

苯酚降解菌 CN-6 的分离及其生长特性

龙腾锐¹, 张 钊^{1,2}, 莊瑞鑫²

(1. 重庆大学 三峡库区生态与环境教育部重点实验室, 重庆 400045;

2. 台湾元智大学 工程学院化学工程与材料科学系, 台湾 32003)

摘要:从台湾某纺织厂污泥中分离得到一株能够将苯酚作为唯一碳源和能源生长的细菌。根据其形态和生理生化反应结合 16S rDNA 测定分析, 该菌被鉴定为假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.)。降解特性研究表明, 该菌降解苯酚的最适 pH 和温度分别为 8.5 和 30℃, 在此条件下, 浓度高达 500 mg/L 的苯酚能被该菌在 17 h 内将完全降解。在动力学研究中, 由于高浓度苯酚对 CN-6 菌株的降解过程存在底物抑制现象, 故采用 Haldane 非竞争性底物抑制模型, 计算确定了模型参数 μ_{\max} 、 K_s 和 K_i 分别为 0.452 h⁻¹、28.617 mg/L、782.4 mg/L, 该动力学方程对实验数据能很好拟合。

关键词:苯酚; 生物降解; 分离; 动力学; *Pseudomonas* sp.

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4764(2010)05-0082-06

Biodegradation of Phenol by a Novel Isolated Bacterium *Pseudomonas* sp. CN-6

LONG Teng-rui¹, ZHANG Zhao^{1,2}, ZHUAN Rui-xin²

(1. MOE Key Laboratory of Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment,

Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China; 2. Department of Chemical Engineering and Materials Science, Yuan Ze University, Taiwan 32003)

Abstract: A strain that have capable of metabolizing phenol as a sole source of carbon and energy sources was isolated from an sludge collected from textile chemical plant in Taiwan. It was identified as *Pseudomonas* sp. based on its morphology, physiological, biochemical characteristics with an automatic biometrical system and the 16S rDNA sequence analysis. It is shown that the biodegradation of phenol was optimized at culture medium pH 8.5 and 30℃. Under the condition, the strain degraded phenol completely within 17h even though the initial phenol level was high to 500 mg/L. With the study of dynamic growth kinetics of suspended cells, the value of μ_{\max} , K_s and K_i were found to be 0.452 h⁻¹, 28.617 mg/L, 782.4 mg/L for strain CN-6 degrading phenol using Haldane's inhibition kinetic models.

Key words: phenol; biodegradation; isolation; kinetic; *Pseudomonas* sp.

苯酚及其衍生物是煤矿开采、石油炼制、炼焦工业、造纸、塑料、纺织等工业废水中的主要排放物质^[1-2]。研究表明, 苯酚是一种毒性物质, 不慎吸、食入, 均会对人体健康造成极大伤害, 许多酚类更被认为是直接的致癌物质。酚的毒性不仅对人类造成伤害, 对水生动植物亦是如此, 当水中苯酚含量达到

5~25 mg/L 时, 就会造成鱼类的死亡, 而酚苯含量大于 100 mg/L 的水若用于灌溉, 将会导致农作物的减产和枯死^[3-4]。所以, 各国水体中苯酚的含量都做出了严格的限制^[5], 中国对于污水中酚的排放标准最大限值为 2 mg/L, 而生活饮用水含酚的标准更不可超过 0.002 mg/L。

收稿日期: 2010-03-09

基金项目: 台湾科学委员会基金资助项目(NSC96-2628-E-155-002-MY2)

作者简介: 龙腾锐(1939-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事水处理研究, (E-mai)longtr@126.com.

目前处理含酚废水可采取生物降解、萃取、活性炭吸附、高级氧化等方法^[5],其中生物降解法不仅安全、经济,而且不会产生2次污染,因此各国学者在这方面进行了大量研究^[6-7]。但生物降解法中的微生物大多是从污泥中驯化得到的菌群,由于菌群内的微生物种类繁多、关系复杂,给降解机理的研究带来不便。

该研究从长期受苯酚污染的土壤中筛选、分离到一株降解苯酚能力较高的细菌菌株。该菌株能以苯酚为唯一碳源和能源生长。通过16S rDNA定序确定该菌的菌属,并对该菌株降解苯酚的生理生化特性和动力学进行了初步研究,旨在找到一些对酚处理效果较好的优势菌株。

1 材料与方法

1.1 微生物

用于研究的菌株分离自台湾桃园县远东纺织厂污水排放口污泥,由台湾元智大学分离技术实验室提供,置于-80℃的冰箱中保存备用。

1.2 化合物及培养基

苯酚、甲醇、甲酸为德国 Merck Chemicals 公司产品,所有药品纯度均超过99%。实验用水为 Millipore 公司 Milli-Q 制备的超纯水。

NB 培养(基)液:牛肉浸膏 3.0 g/L;蛋白胨 5.0 g/L;固态培养基另含琼脂 15.0 g/L。

MS 培养液:矿物质盐培养液采用 Hutner's Mineral Base^[8],每1L培养液中含有 KH_2PO_4 5.44 g; Na_2HPO_4 5.65 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00 g; Nitrilotriacetic acid 0.20 g; MgSO_4 0.29 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.3 mg; EDTA 3.1 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.7 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.9 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg。初始 pH 值为 7.2 ± 0.5 。

1.3 分离和降解培养试验

富集培养:将10g纺织污水排口污泥加入100mL NB 培养液中搅拌静置,取上清液作为接种液。在250mL培养瓶中加入100mL MS 培养液、2mL 接种液、苯酚(100 mg/L)作为唯一碳源,将培养瓶置于水浴摇床中($30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, 120 rpm)培养。富集的菌液约每两天转接1次,每次将5mL前次富集的菌液转接到含有100mL新鲜MS培养液的培养瓶中,同时将苯酚的浓度从100 mg/L增加到200 mg/L,如此转接10次。

菌株分离:将富集得到的培养菌液转接到 NB

固态培养基上,划线分离纯化,置于 $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下的培养箱中培养,如此重复直至得到纯菌株。

苯酚降解试验:在100mL无菌MS培养液中加入2mL含有纯菌株的磷酸盐缓冲液作为接种菌,将不同浓度的苯酚作为唯一的碳源加入无菌MS培养液,置于水浴摇床中($30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, 120 rpm)培养,研究CN-6在不同初始浓度苯酚条件下的降解特性。pH、温度、溶氧量试验是将300 mg/L的苯酚作为唯一碳源加入培养液中,改变pH、温度、水浴摇床晃动速度来了解CN-6在相应环境中对苯酚的降解特性,培养条件同上。每个降解试验做3个平行样品,间隔1h进行无菌操作取样,测定生物量和苯酚浓度。

1.4 分析方法

苯酚浓度:高效液相色谱(HPLC)法。取1mL样品加入0.25mL HCl(3 mol/L),均匀混合后,经孔径为 $0.2 \mu\text{m}$ 的 Millipore 针筒滤膜过滤后,用高效液相色谱仪在254 nm 波长用外标法进行定量。液相色谱仪为日本 JASCO 975 型,色谱柱为美国 Phenomenex Synergi 4 (Polar-RP ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$)),流动相为甲醇与水的混合物,按6:4 (V/V)配制(含0.1%的甲酸),流速1.5 mL/min,柱温 30°C ,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

生物量:比浊法,采用 JASCO 公司 V-550 型紫外-可见光光谱仪在600 nm 下测定光密度值(OD_{600})。

1.5 16S rDNA 测序分析和菌种鉴定

将细菌接种于NB培养液中进行12h培养后,取1mL培养液,使用 Genomic DNA mini kit Geneaid 纯化DNA,采用其标准流程得到 genomic DNA,并在 -20°C 下保存备用。

用于PCR反应的引物为 M13F(-20) 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'和 M13R(-24) 5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'。PCR反应体系: $50 \mu\text{L}$ PCR 混合物中包含细菌DNA $1 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol/L}$ 引物各 $1 \mu\text{L}$, PCR 缓冲液 $5 \mu\text{L}$ (pH8.3 Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl_2 2 mmol/L, 0.01% gelatin), 2.5 mmol/L dNTP $1 \mu\text{L}$, Taq 聚合酶 $0.5 \mu\text{L}$ 。PCR反应条件: 94°C 10min, 55°C 1min, 72°C 2min 扩增35个循环,最后在 72°C 保温延伸10min。纯化后的PCR产物,由台湾明欣生物科技公司使用 ABI Prism 3730 型基因分析仪定序。用电子扫描电镜观察菌体形态特征,并用16S rDNA法进行细菌鉴定。

1.6 系统发育分析

将获取的 CN-6 菌株 16S rDNA 序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析比对, 选取相关序列(皆为 *Pseudomonas* 属), 再利用 DNAMAN 进行多重序列比对(Multialignment), 然后构建发育树(Distance method 选取 Kimura, Bootstrap trials 1 000 次)。

1.7 生长动力学

利用 CN-6 在不同初始浓度下的降解数据, 作出生长曲线。计算每组实验对数生长期中生长曲线的斜率, 推估出不同初始酚浓度下的比生长速率, 并用不同比生长速率值对不同初始酚浓度做图, 选择合适的动力学模型, 在 MATLAB 7.0 中对数据点进行非线性回归, 得出各动力学参数。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定

通过富集培养, 从污泥中分离得到 1 株纯菌种, 可利用苯酚为唯一碳源和能源独立生长于培养基中, 暂命名为 CN-6。CN-6 在固态 NB 培养基上菌落无色透明, 菌落中心略高于周围边缘。挑取单菌落, 利用扫描电镜进行个体观察, 细胞呈杆状(图 1), 革兰氏染色呈阴性, 氧化酶为阳性和过氧化氢酶为阴性。

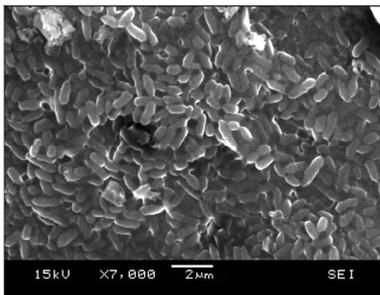


图 1 CN-6 扫描电镜图(7 000×)

利用菌株 16S rDNA 特异引物进行 PCR 扩增, 得到约 1.5 kb 的扩增产物(图 2)。DNA 测序后, 与 GenBank 细菌序列库中序列进行同源性比对, CN-6 与假单胞菌属的多株细菌相似性均在 90% 以上, 其中与 *Pseudomonas* sp. Hg4-06 (EU304252.1) 相似系数高达 98%。根据 16S rDNA 的序列, *Pseudomonas* sp. CN-6 的系统发育树(图 3)。

2.2 *Pseudomonas* sp. CN-6 对不同浓度苯酚的降解

将 CN-6 菌株接种在 pH 7.0, 苯酚质量浓度分别为 30 mg/L, 60 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L

和 1 000 mg/L 的 MS 培养液中, 初始接种生物量为 0.05 ~ 0.08 OD, 将其置于水浴摇床中(30℃ ± 0.5℃, 120 rpm)培养 24 h, 持续测定细菌的生长和苯酚降解情况, 结果见图 4。



图 2 16S rDNA PCR 扩增

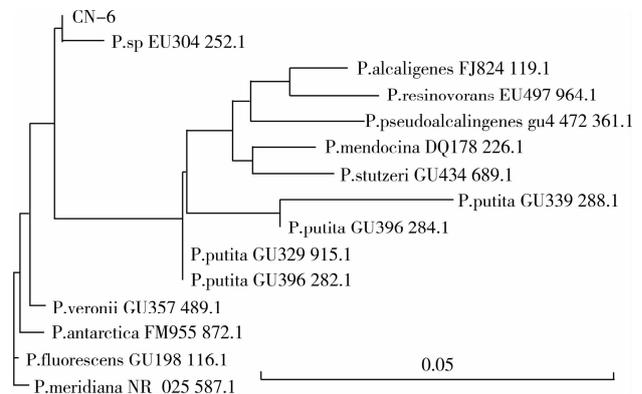


图 3 CN-6 系统发育树

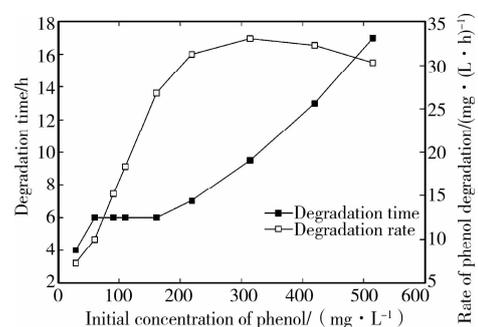


图 4 浓度对 CN-6 菌株降解苯酚的影响

从图 4 中可知, 在初始苯酚浓度不大于 500 mg/L 的培养液中, 细菌生长较快, 苯酚的小时平均降解速率随底物浓度增大而加快, 由图 5 所示, 300 mg/L、pH 7.0 时, 完全降解苯酚耗时 9.5 h, 平均每小时降解 33.05 mg/L 苯酚, 比降解速率大, 降解苯酚能力明显高于文献记载^[9-11], 但迟滞期较长; 在 400~500 mg/L 时, 细菌生长速度和苯酚降解速率略有下降, 但苯酚均能完全降解; 当苯酚高于

500 mg/L,细菌生长受到抑制降解能力迅速下降,在 24 h 内无法完全降解培养液中的苯酚;当苯酚浓度在 1 000 mg/L 时,细菌生长受到严重的抑制而停滞,48 h 内未发现苯酚被降解。

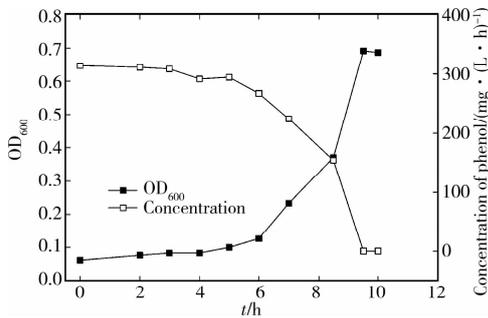


图 5 CN-6 菌株对 300ppm 苯酚的降解

2.3 pH

为了掌握 pH 对菌株降解苯酚的影响,实验将 CN-6 菌株分别接种于苯酚质量浓度为 300 mg/L、pH 值为 4.5~9.5 的 MS 培养液中,在 30℃、120 rpm 下水浴摇床培养,持续无菌取样测定苯酚浓度,所得结果见表 1。

从表中可知,当 pH 值低于 6.0 或高于 8.5 时,菌株对苯酚的降解速率快速下降;当 pH 值在 7.0~8.5 时,菌株均能够快速的降解苯酚。由实验得到的最适降解 pH 值为 8.5,说明碱性环境更利于 CN-6 的生长,这是由于苯酚在水溶液中为酸性(pH=5.2),根据唐伟等研究^[12-13],苯酚对微生物的毒性随 pH 值的增高而减小,因此碱性环境降低了苯酚毒性从而加快了微生物新陈代谢。

表 1 pH 对 CN-6 菌株降解苯酚的影响

pH	OD	降解时间/h	小时降解量/ (mg · (L · h) ⁻¹)
4.5	0.062 7 ± 0.003	—	—
5.0	0.268 4 ± 0.005	—	—
5.5	0.582 3 ± 0.005	20.33 ± 1.7	15.74
6.0	0.624 0 ± 0.006	13.77 ± 0.68	23.24
6.5	0.640 6 ± 0.004	11.53 ± 0.4	27.75
7.0	0.692 3 ± 0.007	10.50 ± 0.3	30.47
7.5	0.680 4 ± 0.007	10.17 ± 0.25	31.47
8.0	0.724 8 ± 0.009	9.53 ± 0.5	33.57
8.5	0.701 9 ± 0.012	8.75 ± 0.3	36.57
9.0	0.068 7 ± 0.003	15.23 ± 1.2	21.01
9.5	0.052 3 ± 0.004	—	—

试验中 MS 培养液在 30℃ 时初始生物量 0.05

~0.08;在 pH4.5,5.0,9.5 未观测到苯酚的降解。

2.4 温度

将 CN-6 菌株接种于 pH 值为 7.0、苯酚浓度为 300 mg/L 的唯一碳源 MS 培养液中,分别在 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 和 45℃ 条件下水浴摇床(120 rpm)培养 36 h,每间隔半小时取样测定苯酚浓度和生物量(OD₆₀₀),结果如图 6。在 20~30℃ 之间,苯酚的降解速率以及细菌生物量(OD₆₀₀)随温度的升高而增加。继续升高温度,高温使得细菌中酶活性降低甚至失去。因此,30℃ 是细菌生长和降解苯酚的最佳温度,细菌中降解酶达到最大活性。

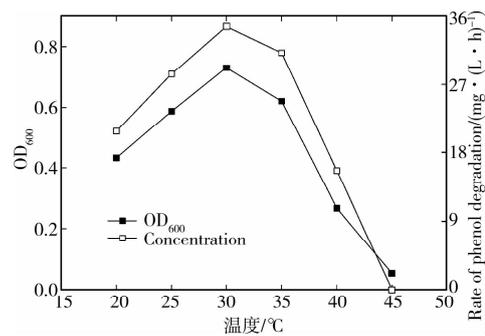


图 6 温度对 CN-6 菌株降解苯酚的影响

2.5 溶氧量

水中的溶解氧含量对 CN-6 降解苯酚速率的影响通过比较细菌在水浴摇床不同晃动速率下对 300 mg/L 的苯酚的降解时间得到。当晃动速率从 40 rpm 增加到 120 rpm,晃动速率与 CN-6 菌株的生物量(OD₆₀₀)和对苯酚的降解速率正相关,同时菌株可以稳定持续的生长(图 7)。

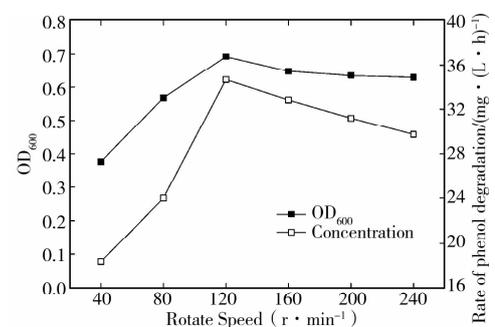


图 7 晃动速度对 CN-6 菌株降解苯酚的影响

这是因为 CN-6 是兼性好氧菌,溶解氧作为一项重要的电子受体,在微生物的生长中发挥着重要的生理作用^[14],摇床的晃动速率越快,质传效率就越高,使得培养基中的溶解氧含量增高。但是,当晃动速率持续增加,细胞浓度和降解速率则维持相对的稳定。因此,120 rpm 是细菌生长和降解苯酚的

最适条件。

2.6 细胞生长动力学

根据上述试验发现,菌株 CN-6 对苯酚的降解能力较高,随苯酚初始浓度的增加,苯酚的降解速率提高,但在实验中同时也发现高浓度的苯酚对降解产生了抑制作用。因此,在建立动力学模型时,需要选择底物抑制模型。已经有多种底物抑制模型被建立^[15-17],其中 Haldane's model 最为常见,用来描述细胞的比生长速率模式。Haldane's model 的定义如 1 式^[18]:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + (S^2/K_i)} \quad (1)$$

式中,比生长速率 μ (1/h) 和底物浓度 S (mg/L) 由实验数据得知,而最大比生长速率 μ_{\max} (1/h)、亲和性常数 K_s (mg/L)、抑制常数 K_i (mg/L) 则是未知的动力参数。其中, μ_{\max} 被视为降解能力的指标,数值愈大,代表降解速度愈快; K_s 值与菌种对底物的化学亲和力成反比,数值愈大,代表菌种与底物亲和力愈差; K_i 为抑制常数,数值愈大,代表菌种对基质耐受力愈好。由于 Haldane's model 为非线性的方程式,难以直接利用数值技术软件估算其动力学参数,故将原式整理为 2 式所示:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{\mu_{\max} K_i} S + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (2)$$

将实验数据代入整理后的 Haldane's model,利用 MATLAB 7.0 进行非线性回归计算,如图 8 所示。

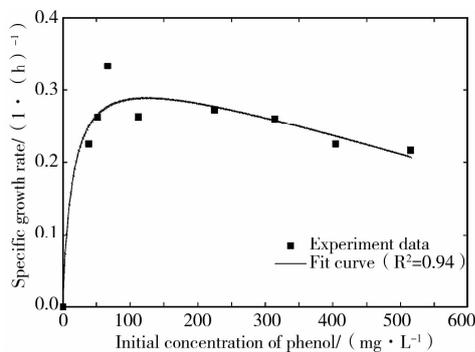


图 8 比生长速率的动力学拟合

得到模型参数 $\mu_{\max} = 0.452 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 28.617 \text{ mg/L}$; $K_i = 782.4 \text{ mg/L}$ 。曲线拟合的最小标准方差 R^2 值为 0.94。

从获得的模型参数值可知, CN-6 菌株的 μ_{\max} 、 K_s 值较大,因此菌株对苯酚的降解速率较快,但对苯酚的耐受性有待提高,蔡尚原等^[19-20]利用水杨酸预培养来活化细胞,大幅降低了细胞受酚抑制的影响,使细胞大幅提升对酚基质的抗性,可以获得更高

的抑制常数 K_i 。

4 结论

1) 从长期受苯酚污染的土壤中经富集培养,筛选分离到 1 株革兰氏染色阴性的细菌 CN-6,经形态观察、16S rDNA 序列测定和系统发育分析初步鉴定为 *Pseudomonas sp.*。

2) CN-6 能以苯酚为唯一碳源和能源生长,降解效率高,500 mg/L 的苯酚经过 17 h 培养可完全降解,在 300 mg/L 时,平均小时苯酚降解量达到 36.57 mg/L。

3) CN-6 生长和降解苯酚的 pH、温度和溶氧量范围较广,最适 pH、温度分别为 8.5 和 30℃;最适水浴摇床晃动速率为 120 rpm。

4) 由于高浓度苯酚时 CN-6 菌株的降解过程存在底物抑制现象,采用 Haldane 非竞争性底物抑制动力学模型,计算确定了模型参数 μ_{\max} 、 K_s 和 K_i 分别为 0.452 h^{-1} 、 28.617 mg/L 、 782.4 mg/L ,模型拟合度高,为后续生物反应器的设计和模拟提供了实验依据。

致谢:感谢重庆大学国际事务处提供的赴台研究便利。同时感谢台湾元智大学生物科技与工程研究所简志青教授、魏毓宏教授对该研究提出的宝贵意见和指导。

参考文献:

- [1] EL-NAAE M H, AL-MUHTAEB S A, MAKHLOUF S. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2009, 164: 720-725.
- [2] PAN G, Kurumada K I, Hybrid gel reinforced with coating layer for removal of phenol from aqueous solution [J]. *Chem. Eng.* 2008, 138: 194-199.
- [3] LEFEBVRE O, MOLETTA R, Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review [J]. *Water Res.*, 2006, 40: 3671-3682.
- [4] NAIR I C, Jayachandran K and Shashidhar S, Treatment of paper factory effluent using a phenol degrading *Alcaligenes sp.* under free and immobilized conditions [J]. *Bioresour. Technol.* 2007, 98: 714-716.
- [5] LAKSHMI C M V V, SRIDEVI V. A review on biodegradation of phenol from industrial effluents [J]. *Ind. Pollut. Contr.*, 2009, 25(1): 13-27.
- [6] NUHOGLU A, YALCIN B, Modelling of phenol removal in a batch reactor [J]. *Process Biochem.*, 2005, 40: 1233-1239.

- [7] AGARRY S E, DUROJAIYE A O, SOLOMON B O. Microbial degradation of phenols: A review [J]. Int. J. Environ. Pollut., 2008, 32 (1):12-28.
- [8] ALIMOVA A, ROBERTS M, et al. Effects of smectite clay on biofilm formation by microorganisms [J]. Biofilms, 2006, 3(1):47-54.
- [9] 龚斌, 刘津, 赵斌. 一株高效苯酚降解菌的分离、鉴定及其降解特性的研究[J]. 环境科学学报, 2006, 12 (26): 2008-2012.
GONG BIN, LIU JIN, ZHAN BIN. The isolation and identification of a phenol-degrading strain and study on its degrading characterization [J]. Acta Scientiarum Circumstantiae, 2006, 26(12):2008-2012.
- [10] HAMED T A, BAYRAKTAR E U, MEBMETOGLU T, et al. The biodegradation of benzene, toluene and phenol in a two-phase system [J]. Biochem. Eng., 2004, 19: 137-146.
- [11] JUANG R S, TSAI S Y, Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate [J]. Biochem. Eng., 2006, 31, 133-140.
- [12] 唐伟, 孙晓怡. pH 值对酚类化合物生物毒性的影响 [J]. 黑龙江环境通报, 2005, (01):45-48.
TANG WEI, SHUN XIAO-YI. Influence of pH value to biologic toxicity of phenol compound [J]. J. Heilj. Environ, 2005(01):45-48.
- [13] 于瑞莲, 胡恭任. 不同 pH 值下对发光菌的毒性及 QSAR 研究[J]. 环境科学与技术, 2005, (04):68-70.
YU RUI-LIAN, HU GONG-REN. Toxicity of phenols to photobacterium phosphoreum at different pH and QSAR[J]. Environ. Sci. & Technol, 2005(04):67-70.
- [14] KULKARNI M, CHAUDHARI A. Biodegradation of p-nitrophenol by *P. putida* [J]. Bioresour. Technol., 2006, 97:982-988.
- [15] YANO T, AKAHARE N T, KAMIYAMA S, et al. Kinetic studies on microbial activities in concentrated solutions. I. Effect of excess sugars on oxygen uptake rate of a cell-free respiratory system [J]. Agr Biol Chem, 1966, 30: 42-48.
- [16] ESSAM T, AMIN M A. Kinetics and metabolic versatility of highly tolerant phenol degrading *Alcaligenes* strain TW1 [J]. J. Hazard. Mater, 2010, 173:783-788.
- [17] ABIA S, SHODA M, NAGALANI M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation [J]. Biotechnol Bioeng, 1968, 10: 845- 864.
- [18] COHEN-BAZIRE G, W R SISTROM, R Y STANIER. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. [J]. Cell. Comp. Physiol., 1957, 49, 25-68.
- [19] CHUNG T P, TSENG H Y, JUANG R S. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems [J]. Process Biochem, 2003, 38 (10): 1497 - 1507.
- [20] KUMAR K, KUMAR S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194 [J]. Biochem. Eng., 2005, 22:151-159.

(编辑 胡玲)