

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019011603

阮珍, 刘永军, 刘静, 等. 金属离子对赤红球菌 (*Rhodococcus ruber* L9) 降解芘的影响及其作用机制[J]. 环境化学, 2019, 38(12): - .
RUAN Zhen, LIU Yongjun, LIU Jing, et al. Effect of metal ions on the degradation of pyrene by *Rhodococcus ruber* L9 and its mechanism of action [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(12): - .

金属离子对赤红球菌 (*Rhodococcus ruber* L9) 降解芘的影响及其作用机制*

阮珍 刘永军** 刘静 刘磐

(西安建筑科技大学 环境与市政工程学院, 陕西省环境工程重点实验室, 西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 西安, 710055)

摘要 实验室从石油污染土壤中筛选得到一株高效芘降解菌, 命名为赤红球菌 (*Rhodococcus ruber* L9), 分析了不同浓度 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 对该菌降解芘效果的影响. 结果发现, $0.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{3+}$ 对芘的降解率有明显促进作用, 6d 时芘降解率最高, 可达 77%, 相较于不加金属离子时提升了约 30%. 进一步研究发现, 当 Fe^{3+} 存在时, 芘降解过程中蛋白总量变化、邻苯二酚 1,2-双加氧酶 (C120) 和邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (C230) 酶活性的变化与 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 在胞内、胞外浓度的变化密切相关, 主要原因是 Fe^{3+} 的存在, 能诱导赤红球菌合成更多与芘降解有关的蛋白, 且可以作为酶的活性中心提高酶的活性, 从而大幅提高芘的降解效率.

关键词 Fe^{3+} , 赤红球菌 (*Rhodococcus ruber* L9), 芘降解, 邻苯二酚双加氧酶, 作用机制.

Effect of metal ions on the degradation of pyrene by *Rhodococcus ruber* L9 and its mechanism of action

RUAN Zhen LIU Yongjun** LIU Jing LIU Pan

(Shaanxi Key Lab of Environmental Engineering, Key Lab of Northwest Water Resources, Environment and Ecology, Ministry of Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an, 710055, China)

Abstract: High-efficiency pyrene-degrading bacteria, *Rhodococcus ruber* L9, was isolated from petroleum contaminated soil. The degradation effect of four metal ions (Fe^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Mn^{2+}) on pyrene was investigated in this study. The results showed that $0.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{3+}$ considerably enhanced the degradation efficiency of pyrene. The degradation rate of pyrene reached a maximum of 77% on day 6, which was about 30% higher than that of the control group. Furthermore, we found that when Fe^{3+} was present during the degradation process, changes in the activity of catechol 1,2-dioxygenase (C120) and catechol 2,3-dioxygenase (C230) and the concentrations of protein were strictly related to changes in intracellular and extracellular Fe^{3+} and Fe^{2+} concentrations. This is because the presence of Fe^{3+} induced *Rhodococcus ruber* L9 to synthesize large quantities of catechol 1,2-dioxygenase and functioned as an active site in the enzyme to increase enzyme activity, thereby drastically improving the degradation efficiency of pyrene.

Keywords: Fe^{3+} , *Rhodococcus ruber* L9, pyrene degradation, catechol dioxygenase, mechanism of action.

2019年1月16日收稿 (Received: January 16, 2019)

* 国家自然科学基金 (51178377) 资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51178377).

** 通讯联系人, Tel: 13572535980; E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

Corresponding author, Tel: 13572535980, E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是自然界中分布极为广泛的一类难降解有机物,是具有“三致”作用的有机污染物之一,其高稳定性和强疏水性使其在环境中呈不断累积的趋势^[1-3],严重危害生态环境和公众健康.芘是环境中普遍存在的四环有机污染物,具有稳定的四苯环对称结构,是高分子量 PAHs 的代表化合物^[4],对芘降解机理的研究一定程度上可以推进高环芳烃降解的研究进程.传统的 PAHs 修复方法有物理、化学、焚烧法等多种^[5],但它们修复成本高、降解不彻底、易造成二次污染,仅适合于高浓度污染的初步快速处理^[6].而生物降解法运行成本低、可将多环芳烃降解为低毒或无毒的终产物,且不会对环境造成不良影响,因此,生物降解已经成为多环芳烃修复的重要手段,具有良好的应用前景^[7].

目前,国内外研究已经分离出多种多环芳烃降解菌,如鞘氨醇单胞属、分支杆菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、红球菌属和伯克氏菌属等^[8-11].但目前存在的问题是其降解效率不高,降解速率较慢.有研究表明, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 在低浓度下可促进芘的降解,且降解过程中邻苯二酚 1,2-双加氧酶(C120)和邻苯二酚 2,3-双加氧酶(C230)是主要限速酶^[12-13].这可能是由于在多环芳烃降解过程中,金属离子可作为电子受体,且 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 可作为酶的活性中心而存在,在多环芳烃降解过程中发挥着重要的作用^[14].

本文以芘作为多环芳烃的代表物进行研究,选取一株从石油污染土壤中筛选驯化而得的赤红球菌(*Rhodococcus ruber*L9),分析了不同浓度的 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 对芘降解效率的影响,并且进一步讨论了 Fe^{3+} 在芘降解过程中的作用机制,为赤红球菌(*Rhodococcus ruber*L9)用于多环芳烃污染土壤的生物修复技术的实际运用奠定基础.

1 材料与方 法(Materials and methods)

1.1 材料

1.1.1 细菌来源

本实验室以石油污染地区的土壤为优良菌源,筛选驯化得到一株红球菌,经专业机构鉴定,确定其为赤红球菌(*Rhodococcus ruber*L9)^[15],本实验所用降解菌即为此菌株.

1.1.2 无机盐 MSM-芘培养基

将无机盐 MSM 培养基调节 pH=7.0,121 °C 灭菌 30 min 后静置冷却至室温,加入一定体积 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的丙酮溶液,分装于锥形瓶,封口后置于空气浴振荡培养箱中,37 °C,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,24 h 使丙酮挥发后备用.

1.1.3 驯化菌悬液

将保留在斜面上的菌株接种在经高压水蒸气灭菌过的 LB 培养基上,于空气浴恒温振荡培养箱中,30 °C,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 好氧培养 24h,室温下 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,用无机盐溶液反复冲洗菌体 3 次,梯度稀释涂布分离出单一的菌株(*Rhodococcus ruber*L9),接种到芘的无机盐培养液中,其中芘浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,空气浴培养 5 d,离心并冲洗后收集菌体,用无机盐培养液重悬,即得到驯化后的菌悬液.

1.1.4 粗酶液的制备

将驯化菌悬液接种到无机盐 MSM-芘培养基一定周期后,于 4 °C、8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min 收集 *Rhodococcus ruber*L9 菌体,用含有 5%丙酮的磷酸盐缓冲盐(PBS,0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH = 7.0)溶液反复洗涤 3 次,再加入 PBS 稀释成 $\text{OD}_{600} = 0.35$ 的菌悬液,取 20 mL 菌悬液用超声破碎仪在 0 °C 下进行冰水混合浴细胞破壁(破碎 2 s,间歇 4 s,120 W,工作 15 min),于 4 °C、10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 25 min,收集上清液即为粗酶液,置于 0 °C 冰水混合浴备用(1 h 内使用).

1.1.5 金属离子母液

分别称取适量 FeCl_3 、 CaCl_2 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 MnCl_2 ,加无机盐 MSM 培养液定容至 50 mL 得相应的金属离子浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液.

芘、菲、十氟联苯采用分析纯,其它试剂均为化学纯.

1.2 实验方法

1.2.1 芘降解率的测定

将 PAHs 降解培养液摇匀后,取 10 mL 样品于 50 mL 锥形瓶,加菲(1.25 mg·mL⁻¹) 100 μL,十氟联苯(40 μL·mL⁻¹) 1.25 mL 用于监测芘的回收率,加 NaCl 3 g,二氯甲烷 15 mL,摇匀并用锡箔纸封口,放入超声清洗仪中超声振荡 20 min,萃取,收集有机相至 25 mL 比色管,重复两次,用氮吹仪将比色管中液体吹至近干,加甲醇定容到 25 mL,震荡摇匀,过无水硫酸钠和滤膜,装入液相小瓶,用超高效液相色谱-荧光检测器测定芘的浓度变化,计算降解率。

1.2.2 赤红球菌吸光度的测定

取 5 mL 样品于离心管,用 UV-紫外分光光度计测定波长 600 nm 下吸光度值。

1.2.3 蛋白含量测定

蛋白质含量用 Bradford 法测得,参考 Bradford 法测蛋白质含量标准操作(SOP-QC-007-01)。

1.2.4 C120、C230 酶活的测定

分别取 1 mL 粗酶液加入到含 0.1 mmol·L⁻¹邻苯二酚的 PBS 中(0.05 mol·L⁻¹, pH = 7.2),总体系 3 mL,37 °C 反应 20 min,分析酶反应产物在 260 nm 和 375 nm 处的吸光度增加值,酶质量比活计算公式如下:

$$\text{酶质量比活力}(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}) = \frac{V_{\text{总}} \times \Delta A \times 10^3}{\varepsilon \times t \times L \times V_{\text{酶}} \times C_{\text{pro}}}$$

其中, $V_{\text{总}}$:酶活测定反应体系的终体积(mL); ΔA :反应时间内反应液在 OD = 260 或者 OD = 375 处吸光度的增加值; ε :单位长度摩尔吸光系数,本研究选用 $\varepsilon_{260} = 16800 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{375} = 36000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; t :反应时间,本试验为 20 min; L :比色皿的内径(cm),本研究为 1 cm; $V_{\text{酶}}$:体系中粗酶液体积(mL); C_{pro} :稀释倍数。

1.2.5 铁离子浓度测定

Fe³⁺、Fe²⁺含量参考邻菲罗啉分光光度法^[16]操作。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 不同金属离子对赤红球菌降解芘的影响

配制芘的无机盐培养液 150 mL,其中 OD₆₀₀ = 2.0 的菌悬液 20 mL,芘浓度为 10 mg·L⁻¹,分别加入 Fe³⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺母液,使得金属离子浓度梯度为 0.10 mmol·L⁻¹至 0.30 mmol·L⁻¹,对照组不含任何金属离子。将样品置于空气浴恒温振荡培养箱,30 °C 振荡培养,每隔 24 h 取样测定芘的降解率和菌生长情况,测得结果如图 1 所示。

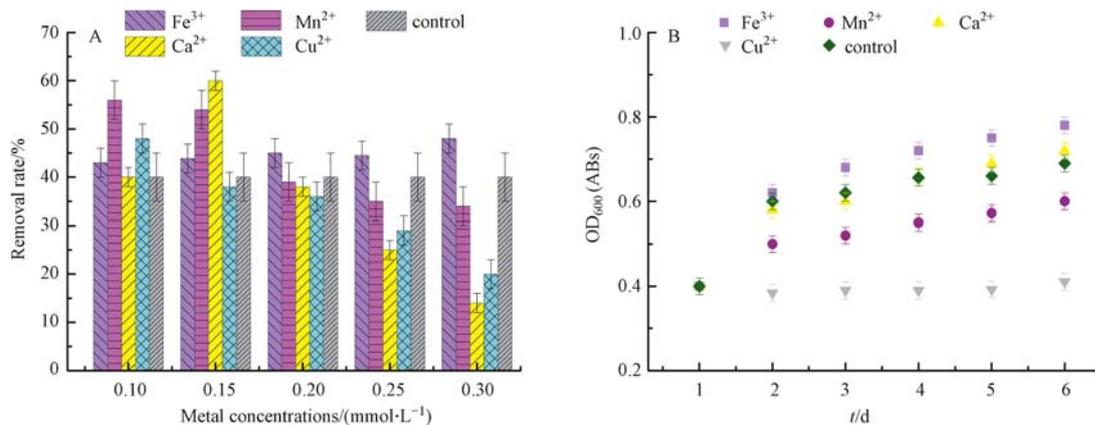


图 1 不同金属离子作用下芘的降解率及赤红球菌的生长状况

Fig.1 Removal rate of pyrene and growth of *Rhodococcus ruber* L9 with four metal ions in different concentrations

由图 1A 可以看出, Fe^{3+} 在 5 种浓度下均能对芘的降解过程起到不同程度的促进作用; 加入 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Mn}^{2+}$ 时, 芘的降解率可达 55% 左右, 但 Mn^{2+} 浓度较高时, 反而会对降解过程产生抑制作用; Ca^{2+} 浓度为 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 可将芘的降解率提高至 60%, 但随着 Ca^{2+} 浓度升高, 在 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下, 它对芘降解过程的抑制作用也非常明显; Cu^{2+} 在 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下对芘的降解有一定的促进作用, 但随着浓度升高, 它也表现出明显的抑制作用。

观察图 1B 可知, Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 都可以明显促进赤红球菌的生长, 而 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 对菌体的生长繁殖则会产生抑制作用, 其中 Cu^{2+} 的抑制效果在第 4 d 后尤为明显。

分析图 1 发现, 芘的降解率与赤红球菌的生长情况成正相关。赤红球菌的生长需要各种诸如铁、钙等金属元素的化合物来维持细胞结构稳定、调节渗透压, 因此加入 Fe^{3+} 或低浓度 Ca^{2+} 后, 不同程度地促进了赤红球菌的生长繁殖, 从而大幅提高了芘的降解率。而 Cu^{2+} 和高浓度的 Mn^{2+} 则会由于菌体的富集作用导致菌体降解活性下降、降解率降低。通过对比可以发现, 四种金属离子中, Fe^{3+} 对芘降解效果的促进作用最为明显。

2.2 不同浓度 Fe^{3+} 对赤红球菌降解芘的影响

配制芘的无机盐培养液 150 mL, 其中芘浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{OD}_{600} = 2.0$ 的菌悬液 20 mL, 分别加入 Fe^{3+} 母液, 使 5 个样本中 Fe^{3+} 浓度梯度为 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $0.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。设置不含 Fe^{3+} 离子的样本作为对照组, 置于空气浴恒温振荡培养箱中, 30°C 振荡培养, 每隔 24 h 取样, 测得芘降解率和菌的生长情况如图 2 所示。

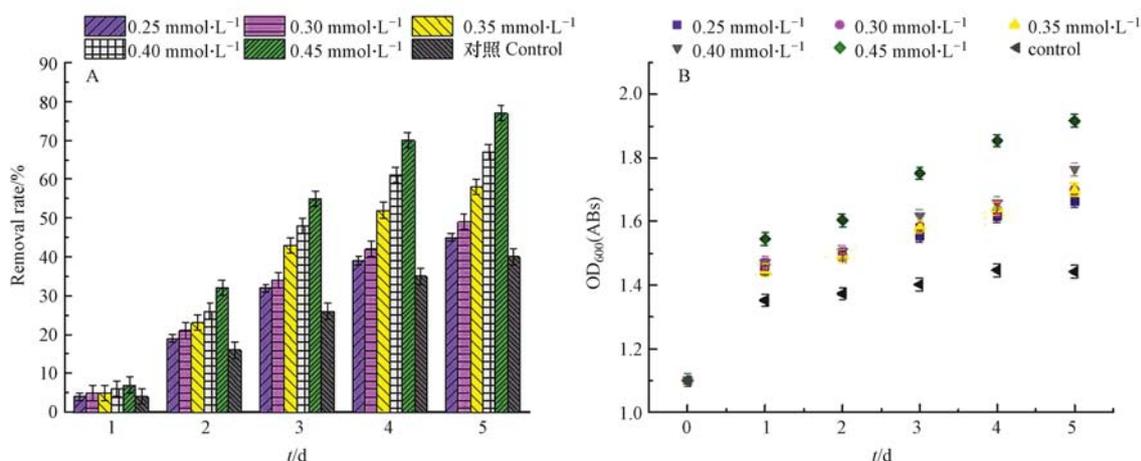


图 2 不同浓度 Fe^{3+} 存在时芘降解率及菌生长随时间变化状况

Fig.2 Removal rate of pyrene and growth of *Rhodococcus ruber*L9 with different concentrations of Fe^{3+}

观察图 2A 可知, 在 5 种不同浓度 Fe^{3+} 作用下, 芘的总降解率相比于对照组均有所提高。其中, 当 Fe^{3+} 浓度为 $0.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 芘每天的降解率均为 5 个样本中最高的, 分别达到 7%、32%、55%、70%、77%。观察图 2B 可知, 加入铁离子之后, 不同程度地促进了赤红球菌的生长, 其中铁离子浓度为 $0.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 赤红球菌的生长状态最好。

综合对比图 2 可以发现, 芘的降解率变化趋势与菌的生长趋势相关。 Fe^{3+} 的添加使得芘的降解率提高, 一定程度上是由于赤红球菌的生长繁殖的增快、数量增多。对比五组样品的降解率可以确定, Fe^{3+} 浓度为 $0.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 芘降解率由 40% 提高到 77% 左右, 为赤红球菌降解芘的最适浓度。

2.3 Fe^{3+} 对芘降解过程中 C120、C230 酶活的影响

配制芘的无机盐培养液 150 mL, 其中含有 $\text{OD}_{600} = 2.0$ 的菌悬液 20 mL, 芘浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 其中一个加入 Fe^{3+} 母液, 使 Fe^{3+} 最终浓度为 $0.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 另一个不加 Fe^{3+} 作为对照组, 置于空气浴恒温振荡培养箱中, 30°C 振荡培养, 每隔 24 h 取样测定 C120 和 C230 酶活性、胞内外 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 浓度变化, 结果如图 3、图 4 所示。

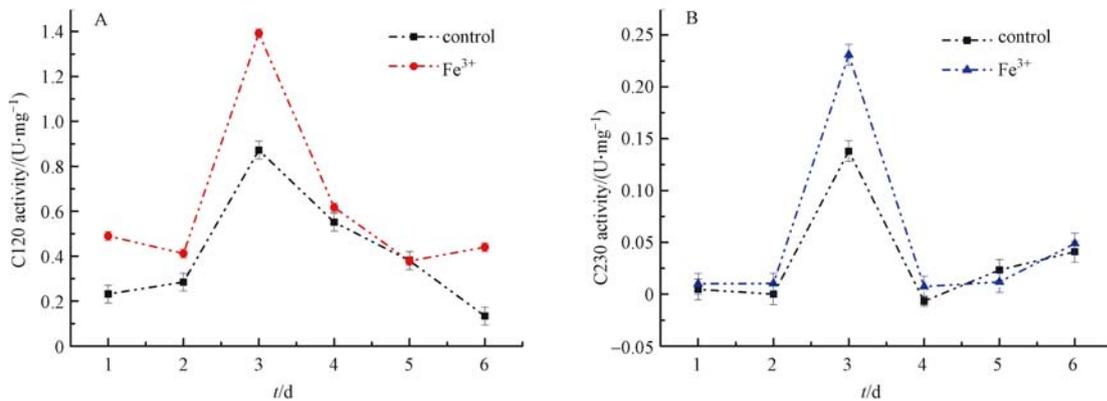


图3 C120和C230活性随时间的变化情况

Fig.3 Changes in activity of C120 and C230 with time

由图3可以看出,Fe³⁺的添加,不同程度地提高了两种酶的活性.C120酶活前两天维持在较低水平(0.2—0.4 U·mg⁻¹),第3天迅速增大到较高水平(1.2—1.6 U·mg⁻¹),然后总体呈下降趋势,直到第6天降到了初始水平;C230活性不及C120高,但总体趋势与C120相似,前两天几乎为零,第3天上升达到最大值(0.25 U·mg⁻¹),随即又降低。

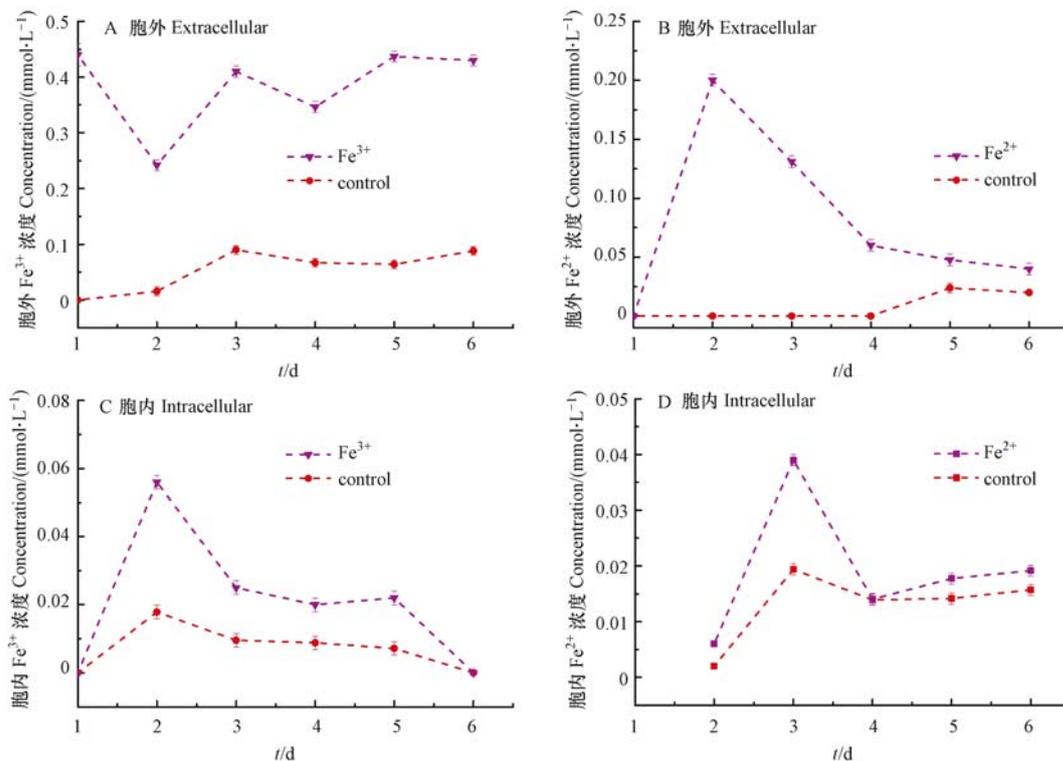


图4 胞外、胞内铁离子浓度随时间的变化

Fig.4 Changes in concentrations of extracellular and intracellular Fe²⁺ and Fe³⁺ with time

经过离心去除菌体后,胞外三价铁离子浓度在第1天突然下降至0.24 mmol·L⁻¹,第2天开始回升,随后稳定在0.42 mmol·L⁻¹左右(图4A);胞外二价铁离子初始浓度为零,第1天后开始上升,于第2天达到最高值0.2 mmol·L⁻¹,随后在第6天时均降低到0.03 mmol·L⁻¹左右(图4B).而经过破碎离心后,测得胞内的Fe³⁺和Fe²⁺浓度都很低,与对照组基本一致(图4C、图4D).

结合图3和图4发现,在Fe³⁺大量消耗转化为Fe²⁺后,C120和C230酶活性随之达到峰值,这可能是由于Fe³⁺参与了C120酶的合成,并且可以作为其活性中心,使酶具有较高的活性^[17];而C230只有当

Fe^{2+} 存在时才具有活性,因此在体系中的 Fe^{2+} 浓度上升后,C230 活性也随之上升了.同时,由于 Fe^{2+} 很难稳定存在,极容易被氧化成为 Fe^{3+} ,随着时间的推移, Fe^{2+} 持续减少,C230 会逐渐失活,因此,C230 活性不如 C120 活性高,由此可以推测芘的降解过程由 C120 起主要作用,C230 为降解过程的限速酶,这与卫昆等人的研究结果基本一致^[18].

2.4 Fe^{3+} 在芘降解过程中的作用机制

配制芘的无机盐培养液 150 mL,其中含有 $\text{OD}_{600} = 2.0$ 的菌悬液 20 mL,芘浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其中一个加入 Fe^{3+} 母液,使 Fe^{3+} 最终浓度为 $0.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,另一个不加 Fe^{3+} 作为对照组,置于空气浴恒温振荡培养箱中, 30°C 振荡培养,每隔 24 h 取样测定蛋白含量随时间的变化情况如图 5 所示.

如图 5 所示,添加铁离子后,蛋白浓度相较于对照组有明显提高.观察发现,反应体系中用于苯环开环的 C120 的酶活性(图 3A)、蛋白含量(图 5)、胞外 Fe^{2+} 浓度(图 4B)和芘的降解率(图 2A)都在 3 d 左右达到峰值,变化趋势呈现一定的同步性.

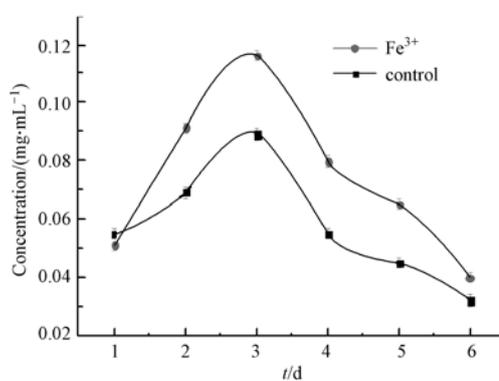


图 5 蛋白浓度时间的变化情况

Fig.5 Change in concentration of protein with time

结合孔德康等的研究^[19],推测赤红球菌降解芘的过程中,铁离子的作用机制可以总结为图 6 所示. Fe^{3+} 进入系统后与芘之间形成一种较弱作用力^[20],降低了芘的电子密度, Fe^{3+} 接收电子成为 Fe^{2+} ,芘在 ATP 的作用下经细胞膜上的特异性蛋白进入细胞内,定向诱导 DNA 转录产生相应的 mRNA,进而翻译产生大量与芘降解相关的各类蛋白,并排出细胞外; Fe^{3+} 形成 C120 的活性中心,使其活性大幅提高,同时,体系中上升的 Fe^{2+} 浓度使得 C230 的活性也有所升高^[21],从而加快了反应速度; Fe^{2+} 在水解和氧化的作用下重新转化为 Fe^{3+} ;而蛋白含量增多、酶活性增强,使得芘的开环裂解过程更快、反应更彻底.

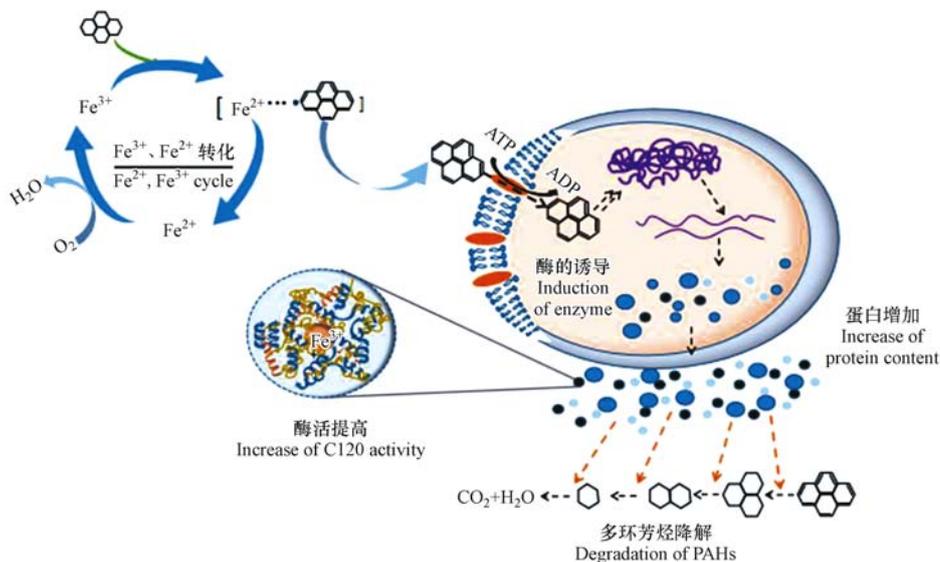


图 6 Fe^{3+} 在芘降解过程中的作用机制示意图

Fig.6 Schematic diagram of the mechanism of action of Fe^{3+} in the degradation process of pyrene

3 结论(Conclusion)

(1) Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 四种金属离子中, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 表现为低浓度下促进芘降解, 高浓度下抑制芘降解, 而 Fe^{3+} 在 $0.1\text{—}0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内对芘降解过程均有明显的促进作用, 为最适金属离子。

(2) 在 $0.25\text{—}0.45\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 当 Fe^{3+} 浓度为 $0.45\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 芘的降解率最高, 达 77%, 相比于不加 Fe^{3+} 时提高了约 30%。

(3) 添加 Fe^{3+} 可提高 C120 和 C230 的酶活性, 且证实了 C230 为芘降解过程的限速酶。

(4) Fe^{3+} 的加入, 使得芘降解率大幅提高的原因可总结为以下两点: 一是 Fe^{3+} 与芘发生相互作用使芘得以进入细胞, 进而刺激 DNA 更多地生成各种相应的蛋白; 二是 Fe^{3+} 可以作为 C120 的活性中心, 从而提高酶活性。

参考文献(References)

- [1] ROYCHOWDHURY S, MITRA D. Separation of polyaromatic hydrocarbons from model diesel composition via pervaporation using a fabricated aromatic polyimide membrane and process optimization [J]. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 2018, 10(1): 1028-1030.
- [2] KADRI T, ROUISSI T, BRAR S K, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 29(1): 52-74.
- [3] 李婧, 党志, 郭楚玲, 等. 复合固定化法固定微生物去除芘 [J]. *环境化学*, 2012, 31(7): 1036-1042.
LI J, DANG Z, GUO C L, et al. Removal of pyrene using immobilized microorganism [J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 31(7): 1036-1042 (in Chinese).
- [4] 李想, 张雪英, 周俊, 等. 1 株铜绿假单胞菌对芘的降解特性及代谢途径 [J]. *环境科学*, 2018, 39(4): 1794-1803.
LI X, ZHANG X Y, ZHOU J, et al. Degradation characteristics and metabolic pathway of a pyrene-degrading *Pseudomonas aeruginosa* Strain [J]. *Environmental Science*, 2018, 39(4): 1794-1803.
- [5] HARITASH A K, KAUSHIK C P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169(1): 1-15.
- [6] 王涛, 蓝慧, 田云, 等. 多环芳烃的微生物降解机制研究进展 [J]. *化学与生物工程*, 2016, 33(2): 8-14.
WANG T, LAN H, TIAN Y, et al. Research progress on microbial degradation mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2016, 33(2): 8-14 (in Chinese).
- [7] 苏梦缘, 王红旗, 李艺, 等. 多环芳烃降解菌菌群构建及其适宜降解环境条件的确定 [J]. *环境工程学报*, 2017, 11(2): 1192-1198.
SU M Y, WANG H Q, LI Y, et al. Construction of microbial consortia for PAHs degradation and appropriate environmental condition for degradation [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(2): 1192-1198 (in Chinese).
- [8] 陈政阳, 刘国, 唐彬彬, 等. 油基泥浆钻井岩屑中高效石油降解菌的筛选及其降解特性 [J]. *环境工程*, 2018, 36(2): 48-53.
CHEN Z Y, LIU G, TANG B B, et al. Isolation of degrading bacteria from oil base mud drilling cuttings and its degrading characteristics [J]. *Environmental Engineering*, 2018, 36(2): 48-53 (in Chinese).
- [9] 陈亚婷, 姜博, 邢奕, 等. 基于非培养手段的多环芳烃降解微生物解析 [J]. *中国环境科学*, 2018, 38(9): 3562-3575.
CHEN Y T, JIANG B, XIE Y, et al. Identification and characterization on PAHs-degrading microorganisms via cultivation-independent approaches [J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(9): 3562-3575 (in Chinese).
- [10] 刁硕, 王红旗, 许洁, 等. 低温耐盐芘降解菌的筛选鉴定及降解特性研究 [J]. *中国环境科学*, 2017, 37(2): 677-685.
DIAO S, WANG H Q, XU J, et al. Isolation, identification and analysis of degradation ability of a cold-resistant haloduric pyrene-degrading strains [J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(2): 677-685 (in Chinese).
- [11] 侯晓鹏, 李春华, 叶春, 等. 不同电子受体作用下微生物降解多环芳烃研究进展 [J]. *环境工程技术学报*, 2016, 6(1): 78-84.
HOU X P, LI C H, YE C, et al. Research progress of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of different electron acceptors [J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2016, 6(1): 78-84 (in Chinese).
- [12] 吴蔓莉, 聂麦茜, 王晓昌, 等. 金属离子对多环芳烃酶降解的影响作用 [J]. *水处理技术*, 2008, 34(8): 13-16.
WU M L, NIE M Q, WANG X C, et al. Effect of metal ions on enzymatic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Technology of Water Treatment*, 2008, 34(8): 13-16 (in Chinese).
- [13] 徐苗, 晁群芳. 一株产胞外邻苯二酚-2,3-双加氧酶菌种的筛选及鉴定 [J]. *中国农业科技导报*, 2017, 19(12): 34-42.
XU M, ZHAO Q F. Study on the synthesis and characteristic of hexadecylldimethyl (2-sulphite) ethyl ammonium [J]. *Technology of Water Treatment*, 2017, 19(12): 34-42 (in Chinese).

- [14] 邵猛猛. 多环芳烃降解菌的筛选、降解性能及环境安全影响研究 [D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2018.
SHAO M M. Isolation of PAHs-degrading bacteria, study on their characterization of the degradation metabolism and environment safety impact [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2018 (in Chinese).
- [15] 杨宏伟, 吴亚丽, 马旭阳, 等. 黄河干流表层沉积物铁形态的分布特征及相关性分析 [J]. 中国环境科学, 2015, 35(12): 3663-3669.
YANG H W, WU Y L, MA X Y, et al. Distribution characteristics and correlation analysis of Fe speciation in the surface sediments from different reaches along Yellow River. [J]. China Environmental Science, 2015, 35(12): 3663-3669 (in Chinese).
- [16] 邓梦, 杨正凤, 黄遵锡, 等. 粪便微生物宏基因组来源的热稳定性邻苯二酚 1,2-双加氧酶异源表达及酶学性质 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1947-1957.
DENG M, YANG Z F, HUANG Z X, et al. Expression and characterization of thermostable catechol 1,2-dioxygenase from a fecal microbial metagenome of *Nycticebuspygmaeus* [J]. Microbiol. China, 2017, 44(8): 1947-1957 (in Chinese).
- [17] 卫昆, 陈烁娜, 尹华, 等. 蜡状芽胞杆菌对芘的降解特性及降解酶研究 [J]. 环境科学学报, 2016, 36(2): 506-512.
WEI K, CHEN S N, YIN H, et al. The biodegradation characteristics of pyrene bacillus cereus and its enzyme [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(2): 506-512 (in Chinese).
- [18] 孔德康, 李艺, 王红旗, 等. 红球菌跨膜运输荧蒽的差异膜蛋白分析 [J]. 中国环境科学, 2019, 39(1): 274-280
KONG D K, LI Y, WANG H Q, et al. Differential membrane protein analysis of *Rhodococcus* during the transmembrane-transport process of fluoranthene [J]. China Environmental Science, 2019, 39(1): 274-280
- [19] SENDA T, SUGIYAMA K, NARITA H, et al. Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102 [J]. Journal of Molecular Biology, 1996, 255(5): 735-752.
- [20] 周鑫淼, 陈洁君, 耿立召, 等. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶的结构和功能研究进展 [J]. 生物技术通报, 2007, 4(1): 51-54.
ZHOU X M, CHEN J J, GENG L Z, et al. Advances in study on structure and function of catechol 2, 3-Dioxygenase [J]. Biotechnology Bulletin, 2007, 4(1): 51-54 (in Chinese).