（95.09%），与其他菌株的序列相似性都小于 95%。图 3-8 是用邻位加入法构建的 AN3^T 与近缘模式菌株的 16S rRNA 基因系统发育树，可以看出，菌株 AN3^T 位于 *Ottowia* 属这一簇内，初步确定它为 *Ottowia* 属的一个新种，归属 β 变形菌纲。

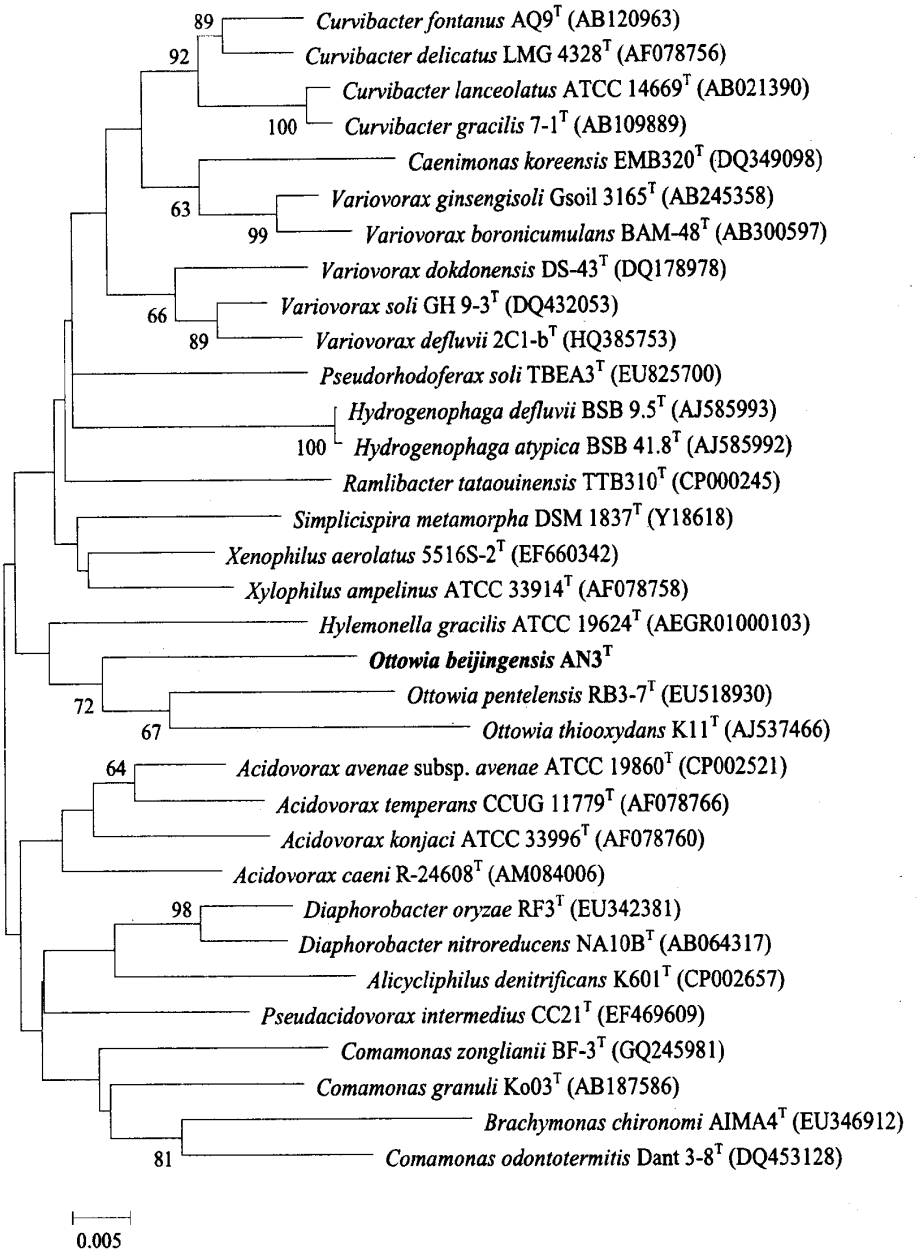

图 3-8 基于 16S rRNA 基因序列的菌株 *Ottowia beijingensis* AN3^T 系统进化树

Fig. 3-8 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of *Ottowia beijingensis* AN3^T

3.5.4 最适生长条件

菌株 AN3^T 是好氧菌，能在 0-2.5% NaCl 浓度的 LB 培养基中生长，最适 NaCl 浓度为 0.5%-1.5%，当 NaCl 浓度大于 3%时就不能生长。该菌能在 15℃-37℃温度范围内生长，最适生长温度为 30℃左右，在 8℃和 41℃均不生长。该菌能在 pH 6.0-10.0 范围内生长，最适生长 pH 为 7.0-8.0。

3.5.5 抗生素抗性实验

通过纸片法测定菌株 AN3^T 的抗生素抗性，共测试了 28 种抗生素。菌株 AN3^T 对以下抗生素敏感：氨苄青霉素（10 μg）、氯霉素（30 μg）、羧苄青霉素（100 μg）、头孢哌酮（30 μg）、环丙沙星（5 μg）、庆大霉素（10 μg）、头孢三嗪（30 μg）、强力霉素（30 μg）、红霉素（15 μg）、卡那霉素（30 μg）、头孢唑啉（30 μg）、米诺四环素（30 μg）、诺氟沙星（10 μg）、氧氟沙星（5 μg）、青霉素 G（10 μg）、多粘菌素 B（30 IU）、哌拉西林（100 μg）、利福平（5 μg）、链霉素（10 μg）、复方新诺明（25 μg）和四环素（30 μg）；对头孢拉定（30 μg）、头孢氨苄（30 μg）、氯林肯霉素（2 μg）、甲硝唑（5 μg）、林可霉素（2 μg）、苯甲异噁唑青霉素（1 μg）和万古霉素（30 μg）不敏感。

3.5.6 Biolog 细菌鉴定

利用 Biolog 微生物鉴定系统鉴定菌株 AN3^T 对 95 种不同碳源的利用情况。菌株 AN3^T 能很好地利用丙酸（Propionic Acid），能微弱利用 N-乙酰-D-葡萄糖胺（N-Acetyl-D-Glucosamine）、葡罗酰胺（Glucuronamide），L-丙氨酰甘氨酸（L-Alanyl-glycine）和 L-天冬氨酸（L-Aspartic Acid）。

3.5.7 酚降解能力测定

通过无机盐摇瓶实验测定菌株 AN3^T 的酚降解能力。实验结果表明，菌株 AN3^T 能微弱利用苯酚和间甲酚，96 h 内对苯酚（200 mg/L）的降解率为 10.84%，对间甲酚（300 mg/L）的降解率也只有 14.13%，详见表 3-7。

目前 *Ottowia* 属仅有 2 株模式菌株，还尚未见有关苯酚、间甲酚生物降解的报道（Felfoldi 等，2011；Spring 等，2004）。菌株 AN3^T 对苯酚、间甲酚的降解率虽低，但降解过程中有菌体生长，并积聚成菌团，如图 3-9 和 3-10 所示，右边摇瓶为实验组（苯酚或间甲酚为唯一碳源和能源），左边摇瓶为相同接种量但无碳源的对照组。这就说明，菌株 AN3^T 可以把苯酚、间甲酚彻底降解而不仅仅是转化。

表 3-7 菌株 AN3^T 对苯酚、间甲酚降解率的测定

Table 3-7 Measurement of phenol and *m*-cresol degradation rate by strain AN3^T

处理	48 h 降解率	96 h 降解率
苯酚（200 mg/L）	8.43%	10.84%
苯酚无菌对照	0.82%	1.31%
间甲酚（300 mg/L）	7.61%	14.13%
间甲酚无菌对照	0.49%	2.44%

图 3-9 菌株 AN3^T 以苯酚为唯一碳源的菌体生长情况

Fig. 3-9 The growth of strain AN3^T with phenol as sole carbon source

左：无碳源对照；右：苯酚为唯一碳源的实验组

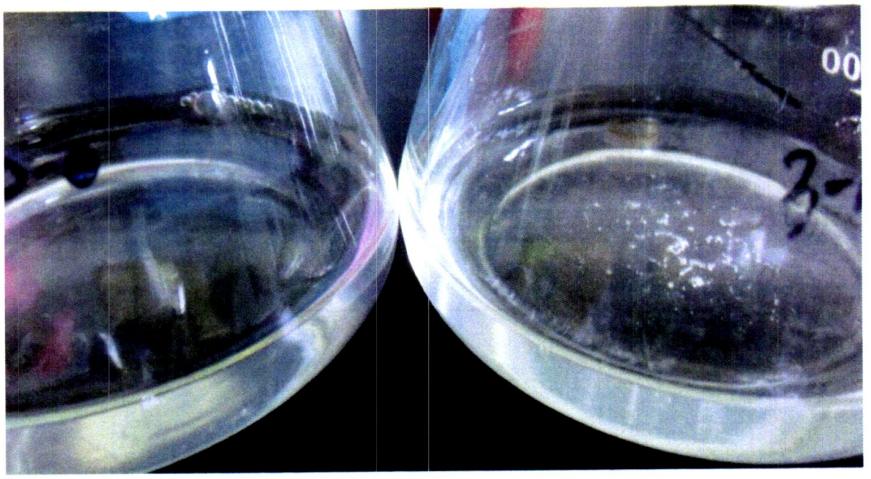

图 3-10 菌株 AN3^T 以间甲酚为唯一碳源的菌体生长情况

Fig. 3-10 The growth of strain AN3^T with *m*-cresol as sole carbon source

左：无碳源对照；右：间甲酚为唯一碳源的实验组

3.5.8 其他生化指标

菌株 AN3^T 为革兰氏阴性菌，接触酶、氧化酶均为阳性；精氨酸双水解酶、脲酶、β-葡糖苷酶和 β-半乳糖苷酶均为阴性。菌株 AN3^T 可以使明胶液化，能利用己二酸，能微弱利用苹果酸；不能进行硝酸盐和亚硝酸盐还原，不能利用 D-葡萄糖产酸，不能产生吲哚，不能利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-甘露醇、N-乙酰-葡萄糖胺、D-麦芽糖、葡萄糖酸盐、甘油、2,3-丁二醇、阿拉伯醇、癸酸、柠檬酸、苯乙酸。

API ZYM 检测实验结果显示，菌株 AN3^T 能够产生碱性磷酸酶、酯酶(C_4)、类脂酯酶(C_8)、缬氨酸芳胺酶、白氨酸芳胺酶、类脂酶(C_{14})和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶；

能微弱产生胱氨酸芳胺酶和酸性磷酸酶；不能产生胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、α-半乳糖苷酶、α-甘露糖苷酶、β-糖醛酸苷酶、β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶、β-葡萄糖苷酶和 α-岩藻糖苷酶。

菌株 AN3^T 与其近缘模式菌株 *Ottowia pentelensis* RB3-7^T 和 *Ottowia thiooxydans* K11^T 的特征比较见表 3-8。

表 3-8 菌株 AN3^T 与其近缘模式菌株的特征比较

Table 3-8 Differences among strainAN3^T, *Ottowia pentelensis* RB3-7^T and *Ottowia thiooxydans* K11^T

特征	AN3^T	RB3-7^T	K11^T
硝化作用	-	-	+
反硝化作用	-	-	+
明胶水解	+	-	+
葡萄糖酸盐	-	W	ND
己二酸	+	W	-
苹果酸	W	W	+
柠檬酸盐	-	+	-
苯乙酸	-	+	+
G+C mol%	67.6	68.5	59

注：RB3-7^T（Felfoldi 等，2011）；K11^T（Spring 等，2004）；+：阳性；-：阴性；W：微弱；ND：不确定

3.5.9 脂肪酸组成分析

菌株 AN3^T 的主要脂肪酸是 Sum In Feature 3（$C_{16:1}\omega7c/C_{16:1}\omega6c$）、$C_{16:0}$、Sum In Feature 8（$C_{18:1}\omega7c/C_{18:1}\omega6c$）和 cyclo $C_{17:0}$，含量分别为 27.13%、25.79%、22.72% 和 7.01%。菌株 AN3^T 中含量较高的脂肪酸还有 $C_{10:0}$ 3-OH（3.28%）、$C_{12:0}$（3.08%）、$C_{18:0}$（2.31%）、$C_{18:1}\omega9c$（1.83%）、$C_{17:0}$（1.45%）和 $C_{14:0}$（1.14%）。这与 *Ottowia* 属另外两株模式菌株的主要脂肪酸组成（$C_{16:1}\omega7c$、$C_{16:0}$ cyclo、$C_{17:0}$ 和 $C_{18:1}\omega7c$）及其含量较为一致，但也稍有差异。比如，cyclo $C_{17:0}$ 在模式菌株 *Ottowia pentelensis* RB3-7^T 中占 20.8%，而在菌株 AN3^T 和模式菌株 *Ottowia thiooxydans* K11^T 中分别只有 7.01%和 3.5%。

总体来说，菌株 AN3^T 与 *Ottowia* 属 2 株模式菌株的脂肪酸组成及其含量较为一致，某些脂肪酸组成及其含量稍有差异。这表明菌株 AN3^T 属于 *Ottowia* 属，但又区别于该属的其它 2 株模式菌株。

菌株 AN3^T 与其它 2 株模式菌株的脂肪酸组成比较见表 3-9。

表 3-9 菌株 AN3^T 和近缘模式菌株的脂肪酸组成比较

Table 3-9 Cellular fatty acid contents of strain AN3^T and related *Ottowia* type strains

Fatty Acid	AN3^T	RB3-7^T	K11^T
$C_{10:0}$	0.23	-	-
$C_{10:0}$ 3-OH	3.28	4.8	2.8
$C_{12:0}$	3.08	3.5	2.8
$C_{13:0}$	0.23	-	-
$C_{12:0}$ 2-OH	-	-	2.1
$C_{12:0}$ 3-OH	0.25	-	-
iso $C_{14:0}$	0.18	-	-
$C_{14:0}$	1.14	0	2.1
$C_{15:1}\omega 6c$	0.38	-	-
iso $C_{16:0}$	0.62	-	-
Sum In Feature 3	27.13	-	-
$C_{16:1}\omega 5c$	0.06	0	2.6
$C_{16:1}\omega 7c$	0	14.1	42.7
$C_{16:0}$	25.79	32.8	19.9
Sum In Feature 4	0.2	-	-
anteiso $C_{17:0}$	0.28	-	-
$C_{17:1}\omega 8c$	0.2	-	-
cyclo $C_{17:0}$	7.01	20.8	3.5
$C_{17:0}$	1.45	-	-
$C_{16:0}$ 2OH	0.56	-	-
$C_{18:1}\omega 7c$	0	18.1	20.4
$C_{18:1}\omega 9c$	1.83	-	-
Sum In Feature 8	22.72	-	-
$C_{18:0}$	2.31	-	-
cyclo $C_{19:0}\omega 8c$	0	3.6	-
iso $C_{19:0}$	0.32	-	-

注：Summed Feature 3：$C_{16:1}\omega 7c/C_{16:1}\omega 6c$；Summed Feature 4：iso $C_{17:1}$ I/anteiso $C_{17:1}$ B；Summed Feature 8：$C_{18:1}\omega 7c/C_{18:1}\omega 6c$；-：无相关数据

3.5.10 *Ottowia beijingensis* AN3^T 新种描述

Ottowia beijingensis (bei.jing.en'sis. N.L. fem. adj. *beijingensis* of beijing, the capital of P. R. China, where the type strain was first isolated)。

菌株 AN3^T 为革兰氏阴性菌，呈椭圆形，长 0.9-1.1 μm，宽 0.5-0.6 μm，没有鞭毛，不运动。在 LB 固体平板上菌落呈土褐色、不透明、边缘规则、表面光滑，菌落直径约 0.7 mm。该菌好氧，能在 0-2.5% NaCl 浓度的 LB 培养基中生长，最适 NaCl 浓度为 0.5%-1.5%，生长温度范围为 15℃-37℃，最适生长温度为 30℃左右。生长 pH 范围为 6.0-10.0，最适生长 pH 为 7.0-8.0。

菌株 AN3^T 接触酶、氧化酶为阳性，能够产生碱性磷酸酶、酯酶(C_4)、类脂酯酶(C_8)、缬氨酸芳胺酶、白氨酸芳胺酶、类脂酶(C_{14})和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶；能微弱产生胱氨酸芳胺酶和酸性磷酸酶；不能进行硝酸盐和亚硝酸盐还原，不能产生胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、α-半乳糖苷酶、α-甘露糖苷酶、β-糖醛酸苷酶、α-葡萄糖苷酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶、β-葡萄糖苷酶、α-岩藻糖苷酶、精氨酸双水解酶、脲酶和β-半乳糖苷酶。菌株 AN3^T 可使明胶液化，能很好地利用丙酸（Propionic Acid）和己二酸，能微弱利用 N-乙酰-D-葡萄糖胺（N-Acetyl-D-Glucosamine）、葡罗酰胺（Glucuronamide），L-丙氨酰甘氨酸（L-Alanyl-glycine）、苹果酸和 L-天冬氨酸（L-Aspartic Acid）。该菌不能利用 D-葡萄糖产酸，不能产生吲哚，不能利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-甘露醇、N-乙酰-葡萄糖胺、D-麦芽糖、葡萄糖酸盐、癸酸、柠檬酸、苯乙酸。

菌株 AN3^T 对以下抗生素敏感：氨苄青霉素、氯霉素、羧苄青霉素、头孢哌酮、环丙沙星、庆大霉素、头孢三嗪、强力霉素、红霉素、卡那霉素、头孢唑啉、米诺四环素、诺氟沙星、氧氟沙星、青霉素 G、多粘菌素 B、哌拉西林、利福平、链霉素、复方新诺明和四环素。

菌株 AN3^T 的主要脂肪酸是 $C_{16:0}$、Sum In Feature 3（$C_{16:1}\omega7c/C_{16:1}\omega6c$）、cyclo $C_{17:0}$ 和 Sum In Feature 8（$C_{18:1}\omega7c/C_{18:1}\omega6c$）。菌株 AN3^T 的 G+C 含量为 67.6 mol%。

3.6 一株潜在的酚降解菌新种 AE31^T 的研究

3.6.1 菌株 AE31^T 的分离

菌株 AE31^T 分离自首都钢铁集团焦化废水污水处理厂好氧池的活性污泥样品（曹军伟等，2011）。活性污泥样品经梯度稀释后涂布于 LB 和 216L 固体培养基，后经酚熏蒸法筛选，分离纯化后得到单菌。其 16S rDNA 序列 Blast 结果表明，它与模式菌株 *Pedobacter saltans* DSM 12145^T 具有最高序列相似性，为 96.14%，可能是该属的一个新种。

3.6.2 菌落形态观察

菌株 AE31^T 在 LB 固体平板上生长 72 h 后，形成直径 1.5-2.2 mm 的特征性菌落：乳白色、不透明、边缘规则、表面光滑（图 3-11）。在透射电子显微镜下观察，菌株 AE31^T 呈短杆状，无鞭毛，菌体长 1.3-1.5 μm，宽 0.3-0.4 μm（图 3-12）。

3.6.3 16S rDNA 序列系统发育分析

PCR 扩增得到菌株 AE31^T 接近全长的 16S rRNA 基因序列（1476 bp），利用网站 EzTaxon-e（Kim 等，2012）将该序列与 GenBank 中的基因序列进行 Blast 比对，

结果发现它与模式菌株 *Pedobacter saltans* DSM 12145^T 具有最高序列相似性，为96.14%。与菌株 AE31^T 近缘的模式菌株还有 *Pedobacter lentus* DS-40^T（92.24%）和 *Mucilaginibacter daejeonensis* Jip 10^T（92.01%），与其他菌株的序列相似性都小于 92%。图3-13是用邻位加入法构建的AE31^{T}与近缘模式菌株的16S rRNA基因系统发育树，可以看出，菌株 AE31^T 位于 *Pedobacter* 属这一簇内，初步确定它为 *Pedobacter* 属的一个新种，归属拟杆菌纲。

图 3-11 菌株 AE31^T 的菌落形态

Fig. 3-11 Colony morphology of strain AE31^T

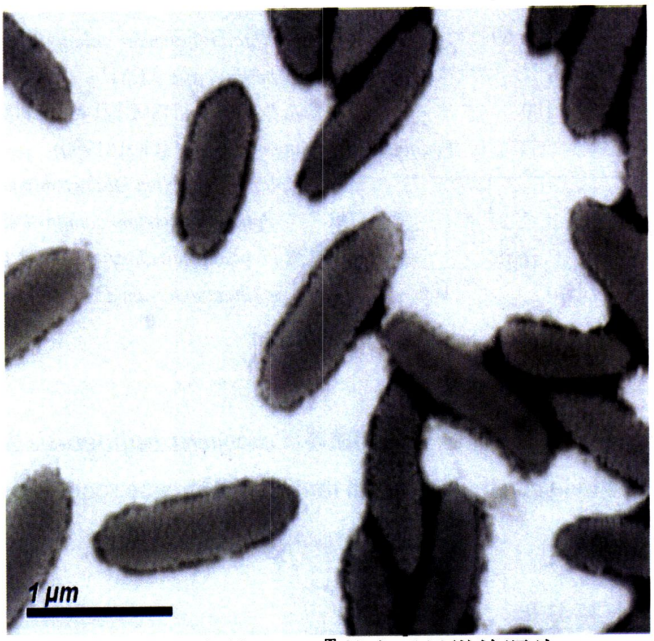

图 3-12 菌株 AE31^T 的电子显微镜照片

Fig. 3-12 Transmission electron micrograph of strain AE31^T

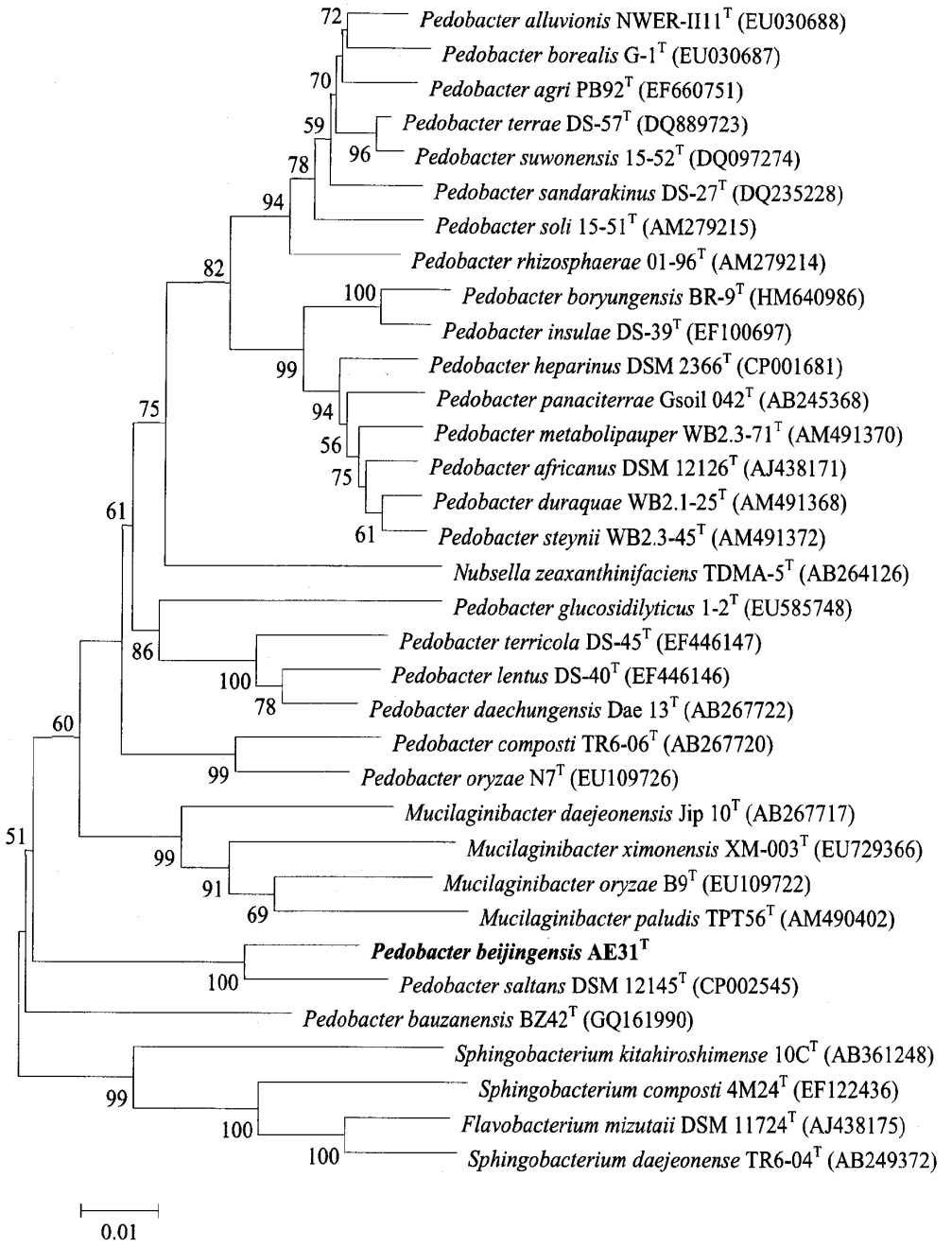

图 3-13 基于 16S rRNA 基因序列的菌株 *Pedobacter beijingensis* AE31^T 系统进化树

Fig. 3-13 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of *Pedobacter beijingensis* AE31^T

3.6.4 最适生长条件

菌株 AE31^T 是好氧菌，能够在 0-3% NaCl 浓度的 LB 培养基中生长，最适 NaCl 浓度为 0.5%-2%，当 NaCl 浓度大于 4%时就不能生长。该菌能在 15℃-37℃温度范

围内生长，最适生长温度为37℃左右，在8℃和41℃均不生长。该菌能在pH 6.0-9.0范围内生长，最适生长pH为7.0-8.0。

3.6.5 抗生素抗性实验

通过纸片法测定菌株AE31^{T}的抗生素抗性，共测试了28种抗生素。菌株AE31^{T}对以下抗生素敏感：氨苄青霉素（10 μg）、氯霉素（30 μg）、羧苄青霉素（100 μg）、头孢拉定（30 μg）、头孢哌酮（30 μg）、环丙沙星（5 μg）、强力霉素（30 μg）、红霉素（15 μg）、氯林肯霉素（2 μg）、米诺四环素（30 μg）、诺氟沙星（10 μg）、氧氟沙星（5 μg）、哌拉西林（100 μg）、利福平（5 μg）、复方新诺明（25 μg）和四环素（30 μg）；对青霉素G（10 μg）、多粘菌素B（30 IU）、卡那霉素（30 μg）、头孢唑啉（30 μg）、头孢三嗪（30 μg）、链霉素（10 μg）、庆大霉素（10 μg）、头孢氨苄（30 μg）、甲硝唑（5 μg）、林可霉素（2 μg）、苯甲异噁唑青霉素（1 μg）和万古霉素（30 μg）不敏感。

表3-10列出了菌株及其近缘模式菌株对抗生素敏感性的差异。

表3-10 菌株AE31^{T}与其近缘模式菌株对抗生素敏感性的差异

Table 3-10 The comparison of antibiotics susceptibility of strainAE31^T with *Pedobacter saltans* DSM 12145^T and *Pedobacter heparinus* DSM 2366^T

抗生素	AE31^T	DSM 12145^T	DSM 2366^T
氨苄青霉素	+	+	-
环丙沙星	+	+	-
头孢三嗪	-	+	-
头孢唑啉	-	+	+
诺氟沙星	+	+	-
氧氟沙星	+	+	-
青霉素G	-	+	-
多粘菌素	-	+	-
万古霉素	-	+	-

+：对抗生素敏感；-：对抗生素不敏感

3.6.6 Biolog细菌鉴定

利用Biolog微生物鉴定系统鉴定菌株AE31^{T}对95种不同碳源的利用情况。菌株AE31^{T}能很好地利用α-环糊精（α-Cyclodextrin）、糊精（Dextrin）、糖原（Glycogen）、N-乙酰-D-半乳糖胺（N-Acetyl-D-Galactosamine）、D-纤维二糖（D-cellobiose）、D-半乳糖（D-Galactose）、龙胆二糖（Gentiobiose）、α-D-葡萄糖（α-D-Glucose）、

α-D-乳糖（α-D-Lactose）、乳果糖（Lactulose）、麦芽糖（Maltose）、D-甘露糖（D-Mannose）、D-蜜二糖（D-Melibiose）、β-甲基 D-葡糖苷（β-Methyl-D-Glucoside）、蔗糖（Sucrose）、D-海藻糖（D-Trehalose）、D-葡糖醛酸（D-Glucuronic Acid）和丙三醇（Glycerol），能微弱利用松二糖（Turanose）、乙酸（Acetic Acid）和琥珀酸（Succinic Acid）。

3.6.7 其他生化指标

菌株 AE31^T 为革兰氏阴性菌，接触酶、氧化酶为阳性，精氨酸双水解酶和脲酶阴性。能利用 D-麦芽糖、N-乙酰-葡萄糖胺、D-葡萄糖和 D-甘露糖，能微弱利用 L-阿拉伯糖。不能进行硝酸盐和亚硝酸盐还原，不能使明胶液化，不能利用 D-葡萄糖产酸，不能产生吲哚，不能利用 D-甘露醇、葡萄糖酸盐、癸酸、柠檬酸、己二酸、苯乙酸和苹果酸。

表 3-11 菌株 AE31^T 与其近缘模式菌株的特征比较

Table 3-11 Differences in biochemical characteristics among strain AE31^T, *Pedobacter saltans* DSM 12145^T and *Pedobacter heparinus* DSM 2366^T

特征	AE31^T	DSM 12145^T	DSM 2366^T
硝化作用	-	W	W
L-阿拉伯糖	W	+	+
D-甘露醇	-	-	+
D-麦芽糖	+	+	W
糖原	+	-	-
D-果糖	-	+	-
普罗酰胺	-	+	-
D-半乳糖醛酸	-	+	-
1-磷酸葡萄糖	-	+	-
6-磷酸葡萄糖	-	+	-
类脂酶(C14)	+	W	-
白氨酸芳胺酶	+	+	-
缬氨酸芳胺酶	+	W	-
胱氨酸芳胺酶	W	W	-
β-糖醛酸苷酶	W	+	W
α-岩藻糖苷酶	-	W	-
G+C mol%	36.24	37	43

+：阳性；-：阴性；W：微弱

API ZYM 检测实验结果显示，菌株 AE31^T 能够产生碱性磷酸酶、酯酶(C_4)、类脂酯酶(C_8)、白氨酸芳胺酶、缬氨酸芳胺酶、酸性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、α-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶、类脂酶(C_{14})和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶；能微弱产生 β-糖醛酸苷酶、α-甘露糖苷酶和胱氨酸芳胺酶；不能产生胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和 α-岩藻糖苷酶。

菌株 AE31^T 与其近缘模式菌株 *Pedobacter saltans* DSM 12145^T 和 *Pedobacter heparinus* DSM 2366^T 的特征比较见表 3-11。

表 3-12 菌株 AE31^T 和近缘模式菌株的脂肪酸组成比较

Table 3-12 Cellular fatty acid contents of strain AE31^T and related type strains

Fatty Acid	AE31^T	DSM 12145^T	DSM 2366^T
$C_{13:1}$ at 12-13	0.14	0.4	0.44
$C_{14:0}$	0.68	0.77	1.13
iso $C_{15:0}$	34.46	30.31	29.3
anteiso $C_{15:0}$	7.13	1.18	3.3
$C_{15:1}\omega 6c$	3.85	4.01	0.54
$C_{14:0}$ 2-OH	0	0	0.17
iso $C_{16:1}$ H	0	0	0.27
Sum In Feature 3	18.61	19.96	23.43
$C_{16:1}\omega 5c$	0	0.3	1.18
iso $C_{15:0}$ 3-OH	4.5	2.71	2.54
Sum In Feature 4	0.8	1.37	0.86
anteiso $C_{17:1}\omega 9c$	0.55	0.65	1.31
iso $C_{17:0}$	0.5	1	1.14
$C_{17:1}\omega 8c$	0.58	1.37	0.51
$C_{17:1}\omega 6c$	0.24	0.98	0.18
$C_{16:0}$ 2-OH	0.25	0	0
iso $C_{17:0}$ 3-OH	6.43	8.49	6.68
$C_{17:0}$ 2-OH	0.43	0.35	1.41
$C_{20:1}\omega 9c$	0	0	0.32
iso $C_{19:1}$ I	0.33	1.15	0
$C_{20:0}$	0.73	0	0

Sum In Feature 3：C16:1ω7c/C16:1ω6c；Sum In Feature 4：iso $C_{17:1}$ I/anteiso $C_{17:1}$ B

3.6.8 脂肪酸组成分析

菌株 AE31^T 的主要脂肪酸是 iso $C_{15:0}$、Sum In Feature 3（$C_{16:1}\omega 7c/C_{16:1}\omega 6c$）、anteiso $C_{15:0}$ 和 iso $C_{17:0}$ 3-OH，含量分别为 34.46%、18.61%、7.13%和 6.43%。这与 *Pedobacter* 属另外两株模式菌株 *Pedobacter saltans* DSM 12145^T 和 *Pedobacter heparinus* DSM 2366^T 的主要脂肪酸组成及其含量较为一致，但也稍有差异。比如，anteiso $C_{15:0}$ 在菌株 AE31^T 中占 7.13%，而在模式菌株 DSM 12145^T 和 DSM 2366^T 中

分别只有1.18%和3.3%。总体来说，菌株AE31^{T}与*Pedobacter*属2株模式菌株的脂肪酸组成及其含量较为一致，某些脂肪酸组成及其含量稍有差异。这表明菌株AE31^{T}属于*Pedobacter*属，但又区别于该属的其它2株模式菌株。

菌株AN3^{T}与*Pedobacter*属其它2株模式菌株的脂肪酸组成比较见表3-12。

3.6.9 *Pedobacter beijingensis* AE31^{T}新种描述

Pedobacter beijingensis (bei.jing.en'sis. N.L. fem. adj. *beijingensis* of beijing, the capital of P. R. China, where the type strain was first isolated)。

菌株AE31^{T}为革兰氏阴性菌，呈短杆状，长1.3-1.5 μm，宽0.3-0.4 μm，没有鞭毛，不运动。在LB固体平板上菌落呈乳白色、不透明、边缘规则、表面光滑，菌落直径约1.7 mm。该菌好氧，能在0-3% NaCl浓度的LB培养基中生长，最适NaCl浓度为0.5%-2%，生长温度范围为15℃-37℃，最适生长温度为37℃左右。生长pH范围为6.0-9.0，最适生长pH为7.0-8.0。

菌株AE31^{T}接触酶、氧化酶为阳性，能够产生碱性磷酸酶、酯酶(C_4)、类脂酯酶(C_8)、白氨酸芳胺酶、缬氨酸芳胺酶、酸性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、α-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶、类脂酶(C_{14})和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶；能微弱产生β-糖醛酸苷酶、α-甘露糖苷酶和胱氨酸芳胺酶；不能进行硝酸盐和亚硝酸盐还原，不能产生胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、α-岩藻糖苷酶、精氨酸双水解酶和脲酶。

菌株AE31^{T}不能使明胶液化，能很好地利用α-环糊精（α-Cyclodextrin）、糊精（Dextrin）、糖原（Glycogen）、N-乙酰-D-半乳糖胺（N-Acetyl-D-Galactosamine）、D-纤维二糖（D-cellobiose）、D-半乳糖（D-Galactose）、龙胆二糖（Gentiobiose）、α-D-葡萄糖（α-D-Glucose）、α-D-乳糖（α-D-Lactose）、乳果糖（Lactulose）、麦芽糖（Maltose）、D-甘露糖（D-Mannose）、D-蜜二糖（D-Melibiose）、β-甲基D-葡糖苷（β-Methyl-D-Glucoside）、蔗糖（Sucrose）、D-海藻糖（D-Trehalose）、D-葡糖醛酸(D-Glucuronic Acid)和丙三醇(Glycerol)，能微弱利用松二糖(Turanose)、乙酸（Acetic Acid）和琥珀酸（Succinic Acid）；不能利用D-葡萄糖产酸，不产生吲哚，不能利用D-甘露醇、葡萄糖酸盐、癸酸、柠檬酸、己二酸、苯乙酸和苹果酸。

菌株AE31^{T}对以下抗生素敏感：氨苄青霉素、氯霉素、羧苄青霉素、头孢拉定、头孢哌酮、环丙沙星、强力霉素、红霉素、氯林肯霉素、米诺四环素、诺氟沙星、氧氟沙星、哌拉西林、利福平、复方新诺明和四环素。

菌株AE31^{T}的主要脂肪酸是iso $C_{15:0}$、Sum In Feature 3（$C_{16:1}\omega7c/C_{16:1}\omega6c$）、anteiso $C_{15:0}$和iso $C_{17:0}$ 3-OH，G+C含量为36.24 mol%。

3.7 菌株 *Ottowia beijingensis* AN3^T 基因组草图的初步分析

酚生物降解实验表明，菌株 AN3^T 能够降解苯酚、间甲酚（96 h 降解率分别为 10.84%和 14.13%）。经系统分类鉴定，菌株 AN3^T 是 *Ottowia* 属的一个新种，目前该属仅有 2 株模式菌株，还尚未见有关苯酚、间甲酚生物降解的报道（Felfoldi 等，2011；Spring 等，2004）。菌株 AN3^T 还扩增得到了苯酚羟化酶大亚基基因的部分片段。因此，本研究对菌株 AN3^T 进行了基因组草图的测序，并分析了其中与酚类化合物降解相关的功能基因。

菌株 AN3^T 基因组草图共有 525 个 Scaffolds，其中大于 1000 bp 的大 Scaffolds 有 455 个。菌株 AN3^T 基因组草图总大小为 4008239 bp，G+C 含量为 67.6 mol%，预测得到 6776 个 ORF。

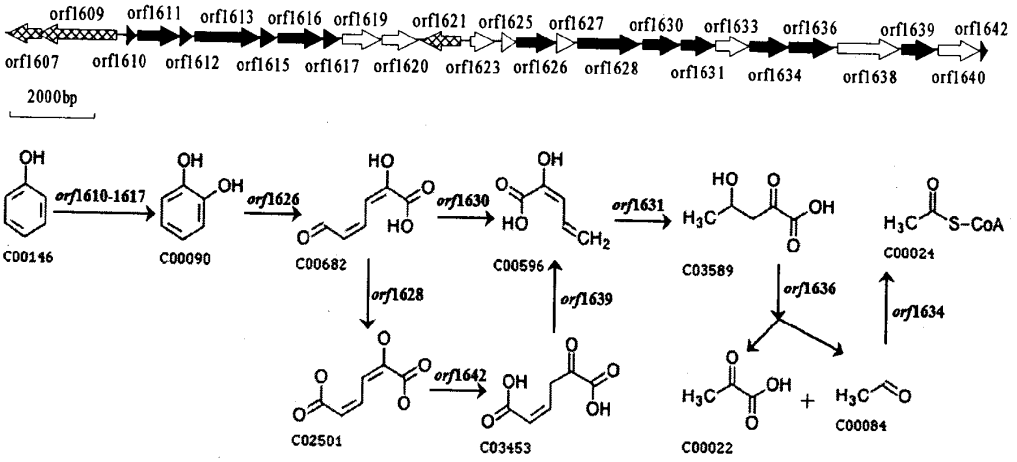

图 3-14 推测菌株 AN3^T 降解苯酚的间位代谢途径及其相关基因组织结构图

Fig. 3-14 Proposed *meta*-cleavage pathway for phenol degradation by strain AN3^T and the organization of the gene cluster

*orf*1610-1617：phenol hydroxylase；*orf*1626：catechol 2,3-dioxygenase；*orf*1628：2-hydroxymuconic acid-6-semialdehyde dehydrogenase；*orf*1630：2-hydroxymuconic acid-6-semialdehyde hydrolase；*orf*1631：2-oxopent-4-dienoate hydratase；*orf*1634：acetaldehyde dehydrogenase；*orf*1636：4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase；*orf*1639：4-Oxalocrotonate decarboxylase；*orf*1642：4-Oxalocrotonate tautomerase

3.7.1 苯酚降解途径的推测

根据基因预测和注释结果，菌株 AN3^T 基因组中有一套比较完整的苯酚降解基因簇，位于约 23 kbp 的 DNA 区域内。*orf*1610 至 *orf*1642 共有 13 个基因可能参与苯酚的生物降解，构成了苯酚间位降解途径的完整基因簇，基因的组织结构图见 3-14，基因注释结果详见表 3-13。根据文献报道（Omokoko 等，2008；Powlowski 等，1994）和 KEGG 等数据库网站，再结合菌株 AN3^T 基因组注释结果，我们推测了菌株 AN3^T

降解苯酚的可能代谢途径，如图所示 3-14。菌株 AN3^T 通过儿茶酚间位裂解途径降解苯酚，经一系列降解酶系的作用，最终生成丙酮酸和乙酰辅酶 A，其降解过程与以往文献报道一致（Omokoko 等，2008；Powlowski 等，1994）。

表 3-13 可能参与苯酚、间甲酚降解的基因及其功能注释

Table 3-13 The genes and their products involved in phenol or *m*-cresol degradation

ORF	aa.	Similar Protein	Identity (%)
0259	149	ref|NP_887288.1| 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase [*Bordetella bronchiseptica* RB50] *hpaF*	50.34
0262	307	ref|YP_608654.1| 3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase (Homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase) [*Pseudomonas entomophila* L48]	81.11
0770	211	ref|YP_004618916.1| maleylacetoacetate isomerase [*Ramlibacter tataouinensis* TTB310]	73.58
1458	129	ref|ZP_08949808.1| 4-carboxymuconolactone decarboxylase [*Acidovorax radicis* N35]	76.8
1579	636	ref|ZP_01744473.1| phenol 2-monooxygenase [*Sagittula stellata* E-37]	75.43
1607	262	ref|YP_984535.1| GntR family transcriptional regulator [*Acidovorax* sp. JS42]	83.52
1609	585	gb|ACN62952.1| sigma54-specific transcriptional regulator [*Diaphorobacter* sp. PCA039]	92.48
1610	72	gb|ACN62953.1| phenol hydroxylase subunit [*Diaphorobacter* sp. PCA039]	100
1611	330	gb|ACN62954.1| phenol hydroxylase subunit [*Diaphorobacter* sp. PCA039]	83.33
1612	94	ref|YP_003279202.1| phenol hydroxylase component [*Comamonas testosteroni* CNB-2]	77.78
1613	519	gb|ACN62956.1| phenol hydroxylase subunit [*Diaphorobacter* sp. PCA039]	96.72
1615	118	dbj|BAH90067.1| phenol hydroxylase conserved region [uncultured bacterium]	100
1616	354	dbj|BAH90066.1| ferredoxin oxidoreductase [uncultured bacterium] phenol hydroxylase subunit [*Comamonas testosteroni*]	95.2
1617	118	dbj|BAH90065.1| ferredoxin [uncultured bacterium]	86.44
1619	301	emb|CAA42452.1| 3-methylcatechol 2,3-dioxygenase [*Pseudomonas putida*]	99.67
1620	296	dbj|BAH89773.1| putative phenolics degradation regulation protein [uncultured bacterium]	86.15
1621	301	gb|AAX47248.1| LysR-type regulator [*Delftia tsuruhatensis*]	95.35

1623	191	dbj|BAB62048.1| antibiotic biosynthesis monooxygenase [*Pseudomonas putida*]	88.42
1625	111	dbj|BAH89646.1| ferredoxin [uncultured bacterium]	90.09
1626	308	dbj|BAB62050.1| catechol 2,3-dioxygenase [*Pseudomonas putida*]	97.73
1627	143	dbj|BAH89648.1| hypothetical protein [uncultured bacterium]	76.06
1628	486	dbj|BAH89649.1| 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase [uncultured bacterium]	95.88
1630	288	dbj|BAB62053.1| 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase [*Pseudomonas putida*]	100
1631	262	dbj|BAB62054.1| 2-oxopent-4-dienoate hydratase [*Pseudomonas putida*]	93.51
1633	264	dbj|BAH89652.1| short-chain dehydrogenase/reductase SDR [uncultured bacterium] 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	88.26
1634	302	dbj|BAB62056.1| acetaldehyde dehydrogenase [*Pseudomonas putida*]	88.08
1636	342	dbj|BAH89654.1| 4-hydroxy 2-oxovalerate aldolase [uncultured bacterium]	90.09
1638	485	ref|YP_004715330.1| methyl-accepting chemotaxis protein [*Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588]	29
1639	262	ref|YP_984555.1| 4-oxalocrotonate decarboxylase [*Acidovorax* sp. JS42]	82.44
1640	327	dbj|BAH89656.1| twin-arginine translocation pathway signal protein [uncultured bacterium]	91.13
1642	63	dbj|BAH89657.1| 4-oxalocrotonate tautomerase [uncultured bacterium]	100
1788	277	ref|YP_981102.1| *beta*-ketoadipate pathway transcription regulator [*Polaromonas naphthalenivorans* CJ2] IclR family	66.18
1789	284	ref|YP_987739.1| 3-oxoacid CoA-transferase subunit A [*Acidovorax* sp. JS42]	77.45
1790	214	ref|ZP_04764694.1| 3-oxoacid CoA-transferase, B subunit [*Acidovorax delafieldii* 2AN]	86.32
1793	400	ref|YP_004236299.1| *beta*-ketoadipyl CoA thiolase [*Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ATCC 19860]	89.95
1795	297	ref|ZP_04764552.1| short-chain dehydrogenase/reductase SDR [*Acidovorax delafieldii* 2AN]	85.98
2313	402	ref|YP_004618019.1| 3-ketoacyl-CoA thiolase [*Ramlibacter tataouinensis* TTB310]	79.75
2322	288	ref|YP_002942709.1| 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase [*Variovorax paradoxus* S110]	73.17
2557	340	ref|YP_982255.1| aldo/keto reductase [*Polaromonas naphthalenivorans* CJ2]	63.2

2559	319	4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase [*Comamonas* sp. E6]	87
2561	455	ref|YP_994980.1| protocatechuate 4,5-dioxygenase [*Verminephrobacter eiseniae* EF01-2]	68.82
2562	311	ref|YP_001565462.1| amidohydrolase 2 [*Delftia acidovorans* SPH-1]	91.03
2562	311	2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) hydrolase [*Bradyrhizobium* sp. BTAi1]	89
2565	227	ref|YP_003278786.1| 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase [*Comamonas testosteroni* CNB-2]	84
2566	348	ref|ZP_08406691.1| 4-oxalomesaconate hydratase [*Hylemonella gracilis* ATCC 19624]	88.92
2568	306	ref|YP_982264.1| LysR family transcriptional regulator [*Polaromonas naphthalenivorans* CJ2]	64.36
3371	370	ref|YP_004388419.1| S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase [*Alicycliphilus denitrificans* K601]	89.73
3510	169	ref|YP_980338.1| flavin reductase domain-containing protein [*Polaromonas naphthalenivorans* CJ2] xylenol methylhydroxylase (39%)	68.26
3511	264	ref|YP_004617196.1| *beta*-ketoadipate enol-lactone hydrolase [*Ramlibacter tataouinensis* TTB310]	52.52
4056	483	gb|AAD09868.1| dehydrogenase PhnF [*Burkholderia sartisoli*]	71.64
4056	483	gb|ACT53252.1| salicylaldehyde dehydrogenase [*Burkholderia* sp. C3]	69
4228	232	ref|YP_003451000.1| fumarylacetoacetate hydrolase [*Azospirillum* sp. B510]	60.61
4228	232	fumarylpyruvate hydrolase [*Azospirillum lipoferum* 4B] *nagK*	65
4230	103	ref|YP_001260477.1| gentisate 1,2-dioxygenase [*Sphingomonas wittichii* RW1]	62.86
4301	395	ref|YP_002552544.1| FAD-binding monooxygenase [*Acidovorax ebreus* TPSY]	63.02
4301	395	ref|ZP_03588597.1| 3-hydroxybenzoate-6-hydroxylase [*Burkholderia multivorans* CGD1]	40
6496	187	ref|YP_004618307.1| protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit *beta* [*Ramlibacter tataouinensis* TTB310]	73.37

3.7.2 间甲酚降解途径的推测

根据基因预测和注释结果，菌株 AN3^T 基因组中有大量间甲酚降解相关基因，其中可能还有部分基因参与苯酚的生物降解。这些基因编码的蛋白质氨基酸序列与GenBank数据库中的已报道蛋白质有着很高的序列相似性，其注释结果详见表3-13。

根据文献报道（Ahamad 等，2001；Hopper 等，1975；Hughes 等，1984；Poh 等，1980）和 KEGG 等数据库网站，再结合菌株 AN3^T 基因组注释结果，我们推测了菌株 AN3^T 降解间甲酚的可能代谢途径，如图 3-15 所示。

菌株 AN3^T 可能通过两条独立的代谢途径降解间甲酚。其一，间甲酚经 2 位单加氧之后形成 3-甲基儿茶酚（图 3-15 下），之后 3-甲基儿茶酚经间位裂解进入儿茶酚间位裂解途径，最终生成丙酮酸和乙酰辅酶 A，进入 TCA 循环。另外，间甲酚还可以经甲基羟化酶催化生成 3-羟基苯甲醇（图 3-15 上），并进一步生成 3-羟基苯甲酸，之后 3-羟基苯甲酸在不同酶作用下分别生成龙胆酸和原儿茶酸，再分别经过龙胆酸途径（图 3-16）和原儿茶酸途径，生成 TCA 循环的中间产物。其中的原儿茶酸途径还分为原儿茶酸2,3-裂解途径、原儿茶酸3,4-裂解途径和原儿茶酸4,5-裂解途径，详见图 3-17、3-18 和 3-19。菌株 AN3^T 降解间甲酚的可能代谢途径和以往文献报道的间甲酚代谢途径基本一致（Hopper 等，1975；Stephens，2011；彭丽花等，2009）。

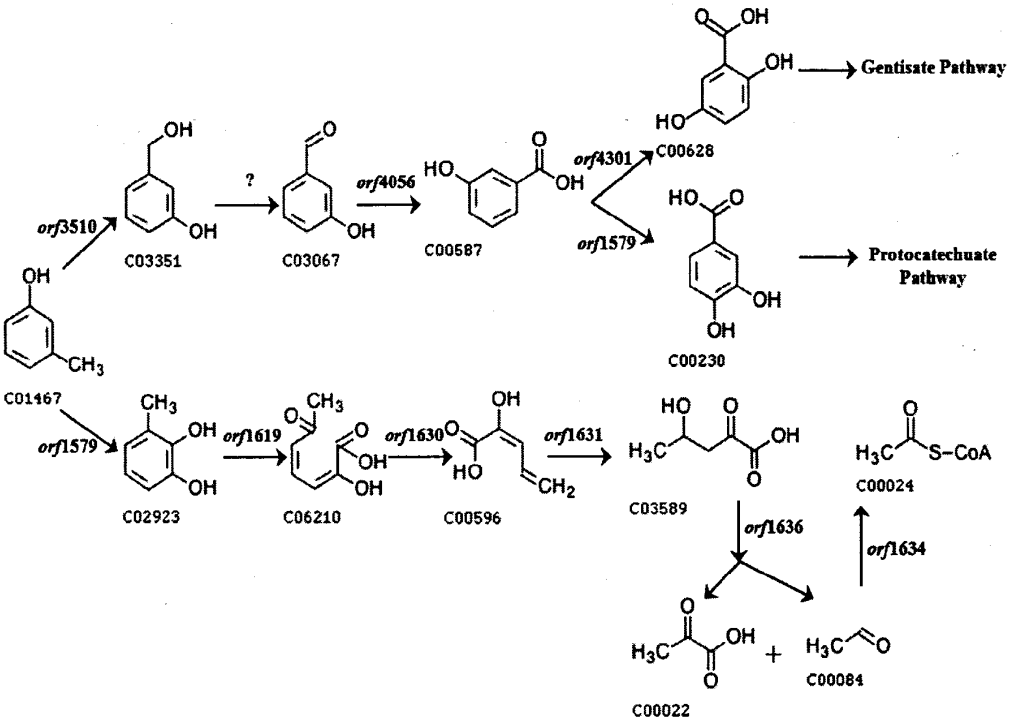

图 3-15 *Ottowia beijingensis* AN3^T 降解间甲酚可能的代谢途径

Fig. 3-15 Proposed pathway for *m*-cresol degradation by *Ottowia beijingensis* AN3^T

*orf*1579：phenol 2-monooxygenase；*orf*1619：3-Methylcatechol:oxygen 2,3-oxidoreductase(decyclizing)；*orf*1630：2-hydroxymuconic acid-6-semialdehyde hydrolase；*orf*1631：2-oxopent-4-dienoate hydratase；*orf*1636：4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase；*orf*1634：acetaldehyde dehydrogenase；*orf*3510：xylenol methylhydroxylase；*orf*4056：3-hydroxybenzaldehyde:NAD(P)$^+$ oxidoreductase；*orf*4301：3-hydroxybenzoate,NADH:oxygen oxidoreductase (6-hydroxylating)；?：3-Hydroxybenzyl-alcohol:NADP$^+$ oxidoreductase，可能为 *orf*3371

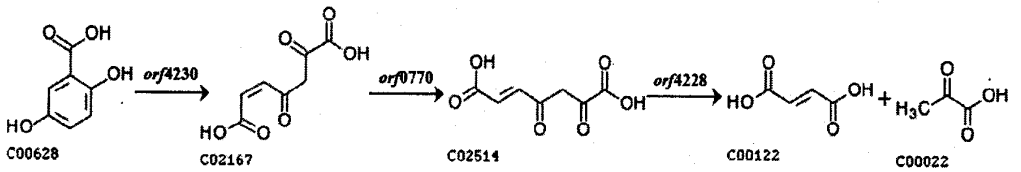

图 3-16 *Ottowia beijingensis* AN3^T 龙胆酸降解途径

Fig. 3-16 Gentisate pathway of *Ottowia beijingensis* AN3^T

*orf*0770：maleylpyruvate isomerase；*orf*4228：fumarylpyruvate hydrolase；*orf*4230：gentisate 1,2-dioxygenase

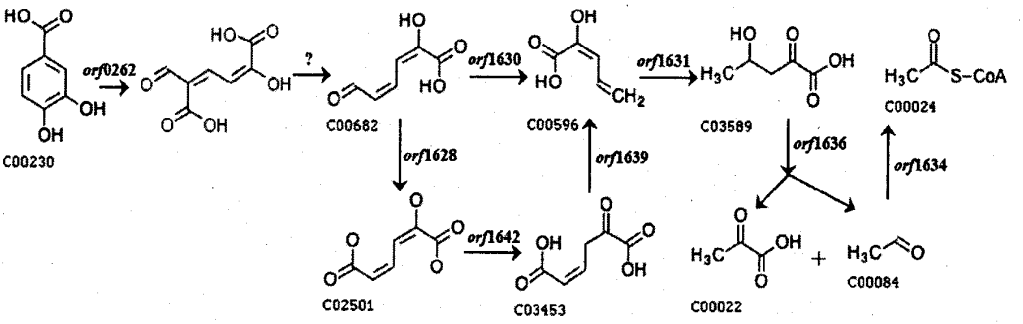

图 3-17 *Ottowia beijingensis* AN3^T 原儿茶酸 2,3-裂解途径

Fig. 3-17 Protocatechuate 2,3-cleavage pathway of *Ottowia beijingensis* AN3^T

*orf*0262：protocatechuate 2,3-dioxygenase；*orf*1628：2-hydroxymuconic acid-6-semialdehyde dehydrogenase；*orf*1630：2-hydroxymuconic acid-6-semialdehyde hydrolase；*orf*1631：2-oxopent-4-dienoate hydratase；*orf*1634：acetaldehyde dehydrogenase；*orf*1636：4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase；*orf*1639：4-Oxalocrotonate decarboxylase；*orf*1642：4-Oxalocrotonate tautomerase；?：5-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase.

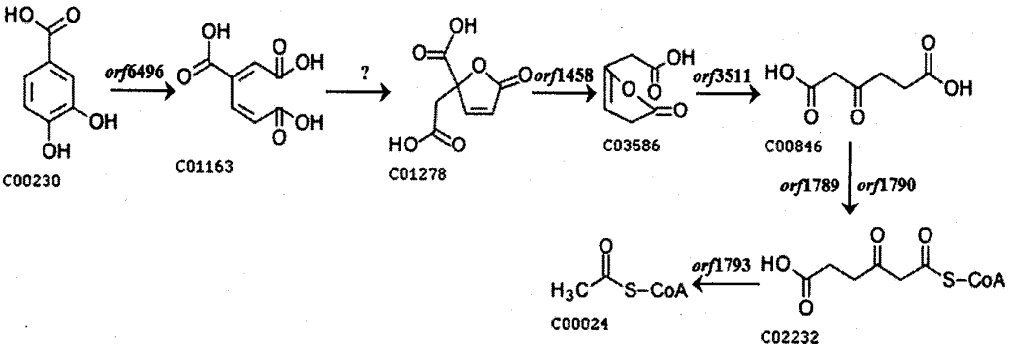

图 3-18 *Ottowia beijingensis* AN3^T 原儿茶酸 3,4-裂解途径

Fig. 3-18 Protocatechuate 3,4-cleavage pathway of *Ottowia beijingensis* AN3^T

*orf*1458：*gamma*-carboxymuconolactone decarboxylase；*orf*1789, *orf*1790：3-oxoacid CoA-transferase；*orf*1793：*beta*-ketoadipyl CoA thiolase；*orf*3511：*beta*-ketoadipate enol-lactone hydrolase；*orf*6496：protocatechuate 3,4-dioxygenase；?：3-carboxy-*cis*,*cis*-muconate cycloisomerase

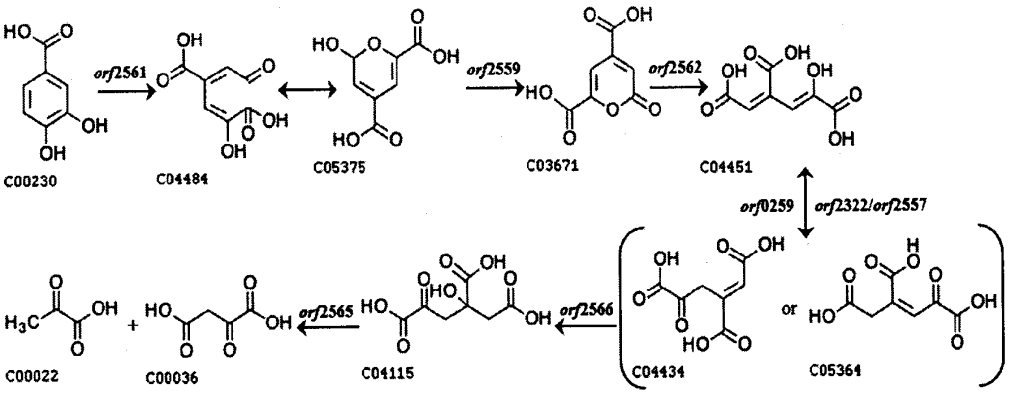

图 3-19 *Ottowia beijingensis* AN3^T 原儿茶酸 4,5-裂解途径

Fig. 3-19 Protocatechuate 4,5-cleavage pathway of *Ottowia beijingensis* AN3^T

*orf*0259：5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase；*orf*2322：5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase；*orf*2557：aldo/keto reductase；*orf*2559：4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase；*orf*2561：protocatechuate 4,5-dioxygenase；*orf*2562：2-pyrone-4,6-dicarboxylate hydrolase；*orf*2565：4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase；*orf*2566：4-oxalomesaconate hydratase

4 讨论

本文从首都钢铁集团污水处理厂的2个活性污泥样品中富集、分离得到28株潜在的酚降解菌，分属于六大类的20个属28个种。其中的假单胞菌（*Pseudomonas*）、产碱菌（*Alcaligenes*）和不动杆菌（*Acinetobacter*）等都是常见的苯酚、间甲酚降解菌属；还有一些降解菌属，如 *Castellaniella*、*Pedobacter* 等很少报道有酚降解能力，特别是很少报道有降解间甲酚的能力。经过酚降解实验，从中筛选获得6株苯酚、间甲酚降解效果良好的菌株AE14、AE31、AN8、AN38、AEJ1和ANJ3。这6株菌的16S rDNA鉴定结果为：AN8（*Comamonas denitrificans* 123^T，99.72%）、AE14（*Pseudomonas alcaliphila* AL15-21^T，99.392%）、AEJ1（*Pseudomonas monteilii* CIP 104883^T，99.665%）、AE31（*Pedobacter saltans* DSM 12145^T，96.14%）、AN38（*Castellaniella defragrans* $54Pin^T$，100%）和ANJ3（*Pseudomonas plecoglossicida* $FPC951^T$，99.666%）。

本研究通过16S rDNA序列分析，发现有4株菌可能属于新种，对其中菌株AN3和AE31进行了系统的分类鉴定。

菌株AN3为革兰氏阴性菌，根据其系统发育底物、G+C含量、脂肪酸分析、抗生素敏感性、Biolog实验以及其他生理生化特征，菌株AN3具备了 *Ottowia* 属所共有的特征。除此之外，菌株AN3也有其一些独特的特征。所以我们认为菌株AN3为 *Ottowia* 属的一个新种，并命名为 *Ottowia beijingensis* $AN3^T$，MCCC保藏编号为MCCC 1A01410。

菌株AE31为革兰氏阴性菌，根据其系统发育底物、G+C含量、脂肪酸分析、抗生素敏感性、Biolog实验以及其他生理生化特征，菌株AE31具备了 *Pedobacter* 属所共有的特征。除此之外，菌株AE31也有其一些独特的特征。所以我们认为菌株AE31为 *Pedobacter* 属的一个新种，并命名为 *Pedobacter beijingensis* $AE31^T$，MCCC保藏编号为MCCC 1A01299。

通过酚生物降解实验，发现菌株AEJ1（*Pseudomonas monteilii* CIP 104883^T，99.67%）和ANJ3（*Pseudomonas plecoglossicida* $FPC951^T$，99.67%）降解苯酚、间甲酚降解效果很好，特别是对间甲酚的降解作用尤为突出。在未经优化的培养参数下，菌株AEJ1在48 h内对间甲酚（790.77 mg/L）的降解率达到94.6%，菌株ANJ3对间甲酚（762.75 mg/L）的降解率也达到了92.2%。这两株菌降解间甲酚的初始浓度高于目前文献（Tallur等，2006；彭丽花等，2009）报道过的600 mg/L。同时，菌株AEJ1能在24 h内将1097.82 mg/L苯酚降解72.8%，48 h降解率则达到93.2%；菌株ANJ3在48 h内对1090.05 mg/L苯酚的降解率也到达了94.2%。由于这两株菌来源于含有多种有机污染物的焦化废水活性污泥样品中，因此具有重要的实际应用价值。

本研究还选择降解效果好的降解菌进行分子生物学方面的研究，发现所试降解菌都编码有酚降解相关基因，且与已报道的有较高同源性。从酚降解菌 AE14、AN3、AEJ1 和 ANJ3 的基因组 DNA 中扩增得到了苯酚羟化酶大亚基基因片段，经测序并使用 BLAST 网站进行序列比对，得知菌株 AE14 的 PCR 产物与 *Pseudomonas mendocina* PC3 苯酚羟化酶基因的序列相似性达到 99%；菌株 AN3 的 PCR 产物与 *Diaphorobacter* sp. J5-51 的苯酚羟化酶基因序列相似度最高（100%）；菌株 AEJ1 和 ANJ3 的 PCR 产物与 *Pseudomonas putida* KL33 苯酚羟化酶基因的序列相似度均为 99%。从基因水平上提供了这 4 个菌株酚降解功能的证据，并为进一步研究打下了基础。

本研究选择了菌株 $AN3^T$ 做了深入研究。该菌能够降解苯酚、间甲酚。系统分类鉴定结果表明，菌株 $AN3^T$ 是 *Ottowia* 属的一个新种，目前该属还尚未见有关苯酚、间甲酚生物降解的报道（Felfoldi 等，2011；Spring 等，2004）。

通过对菌株 $AN3^T$ 的基因组草图测序，分析了其中与酚类化合物降解相关的功能基因。基因预测和注释结果显示，菌株 $AN3^T$ 基因组中有一套比较完整的苯酚降解基因簇，*orf*1610 至 *orf*1642 共有 13 个基因可能参与苯酚的生物降解，构成了间位裂解途径的完整基因簇；基因组还有大量间甲酚降解相关基因，其中可能还有部分基因参与苯酚的生物降解（间位代谢途径）。推测菌株 $AN3^T$ 的苯酚降解途径为苯酚间位降解途径，其降解过程与以往文献报道一致（Omokoko 等，2008；Powlowski 等，1994）。

在间甲酚降解方面，推测菌株 $AN3^T$ 可能采取两条独立的代谢途径：其一与苯酚的生物降解过程类似，采取间位裂解途径将生成的 3-甲基儿茶酚彻底降解；其二先将间甲酚单加氧生成 3-羟基苯甲醇，并进一步生成龙胆酸和原儿茶酸，再分别经过龙胆酸途径和原儿茶酸途径（包括原儿茶酸 2,3-裂解途径、原儿茶酸 3,4-裂解途径和原儿茶酸 4,5-裂解途径）生成 TCA 循环的中间产物。

有关间甲酚降解途径，负责某些生化反应步骤的基因尚未明确，如图 3-15、3-17 和 3-18 所示。其中负责 3-羟基苯甲醇脱氢氧化为 3-羟基苯甲醛这一反应步骤的基因，目前还少见文献报道。针对这些尚未明确的基因，本研究分析出了可能的候选基因，下一步将对这些基因进行原核表达或基因敲除等功能方面的研究。同时通过检测代谢中间产物，验证推测的间甲酚降解途径。

本研究已获得的酚降解菌种资源多样丰富，有潜在应用价值，有待发掘。特别是菌株 AEJ1 和 ANJ3 降解苯酚、间甲酚降解效果很好，有希望应用于实际的含酚废水处理过程。

参考文献

1. 曹军伟，董纯明，曹宏斌等．焦化废水中酚降解菌及其降解基因的研究．环境科学．2011, 32(2): 560-566.
2. 陈春．焦化废水中苯酚降解菌的筛选与降解性能的研究 [硕士学位论文]．太原: 太原理工大学, 2011.
3. 东秀珠，蔡妙英．常见细菌系统鉴定手册[M]．北京: 科学出版社, 2001: 352.
4. 付柳，任源，韦朝海．间甲酚高效降解菌的筛选及其降解特性．化工进展．2008, 27(7): 1032-1037.
5. 龚斌．一株高效苯酚降解菌的分离和鉴定及特性的研究 [硕士学位论文]．武汉: 华中农业大学, 2006.
6. 顾立锋，何健，张瑞福等．一株耐盐苯酚降解酵母菌的分离及降解特性研究．土壤学报．2004, 41(5): 756-760.
7. 关海滨．高效苯酚降解菌的选育及降酚性能研究 [硕士学位论文]．沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
8. 关晓燕．苯酚降解菌的分离鉴定及其特性研究 [硕士学位论文]．大连: 大连理工大学, 2008.
9. 金光，张晓华．海洋新菌的分类与鉴定方法．中国海洋大学学报．2011, 41(4): 69-76.
10. 赖其良．西南印度洋中脊深海水体 PAHs 降解菌的多样性分析 [硕士学位论文]．厦门: 厦门大学, 2007.
11. 李绍峰，孙连鹏，黄君礼．UV/H_2O_2 降解酚类物质动力学研究．中山大学学报（自然科学版）．2004, 43(3): 99-102.
12. 李淑彬，陈振军．微生物降解酚类化合物的研究进展．华南师范大学学报（自然科学版）．2005, (4): 136-142.
13. 潘利华，姜绍通，刘鹏达等．苯酚降解菌的筛选及其降解特性的初步研究．微生物学通报．2003, 30(5): 78-81.
14. 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．环境化学．2009, 28(1): 44-48.
15. 沈锡辉，刘志培，王保军等．苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株（*Rhodococcus* sp. strain PNAN5）的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究．环境科学学报．2004, 24(3): 482-486.
16. 韦朝海，朱家亮，吴超飞等．焦化行业废水水质变化影响因素及污染控制．焦化行业废水水质变化影响因素及污染控制．2011, 30(1): 225-232.

17. 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. 环境科学学报. 2004, 24(6): 1135-1141.
18. 吴培诚. 苯酚降解细菌 GXP04 及其苯酚羟化酶基因的研究 [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2002.
19. 向述荣，林敏. 苯酚的生物降解基因组成及其调控机制. 微生物学杂志. 2001, 21(3): 48-53.
20. 徐玉泉，张维，陈明等. 一株苯酚降解菌的分离和鉴定. 环境科学学报. 2000, 20(4): 450-455.
21. 姚海艳. *Lysinibacillus cresolivorans* 的间甲酚降解特性及动力学研究 [硕士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2011.
22. 袁军. 印度洋深海多环芳烃降解菌的多样性分析及降解菌新种的分类鉴定与降解机理初步研究 [博士学位论文]. 厦门: 厦门大学, 2008.
23. 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 355.
24. Afzal M, Iqbal S, Rauf S *et al*. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. J Hazard Mater. 2007, 149(1): 60-66.
25. Ahamad P, Kunhi A, Divakar S. New metabolic pathway for *o*-cresol degradation by *Pseudomonas* sp. CP4 as evidenced by 1H NMR spectroscopic studies. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2001, 17(4): 371-377.
26. Ahamad P Y A, Kunhi A A M. Degradation of phenol through *ortho*-cleavage pathway by *Pseudomonas stutzeri* strain SPC2 . Letters in Applied Microbiology. 1996, 22(1): 26-29.
27. Arai H, Akahira S, Ohishi T *et al*. Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. Microbiology. 1998, 144 (Pt 10): 2895-2903.
28. Banerjee A, Ghoshal A K. Phenol degradation by *Bacillus cereus*: pathway and kinetic modeling. Bioresour Technol. 2010, 101(14): 5501-5507.
29. Bartilson M, Shingler V. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* CF600. Gene. 1989, 85(1): 233-238.
30. Bergauer P, Fonteyne P A, Nolard N *et al*. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. Chemosphere. 2005, 59(7): 909-918.

31. Bolotin A, Wincker P, Mauger S *et al*. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Res. 2001, 11(5): 731-753.
32. 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. Archives of microbiology. 1995, 164(1): 63-69.
33. Camara B, Bielecki P, Kaminski F *et al*. A gene cluster involved in degradation of substituted salicylates via *ortho* cleavage in *Pseudomonas* sp. strain MT1 encodes enzymes specifically adapted for transformation of 4-methylcatechol and 3-methylmuconate. J Bacteriol. 2007, 189(5): 1664-1674.
34. Chen W M, Chang J S, Wu C H *et al*. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. Res Microbiol. 2004, 155(8): 672-680.
35. Dagley S, Gibson D T. The Bacterial Degradation of Catechol. Biochem J. 1965, 95: 466-474.
36. Duffner F M, Kirchner U, Bauer M P *et al*. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. Gene. 2000, 256(1-2): 215-221.
37. Ehrt S, Schirmer F, Hillen W. Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. Mol Microbiol. 1995, 18(1): 13-20.
38. El-Sayed W S, Ibrahim M K, Abu-Shady M *et al*. Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. Biosci Biotechnol Biochem. 2003, 67(9): 2026-2029.
39. Essam T, Amin M A, Tayeb O E *et al*. Kinetics and metabolic versatility of highly tolerant phenol degrading *Alcaligenes* strain TW1. J Hazard Mater. 2010, 173(1-3): 783-788.
40. Felfoldi T, Keki Z, Sipos R *et al*. *Ottowia pentelensis* sp. nov., a floc-forming betaproteobacterium isolated from an activated sludge system treating coke plant effluent. Int J Syst Evol Microbiol. 2011, 61(Pt 9): 2146-2150.
41. Fleischmann R D, Adams M D, White O *et al*. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science. 1995, 269(5223): 496-512.
42. Hopper D J, Taylor D G. Pathways for the degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. J Bacteriol. 1975, 122(1): 1-6.

43. Hughes E J, Bayly R C, Skurray R A. Evidence for isofunctional enzymes in the degradation of phenol, *m*- and *p*-toluate, and *p*-cresol via catechol *meta*-cleavage pathways in *Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol. 1984, 158(1): 79-83.
44. Jiang Y, Cai X, Wu D *et al*. Biodegradation of phenol and *m*-cresol by mutated *Candida tropicalis*. J Environ Sci-China. 2010, 22(4): 621-626.
45. Jiang Y, Wen J, Jia X *et al*. Mutation of *Candida tropicalis* by irradiation with a He-Ne laser to increase its ability to degrade phenol. Appl Environ Microbiol. 2007a, 73(1): 226-231.
46. Jiang Y, Wen J, Lan L *et al*. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the yeast *Candida tropicalis*. Biodegradation. 2007b, 18(6): 719-729.
47. Kalin M, Neujahr H Y, Weissmahr R N *et al*. Phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*: gene cloning, sequence analysis, and functional expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1992, 174(22): 7112-7120.
48. Kim O S, Cho Y J, Lee K *et al*. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol. 2012, 62(Pt 3): 716-721.
49. Kim S-J, Kweon O, Jones R C *et al*. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Biodegradation. 2008, 19: 859-881.
50. Kim Y, Harker A R. Cloning and characterization of the regulatory genes *phlR1* and *phlR2* involved in phenol metabolism from *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Mol Cells. 1997, 7(5): 620-629.
51. Kirimura K, Gunji H, Wakayama R *et al*. Enzymatic Kolbe-Schmitt reaction to form salicylic acid from phenol: enzymatic characterization and gene identification of a novel enzyme, *Trichosporon moniliiforme* salicylic acid decarboxylase. Biochem Biophys Res Commun. 2010, 394(2): 279-284.
52. Kotresha D, Vidyasagar G. Isolation and characterisation of phenol-degrading *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008, 24(4): 541-547.
53. Kukor J J, Olsen R H. Molecular cloning, characterization, and regulation of a *Pseudomonas pickettii* PKO1 gene encoding phenol hydroxylase and expression of the gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. J Bacteriol. 1990, 172(8): 4624-4630.
54. Kukor J J, Olsen R H. Genetic organization and regulation of a *meta* cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, and cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1. J Bacteriol. 1991, 173(15): 4587-4594.

55. Lack A, Fuchs G. Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. J Bacteriol. 1992, 174(11): 3629-3636.

56. Lee D J, Ho K L, Chen Y Y. Degradation of cresols by phenol-acclimated aerobic granules. Appl Microbiol Biotechnol. 2011, 89(1): 209-215.

57. Londry K L, Fedorak P M, Suflita J M. Anaerobic Degradation of *m*-Cresol by a Sulfate-Reducing Bacterium. Appl Environ Microbiol. 1997, 63(8): 3170-3175.

58. Muller J A, Galushko A S, Kappler A *et al*. Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. Arch Microbiol. 1999, 172(5): 287-294.

59. Ng L C, Shingler V, Sze C C *et al*. Cloning and sequences of the first eight genes of the chromosomally encoded (methyl) phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. Gene. 1994, 151(1-2): 29-36.

60. Nordlund I, Powlowski J, Shingler V. Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. J Bacteriol. 1990a, 172(12): 6826-6833.

61. Nordlund I, Shingler V. Nucleotide sequences of the *meta*-cleavage pathway enzymes 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase and 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* CF600. Biochim Biophys Acta. 1990b, 1049(2): 227-230.

62. Omokoko B, Jantges U K, Zimmermann M *et al*. Isolation of the *phe*-operon from *G. stearothermophilus* comprising the phenol degradative *meta*-pathway genes and a novel transcriptional regulator. BMC Microbiol. 2008, 8: 197.

63. Paller G, Hommel R K, Kleber H P. Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. J Basic Microbiol. 1995, 35(5): 325-335.

64. Poh C L, Bayly R C. Evidence for isofunctional enzymes used in *m*-cresol and 2,5-xylenol degradation via the gentisate pathway in *Pseudomonas alcaligenes*. J Bacteriol. 1980, 143(1): 59-69.

65. Powlowski J, Shingler V. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. Biodegradation. 1994, 5(3-4): 219-236.

66. Santos V L, Heilbuth N M, Braga D T *et al*. Phenol degradation by a *Graphium* sp. FIB4 isolated from industrial effluents. J Basic Microbiol. 2003, 43(3): 238-248.

67. 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.. Bioresour Technol. 2008, 99(18): 8553-8558.
68. Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note #101. Newark, De: MIDI. 1990.
69. Semple K T, Cain R B. Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. Appl Environ Microbiol. 1996, 62(4): 1265-1273.
70. Shieh W Y, Chen Y W, Chaw S M *et al*. *Vibrioruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. Int J Syst Evol Microbiol. 2003, 53(Pt 2): 479-484.
71. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H *et al*. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(2): 996-1001.
72. Shingler V, Franklin F C, Tsuda M *et al*. Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. J Gen Microbiol. 1989, 135(5): 1083-1092.
73. 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 Bacteriol. 1992, 174(3): 711-724.
74. Spring S, Jackel U, Wagner M *et al*. *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N_2O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2004, 54(Pt 1): 99-106.
75. Stephens S. *m*-Cresol Pathway Map. UMBBD-Pathways, 2011. (Accessed March 31, 2012, at http://umbbd.msi.umn.edu/mcr/mcr_image_map.html.)
76. Tallur P N, Megadi V B, Kamanavalli C M *et al*. Biodegradation of *p*-cresol by *Bacillus* sp. strain PHN 1. Curr Microbiol. 2006, 53(6): 529-533.
77. Tepe O, Dursun A Y. Combined effects of external mass transfer and biodegradation rates on removal of phenol by immobilized *Ralstonia eutropha* in a packed bed reactor. J Hazard Mater. 2008, 151(1): 9-16.
78. Wang G, Wen J, Li H *et al*. Biodegradation of phenol and *m*-cresol by *Candida albicans* PDY-07 under anaerobic condition. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009, 36(6): 809-814.

79. Wei G, Yu J, Zhu Y *et al*. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. J Hazard Mater. 2008, 151(1): 111-117.

80. Yan D Z, Kang J X, Liu D Q. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Silicibacter pomeroyi* DSS-3. Annals of Microbiology. 2009, 59(4): 789-800.

81. Zeng H Y, Jiang H, Xia K *et al*. Characterization of phenol degradation by high-efficiency binary mixed culture. Environ Sci Pollut Res Int. 2010, 17(5): 1035-1044.

82. Zhan Y, Yan Y, Zhang W *et al*. Comparative analysis of the complete genome of an *Acinetobacter calcoaceticus* strain adapted to a phenol-polluted environment. Res Microbiol. 2012, 163(1): 36-43.

致谢

时光荏苒！硕士研究生阶段的三年时光短暂而又充实！

感谢尊敬的导师邵宗泽研究员。在学业上，邵老师给我以精心指导；在生活上邵老师给我以无微不至的关怀。所有的悉心教导和温暖关怀我都铭记于心，时刻激励着我不断成长。师恩深似海，终生难忘！

感谢赖其良老师，无论是实验上的细心指导，还是生活上的关心照顾，都让我倍感温馨，衷心感谢！

感谢孙风芹老师、何进老师、董纯明老师、王万鹏老师、王丽萍老师和张青叶老师在实验和生活中给予的关心和照顾！感谢 MCCC 菌种保藏中心的全体人员对我的关心和帮助！

感谢 329 实验室的全体成员，廖悦婷、付媛媛、李安章、黄兆斌、王建宁、陈华、王震、余志伟、史小满、李少能、张荣秋、白秀花、刘阳、陈艳武、黄会、李莞平、王淋、蔡波波、陈昕、李贵珍、谢燕荣和庄玲萍等。感谢你们在实验上给我的帮助和建议，感谢你们在生活上给我的关心和照顾，实验室的生活有了你们的陪伴而精彩，衷心祝福你们在未来的工作和学习中顺心顺意！

感谢华中农业大学，感谢华中农业大学的老师和同学！

感谢我的家人和朋友，感谢你们的理解、支持、鼓励和关爱，感谢你们给了我前进中不竭的动力！

附录

攻读硕士研究生期间已发表论文：

曹军伟，董纯明，曹宏斌等．焦化废水中酚降解菌及其降解基因的研究．环境科学．2011, 32(2): 560-566.