

基于均匀设计优化新鞘氨醇菌US6-1 对高分子量多环芳烃的降解条件*

郑伟^{1,2} 田蕴^{1**} 郑天凌^{1,2**}

(¹厦门大学生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室(厦门大学) 厦门 361005)

(²近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学) 厦门 361005)

摘要 运用均匀设计优化一株新鞘氨醇菌 *Novosphingobium pentaromativorans* strain US6-1 对芘、荧蒹、苯并[a]芘等高分子量多环芳烃 (High molecular weigh polycyclic aromatic hydrocarbons, HMW-PAHs) 的降解条件. 结果表明, 在最适生长条件 (30 °C、pH 6.5及NaCl浓度为2.5%) 下, 接种量与底物浓度是影响该菌降解能力的关键因素. 在接种量 $D_{660\text{ nm}}$ 为0.6、芘初始浓度56 mg L⁻¹、培养时间5 d的情况下, 菌株US6-1对芘的降解达到32.5 mg L⁻¹, 预测平均准确率达99.38%; 在接种量 $D_{660\text{ nm}}$ 为0.6、荧蒹初始浓度48 mg L⁻¹、培养时间5 d的情况下, 对荧蒹的降解达到34.3 mg L⁻¹, 预测平均准确率达99.61%; 在接种量 $D_{660\text{ nm}}$ 为0.1、苯并[a]芘初始浓度60 mg L⁻¹、培养时间为5 d时, 对苯并[a]芘的降解达到24 mg L⁻¹, 预测平均准确率达98.75%. 菌株US6-1对芘及苯并[a]芘的降解能力比未优化前分别提高了29.2%与58%. 图1 表5 参21

关键词 新鞘氨醇菌; 均匀设计; 高分子量多环芳烃 (HMW-PAHs); 生物降解; 接种量

CLC X172

Using Uniform Design to Optimize Degradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HMW-PAHs) by *Novosphingobium pentaromativorans* Strain US6-1*

ZHENG Wei^{1,2}, TIAN Yun^{1**} & ZHENG Tianling^{1,2**}

(¹Key Laboratory of Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

(²State Key Laboratory for Marine Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract The uniform design was applied to optimize the degradation of high molecular weigh polycyclic aromatic hydrocarbons (HMW-PAHs) by *Novosphingobium pentaromativorans* strain US6-1. It was found that inoculum size ($D_{660\text{ nm}}$) and PAHs initial concentration were the critical factors under the optimal biodegradation condition (30 °C, pH 6.5 and 2.5% NaCl). The degraded pyrene was 32.3 mg L⁻¹ within 5 days at the inoculum size of 0.6 ($D_{660\text{ nm}}$) and pyrene initial concentration of 56 mg L⁻¹. The degraded amount of fluoroanthene (34.3 mg L⁻¹) reached largest after 5 days, when the inoculum size was 0.6 ($D_{660\text{ nm}}$) and fluoroanthene initial concentration 56 mg L⁻¹. Totally, 23.7 mg L⁻¹ benzo[a]pyrene was removed after 5 days with an inoculum size of 0.1 ($D_{660\text{ nm}}$) and benzo[a]pyrene initial concentration of 60 mg L⁻¹. The verified experiment showed that the predicted degrading capabilities were fitted the optimum degrading capabilities very well, and the accuracy rate approached 99.38%, 99.61% and 98.75%, respectively. It improved the abilities of pyrene and benzo [a] pyrene degradation by over 29.2% and 58%, respectively. It means that the biodegradation condition by strain US6-1 has been optimized initially. Fig 1, Tab 5, Ref 21

Keywords *Novosphingobium pentaromativorans*; uniform design; high molecular weigh polycyclic aromatic hydrocarbons (HMW-PAHs); biodegradation; inoculum size

CLC X172

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类由化石燃料的开采与使用、有机燃料的不完全燃烧等人类行为产生的有机污染物, 主要由两个或两个以上的苯环以线形排列、弯接或簇聚的方式形成, 在环境中广泛分布, 以其致癌、致畸及致突变的“三致”作用而受到人们的关注. 大量

研究表明, 微生物降解是去除环境中PAHs污染的主要途径. 人们对三环以下的低分子量多环芳烃 (Low molecular weigh-PAHs, LMW-PAHs) 的微生物降解研究比较深入, 而对高脂溶性、难挥发的4个或4个以上苯环组成的高分子量多环芳烃 (High molecular weigh-PAHs, HMW-PAHs) 的研究进展相对缓慢. 在寻找新的降解微生物的同时, 对现有的HMW-PAHs降解微生物进行降解条件的优化, 使其拥有更好的降解性能, 成为开展HMW-PAHs微生物降解研究的前提条件之一^[1].

人们最初是从单一因子开始对HMW-PAHs降解微生物进行降解条件的优化研究, 已有的研究表明, 碳氮比^[2]、盐度^[3]、培养温度^[4]和PAHs的生物利用性^[5]等都是影响微生物对PAHs降解的重要因素. 由于微生物降解是一个复杂的生

收稿日期: 2010-03-11 接受日期: 2010-05-07

*国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) 项目 (No. 2008AA09Z408)、国家自然科学基金项目 (Nos. 40976069, 40930847) 和福建省科技计划重点项目 (No. 2008Y0061) 资助 Supported by the National High Technology R & D Program of China (No. 2008AA09Z408), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 40976069, 40930847) and the Key Project of the Science and Technology Program of Fujian, China (No. 2008Y0061)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tianyun@xmu.edu.cn; wshwzh@xmu.edu.cn)

理代谢过程,受环境中理化因子及PAHs生物利用性等因素的共同影响与制约,单因素的研究无法全面地揭示各因子之间的相互作用,其优化效果往往不尽人意^[6]。目前关于PAHs微生物降解过程中的多因素相互作用了解还较匮乏,对多因子PAHs降解条件优化的报道很少。

在对多因素降解条件的优化中,最直接的是运用全因子试验法检测每一组可能组合的实验效果,可是由于巨大的工作量使其在实际操作中并不可行,于是人们尝试运用正交实验设计(Orthogonal experimental design)从多因素、多水平研究微生物的降解能力,在充分考虑多因素交互作用的同时,减少了工作量,提高了工作效率^[7-8]。与“正交设计”相比,由中国著名数学家方开泰教授和王元院士合作共同发明的“均匀设计”(Uniform design),其试验点比正交设计的试验点分布得更均匀,因而具有更好的代表性。故均匀设计可以用较少的试验次数,安排多因素、多水平的析因试验,是在均匀性的度量下较好的析因试验设计方法。均匀设计也是仿真试验设计和稳健设计的重要方法,已经广泛运用于各种寻优过程^[9-10]。目前尚未有将均匀设计运用于PAHs,尤其是HMW-PAHs微生物降解条件优化的文献报道。

本实验尝试运用均匀设计的方法,多因素、多水平地优化菌株US6-1对芘、荧蒹及苯并[a]芘的降解条件,研究在多环芳烃代谢过程中不同理化因子对菌株降解能力的影响及各因子间的交互作用,分析降解过程中的关键因素,评估菌株US6-1对芘、荧蒹及苯并[a]芘的降解潜力,为实现PAHs污染环境的生物修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验菌株 *Novosphingobium pentaromativorans* strain US6-1^[11],由韩国海洋研究院提供。

1.2 试剂与培养基

菲、芘、荧蒹和苯并[a]芘等PAHs购自Sigma公司,纯度 $\geq 99\%$,甲醇、二氯甲烷、正己烷购于TEDIA(美国)公司,均为HPLC级,蛋白胨、酵母浸出膏为Difco公司产品。

PAHs/二氯甲烷溶液配制:称取上述4种PAHs各0.1 g,分别溶解于10 mL二氯甲烷,使其终浓度为10 mg mL⁻¹。

2216E培养基(1 000 mL):蛋白胨5 g,酵母浸出膏1 g,磷酸高铁0.01 g,陈海水750 mL,蒸馏水250 mL, pH 7.6~7.8, 1 $\times 10^5$ Pa灭菌20 min。

MM2培养基(1 000 mL):硫酸亚铁0.278 mg, 1 mol/L磷酸二氢钾0.1 mL,硫酸铵2.3 g,混合环糊精(MCD)10 g,陈海水750 mL,蒸馏水250 mL, pH 7.2, 1 $\times 10^5$ Pa灭菌20 min。

1.3 菌种的活化与收集

在无菌条件下将菌株US6-1接种到100 mL 2216E液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min振荡培养24 h, 8 000 r/min离心10 min,去上清收集菌体,再用灭菌的MM2液体培养基重悬, 8 000 r/min离心10 min,反复3次。最终,将所得菌体重悬于适量的MM2液体培养基中,配成一定浓度的菌悬液备用。

1.4 均匀设计方案

选用均匀设计表 $U_6(6^3)$ 设计试验方案。拟选三因素,即 X_1 —接种量($D_{660\text{nm}}$), X_2 —底物浓度(mg L⁻¹), X_3 —培养时

间(d),见表1。测定不同条件下菌株US6-1对芘、荧蒹、苯并[a]芘的降解能力。利用DPS数据处理系统(Data Processing System,版本2.0)分析所得数据,建立菌株US6-1对芘、荧蒹、苯并[a]芘的最佳降解力模型,预测最佳值^[9],并对降解力模型进行检验。

表1 均匀设计实验参数
Table 1 Parameters of the uniform design

处理 Treatment	接种量 Inoculum size ($X_1, D_{660\text{nm}}$)	底物浓度 Initial concentration ($X_2/\text{mg L}^{-1}$)	培养时间 Time (X_3/d)
1	0.2	10	3
2	0.6	50	2
3	0.3	60	4
4	0.1	40	1
5	0.4	20	0
6	0.5	30	5

1.5 降解率测定

在无菌条件下移取一定量的HMW-PAHs/二氯甲烷溶液加入到已灭菌的20 mL MM2液体培养基中,再加入预先制备的菌悬液至一定的菌体终浓度($D_{660\text{nm}}$), 30 $^{\circ}$ C、150 r min⁻¹振荡培养,以未接菌的含芘、荧蒹、苯并[a]芘的MM2培养基为对照,每隔24 h取样整瓶萃取,样品和对照每次均设3个平行。每次萃取前,往待萃取的三角瓶的菌液中加入20 μ L浓度为10 mg mL⁻¹的菲做为内标,加入20 mL二氯甲烷,超声清洗器中超声15 min,然后全部倒入分液漏斗中,另取5 mL二氯甲烷于三角瓶中清洗瓶壁,重复3次并将洗液移入分液漏斗中。萃取收集有机相,经无水硫酸钠去除残留水相,于旋转蒸发器上旋蒸浓缩,最终定容至1 mL。用注射器吸取有机相,经0.45 μ m孔径的有机相滤器过滤后移入2 mL色谱瓶中, -20 $^{\circ}$ C保存待测。

测定用色谱柱为Agilent Hypersil C18柱(4.0 \times 250 μ m, 5 μ m);柱温25 $^{\circ}$ C;紫外检测器检测波长为254 nm;流动相为甲醇/MilliQ水(90/10),流速为1 mL min⁻¹;进样体积5 μ L。数据处理及分析采用Agilent化学工作站。

2 结果与分析

2.1 不同处理条件下菌株US6-1对HMW-PAHs的降解

前期实验结果表明,菌株US6-1的最适生长条件为30 $^{\circ}$ C, pH 6.5及NaCl浓度为2.5%^[11]。在此基础上,测定了不同处理条件下菌株US6-1对3种HMW-PAHs的降解效果,结果如图1所示。菌株US6-1在实验条件6($D_{660\text{nm}}$ 为0.5,底物浓度为30 mg L⁻¹,培养时间为5 d)时可以完全降解浓度达25.5 mg L⁻¹的芘,在实验条件2($D_{660\text{nm}}$ 为0.6,底物浓度为50 mg L⁻¹,培养2 d)时可以完全降解浓度为27 mg L⁻¹的荧蒹,在实验条件3($D_{660\text{nm}}$ 为0.3,底物浓度为60 mg L⁻¹,培养时间为4 d)时对苯并[a]芘的降解能力达到23.4 mg L⁻¹。所得实验数据将输入DPS数据处理系统,进行进一步的统计学分析。

2.2 芘、荧蒹及苯并[a]芘降解力模型的构建及降解潜力的预测

将2.1的实验结果输入到DPS数据处理系统,利用二元回归法构建降解力预测模型,并对该模型进行显著性检验,所得回归方程依次为:

$$Y_{(\text{芘})} = 22.6718 + 0.0529X_2 - 8.5335X_3 - 53.4027X_1X_2 +$$

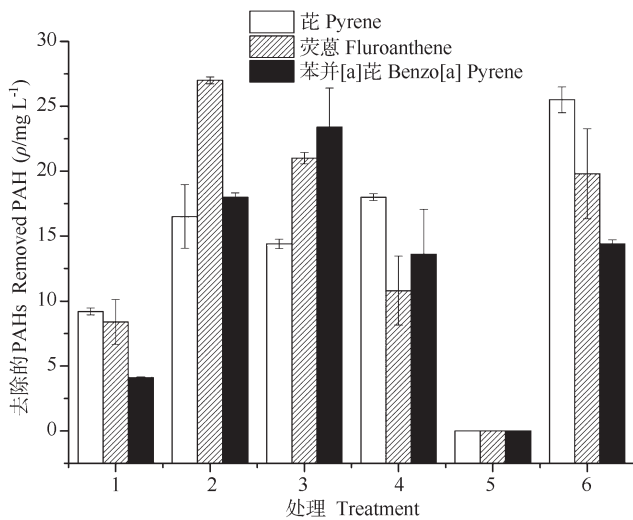


图1 不同处理条件下菌株US6-1对HMW-PAHs的降解

Fig. 1 HMW-PAHs degradation by *N. pentaromaticivorans* US6-1 under different treatments

竖条表示标准差 Bars indicate standard deviation (N=3)

22.9031 X_1X_3 , 其中相关系数 $R = 1.000\ 00$, F 值= 64 505.091 1, 显著水平 $P = 0.0030 < 0.05$, 各项式平均显著水平 $\bar{u} < 0.05$, 因此回归方程显著。

$Y_{(荧蒽)} = 12.8346 - 91.65750X_1 + 2.67447X_3 + 105.1202X_1X_1 + 0.8741X_1X_2$, 其中相关系数 $R = 0.999\ 99$, $F = 8\ 508.809\ 7$, 显著水平 $P = 0.0081 < 0.05$, 各项式平均显著水平 $\bar{u} < 0.05$, 因此回归方程显著。

$Y_{(苯并[a]芘)} = -10.0846 - 3.2929X_1 + 0.5720X_2 + 3.590357143X_3 - 0.0595X_2X_3$, 其中相关系数 $R = 0.999\ 94$, $F = 2\ 226.865\ 5$, 显著水平 $P = 0.0159 < 0.05$, 各项式平均显著水平 $\bar{u} < 0.05$, 因此回归方程显著。

比较3个回归方程中各个因子的显著水平 (P) (表2、表

表2 芘降解力回归方程参数

Table 2 Parameters of the pyrene degrading regression equation

因素 Factor	偏相关 Partial correlation	t	P
X_2	0.99994	89.27902	0.00013
X_3	-1.00000	382.70130	0.00002
X_1X_1	-0.99999	296.91533	0.00001
X_1X_3	1.00000	430.77600	0.00001

表3 荧蒽降解力回归方程参数

Table 3 Parameters of the fluroanthene degrading regression equation

因素 Factor	偏相关 Partial correlation	t	P
X_1	-0.00087	61.33959	0.00027
X_3	0.99993	84.67126	0.00034
X_1X_1	0.99977	46.14544	0.00047
X_1X_2	0.99993	86.60899	0.00013

表4 苯并[a]芘降解力回归方程参数

Table 4 Parameters of the benzo[a]pyrene degrading regression equation

因素 Factor	偏相关 Partial correlation	t	P
X_1	-0.99923	89.27902	0.00013
X_2	0.99974	43.81565	0.00052
X_3	0.99928	26.40507	0.00143
X_2X_3	-0.99763	14.49732	0.00471

3、表4)可知, $P_{(X_1)}$ 均小于 $P_{(X_2)}$ 及 $P_{(X_3)}$, 说明接种量是影响回归模型的重要因子, 同时各因素之间存在的交互作用也会对降解能力产生一定的影响。

通过所得的回归方程可预测菌株US6-1对芘、荧蒽和苯并[a]芘的降解潜力。菌株US6-1在接种量 $D_{660\text{ nm}}$ 为0.6、芘初始浓度 56 mg L^{-1} 、培养时间5 d的情况下, 32.5 mg L^{-1} 的芘被降解; 在接种量 $D_{660\text{ nm}}$ 为0.6、荧蒽初始浓度 48 mg L^{-1} 、培养时间5 d时, 34.3 mg L^{-1} 的荧蒽被降解; 在接种量 $D_{660\text{ nm}}$ 为0.1、苯并[a]芘初始浓度 60 mg L^{-1} 、培养时间5 d时, 24 mg L^{-1} 的苯并[a]芘被降解。

2.3 降解潜力的检验

为检验降解力模型预测的准确率, 进行了验证实验, 结果如表5所示。实际测得芘的最大降解量为 32.3 mg L^{-1} , 降解速率达到 $6.46\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$, 预测准确率达到了99.38%; 对荧蒽的最大降解量为 34.2 mg L^{-1} , 降解速率达到 $6.86\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$, 预测准确率达到了99.61%; 对苯并[a]芘最大降解量为 23.7 mg L^{-1} , 降解速率达到 $4.74\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$, 预测准确率达到了98.75%。

表5 验证实验的结果

Table 5 The results of verified experiment

PAHs	接种量 Inoculum size ($D_{660\text{ nm}}$)	初始浓度 Initial concentration ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	培养时间 Time (t/d)	降解力预测值 Predicted value ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	降解力实测值 Measure value ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	预测准确率 Accuracy rate ($r/\%$)
Pyrene	0.6	56	5	32.5	32.3	99.38
Fluroanthene	0.6	48	5	34.3	34.2	99.61
Benzo[a]pyrene	0.1	60	5	24.0	23.7	98.75

3 讨论

由于其自身的结构和特性, HMW-PAHs在环境中较稳定, 难于被降解, 故被列入难降解物。研究表明, 在自然界中能矿化HMW-PAHs并以其作为唯一碳源和能源的微生物也比较少。如何有效地提高微生物对HMW-PAHs的降解能力一直是困扰研究者的一大难题。目前, 人们多用梯度驯化^[11]或者共代谢的方法^[12], 可是结果并不十分理想。优化微生物降解HMW-PAHs的条件, 可通过改善一些可控因子, 一方面提高HMW-PAHs的生物可利用性, 一方面让微生物调整到最佳的降解状态, 以提高其对HMW-PAHs的降解效率。

本实验结果表明, 在最适生长条件 ($30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 6.5$ 及 NaCl 浓度为2.5%)下, 接种量是影响菌株US6-1对HMW-PAHs降解的关键因素。菌株US6-1在高接种量的情况下对四环的芘和荧蒽的降解效果较好, 而对五环的苯并[a]芘的降解需要降低细菌的接种量。培养体系中处于溶解态的HMW-PAHs为菌株US6-1提供了生长所需的唯一碳源, 其浓度高低可能会影响菌株的生理活性及种群的规模。HMW-PAHs独特的分子结构使其在水中溶解度很低, 为此在本实验中加入混合糊精 (MCD) 以促进HMW-PAHs在培养体系中的溶解度。MCD是一类表面活性剂物质, 其分子具有亲水基团和疏水基团。MCD分子先与HMW-PAHs分子相结合形成HMW-PAHs-MCD复合基团, 其中MCD的亲水基分布于该复合基团的表面, 通过这一作用促进了HMW-PAHs在水中的溶解。可是随着PAHs苯环数目的增加, 结合一分子PAH所需的MCD分子数量也逐步增加。研究表明, 一分子MCD可以与一分子

的四环以下的PAHs结合形成PAHs-MCD复合体,但对五环的HMW-PAHs,则需要2~3分子MCD才能与其充分结合.这导致MCD对五环的苯并[a]芘的增溶作用弱于对其它四环多环芳烃的增溶作用,使得培养体系中处于溶解态的苯并[a]芘的量仍然少于四环的HMW-PAHs^[21].在以苯并[a]芘为底物的降解体系中,较少的接种量有利于菌株个体在低浓度的可利用碳源(处于溶解态的苯并[a]芘)的情况下获得相对充足的营养,有利于菌体的正常生长.同时,底物浓度的高低也能对菌体的降解能力产生影响.在本次实验所设定的初始浓度范围($\leq 60 \text{ mg L}^{-1}$)内,高浓度底物比低浓度底物更能诱导提高菌株对HMW-PAHs的降解能力.适当过量初始底物有可能在降解过程中不断补充被微生物利用溶解态的HMW-PAHs,使溶解态的HMW-PAHs浓度保持在一个动态稳定的范围之内,为菌株的生长提供必需的碳源.

4 小结

经实验优化,菌株US6-1对芘与苯并[a]芘的降解速率分别达到 $6.46 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 与 $4.74 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$,其降解能力不仅比未优化前($5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 和 $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)^[11]分别提高29.2%与58%,也高于其它已报道的HMW-PAHs降解菌的降解能力^[13-20].利用均匀设计方法,可进一步全面分析多重因素,如碳/氮、盐度、温度、pH、辅助碳源、复合污染物等对微生物降解能力的影响,将有利于建立适用于复杂环境的PAHs微生物降解模型,从而实现对PAHs污染环境的快速修复.

References

- Kanally RA, Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol*, 2000, **182** (8): 2059~2067
- Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environ Pollut*, 1993, **81** (3): 229~249
- Kerr RP, Capone DG. The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. *Mar Environ Res*, 1988, **26** (3): 181~198
- Mohn WW, Stewart GR. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in arctic soils. *Sol Biol Biochem*, 2000, **32** (8-9): 1161~1172
- Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour Technol*, 2000, **74** (1): 63~67
- Li YS (李玉双), Zhu RG (祝儒刚), Zhong M (钟鸣), Zhou QX (周启星), Liu SX (刘少霞). The optimization of cultural conditions for one phenanthrene-degrading strain and study on its characteristics. *Chem & Bioengin (化学与生物工程)*, 2006, **23** (1): 39~42
- Chen J, Wong MH, Wong YS, Tam Nfy. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Mar Pollut Bull*, 2008, **57** (6-12): 695~702
- Chen, JL, Au KC, Wong YS, Tam, Nfy. Using orthogonal design to determine optimal conditions for biodegradation of phenanthrene in mangrove sediment slurry. *J Hazard Mater*, 2010, **176** (1-3): 666~671
- Lin Y (林毅), Cai FY (蔡福营), Yuan YX (袁宇熹), Zhang GY (张光亚). A uniform design based PCA-SVM model for predicting optimum pH in chitinase. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2007, **23** (3): 514~519
- Zhang GY (张光亚), Li M (李猛), Fang BS (方柏山). A uniform design base neural network model for amino acid and optimum temperature of alcohol dehydrogenase. *Comput & Appl Chem (计算机与应用化学)*, 2006, **23** (10): 955~958
- Sohn JH, Kwon KK, Kang JH, Jung HB, Kim SJ. *Novosphingobium Pentaromativorans* sp. Nov. a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *Int J Syst Bacteriol*, 2004, **54**: 001~006
- Luan TG, Yu KSH, Zhong Y, Zhou HW, Lan CY, Tam Nfy. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere*, 2006, **65** (11): 2289~2296
- Yuan SY, Wei SH, Chang B. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere*, 2000, **41** (9): 1463~1468
- Zheng TL (郑天凌), Luo YR (骆苑蓉), Cao XX (曹晓星), Huang X (黄栩), Hu Z (胡忠), Tian Y (田蕴). Advances in research of microbial degradation of high Molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons benzo(a)pyrene. *Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报)*, 2006, **12** (6): 100~110
- Luo YR (骆苑蓉), Hu Z (胡忠), Zheng TL (郑天凌), Huang X (黄栩). Biodegradation of benzo[a]pyrene by mangrove microbial consortium. *J Xiamen Univ Nat Sci (厦门大学学报自然科学版)*, 2005, **44** (Sup): 75~79
- Xu H (徐虹), Zhang J (章军), Liu CL (刘陈立), Shao ZZ (邵宗泽). Isolation and identification of PAH-degradating strains and their degradation capability. *Mar Environ Sci (海洋环境科学)*, 2004, **23** (3): 61~64
- Hou SY (侯树宇), Zhang QM (张清敏), Yu HC (余海晨), Duo M (多森), Bai Y (白晔), Zhang Y (张杨), Sun HW (孙红文). Optimized cultivation of high-efficient degradation bacterial strains and their degradation ability towards pyrene. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis (南开大学学报自然科学版)*, 2006, **39** (2): 71~74
- Yin B (殷波), Gu JD (顾继东). Degradation of naphthalene, anthracene, phenanthrene and pyrene by aerobic microorganism. *J Trop Oceanogr (热带海洋学报)*, 2005, **24** (4): 14~21
- Sheng XF (盛下放), He LY (何琳燕), Hu LF (胡凌飞). Isolation of a benzo[a]pyrene-degrading strain and its degradation condition. *Acta Sci Circumst (环境科学学报)*, 2004, **25** (6): 791~795
- Mao J (毛健), Luo YM (骆永明), Teng Y (滕应), Li ZG (李振高), Wu YC (吴宇澄). Isolation and characterization of a high-molecular-weight (HMW) PAHs degrading bacterial strain. *Microbiology (微生物学通报)*, 2008, **35** (7): 1011~1015
- Wang JM, Maier RM, and Brusseau, ML. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) on the bioavailability and biodegradation of pyrene. *Chemosphere*, 2005, **60** (5): 725~728