

不同富集和分离培养条件下的含酚废水处理 生物膜微生物群落结构与活性比较分析

岳思青 徐廷婷 侯瑞青 张晓君* 赵立平

(上海交通大学生命科学技术学院 教育部微生物代谢重点实验室 上海 200240)

摘要: 采用 Biolog 和变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术研究了不同苯酚浓度培养对焦化废水处理厂反硝化池生物膜样品中微生物群落结构和代谢类型的影响。DGGE 结果表明,不同浓度苯酚和不同培养方式富集培养后,细菌 16S rDNA 的部分条带分布谱形发生改变,还有部分条带只受到了苯酚浓度变化的影响;富集培养过程中由于碳源组成相对焦化废水简单, DGGE 条带所代表的优势微生物多样性有所降低。Biolog 试验结果表明,生物膜样本的细菌群落代谢能力最强;低浓度苯酚富集后的样品能利用的底物碳源类型最丰富。对 Biolog 试验结果的主成分分析显示,相同浓度苯酚富集培养后的细菌群落代谢功能多样性相似,但从 DGGE 结果看出其结构组成产生了变化。富集培养使样品微生物群落的代谢功能发生改变,低浓度的苯酚富集增加了群落中微生物的代谢类型。而不同条件获得的分离物其苯酚降解能力的初步分析也表明,富集与分离条件对苯酚降解菌的分离能力和得到的菌株特性具有差别。

关键词: 苯酚, 细菌, 变性梯度凝胶电泳, 富集培养

Comparative Analysis of Community Structure and Activity of Wastewater Treatment Biofilm Cultivated Under Different Conditions

YUE Si-Qing XU Ting-Ting HOU Rui-Qing ZHANG Xiao-Jun* ZHAO Li-Ping

(Key Laboratory of Microbial Metabolism, Ministry of Education, College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The effect of phenol concentration on the structure and function of microbial communities, which were cultured in different conditions using coking wastewater biofilm as seeding, was investigated by Biolog and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) methods. The less number of bands of cultivated samples on the denaturing gradient gel electrophoresis fingerprint of 16S rRNA gene indicated reduction of diversity after enrichment and cultivation. Some bands on the DGGE gel were significantly influenced by the phenol concentration in medium. The results of Biolog showed that the original biofilm sample had the

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20677041); 863 计划重点项目(No. 2007AA021301); 上海市国际合作项目(No. 05SR07107); 上海市重点学科建设项目资助(No. B203); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

* 通讯作者: Tel: 86-21-34204878; 信箱: xjzhangsjtu@gmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期: 2008-10-02; 接受日期: 2009-02-06

highest substrate utility capacity as measured by average well color development (AWCD). But low concentration of phenol enriched sample S7 showed more diverse activity on the utility of Carboxylic acids. The principal component analysis (PCA) of Biolog data revealed that the metabolic patterns were similar when using the same phenol concentration, although the sample S7 much less similar to other cultivated samples. These results suggested that the enrichment and cultivation with phenol supplemented decreased the diversity and also changed the metabolic function of the microbial community. Lower phenol concentration increased the microbial community metabolic activity. The phenol degrading capacity of isolates from each samples indicated that the enrichment and cultivation condition had changed the type and property of culturable bacteria. Based on these results, we concluded that the different microorganisms will be isolated under different cultivation condition.

Keywords: Phenol, Bacteria, Denaturing gradient gel electrophoresis, Enrichment and cultivation

焦化废水的组成非常复杂, 苯酚是其中一种主要的污染物^[1]。在处理焦化废水的工艺中, A1-A2-O的处理效果较为理想的, 而废水中的有机物如苯酚大部分是在缺氧段(A2池)去除的^[2], 所以研究A2池的微生物群落结构组成和主要污染物苯酚的关系, 对去除焦化废水中的污染物有着重要的意义。

苯酚降解菌的分离是研究微生物降解苯酚的过程和功能基因的重要方法之一, 主要的分离手段是富集培养。而富集培养往往是采用较高浓度的苯酚为碳源, 此时, 生长速率最高的少数种群占优势^[3]。从过去对苯酚降解菌的分离情况来看, 沈齐英等^[4]用高浓度苯酚(500 mg/L、1000 mg/L、1500 mg/L、2000 mg/L)作为唯一碳源富集培养的方法从炼油污水中分离到3株降解高浓度苯酚的降酚菌株, 均为*Pseudomonas*属细菌。Muralikrishnan等^[5]从废水中分离到*Pseudomonas cepacia*和*Bacillus brevis*, 能够降解2500 mg/L的苯酚。高平等^[6]采用原废水作为培养基对焦化废水进行降酚菌分离, 得到与*Alcaligenes faecalis*、*Arthrobacter nicotianae*、*Ochrobactrum* sp.具有较高同源性的菌株。Watanabe^[7]等的研究发现, 以高浓度(500 mg/L)的苯酚富集培养的菌株表现出的苯酚氧化活性呈高亲和常数(high-Ks), 而通过连续恒化富集培养的菌株表现出的苯酚氧化活性呈低亲和常数(low-Ks), 后者是在自然环境的苯酚降解中起主要作用的类型。为此, 熊顺子等^[8]采用YPG、10%YPG和LB三种无苯酚的培养基进行苯酚降解菌的分离, 结果获得更多样的降酚菌株。然而, 目前尚未有研究比较不同苯酚浓度对于培养过程中微生物群落组成的影响。本研究采用不同浓度的苯酚分别培养A2池的微生物, 用PCR-DGGE和Biolog研究苯

酚浓度对群落结构及代谢类型的影响, 以了解不同的分离策略对培养的微生物类型的影响, 为采用合理的分离策略提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料来源

生物膜样品取自上海焦化厂污水处理系统A2池(缺氧处理池)。该污水处理厂采用A1-A2-O法工艺处理含酚废水, 其中A2池的生物膜为降解有机物的主体。PCR试剂购自TaKaRa公司。

1.2 培养基:

富集用培养基(1 L): KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaAc 15 mmol, 酒石酸钾钠 15 mmol, 灭菌(1 × 10⁵ Pa灭菌 20 min)后每升中加入0.3 g苯酚(HDPL培养基)或者0.03 g苯酚(LDPL培养基)。分离培养基中灭菌前每升加入15 g琼脂粉, 按苯酚浓度分为HDPS(0.3 g/L苯酚)和LDPS(0.03 g/L苯酚)培养基。

1.3 富集培养

富集培养途径如图1所示, 取10 mL A2池生物膜样本分别接种于8 mL HDPL和LDPL液体培养基, 28°C静置培养3 d, 然后转接于相同的新鲜培养基中28°C培养2 d。吸取富集物分别稀释涂于HDPS和LDPS固体平板上, 菌落直径多数达到1 mm~2 mm后, 用5 mL无菌生理盐水洗涤平板, 收集菌体。回收菌液分装在灭菌的Eppendorf管中(含有20%甘油)保存于-70°C冰箱。

1.4 总DNA的提取

细菌培养物总DNA的提取参照文献[9], 从生物膜样品中提取总DNA参照文献[10]。

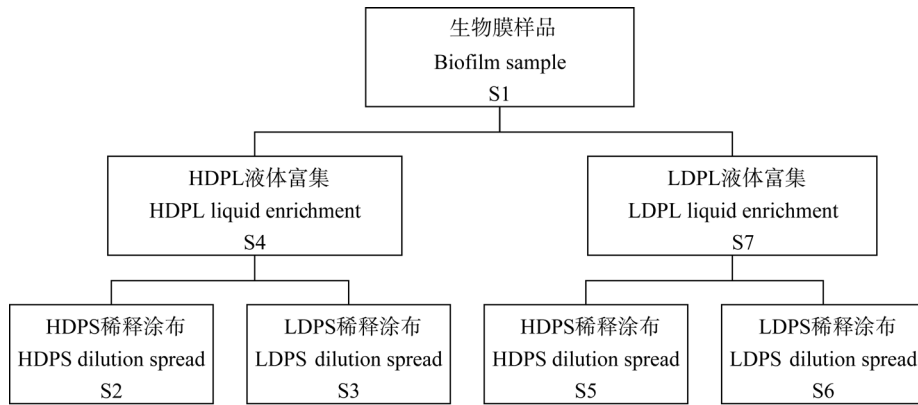


图1 富集分离途径及相应的微生物群落

Fig. 1 Enrichment and isolation strategy

Note: S1~S7: Microbial community name.

1.5 样品 16S rRNA 基因 V3 区 PCR 扩增

16S rRNA 基因 V3 区 PCR 引物设计和反应条件参照文献[11]: P2(534r): 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'和 P3(341f): 5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 25 μ L 的反应体系中含有 0.2 mmol/L dNTPs, 1 \times Buffer, 2 mmol/L MgCl₂ 和 0.75 U *Taq* 酶(TaKaRa)。引物 P2 和 P3 均为 12.5 pmol, DNA 模板量 10 ng。PCR 反应在 MiniCycler™ (MJ Research Inc) 上进行, PCR 引物由生工(上海)有限公司合成。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, GDS8000 凝胶成像系统(Ultra-Violet Product Ltd) 照像、记录分析结果。

1.6 PCR 产物的 DGGE 分析

参照 Mulyer 等[11] 方法, 对 16S rRNA 的 V3 可变区的扩增产物进行 DGGE 分析。DGGE 使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 27%~55% 变性梯度。电泳采用 DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 200 V 电泳 4 h。电泳所使用的缓冲液是 1 \times Tris-Acetate-EDTA (TAE, pH 8.4)。电泳胶以 SYBR Green I (Amresco 公司) 染色 45 min, GDS8000 凝胶成像系统(Ultra-Violet Product Ltd) 照像。

1.7 菌群活性的 Biolog 微平板测定

保存的待测样品进行适当稀释后, 取 150 μ L 的稀释样品加到 Biolog GN 微平板孔中, 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 期间每隔 24 h 用酶标仪测定 570 nm 波长吸光度。

1.8 Biolog 微平板数据分析

95 个孔吸光度的平均值(average well color de-

velopment, AWCD) 的计算公式为:

$$AWCD = [\sum(C_i - R)]/95$$

其中 C_i 是除对照孔外各孔吸光度值, R 是对照孔吸光度值。反应孔与对照孔的吸光度差值如果为负, 则认为呈阴性反应且数值计为 0。阳性反应指的是, 反应孔中的底物被利用而发生显色反应, 吸光度大于 0.1 的认为是阳性反应。底物利用丰度值则由每个微平板中呈阳性反应的孔数来计算[12]。

1.9 分光光度法测定苯酚降解情况

利用苯酚在 270 nm 处具有特异吸收峰的特性[13], 采用紫外分光光度法测定培养基中苯酚的降解。选择各种条件下分离获得的菌株, 在含 0.03 g/L 苯酚的无机盐培养基中培养 4 d 后, 菌液 10000 \times g 离心 10 min 后, 取上清于 270 nm 处测光吸收值, 以未接菌的培养基为空白对照。

2 结果和分析

2.1 生物膜样品经不同条件培养后菌群结构的比较

图 2 可以看出, S1 即 A2 池生物膜样的条带最多, 说明它的生物多样性也是最高的, 这是因为焦化废水碳源组成复杂, 所以微生物种类较多, 可以看出条带 a 在 S1 中最亮, 说明这类菌在 A2 生物膜样品中占优势, 但是经过培养后, 条带 a 变淡, 说明经过培养后群落结构出现变化, 优势菌发生改变。经过不同培养方法培养后, 样品泳道中出现一条共同的亮带 g, 并且不受苯酚浓度变化的影响, 说明该类菌对于苯酚有较强的适应能力, 从该图中也能看到高浓度苯酚液体培养物(S4)和低浓度苯酚液体

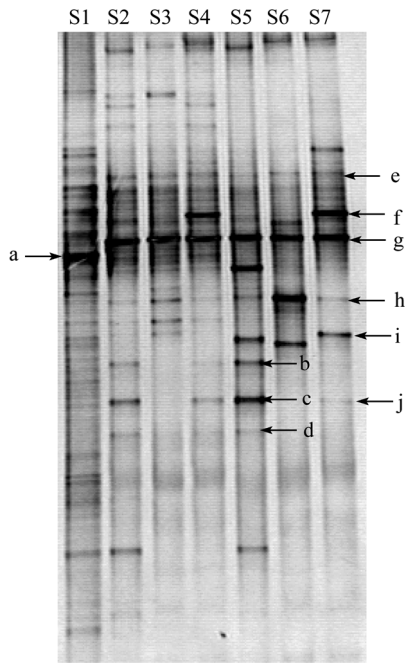


图2 生物膜在不同条件下培养后 PCR-DGGE 电泳图
Fig. 2 PCR-DGGE analysis of biofilm cultured in different condition

Note: The sample of lane S1 was biofilm from A2 reactor; S2-S7 were S1 cultured in different conditions as shown in Fig.1.

培养物(S7)之间两者有很多相同的条带:如条带 e、f、g、h、i、j。但两者之间仍有不少差异,例如低浓度苯酚培养物中条带 i 的亮度大大高于高浓度苯酚培养的样品的相应条带,说明这一条带代表的菌在低浓度苯酚培养物中丰度更高。在液体培养中均占优势的条带 f 在平板培养的样品 S2、S3、S5、S6 中变淡甚至消失了。从图 2 中还可看出苯酚浓度对于群落结构的影响,条带 b、c 和 d 在高浓度苯酚浓度的培养物(S2、S4、S5)中较亮,这些菌可能能够在较高浓度苯酚的条件下迅速生长。

2.2 生物膜样品经不同条件培养后菌群活性的比较

微生物的平均活性常用 Biolog 板单孔颜色平均变化(AWCD)表示(如图 3)。

由图 3 可以看出,AWCD 值随着接种时间延长而增大,在整个培养过程中 S6 最低, S1 即 A2 生物膜样的 AWCD 值增加的速度和达到的程度高于其他样品,这种差异在培养 48 h 后尤为明显。Garland^[14]等认为微生物群落 ELISA 反应(以 AWCD 值表示)速度和最终能达到的程度与群落内能利用单一碳底物的微生物数目和种类相关。AWCD 值的大小代表了不同方法富集培养后得到的细菌对底物

碳源利用能力上的差异,可以看出,经过低浓度苯酚与高浓度苯酚的富集培养后,群落细菌对 Biolog 微孔板上碳源的利用能力发生了改变。原始 A2 生物膜样品具有最强的碳源利用能力,而低浓度苯酚富集培养得到的细菌(S7, S2)相对高浓度苯酚富集培养得到的细菌来说,具有较强的底物碳源利用能力。

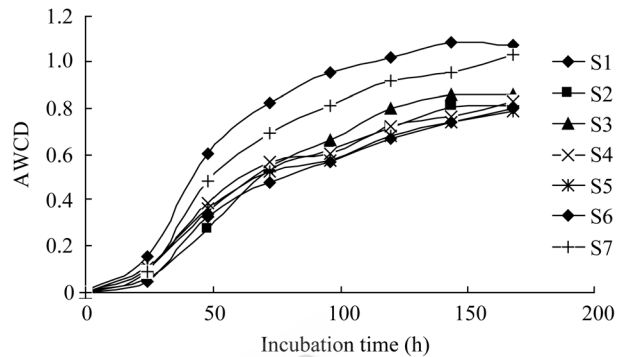


图3 Biolog 板 AWCD 值随时间的变化
Fig. 3 Bacterial activity change during the incubation on Biolog plate

从图 4 不同类型的碳源的利用情况来看, S1 对胺-酰胺类高聚物,氨基酸类及碳水化合物类的碳源利用量高于其培养物。在胺-酰胺类高聚物利用方面,除了 S1 生物膜样品以外,各个培养物的利用情况较为相似,均低于 S1 且相互之间差别不大。但 S7 对羧酸类碳源的利用能力增强,说明 S7 的菌群发生了不同于其他培养物的代谢类型变化。经过不同条件的培养后,菌群对不同类型碳源各有不同的反应,如 S3 在培养 7 d 后对碳水化合物仍只有平均 0.8 左右的光密度值,相对 S1、S2、S7 有 1.0 以上的光密度值来说利用量较少,但在羧酸类碳源方面, S2、S4、S5、S6 培养 7 d 后只有 0.6~0.8 的光密度值, S3 则有 0.9 左右的光密度值。这都说明在不同浓度的苯酚培养条件下,菌群结构的变化导致代谢类型发生了改变。

对 Biolog 板单孔颜色变化值,进行 PCA 分析(图 5)。结果显示, PC1 将各个样品的第 1 天与其他的时间点区分开来,说明开始阶段菌群没有差异,第 3 天后,各个样品的碳源利用情况及代谢情况发生了不同的变化。经过 7 d 的培养,各个孔内的碳源利用情况发生了显著变化^[15]。由图 5 可以看出, A2 池的生物膜样品 S1 培养第 3 天后和其他富集培养物明显区分开来,说明生物膜样品中微生物代谢类型,

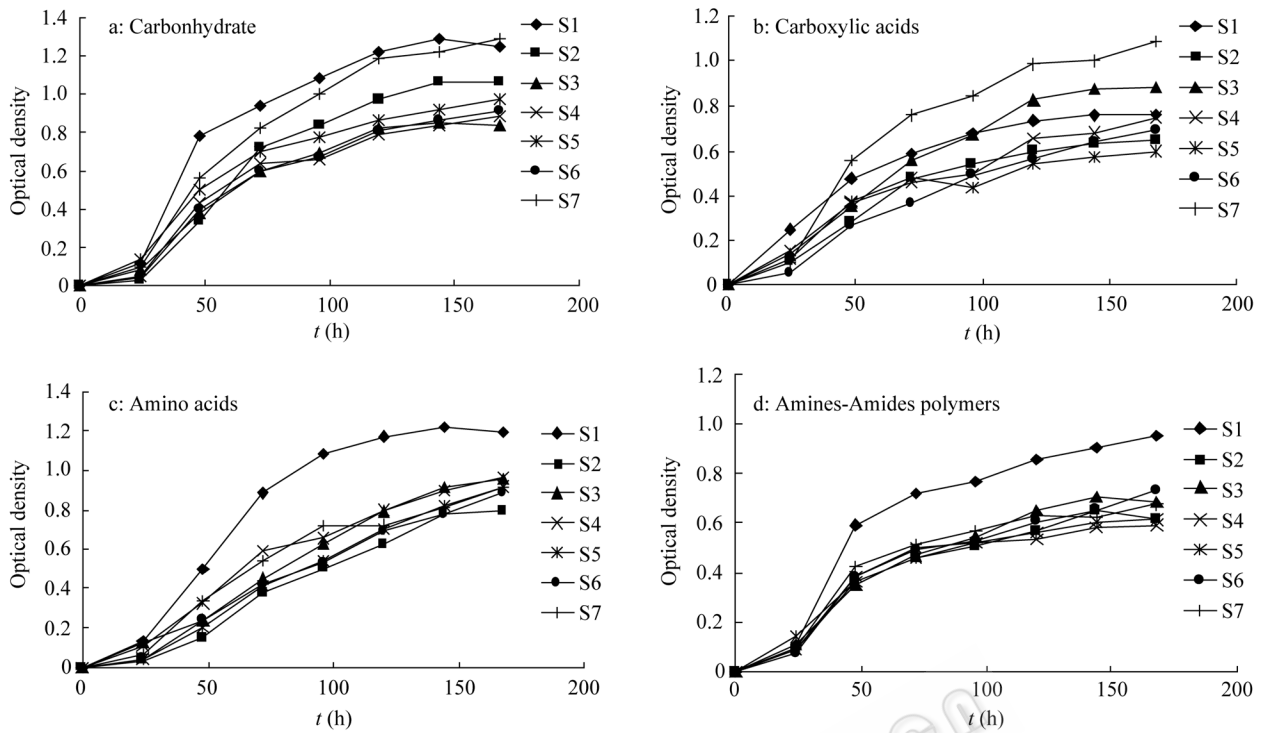


图 4 对不同碳源的利用情况
Fig. 4 Utilization of different carbon sources

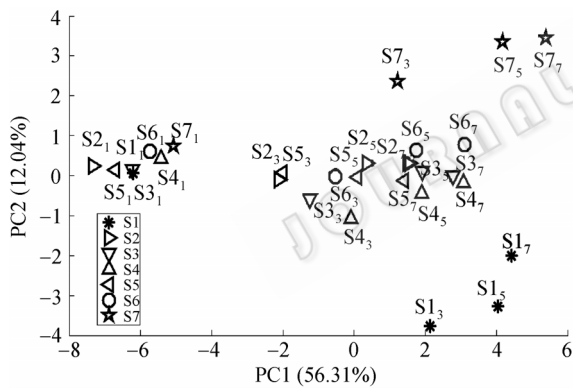


图 5 不同培养物的主成分分析(PCA)
Fig. 5 Principal component analysis (PCA) of Biolog GN data from different samples
Note: Sample name were assigned as SN_x, SN (S1~S7 as shown in Fig.1), x (biolog incubation time)

对不同碳源利用情况在经过富集培养后发生了明显的变化。从第 3 天到第 7 天的情况看来, PC2 将 S1、S7 与其它样品在不同的方向区分开来, 说明在不同浓度的苯酚影响下, 微生物的群落结构及其功能发生了一些改变, 从而对碳源的利用发生了变化。

2.3 分离菌株苯酚降解情况分析

空白对照的吸光值为 0.493, 共测定了 847 株分离物在苯酚培养基培养后的 270 nm 吸光值。在选取

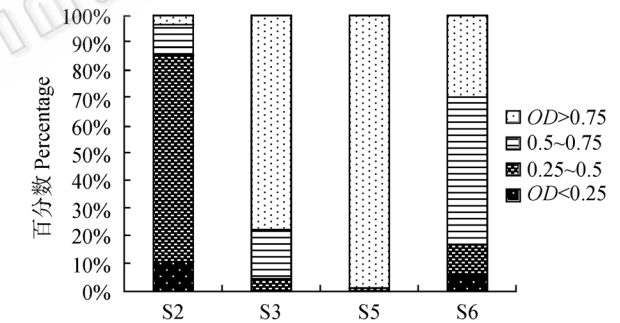


图 6 不同样本的分离物培养后吸光值(270 nm)分布
Fig. 6 The optical density (270 nm) distribution of isolates after cultured in medium containing phenol

的 847 株分离物中, 275 株来自 S2, 245 株来自 S3, 而 S5 和 S6 各选取了 140 株和 187 株, 不同样本得到的分离物吸光值分布如图 6。

由于苯酚在 270 nm 处有吸收峰, 所测的 270 nm 处的吸光值能部分代表苯酚的降解情况。很多菌株培养后吸光值升高, 推测是较多中间代谢产物积累造成。从图 6 可以看出, 不同富集培养方法影响了所分离细菌的类型。高浓度苯酚富集后再在高浓度苯酚培养基上分离(S2), 对降解苯酚的细菌有较强的选择作用, 抑制了其他不耐高浓度苯酚的细菌, 所以得到的分离物大部分能完全降解苯酚。

而高浓度苯酚富集后以低浓度苯酚分离(S3)获得的菌株中可完全分解苯酚的菌株较少, 很多不耐高浓度苯酚的菌株得到分离。低浓度富集后再以高浓度苯酚培养基分离时(S5), 几乎没有可完全降解苯酚的菌株, 而以低浓度苯酚培养基分离(S6)获得较多完全降解苯酚的菌株。S6 分离获得的完全分解苯酚的菌株应该是不耐受高浓度苯酚的, 因为在 S5 中未分离到此类菌株。

3 讨论

在微生物降解的过程中, 微生物的活性与群落结构多样性是微生物生态学研究的重点。苯酚作为一种常见的污染物, 尤其是焦化废水中主要的有毒有害物质之一, 它的微生物降解一直是大家关注的焦点。在苯酚降解菌的研究中, 过往的研究从多种环境中, 用各种培养条件分离出了种类繁多的苯酚降解菌^[16-18], 通过分析他们的降酚动力学常数发现这些降解菌存在较大差异^[7], 根据它们的降酚动力学常数, 可以把这些苯酚降解菌分为两大类: 高亲和常数和低亲和常数, 进一步分析时发现, 高亲和常数的降酚菌一般属于 *gamma* 变形菌纲, 在高浓度苯酚(大于 500 mg/L)生长较快, 但并不是原始群落中的主要降酚菌, 低亲和常数的降酚菌可能才是环境中降解苯酚的主力军, 而 Zhang 等人分离到一批系统进化地位很相似的苯酚降解菌(16S rRNA 基因的相似性大于 99.47%), 并发现它们的苯酚降解能力和苯酚羟化酶基因也有很大的多样性, 这加深了我们对苯酚降解菌多样性的理解, 说明苯酚降解菌中存在微多样性^[19]。

用稀释涂布平板分离的方法, 培养基的营养组成和温度等培养条件对于分离物的数量和多样性存在很大影响。Uphoff 等^[20]采用不同的碳源组成的培养基对海水中的微生物进行分离培养, 发现丰富培养基培养出来的多是 *gamma* 变形菌纲的细菌, 多种碳源复合而成的培养基能培养出多样性较高的微生物, 但是对于同种碳源在不同浓度下对于菌群结构的影响还没有进行研究。在实际处理工业废水的过程中, 污染物的浓度会随时间的变化而不同。本研究的目的在于探讨不同浓度的同种污染物对于群落结构的影响。也就是说如果采用不同浓度的苯酚进行富集分离, 可能得到不同亲和常数占优势的菌群。本研究从采用不同浓度苯酚对生物膜进行富集

出发, 用 PCR-DGGE 揭示了不同浓度苯酚和培养方式的差别对微生物群落结构的影响, 用不同浓度苯酚富集培养后, 生物膜样本中的一些条带出现缺失, 这是由于碳源组成相对焦化废水简单, 说明碳源组成多样性的降低导致了菌群结构组成多样性的降低。而随苯酚浓度和培养方式不同, 细菌 16S rDNA 的部分条带分布和亮度发生改变, 说明这些细菌类群在不同浓度的苯酚和培养方式影响下发生了改变, 如图 2 条带 a 的变化, 虽然在生物膜中占有优势, 但是由于培养过程中使用相对单一的碳源, 在之后的培养中逐渐失去在菌群中的优势地位, 而条带 g 则占据了优势。条带 b、c、d 在相对苯酚浓度较高的情况下丰度较高, 说明虽然碳源种类, 培养条件相同, 但是浓度不同的碳源仍然会对菌群有所影响。而条带 f 只出现在液体培养方式中, 说明液体和固体培养方式也会带来菌群结构的差异, 在固体培养基培养的过程中, 某些在液体培养中占优势的细菌因不适宜的环境而不再具有优势。

虽然 PCR-DGGE/TGGE 技术能够反映包括非培养细菌的菌群结构情况, 但是微生物群落的生态功能是由微生物的群落结构和活性共同决定的, 而 DGGE 只能反映菌群组成情况, 但是微生物群落的信息不能单从序列上得到。Biolog 微平板技术起初被用于异养细菌的分类鉴定^[21], 1991 年 Garland 和 Mills^[14]开始将该技术用于微生物群落变化的研究后, 拓宽了它的应用范围。在近年的研究中, Biolog 多用于评价土壤微生物的群落水平底物利用情况^[22]。在 Widmer 等的研究中, 采用了 RFLP、PLFA、Biolog 同时比较分析了土壤微生物的群落特征, 结果显示 3 种方法均能区分不同的土壤微生物群落, 但 Biolog 的聚类分析结果与其余 2 种方法的结果有所不同, 作者认为, Biolog 的结果与微生物群落的种类组成关系不大, 主要显示群落中可培养部分细菌的功能^[23]。在本研究中, 用相同苯酚富集培养的样本具有更高的相似性, 虽然生物膜样本总体来说有较强的碳源利用能力, 但是低浓度苯酚液体富集使得羧酸类碳源利用能力增强, 虽然 DGGE 的结果显示, 富集培养降低了生物膜中样本的微生物组成多样性, 但是这可能与 2 种方法表征微生物群落特征方面不一致有关, Biolog 代表的是群落的部分代谢活性^[12], 而 DGGE 代表了群落中细菌的种类组成信息, 即生物多样性^[11]。Biolog 的实验结果说明, 不同浓度的

苯酚的培养改变了微生物群落的代谢活性。而分离菌株的苯酚降解测定说明不同的富集分离方法获得的菌株的特性差异较大。由此说明,采用不同浓度的苯酚进行富集和分离,可以分离到不同类型的降解菌株,通过对这些不同菌株的进一步筛选,最后获得可以在环境中真正起降解苯酚作用的菌株。

参 考 文 献

- [1] 何 苗. 焦化废水中芳香族有机物及杂环化合物在活性污泥法处理中的去除特性. *中国给水排水*, 1997, **13**: 14-17.
- [2] 仇雁翎, 赵建夫, 李咏梅. 焦化废水中有机物在 A1-A2-O 系统各段的降解与转化. *上海环境科学*, 2002, **21**: 216-219.
- [3] Dunbar J, White S, Forney L. Genetic diversity through the looking glass: Effect of enrichment bias. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(4): 1326-1331.
- [4] 沈齐英, 刘 录, 申林波. 降酚微生物的分离. *化工环保*, 2002, **22**(4): 191-194.
- [5] Arutchelvan V, Kanakasabai V, Nagarajan S, *et al.* Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *J Hazard Mater*, 2005, **127**(1-3): 238-243.
- [6] 高平平, 陈迎春, 刘彬彬, 等. 原废水培养基分离活性污泥中的苯酚降解细菌. *应用与环境生物学报*, 2003, **9**(2): 189-192.
- [7] Watanabe Kazuya, Hino Sanae, Onodera Ko, *et al.* Diversity in kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, **81**(6): 560-563.
- [8] 熊顺子, 张学礼, 陈慕云, 等. 无苯酚培养基分离到的降酚菌多样性的分子分析. *应用与环境生物学报*, 2006, **12**(1): 99-103.
- [9] 赵立平, 肖 红, 李艳琴, 等. ERIC-PCR: 一种快速鉴定环境细菌菌株的方法. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**(增刊): 30-33.
- [10] 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.
- [11] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [12] Garland JL. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, **24**(4): 289-300.
- [13] Muret C, Pouet MF, Touraud E, *et al.* From UV spectra to degradability of industrial wastewater/definition and use of a "shape factor". *Water Science and Technology*, 2000, **42**(5-6): 47-53.
- [14] Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(8): 2351-2359.
- [15] Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, *et al.* Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(4): 1220-1225.
- [16] Heinaru E, Truu J, Stottmeister U, *et al.* Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **31**(3): 195-205.
- [17] Przybulewska K, Wieczorek A, Nowak A, *et al.* The isolation of microorganisms capable of phenol degradation. *Pol J Microbiol*, 2006, **55**(1): 63-67.
- [18] Geng A, Soh AE, Lim CJ, *et al.* Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**(5): 728-735.
- [19] Zhang XL, Gao PP, Chao QF, *et al.* Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp. from an activated sludge system. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **237**(2): 369-375.
- [20] Uphoff HU, Felske A, Fehr W, *et al.* The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **35**(3): 249-258.
- [21] Courcol RJ, Husson MO, Izard DE, *et al.* Comparison of the MIC 2000 enteric media with API 20 E and conventional methods for identification of Enterobacteriaceae. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg*, 1982, **252**(4): 472-479.
- [22] Weber KP, Gehder M, Legge RL. Assessment of changes in the microbial community of constructed wetland mesocosms in response to acid mine drainage exposure. *Water Res*, 2008, **42**(1-2): 180-188.
- [23] Widmer F, Fliessbach A, Laczko E, *et al.* Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog (TM)-analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, **33**(7-8): 1029-1036.