

海洋环境中多环芳烃的微生物降解研究进展*

田蕴 郑天凌** 胡忠

(厦门大学生命科学学院 应用与环境微生物研究所 厦门 361005)

关键词 多环芳烃; 微生物降解; 海洋环境 (图 2 参 46)

CLC X55 + X172

ADVANCES ON MICROBIAL DEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) IN MARINE ENVIRONMENT*

TIAN Yun, ZHENG Tianling** & HU Zhong

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are considered hazardous because of cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic effects. The fates of these compounds in the marine environment and the remediation of PAH-contaminated sites are, therefore, of high public interest. The principle processes for their successful removal are currently believed to be microbial transformation and degradation. Microorganisms have a huge metabolic repertoire that enables them to degrade a panoply of organic pollutants and in many cases the complex biochemistry and molecular biology of the catabolic pathways involved have been unraveled. This review provides some advance on the microbial degradation of PAHs. Studies are presented on the genetics of PAHs degradation pathways and the application of genes. Molecular oxygen is essential for the initial PAHs by microorganisms. The cometabolism mechanisms of PAHs and the achievements on the PAHs cometabolism degradation are discussed. The degradation of most PAHs with high molecular weight is carried out by means of cometabolism. Fig 2, Ref 46

Keywords polycyclic aromatic hydrocarbons; microbial degradation; marine environment

CLC X55 + X172

多环芳烃(PAHs)是一类广泛分布于海洋环境中的含有两个苯环以上的有毒有害污染物,主要来源于人类活动和能源利用过程,如石油、煤、木材等的燃烧过程,石油及石油化工产品的生产过程,海上通过地面径流、污水排放及机动车辆等燃料不完全燃烧后的废气随大气颗粒的沉降进入海洋环境中。由于多环芳烃的潜在毒性、致癌性及致畸诱变作用^[1,2],通过生物累积及食物链的传递作用,给海洋生物、生态环境和人体健康带来极大危害,已引起各国环境科学家的极大重视。美国环保局在上世纪80年代把16种未带分支的多环芳烃确定为环境中的优先污染物^[3],我国也把多环芳烃列入环境优先监测的污染物黑名单中。

多环芳烃在环境中的归宿包括挥发、光氧化、化学氧化、生物积累、土壤吸附及微生物降解等,研究表明,微生物降解在该污染物的迁移转化乃至最终从环境中消失的过程中占有重要的地位,是环境中多环芳烃去除最主要的途径^[4]。微生物对多环芳烃等污染物的生物降解是海洋环境污染研究中最活跃领域之一^[5,6],研究工作已从一般寻找降解污染物的微生物转入微生物代谢途径、遗传调控机制和高效基因工程菌的研究。本文就多环芳烃的微生物降解途径、降解基因、共代谢降解

等方面的最新研究进展作一综述。

1 微生物对 PAHs 的代谢

生物代谢对于 PAHs 在环境中的化学行为起着重要作用,其中微生物降解作用尤其显著,其主要以两种方式进行代谢:1. 以 PAHs 作为唯一碳源和能源。2. PAHs 与其它有机质进行共代谢,从而最终将污染物转化为微生物自身的生物量及稳定、无毒的有机物和 CO₂、水。

在一般的条件下,原核生物和真核生物对 PAHs 的微生物降解都需要氧气的参与,产生氧化酶,使苯环降解。微生物加氧酶有两种,即单加氧酶和双加氧酶。丝状真菌一般产生单加氧酶,对 PAHs 降解的第一步是羟基化 PAHs,即把一个氧原子加到底物中形成芳烃化合物,继而氧化为反式双氢乙醇和酚类^[7,8]。细菌主要产生双加氧酶,对 PAHs 降解的第一步是苯环的裂解,把两个氧原子加到底物中形成双氧乙烷^[9],进一步氧化成顺式双氢乙醇,双氢乙醇可继续氧化为儿茶酸、原儿茶酸和龙胆酸等中间代谢物,接着苯环断开,产生琥珀酸、延胡索酸、乙酸、丙酮酸和乙醛^[10]。降解中的产物被微生物用来合成自身的生物量,同时产生 CO₂ 和 H₂O。微生物在加氧酶的作用下氧化 PAHs 的途径见图 1。PAHs 最初的氧化即苯环的加氧是 PAHs 微生物降解反应的速控步,此后降解进程加快,没有或很少有中间代谢物的积累^[10]。PAHs 的酶降解具有很强的区域性和选择性。近些年在低分子量的 PAHs 如萘、菲等的降解机理方面有所进展^[11~13]。

收稿日期: 2002-12-02 接受日期: 2003-01-02

*国家自然科学基金资助项目(No. 30070157, No. 40206015)及河口海岸动力沉积和动力地貌综合国家重点实验室开放课题基金资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30070157, No. 4020615) and the Open Subject Fund of the State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wshwzh@jingxian.xmu.edu.cn, Tel: 0592-2183217)

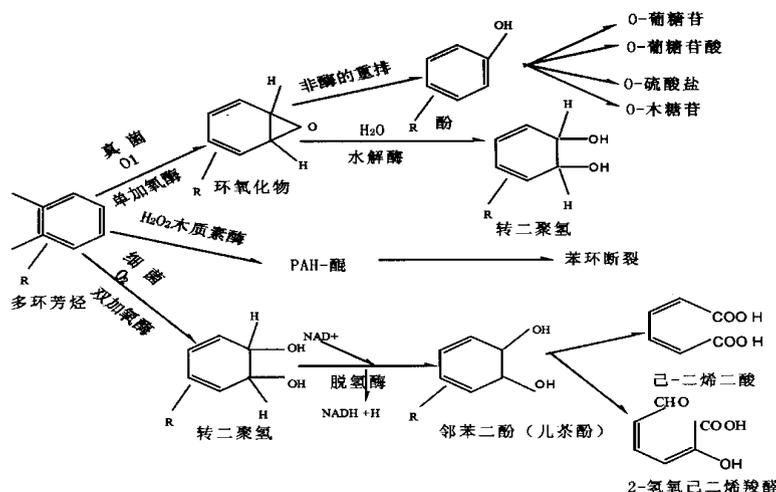
图1 PAHs的代谢途径^[10]

Fig. 1 Pathways for the microbial catabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons

1.1 PAHs 的降解基因

PAHs 作为一类难降解物释放到环境中后,必然对微生物产生强大压力,这些微生物经过一系列突变、基因重组、易位及其他的遗传调控来创造新的酶促功能,以作用于 PAHs 及其以后的代谢产物。这类基因发生遗传重组,组织连续的代谢步骤的基因进入单个的遗传单位,然后和转移质粒结合,形成具有降解能力的质粒。这些质粒在微生物之间传递,因此这种降解功能可在环境中扩展。当然也可以通过导入质粒的方法创造新菌株,获得新的降解能力。

对于编码低分子量 PAHs 如萘、菲等的分解代谢的基因,其中许多可自由转移的分解质粒已被分离。Garcia-Valdes 等 (1989) 分离到降解萘和其它芳香化合物的海洋细菌 *Pseudomonas stutzeri* 和 *Pseudomonas testosteroni*, 这些细菌没有 1, 2-双加氧酶活性,而是通过 2, 3-双加氧酶 (C230) 催化芳香环的裂解。通过对菌株 *P. stutzeri* AN11 基因文库的克隆和亚克隆实验,得到一个携带 6.1 kb 插入片段的质粒 PLB113, 对 *Escherichia coli* HB101 (PLB113) 的酶活实验显示水杨酸是通过 C230 和水杨酸水解酶 SH 催化降解的,且 C230 基因位于 SH 基因的下游。以 *xyIE* (在 TOL 质粒 pWWO 中编码 C230) 和 *nahG* (在 NAH 质粒 pWW60 中编码 SH) 为探针与上述 6.1 kb 插入片段杂交,显示该片段与二者均有同源性,但该片段来自于质粒还是染色体还不得而知^[14]。

Hedlund 等 (1999) 发现海洋萘降解菌 *Neptunomona naphthovorans* NAG2N-126 和 *Neptunomona naphthovorans* NAG2N-113 虽然在萘双氧酶大亚基的氨基酸序列上有高度

同源性 (97.6%), 但前者不能降解菲,后者却不仅能降解菲,而且能以菲为唯一碳源和能源,并能转化 2, 6-二甲基萘,预示代谢途径的巨大差异可能只源于几个关键的氨基酸,而菌株 NAG2N-113 中可能包含不止一个双加氧酶,因此能降解更多的芳香化合物。从这两个菌株克隆的双加氧酶基因可能与公认的假单胞菌 *nah* 途径的基因很接近^[15]。

Rossello 等 (1994) 分离到一株海洋萘降解细菌 *P. stutzeri* AN10, 并证实该菌株的降解基因由染色体编码,与通常的由质粒编码萘降解途径不同^[16], Bosch 等 (1999) 获得了菌株 AN10 萘降解上游途径 (*nahAaAbAcAdBFCEd*) 的核酸序列 (图 2A)^[11], 2000 年又报道了 AN10 整个萘降解途径下游 (*nahGTHINLOMKJ*) 的序列分析 (图 2B)^[12], 从而得到了第一个完整的萘降解途径的 DNA 序列,其中有 11 个 ORFs 被证实。*P. stutzeri* AN10 中萘降解途径由 19 个基因编码,它们组成两个操纵子,第一个, *nahAaAbAcAdBFCEd*, 编码萘降解为水杨酸途径的酶,第二个, *nahGTHINLOMKJ*, 编码间位裂解途径将水杨酸降解为丙酮酸和乙酰 CoA 时所需的基因产物。菌株 AN10 中编码萘降解途径的基因结构与其它已得到良好描述的萘降解途径很相似,如 *P. putida* G7 中 NAH7 编码的降解途径和 *P. putida* NCIB9816 中 NAH 质粒 PWW60-1 编码的降解途径。降解基因的高度同源性反映出萘降解途径的相似性:萘,经过 NahA、NahB、NahC、NahD、NahE 和 NahF 的连续作用产生水杨酸和丙酮酸,水杨酸可通过 2 种水杨酸水解酶 NahG 和 NahW 生成儿茶酚,儿茶酚通过 NahH 开环,再通过间位裂解途径转化为丙酮酸和乙酰 CoA。

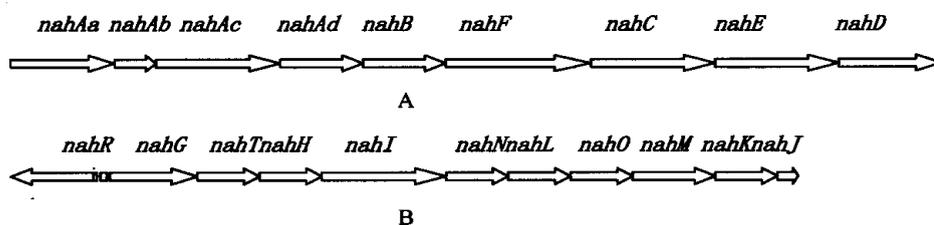
图2 *P. stutzeri* AN10 萘降解基因结构

Fig. 2 Genetic organization of naphthalene degradation of AN10

(A *P. stutzeri* AN10 萘降解上游途径基因结构; B *P. stutzeri* AN10 萘降解下游途径基因结构)

(A Genetic organization of naphthalene-degradation upper pathway of AN10; B Genetic organization of naphthalene-degradation lower pathway of AN10)

Iwabuchi 和 Harayame (1998) 报道了 *Nocardioides* sp. strain KP7 在菲降解途径中编码 1-羟基-2-萘双加氧酶的 *phdI* 基因、编码反-2-羧基苯亚甲基丙酮酸盐水合酶-醛缩酶的 *phdJ* 基因和编码 2-羧基苯甲醛脱氢酶的 *phdK* 基因的核酸序列, 该基因簇 *phdIJK*, 为一段 6.2 kb 的 DNA^[17]。

随后 Saito 等(1999)报道了 *Nocardioides* sp. strain KP7 编码降解菲为 1-羟基-2-萘的另一个基因簇 *phdEFABGHCD* 的核酸序列, 该基因簇位于 *phdIJK* 的下游 6.1 kb 处。同时, Saito 对 *phdA*、*phdB*、*phdC*、*phdE*、*phdD*、*phdF*、*phdG*、*phdH* 等基因的产物及功能也进行了分析, 并将 *phdABCD* 转入大肠杆菌中, 使大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 获得了降解菲的能力^[13]。

对海洋微生物代谢途径的研究反映出在海洋微生物和陆地微生物在基因组成、调节等方面的差异, 也预示海洋微生物的多环芳烃降解系统可能包含有类似于典型的多环芳烃降解途径的一些组成部分。

1.2 PAHs 的降解基因的应用

PAHs 降解代谢的遗传学结构知识, 为环境领域中应用生物降解提供了重要信息。除了构建一些可改善土著的微生物性状的遗传功能菌外, 分子技术还能对生物降解监测和降解优化产生有益作用。

克隆的结构基因可作特定微生物和降解代谢途径的基因探针。克隆的调节基因尤其有用, 因为这些基因可探测特定的调节特征, 从而迅速阐明诱导剂的类型, 而诱导剂对激活所期望的降解能力是必需的^[18]。编码关键酶或调节蛋白的核苷酸序列, 使得可设计用于快速检测和确定在特定地区出现的微生物种类的特殊 PCR 引物^[19]。生物样品的反向基因组探针已有用于碳水化合物降解菌鉴定, 荧光标记及同位素寡核苷酸标记的探针可有效地用于检出特异种的基因序列^[19]。已证明在菌落印记杂交中, 可以方便地检测含 Tol 质粒的恶臭假单胞菌。Garcia Valcles 等 (1989) 用 *xyle* 和 *nahG* 基因探针与质粒 PL IB113 酶切片段杂交, 显示 6.1 kb 片段与 2 个探针 DNA 均有同源性^[14]。

Rossello-Mora 等(1994)以 *nahA* (NO) 和 *nahH* (C230) 基因为探针, 与 6 个萘降解菌株的质粒杂交, 发现菌株 *P. stutzeri* 19SMN4 的质粒含有 *nahH* 基因, 同时, 以芳香环降解基因探针 *nahA*、*nahG* 和 *nahH* 与 12 个 *P. stutzeri* 菌株的总 DNA 酶切片段杂交, 不但定位了阳性酶切片段所携带的降解基因, 而且发现所有菌株中降解基因均有同源性^[16]。

萘降解基因已用于检测活性污泥中萘降解细菌的数量。从费氏弧菌获得 *Lux* 基因编码产生荧光酶系统, 插入到 *P. fluorescens* 萘降解质粒的编码水杨酸羟化酶的基因中, 新形成的质粒表达荧光酶, 从而在暴露于萘时产生光。这些菌株已用于生物传感器, 以测定污泥土壤中可生物利用的萘的量, 这种系统测量萘的浓度是快速的, 并可测到 45×10^{-9} 的浓度^[20,21]。

在多环芳烃代谢途径中, 双加氧酶是低分子量芳香碳水化合物(如萘、联苯等)有氧生物降解过程的第一步所必须的, 而且具有相似性。有关编码双加氧酶的基因, 有的已经被克隆并进行了序列分析, 有的已经被证实位于某类特定质粒(如 TOL、NAL 簇)上。但有关高分子量多环芳烃降解基因的报道还很少, 已证实有一些假单胞菌中与菲、蒽转化有关的 *nah*、

pah、*ndo* 和 *dox* 操纵子与萘的降解基因有很高的同源性^[22]。

2 PAHs 的共代谢降解

海洋环境中存在的 PAHs 多以多组分存在, 许多四环或多环高分子量 PAHs 的降解是以共代谢 (cometabolism) 的方式进行的^[23]。细菌对四环或多环 PAHs 的矿化作用一般以共代谢的方式开始。

2.1 共代谢降解过程的机理

Leadbetter 和 Foster (1959) 最早提出了共代谢现象, 并命名为共氧化 (cooxidation), 这个定义描述了微生物能氧化底物却不能利用氧化过程中的能量维持生长的过程^[24]。后来 Jensen 扩展其内涵, 提出共代谢 (cometabolism) 概念^[25]。在有其他碳源和能源存在的条件下, 微生物酶活性增强, 降解非生长基质的效率提高, 也称为共代谢作用。通常确定有机污染物生物可降解性的方法均侧重于选择能以供试化合物作为唯一的碳源和能源的微生物, 而不考虑微生物是否有活性, 是否有能力共代谢这些化合物, 因此, 共代谢现象的提出影响到人们对难降解有机物的定义。许多微生物都有共代谢的能力, 各种各样的底物都可被利用, 其降解反应可能涉及除氧化作用外的各种反应, 因此, 微生物不能依靠某种有机污染物生长并不意味着这种污染物能够抵抗微生物的攻击, 因为当存在其他底物时, 这种污染物就会通过共代谢作用而生物降解^[26]。

目前提到共代谢, 就是指微生物的“生长基质”和“非生长基质”共酶, 或是在污染物完全氧化成 CO_2 和水的过程中有多种酶或微生物参与。“生长基质”和“非生长基质”共酶, 是指有些污染物(非生长基质)不能作为微生物的唯一碳源和能源, 其降解并不导致微生物的生长和能量的产生, 它们只是在微生物利用生长基质时, 被微生物产生的酶降解或成为不完全氧化产物, 这种不完全氧化产物进而可以被别的微生物利用并彻底降解^[27]。因而在纯培养时的共代谢只是一种截止式转化 (dead-end transformation), 而在混合培养和自然环境中, 这种转化可以为其他微生物所进行的共代谢或其他微生物降解铺平道路, 以共代谢方式使难降解污染物经过一系列微生物的协同作用而得到彻底分解。因此, 微生物的共代谢作用可能存在以下几种情况: (1) 靠降解其他有机物提供能源或碳源; (2) 与其他微生物协同作用; (3) 由其他物质的诱导产生相应的酶系。

有人提出假设, 用易于被微生物利用的底物维持 PAHs 降解菌的生长, 这些降解菌的大量生长繁殖可以提高 PAHs 的降解率^[28]。PAHs 生物降解过程中, 加氧酶的活性程度对 PAHs 的降解有很大的影响, 有文献报道, 加氧酶可以作为有机污染物的检测方法^[29,30]。投加基质类似物(生长基质)是针对代谢酶的可诱导性而提出来的, 曾有许多报道表明, 细菌内的羟化系统可以被烃以外的底物诱导, 酶的诱导物中有些需要分子氧, 有些不需要。

共代谢降解的机制目前研究的并不深入, 有些解释还是假设性的^[28], 还有待于进一步研究。

2.2 共代谢降解 PAHs 的研究进展

虽然对 3 个左右的并合芳香环的 PAHs 有较深的认识, 但对更大的 PAHs 的研究并不广泛^[31]。由于其自身的结构和特性, 高分子量的 PAHs 在环境中较稳定, 难于被降解, 而被列入

难降解物.能以能矿化多环 PAHs 并以其作为唯一碳源和能源的细菌也比较少.现有的突破是 1980 年之后的研究所报道的.1988 年,Heitkamp 等第一次从环境中分离到一株能广泛降解 PAHs(也包括 4 个芳香环的)的菌株.他们是从油田附近的沉积物中分离到一株革兰氏阳性杆菌,当它在无机营养物中生长 2 wk 后能通过共代谢方式降解一系列 PAHs(0.5 mg/L),包括荧蒹、芘、1-硝基芘、3-甲基-蒹、二苯并(a,h)蒹等^[32].

同样是在 1988 年,Mahaffey 在实验中观察到 *Beijerinckia* sp. 菌株不能以苯并蒹作为碳源和能源生长,但在有联苯、水杨酸作为诱导底物生长后可以氧化苯并蒹.水杨酸的存在还能提高 *Pseudomonas putida* NCIB9816 降解荧蒹和苯并芘的能力^[33].Mahaffey 首次提供了高分子量 PAHs 降解过程中环裂变的直接证据.采用联苯、*m*-二甲苯、水杨酸盐诱导 *Beijerinckia* sp 菌株 B1 把苯并(a)蒹氧化成三种 σ -羟基-多芳香酸,通过核磁共振和质谱分析分别确定为:1-羟基-2-萘酸、2-羟基-3-萘酸、3-羟基-2-萘酸.利用 [¹⁴C]-苯并(a)蒹的矿化实验也显示有¹⁴CO₂的形成.

1989 年 Mueller 通过实验第一次证实:细菌以含 4 个或多个芳香环的 PAHs 作为唯一碳源和能源是可能的.他们在杂酚油污染的土壤中分离到的由 7 种细菌组成的群落可以利用荧蒹,在荧蒹中生长的该群落也能生物转化浓度在 0.3-2.3 mg/l 范围内的其它 17 种 PAHs,而在这 17 种 PAHs 中有些是不能直接被微生物利用的,它们的降解应是以共代谢方式进行的.微生物群落中的微生物起到了不同的作用,有的提供了加氧酶及其它降解酶,有的提供了生长因子^[34].

因为 PAHs 及其代谢中间产物结构的相似性,可以预测在一系列降解 PAHs 的微生物中存在着功能类似的加氧酶或降解途径^[34].Mueller 在 1997 年的研究中发现:在菲和水杨酸存在的前提下,不能作为 *Pseudomonas Sacharophila* p-15 碳源和能源的荧蒹和芘能被这种菌代谢.菲和萘的降解均受到水杨酸的控制,这可以表明二者代谢作用源于同一酶系^[35].

Bouchez 等(1995)分离出 6 种细菌,这些细菌至少能以如下 6 种 PAHs:萘、芘、菲、蒹、荧蒹、芘中的一种为碳源和能源.他们在对生物降解过程中的两种 PAHs 在相互关系的观察中发现:除了协同作用外,PAHs 之间存在着剧烈的抑制作用.多种微生物混合培养能减缓 PAHs 之间的抑制现象.他们认为共代谢是 PAHs 降解的一个重要特征,它普遍存在,扩展了微生物所能降解的有机物范围^[36].

Robert (1997)把苯并(a)芘和原油混合后投入清洁土壤,利用土著微生物进行降解,他把苯并(a)芘的降解解释为共代谢氧化和随后的一些烃类降解菌的共生体代谢作用的结果^[37].在 2000 年的研究中 Robert 发现:混合培养微生物在有柴油存在的基质中,可将 7-¹⁴C 苯并芘矿化为¹⁴CO₂.添加浓度为 0.007%~0.2%的柴油,可以使浓度为 10 mg/L 苯并芘的矿化率在两个星期的时间内达到 33%~65%.对混合培养微生物的 PCR-DGGE 分析表明,有 8 种微生物在不同的阶段参与了苯并(a)芘的矿化^[38].

尽管共代谢降解 PAHs 的理论研究已取得一些进展,能降解高分子量 PAHs 化合物的微生物数目在不断增加,对一些菌株的降解途径也进行了推测,但整体进展仍相当缓慢,特别是在高分子量 PAHs 生物降解的调节机制、PAHs 与其它烃形成混合物的生物降解、在降解 PAHs 的共生体中微生物之间的相

互作用等几个领域的研究^[39].并且把共代谢应用到实际中的报道目前还未见到.

3 结语

微生物降解是环境中去除 PAHs 的主要途径,是 PAHs 污染现场生物修复的重要基础.为了更好地应用生物技术治理 PAHs 的污染,有必要对环境中 PAHs 污染特征、PAHs 降解微生物、微生物降解污染物的酶促反应机理和途径及其相关的基因等有充分的理解及进行深入的研究,从而选择出最优化的方案,利用生物技术手段构建高效的遗传工程菌株并应用于环境污染物的治理.这也正是目前各国科学家致力发展生物修复技术的基础^[40].在我国,对这方面的研究起步较晚,而且主要集中在陆地上^[28,41].

海洋环境是一个多元、多层次、庞大、复杂的系统,养育了繁多的海洋生物的同时也承纳了各式各样的污染物.尽管人们对于 PAHs 的生物降解已有较丰富的研究,但在海水和沉积物中 PAHs 的生物降解却很难确定^[42].由于海洋环境的不稳定性,现有的海洋有机污染的生物修复技术研究与应用多集中在潮间带现场,而在开阔海域及沉积物中的研究却很少^[43].更为突出的是,对于海洋环境中的高分子量 PAHs 来说,有关其微生物降解途径和有关的基因序列方面的知识积累较少,仅有的国外几篇报道仍局限于降解菌的分离和特性研究等^[44~46],在国内目前除本研究组进行了一些初步的探索外^[5~6],尚未见其他的研究报道.因此,开展有关海洋环境的这方面研究是非常必要的,也是势在必行的.

References

- Baird C. Environmental Chemistry. New York: W H Freeman and Company, 1995. 276~278
- Stegeman JJ, Lech JJ. Cytochrome p-450 monooxygenase system in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Perspectives*, 1991, **90**:101~109
- Varanas U. Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Inc, 1989
- Gibson DT, Mahadevan V, Jerina R M, Yagi H, Yeh HJC. Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 1975, **189**: 295~297
- Zheng TL(郑天凌), Zhuang TC(庄铁城), Cai LZ(蔡立哲). The role of microbes in bioremediation of marine polluted environment. *J Xiamen Univ* (厦门大学学报), 2001, **40**(2): 524~534
- Guo CL(郭楚玲), Zheng TL(郑天凌), Hong HS(洪华生). Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Sci* (海洋环境科学), 2000, **19**(3): 24~29
- Fiechter A. Function and synthesis of enzymes involved in lignin degradation. *J Biotechnol*. 1993, **30**: 49~55
- Barbosa AM, Dekker RFH, St Hardy GE. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric Poly R-478. *Lett Appl Microbiol*, 1996, **23**: 93~96
- Albaiges J, Frei RW, Merian E. Chemistry and Analysis of Hydrocarbons in Environment. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1983. 177~190

- 10 Cerniglia CE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon: a review. *Biodegradation*, 1992(3): 351 ~ 368
- 11 Bosch R. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 1999, **236**:149 ~ 157
- 12 Bosch R. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 2000, **245**:65 ~ 74
- 13 Saito A. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere*, 1999, **38**(6):1331 ~ 1337
- 14 Garcia-Valdes E, Cozar E, Lalucat J, Rotger R. Molecular cloning of aromatic degradative genes from *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **61**:301 ~ 306
- 15 Hedlund BP, Geiselbrecht AD, Bair TJ, Staley JT. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Nep-*tunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(1):251 ~ 259
- 16 Rossello-Mora RA, Lalucat J, Garcia-Valdes E. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**:966 ~ 972
- 17 Iwabuchi T, Harayama S. Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2- naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 8332 ~ 8336
- 18 张从,夏立江. 污染土壤生物修复技术. 中国环境科学出版社, 2000
- 19 Shen Y, Stehmeier LG, Voordouw G. Identification of hydrocarbon-degrading bacteria in soil by reverse sample genome probing. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**:637 ~ 645
- 20 King JMH, Digrazia PM, Applegate B. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalent exposure and biodegradation. *Science*, 1990, **249**:778 ~ 779
- 21 Goyal AK, Zylstra GF. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GE39. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**:230 ~ 236
- 22 Yang Y, Chen RF, Shiaris MP. Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB9816. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 2158 ~ 2164
- 23 Sims RC, Overcash MR. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNA's) in soil-plant systems. *Residue Rev*, 1983, **88**:1 ~ 68
- 24 Leadbetter ER., Foster JW. Oxidation products formed from gaseous alkane by the bacterium *pseudomonas metharica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, **82**:491 ~ 492
- 25 Jense HL. Carbon nutrition if some microorganisms decomposing halogen-substituted aliphatic acids. *Acta Agr Scand*, 1963, **13**:404 ~ 412
- 26 金志刚,张彤,朱怀兰编著. 污染物生物降解. 华东理工大学出版社, 1997
- 27 夏淑芬. 微生物生态学. 武汉大学出版社, 1988
- 28 Gong ZQ(巩宗强), Li PJ(李培军), Wang X(王新). The process of cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the contaminated soils. *Chin J Ecol (生态学杂志)*. 2000, **19**(6):40 ~ 45
- 29 Porte C. Response of mixed-function oxygenase enzymes and antioxidant enzyme system of *mytilus* sp. to organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol*, 1991, **100**(1/2): 183 ~ 186
- 30 Ferry F. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Biochem Physiol*, 1986(2): 233 ~ 245
- 31 Harayama S. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr Opin Biotech*, 1997, **8**:268 ~ 273
- 32 Heitkamp MA. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. In microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**: 1969 ~ 1973
- 33 Mahaffey WR. Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[*a*]anthracene. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**:2415 ~ 2423
- 34 Mueller J G. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**:3085 ~ 3090
- 35 Mueller J G. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, **71**:329 ~ 343
- 36 Bouchez M, Blanchet D. and Vandecasteele J P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by pure strains and by defined strain association: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **43**: 368 ~ 377
- 37 Robert AK. Biodegradation of ¹⁴Cbenzo(a)pyrene added on crude oil to uncontaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**(11): 4511 ~ 4515
- 38 Robert AK, Richard B, Kazuya W. Rapid mineralization of Benzo(a)pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Appl. Environ. Microbiol* 2000, **66**:4205 ~ 4211
- 39 Robert AK, Shigeaki H. Biodegradation of high-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol*, 2000, **182**(8): 2059 ~ 2067
- 40 Johnson AC, and Larsen D. The distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments of Penobscot Bay (Maine, USA) in relation to possible sources and to other sites worldwide. *Mar Environ Res*, 1985(15): 1 ~ 16
- 41 Song YF(宋玉芳), Sun TH(孙铁珩), Xu HX(许华夏). Effect of surfactant TW-80 on biodegradation of PAHs in soils. *Chin J Appl Ecol (应用生态学报)*, 1999, **10**(2):230 ~ 232
- 42 Zaidi BR. and Imam SH. Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the Caribbean coastal water. *Mar Poll Bull*, 1999, **38**(8): 737 ~ 742
- 43 Head LM. and Swannell RPJ. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr Opinion Biotechnol*, 1999, **10**: 234 ~ 239
- 44 Shiaris MP. and Cooney JJ. Replica plating method for estimating phenanthrene-utilizing and phenanthrene-cometabolizing microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45**: 706 ~ 710
- 45 Geiselbrecht A D. Enumeration and phylogenetic analysis of Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget sound sediments, *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3344 ~ 3349
- 46 Geiselbrecht AD, Hedcund BP, Tichi MA, Staley JT. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the gulf of mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(12):4703 ~ 4710