

焦化废水处理厂接触氧化池中降酚菌群的 苯酚羟化酶大亚基基因多样性

张学礼, 熊顺子, 刘彬彬, 严 兴, 周志华, 王凌华, 赵立平*

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要:研究了某焦化废水处理厂接触氧化池中降酚菌群的苯酚羟化酶大亚基基因(the largest subunit of the multi-component phenol hydroxylase, LmPH)的多样性。通过温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)对比分析了氧化池 4 个区段(O1—O4)中降酚菌群 LmPH 的组成。它们的 TGGE 图谱完全一样,相似性为 100%,表明该处理池中不同区段的降酚菌群的功能基因组成是高度相似的。以 O4 段的菌群为代表建立 LmPH 基因克隆文库,从中挑选了 49 个克隆测序。依据 LmPH 基因的 DNA 序列所推测的氨基酸序列完全相同的归为一类的原则,49 个克隆被分为 16 种类型,其中优势 LmPH 基因主要有 5 种类型(多于 4 个克隆),而另外 11 种类型都只有 1 个克隆。与已知基因同源性超过 90%的有 7 种类型,低于 80%的有 2 种类型。基于氨基酸序列的系统进化树分析表明,LmPH 文库中绝大部分的类型都属于低亲和常数(low-Ks)的 LmPH,占有克隆的 92%。只有一个类型属于高亲和常数(high-Ks)的。因此,处理焦化废水的工业装置中不仅具有丰富多样的苯酚羟化酶基因类型,而且以编码低亲和常数的占优势地位,而过去报道的通过富集培养分离得到的降酚菌则多带有高亲和常数的酶。这提示我们传统的富集培养方法并不能筛选到生态环境中的真正优势功能菌。

关键词:苯酚羟化酶大亚基(LmPH)基因;TGGE;多样性;克隆文库;焦化废水

文章编号:1000-0933(2005)08-2025-06 中图分类号:Q938.1 文献标识码:A

Diversity analysis of the largest subunit of the multi-component phenol hydroxylase (LmPH) gene from the phenol degrading microbial communities of an aeration tank of a coking wastewater treatment plant

ZHANG Xue-Li, XIONG Shun-Zi, LIU Bin-Bin, YAN Xing, ZHOU Zhi-Hua, WANG Ling-Hua, ZHAO Li-Ping* (College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(8): 2025~2030.

Abstract:The diversity of the largest subunit of the multi-component phenol hydroxylase (LmPH) gene in four compartments of the aeration tank (O1-O4) of a coking wastewater treatment plant in Shanghai was analyzed via PCR-TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) analysis. TGGE fingerprints were identical in all four compartments, suggesting that the phenol-degrading microbial populations in the different compartments of the aeration tank were highly similar. A LmPH gene clone library from the fourth compartment (O4) was constructed and the nucleotide sequences of 49 randomly selected clones were determined. The 49 clones were classified into 16 groups (amino acid sequences with 100% similarity were defined as one group) based on the deduced amino acid sequences. Five predominant LmPH groups were identified, each of which had more than four clones. Each of the other 11 groups were represented by one clone. Seven LmPH groups had more than 90% similarity with their nearest LmPHs in the GenBank, while 2 groups had less than 80%. Phylogenetic analysis of the partial

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30240014)

收稿日期:2004-10-14;修订日期:2005-04-20

作者简介:张学礼(1981~),男,江苏靖江人,博士生,主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail: xlzhang@sjtu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: lpzhao@sjtu.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 30240014)

Received date: 2004-10-14; Accepted date: 2005-04-20

Biography: ZHANG Xue-Li, Ph.D. candidate, mainly engaged in microbial ecology. E-mail: xlzhang@sjtu.edu.cn

amino acid sequences of the LmPHs indicated that most of the clones in the library (92%) were affiliated with low-Ks (affinity constants) LmPH, while only one clone (L-SJ32) was affiliated with high-Ks LmPH. These results suggest that LmPH genes were very diverse in the coking wastewater and that the low-Ks LmPHs were the predominant type involved in phenol degradation. Since most of the previously isolated phenol-degrading bacteria had high-Ks LmPHs, this indicates that traditional enrichment culture methods may not have identified the key functional bacteria from this environment.

Key words: LmPH; TGGE; diversity; clone library; coking wastewater

焦化废水的排放量大,成分复杂,有毒有害难降解有机物含量高。若不处理直接排放,不但对环境造成很大的污染,还直接威胁到人类的健康。焦化废水处理工艺已有长期研究,利用微生物的生物降解法是主要方法^[1]。以前的研究绝大部分都集中在处理工艺的改善上,如采用 A²/O(厌氧-缺氧-好氧)法代替原来的活性污泥法从而能更好地去除 COD 和氨氮^[1~3]。但对废水处理中真正起作用的微生物的研究却比较少。只有少数工作用传统的分离培养方法对焦化废水处理系统中的微生物进行了研究^[4]。

越来越多的工作表明,能培养的微生物只占自然环境中的很少一部分,绝大部分微生物是用现有技术很难培养或不能培养的^[5]。为了克服这一困难,基于 16S rDNA 基因的各种分子生物学方法,如克隆文库,探针杂交,温度梯度凝胶电泳等指纹图谱分析技术,已被广泛用于微生物群落结构的研究^[5]。但由于很多微生物生态系统,如处理焦化废水的微生物菌群,特别复杂,含有很多微生物种群,因此基于 16S rDNA 基因分子生物学方法也有较大局限性。它们只能识别系统中的优势菌群,对于一些比例比较低但可能有重要功能的菌群却忽略了^[5]。为了解决这个问题,特异性地研究系统中起某种特定功能的功能菌群是很好的一个办法^[6]。

苯酚是焦化废水中主要的有毒有害物质之一^[3],对焦化废水中苯酚最有效的处理方法是生物降解^[7]。到目前为止,科学家们已经分离出了很多降酚菌,包括 *Pseudomonas*^[8~13], *Ralstonia*^[9,12,14], *Acinetobacter*^[15], *Comamonas*^[12,16], *Burkholderia*^[12], *Variovorax*^[9], 并详细研究了它们的苯酚降解途径及其基因调控机制。苯酚生物降解的第一步是在苯酚羟化酶催化下,将苯酚转变为儿茶酚。这是整个苯酚代谢途径的限速反应,决定了苯酚降解的动力学属性^[17]。自然环境中有单组分和多组分两种苯酚羟化酶,其中多组分苯酚羟化酶(mPH)是自然环境中的优势类型^[9,13,18]。编码多组分苯酚羟化酶大亚基的 DNA 片段(the largest subunit of multi-component phenol hydroxylase, LmPH)已被成功用作分子标记,来研究自然环境中的降酚菌的遗传和功能多样性^[13,19]。

上海某焦化厂(以下简称 SJ)废水处理工业装置系统采用 A²/O(厌氧-缺氧-好氧)接触氧化法对废水进行处理,其中苯酚好氧降解主要发生在接触氧化池。本文研究,把接触氧化池平均分成 4 段,先通过温度梯度凝胶电泳(TGGE)对比分析了不同区段生物膜样品中降酚菌群的 LmPH 的组成结构,然后对其中的一个区段(O4)菌群的 LmPH 基因构建克隆文库,通过对克隆的测序分析,详细地研究了其中 LmPH 基因的多样性。

1 材料和方法

1.1 样品

样品来自 SJ 废水处理工业装置系统(A²/O 法)的缺氧池和氧化池中的生物膜。其中氧化池从进水口到出水口被等距离分成 4 段(O1, O2, O3, O4)。

1.2 基因组总 DNA 提取

参考文献^[20],提取各废水处理池生物膜样品中菌群的基因组总 DNA。将 50 mg 样品放置在 Eppendorf 管中,加入 200 μ L 抽提缓冲液(100 mmol Tris, 100mmol EDTA, 200 mmol NaCl, 1% PVP, 2% CTAB, pH 8.0),用旋涡混合器击打 5 min 使样品充分混匀。加入 200 μ L SDS 缓冲液(100 mmol Tris, 200 mmol NaCl, 2% SDS, pH 8.0),轻微地上下颠倒几次,使细胞裂解。将 Eppendorf 管放置在冰上 10 min,然后在 4 C, 13,000 g 高速离心 10min。上清液经酚、氯仿-异戊醇抽提纯化后,加入 2 倍体积的乙醇,沉淀干燥。用 30 μ L TE 缓冲液溶解。

1.3 苯酚羟化酶大亚基(LmPH)基因扩增

使用 LmPH 基因通用引物 Phe149GC 和 Phe212^[13]从生物膜样品基因组总 DNA 中扩增 LmPH 基因用于 TGGE 分析。PCR 扩增体系和程序参考文献^[13,21]。PCR 扩增采用 Promega 公司的 Taq 聚合酶扩增体系。反应总体积为 50 μ L,其中 10 \times Buffer 5 μ L、MgCl₂ 3 μ L(25 mmol)、dNTP 4 μ L(25 mmol)、引物各 1 μ L (12.5 pmol/ μ L)、模板 DNA 10 ng、Taq 酶 0.25 μ L (5u/ μ L)。PCR 反应程序为 94 C 预变性 3min,30 个循环的 94 C 变性 1min、55 C 退火 1min、72 C 延伸 1min,最后 72 C 6min。

扩增产物再经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(denatured polyacrylamide gel electrophoresis, d-PAGE)纯化以消除第一次 PCR 过程中的单链 DNA 和杂合双链 DNA 污染^[22]。

1.4 LmPH 基因的 TGGE 分析

用 TGGE-Mini system (Biometra)对 LmPH 基因进行研究。TGGE 胶的配方为 8% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺(37.5 : 1), 8 M 尿素和 20% 甲酰胺。电泳采用 TAE 缓冲液系统, 电压 200V, 电泳时间 3h。温度梯度为 40~60 °C。

1.5 TGGE 指纹图谱的相似性比较

使用 Dice 相似性系数(Dice similarity coefficient, C_s)^[23]来比较 TGGE 指纹图谱之间的相似性。 $C_s = 2j / (a + b) \times 100$, 其中 a 是第 1 组 TGGE 指纹图谱的条带数目, b 是第 2 组 TGGE 指纹图谱的条带数目, j 是在两个图谱中共有的条带的数目。

1.6 LmPH 基因克隆文库分析

用不带 GC 夹子的 LmPH 基因通用引物^[13]从 O4 池生物膜样品基因组总 DNA 中扩增 LmPH 基因。扩增产物经 MO BIO 公司的 UltraClean™ 15 DNA Purification 试剂盒纯化, 连接到 pGEM-T easy 载体(Promega), 转化入大肠杆菌 DH5 α 。转化子涂布在含氨苄和 X-Gal/IPTG 的 LB 平板上。挑选白色克隆送至上海博雅公司测序。

1.7 LmPH 基因序列分析

通过 BlastX 分析从各克隆的 LmPH 基因 DNA 序列推测其氨基酸序列, 用 Clustal X 软件^[24]对所有推测的氨基酸序列进行 alignment 分析, 根据所推测氨基酸序列的异同, 研究 LmPH 基因的多样性。用 Clustal X 软件^[24]对所得的每种 LmPH 基因类型的氨基酸序列和 GenBank 数据库中已有的与其最相近的代表性降酚菌的 LmPH 基因氨基酸序列构建邻近树(neighbor-joining tree)^[25], 进行系统进化分析。Bootstrap 分析进化树枝点处的统计学可信度。

1.8 核酸序列登录号(Accession number)

本研究中发现的 LmPH 基因核酸序列在 GenBank 数据库中的登录号为 AY770085-AY770100。

2 结果

2.1 活性污泥基因组总 DNA 提取与 LmPH 基因扩增

按照实验室建立的方法, 从 4 个接触氧化池生物膜样品中均能很好地提取出基因组总 DNA, 片段均大于 20 Kb(图 1)。从 4 个接触氧化池生物膜样品基因组总 DNA 中均能很好地扩增出 LmPH 基因, 片段大小为 250 bp 左右(带 GC 夹子)。

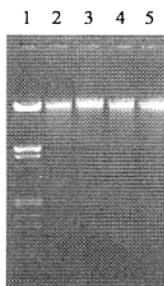


图 1 接触氧化池 4 个区段生物膜样品基因组总 DNA

Fig. 1 Total genomic DNA extracted from the biofilm samples of four compartments of the aeration tank

Lanes: 1, λ DNA Marker; 2, O1; 3, O2; 4, O3; 5, O4

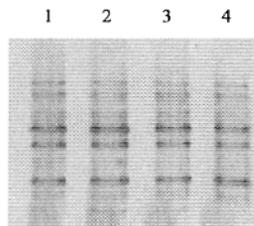


图 2 接触氧化池 4 个区段生物膜样品 LmPH 基因的 TGGE 指纹图谱分析

Fig. 2 TGGE analysis of the LmPH genes of the four compartments of the aeration tank

Lanes: 1, O1; 2, O2; 3, O3; 4, O4

2.2 LmPH 基因 TGGE 图谱分析

用 TGGE 对扩增的接触氧化池 4 个区段的 LmPH 基因多样性进行分析(图 2)。4 个样品的 TGGE 图谱均含有 3 条较强的主带和 6 条较弱的条带。用 Dice 相似性系数分析 4 个池的 LmPH 基因 TGGE 指纹图谱的相似性。四个氧化池区段样品的 LmPH 的 TGGE 图谱完全一样, 相似性为 100%。

2.3 LmPH 基因克隆文库分析

选取第 4 个区段(O4), 建立其 LmPH 基因克隆文库, 挑选了 49 个克隆测序。对这些克隆的推测氨基酸序列进行 alignment 分析, 如果按照氨基酸序列完全相同的归为一类, 可以将它们分为 16 类。其中优势的 LmPH 基因类型主要有 5 种, 分别有 14, 7, 7, 6 和 4 个克隆。其它 11 种类型均只有 1 个克隆(表 1)。

用 Blastx 软件对所有 LmPH 基因类型在氨基酸序列水平进行了同源序列分析, 找到了各自最相近的已知基因序列。用 Clustal X 软件对各类型的氨基酸序列和 GenBank 数据库中相应的最相近的代表性降酚菌的 LmPH 基因氨基酸序列进行聚类分析(图 3)。根据 LmPH 基因氨基酸序列的系统进化树, LmPH 基因主要有三大类(类型 I, II 和 III)。其中类型 I 和 II 的 LmPH 基因都属于低亲和常数的, 而类型 III 的 LmPH 基因属于高亲和常数。

表 1 O4 池 LmPH 基因克隆文库中各类型的代表序列分析

Table 1 Representative sequence analysis of the LmPH gene clone library of the O4 department

Lm PH 类型 Types	代表克隆 Clone	GenBank 登录号	克隆数目 Number of clone	最相似的 LmPH 基因 The best similar clone	相似性 Similar character(%)
1	L-SJ04	AY770085	14	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	92
2	L-SJ21	AY770090	7	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	88
3	L-SJ33	AY770093	7	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	94
4	L-SJ11	AY770088	6	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	88
5	L-SJ14	AY770089	4	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	97
6	L-SJ07	AY770086	1	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	91
7	L-SJ45	AY770095	1	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	92
8	L-SJ48	AY770096	1	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	89
9	L-SJ24	AY770091	1	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	86
10	L-SJ38	AY770094	1	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	86
11	L-SJ57	AY770098	1	<i>Burkholderia cepacia</i> (Tbc1D monooxygenase)	89
12	L-SJ51	AY770097	1	<i>Comamonas testosteroni</i> R5 (phcN)	88
13	L-SJ32	AY770092	1	<i>Pseudomonas</i> sp. strain CF600 (dmpN)	100
14	L-SJ09	AY770087	1	<i>Comamonas</i> sp. E6	78
15	L-SJ60	AY770099	1	<i>Pseudomonas putida</i> MT4	91
16	L-SJ62	AY770100	1	<i>Pseudomonas</i> sp. LAB-16	78

得到的 16 种 LmPH 类型中,有 12 个类型(45 个克隆)归为低亲和常数的 LmPH,它们和数据库中最相近的代表性降酚菌的序列相似性很高。其中 11 个类型(44 个克隆)和 *Burkholderia cepacia* 的 Tbc1D 单加氧酶亲源关系最近,相似性从 86% 到 97%;另一个类型(L-SJ51)和 *Comamonas testosteroni* R5 的 phcN 亲源关系最近,相似性为 88%。只有 1 个克隆(L-SJ32)属于高亲和常数的 LmPH,它和 *Pseudomonas* sp. strain CF600 的 dmpN 等的相似性为 100%。另外 3 个克隆 L-SJ09, L-SJ60, L-SJ62 和现有的 3 种主要 LmPH 类型亲缘关系都不是很近(图 3),其中的 2 个克隆(L-SJ09, L-SJ62)和数据库中已有的最相近序列的相似性低于 80%,可能是新的降酚基因类型。克隆文库中 92% 的克隆序列都属于低亲和常数的 LmPH 类型,这表明该类型是 SJ 焦化废水降酚菌群中的优势降解类型。

3 讨论

Watanabe 研究小组^[9,12,13,19]最先用多组分苯酚羟化酶大亚基(LmPH)基因来研究降酚菌的多样性。他们发现降酚菌的苯酚降解动力学属性主要有低亲和常数(high-Ks)和高亲和常数(high-Ks)两大类。根据 LmPH 的氨基酸序列构建的进化树也把它们分成与全细胞降解动力学特性相对应的两个主要类群。他们对处理原油精炼厂废水及生活污水的活性污泥的降酚动力学研究表明,它们的苯酚降解动力学属性是低亲和常数,这表明低亲和常数的苯酚羟化酶基因有可能是废水处理系统中的优势降酚基因^[12,13,19]。

已经研究了太原某焦化厂(以下简称 TJ)废水处理系统的活性污泥中的苯酚羟化酶基因组成^[21]。通过构建 LmPH 基因克隆文库,在已测序的 24 个克隆中发现了 3 种 LmPH 基因,其中 2 种基因(23 个克隆)属于低亲和常数的苯酚羟化酶基因,在该系统中占绝对优势(96%)^[21],高亲和常数的只有 1 个克隆。

SJ 废水处理系统采用 A²/O 法工业装置,有 1 个厌氧池,1 个缺氧池和 1 个长的氧化池(等距离分为 O1, O2, O3, O4),其中苯酚好氧降解主要发生在氧化池,因此选择氧化池的 4 个区段来研究其中的 LmPH 基因的多样性。TGGE 指纹图谱对比分析表明,各个区段的 LmPH 基因组成完全一样,这说明它们中的主要降酚菌群是比较稳定的。氧化池的 4 个区段是一个串联系统,生态环境和处理工况一样,所以降酚菌群的功能基因类型一样是可以理解的。

对比分析 SJ 和 TJ 的 LmPH 基因氨基酸序列^[21],发现它们中的优势 LmPH 基因亲源关系很近。L-SJ04 和 L-ASb 的氨基酸序列一样;L-SJ33, L-SJ14 和 L-ASb 的氨基酸序列有 1 个和 3 个残基差异;L-SJ11, L-SJ21 和 L-ASa 的氨基酸序列有 1 个和 2 个残基差异。两个系统中的优势 LmPH 基因都属于低亲和常数的 LmPH,且都和 *Burkholderia cepacia* 的 Tbc1D 单加氧酶亲源关系最近。这也进一步说明了低亲和常数的 LmPH 在焦化废水苯酚降解中的优势作用。研究中还发现 2 个 LmPH 类型和现有类型的 LmPH 亲缘关系都比较远,说明自然环境中还有很多 LmPH 基因类型,它的多样性可能远比现在了解的要丰富。

另外,对比分析了 SJ 和 TJ 废水处理工业装置中 LmPH 的多样性。在 TJ 中只发现 3 种 LmPH 基因类型,而在 SJ 中发现 16 种 LmPH 基因类型,远比前者要丰富。这可能是由于两个焦化废水处理系统的处理工艺不一样所致。TJ 采用的是传统的活性污泥法,焦化废水直接流入瀑气池中,冲击负荷大,各种有毒有害物质对降酚菌群的毒性较大。很多降酚菌的生长代谢因此受到抑制,所以降酚菌群的多样性就比较低。SJ 采用的 A²/O 法对焦化废水的处理分厌氧酸化,缺氧和好氧三步^[2,3]。由于厌氧酸化

可以把废水中部分大分子,难降解有毒有害物质转化为小分子及易被好氧微生物降解的有机物^[3],这就降低了有毒有害物质的浓度,对降酚菌群的毒性可能也就大大降低了。所以 SJ 中降酚菌群的多样性就比较高。

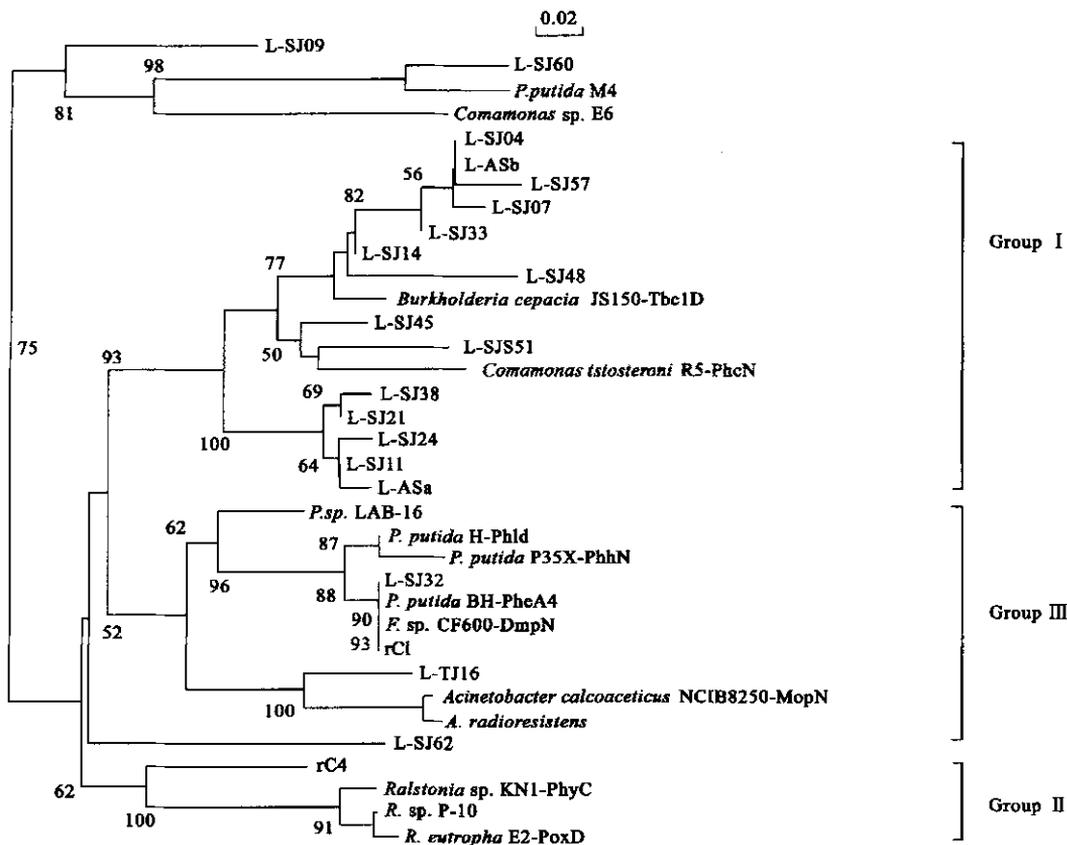


图 3 LmPH 基因氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 3 Unrooted neighbor-joining tree based on the partial amino acid sequences of our identified LmPHs in this paper and previous identified representative LmPHs retrieved from GenBank

进化树由本研究中所得到 LmPHs 的氨基酸序列和 GenBank 中的已经鉴定的有代表性的 LmPHs 的氨基酸序列构建。大于 50 的 Bootstrap 值标于进化树的分支处。图中的 bar 代表 2% 的序列差异 Numbers at the branch nodes are bootstrap values (per 100 trials); only values greater than 50 are indicated; The bar represents 0.02 substitution per amino acid site

以前对降酚菌的分离主要是以高浓度苯酚为唯一碳源通过批式富集培养得到的,因此绝大部分都是带高亲和常数的苯酚羟化酶^[8,10~13,19]。采用苯酚降解的特异性功能基因(LmPH)对两个焦化废水处理系统的降酚菌群的研究表明,低亲和常数的苯酚羟化酶才是在工业焦化废水苯酚降解中起主要作用的。这提示人们用传统的富集培养方法去筛选生态环境中的功能菌并不能得到系统中的真正优势功能菌。为了克服这一困难,一方面需要用基于功能基因的分子生物学方法对生态系统进行解析,从而鉴定出系统中的真正优势功能菌。另一方面,需要在分子方法的监测和指导下,结合多种分离方法才有可能从环境中分离出这些优势功能菌。

References:

[1] Wang Y Y, Yuan Y X, Tian R S. Advances in the research on coke plant wastewater treatment. *Industrial Water Treatment*, 2002, 22 (7): 1~5.

[2] Shao L G, Chen B, Huang X, et al. Study on the acid hydrolysis-anaerobic-aerobic fixed biofilm system for the treatment of wastewater from coking plant. *Chin. J. Environ. Sci.*, 1994, 15(6): 51~53.

[3] Li Y M, Peng Y Z, Gu G W, et al. Degradation of organic compounds in coal coking wastewater treated by the A1-A2-O biofilm system. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(2): 242~248.

[4] Chen Y L, Zhang F J. Analysis of Bacteria Group at the Denitrified Stage on Coking Wastewater Bionitrification Process. *Shanghai. Environ. Sci.*, 1997, 16(2): 15~18.

- [5] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**(1): 143~169.
- [6] Junca H, Pieper DH. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environ. Microbiol.*, 2004, **6**(2): 95~110.
- [7] Shingler V. Molecular and regulatory check points in phenol degradation by *Pseudomonas* sp. In: T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas, and S. Silver eds. *Molecular biology of pseudomonads*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1996. CF600, p. 153~164.
- [8] Frey J, Bagdasarian M, Feiss D, *et al.* Stable cosmid vectors that enable the introduction of cloned fragments into a wide range of gram-negative bacteria. *Gene.*, 1983, **24** (2-3): 299~308.
- [9] Futamata H, Harayama S, Watanabe K. Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(10): 4671~4677.
- [10] Hashimoto S, Fujita M. Identification of three phenol-degrading microorganisms isolated from activated sludges and their characteristics. *J. Jpn. Sewage Works*, 1987, **9**: 655~660.
- [11] Hopper D J, Chapman P J, Dagley S. Metabolism of L-malate and D-malate by a species of *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 1970, **104**: 1197~1202.
- [12] Watanabe K, Hino S, Onodera K, *et al.* Diversity in kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity. *J. Ferment. Bioeng.*, 1996, **81**: 560~563.
- [13] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, *et al.* Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**(11): 4396~4402.
- [14] Nakamura K, Ishida H, Iizumi T. Constitutive trichloroethylene degradation led by tac promoter chromosomally integrated upstream of phenol hydroxylase genes of *Ralstonia* sp. KN1 and its nucleotide sequence analysis. *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, **89**: 47~54.
- [15] 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.
- [16] 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**: 2895~2903.
- [17] Hino S, Watanabe K, Takahashi N. Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. *Microbiology*, 1998, **144**: 1765~1772.
- [18] Peters M, Heinaru E, Talpsep E, *et al.* Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(12): 4899~4906.
- [19] Watanabe K, Futamata H, Harayama S. Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, **81**(1-4): 655~663.
- [20] Gao P P, Zhao L P. DNA extraction from activated sludge for microbial ecological analysis. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, **22** (11) : 2015~2019.
- [21] Zhang X L, Gao P P, Chao Q F, *et al.* Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp. from an activated sludge system. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, **237**(2): 369~375.
- [22] Zhang X L, Yan X, Gao P P, *et al.* Optimized sequence retrieval from single bands of TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J. Microbiol. Methods*, 2005, **60**(1): 1~11.
- [23] Dice L R. Measures of the amount of ecological association between species. *J. Ecol.*, 1945, **26**: 297~302.
- [24] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**(22): 4673~4680.
- [25] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method; a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, **4**(4): 406~425.

参考文献:

- [1] 王业耀, 袁彦肖, 田仁生. 焦化废水处理技术研究进展. *工业水处理*, 2002, **22**(7): 1~5.
- [2] 邵林广, 陈斌, 黄霞, 等. 水解(酸化)-缺氧-好氧固定床生物膜系统处理焦化废水的试验研究. *环境科学*, 1994, **15**(6): 51~53.
- [3] 李咏梅, 彭永臻, 顾国维, 等. 焦化废水中有机物在 A1-A2-O 生物膜系统中的降解机理研究. *环境科学学报*, 2004, **24**(2): 242~248.
- [4] 陈艳丽, 章非娟. 焦化废水生物脱氮工艺反硝化段菌相分析. *上海环境科学*, 1997, **16**(2): 15~18.
- [20] 高平平, 赵立平. 可用于微生物群落分子生态学研究的活性污泥总 DNA 提取方法的研究. *生态学报*, 2002, **22**(11): 2015~2020.