

海洋环境中降解多环芳烃的微生物

PAH – degrading microorganisms in marine environment

田 蕴 , 郑天凌

(厦门大学 生命科学学院 应用与环境微生物研究所, 福建 厦门 361005)

中图分类号 Q55

文献标识码 A

文章编号 :1000 – 3096(2004)09 – 0050 – 06

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, 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。由于其自身的疏水性及低水溶性,能很快进入到沉积环境中,可长期存在,并且随着苯环数量增加,多环芳烃的脂溶性越强,水溶性越低,在环境中存在时间越长,遗传毒性越高,致癌性增强^[1,2]。通过生物累积及食物链的传递作用给海洋生物体、生态环境和人体健康带来极大危害,已引起各国科学家的极大重视。美国环保局在80年代初把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]。海洋环境中分布着数量极其庞大,种类繁多的微生物,它们在物质循环、能量流动、生态平衡及环境净化等方面担当着重要的角色。因其高速度的繁殖、代谢的多样性、遗传变异性使它的酶体系能够以最快的速度适应外界环境的变化,能在各种不同的自然环境中生长,具有降解或转化有机污染物的巨大潜能。因此,开展海洋环境中多环芳烃降解微生物的分布调查,同时从中分离并获得高效的多环芳烃降解菌株是了解海洋环境中微生物对多环芳烃的作用及其归宿的前提步骤,也才能更有效地应用在生物治理技术中,这也正是目前各国科学家致力发展生物修复技术的基础^[5]。

1 降解多环芳烃的海洋微生物种类

许多细菌、真菌及藻类都具有降解多环芳烃的

能力^[6]。暴露于多环芳烃污染的沉积物环境中的微生物能提高多环芳烃的降解速率^[7,8]。Herbes^[9]的研究中发现受污染环境多环芳烃的转化率是未受污染的3 000倍以上。微生物会逐渐适应污染区的特定条件。因此,为了缩短适应的期限,提高多环芳烃的生物降解速率,常常从受污染的环境中分离并培养降解速率最大的优势菌株,然后再把它们用于污染环境的生物治理。有研究报道了把对某区域适应性特强的优势微生物菌株进行实验室培养后,再将其引入受同类多环芳烃污染的区域,常常能起到有效的作用。Vecchioli等^[10]报道了用这种方法处理受石油污染的土壤,烃的去除率提高了22%。由此可见,从受污染环境中分离能高效降解多环芳烃的优势微生物菌株,是当前进行多环芳烃污染环境生物修复的关键所在。

1.1 海洋环境中降解多环芳烃的细菌

一般来说,多环芳烃的降解速度与芳香环数目有关,因此低分子质量的多环芳烃(含2~3个芳香环)的降解速度比高分子量的多环芳烃(含4个和4个以上芳香环)要快得多,人们对降解低分子质量的多环芳烃的微生物的研究比较深入,并且研究多集中在土壤和淡水沉积物中多环芳烃的微生物降解,但对于高环多环芳烃生物降解、海洋环境中降解多环芳烃的微生物的研究却并不广泛^[6,11]。

目前,已从海洋沉积物中分离到了一些降解多环芳烃的微生物,大多数是对低分子质量多环芳烃如

收稿日期:2002-12-16;修回日期:2003-05-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070157);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项目

作者简介:田蕴(1967-),女,讲师,博士,主要从事海洋环境中有机污染的生物修复研究,电话:0592-2184866

萘、菲等有降解能力的微生物、文献报道的一些海洋环境中降解多环芳烃的微生物列于表 1。其中 *Cycloclasticus*、*Vibrio*、*Pseudalteromonas*、*Neptunomonas* 等属的一些种,是海洋特有的微生物,因此可以认为海洋环境多环芳烃降解中很重要的一部分是由海洋特有的微生物来完成的。人们虽然也从海洋沉积物中分离得到了假单胞菌和 *Sphingomonas* 菌株,但这些菌株以及其它由土壤及淡水沉积物中分离得到的多环芳烃降解菌株——*Burkholderia*、*Comamonas* 等,在海洋环境中

的存在数量及生态分布还不清楚。

作者从厦门西港的沉积物中分离得到 2 株降解高环多环芳烃—芘的降解菌,对其 16SrDNA 的扩增产物进行测序,将 2 种降解菌的 16SrDNA 序列分别与国际分子生物学数据库中已知序列进行比较,得到 2 株细菌在分类学中的位置分别为 *Ochrobactrum* sp. 和 *Pandoraea* sp.。

Shiaris 实验室^[33]认为从海洋环境分离得到的优势菌可能比从陆地分离到的菌株在海洋环境多环芳

表 1 海洋环境中降解 PAHs 的微生物

化合物	微生物
萘	<i>Pseudomonas putida</i> PpN1 ^[12] ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> strains ^[13-15] ; <i>P. testosteron</i> ^[15] ; <i>Pseudalteromonas</i> ^[15] ; <i>Marinobacter</i> sp. ^[16] ; <i>Moraxella</i> sp. ^[17] ; <i>Sphingomonas aromaticivorans</i> F199 ^[18] ; <i>Cycloclasticus</i> sp. ^[19,20] ; <i>Neptunomonsa naphthovorans</i> ^[21] ; <i>Capitella capitata</i> ^[22] ; <i>Oscillatoria</i> sp. strain JCM ^[23]
蒽	<i>Cycloclasticus</i> sp. ^[19] ; <i>Neptunomonsa naphthovorans</i> ^[21]
菲	<i>Pseudomonas</i> sp. ^[24] ; <i>Flavobacterium</i> ^[24,25] ; <i>Vibrio cyclotrophicus</i> ^[20] ; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^[26] ; <i>Vibrio fluvialis</i> ^[26] ; <i>Vibrio</i> sp. ^[26] ; <i>Nocardioidea</i> sp. KP7 ^[27] ; <i>Mytilus edulis</i> ^[28] ; <i>Cycloclasticus</i> strains ^[19] ; <i>Enterobacteriaceae</i> ^[26] ; <i>Agmenellum quadruplicatum</i> PR-6 ^[29] ; <i>Oscillatoria</i> sp. strain JCM ^[23] ; <i>Candida kru-sei</i> ^[30] ; <i>C. zeylanoides</i> ^[30] ; <i>Trichosporon penicillatum</i> ^[30] ; <i>Torulopsis glabrata</i> ^[30] ; <i>Rhodotorula rubra</i> ^[30]
蒽	<i>Cycloclasticus</i> sp. ^[20] ; <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ^[31] ; <i>Cycloclasticus pugetii</i> ^[32]

烃降解中的作用更重要。至今为止,已进行了系统发育分析的海洋多环芳烃降解菌还不多,只有 *Cycloclasticus pugetii*^[20]、*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*^[16]、*Vibrio* sp.^[22] 和 *Neptunomonas naphthovorans*^[21] 等。

1.2 海洋环境中降解多环芳烃的其它微生物

在海洋环境中丝状真菌和酵母菌非常普遍,它们在多环芳烃降解中的作用也非常重要,已分离出一些具有多环芳烃降解能力的海洋丝状真菌和酵母,如 *Trichosporon penicillatum* 降解菲的能力特别强^[28,34,35]。由于 *Trichosporon* 菌株能利用十六烷和煤油,因此, *Trichosporon* 菌株可以作为检测多环芳烃降解的酵母菌模式菌株应用于生物修复。

酵母菌在营养丰富的水中数量较多,在未被污染的水中数量较少。在海岸沉积物中,酵母菌的浓度从 $10^2 \sim 10^4$ 个/g 不等,Macgillivray 等^[30]1993 年对分离得到的 13 株酵母菌的转化菲实验表明,它们降解活力范围较宽,120h 的降解率为 $0.15 \sim 8.15 \mu\text{mol/g}$,相当于每个细胞降解 $8.04 \times 10^{-10} \sim 10.80 \times 10^{-12} \mu\text{mol}$ 菲,与报道的菲降解菌 *Beijerinckia* sp. strain B1 相当 $[3.6 \times 10^{-11} \mu\text{mol/细胞}]$,因此可以说酵母菌用于降解多环芳烃具有巨大潜力。

2 环境中微生物对多环芳烃污染的指示作用

环境中数量庞大、种类繁多的微生物,其细胞个体微小、分裂时间短,对环境的变化能迅速作出反应,使群落结构、生物量、生产力等发生变化。微生物在消除有机污染物时种群数量会表现很高,尤其是有机污染物降解菌的数量。随着污染物浓度的下降,污染物降解菌的数量也会降低^[36]。因此,环境中降解菌的种群动态、微生物群落结变化等特征对有机污染的水平及生物修复的程度具有一定的指示作用。

2.1 多环芳烃降解菌对多环芳烃污染的指示

多环芳烃诱导作用及微生物对长期暴露于多环芳烃的适应性都能促进环境中多环芳烃的降解。环境中多环芳烃降解微生物与多环芳烃的含量密切相关。一般来说,污染的海洋沉积物中多环芳烃降解菌的数量比未污染海洋沉积物中的多,并且降解多环芳烃的能力也远远高于未受污染区域^[37]。Mcnelly 等^[28]对 Keweenaw 湾和 Trenton 海峡的微生物调查中,发现在这两个区域的异氧菌总数和 PAHs 的降解微生物的数量相当,而微生物的优势菌株不同, Keweenaw 湾(68

种)的微生物种类多于 Trenton 海峡(57种),但 Ke-weenaw 湾(3种)多环芳烃降解微生物的种类明显少于 Trenton 海峡(18种),两者区别的原因在于受 PAHs 污染程度的不同。Geiselbrecht 等^[20]研究中,采用 PAH-MPN 法测定 Puget Sound 中不同站点的沉积环境多环芳烃降解微生物的分布(Puget Sound 中多环芳烃的主要来源是杂酚油,该化合物的多环芳烃含量达到 85% 以上),发现在受到多环芳烃严重污染的区域,降解微生物的含量达到 10^7 个/g;而在污染程度较轻的区域,降解微生物的含量仅为 10^3 个/g。

单层平板细菌培养技术可提供活的降解菌的数目^[39],但一些非降解菌可能依靠污染了的琼脂和实验室空气中的有机物或降解菌的代谢产物而在平板上生长,因此这种计数技术可能会高估降解菌的真正数目。多管发酵计数技术使用一种混有有机污染物成分的液体无机培养基,克服了其他因素的干扰,但这种技术需要大量的玻璃器皿,且培养时间长,需要 1~4 个月才能得到满意的结果^[40]。双层平板计数技术,是将环境样品接种到冷却的但仍呈溶解状态的琼脂液中,琼脂液中均匀地混有多环芳烃,然后将这种琼脂液倒入已凝固的无机盐琼脂底板表面,这样既避免了污染又可以通过多环芳烃消失而产生的透明圈来识别降解菌^[41]。因此,选择一种有效的计数技术,不仅可用于生物修复前多环芳烃降解菌的调查以指示多环芳烃的污染程度,也可用于生物修复过程中多环芳烃降解菌数量和活性的监测。

随着分子生物学的飞速发展,一些分子手段已被用来鉴定环境样品中的多环芳烃降解微生物或对不同酶的检测等。生物样品的反向基因组探针已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^[42]。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 *Pseudomonas 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^[43]。

2.2 微生物群落结构变化对多环芳烃污染的指示

近些年来,PCR-DGGE 的方法已越来越多地用于环境微生物群落的结构和功能的多样性的分析。DGGE 胶是在体积分数 6% 聚丙烯酰胺中添加线性梯度的变性剂(尿素或甲酰胺),变性剂的浓度从上到下,从低到高呈线性梯度,在一定温度下,在一定浓度

的变性剂浓度下,序列不同的产物,其部分解链程度也不同,而产物解链程度又直接影响其电泳迁移率,结果不同的产物在凝胶上分离开来。PCR-DGGE 的原理是直接从环境样品中抽提 DNA,用和 16SrDNA 保守区互补的一套引物进行 PCR,再将 PCR 产物进行变性梯度凝胶电泳(denaturing-gradient gel electrophoresis DGGE),分离产物混合物。PCR-DGGE 方法的最大优点是可不经过分离培养微生物,而直接从自然环境样品中提取 DNA,而且该方法允许多个样品快速初筛,因此在区别不同种群的最初调查及数量上占优势群落的鉴定中非常有用。Murray 等^[44]为了证实 San Francisco 海湾和 Tomales 海湾的浮游细菌群落组成的不同,利用 PCR-DGGE 的方法对这些浮游细菌集群的系统发育组成进行了分析研究,证实正是由于细菌种群上的差异,导致了两个海湾多环芳烃代谢能力的差异。

磷脂脂肪酸具有微生物种的特异性,该特异性随生长条件而改变,因此相对于个别种的定量鉴定而言,更宜用作监测群落结构发生变化的指标^[45]。

分析微生物群落结构的方法还有 PCR-RFLP、PA-PD 等,但均未见用于海洋环境多环芳烃降解菌群落分析的报道。Robert 等^[46]认为,随着对高分子量多环芳烃降解群落的微生物生态学和其生物降解机制的了解加深,可以预测这些化合物的环境命运,乃至能在不久的将来建立有实用价值的 PAHs 生物修复策略。

3 微生物在海洋多环芳烃污染生物修复中的作用

生物修复(Bioremediation)是指生物尤其是微生物催化降解环境污染物,减少或最终消除环境污染的受控或自发过程。由于自然的生物修复过程一般较慢,难以实际推广应用,一般指的是在人为促进条件下的生物修复。其它物理、化学治理方法,如填埋、燃烧等,对于污染物仅是稀释、聚集或不同环境中的迁移作用;化学方法易造成二次污染,而在生物修复作用下污染物则被转化为稳定的、无毒的终产物如水、CO₂、简单的醇或酸及微生物自身的生物量,最终从环境中消失。目前,生物修复技术由于环境影响小,处理的污染物阈值低、残留少等特点,已成为一种新的可靠的环保技术^[47]。80 年代末至 90 年代初美国环境保护局在阿拉斯加 Exxon Vadez 石油泄露导致海滩严重污染的生物修复项目中,短时间内消除了污染,治理了环境,是生物修复技术成功应用的开端,同时开创了生物修复在治理海洋污染环境中的应用。污染物的生物修复作用,本质上,是开发利用微生物的新陈代谢能力及基因的多样性,把污染物转化为无污染的

终产物,重新进入生物地球化学循环。

3.1 污染物的微生物降解进入到微生物能量网

微生物能在一定的环境中生存,离不开碳源和能源及一定的生态位。环境污染物常成为微生物潜在的能量来源。芳香烃化合物,含有不同的功能团,在微生物的作用下,污染物发生氧化分解,其中某些中间产物作为微生物生长的碳源,功能团形成营养物质,构成微生物食物网一部分,重新进入生物地球化学循环。环境中许多多环芳烃化合物均能被微生物全部或部分降解,微生物对污染物的降解能力常取决于微生物暴露于污染物时间的长短。在多环芳烃污染环境中,当多环芳烃浓度太低,不足以诱导土著微生物产生降解酶,土著微生物的生长速度太慢、代谢活性不高;当多环芳烃浓度太高,对于土著微生物具有毒害作用,会造成土著微生物的数量下降。

许多情况下,微生物会逐渐适应多环芳烃污染区的特定条件。为了缩短适应期限,提高多环芳烃的降解速率,常从污染的环境中分离并培育降解速率最大的微生物菌系,然后再把它们用于多环芳烃污染环境的生物修复。也有把对某区域适应性特强的微生物种类培养后,再引入到受同类污染物污染的环境中^[48]。一旦污染物的生物修复过程完成,这些菌株最终也会在环境中消亡。少数情况下接种的菌株长期存在于环境中,可能是由于环境竞争压力减少或其它生存机制,目前尚不清楚。

随着分子生物学技术的发展,采用细胞融合技术等遗传工程手段可以将多种降解基因转入同一微生物中,使之获得广谱的降解能力,即合成基因工程菌(Gene Engineering Microorganisms, GEMs)。多环芳烃在沉积物中多以混合物存在,已有研究报道,可把从小分子量多环芳烃降解菌中提取的质粒融合到大肠杆菌(*Escherichia Coli*)的DNA上,使其获得降解多环芳烃的能力,但对其研究目前仍主要在实验室进行^[49-50]。考虑到基因工程菌引入现场环境中可能与土著微生物菌群发生激烈的竞争以及会产生其它的变化,这方面的研究仍有待于深入。

3.2 生物修复过程中的微生物活性

微生物的活性强烈地影响生物修复的效果。生物修复作用的成功与否很大程度上与降解微生物群落在环境中的数量及生长繁殖速率有关。生物修复中引入菌种的成功与否与菌株的降解能力及在环境中的竞争力有关。菌株的生存受到许多因素的影响:pH、温度、氧化还原能力、氧、水分的供给等非生物因素及微生物之间的竞争、捕食等生物因素。

环境中多环芳烃以多组分存在或与其他污染物

共存,因此,处理各种化学性质不同的污染物常需要保持特殊和复杂的微生物种,并维持其降解活性,但实际应用中难以保持这种微生物种群的持久性。提高引入菌株生存机率包括引入足够的数量,以适当的方式引入,同时引入一种选择性的底物,创造一个新的生态位。这种方法的有效性及其安全性常引起争议,尤其是基因工程菌(GEMs)。因此,一般在应用生物修复技术引入菌种之前,应先做风险评价的研究。

在海洋环境中营养盐的缺乏常是限制微生物活性的重要因素^[51]。为了使污染物达到完全的降解,适当添加营养物可以明显地促进污染物的降解。目前,外加营养盐主要用于受石油烃化合物污染环境的生物修复。1989年,Exxon公司和美国环保局成功实施了“阿拉斯加研究计划”,主要采用生物修复技术来清除溢油的污染,这也是目前为止规模最大的现场生物修复工程。工程实施过程中在一些受污染的海滩有控制地添加了一种外表微乳化而内含N、P养分的肥料,发现相对于对照海滩,加入营养盐的海滩“变白”了,分析表明该海滩沉积物表面和次表面的异氧菌和石油降解菌的数量增加了1~2个数量级,石油污染物的降解速度提高了2~3倍,多环芳烃成分也降低了,使整个净化过程加快了近2个月^[52]。对该区的生态监测结果表明,与相邻区比较,处理区海水中养分浓度并未增加,对浮游植物的调查分析说明,施用该种肥料后并未影响藻类生长、叶绿素结果均在期望值内,施肥并未造成生态系统的任何不利影响^[53]。尽管添加营养盐已被广泛接受并用于一些污染事件的生物修复中,但关于外加营养盐对土著微生物种群及生物修复过程的影响还缺乏深入的研究^[54]。在制定生物修复方案计划中的一个难点便是如何确定添加营养盐的水平。

4 小结

由于海洋一个多元、多层次、庞大、复杂的系统,使得对其进行多环芳烃污染的生物修复成为一个难点。研究表明,在自然界中能矿化高环多环芳烃并以其作为唯一碳源和能源的微生物也比较少,对于海洋环境中的高分子量多环芳烃来说,有关其微生物修复方面的知识积累不多,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^[19-33],在国内目前除本课题组进行了一些初步的探索外,尚未见其他的研究报道。因此开展海洋环境中以微生物为主体的多环芳烃污染的生物修复研究是十分必要的。

参考文献:

- [1] Baird C. Environmental Chemistry [M]. New York: W.H. Freeman and Company Press, 1995. 276-278.

- [2] Stegeman J J, Lech J J. Cytochrome p - 450 monooxygenase system in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure[J]. **Environmental Health Perspectives**, 1991, 90: 101 - 109.
- [3] Varanas U. Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment[M]. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Inc., 1989. 26 - 32.
- [4] Gibson D T, Mahadevan V, Jerina R M, *et al.* Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene to dihydrodiols by a bacterium[J]. **Science**, 1975, 189: 295 - 297.
- [5] Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon: a review[J]. **Biodegradation**, 1992, 3: 351 - 368.
- [6] Harayama S. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design[J]. **Current Opinion in Biotech**, 1997, 8: 268 - 273.
- [7] Bauer J E, Capone D G. Effects of co - occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries[J]. **Appl Environ Microb**, 1988, 54: 1649 - 1655.
- [8] Thomas J M. Microbial ecology of the subsurface at an abandoned creosote waste site[J]. **Journal of Industrial Microbiology**, 1989, 4: 109 - 120.
- [9] Herbes S E, Schwall L R. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments[J]. **Appl Environ Microb**, 1978, 35: 306 - 316.
- [10] Vecchioli G I. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil[J]. **Environmental Pollution**, 1990, 67: 249 - 258.
- [11] Wilson S C, Jones K C. Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. **Environmental Pollutant**, 1993, 81: 229 - 249.
- [12] Ferrer C, Cozar E, Garcia - Valdes E, *et al.* Incp - 7 naphthalene - degradative plasmids from *Pseudomonas Putida*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1986, 36: 21 - 25.
- [13] Garcia - Valdes E, Cozar E, Lalucat J, *et al.* Molecular cloning of aromatic degradative genes from *Pseudomonas stutzeri* [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1989, 61: 301 - 306.
- [14] Bosch R, Garcia - Valdes E, Moore E R B. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene - degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10[J]. **Gene**, 2000, 245: 65 - 74.
- [15] Garcia - Valdes E, Cozar E, Rotger R, *et al.* New Naphthalene - degrading marine *Pseudomonas* strains[J]. **Appl Environ Microb**, 1988, 54(10): 2 478 - 2 485.
- [16] Gauthier M J, Lafay B, Christen R, *et al.* *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon - degrading marine bacterium[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1992, 43: 568 - 576.
- [17] Tagger S, Truffaut N, Petit J L. Preliminary study on relationships among strains forming a bacterial community selected on naphthalene from a marine sediment[J]. **Can J Microbiol**, 1990, 36: 676 - 681.
- [18] Romine M F, Stillwell L C, Wong K K, *et al.* Complete sequence of a 184 - kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199[J]. **Journal of Bacteriology**, 1999, 181(5): 1 585 - 1 602.
- [19] Geiselbrecht A D, Hedlund B P, Tichi M A, *et al.* 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 Microb**, 1998, 64(12): 4 703 - 4 710.
- [20] Geiselbrecht A D, Herwig R P, Deming J W, *et al.* Enumeration and Phylogenetic analysis of Polycyclic aromatic hydrocarbon - degrading marine bacteria from Puget sound sediments[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1996, 62(9): 3 344 - 3 349.
- [21] Hedlund B P, Geiselbrecht A D, Bair T J, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, 65(1): 251 - 259.
- [22] Bauer J E, Kerr R P, Bautista M F, *et al.* Effects of co - occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries[J]. **Appl Environ Microbiol Mar Environ Res**, 1988, 25: 63 - 84.
- [23] Cerniglia C E, Baalen C V, Gibson D T. J Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain JCM[J]. **Microbiol**, 1980, 116: 485 - 494.
- [24] Shiaris M P, Cooney J J. Replica plating method for estimating phenanthrene - utilizing and phenanthrene - cometabolizing microorganisms[J]. **Appl Environ Microb**, 1983, 45: 706 - 710.
- [25] Okpokwasili G C, Somerville C C, Grimes D J, *et al.* Plasmid - associated phenanthrene degradation by Chesapeake Bay sediment bacteria[J]. **Colloq Inst Francaise Rech Exploit**, 1984, 3: 601 - 610.
- [26] West P A, Okpokwasili G C, Brayton P R, *et al.* Numerical taxonomy of phenanthrene - degrading bacteria isolated from the Chesapeake Bay[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1984, 48(5): 988 - 993.
- [27] Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioideis* sp. KP7[J]. **Chemosphere**, 1999, 38(6): 1 331 - 1 337.

- [28] Pipe R K, Moore M N. Arylsulphatase activity associated with phenanthrene induced digestive cell deletion in the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. **Histochem J**, 1986, 18:557 – 564.
- [29] Martha L N, Carl E C, Chase V B, *et al.* Metabolism of phenanthrene by the marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR – 6[J]. **Appl Environ Microb**, 1992, **58**(4): 1 351 – 1 359.
- [30] Macgillivray A R, Shiaris M P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, **59**(5): 1613 – 1618.
- [31] Lal B, Khanna S. *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcali – genes odorans* [J]. **Journal of Applied Bacteriology**, 1996, 81: 355 – 362.
- [32] Dyksterhouse S E, Gray J P, Herwig R P, *et al.* *Cyclo – clasticus pugetii* gen. nov., sp., nov., an aromatic hydrocarbon – degrading bacterium from marine sediment [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1995, 45: 116 – 123.
- [33] Shiaris M P. Phenanthrene mineralization along a natural salinity gradient in an urban estuary, Boston Harbor, Massachusetts. **Microb Ecol**, 1989, 18: 135 – 146.
- [34] Fedorak P M. Oil – degrading capabilities of yeast and fungi isolated from coastal marine environments[J]. **Can J Microbiol**, 1984, 30: 565 – 571.
- [35] Kirk P W, Gordon A S. Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi[J]. **Mycologia**, 1988, 80: 776 – 782.
- [36] Bogardt A H. Enumeration of Phenanthrene – degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum – contaminated sites[J]. **Appl Environ Microb**, 1992, 58: 2 579 – 2 582.
- [37] Allison D. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon – degrading marine bacteria from Puget Sound Sediments[J]. **Appl Environ Microb**, 1996, **62**(9): 3 344 – 3 349.
- [38] McNally D L, Michelcic J R, Lueking D R. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation microorganisms in Great Lakes sediments[J]. **Journal of Great Lakes Research**, 1998, 24: 392 – 403.
- [39] Yuan S Y, Wei S H, Chang B V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture[J]. **Chemosphere**, 2000, 41: 1 463 – 1 468.
- [40] Mills A L, Breuil C, Colwell R R. Enumeration of petroleum – degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method[J]. **Can J Microbiol**, 1978, 24: 552 – 557.
- [41] Kästner M, Mahro B. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon – contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1994, 41: 257 – 273.
- [42] Shen Y, Stehmeier L G, Voordouw G. Identification of hydrocarbon – degrading bacteria in soil by reverse sample genome probing[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, 64: 637 – 645.
- [43] Goyal A K, Zylstra G J. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testasteroni* GE39[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1996, 62: 230 – 236.
- [44] Murray A E, Hollibaugh J T, Orrego C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1996, 62(7): 2 676 – 2 680.
- [45] Bossio D A, Scow K M. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization[J]. **Microb Ecol**, 1998 35: 265 – 278.
- [46] Robert A K, Richard B, Kazuya W, *et al.* Rapid mineralization of Benzo(a)pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 4 205 – 4 211.
- [47] Head L M. Bioremediation: towards a credible technology [J]. **Microbiology**, 1998, 144: 599 – 608.
- [48] Vecchioli G I. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil[J]. **Environmental Pollution**, 1990, 67: 249 – 258.
- [49] Coschigano P W, Haggblom M M, Young L Y. Metabolism of both 4 – chlorobenzoate and toluene under denitrifying conditions by a constructed bacterial strain [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1994, 60: 989 – 995.
- [50] Erb R W, Eichner C A, Wagner – Dobler I, *et al.* Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad[J]. **Nat Biotechnol**, 1997, 15: 378 – 382.
- [51] Atlas R M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation[J]. **Marine Pollution Bulletin**, 1995, 31: 178 – 182.
- [52] Pritchard P H. EPA’s Alaska oil spill bioremediation project[J]. **Environ Sci Technol**, 1991, 25: 372 – 379.
- [53] Lessard R R, Wilkinson J B, Prince R C, *et al.* Bioremediation application in the 1989 Alaska oil spill[A]. Schepart B S. Bioremediation of pollutants in soil and water[C]. Philadelphia USA: ASTM, 1995. 207 – 225.
- [54] Head L M, Swannell R P J. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 1999, 10: 234 – 239.

(本文编辑 张培新)