

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第39卷 第4期

Vol.39 No.4

2018

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

京津冀地区钢铁行业污染物排放清单及对PM_{2.5}影响 段文娇, 郎建全, 程水源, 贾佳, 王晓琦 (1445)

京津冀内陆平原地区PM_{2.5}浓度时空变化定量模拟 郝静, 孙成, 郭兴宇, 王卫, 刘方田, 党海燕 (1455)

成都市冬季相对湿度对颗粒物浓度和大气能见度的影响 刘凡, 谭钦文, 江霞, 蒋文举, 宋丹林 (1466)

华山地区PM_{2.5}中无机离子垂直分布特征 曹聪, 王格慧, 吴灿, 李建军, 刘浪, 李瑾, 余兴 (1473)

烟花爆竹集中燃放的大气细颗粒物(PM_{2.5})成分图谱 谢瑞加, 侯红霞, 陈永山 (1484)

长三角地区中小燃煤锅炉PM_{2.5}成分谱特征 徐健, 黄成, 李莉, 陈勇航, 楼晟荣, 乔利平, 王鸿宇 (1493)

民用燃煤排放分级颗粒物中重金属排放因子 严沁, 孔少飞, 刘海彪, 王伟, 吴剑, 郑明明, 郑淑容, 杨国威, 吴方琪 (1502)

冬、春季青岛大气气溶胶中乙二酸的分布特征及影响因素 张帅, 石金辉, 姚小红, 高会旺 (1512)

青岛大气降水中微量元素的浓度及溶解度 李茜, 石金辉, 李鹏志, 姚小红, 高会旺 (1520)

辽东湾大气中多环芳烃的含量组成及气粒分配 张玉凤, 宋永刚, 田金, 赵海勃, 杨爽, 吴金浩 (1527)

典型地区大气新型卤代阻燃剂污染特征、来源分析及人体暴露 李琦路, 杨孔, 李军, 张干 (1537)

苏州工业园区室内外颗粒物中多溴联苯醚污染特征及人体暴露水平 王俊霞, 顾海东, 张占恩, 钱飞跃 (1544)

上海市大气污染对感冒疾病相对危险度的影响 杨丝絮, 马玉霞, 周建丁, 周骥 (1552)

城镇化河流溶解性有机质的荧光特性与水质相关性:以宁波市北仑区芦江为例 曹昌丽, 梁梦琦, 何桂英, 纵亚男, 唐剑锋 (1560)

艾比湖区域景观格局与河流水质关系探讨 曹灿, 张飞, 阿依尼格·亚力坤, 朱世丹, 郭苗, 阿丽米热·塔力甫江, Kung Hsiangte (1568)

三峡澎溪河水华期间水体CH₄浓度及其通量变化特征初探 秦宇, 张渝阳, 李哲, 马健荣 (1578)

漓江段地表水体旱季硝酸盐动态变化特征及其来源 苗迎, 章程, 肖琼, 赵海娟, 李成习 (1589)

柳江流域饮用水源地重金属污染与健康风险评价 张清华, 韦永著, 曹建华, 于爽 (1598)

黄柏河流域梯级水库沉积物磷形态特征及磷释放通量分析 刘佳, 雷丹, 李琼, 王亮, 张平, 肖尚斌 (1608)

白洋淀典型持久性有机污染物污染特征与风险评估 高秋生, 焦立新, 杨柳, 田自强, 杨苏文, 安月霞, 贾海斌, 崔志丹 (1616)

典型有机氯农药在珠三角地区多介质环境中的归趋模拟 高梓闻, 徐月, 亦如瀚 (1628)

河道水旁路处理中试工艺中PPCPs的去除效果及机制 李力, 朱楦, 白瑶, 赵健, 曹之淇, 郭泓利, 李凌云, 左剑勇 (1637)

茶普生在氯消毒过程中的去除、转化与风险评价 樊鑫鑫, 杜尔登, 李佳琦, 赵顺利, 王聿琳, 彭明国 (1645)

真空紫外/氯处理饮用水典型致嗅物质 孙昕, 张焱, 史路肖, 陈笑涵, 唐晓 (1654)

热活化过硫酸盐降解三氯生 蒋梦迪, 张清越, 季跃飞, 陆隽鹤 (1661)

水体模拟颗粒物对四环素的吸附特性及基本规律 徐龙凤, 魏群山, 吕强, 唐立朋, 刘亚男, 柳建设 (1668)

海水优化ANAMMOX包埋固定化及其处理含海水污水的脱氮性能 单晓静, 于德爽, 李津, 陈光辉, 冯莉, 吕廷廷, 邵青 (1677)

外源甜菜碱投加增强高盐废水厌氧氨氧化脱氮性能 于德爽, 吴国栋, 李津, 周同, 王晓静 (1688)

硝化污泥富集及其强化高氨氮冲击的中试研究 盛晓琳, 崔灿灿, 王家德, 刘锐, 徐峰, 陈吕军 (1697)

分段进水对改良A²/O-BAF双污泥系统反硝化除磷脱氮的影响 南彦斌, 彭永臻, 曾立云, 赵智超, 刘宏, 李慧, 陈永志 (1704)

不同温度下应用比值控制实现连续流好氧颗粒污泥短程硝化 梁东博, 卞伟, 阚睿哲, 王文啸, 赵青, 孙艺齐, 李军 (1713)

智能化曝气控制A/O工艺活性污泥特性演化对内源反硝化脱氮的作用机制 徐旻昉, 胡湛波, 张穗生, 李昊航 (1720)

温度对一体式厌氧流化床膜生物反应器运行效能及微生物群落结构的影响 李玥, 胡奇, 高大文 (1731)

污泥臭氧原位减量工艺中抗生素的去除 汪鲁, 黄伟伟, 李彦刚, 强志民 (1739)

零价铁对污泥厌氧消化过程中四环素抗性基因水平转移的作用影响 杨帆, 徐雯丽, 钱雅洁, 刘振鸿, 薛罡, 高品 (1748)

环境因子对全自养脱氮颗粒污泥功能菌协同效应的影响 陈希, 钱飞跃, 王建芳, 高军军, 沈耀良, 贾珣 (1756)

后置固相反硝化滤池工艺沿程微生物特性 张千, 吉芳英, 徐璇 (1763)

复合菌株YH01+YH02强化SBR好氧反硝化脱氮及菌群结构分析 陈海升, 曹刚, 张迪, 黄郑郑, 莫测辉 (1773)

氮磷失衡下膨胀污泥性能及膨胀菌群落结构变化 贺雪濛, 丁丽丽, 张璐璐, 顾卓江, 任洪强 (1782)

1株铜绿假单胞菌对苊的降解特性及代谢途径 李想, 张雪英, 周俊, 宋军, 王建刚, 雍晓雨, 贾红华 (1794)

铜尾矿库坝面土壤微生物群落动态的驱动因子 李磊, 景炬辉, 刘晋仙, 柴宝峰 (1804)

垦殖对桂林会仙喀斯特湿地土壤养分与微生物活性的影响 黄科朝, 沈育伊, 徐广平, 黄玉清, 张德楠, 孙英杰, 李艳琼, 何文, 周龙武 (1813)

黄土丘陵区退耕还林还草对土壤细菌群落结构的影响 陈孟立, 曾全超, 黄懿梅, 倪银霞 (1824)

河岸带表层土壤的铁氨氧化(Feammox)脱氮机制的探究 丁帮环, 李正魁, 朱鸿杰, 陈湜, 覃云斌, 杨建华, 胡优优 (1833)

藏猪扰动作用下的高寒草甸土壤退化特征及微生物群落结构变化 展鹏飞, 肖德荣, 闫鹏飞, 刘振亚, 马金成, 陈志明, 格茸, 田伟, 王行 (1840)

深圳湾典型红树植物根表铁膜及其重金属富集特征 沈小雪, 李瑞利, 柴民伟, 邱国玉 (1851)

香港周边海域野生鱼体内DDTs和PCBs的含量分布和食用风险评估 苏杨, 鲍恋君, 曾永平 (1861)

偏远高山湿地土壤中PAHs污染特征:以神农架大九湖为例 胡天鹏, 邢新丽, 柯艳萍, 毛瑶, 黎荧, 郑煌, 喻月, 张家泉, 祁士华 (1872)

西南地区典型森林水库土壤和沉积物汞的迁移转化特征 孙涛, 马明, 王永敏, 安思危, 王定勇 (1880)

广西西江流域土壤镉含量特征及风险评估 宋波, 杨子杰, 张云霞, 王佛鹏, 周浪, 李黎, 钟雪梅 (1888)

长期施肥对旱地红壤及作物中砷累积的影响 张蓉, 余光辉, 李亚青 (1901)

三元土壤调理剂对田间水稻镉累积转运的影响 辜娇峰, 周航, 贾润语, 王倩倩, 李虹呈, 张平, 彭佩钦, 廖柏寒 (1910)

稻田土壤性质与水稻镉含量的定量关系 王梦梦, 何梦媛, 苏德纯 (1918)

钙基膨润土辅助对堆肥及土壤Cu、Zn形态转化和白菜吸收的影响 赵军超, 王权, 任秀娜, 李荣华, Mukesh Kumar Awasthi, Altaf Hussain Lahori, 张增强 (1926)

外源碳和氮输入对降水变化下土壤呼吸的短期影响 贺玉龙, 齐玉春, 彭琴, 董云社, 郭树芳, 闫钟清, 李兆林, 王丽芹 (1934)

模拟降水量减少对大豆-冬小麦轮作农田土壤呼吸的影响 王朝辉, 陈书涛, 孙鹭, 胡正华 (1943)

紫色土丘陵区农田源头沟渠一氧化氮排放的季节差异及影响因素 田琳琳, 任光前, 朱波 (1952)

季节非对称升温对喀斯特土壤CO₂释放的影响 唐国勇, 张春华, 刘方炎, 李昆, 马艳 (1962)

《环境科学》征订启事 (1472) 《环境科学》征稿简则 (1511) 信息 (1755, 1839, 1925)

1 株铜绿假单胞菌对芘的降解特性及代谢途径

李想¹, 张雪英¹, 周俊^{2*}, 宋军³, 王建刚⁴, 雍晓雨², 贾红华²

(1. 南京工业大学环境学院, 南京 211816; 2. 南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 211816; 3. 南京工业大学化工学院, 南京 211816; 4. 四川省地质矿产勘查开发局, 成都水文地质工程地质队, 成都 610072)

摘要: 多环芳烃(PAHs)因其具有“三致”作用对生态系统产生潜在威胁. 微生物降解是多环芳烃降解的主要途径之一, 筛选出能高效降解多环芳烃的菌株是微生物修复技术的关键. 本文采用富集培养的方法从多环芳烃污染的污泥中分离到 1 株以芘为唯一碳源的菌株 LX2, 经形态观察、生理生化 and 16S rDNA 鉴定, LX2 属于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas* sp. LX2). 菌株在含芘浓度为 50 mg·L⁻¹ 的无机盐液体培养基中培养 21 d 对芘的降解效率达 32.1%. 经 GC-MS 分析发现, *Pseudomonas* sp. LX2 降解芘的中间代谢产物主要有 4,5-二氢芘、2'-羟基苯丙酮、苯酚、原儿茶酚. 基于鉴定的代谢产物得出芘通过“萘”和“邻苯二甲酸”两种不同的途径被铜绿假单胞菌(*Pseudomonas* sp. LX2)降解.

关键词: 芘; 微生物降解; 铜绿假单胞菌; 代谢途径; 萘; 邻苯二甲酸

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2018)04-1794-10 DOI: 10.13227/j.hjxx.201708243

Degradation Characteristics and Metabolic Pathway of a Pyrene-Degrading *Pseudomonas aeruginosa* Strain

LI Xiang¹, ZHANG Xue-ying¹, ZHOU Jun^{2*}, SONG Jun³, WANG Jian-gang⁴, YONG Xiao-yu², JIA Hong-hua²

(1. College of Environment, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 3. College of Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 4. Chengdu Hydrogeology and Engineering Geology Team, Sichuan Bureau of Geology & Mineral Resources, Chengdu 610072, China)

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pose a potential threat to ecosystems due to their mutagenic, carcinogenic, and teratogenic effects. Microbial degradation has been suggested as the best way to remove PAHs from contaminated environments. Screening of bacterial strains capable of efficiently degrading PAHs is the key to the bio-remediation technique. With the method of enrichment culture, the bacterial strain LX2, which can use pyrene as the sole carbon source, was isolated from sludge contaminated with PAHs. The strain was identified as *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas* sp. LX2) according to the results of the analyses of its morphology, physiology, and phylogeny of its 16S rDNA sequence. The degradation rate of pyrene by *Pseudomonas* sp. LX2 was 32.1% after 21 days of cultivation at an initial pyrene concentration of 50 mg·L⁻¹. Pyrene, 4,5-dihydro-, 2'-Hydroxypropiophenone, Phenol, and Protocatechuate were identified as the major metabolites by GC/MS analysis. Based on the identified metabolites, it was concluded that pyrene was degraded via two different routes by *Pseudomonas aeruginosa*, namely the 'naphthalene' and the 'phthalic acid' routes.

Key words: pyrene; biodegradation; *Pseudomonas aeruginosa*; metabolic pathway; naphthalene; phthalic acid

多环芳烃(PAHs)是由两个或多个苯环以线状、角状或簇状的排列方式构成的有机物,具有致癌、致畸、致突变性(“三致性”)^[1,2].从航运、石油泄漏、地表径流以及矿物燃料的不完全燃烧等各种活动排放的多环芳烃对环境造成了持续危害^[3].这种污染物由于其非常低的水溶性和对海洋沉积物的强吸附力往往在环境中持续存在. PAHs 主要是通过挥发、光降解、沉降、化学氧化和微生物降解来去除,其中微生物降解是最为彻底的多环芳烃去除方法^[4],已成为污染治理的主要研究方向.

在探求多环芳烃降解的过程中,筛选分离出高效降解菌株是多环芳烃微生物降解技术的关键.相对于低分子量的 PAHs,四环及四环以上的 PAHs 由

于其分子结构复杂、难于被氧化、水溶性差等很难筛选出高效降解的菌株.芘是环境中普遍存在的四环的 PAHs,具有稳定的四苯环对称结构,是高分子量 PAHs 的代表化合物.目前发现能够降解芘的典型细菌包括以下几种:不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)^[5]、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[6-9]、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)^[10-12]、解环菌属(*Cycloclasticus*

收稿日期: 2017-08-30; 修订日期: 2017-09-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(21777069); 国家重点研发计划项目(2016YFE0112800); 江苏省重点研发计划项目(BE2016389)

作者简介: 李想(1992~),女,硕士研究生,主要研究方向为城市污泥的生物脱毒及资源化利用, E-mail: 995103243@qq.com

* 通信作者, E-mail: zhoujun@njtech.edu.cn

sp.)^[13]、分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)^[14]、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)^[11-12,15]、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)^[16]、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)^[17]、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)^[18-19]、戈登氏菌属(*Gordona* sp.)^[20-21]、糖丝菌属(*Saccharothrix* sp.)^[22]等。PAHs 的微生物降解的难易程度往往与有机物的溶解度、环数、杂环原子性质和取代基的数目、种类、位置有关,而各种微生物对不同 PAHs 降解的机制也各不相同^[23]。近几年关于萘、菲等简单的 PAHs 微生物代谢途径的研究较为清晰^[24-28],但对于四环及四环以上的 PAHs 研究目前还一直是热点,特别是对四环及四环以上的 PAHs 的降解途径仍需深入探究^[29,30]。

本文从长期被石油污染的石化污泥中分离出 1 株芘降解菌株,对其进行了生理生化及分子生物学的鉴定,考察了菌株的生长及其对芘的降解特性,并探究了该菌株对芘降解的途径,以期为多环芳烃污染地区的生物修复和治理提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌源取自于南京某石化污水厂二沉池活性污泥。

无机盐培养基:NaCl 24 g、KCl 0.7 g、MgSO₄·7H₂O 0.7 g、NH₄Cl 1 g、NaNO₃ 0.5 g、KH₂PO₄ 2 g、Na₂HPO₄ 3 g, 1 000 mL 蒸馏水, pH 6~7。芘无机盐培养基:以丙酮配制 1 g·L⁻¹的芘丙酮溶液,取一定量的芘丙酮溶液,置于已灭菌的无机盐培养基中,在无菌状态下,待丙酮挥发完毕。注意芘丙酮溶液加入无机盐培养基时会出现白色浑浊物,是未挥发的丙酮所致,待丙酮挥发完全后白色浑浊物消失。LB 培养基:NaCl 10 g、蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g。LB 培养基中加入琼脂 15~20 g 制成 LB 平板培养基。以上培养基均使用高压蒸汽灭菌锅在 121℃ 条件下灭菌 20 min。

主要试剂:多环芳烃污染样品芘(Pyene, 质量分数 > 97%), 购自 TCI 公司。多环芳烃标准品芘(Pyene, 质量分数 99.1%), 购自 AccuStandard 公司, 有机溶剂纯度均为色谱纯。HTP 试剂:按照吡啶:六甲基二硅胺:三甲基氯硅烷比例为 7:2:1 配置, 混合后 -20℃ 保存备用。

1.2 菌种的筛选与纯化

取新鲜的污泥 10 g 在 100 mL 0.85% 的生理盐

水中振荡 20 min, 再取悬液接入以芘(10 mg·L⁻¹)为唯一碳源的无机盐培养基中, 恒温 30℃ 振荡速率为 180 r·min⁻¹ 培养 7 d。然后再次转接到 20 mg·L⁻¹的芘无机盐培养基中, 继续培养。如此重复, 直到培养基中芘浓度为 160 mg·L⁻¹。将最后一的培养液进行 10⁻¹~10⁻⁹ 梯度稀释并涂布到 LB 平板培养基上, 经过培养挑选出生长迅速、丰富的单菌落, 进行平板反复划线分离, 直至得到纯种菌。以 1% 的接种量转接至三角瓶中, 所有操作在超净工作台中进行。为防止芘被光解, 实验均在暗室培养箱中操作。

1.3 菌种的鉴定

通过菌体的形态特征、生理生化特性以及 16S rDNA 序列结果进行鉴定。

1.3.1 形态特征观察

将各纯菌接入 LB 平板培养基中, 在 30℃ 培养至对数生长期后, 观察细菌的生长状况、菌落形态以及颜色, 同时通过革兰氏染色在显微镜下观察细胞形态。

1.3.2 菌株生理生化特性测定

应用美国 Biolog 公司的 Biolog 微生物自动分析系统(GEN III MicroPlate™ 测试面板)对细菌的 94 种生化表型进行测试, 并鉴定菌种。在 94 个表型测试中分析了 71 个碳源利用测定和 23 个化学敏感性测定。Biolog 的微生物鉴定系统软件从 GEN III MicroPlate™ 测试面板的表型模式中鉴定细菌。测试板可以提供微生物的“表型指纹图谱”, 可用于在物种层面识别鉴定^[31,32]。所有程序参阅 Biolog 公司 GEN III 用户指南进行。将获得的纯培养物接种至 Biolog 所推荐的 BUG 培养基上, 在 IF-A 接种液中制备菌悬液, 在 Biolog 读数仪上读取微孔板数据, 重复 3 次读数, 最终再与数据库比对鉴定^[33,34]。

1.3.3 16S rDNA 序列测定

鉴定菌株在 30℃ LB 培养基中生长至对数期, 1.5 mL 菌液在转速为 12 000 r·min⁻¹ 下离心收集菌体, 并对该菌株 16S rDNA 基因序列分析。16S rDNA 扩增的引物为 27F AGAGTTTGATCCTGG CTCAG 和 1492R GGTTACCTTGTTACGACTT^[29]。PCR 所用酶为 ExTaq, PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 次循环, 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。DNA 纯化和测序工作委托金斯瑞公司完成。测序结果在 NCBI 上通过 Blast 程序进行序列同源性比较, 同时下载同源性较高且已知分类菌种的 16S rDNA 碱基序列, 利用 clustalx

进行相似性分析, MEGA4 软件采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树图。

1.4 菌株生长曲线动力学研究

将活化两次后的种子液以 1% 接种于 LB 培养基中, 恒温培养, 每隔 1~2 h 取样测量其 600 nm 处的吸光值 (D_{600} 值)。根据菌株在不同时间的生长数据, 选择修正 Gompertz 模型拟合苈降解菌的生长曲线。通过修正 Gompertz 模型^[35] [公式(1)] 拟合得到的模型参数, 计算出最大比生长速率 U [公式(2)] 和微生物生长的延滞期 LPD [公式(3)]。最终采用 R^2 对建立模型进行评价^[36]。

$$\lg(N_t/N_0) = a \times \exp\{-\exp[K \times (t - t_c)]\} \quad (1)$$

由此可以得出 U 和 LPD 的计算公式如下:

$$U = \frac{a \times k}{e} \quad (e = 2.7182) \quad (2)$$

$$\text{LPD} = t_c - \frac{1}{K} \quad (3)$$

式中, t 为时间; N_t 和 N_0 分别表示在时间 t 时和初始时间微生物数量; a 为最大菌数 N_{\max} 与初始菌数 N_0 的差值; t_c 为达到最大生长速率的时间; K 为在时间点 t_c 的最大生长速率。

1.5 降解效率的测定

将种子液以 1% 接种量接种于以苈为唯一碳源的无机盐培养基中, 苈浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 恒温 30°C 振荡速率为 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养, 以含苈而不接菌的无机盐培养基作为空白对照, 记为 CK。在培养过程中分别在第 0、3、7、11、17、23 d 定时取样测定好氧过程中苈的降解率。

取菌液与等体积二氯甲烷混合, 旋转超声, 离心, 重复 3 次萃取后, 旋转蒸发至萃取液近干。加入无水硫酸钠除去多余水分, 用甲醇定容, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径有机滤膜, 最后进 HPLC 分析。HPLC 测试条件: 安捷伦 1200 系列高效液相色谱, 色谱柱为 Water PAHs C-18 专用柱, 检测器是紫外检测器, 柱温 35°C ; 流动相为甲醇, 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 $10 \mu\text{L}$, 检测波长为 254 nm 。

1.6 中间代谢产物的分析

选取 LX2 降解后的样品进行代谢产物的分析测定。采用等体积的二氯甲烷超声萃取菌液 3 次, 萃取方法同上。萃取液氮吹至干后, 加入 $250 \mu\text{L}$ 的 HTP 试剂进行衍生化反应 (120°C 下反应 30 min), 样品制备好后运用气质联用 (GC-MS) 检测降解产物。GC-MS 条件: 进样口温度 250°C , 不分流模式,

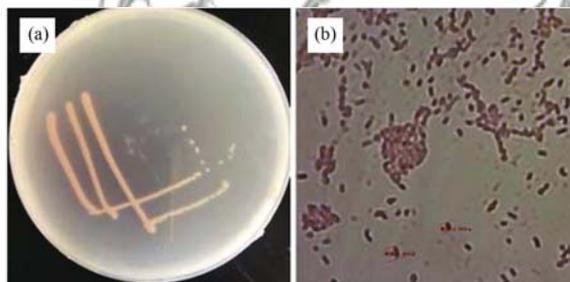
色谱柱 HP-5MS 熔融石英柱 ($30 \text{ m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$)。色谱条件: 初始柱温 70°C , 保留 1.5 min, $16^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 250°C , 保留时间 10 min。质谱条件为: 离子温度 200°C , 电子能量 70 eV, 扫描范围 (m/z) 50~400, 载气为氦气, 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。检索谱库为 NIST 谱库。空白样为含苈而不接菌的无机盐培养基。

2 结果与讨论

2.1 菌种的鉴定

2.1.1 形态特征观察

经过反复筛选、驯化及纯化, 最终筛选出 1 株好氧降解菌 LX2 作为研究菌株。菌株 LX2 在 LB 培养基中生长良好, 在 LB 平板培养基 6 h 后长出黄色菌落, 12 h 后菌落变成粉色, 最终变为红色, 为好氧菌。菌株 LX2 肉眼可看到清晰的单菌落, 菌落较小且扁平, 呈现不规则圆形, 直径 $0.5 \sim 2.0 \text{ mm}$ 左右, 湿润, 如图 1 所示。菌体直或稍弯的杆菌, 菌株大小 $1.94 \sim 2.87 \mu\text{m}$ 左右, 在相差显微镜中观察到菌株活泼的运动, 为革兰氏阴性菌。



(a) 平板培养, (b) 革兰氏染色

图 1 LX2 菌株形态

Fig. 1 Morphological observation of the strain LX2

2.1.2 菌株生理生化特性测定

由微量分析系统 GENIII MicroPlateBiolog 确定重要的生物化学特征如表 1 所示^[33,37,38]。菌株 LX2 可有效利用 8 种碳源, 包括 α -D-葡萄糖、D-果糖-6-磷酸、L-谷氨酸等, 同时化学敏感性测试中, 对 14 种化学物质敏感, 其中包括夫西地酸、D-丝氨酸、二甲胺四环素、毒素有利福霉素、林肯霉素、万古霉素等。菌株 LX2 在 pH 5.0 和 6.0 都可以很好地生长。经 Biolog 细菌鉴定系统分析菌株 LX2 是铜绿假单胞菌属, 可能性为 92.0%, 相似性为 0.647, 位距为 4.180。由此结合菌株 LX2 的形态特征和 Biolog 鉴定结果初步确定为铜绿假单胞菌属。

表 1 生理生化特征测定¹⁾

Table 1 Characteristics of physiology and biochemistry

测试项目	反应	测试项目	反应	测试项目	反应
糊精	b	D-麦芽糖	-	D-海藻糖	-
D-纤维二糖	-	龙胆二糖	-	蔗糖	-
水苏糖	-	棉籽糖	-	D-蜜二糖	-
β -甲基-D-半乳糖苷	-	D-水杨苷	-	N-乙酰-D-葡糖胺	b
N-乙酰神经氨酸	-	α -D-葡糖	+	D-甘露糖	-
D-果糖	b	D-半乳糖	-	3-甲-D-葡糖	-
D-岩藻糖	b	L-岩藻糖	-	L-鼠李糖	-
肌苷	b	D-山梨酸	-	D-甘露醇	b
D-阿糖醇	-	m-肌醇	-	甘油	b
D-葡糖-6-磷酸	-	D-果糖-6-磷酸	+	D-丝氨酸	-
甘氨酸-L-脯氨酸	b	D-丙氨酸	b	L-精氨酸	b
L-天冬氨酸	b	L-谷氨酸	+	L-组氨酸	b
L-焦谷氨酸	b	果胶	-	D-半乳糖醛酸	b
L-半乳糖醛酸内酯	b	D-葡糖酸	+	D-葡糖醛酸	b
葡糖醛酰胺	+	奎宁酸	b	p-羟基-苯乙酸	b
L-乳酸	+	柠檬酸	+	α -酮-戊二酸	b
D-苹果酸	-	L-苹果酸	+	溴-丁二酸	b
吐温-40	b	γ -氨基-丁酸	b	β -羟基-D,L-丁酸	b
丙酸	b	乙酸	b	pH6	+
pH5	+	1% NaCl	b	4% NaCl	b
1% 乳酸钠	+	夫西地酸	+	D-丝氨酸	+
醋竹桃霉素	b	利福霉素	+	二甲胺四环素	+
林肯霉素	+	盐酸胍	b	硫酸四癸钠	+
万古霉素	+	四唑紫	+	四唑蓝	+
茶啉酸	+	亚碲酸钾	+	氨基南	b

1) “-”表示阴性反应; “+”表示阳性反应; “b”表示结果不确定, 在以下条件下都呈阴性, D-纤维二糖、D-松二糖、 α -D-乳糖、N-乙酰- β -D-甘露糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺、D-天冬氨酸、明胶、L-丝氨酸、半乳糖二酸、D-葡糖二酸、丙酮酸甲酯、D-乳酸甲酯、 α -羟基-丁酸、 α -丁酮酸、乙酰乙酸、甲酸、8% NaCl、氯化锂、丁酸钠和溴酸钠

2.1.3 16S rDNA 序列测定

提取菌株的总 DNA, 利用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增得到目的 DNA 片段, 最终得到 1 500 bp 的 16S rDNA 部分序列, 测序结果输入 NCBI, 登录号为 MF593283. 经过 BLAST 分析对比, 显示菌株 LX2 与多株铜绿假单胞菌

(*Pseudomonas aeruginosa*) 的同源性均为 100%. 最后将同源性高的菌株的碱基序列依次下载后, 用 clustalx 进行相似性分析, 并用 MEGA 4 软件采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树图(图 2). 由图 2 可知, 菌株 LX2 与多株铜绿假单胞菌位于同一分支. 综合菌株的形态特征、生理生化特性以及

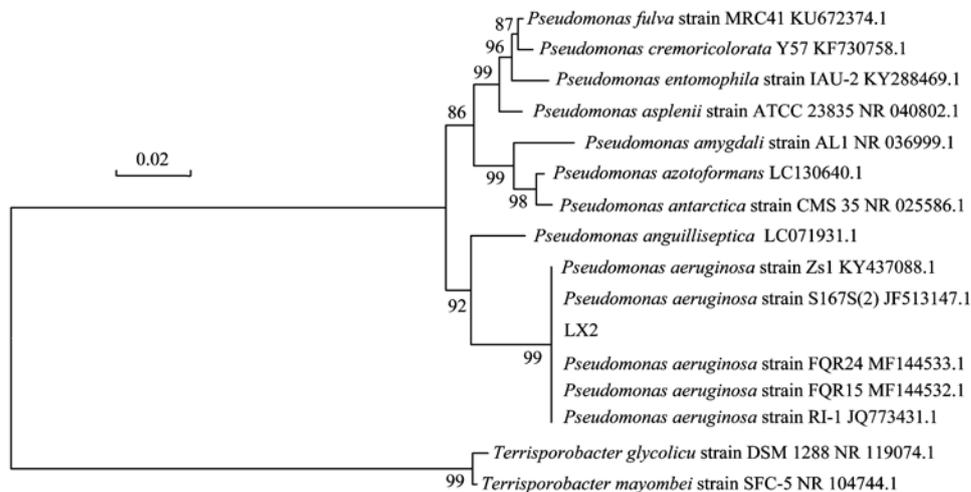


图 2 基于 16S rDNA 基因序列同源性的 *Pseudomonas* sp. LX2 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Pseudomonas* sp. LX2 based on the 16S rDNA gene homology

16S rDNA序列结果, 推测 LX2 属于铜绿假单胞菌, 命名为 *Pseudomonas* sp. LX2.

2.2 *Pseudomonas* sp. LX2 生长曲线动力学研究

运用 Origin 软件, 选用 SGompertz 模型分别拟合菌株 LX2 的生长曲线(图 3), 得到该模型的拟合参数并计算出各自最大比生长速率 U 和微生物生长的延滞期 LPD(表 2). 模型的 R^2 为 0.992 32, 说明 SGompertz 模型可以很好地描述 LX2 的生长. 由表 2 可知, 菌株 LX2 在第 6.7 h 达到最大生长率速度, LX2 的 D_{600} 值最高达 1.7949 ± 0.01935 , 每小时 D_{600} 值增长 0.16, LX2 的最大比增长速率约为 0.1, 延迟期大约只有 0.6 h, 在 2 d 后结束对数期.

2.3 *Pseudomonas* sp. LX2 对芘的降解能力研究

利用 HPLC 对芘降解效率进行定量分析, 以不

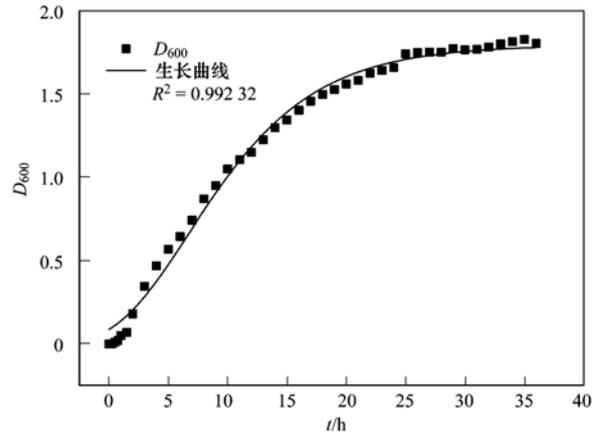


图 3 SGompertz 模型拟合的 *Pseudomonas* sp. LX2 的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *Pseudomonas* sp. LX2 calculated from the Standard Gompertz model

表 2 SGompertz 模型得到的 *Pseudomonas* sp. LX2 的生长参数¹⁾

Table 2 Kinetic growth parameters estimated by the Standard Gompertz model of *Pseudomonas* sp. LX2

菌株	a	t_c	K	U	LPD	R^2
LX2	1.7949 ± 0.01935	6.69758 ± 0.17796	0.16488 ± 0.00681	0.108875	0.632563	0.99232

1) 表内符号的含义见 1.4 节公式说明

接菌的无机盐培养基作为空白对照 CK, *Pseudomonas* sp. LX2 在芘初始浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中对芘的降解效果见图 4. 从中可以看出 *Pseudomonas* sp. LX2 对芘的降解率随着培养时间的延长而逐渐升高, *Pseudomonas* sp. LX2 在培养第 3 d 对芘的降解率高达 16.6%, 在第 17 d 时进入衰退期, 降解率在第 21 d 达到最大为 32.1%. 在不加菌的空白培养基中, 芘浓度几乎没有变化. 由于芘含有 4 个苯环, 在自然环境中非常难于降解, 且降解菌株在不提供其他碳源的情况下降解通常很低^[4].

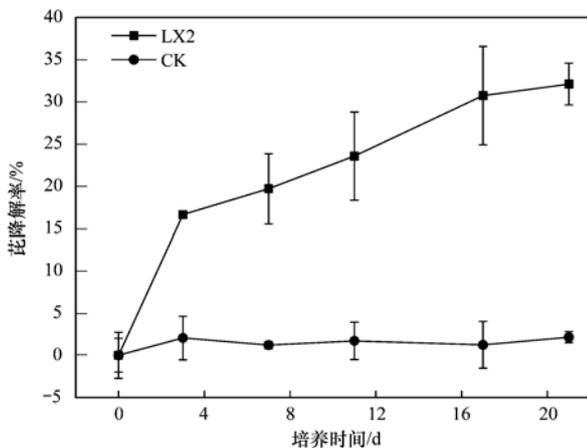


图 4 *Pseudomonas* sp. LX2 对芘的降解率

Fig. 4 Rate of pyrene biodegradation by *Pseudomonas* sp. LX2

2.4 *Pseudomonas* sp. LX2 降解芘的中间代谢产物分析

通过 GC-MS 进行定性分析, 深入研究 *Pseudomonas* sp. LX2 对芘好氧降解过程中的一系列中间代谢产物. 提取样品的色谱图表明, *Pseudomonas* sp. LX2 在对芘降解过程中形成了多种代谢产物, 同时以加芘而非加菌的培养基作为空白对照, 结果如图 5 所示. 从中可知, 与空白对照相比, *Pseudomonas* sp. LX2 的反应体系中在第 4 d 发现了 6 种物质. 13.517、13.114 和 13.336 min 的吸收峰经质谱比对分别为芘 ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}$, CAS:129-00-0)、4,5-二氢芘 ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}$, CAS:6628-98-4) 和 1,2,3,3a,4,5-六氢芘 ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}$, CAS:5385-37-5); 12.697 min 和 12.947 min 的吸收峰经质谱比对分别是氢化肉桂酸 ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$, CAS:501-52-0) 和 2'-羟基苯丙酮 ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$, CAS:610-99-1) 硅烷化后的产物; 氢化肉桂酸和 2'-羟基苯丙酮推测为 1,2,3,3a,4,5-六氢芘经过多次代谢后的产物; 氢化肉桂酸进一步代谢为苯乙酸 ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$, CAS:103-82-2) 和苯酚 ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$, CAS:108-95-2), 硅烷化后产物被确认停留时间在 12.857 min. 以上物质分别通过标准品 GC/MS 分析证实. 接种 *Pseudomonas* sp. LX2 的反应体系在第 7 d 的代谢产物中也发现了 1,2,3,3a,4,5-六氢芘 (停留时间为 13.343

min), 同时产生了另外两种新的代谢产物, 色谱停留时间分别为 10.147 min 和 10.772 min, 经质谱比

对后鉴定为 3,4,5,6-四氢苯酐($C_8H_8O_3$, CAS: 2426-02-0) 和原儿茶酸($C_7H_6O_4$, CAS: 99-50-3),

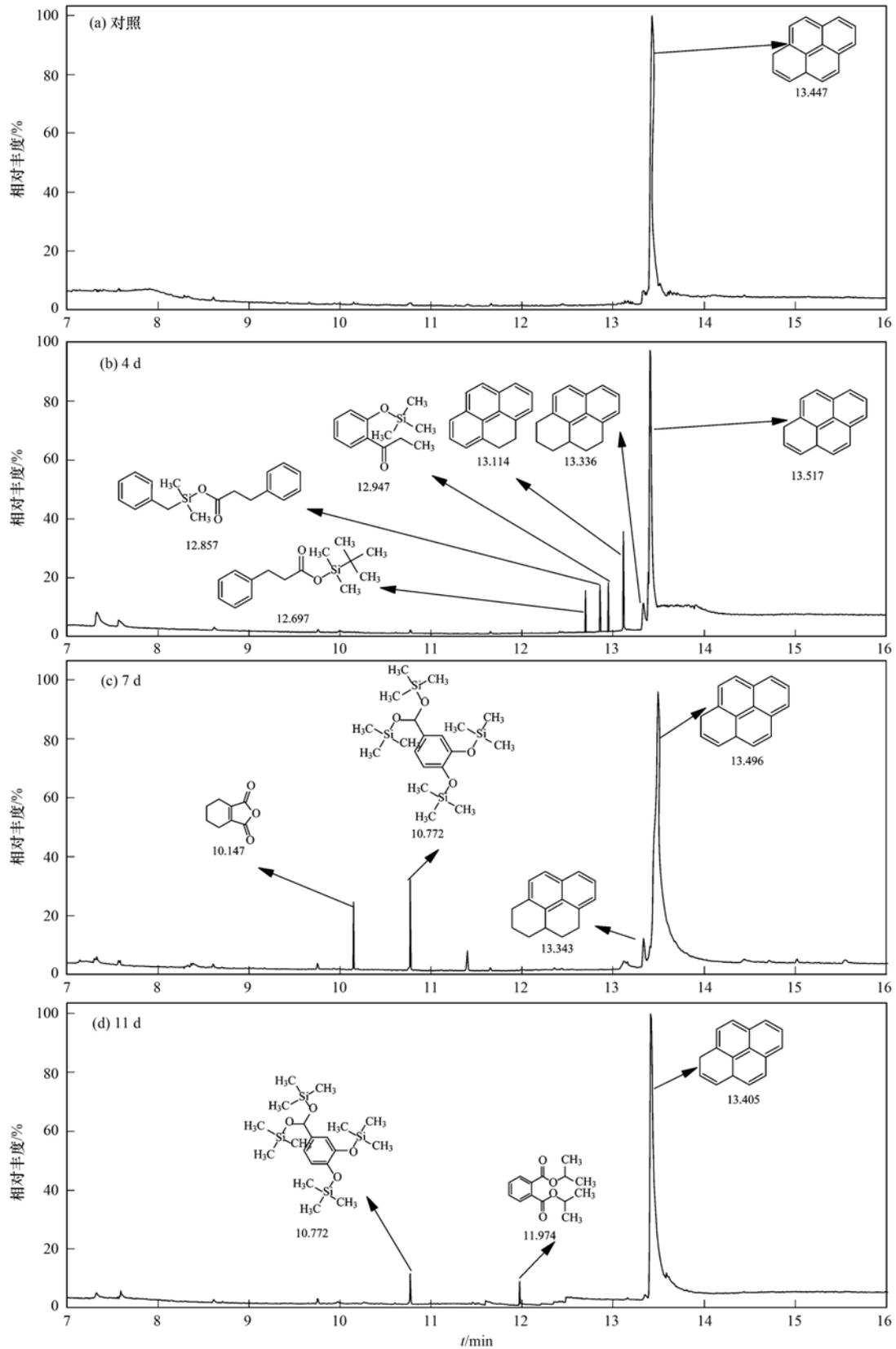


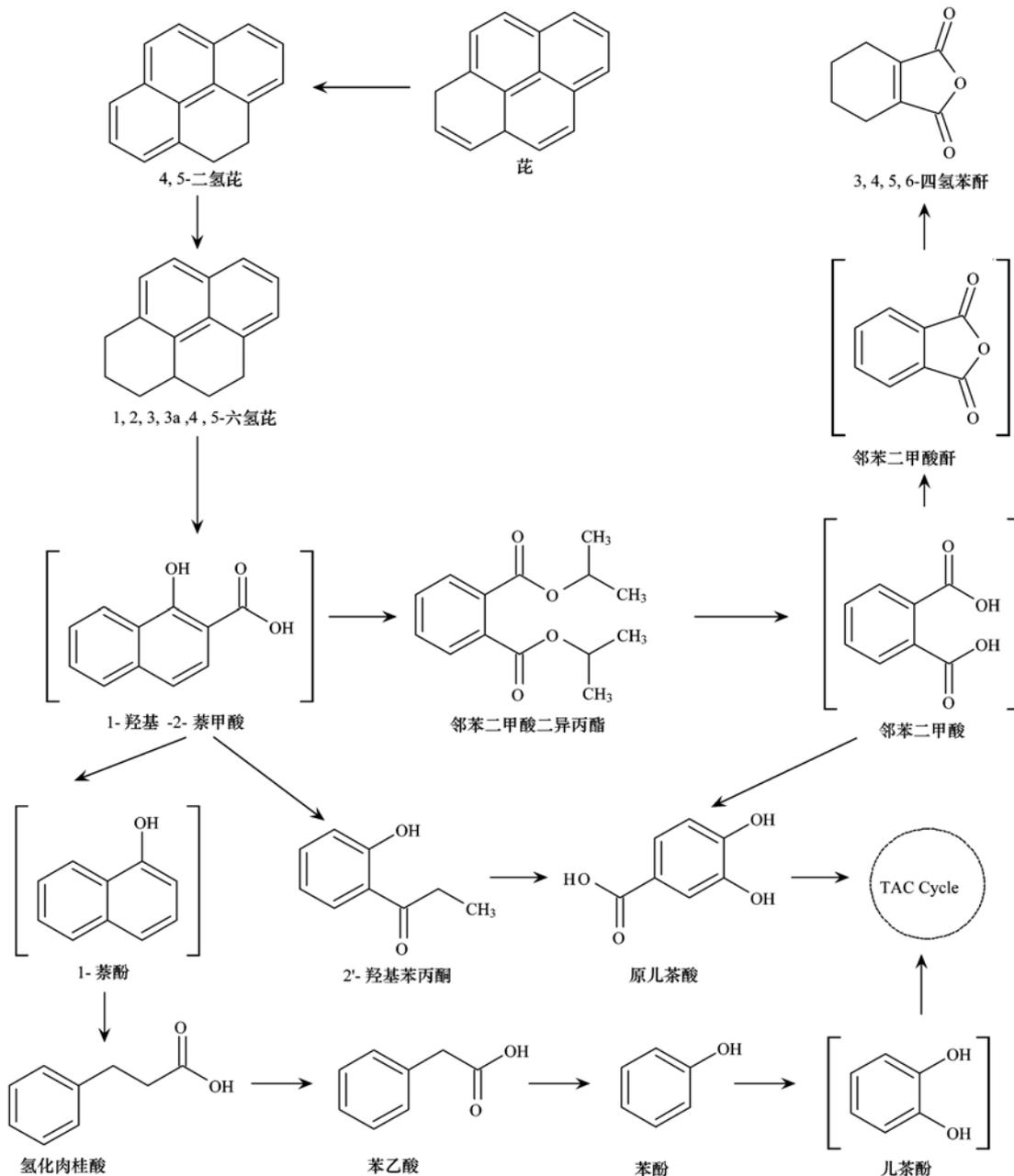
图5 *Pseudomonas* sp. LX2 对芘降解第 4、7、11d 时中间产物的 GC-MS 分析

Fig. 5 GC-MS chromatogram of pyrene (4th, 7th, and 11th day) isolates degraded by *Pseudomonas* sp. LX2

原儿茶酸为硅烷化后的产物. 接种 *Pseudomonas* sp. LX2 的反应体系在第 11 d 的培养物中也发现了原儿茶酸硅烷化后的产物, 另外还发现了邻苯二甲酸二异丙酯(C₁₄H₁₈O₄, CAS:605-45-8), 色谱停留时间为 11.974 min.

根据以上中间产物的分析, 推导出 *Pseudomonas* sp. LX2 好氧降解芘的途径如图 6 所示. 从中可以看出, 氢化还原可能是芘降解的初始活化反应, 芘先通过加入两个氢原子还原成 4,5-二氢芘, 再进一步还原生成 1,2,3,3a,4,5-六氢芘, 然

后饱和碳原子上的碳—碳键切割并氧化最终生成 1-羟基-2-萘甲酸. 众所周知, 1-羟基-2-萘甲酸被认为是多环芳烃生物降解的关键中间产物^[28]. 氢化还原之后碳—碳键切割是根据假单胞菌降解通过加入氢原子还原苯并芘代谢生成芘进一步生成菲推测而来^[39], 随后被氧化最终产生的 1-羟基-2-萘甲酸是通过多环芳烃相邻的碳键上发生了羟基化双氧合, 形成氧化产物, 导致苯环裂解. 虽然在本研究中没有检测到 1-羟基-2-萘甲酸, 但是在许多推定芳烃双加氧酶基因的研究可以支持这一推



括号中的化合物是假设的中间体, 但没有检测到

图 6 *Pseudomonas* sp. LX2 对芘好氧降解的途径

Fig. 6 Proposed pathways for aerobic degradation of pyrene by *Pseudomonas* sp. LX2

测^[24,26,40]. 已知 1-羟基-2-萘甲酸通常可以通过被称为“邻苯二甲酸”或“萘”途径的两种不同途径进行降解^[41]. *Pseudomonas* sp. LX2 对芘的降解至少有两个不同的途径. 在“邻苯二甲酸”途径中, 1-羟基-2-萘甲酸在脱氢酶、双加氧酶、脱氢异构酶等一系列酶的作用下苯环裂解^[42], 生成邻苯二甲酸二异丙酯和 2'-羟基苯丙酮, 邻苯二甲酸二异丙酯进一步生成邻苯二甲酸. 邻苯二甲酸酐是邻苯二甲酸通过分子内脱水反应的产物, 邻苯二甲酸酐进一步转化生成 3,4,5,6-四氢苯酐. 通过 3,4,5,6-四氢苯酐的存在证明在 *Pseudomonas* sp. LX2 对芘的降解过程中产生了邻苯二甲酸^[26]. 邻苯二甲酸和 2'-羟基苯丙酮还可以通过“邻苯二甲酸”途径进一步转化为原儿茶酸^[27], Qin 等^[43] 在研究苯并[a]芘降解过程中发现, 中间产物菲被氧化成 2-甲基-1-萘乙酸, 由此推导出 2'-羟基苯丙酮的生成. 第二条代谢途径是被称为“萘”的代谢途径, 在培养物中检测到的化合物氢化肉桂酸, 判断其是 1-羟基-2-萘甲酸的进一步降解的产物, 从物质的结构来看, 推测氢化肉桂酸是通过 1-羟基-2-萘甲酸降解获得的 1-萘酚转化而来, 通过 1-萘酚代谢 1-羟基-2-萘甲酸的替代途径在以前的研究中也发现^[24,28,44]. 氢化肉桂酸依次氧化降解为苯乙酸和苯酚, 苯酚也有可能被氧化为儿茶酚^[45] 和原儿茶酸一起经过苯环裂解进入 TCA 循环, 最终被完全降解^[28]. 本研究中 3,4,5,6-四氢苯酐和 1-萘酚中间产物的存在表明 1-羟基-2-萘甲酸是通过“邻苯二甲酸”和“萘”两条途径进行代谢. 邻苯二甲酸可以通过“邻苯二甲酸”途径进一步转化为原儿茶酸^[39], 水杨酸可以进一步转化为龙胆酸或儿茶酚^[24,46]. 虽然在“萘”途径中, 两种产物都可以降解形成 TCA 循环中间体^[28], 但“邻苯二甲酸”途径比“龙胆酸”途径更常见^[47]. *Pseudomonas* sp. LX2 在“邻苯二甲酸”途径中显示出降解为原儿茶酸的能力, 在“萘”途径中推测降解为儿茶酚.

3 结论

自南京某石化污水厂二沉池活性污泥中筛选得到 1 株能以芘为唯一碳源生长的菌株 LX2. 通过形态鉴定、Biolog 及 16S rDNA 鉴定表明, 菌株属于铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. LX2). *Pseudomonas* sp. LX2 可以有效利用 8 种碳源, 对 14 种化学物质敏感, pH 值在 5.0 和 6.0 时生长良好, 该菌株在 LB 培养基中生长曲线可以利用 SGompertz 模型得

到很好的描述, 菌株生长迅速, 生长停滞期只有 0.6 h, 在 7.7 h 达到最大生长速率. 芘的降解率研究表明, 在以芘为唯一碳源 (1% 的接菌量, 初始芘浓度为 50 mg·L⁻¹) 的无机盐培养基中培养 21 d 后, 芘的降解率高达 32.1%. 对 *Pseudomonas* sp. LX2 在无机盐培养基中降解芘的代谢产物进行 GC-MS 分析, 检测到一系列的代谢产物, 包括 4,5-二氢芘、1,2,3,3a,4,5-六氢芘、氢化肉桂酸、2'-羟基苯丙酮、苯乙酸、苯酚、3,4,5,6-四氢苯酐、原儿茶酚和邻苯二甲酸二异丙酯, 并发现这些物质在降解产物中有一定积累, 从而推测出该菌株可能通过氢化还原开始对芘的初始活化反应, 并通过“邻苯二甲酸”和“萘”两条途径代谢降解芘.

参考文献:

- [1] Vela N, Martínez-Menchón M, Navarro G, et al. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from groundwater by heterogeneous photocatalysis under natural sunlight [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012, **232**: 32-40.
- [2] Wu B, Zhang Y, Zhang X X, et al. Health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the source water and drinking water of China: quantitative analysis based on published monitoring data [J]. *Science of the Total Environment*, 2011, **410-411**: 112-118.
- [3] 郑博文. 持久性污染物多环芳烃的研究进展 [J]. *工业卫生与职业病*, 2016, **42**(5): 386-390.
- [4] Haritash A K, Kaushik C P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, **169**(1-3): 1-15.
- [5] Zhao Z Y, Wong J W C. Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene [J]. *Environmental Technology*, 2009, **30**(3): 291-299.
- [6] Li C H, Wong Y S, Wang H Y, et al. Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO₃ [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2015, **30**: 148-156.
- [7] Yuan S Y, Chang B V. Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2007, **42**(1): 63-69.
- [8] Chang B V, Chang I T, Yuan S Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, **80**(2): 145-149.
- [9] Zhang W, Wang H, Zhang R, et al. Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China [J]. *Ecotoxicology*, 2010, **19**(1): 96-104.
- [10] Xu X Y, Chen X, Su P, et al. Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria strains enriched from Yangtze River sediments [J]. *Environmental Technology*, 2016, **37**(5): 513-520.
- [11] Li C H, Ye C, Hou X P, et al. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria with tolerance

- to hypoxic environments[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2017, **52**(7): 581-589.
- [12] Zafra G, Absalón ú E, Cuevas M D C, *et al.* Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2014, **225**(2): 1826.
- [13] Wang B J, Lai Q L, Cui Z S, *et al.* A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the west pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(8): 1948-1963.
- [14] Cheung P Y, Kinkle B K. *Mycobacterium* diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(5): 2222-2229.
- [15] Ma J, Xu L, Jia L Y. Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2013, **140**: 15-21.
- [16] Song X H, Xu Y, Li G M, *et al.* Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, **62**(10): 2122-2128.
- [17] Zhong Y, Luan T G, Lin L, *et al.* Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. [J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(3): 2965-2972.
- [18] 张宏波, 林爱军, 刘爽, 等. 芘高效降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. *环境科学*, 2010, **31**(1): 243-248.
- Zhang H B, Lin A J, Liu S, *et al.* Identification of pyrene degrading strains and the degrading characteristics research[J]. *Environment Science*, 2010, **31**(1): 243-248.
- [19] 王蕾, 聂麦茜, 王志盈, 等. 一株芽胞杆菌和一枚黄杆菌代谢芘的摄取方式解析[J]. *环境科学学报*, 2009, **29**(5): 924-929.
- Wang L, Nie M Q, Wang Z Y, *et al.* Mode of metabolic pyrene up take by a *Bacillus* sp. and a *Flavobacterium* sp. [J]. *Acta Science Circumstantiae*, 2009, **29**(5): 924-929.
- [20] 胡凤钗, 李新宇, 苏振成, 等. 三株降解芘的戈登氏菌鉴定及其降解能力[J]. *应用生态学报*, 2011, **22**(7): 1857-1862.
- Hu F C, Li X Y, Su Z C, *et al.* Identification and degradation capability of three pyrene-degrading *Gordonia* sp. strains [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, **22**(7): 1857-1862.
- [21] 许丽, 高振, 罗霖, 等. 一株高效降解芘的细菌分离、鉴定及其降解效果[J]. *微生物学报*, 2011, **51**(3): 313-319.
- Xu L, Gao Z, Luo M, *et al.* Isolation and identification of a pyrene-degrading bacterial strain from contaminated soil [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, **51**(3): 313-319.
- [22] Hu Y T, Zhou P J, Zhou Y G, *et al.* *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi Lake, Xinjiang, China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, **54**(6): 2091-2094.
- [23] 谭文捷, 李宗良, 丁爱中, 等. 土壤和地下水中多环芳烃生物降解研究进展[J]. *生态环境*, 2007, **16**(4): 1310-1317.
- Tan W J, Li Z L, Ding A Z, *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and groundwater: a review [J]. *Ecology and Environment*, 2007, **16**(4): 1310-1317.
- [24] Li F, Zhu L Z, Zhang D. Effect of surfactant on phenanthrene metabolic kinetics by *Citrobacter* sp. SA01 [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, **26**(11): 2298-2306.
- [25] Mnif S, Chebbi A, Mhiri N, *et al.* Biodegradation of phenanthrene by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2017, **107**: 44-53.
- [26] Huang X, Shi J, Cui C, *et al.* Biodegradation of phenanthrene by *Rhizobium petrolearium* SL-1 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, **121**(6): 1616-1626.
- [27] Gao S M, Seo J S, Wang J, *et al.* Multiple degradation pathways of phenanthrene by *Stenotrophomonas maltophilia* C6 [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, **79**: 98-104.
- [28] Feng T C, Cui C Z, Dong F, *et al.* Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, **113**(4): 779-789.
- [29] Meena S S, Sharma R S, Gupta P, *et al.* Isolation and identification of *Bacillus megaterium* YB3 from an effluent contaminated site efficiently degrades pyrene [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, **56**(4): 369-378.
- [30] 姚俊, 喻婵, 靳竞男. 一株枯草芽孢杆菌对芘的降解特性及代谢途径的研究[J]. *化学与生物工程*, 2014, **31**(5): 10-12, 27.
- [31] 汪汉成, 李文红, 黄艳飞, 等. Biolog GEN III 微孔板在烟草青枯病、黑胫病生防细菌鉴定中的应用[J]. *中国烟草学报*, 2012, **18**(5): 51-55.
- Wang H C, Li W C, Huang Y F, *et al.* The application of Biolog GEN III Microplate in identifying antagonistic bacteria against tobacco bacterial wilt and tobacco black shank [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2012, **18**(5): 51-55.
- [32] 杨建云, 纪春艳, 凌冰, 等. 黄曲条跳甲幼虫致病菌的鉴定及其对黄曲条跳甲的杀虫活性研究[J]. *中国生物防治学报*, 2014, **30**(3): 434-440.
- Yang J Y, Ji C Y, Ling B, *et al.* Isolation and identification of bacteria from *Phyllotreta striolata* (fabricius) and determination of its insecticidal bioactivity [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, **30**(3): 434-440.
- [33] 徐建红, 李日强, 李红娇, 等. 萘降解菌的分离鉴定以及脱氢酶活性的测定[J]. *山西大学学报(自然科学版)*, 2013, **36**(3): 471-474.
- Xu J H, Li R Q, Li H J, *et al.* Isolation and identification of naphthalene-degrading strains and determination of dehydrogenase activity [J]. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2013, **36**(3): 471-474.
- [34] Roach J C M, Levett P N, Lavoie M C. Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **67**(1): 20-26.
- [35] 宇盛好, 曹慧, 徐斐, 等. 烤鸭中金黄色葡萄球菌生长模型的建立[J]. *食品科学*, 2015, **36**(13): 154-159.
- Yu S H, Cao H, Xu F, *et al.* Predictive models for the growth of staphylococcus aureus in roast duck [J]. *Food Science*, 2015, **36**(13): 154-159.
- [36] Park H S, Sung B Y, Ryu K. Predictive model for growth of *Staphylococcus aureus* in blanched spinach with seasoning [J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2012, **55**(4): 529-533.
- [37] Van Assche A, Álvarez-Pérez S, De Breij A, *et al.* Phylogenetic signal in phenotypic traits related to carbon source assimilation

- and chemical sensitivity in *Acinetobacter* species [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, **101**(1): 367-379.
- [38] Safronova V I, Kuznetsova I G, Sazanova A L, *et al.* *Bosea vaviloviae* sp. nov., a new species of slow-growing rhizobia isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, **107**(4): 911-920.
- [39] Liang L, Song X H, Kong J, *et al.* Anaerobic biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a facultative anaerobe *Pseudomonas* sp. JP1 [J]. *Biodegradation*, 2014, **25**(6): 825-833.
- [40] Cui C Z, Ma L, Shi J, *et al.* Metabolic pathway for degradation of anthracene by halophilic *Marteella* sp. AD-3 [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, **89**: 67-73.
- [41] Deveryshetty J, Phale P S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PPD: purification and characterization of 1-hydroxy-2-naphthoic acid dioxygenase [J]. *Microbiology*, 2009, **155**(9): 3083-3091.
- [42] 姜岩, 杨颖, 张贤明. 典型多环芳烃生物降解及转化机制的研究进展 [J]. *石油学报(石油加工)*, 2014, **30**(6): 1137-1150.
- Jiang Y, Yang Y, Zhang X M. Review on the biodegradation and conversion mechanisms of typical polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2014, **30**(6): 1137-1150.
- [43] Qin W, Zhu Y, Fan F Q, *et al.* Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, **121**: 131-138.
- [44] Prabhu Y, Phale P S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **61**(4): 342-351.
- [45] Mallick S, Chakraborty J, Dutta T K. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011, **37**(1): 64-90.
- [46] Woo S H, Park J M. Microbial degradation and enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2004, **10**(1): 16-23.
- [47] Ishiyama D, Vujaklija D, Davies J. Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(3): 1297-1306.



CONTENTS

Air Pollutant Emission Inventory from Iron and Steel Industry in the Beijing-Tianjin-Hebei Region and Its Impact on PM _{2.5}	DUAN Wen-jiao, LANG Jian-lei, CHENG Shui-yuan, <i>et al.</i> (1445)
Simulation of the Spatio-temporally Resolved PM _{2.5} Aerosol Mass Concentration over the Inland Plain of the Beijing-Tianjin-Hebei Region	HAO Jing, SUN Cheng, GUO Xing-yu, <i>et al.</i> (1455)
Effect of Relative Humidity on Particulate Matter Concentration and Visibility During Winter in Chengdu	LIU Fan, TAN Qin-wen, JIANG Xia, <i>et al.</i> (1466)
Vertical Distributional Characteristics of Inorganic Ions of PM _{2.5} at Mt. Huashan, Inland China	CAO Cong, WANG Ge-hui, WU Can, <i>et al.</i> (1473)
Analysis of the Composition of Atmospheric Fine Particles (PM _{2.5}) Produced by Burning Fireworks	XIE Rui-jia, HOU Hong-xia, CHEN Yong-shan (1484)
Chemical Composition Characteristics of PM _{2.5} Emitted by Medium and Small Capacity Coal-fired Boilers in the Yangtze River Delta Region	XU Jian, HUANG Cheng, LI Li, <i>et al.</i> (1493)
Emission Factors of Heavy Metals in Size-resolved Particles Emitted from Residential Coal Combustion	YAN Qin, KONG Shao-fei, LIU Hai-biao, <i>et al.</i> (1502)
Distribution of Oxalate in Atmospheric Aerosols and the Related Influencing Factors in Qingdao, During Winter and Spring	ZHANG Shuai, SHI Jin-hui, YAO Xiao-hong, <i>et al.</i> (1512)
Concentrations and Solubility of Trace Elements in Atmospheric Precipitation in Qingdao	LI Qian, SHI Jin-hui, LI Peng-zhi, <i>et al.</i> (1520)
Occurrence and Gas-particle Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Air of Liaodong Bay	ZHANG Yu-feng, SONG Yong-gang, TIAN Jin, <i>et al.</i> (1527)
Analysis of Sources, Pollution Characteristics, and Human Exposure to Atmospheric New Halogenated Flame Retardants in Selected Areas	LI Qi-lu, YANG Kong, LI Jun, <i>et al.</i> (1537)
Contamination Characterization and Human Exposure Levels to Polybrominated Diphenyl Ethers in Indoor and Outdoor Air in Industrial Park of Suzhou City	WANG Jun-xia, GU Hai-dong, ZHANG Zhan-en, <i>et al.</i> (1544)
Effect of Air Pollution on the Cold Disease in Shanghai	YANG Si-xu, MA Yu-xia, ZHOU Jian-ding, <i>et al.</i> (1552)
Fluorescent Dissolved Organic Matter and Its Correlation with Water Quality in a Urban River; A Case Study of the Lujiang River in Beilun, Ningbo	CAO Chang-li, LIANG Meng-qi, HE Gui-ying, <i>et al.</i> (1560)
Relationship Between Landscape Pattern and Water Quality in the Ebinur Lake Region	CAO Can, ZHANG Fei, Ayinigeer·Yalikun, <i>et al.</i> (1568)
CH ₄ Fluxes During the Algal Bloom in the Pengxi River	QIN Yu, ZHANG Yu-yang, LI Zhe, <i>et al.</i> (1578)
Dynamic Variations and Sources of Nitrate During Dry Season in the Lijiang River	MIAO Ying, ZHANG Cheng, XIAO Qiong, <i>et al.</i> (1589)
Heavy Metal Pollution of the Drinking Water Sources in the Lijiang River Basin, and Related Health Risk Assessments	ZHANG Qing-hua, WEI Yong-zhu, CAO Jian-hua, <i>et al.</i> (1598)
Characteristics of Phosphorus Fractions and Phosphate Diffusion Fluxes of Sediments in Cascade Reservoirs of the Huangbai River	LIU Jia, LEI Dan, LI Qiong, <i>et al.</i> (1608)
Occurrence and Ecological Risk Assessment of Typical Persistent Organic Pollutants in Baiyangdian Lake	GAO Qiu-sheng, JIAO Li-xin, YANG Liu, <i>et al.</i> (1616)
Simulating the Fate of Typical Organochlorine Pesticides in the Multimedia Environment of the Pearl River Delta	GAO Zi-wen, XU Yue, YI Ru-han (1628)
Mechanisms and Efficiencies of Removal of PPCPs by Pilot River Water Bypass Treatment Process	LI Li, ZHU Bing, BAI Yao, <i>et al.</i> (1637)
Chlorination of Naproxen; Removal, Transformation and Risk Assessment	FAN Xin-xin, DU Er-deng, LI Jia-qi, <i>et al.</i> (1645)
Removing Typical Odorants in Drinking Water by Vacuum Ultraviolet Combined with Chlorine	SUN Xin, ZHANG Yi, SHI Lu-xiao, <i>et al.</i> (1654)
Degradation of Triclosan by Heat Activated Persulfate Oxidation	JIANG Meng-di, ZHANG Qing-yue, JI Yue-fei, <i>et al.</i> (1661)
Adsorption of Tetracycline on Simulated Suspended Particles in Water	XU Long-feng, WEI Qun-shan, LÜ Qiang, <i>et al.</i> (1668)
Characteristics and Performance of Embedded ANAMMOX Bacteria in Treating Saline Wastewater	SHAN Xiao-jing, YU De-shuang, LI Jin, <i>et al.</i> (1677)
Enhanced Nitrogen Removal of ANAMMOX Treating Saline Wastewater With Betaine Addition	YU De-shuang, WU Guo-dong, LI Jin, <i>et al.</i> (1688)
Pilot-scale Experiment on Enrichment of Nitrifying Activated Sludge and Its Application in Enhancing a Wastewater Biological Treatment System Against Ammonia Shocking Loads	SHENG Xiao-lin, CUI Can-can, WANG Jia-de, <i>et al.</i> (1697)
Effect of Step Feed on Denitrifying Phosphorus and Nitrate Removal in a Modification of the Two Sludge A ² /O-BAF System	NAN Yan-bin, PENG Yong-zhen, ZENG Li-yun, <i>et al.</i> (1704)
Achieving Partial Nitrification in a Continuous-flow Aerobic Granular Sludge Reactor at Different Temperatures Through Ratio Control	LIANG Dong-bo, BIAN Wei, KAN Rui-zhe, <i>et al.</i> (1713)
Mechanism of Action of Activated Sludge Properties in Nitrogen Removal by Endogenous Denitrification Through an Intelligent Aeration-controlled A/O Process	XU Min-yang, HU Zhan-bo, ZHANG Sui-sheng, <i>et al.</i> (1720)
Effect of Temperature on the Performance and Microbial Community Structure in an Integrated Anaerobic Fluidized-bed Membrane Bioreactor Treating Benzothiazole Wastewater	LI Yue, HU Qi, GAO Da-wen (1731)
Removal of Antibiotics During In-situ Sludge Ozone-reduction Process	WANG Lu, BEN Wei-wei, LI Yan-gang, <i>et al.</i> (1739)
Effect of Zero Valent Iron on the Horizontal Gene Transfer of Tetracycline Resistance Genes During Anaerobic Sludge Digestion Process	YANG Fan, XU Wen-li, QIAN Ya-jie, <i>et al.</i> (1748)
Effects of Environmental Factors on the Synergy of Functional Bacteria in Completely Autotrophic Granular Sludge	CHEN Xi, QIAN Fei-yue, WANG Jian-fang, <i>et al.</i> (1756)
Microbiological Characteristics of a Post Solid-Phase Denitrification Biofilter Process	ZHANG Qian, JI Fang-ying, XU Xuan (1763)
Aerobic Denitrification and Microbial Community Shift in SBR Bioaugmented with Strains YH01 and YH02	CHEN Hai-sheng, CAO Gang, ZHANG Di, <i>et al.</i> (1773)
Performance, Sludge Characteristics, and the Microbial Community Dynamics of Bulking Sludge Under Different Nitrogen and Phosphorus Imbalances	HE Xue-meng, DING Li-li, ZHANG Lu-lu, <i>et al.</i> (1782)
Degradation Characteristics and Metabolic Pathway of a Pyrene-Degrading <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Strain	LI Xiang, ZHANG Xue-ying, ZHOU Jun, <i>et al.</i> (1794)
Driving Factors of the Dynamics of Microbial Community in a Dam of Copper Mine Tailings	LI Cui, JING Ju-hui, LIU Jin-xian, <i>et al.</i> (1804)
Effects of Reclamation on Soil Nutrients and Microbial Activities in the Huixian Karst Wetland in Guilin	HUANG Ke-chao, SHEN Yu-yi, XU Guang-ping, <i>et al.</i> (1813)
Effects of the Farmland-to-Forest/Grassland Conversion Program on the Soil Bacterial Community in the Loess Hilly Region	CHEN Meng-li, ZENG Quan-chao, HUANG Yi-mei, <i>et al.</i> (1824)
Insight into the Mechanism of Feamox in the Surface Soils of a Riparian Zone	DING Bang-jing, LI Zheng-kui, ZHU Hong-jie, <i>et al.</i> (1833)
Soil Degradation-Associated Microbial Community Structure Changes in an Alpine Meadow Under Tibetan Pig Herding	ZHAN Peng-fei, XIAO De-rong, YAN Peng-fei, <i>et al.</i> (1840)
Characteristics of Iron Plaque and Its Heavy Metal Enrichment in Typical Mangrove Plants in Shenzhen Bay, China	SHEN Xiao-xue, LI Rui-li, CHAI Min-wei, <i>et al.</i> (1851)
Spatial Distribution of DDTs and PCBs in Wild Fish from Hong Kong Coastal Areas and Potential Human Health Risk Assessment	SU Yang, BAO Lian-jun, ZENG Eddy Y (1861)
Pollution Characteristics of PAHs in Soil from a Remote Mountain Wetland-Dajuhu Lake, Shengongjia	HU Tian-peng, XING Xin-li, KE Yan-ping, <i>et al.</i> (1872)
Migration and Transformation of Mercury in Unsubmerged Soil and Sediment at One Typical Forest Reservoir in Southwest China	SUN Tao, MA Ming, WANG Yong-min, <i>et al.</i> (1880)
Accumulation of Cd and Its Risks in the Soils of the Xijiang River Drainage Basin in Guangxi	SONG Bo, YANG Zi-jie, ZHANG Yun-xia, <i>et al.</i> (1888)
Effects of Long-term Fertilization Regimes on As Accumulation in Upland Red Earth and the Crops Growing on It	ZHANG Rong, YU Guang-hui, LI Ya-qing (1901)
Effects of a Tribasic Amendment on Cadmium and Arsenic Accumulation and Translocation in Rice in a Field Experiment	GU Jiao-feng, ZHOU Hang, JIA Run-yu, <i>et al.</i> (1910)
Quantitative Relationship Between Paddy Soil Properties and Cadmium Content in Rice Grains	WANG Meng-meng, HE Meng-yuan, SU De-chun (1918)
Effect of Ca-bentonite on Cu and Zn Forms in Compost and Soil, and Their Absorption by Chinese Cabbage	ZHAO Jun-chao, WANG Quan, REN Xiu-na, <i>et al.</i> (1926)
Effects of Short-term Exogenous Nitrogen and Carbon Input on Soil Respiration Under Changing Precipitation Pattern	HE Yun-long, QI Yu-chun, PENG Qin, <i>et al.</i> (1934)
Effects of Simulated Precipitation Reduction on Soil Respiration in a Soybean-Winter Wheat Rotation Cropland	WANG Zhao-hui, CHEN Shu-tao, SUN Lu, <i>et al.</i> (1943)
Seasonal Variation in Nitric Oxide Emission from an Agricultural Headwater Ditch in the Hilly Purple Soil Area and the Factors Influencing Emission	TIAN Lin-lin, REN Guang-qian, ZHU Bo (1952)
Effects of Seasonal Asymmetric Warming on Soil CO ₂ Release in Karst Region	TANG Guo-yong, ZHANG Chun-hua, LIU Fang-yan, <i>et al.</i> (1962)