

三株降解芘的戈登氏菌鉴定及其降解能力*

胡凤钗^{1,2} 李新宇² 苏振成^{2**} 王秀娟² 张惠文² 孙军德¹

(¹ 沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110161; ² 森林与土壤生态国家重点实验室, 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110164)

摘要 从沈抚灌区多环芳烃污染土壤中筛选出的芘降解菌 D44、D82S 和 D82Q, 经形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析确定均为戈登氏菌属 (*Gordonia* sp.)。3 株菌的最适生长 pH 值均为 7, 当 pH 值低于 5 或高于 9 时, 生长均受到明显抑制。降解试验表明, 3 株菌能以芘、苯并芘、蒽、萘、菲和荧蒽为唯一碳源和能源生长。经过 7 d 的培养, 3 株菌对初始浓度为 100 mg · L⁻¹ 的芘的降解率均在 65% 以上, 对初始浓度为 50 mg · L⁻¹ 的苯并芘的降解率分别为 79.6%、91.3% 和 62.8%。通过 PCR 检测发现 D82Q 和 D82S 含有烷烃单加氧酶基因 *alkB*。

关键词 戈登氏菌 多环芳烃 芘 生物降解

文章编号 1001-9332(2011)07-1857-06 中图分类号 Q939.9 文献标识码 A

Identification and degradation capability of three pyrene-degrading *Gordonia* sp. strains. HU Feng-chai^{1,2}, LI Xin-yu², SU Zhen-cheng², WANG Xiu-juan², ZHANG Hui-wen², SUN Jun-de¹ (¹College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ²State Key Laboratory of Forest and Soil Ecology, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110164, China). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2011, 22(7): 1857-1862.

Abstract: Three pyrene-degrading bacterial strains named D44, D82S and D82Q were isolated from PAHs-contaminated soil in Shenfu Irrigation Area of Shenyang, Northeast China. The strains were identified as *Gordonia* sp., based on the morphological observation, physiological and biochemical identification, and phylogenetical analysis of 16S rDNA sequences. For all the three stains, their optimal pH was 7, and their growth was obviously inhibited when the pH was lower than 5 or higher than 9. The three strains were capable of utilizing pyrene, benzo[a]pyrene, anthracene, naphthalene, phenanthrene, and fluoranthene as the sole source of carbon and energy. After seven days incubation, the three strains could degrade more than 65% of pyrene with an initial concentration 100 mg · L⁻¹, and the D44, D82S, and D82Q could degrade 79.6%, 91.3%, and 62.8% of benzo[a]pyrene with an initial concentration 50 mg · L⁻¹, respectively. PCR amplification indicated that the strains D82Q and D82S possessed alkane monooxygenase gene *alkB*.

Key words: *Gordonia* sp.; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); pyrene; biodegradation.

随着石油工业的发展,石油在开采、运输和使用过程中的泄露以及含油废弃物排放引起的土壤污染问题日益严重。石油污染可改变土壤理化性质,危害农作物,进而威胁人类健康,因而石油污染土壤的修复技术研究日益受到重视。生物修复技术在诸多治理方法中最经济,且环境破坏性小,利用微生物降解多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs), 对 PAHs 污染土壤进行生物修复被认为是最具应用

前景的修复技术之一,而选育 PAHs 高效降解微生物并充分发挥其降解作用是该技术的核心和重要前提^[1-2]。

芘是难降解的具有 4 个苯环的典型稠环芳烃,微溶于水,半衰期长,具有潜在毒性、致癌性及致畸诱变作用,它普遍存在于环境中,而且它的一些衍生物具有更强的毒性,所以芘常被用作监测 PAHs 污染的指示物和其他 PAHs 光化学降解、生物降解的模式化合物。但由于芘属于高分子量 PAHs,具有化学稳定性,在土壤中很难被微生物所代谢利用,关于芘的净化技术处于研究阶段,还没有成熟、高效且易

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-053-2) 资助。

** 通讯作者。E-mail: zhenchengsu@yahoo.com.cn

2011-02-22 收稿,2011-04-20 接受。

行的处理方法. 国内外已报道的可降解四环素的微生物主要有分枝杆菌 (*Mycobacterium*)^[3-4]、诺卡氏菌 (*Nocardia*)^[5]、红球菌 (*Rhodococcus*)^[6]、假单胞菌 (*Pseudomonas*)^[7]、芽孢杆菌 (*Bacillus*)^[8]、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*)^[9] 和戈登氏菌 (*Gordonia*)^[10-11] 等.

在放线菌中, 戈登氏菌显示出了较强的代谢方式多样性和遗传多样性, 该属的多个成员已成为烃类污染土壤生物修复的极具潜力的供选菌株^[12-13]. 研究表明, 一些戈登氏菌可降解或修饰芳香族和脂肪族碳氢化合物、卤化的芳香族化合物、苯并噻吩、腈、聚异戊二烯、二甲苯、橡胶等^[13]. 本文以 3 株从污染土壤中筛选出的戈登氏菌为试验对象, 对其进行初步鉴定, 并研究其对 PAHs 的降解能力.

1 材料与方法

1.1 降解菌的分离和筛选

1.1.1 土壤样品采集 污染土壤样品采自沈抚石油污水灌区渠首稻田 (41°50'55" N, 123°44'56" E), 该灌区是中国最大的石油污水灌区之一, 长期污灌造成土壤 PAHs 含量严重超标, 对该地区的土壤生态安全及居民健康造成极大威胁. 在灌渠附近的稻田取 0~20 cm 耕层土壤, 五点法采样, 过 2 mm 筛后彻底混合均匀, 采集到的土样一部分风干后用于土壤理化性质分析, 一部分保存于 -70 °C 冰箱内供基因组 DNA 提取及分析, 一部分保存于 4 °C, 用于筛选 PAHs 降解菌. 土壤的基本理化性质及多环芳烃污染情况见表 1.

1.1.2 菌株培养基 无机盐基础培养基成分及用量 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, KH_2PO_4 0.4, Na_2HPO_4 0.6, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02, NH_4NO_3 1.0. 固体培养基中加入 2% 琼脂, 茈用丙酮配制成 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 调 pH 值接近污染土壤的自然 pH, 121 °C 蒸汽灭菌 30 min.

菌株保藏用牛肉膏蛋白胨培养基, 成分及用量 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 调

整 pH 7.0~7.2. 加入茈使其终浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.1.3 茈降解菌的筛选 称取土样 5 g, 放入 45 mL 无菌水中, 摇床振荡 30 min 后, 经过系列稀释到 10^{-7} , 各个浓度分别取 0.1 mL 涂布到无机盐固体培养基上, 然后用升华法在培养基上加层茈膜. 加膜方法: 在通风橱中, 将茈配成 $10000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丙酮溶液, 吸取 2 mL 移至平皿底中, 待丙酮挥发完全, 把接种后的平皿倒扣到平皿盖上, 并用封口膜将接口处封闭, 整体放到沙浴中加热, 在平板上方放上冰袋, 使茈升华后遇平皿冷却而附着在固体培养基上. 制备好的培养皿置入 30 °C 恒温箱培养, 每日观察, 挑取能产生透明圈的单菌落在牛肉膏蛋白胨培养基上多次划线纯化. 纯化后的菌株再接种于含茈的无机盐平皿上验证其降解能力.

1.2 菌株的鉴定

1.2.1 形态观察与生理生化鉴定 采用光学显微镜进行革兰氏染色后观察, 菌株鉴定的生理生化试验参照文献[14]进行, 主要进行淀粉水解、硝酸盐还原和明胶液化等试验.

1.2.2 16S rDNA 序列的 PCR 扩增与测序 使用前引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和后引物 1492R (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') (分别来源于大肠杆菌 16S rDNA 的 8-27 和 1492-1513 基因片段) 进行扩增^[15]. PCR 反应程序如下: 在 96 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min. 反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 经切胶纯化后送华大基因公司测序. 序列登陆 GeneBank 进行 blast 分析, 用 3 株戈登氏菌的序列和下载的 16S rDNA 序列通过 clustalX 进行比对聚类分析, 应用 MEGA 4.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 方法和 Jukes-Cantor 模式构建系统发育树.

1.3 降解能力的测定

1.3.1 菌株活化和菌体悬液的制备 取斜面菌株接种于 50 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 30 °C $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 48 h, 即得到活化菌株. 取已活化好的菌液 50 mL, 置于无菌离心管, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$

表 1 土壤基本理化性质和多环芳烃含量

Table 1 Basic physical and chemical properties and PAHs content of the test soil

沙粒 Sand (%)	粉粒 Silt (%)	粘粒 Clay (%)	有机质 Organic matter (%)	碳氮比 C:N	pH	多环芳烃 PAHs ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)			16 种多环芳 烃总量 Total 16 PAHs
						2~3 环 2-3 rings	4 环 4 rings	5~6 环 5-6 rings	
63	27	10	47.9	14	6.24	1477	4503	2438	8417

离心 10 min, 弃上清液, 用磷酸盐缓冲液震荡重新悬浮菌体, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 如此反复两次, 最后用该磷酸盐缓冲液悬浮菌体得到菌体悬液, 浓度调至 $6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$. 此悬液不带有任何碳源和氮源.

1.3.2 菌株的最适生长 pH 试验 将牛肉膏蛋白胨培养基调 pH 为 5、6、7、8、9, 分别接入菌体悬液 1 mL, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养, 每日测定 OD_{600} .

1.3.3 烷烃单加氧酶基因 *alkB* 的扩增 *alkB* 为烷烃降解的关键基因, 扩增采用前引物 *alkB*-1f (5'-AAYACNGCNCAYGARCTNCGNCAAYAA-3') 和后引物 *alkB*-1r (5'-GCRTGRTGRTCNGARTGNGCGYTG-3')^[16], PCR 体系为: $1 \times \text{PCR}$ 缓冲液, 1 U 的 rTaq DNA 聚合酶, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTP, 25 pmol 的前后两种引物, $0.5 \mu\text{L}$ $10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的牛血清白蛋白, $0.5 \mu\text{L}$ 的 DNA 模板 (约 50 ng), 用去离子水补充到 25 μL . 扩增程序为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 15 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 此步骤共 39 个循环, 最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min.

1.3.4 菌株对 PAHs 降解能力的测定 PAHs 残留量的测定参照齐邦峰等^[17] 的紫外分光光度分析法. 反应瓶中加入 10 mL 二氯甲烷, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床震荡 15 min, 取萃取有机相于 25 mL 容量瓶中, 如此反复萃取 3 次 (第 2 次加入二氯甲烷 8 mL, 第 3 次加入 7 mL), 定容萃取液, 摇匀后吸取 50 μL 加于试管中, 待二氯甲烷挥发后加入 10 mL 甲醇溶解残留的多环芳烃, 待其完全溶解后以甲醇为对照在各多环芳烃最大紫外吸收波长处测定其吸光度值, 其中, 芘为 240 nm, 萘为 275 nm, 蒽为 254 nm, 菲为 252 nm, 荧蒽为 232 nm, 苯并(α)芘为 296 nm.

1.4 数据处理

通过对标准浓度的 PAHs-甲醇溶液吸光度值的

测定, 获得浓度为 X 、吸光值为 Y 的标准曲线方程 $Y = aX + b$. 测得不同时间的吸光值后, 可得其残留浓度 $X = (Y - b) / a$, 降解率 $D = (X_0 - X) / X_0 \times 100\%$, X_0 为未接菌空白对照的 PAHs 残留浓度. 所有数据使用 Excel 2007 软件进行分析和作图.

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定

经过多次分离、纯化和复验, 从土壤中筛选到 3 株可以芘为唯一碳源和能源生长的菌株, 分别命名为 D44、D82S 和 D82Q. 3 株菌的菌落边缘整齐, 表面有光泽, 呈圆形垫状, 分别为品红色、粉红色和米黄色 (图 1). 在显微镜下观察均为长杆状, 革兰氏阳性菌. 其生理生化反应结果表明, 这 3 株菌均能在 5% NaCl 下生长, 过氧化氢酶为阳性, 不能水解吐温-80, 硝酸盐还原和脲酶为阴性, 吡啉试验为阳性, 能利用葡萄糖、麦芽糖和蔗糖等.

将 3 株菌的 16SrDNA 序列与 GeneBank 中已知序列进行比对, 结果表明, D44 与 *Gordonia alkanivorans* strain DSM 44187 及 *Gordonia alkanivorans* strain CC-JG39 的序列相似性为 100%, D82S 与分离自石油严重污染土壤中的戈登氏菌 CC-MJ-33a 的序列相似性为 100%, D82Q 与 *Gordonia amicalis* strain CC-MJ-2a 等菌株的序列相似性为 99%. 结合生理生化试验结果, 确定 3 株菌均为戈登氏菌属. 系统发育关系见图 2.

2.2 3 株菌的最适生长 pH 值

戈登氏菌在 pH 为 5 ~ 9 范围均可生长, 生长规律为 $\text{pH } 7 > \text{pH } 8 > \text{pH } 9 > \text{pH } 6 > \text{pH } 5$, 最适 pH 为 7 (图 3). 这 3 株菌在 pH 5 时生长最缓慢, pH 6 其次, 表明其耐酸性很差, 耐碱性较强.

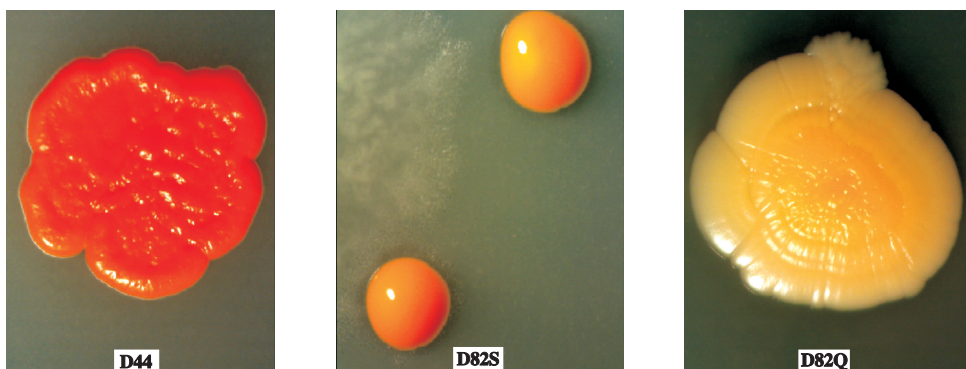


图 1 3 株戈登氏菌的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of three *Gordonia* sp. strains.

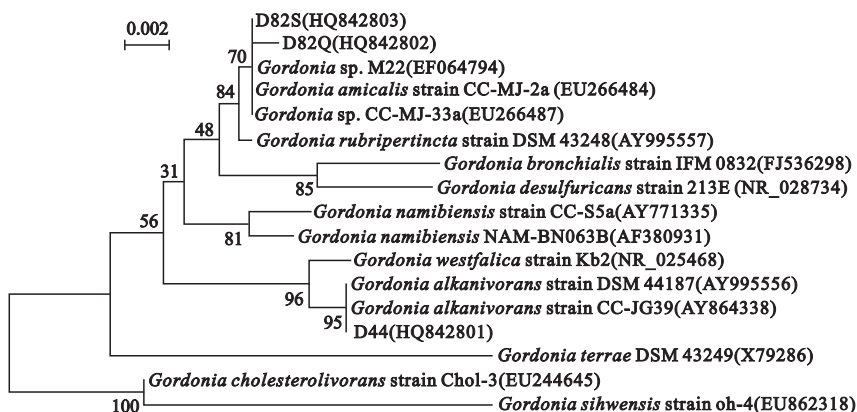


图2 邻位相连法建立的3株菌的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of three strains conducted by neighbor-joining method.

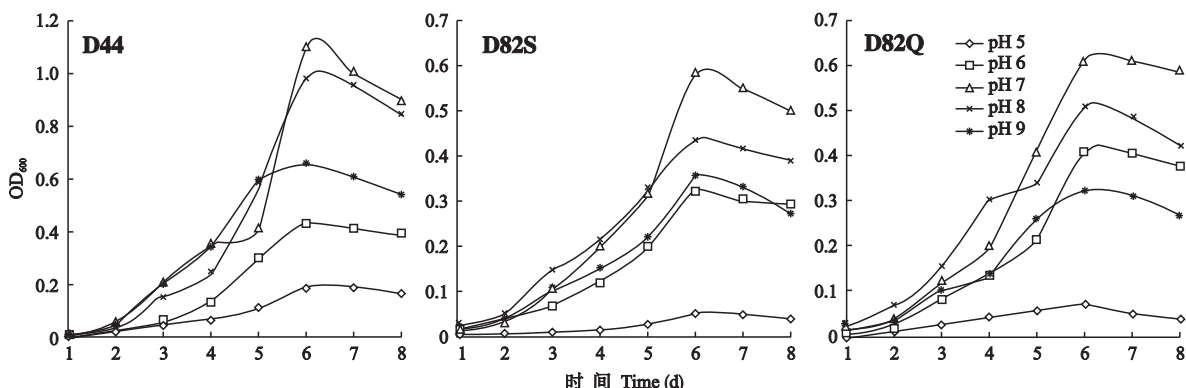


图3 3株菌在不同pH条件下的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of three strains under different pH conditions.

2.3 烷烃单加氧酶基因 *alkB* 的检测

在假单胞菌中,单加氧酶系统催化正烷烃降解的第一步反应,烷烃单加氧酶(alkane hydroxylase, *alkB*)是这个酶系统的主要部分^[18],并且在烷烃降解过程中发挥重要作用.提高碳氢化合物的浓度或向环境中添加碳氢化合物菌能导致 *alkB* 基因拷贝数的增加,因此, *alkB* 基因可作为石油污染或生物降解的重要生物指标^[19].

根据 Wasmund 等^[16]设计的引物,通过PCR扩增得到约550 bp的DNA片段,琼脂糖凝胶电泳结果如图4所示,菌株D82Q和D82S均含有烷烃单加氧酶基因 *alkB*,表明这两株戈登氏菌具有降解烷烃的潜力.

2.4 3株菌对芘和其他PAHs的降解

3株菌对芘的降解效果相近,随培养时间的增加,降解率也不断增加.在生长延滞期芘的降解速率较低,到对数期降解增快,之后降解速率下降,可能是由于菌体的生长到了稳定期,碳源利用率下降.在芘浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐培养基中培养7 d,3

株菌对芘的降解率分别达65.4%、70.5%和67.5%.由菲的降解曲线可以看出,菌株D82Q对菲的降解能力最强,从培养第3天起至试验结束,其对菲的降解率一直最高,其次是D82S, D44的降解能力最弱.在苯并芘的初始浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的降解试验中,3株菌的降解情况较复杂,在试验的前5 d,菌株D44的降解效果好于菌株D82S和D82Q,但在此之后,菌株D82S的降解速率显著增加,至试验结束时,其降解率最高,菌株D44次之, D82Q降解曲

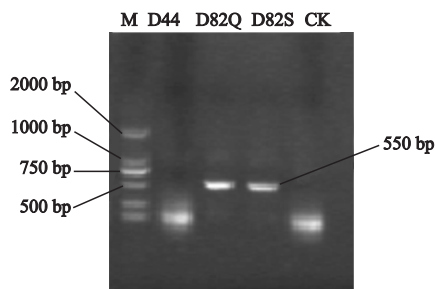


图4 3株菌烷烃单加氧酶基因 *alkB* 检测结果

Fig. 4 Detection result of alkane hydroxylase gene *alkB* in three strains.

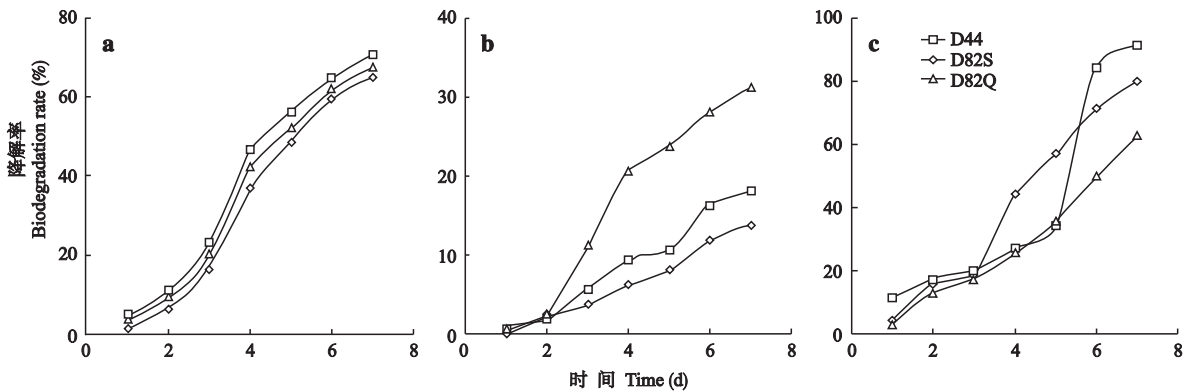


图 5 3 株菌对不同多环芳烃的降解能力

Fig. 5 Degrading ability of the three strains on PAHs.

a) $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pyrene; b) $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 菲 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ fluoranthene; c) $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯并芘 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ benzo[a]pyrene.

线最平稳(图 5)。

采用同样方法,检测了 3 株菌对萘、蒽和荧蒽的降解情况。结果表明: 3 株菌均可以萘、蒽和荧蒽为唯一碳源和能源生长,但降解率较低。

3 讨 论

对苯并芘代谢的研究大部分是由芘降解的相关研究推动的,而且一般需要添加共代谢底物^[20-21],因为芘可以刺激 PAHs 代谢酶,从而降解苯并芘。盛下放等^[22]从石油污染的土壤样品中分离筛选出一株高效降解苯并芘的氮单胞菌属菌株 JL-14,在苯并芘浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下,降解率可达 27.6%,加入菲和蔗糖均可促进对苯并芘的降解。近几年来,可以苯并芘为唯一碳源和能源进行降解的菌株陆续被报道。苏丹等^[23]筛选出 6 株真菌(产黄青霉、镰刀菌、黑曲霉、木霉、毛霉和水霉)可降解芘和苯并芘,它们的降解速率差异显著,但降解率相差不大。*Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC9447)^[24]是最早报道的可以苯并芘为唯一碳源和能源的细菌,在培养 24 h 后开始降解苯并芘,继续培养到 28 d 时可达最大降解率(84.7%)。*Ochrobactrum* sp. BAP5^[25]是从海洋沉积物中分离得到的可将苯并芘降解的细菌,培养 2 周可降解 20% 以上的苯并芘。可以苯并芘为唯一碳源和能源生长的菌株还有 *Mycobacterium* sp. NJS-1^[26]和假单胞菌 SL-1^[27],然而可降解苯并芘的戈登氏菌还未见报道。

戈登氏菌是一类具有较高底物降解多样性的微生物,能够代谢多种环境有毒污染物。对一些代表性的分离株的鉴定结果表明,戈登氏菌属与分枝杆菌、红球菌同属于诺卡氏菌型放线菌,是土壤中具有代谢 PAHs 能力的主要微生物类群之一^[28]。刘磊等^[10]

从石油污染土壤中分离出具有 PAHs 代谢活性的戈登氏菌 He4,该菌株可降解正十六烷、苯、萘、蒽、菲和芘。*Gordonia* sp. strain JE-1058^[29]可产生生物表面活性剂,具有清洁海洋和海滩上泄漏石油的潜力。

目前,已经从烃类化合物污染土壤中分离出多株放线菌类降解菌,其中一些菌株的降解特性、降解途径及相关降解基因已有报道,但关于 *Gordonia* 属细菌的代谢规律和机理研究较少。

4 结 论

从石油污染稻田土壤中分离得到 3 株芘降解细菌 D44、D82S 和 D82Q,通过形态观察、生理生化反应和 16S rDNA 基因序列分析,初步确定均为戈登氏菌,其生长最适 pH 值为 7。降解能力测试结果表明,3 株菌对浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率均超过 60%,D82Q 降解菲的能力最强,D82S 对 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯并芘的降解率高达 90%,同时 3 株菌还可以萘、蒽和荧蒽为唯一碳源和能源生长,菌株 D82Q 和 D82S 含有烷烃降解基因 *alkB*。3 株戈登氏菌能降解多种 PAHs,可作为生物修复 PAHs 污染土壤的潜在菌种资源。

参考文献

- [1] Zhang J (张 杰), Liu Y-S (刘永生), Meng L (孟玲), et al. Isolation and characteristics of PAHs-degrading strains. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2003, **14**(10): 1783-1786 (in Chinese)
- [2] Su D (苏 丹), Li P-J (李培军), Ju J-L (鞠京丽), et al. Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in non-fluid medium with immobilized microorganism technique. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(8): 1530-1534 (in Chinese)
- [3] Heitkamp MA, Franklin W, Cerniglia CE. Microbial

- metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons; Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **54**: 2549-2555
- [4] Vila J, Lopez Z, Sabate J, *et al.* Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: Actions of the isolate on two- and three-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 5497-5505
- [5] Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere*, 1999, **38**: 1331-1337
- [6] Walter U, Beter M, Klein J, *et al.* Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, **34**: 671-676
- [7] Zhou L (周乐), Sheng X-F (盛下放). Screening and the degradation conditions of pyrene-degrading bacterium. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2006, **25**(6): 1504-1507 (in Chinese)
- [8] Liu Y-F (刘艳锋), Zhou Z-M (周作明), Li X-L (李小林), *et al.* Isolation and purification of pyrene degrading strains and measurement of their degradation capability. *Journal of Huaqiao University* (Natural Science) (华侨大学学报·自然科学版), 2008, **29**(2): 267-269 (in Chinese)
- [9] Zhong M (钟鸣), Zhang J-Q (张佳庆), Wu X-X (吴小霞), *et al.* Isolation, identification, and degrading characteristics of a high-efficient pyrene-degrading bacterial strain. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, **21**(5): 1334-1338 (in Chinese)
- [10] Liu L (刘磊), Li X-W (李习武), Liu S-J (刘双江), *et al.* Isolation and identification of a PAHs-degrading strain *Gordonia* sp. He4 and its dynamics during bioremediation of phenanthrene polluted soil. *Environmental Science* (环境科学), 2007, **28**(3): 617-622 (in Chinese)
- [11] Yang X-H (杨秀虹), Tang W-H (汤婉环), Li S-Y (李适宇), *et al.* Isolation, identification and degradation ability of phenanthrene-degrading bacteria from contaminated soils. *Research of Environmental Sciences* (环境科学研究), 2009, **22**(6): 675-681 (in Chinese)
- [12] Bendinger B, Kroppenstedt RM, Klatt S, *et al.* Chemotaxonomic differentiation of coryneform bacteria isolated from biofilters. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, **42**: 474-486
- [13] Arenskotter M, Broker D, Steinbuchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 3195-3204
- [14] Dong X-Z (东秀珠), Cai M-Y (蔡妙英). Manual of Common Determinative Bacteriology. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [15] Cavalca L, Hartmann A, Rouard N, *et al.* Diversity of *tfdC* gene: Distribution and polymorphism among 2, 4-dichloro-ropenoxyacetic acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **29**: 45-58
- [16] Wasmund K, Burns KA, Kurtboke DI, *et al.* Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor sea, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**: 7391-7398
- [17] Qi B-F (齐邦峰), Zhang H-C (张会成), Chen L-R (陈立仁), *et al.* The determination of 3,4-benzopyrene content in microstalfine wax with the solvent extraction and UV absorption method. *Analysis and Testing Technology and Instruments* (分析测试技术与仪器), 2003, **9**(3): 169-172 (in Chinese)
- [18] Van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*, 1994, **5**: 161-174
- [19] Heiss-Blanquet S, Benoit Y, Marechaux C, *et al.* Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, **99**: 1392-1403
- [20] Moody JD, Freeman JP, Fu PP, *et al.* Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 340-345
- [21] Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, **45**: 57-88
- [22] Sheng X-F (盛下放), He L-Y (何林燕), Hu L-F (胡凌飞). Isolation of a benzo[a]pyrene-degrading strain and its degradation conditions. *Acta Scientiae Circumstantiae* (环境科学学报), 2005, **25**(6): 791-795 (in Chinese)
- [23] Su D (苏丹), Li P-J (李培军), Ju J-L (鞠京丽). Degradation of pyrene and benzo[a]pyrene in soil by six strains of fungi and its kinetics. *China Environmental Science* (中国环境科学), 2006, **26**(2): 188-191 (in Chinese)
- [24] Lily MK, Bahuguna A, Dangwal K, *et al.* Degradation of benzo[a]pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC9447). *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, **40**: 884-892
- [25] Wu YR, He TT, Zhong MQ, *et al.* Isolation of marine benzo[a]pyrene-degrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and protein characterization. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, **21**: 1446-1451
- [26] Zeng J, Lin XG, Zhang J, *et al.* Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium* sp. and the degradation in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **183**: 718-723
- [27] Li Y-Q (李艳秋), Liu J (刘君), Gao P (高鹏), *et al.* Isolation, identification and degradation properties of a benzo[a]pyrene-degrading strain SL-1. *Northern Environmental* (北方环境), 2010, **22**(2): 74-77 (in Chinese)
- [28] Kastner M, Breuer-Jammali M, Mahro B. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology Biotechnology*, 1994, **41**: 267-273
- [29] Saeki H, Sasaki M, Komatsu K, *et al.* Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contain a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource Technology*, 2009, **100**: 572-577

作者简介 胡凤钗,女,1983年生,硕士研究生.主要从事环境微生物及 PAHs 污染修复研究. E-mail: hufengchai0314@126.com

责任编辑 肖红