

降解芘的分枝杆菌 M11 的分离鉴定和降解特性

李全霞, 范丙全*, 龚明波, 杨慧

(中国农业科学院农业资源与农业区划所, 北京 100081)

摘要: 从多环芳烃污染的土壤中分离到 1 株能高效降解四环芳烃芘的放线菌 M11, 经形态观察、生理生化和 16S rDNA 鉴定, 属于分枝杆菌属 (*Mycobacterium* sp.). 菌株 M11 能以菲、蒽、荧蒽和芘为唯一碳源生长, 在含芘 50、100 和 200 mg/L 的无机盐液体培养基中培养 16 d 降解率分别达到 76.9%、91.8% 和 79.23%. 菌株 M11 对芘的降解具有较广泛的 pH 范围, 在芘浓度 100 mg/L, pH 为 5~9 的液体条件下, 均可生长. 根据已报道的芘降解菌的双加氧酶同源序列设计引物, PCR 扩增出编码双加氧酶大亚基和小亚基的基因片段, 序列分析表明与已知降解芘的分枝杆菌的双加氧酶基因具有高度同源性.

关键词: 分枝杆菌; 芘; 微生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)03-0763-06

Isolation, Identification of a Pyrene-Degrading Strain *Mycobacterium* sp. M11 and Its Degrading Characteristics

LI Quan-xia, FAN Bing-quan, GONG Ming-bo, YANG Hui

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A bacterial strain M11 using phenanthrene, anthracene, fluorethene, pyrene as a sole carbon and energy sources was isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Strain M11 was identified as *Mycobacterium* sp. according to the results of morphology, physiology and the phylogenetical analyses of 16S rDNA sequence. The degradation rate of pyrene (at levels of 50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L) by strain M11 was 76.9%, 91.8% and 79.23% within 16 d in broth assay. *Mycobacterium* sp. M11 showed a strong ability to grow from pH 5 to pH 9 in liquid minimal medium containing pyrene 100 mg/L. *Mycobacterium* sp. M11 possessed aromatic-ring dioxygenase genes, which are highly homologous to the known *nidAB* genes from pyrene-degrading *Mycobacteria*.

Key words: *Mycobacterium*; pyrene; biodegradation

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是指一类由 2 个或 2 个以上苯环以线状、角状或成簇形式构成的独特的持久性有机污染物. 很多 PAHs 会在生物体内积累通过细胞毒性、遗传毒性和免疫毒性对生物体产生致癌、致畸、致突变作用, 对自然界生物安全和人类健康构成巨大威胁^[1]. 美国环保局在 20 世纪 80 年代已将 16 种不带分支的 PAHs 列入优先污染物名单中, 我国也把 PAHs 列入环境污染物的黑名单中^[2].

微生物降解多环芳烃具有环保高效廉价的特点, 被公认为是去除环境中多环芳烃的重要途径之一^[3~5]. 20 世纪 70 年代研究人员开展了利用微生物修复多环芳烃污染土壤的尝试^[6], 80 年代科学家认识到微生物修复是多环芳烃污染环境修复最有良好前景的技术^[7], 并首先用于石油污染环境的修复^[8]. 20 世纪 90 年代至今, 多环芳烃的微生物修复研究全面展开, 微生物修复强化对菌株的特性要求、影响微生物降解的生物和物理化学的因素、最佳生存条件与调节 (营养物质、氧气以及电子受体), 形成了微生物修复理论和原理^[9, 10].

多环芳烃降解菌的筛选一直是国内外生物降解 PAHs 的一个重要方面, 迄今已分离筛选到多种降解 PAHs 的细菌, 如气单胞菌 (*Aeromonas*)^[11]、芽孢杆菌 (*Bacillus*)^[12]、拜叶林克氏菌 (*Beijerinckia*)^[13]、假单胞菌 (*Pseudomonas*)^[14~16]、诺卡氏菌 (*Nocardia*)^[17]、红球菌 (*Rhodococcus*)^[18] 等, 但多是降解萘、菲等低分子量的 PAHs. 芘由 4 个苯环对称排列组成, 结构稳定, 是高分子量 PAHs 的代表化合物, 具有致癌、致畸的结构域, 因此能降解芘的微生物资源还很有限. 1988 年, Heitkamp 等^[19]首次报道从土壤中分离到 1 株能降解芘的菌, 经鉴定为分枝杆菌属的一个新种 (*Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1), 之后高分子量 PAHs 的降解研究才开始展开, 相继分离到其他具有降解能力的分枝杆菌 (如 *Mycobacterium* sp. strain API^[20]、*Mycobacterium* sp. strain RJGII-135^[21]、*Mycobacterium flavescens*^[22]). 红球菌 (*Rhodococcus* sp.

收稿日期: 2007-04-26; 修订日期: 2007-05-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2002CB410809)

作者简介: 李全霞 (1979~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物及 PAHs 污染修复, E-mail: liquanxia@163.com

* 通讯联系人, E-mail: bqfan@caas.ac.cn

strain UW1^[23])、白腐真菌(*Pleurotus ostreatus*^[24])和糖丝菌(*Saccharothrix* sp. PYX-6^[25])等也被证明具有降解芘的能力。

目前,国内关于分枝杆菌降解芘的研究鲜见报道.本研究从 PAHs 污染土壤中分离到 1 株具有较强降解芘能力的分枝杆菌,并对它的系统发育地位和降解特性进行了探讨,以期多环芳烃污染土壤的生物修复提供高效菌株。

1 材料与方法

1.1 降解菌的分离和筛选

1.1.1 样品来源

从湖南、湖北多处被多环芳烃污染的石化厂、焦化厂附近采集土样 63 个,采取表层 0~10 cm 的土壤,放于自封袋中,封口,置于 4℃ 冰箱保存。

1.1.2 培养基

分离降解 PAHs 用无机盐基础培养基,成分及用量(g/L): NH_4Cl 1.1, K_2HPO_4 1.0, NaCl 0.5, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, FeSO_4 0.001, CaCl_2 0.01, 再加入微量元素混合溶液 1 mL(含量 mg/L): H_3BO_3 57, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 43, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 43, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 37, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 25. 固体培养基中加入 2% 琼脂. 芘用丙酮配成 5 g/L 的母液,用 0.22 μm 的有机滤膜过滤灭菌后加入灭好菌的无机盐基础培养基中作为碳源。

菌株保藏用营养肉汁培养基,成分及用量(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 调整 pH 7.0~7.2。

1.1.3 分离方法

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^{-3} , 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形成芘膜. 成膜方法: 把接种后的平板倒扣到底部平铺有固体芘的 500 mL 的烧杯上, 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, 使芘升华后遇平板冷却而附着在固体培养基上. 制备好的培养皿置入 30℃ 恒温箱培养, 每日观察, 挑取能产生透明圈的单菌落在营养肉汁培养基上多次划线纯化. 纯化后的菌株再接种于含芘的无机盐平板上验证其降解能力^[26]。

1.2 菌株的鉴定

1.2.1 形态观察

采用光学显微镜(OLYMPUS BH-2)进行革兰氏

染色和抗酸染色观察。

1.2.2 生理生化鉴定

菌株鉴定的生理生化试验参照文献[27]进行, 主要进行了 5% NaCl 生长, 硝酸盐还原, 吐温水解(5 d), 过氧化氢酶、脲酶, 葡萄糖发酵和 9 种碳水化合物产酸实验。

1.2.3 16S rDNA 部分序列的 PCR 扩增

平板划线得出细菌单菌落, 挑取单菌落直接进行 PCR 扩增. 用于 PCR 扩增反应的引物序列如下: 16S rDNA 上游引物 SEQ1 5'-CAC ATG CAA GTC GAA CGG AAA GG-3'(位于结核分支杆菌 16S rDNA 62~85 核苷酸位)和下游引物 SEQ2 5'-GCC CGT ATC GCC CGC ACG CT-3'(位于结核分支杆菌 16S rDNA 626~647 核苷酸位), 扩增 16S rDNA 的 5'端 580 bp 片段。

PCR 反应程序: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 50 s, 63℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 次循环, 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存. 取 2 μL 反应液进行 1% 琼脂糖电泳检测, PCR 扩增产物直接送到北京华大中生科技发展有限公司测序。

1.3 菌株 M11 对芘降解效果的测定

1.3.1 不同芘浓度下的降解

取含芘的无机盐培养基中生长 3 d 的菌株培养物 1 mL 接入 10 mL 的以芘为唯一碳源和能源的无机盐培养基中(含芘 50、100 和 200 mg/L), 温度 30℃, 转速 170 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养, 每隔 1 d 取样, 用环己烷萃取培养基中残留的芘, 高效液相色谱测定芘含量. 以未接菌的含芘液体培养基为对照. 每次测定均设置 3 个重复。

1.3.2 不同 pH 条件下芘的降解

取加芘的无机盐培养基中生长 3 d 的菌株培养物 1 mL 接入 10 mL 的以芘为唯一碳源和能源的无机盐培养基中(含芘 100 mg/L), 调节 pH 分别为 5、6、7、8、9, 在温度为 30℃, 转速 170 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养 20 d, 用环己烷萃取培养基中残留的芘, 测定残留的芘含量. 以未接菌的含芘无机盐培养基为对照. 每次测定均设置 3 个重复。

1.3.3 芘残留量的测定

采用高效液相色谱测定, 以美国 RAINBOW 公司的 Kromasil C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相为甲醇/水(体积比, 90:10), 流速为 1 mL/min, 使用 Agilent 1100HPLC 化学工作站的 VWD 检测器, 检测波长为 254 nm, 进样体积为 5 μL , 测定时间为 15 min。

1.3.4 M11 生长量的测定

采用活菌计数法,每隔 1 d 取样,将菌液稀释到 10⁵CFU/mL 后,在营养肉汁培养基上涂布,30℃ 恒温培养 5 d 后计数,绘制生长曲线.

1.4 芘降解菌 M11 降解基因序列分析

对多环芳烃降解过程中的芳香环羟基化双加氧酶 α 大亚基和 β 小亚基进行扩增和序列分析.引物序列如下: *nidA* forward 5'-ATG ACC ACC GAA ACA ACC GGA-3', *nidA* reverse 5'-TCA AGC ACG CCC GCC GAA TGC-3'; *nibB* forward 5'-ATG AAC GCG GTT GCG GTC GAT-3', *nidB* reverse 5'-CTA CAG GAC TAC CGA CAG GTT-3'.PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,63℃ 50 s,72℃ 50 s,30 次循环,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存.PCR 扩增产物进行测序分析.

2 结果与讨论

2.1 降解菌的筛选

经过多次分离和纯化,从不同来源的土壤样品中分离到 28 株以芘为唯一碳源生长的菌株,接种于表面含有芘晶膜的无机盐固体平板上,恒温培养后观察和比较透明降解圈的大小,最后得到 1 株降解圈较大的菌,命名为 M11(见图 1).菌株 M11 也能在表面含有菲、蒽、荧蒽的固体平板上生长.



图 1 菌株 M11 在固体平板上的生长和芘降解
Fig.1 Pyrene degradation and strain growth at solid culture medium

2.2 菌株的鉴定

M11 在 30℃ 恒温培养 5 d 后肉眼才可看到清晰的单菌落.菌落在营养肉汁平板上起初为乳白色,随着菌龄的增加,颜色越来越深,最后呈橙黄色.菌落呈规则圆型,表面光滑,边缘整齐.革兰氏染色后,不

易着色,抗酸染色为阳性.细胞为杆状,不运动,无芽孢.据此初步确定 M11 为分支杆菌属快速生长群的暗产色菌.生理生化反应结果表明,菌株 M11 能以 5%NaCl 生长,能还原硝酸盐,吐温水解(5 d)、过氧化氢酶为阳性,脲酶弱阳性,不能发酵葡萄糖产酸,能从阿拉伯糖、鼠李糖产酸,不能从山梨醇、卫茅醇、甘露糖醇、海藻糖、肌醇、果糖、半乳糖产酸.

利用 16S 通用引物进行 PCR 扩增未能得到目的 DNA 片段,鉴于分支杆菌的特殊性,设计针对菌株 M11 的引物,序列测定得到 576bp 的 16S rDNA 部分序列,菌株 M11 的 16S rDNA 基因序列在 GenBank 中的登录号为 EF539332.利用 GenBank Blast 软件进行序列同源性比较,结果显示菌株 M11 的 16S rDNA 序列与分支杆菌属(*Mycobacteria*)的多株菌具有高度同源性.菌株 M11 与 *Mycobacterium* sp. JLS、*Mycobacterium* sp. KMS、*Mycobacterium* sp. MCS(从土壤中分离,可降解 PAHs^[28])的同源性为 99%,与 *Mycobacterium monacense* sp. B9-21-178 的同源性为 99%(2006 年报道分离的 1 个新种^[29]),与 *Mycobacterium doricum* DSM 44339 同源性为 98%,与 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 的同源性为 97%.

从 GenBank 基因数据库中下载分支杆菌属内与菌株 M11 序列相似性大于 97% 的 16S rDNA 序列.用分支杆菌 M11 的序列和下载的 16S rDNA 序列通过 CluserW 进行聚类分析后,利用 MEGA3.1 软件以 Neighbor-Joining 计算方式生成系统发育进化树(距离计算采用 Jukes Cantor 模式).从图 2 中可以看到菌株 M11 与 *Mycobacterium* sp. JLS 和 *Mycobacterium monacense* 聚于一类,亲缘最近.根据形态观察、生理生化和 16S rDNA 序列比对初步确定菌株 M11 为分支杆菌属(*Mycobacterium* sp.).

2.3 菌株 M11 对芘的降解效果

菌株 M11 接种到含芘 50、100、200 mg/L 的液体培养基中后,芘的含量越高,菌体总数越大,利用芘的量也越多.菌生长 12d 后,其数量都达到最高,与芘的初始浓度无关.在含芘 100 mg/L 的培养基中,M11 对芘的降解率始终增加的很快,而含芘 50 mg/L 和 200 mg/L 培养基中,在对数生长后期,芘的降解开始缓慢增加.可见 3 个浓度相比较,100 mg/L 的浓度对菌 M11 的较适宜(见图 3).

在液体降解芘实验时,反应瓶里的培养液逐渐由含有颗粒物的不透明乳白色(不溶性的芘所致)变成透明液体,颗粒物也消失,并有大量微生物絮体出现,说明微生物在繁殖生长的同时也降解了芘.

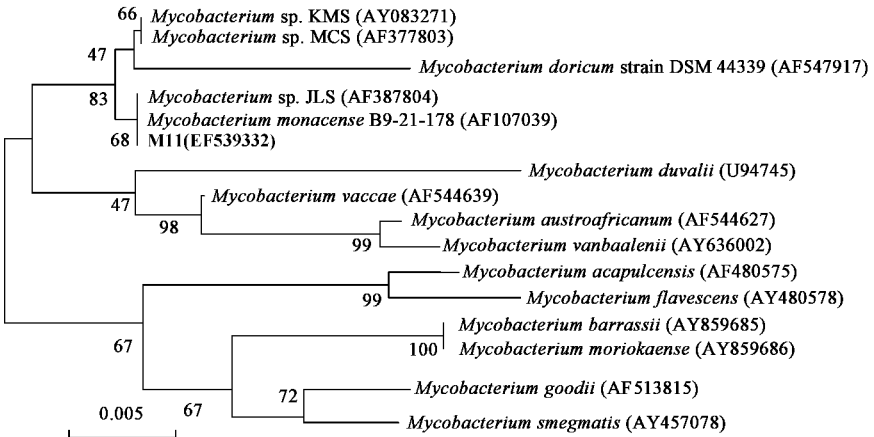


图 2 基于分枝杆菌 M11 和亲缘关系相近的分枝杆菌的 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain M11 and sequences of relating species

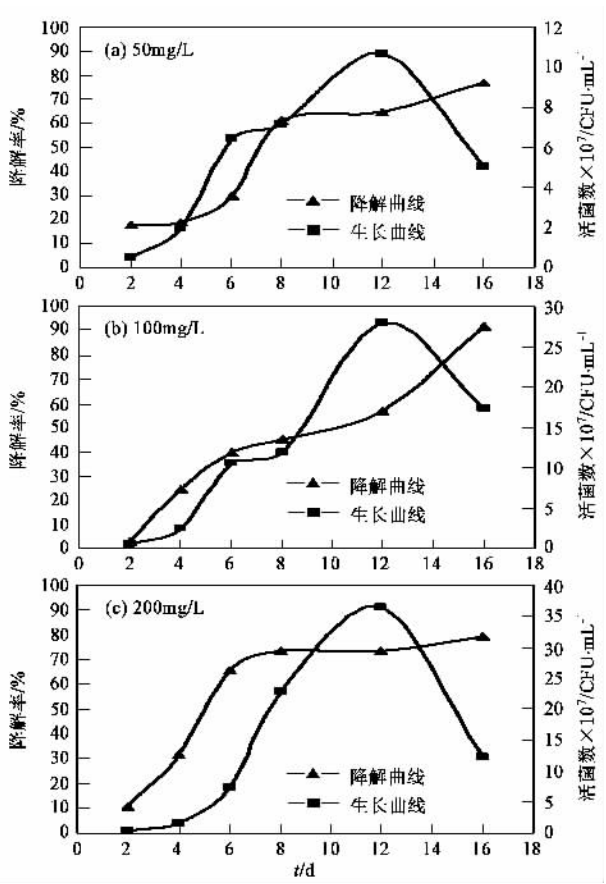


图 3 菌 M11 在不同芘浓度下的降解曲线和生长曲线

Fig.3 Pyrene degradation and strain growth in different pyrene concentration

在菌对数生长的后期,芘降解率降低,这可能是在对数生长前期吸收了大量的芘在菌体内以及大量代谢产物的积累而使降解率降低,随着时间延长,芘逐渐降解,之后降解率又增加.这与糖丝菌(*Saccharothrix* sp. PYX-6^[25])降解芘的过程一致.在

菌的衰亡期,芘的含量减少,菌的数量也较少.液体培养 16d 后降解率分别达到 76.9%、91.8% 和 79.23%.结果表明菌株 M11 具有较强的降解能力,在芘含量高达 200 mg/L 的条件下,仍然能够较好地生长和降解,而聂麦茜等^[30]报道在该浓度下,菌株 FCN2 对芘的降解转化受到了明显的抑制作用.

M11 对芘的降解具有较广泛的 pH 范围,在芘浓度 100 mg/L, pH 为 5~9 的液体条件下,菌株 M11 均可生长(表 1).在偏酸和偏碱性条件下,降解率都在 68.1% 以上,但在中性和偏碱性条件下,对芘的降解效果较好.在 pH 8 时,降解效果最佳.在 pH 6~9 的范围内,菌的数量差异很小,而在 pH 5 时,菌数迅速减少,但仍达到 10⁷ CFU/mL 以上.

表 1 不同 pH 条件下菌株 M11 的生长和对芘的降解

Table 1 Pyrene degradation and growth of strain M11 under different pH value		
pH 值	降解率/%	活菌数 × 10 ⁸ /CFU·mL ⁻¹
5	50.7	0.75
6	68.0	1.0
7	73.8	1.5
8	80.4	1.2
9	75.5	1.9

2.4 双加氧酶 α 大亚基和 β 小亚基的扩增和序列分析

根据已报道的分枝杆菌 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 的双加氧酶 α 大亚基和 β 小亚基片段设计引物,PCR 扩增后得到约 1 300 bp 和 480 bp 的片段,将序列输入 GenBank 以 Blast 软件进行序列同源性比较,结果显示菌株 M11 与 *Mycobacterium* sp. JLSα 大亚基基因的序列相似性为 99%,与

Mycobacterium vanbaalenii PYR-1 α 大亚基基因序列相似性为 99%, 与 *Mycobacterium* sp. JLS β 小亚基基因的序列相似性为 99%, 与 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 β 小亚基的序列相似性为 98%. 这说明菌株 M11 中具有与以上分枝杆菌高度同源的双加氧酶基因. 由于双加氧酶中 β 小亚基基因的序列保守性低于 α 大亚基, 所以 β 小亚基的同源性稍低于 α 大亚基. 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳结果如图 4.

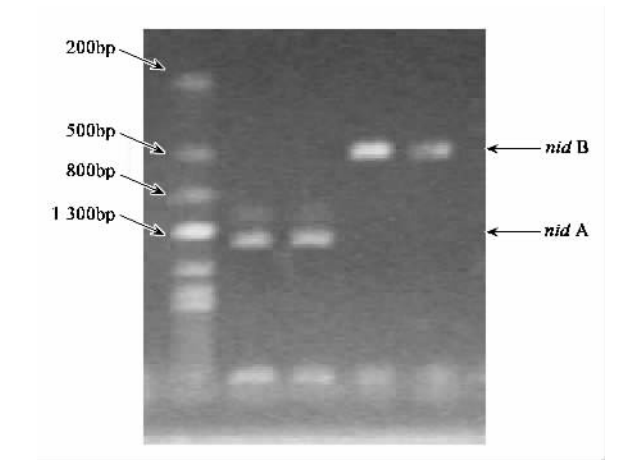


图 4 M11 双加氧酶片段
Fig. 4 Dioxygenase gene fragments of M11

芳香环羟基化双加氧酶是 PAHs 降解过程中的第 1 个酶, 也是关键酶, 它催化氧原子进入到 PAHs 的苯环上, 形成二氢二醇类化合物, 促进 PAHs 的后续降解. Khan 等^[31] 从菌株 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 克隆和测定了 *nidA* 和 *nidB* 基因编码的芳香环羟基化双加氧酶 α 大亚基和 β 小亚基序列, 此双加氧酶基因能够将芘催化成 4, 5-二羟基-4, 5-二氢芘. Krivobok 等^[32] 克隆了芘诱导的 *Mycobacterium* sp. 6PY1 的双加氧酶基因 *pdoA1* 和 *pdoB1*, 序列分析显示与 *nidA* 和 *nidB* 基因有高度同源性. Miller 等^[28] 从污染土壤中筛选到能降解芘的 3 株分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. JLS、*Mycobacterium* sp. KMS、*Mycobacterium* sp. MCS, PCR 扩增均得到 *nidA* 和 *nidB* 基因, 且高度相似. Hall 等^[33] 报道将 *nidA* 和 *nidB* 基因作探针来探测土壤中能降解 PAHs 的分枝杆菌, 为土著微生物群落 PAHs 降解和修复能力提供重要信息^[34]. 菌株 M11 同样具有高度类似 *nidAB* 的基因, 可见 *nidA* 和 *nidB* 基因可能在芘降解的过程中起重要作用, 广泛存在于降解芘的分枝杆菌中.

3 结论

(1) 本研究从土壤中筛选到 1 株降解芘能力较

强的菌株 M11, 经生理生化和 16S rDNA 分析被鉴定为分枝杆菌属. PCR 扩增得到编码芘羟基化双加氧酶大亚基和小亚基的基因片段, 序列分析表明与已知降解芘的分枝杆菌的 *nidAB* 基因具有高度同源性.

(2) 菌株 M11 能以菲、蒽、荧蒽、芘为唯一碳源和能源生长. 污染环境中的 PAHs 都是以混合形式存在的, 而且污染条件复杂. 菌株 M11 在芘浓度为 50 ~ 200 mg/L, pH5 ~ 9 的条件下都可以较好地生长和降解, 因此在生物修复污染土壤方面具有很广阔的应用前景.

参考文献:

[1] Zasadowski A, Wysocki A. Some toxicological aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) effects[J]. Roczn. Panstw. Zakl. Hig., 2002, 53(1): 33-45.

[2] 郭楚玲, 郑天凌, 洪华生. 多环芳烃的微生物降解和生物修复[J]. 海洋环境科学, 2000, 19(8): 24-29.

[3] 宋玉芳, 宋雪英, 张薇, 等. 污染土壤生物修复中存在问题的探讨[J]. 环境科学, 2004, 25(2): 129-133.

[4] Samanta S K, Singh O V, Jain R K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(6): 243-248.

[5] Harayama S. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design [J]. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8(3): 268-273.

[6] Ahmed M, Focht D D. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*[J]. Can J Microbiol, 1973, 19: 47-52.

[7] Atlas R M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective[J]. Microbiol Rev, 1981, 45: 180-209.

[8] Bartha R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation[J]. Microb Ecol, 1986, 12: 155-172.

[9] Shuttleworth K L, Cerniglia C E. Environmental aspects of PAH biodegradation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology Part A, Enzyme Engineering and Biotechnology, 1995, 54(13): 291-302.

[10] Johnsen A R, Wick L Y, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil[J]. Environmental Pollution, 2005, 133(1): 71-84.

[11] Saagua M C, Baeta-Hall L, Anselmo A M. Microbiological characterization of a coke oven contaminated site and evaluation of its potential for bioremediation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18: 841-845.

[12] Feitkenhauer H, Muller R, Markl H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60 ~ 70°C by *Thermus* and *Bacillus* spp.[J]. Biodegradation, 2003, 14: 367-372.

[13] Seo J S, Keum Y S, Hu Y, et al. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1, 2- and 3, 4-dioxygenation and meta- and ortho-cleavage of naphthalene-1, 2-diol [J]. Biodegradation, 2007, 18(1): 123-131.

[14] Garcia-Valdes E, Cozar E, Rotger R, et al. New Naphthalene-Degrading Marine *Pseudomonas* Strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(10): 2478-2485.

- [15] Stuart-Kell K G, Hohnatock A M, Drees K P, *et al.* Plasmids Responsible for Horizontal Transfer of Naphthalene Catabolism Genes between Bacteria at a Coal Tar-Contaminated Site Are Homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(10): 3633-3640.
- [16] Stringfellow W T, Aitken M D. Competitive Metabolism of Naphthalene, Methyl-naphthalenes, and Fluorene by Phenanthrene Degrading *Pseudomonads* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(1): 357-362.
- [17] Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7[J]. *Chemosphere*, 1999, **38**(6): 1331-1337.
- [18] Finkelstein Z I, Baskunov B P, Golovlev E L, *et al.* Fluorene Transformation by Bacteria of the Genus *Rhodococcus* [J]. *Microbiology*, 2003, **72**(6): 660-665.
- [19] Heitkamp M A, Freeman J P, Miller D W, *et al.* Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **54**(10): 2556-2565.
- [20] 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-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(12): 5497-5505.
- [21] Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, *et al.* Degradation of Pyrene, Benz[a]anthracene, and Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, Isolated from a Former Coal Gasification Site [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(1): 13-19.
- [22] Dean-Ross D, Cerniglia C E. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**: 307-312.
- [23] Walter U, Beyer M, Klein J, *et al.* Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, **34**: 671-676.
- [24] Bezalel L, Hadar Y, Peter P F U, *et al.* Initial Oxidation Products in the Metabolism of Pyrene, Anthracene, Fluorene, and Dibenzothiophene by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(7): 2554-2559.
- [25] 扈玉婷, 任凤华, 周培瑾, 等. 一株分离自新疆天池寡营养环境的糖丝菌(*Saccharothrix* sp. PYX-6)降解芘的特性[J]. *科学通报*, 2003, **48**(16): 1796-1800.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英编著. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 349-370.
- [27] 武凤霞. 菲降解细菌的分离鉴定和及其降解效果研究[D]. 西安: 西北大学, 2006. 22-23.
- [28] Miller C D, Hall K, Liang Y N, *et al.* Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading *Mycobacterium* Isolates from Soil[J]. *Microbiol Ecology*, 2004, **48**: 230-238.
- [29] Reischl U, Melzl H, Kroppenstedt R M, *et al.* *Mycobacterium monacense* sp. nov [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, **56**: 2575-2578.
- [30] 聂麦茜, 吴蔓莉, 王晓昌, 等. 一株黄杆菌及其粗酶液对芘降解的动力学特征研究[J]. *环境科学学报*, 2006, **26**(2): 181-185.
- [31] Khan A A, Wang R F, Cao W W, *et al.* Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(8): 3577-3585.
- [32] Krivobok S, Kuony S, Meyer C, *et al.* Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases [J]. *J Bacteriol*, 2003, **185**(13): 3828-3841.
- [33] Hall K, Miller C D, Sorensen D L, *et al.* Development of a catabolically significant genetic probe for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacteria* in soil [J]. *Biodegradation*, 2005, **16**: 475-484.