

短短芽胞杆菌及其芽胞对芘的降解

刘芷辰¹, 叶锦韶¹, 彭辉^{2*}, 刘则华³, 邓庭进¹, 尹华^{3*}, 廖丽萍¹

(1. 暨南大学环境学院, 广东省高校水土环境毒害性污染物防治与生物修复重点实验室, 广州 510632; 2. 暨南大学化学系, 广州 510632; 3. 华南理工大学环境与能源学院, 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006)

摘要: 考察短短芽胞杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 菌体及芽胞对四环多环芳烃芘的降解性能。结果表明, 菌体 5 d 内对 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率可达 53%。菌体和胞内酶降解芘过程中检测到 1-羟基芘、9-羟基芘、 α -萘酚和 β -萘酚这 4 种单羟基降解产物, 在完整菌体降解体系中, 产物呈现先积累后下降的趋势, 而在胞内粗酶液降解体系中, 大分子代谢产物表现为一直积累的趋势, 说明 *B. brevis* 完整菌体在降解初期并不具备一些中间产物的降解酶, 但随着时间推移, 可被诱导产生相关酶对生成的新产物进行进一步降解。芽胞悬液在添加芘的无机盐培养基中 5 d 内萌发生成的营养细胞可达到 1.5×10^9 个 $\cdot \text{L}^{-1}$, 对 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率达到 15%。

关键词: 芘; 短短芽胞杆菌; 胞内酶; 芽胞; 降解产物

中图分类号: X513 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)05-1763-06 DOI: 10.13227/j.hjxx.2015.05.035

Biodegradation of Pyrene by Intact Cells and Spores of *Brevibacillus brevis*

LIU Zhi-chen¹, YE Jin-shao¹, PENG Hui^{2*}, LIU Ze-hua³, DENG Ting-jin¹, YIN Hua^{3*}, LIAO Li-ping¹

(1. Key Laboratory of Water/Soil Toxic Pollutants Control and Bioremediation of Guangdong Higher Education Institutes, School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Biodegradation characteristics of pyrene by intact cells and spores of *Brevibacillus brevis* were investigated. The results revealed that the degradation efficiency of $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pyrene by *B. brevis* intact cells reached 53% within 5 d. Four hydroxy metabolites were detected by LC-MS/MS during the degradation of pyrene by intact cells and intracellular enzymes, including 1-hydroxy-pyrene, 9-phenanthrol, α -naphthol and β -naphthol. The amount of products first increased and then declined in the degradation system with intact cells, while the macromolecular metabolites showed a continuous accumulation tendency in the degradation system with intracellular enzymes, proving that some degrading enzymes of *B. brevis* could be induced by the products generated during the degradation, and then the enzymes induced could further degrade these degradation products. The amount of cells germinated from spores in MSM containing pyrene was 1.5×10^9 cells $\cdot \text{L}^{-1}$, and the degradation rate of pyrene ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) within 5 d reached 15%.

Key words: pyrene; *Brevibacillus brevis*; intracellular enzymes; spore; degradation products

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是在环境中普遍存在的持久性有机污染物, 具有高生物毒性, 易在生物体内蓄积, 对生物具有致癌、致畸、致突变的作用, 因此给生物圈带来巨大的危害^[1]。芘作为四环多环芳烃, 具有稳定的分子结构和难降解性, 是指示多环芳烃污染的代表物^[2]。

微生物降解因为具有环境友好和高效等特点, 是去除 PAHs 等毒害性有机污染物的一个重要手段^[3]。在 20 世纪中叶, 有学者就证明了许多种类的细菌、真菌和藻类对 PAHs 都具有降解作用^[4, 5]。近年来分离得到的 PAHs 降解菌包括分支杆菌 (*Mycobacterium* sp.)、动胶杆菌 (*Zoogloea* sp.)、黄杆菌 (*Flavobacterium* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、芽胞杆菌 (*Bacillus* sp.) 等^[6~8], 故利用细菌治理 PAHs 污染是切实可行的^[9]。其中, 芽胞杆菌

具有产芽胞的特性, 在环境修复中具有独特的作用。芽胞能在条件恶劣的情况下休眠^[10], 一旦外界条件合适又会萌发为具有降解功能的营养菌体, 从而使污染物的降解过程得到延续^[11]。

本研究将提取出的 *B. brevis* 的芽胞用于污染物的降解, 考察其在芘降解过程中的贡献, 以期深化研究 *B. brevis* 的芘降解机制奠定科学基础。此外, 从微观的角度看, 微生物降解有机污染物的实质是其分泌的降解酶对污染物的催化作用^[12, 13], 因此探

收稿日期: 2015-01-16; 修订日期: 2015-02-06
基金项目: 国家自然科学基金委-广东省联合基金重点项目 (U0933002); 广东省自然科学基金重点项目 (S2013020012808); 中央高校基本科研业务费专项 (2013ZM0126)

作者简介: 刘芷辰 (1990~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制与修复, E-mail: alkids@126.com

* 通讯联系人, E-mail: huayin@scut.edu.cn; tbpenghui@163.com

讨完整菌体与胞内酶降解产物随时间的变化,对于探明菌体的降解酶体系在降解过程中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种

短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*),革兰氏阳性,由本课题组从广州市贵屿电子垃圾拆卸地底泥中筛选得到,对多环芳烃有良好的降解效果^[14]。

1.1.2 化学试剂与培养基

苊、1-羟基苊、9-羟基菲、 α -萘酚、 β -萘酚、甲醇(色谱纯)购买于 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA);二乙酸荧光素(FDA)购买于 Sigma-Aldrich (Sydney, NSW, Australia),绝对计数管(TruCOUNT Tubes)购买于 Becton - Dickinson (San Jose, CA, USA);乙酸乙酯(分析纯)购买于天津市富宇精细化工有限公司,其余试剂购买于广州化学试剂厂。

磷酸盐缓冲液(PBS, $g \cdot L^{-1}$): NaCl 8, KCl 0.2, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.44, KH_2PO_4 0.24, 调节 pH 为 7.4。

牛肉膏营养培养基($g \cdot L^{-1}$): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, pH 为 7.4 ~ 7.6。

无机盐基础培养基(MSM, $g \cdot L^{-1}$): K_2HPO_4 0.05, KH_2PO_4 0.3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 柠檬酸钠 0.05。

1.2 实验方法

1.2.1 苊降解实验

将 *B. brevis* 从斜面接种到牛肉膏营养培养基中,在 $30^\circ C$ 、 $130 r \cdot min^{-1}$ 摇床中振荡培养 24 h 后取样,于 $6000 r \cdot min^{-1}$ 下离心 10 min 得到营养菌体,洗涤后配制成一定浓度的菌悬液。

在灭菌无机盐培养基(MSM)中加入苊储备液与菌悬液,配成 20 mL 降解体系,体系中菌体浓度为 $1.0 g \cdot L^{-1}$,以不加菌体的 MSM 体系作为空白对照。在 $30^\circ C$ 、 $130 r \cdot min^{-1}$ 摇床中振荡培养,分别于第 0、1、2、3、4 和 5 d 取样测定体系中苊的残余量。

1.2.2 胞内酶降解实验

将 *B. brevis* 从斜面接种到牛肉膏营养培养基中,在 $30^\circ C$ 、 $130 r \cdot min^{-1}$ 摇床中振荡培养 24 h 后取样,于 $6000 r \cdot min^{-1}$ 下离心 10 min 收集菌体。用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次后,加入一定量的 PBS 重悬,置于 $0^\circ C$ 的冰-水混合水浴中,用超声波细胞粉

碎机(450 W)破碎处理 30 min,每次 6 s,间隔 9 s, $4^\circ C$ 下 $8000 r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,得胞内粗酶液。

在灭菌无机盐培养基(MSM)中加入苊储备液与粗酶液,配成 20 mL 降解体系,体系中酶液浓度对应 $1.0 g \cdot L^{-1}$ 菌体中的提取量,以不加酶液的 MSM 体系作为空白对照。在 $30^\circ C$ 、 $130 r \cdot min^{-1}$ 摇床中振荡培养,分别于第 0、4、8、12、20 和 24 h 取样测定体系中产物含量。

1.2.3 苊和羟基化产物的分析方法

取样后,用 HCl 调节 pH 至 2,样品转入 125 mL 分液漏斗,加入等体积的乙酸乙酯萃取,充分混合后静置分层,有机相过无水硫酸钠,水相重复以上萃取步骤,收集于梨形瓶中,用旋转蒸发器于 $35^\circ C$ 浓缩蒸干,甲醇洗脱、浓缩定容至 10 mL,待上机。

苊采用 HPLC 分析。方法与课题组前期使用方法一致^[15]。

羟基化产物采用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)测定。液相色谱条件为:色谱柱 Agilent Eclipse Plus C18 柱(2.1 mm \times 150 mm);流动相: A 为乙腈, B 为水;梯度洗脱: 0 min, 40% B; 0.5 min, 60% B; 2.5 min, 95% B; 7.5 min, 95% B; 7.6 min, 40% B; 15 min, 95% B。流动相速度为 $300 \mu L \cdot min^{-1}$ 。质谱条件见表 1。

表 1 产物的质谱条件

Table 1 Parameters of MRM for target compounds

项目	检测离子 (m/z)	解簇电压 /V	碰撞电压 /V	出口电压 /V
α -萘酚	143/115	-80	-35	-10
β -萘酚	143/115	-80	-35	-10
9-羟基菲	193/165	-100	-42	-8
1-羟基苊	217/189	-105	-47	-10

1.2.4 芽孢降解实验

将一定浓度的 *B. brevis* 菌悬液装于玻璃管中加盖,放水浴锅中, $100^\circ C$ 水浴 30 min^[16]。热处理可以杀死营养细胞,破坏细胞外壁结构,使胞内芽孢流出,冷却后形成芽孢悬液。

在灭菌无机盐培养基(MSM)中加入苊储备液与芽孢悬液,配成 20 mL 降解体系,体系中芽孢浓度为 $1.0 g \cdot L^{-1}$,以不加芽孢的 MSM 体系作为空白对照。在 $30^\circ C$ 、 $130 r \cdot min^{-1}$ 摇床中振荡培养,分别于第 0、1、2、3、4 和 5 d 取样测定体系中苊的残余量。

1.2.5 芽孢萌发量的测定

在灭菌无机盐培养基(MSM)中加入苊储备液与芽孢悬液,配成 20 mL 降解体系,使体系最终为

20 mL, 芽胞浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 以不加芘的 MSM 体系作为空白对照。

在 30°C 、 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中振荡培养, 分别于第 0、1、2、3、4 和 5 d 取样, 于 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 收集底部细胞, 洗涤后, 加入 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二乙酸荧光素 (FDA) 对样品染色, 在充分混匀后, 37°C 条件下避光孵育 15 min. 染色后的细胞经高纯水稀释 2000 倍, 取 $300 \mu\text{L}$ 加入绝对计数管中, 涡旋振荡使样品与管中的内参物荧光微球混匀后上机检测。

每管绝对计数管中含有已知数量的内参物荧光微球, 通过流式细胞仪 (FACS Aria flow cytometer) 可直接检测到进样中已被 FDA 荧光标记的细胞 (即萌发生成的营养菌) 数目和荧光微球的数目, 通过以下公式换算可以直接得出样品中由芽胞萌发出的细菌数^[17]:

$$\text{芽胞萌发数量} = \frac{B(\text{被标记细胞读数})}{C(\text{荧光微球数})} \times \frac{\text{计数管内微球总数(已知)}}{\text{进样体积}(300 \mu\text{L})} \times 2000(\text{稀释倍数})$$

2 结果与讨论

2.1 *B. brevis* 对芘的降解

B. brevis 菌体在 5 d 内对芘的降解率如图 1 所示. 在 0~2 d 内, 降解率处于较低的水平, 且增长比较缓慢. 推测细菌刚从营养丰富的牛肉膏培养基中转移到营养缺失的 MSM 中, 同时受到芘的毒害和胁迫, 导致大部分细菌失活或死亡, 从而在短时间内显示出较低的降解率。

而从第 3 d 开始, 降解率出现较快的上升, 从生长曲线也可以看出细菌数目出现上升的趋势. 在课题组前期的研究中发现, *B. brevis* 菌体在降解体系中受到毒物的胁迫作用, 发生细胞凋亡和细胞膜通透性增大的现象, 会释放大量细胞内含物质, 如 Na^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 和蛋白分子^[18, 19]. 而随着时间推移, 一部分细菌适应了外界条件, 利用了培养基中流出的内含物和细胞碎片作为营养物质, 同时逐步被驯化从而可以利用芘作为碳源, 保持活性进行新一轮的分裂增殖. 随着增殖的细胞数目增多, 对芘的利用率也不断上升, 在 5 d 时 *B. brevis* 完整菌体对 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率可达到 53% 左右。

2.2 芘代谢过程中代表性产物分析

多环芳烃的降解过程涉及到开环, 母体在双加

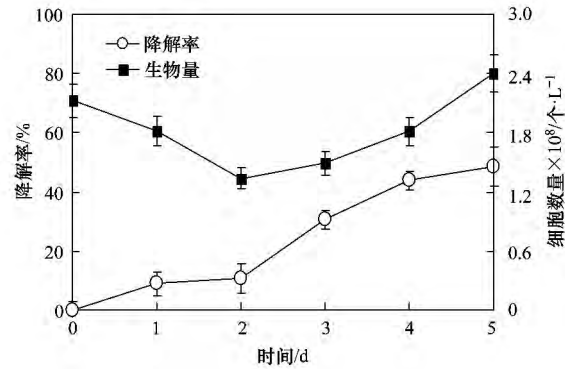


图 1 *B. brevis* 的生物量及对 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解随时间变化曲线
Fig. 1 Variation of biomass of *B. brevis* and degradation rate of $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pyrene by *B. brevis* with time

氧酶和单加氧酶的作用下, 首先生成羟基化产物, 进而双碳键断裂形成环氧化物, 实现从高环到低环的转变, 因此羟基化多环芳烃是降解过程中一个重要指示物. 但是羟基化产物具有高极性, 通常较难分离与检测^[20]. 本实验采用液相质谱联用技术 (LC-MS) 对降解过程中的羟基化产物进行定量检测, 其检测限可达到 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

实验结果表明, *B. brevis* 对芘的降解过程中生成了四环到二环的单羟基化产物 [图 2 (a)]. 其中 1-羟基芘属于四环大分子产物, 推测其为芘在单加氧酶的作用下生成, 它在降解过程的前 3 d 大量生成和积累, 达到 $23 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之后开始缓慢下降, 说明在菌体对芘的降解过程中, 1-羟基芘并不是代谢终产物, 随着时间的延长, 可以被进一步降解和转化. 这对推测 *B. brevis* 降解芘的初始途径也具备一定意义, 已有研究表明, 大多好氧细菌降解多环芳烃初始途径都是由双加氧酶催化开环^[21], 而本实验中, 芘很有可能在单加氧酶的作用下直接开环生成 1-羟基芘. 9-羟基菲的出现晚于 1-羟基芘, 推测因为反应进程的推进, 四环的产物会逐渐开环生成三环分子, 9-羟基菲代表加氧酶进一步攻击三环的分子, 继续开环反应, 它在第 2 d 至第 4 d 产生积累, 说明四环分子的开环反应在 2~4 d 进行剧烈, 生成的中间产物随之增长迅速. 而在 5 d 时转为下降趋势, 显示以 9-羟基菲为代表的三环产物也进一步被菌体所降解和转化, 逐渐被消耗. 图 2 (a) 中还可看出, 反应过程中有 α -萘酚和 β -萘酚生成并少量积累. 萘酚是菲降解过程中常见的中间产物^[22], 有研究指出, 菲在加氧酶作用下, 3, 4 位氧化生成顺式-二醇, 然后转化为二羟基化合物, 接着开环生成 1-羟基-2-萘酸, 再脱羧形成 α -萘酚等其它二环类物

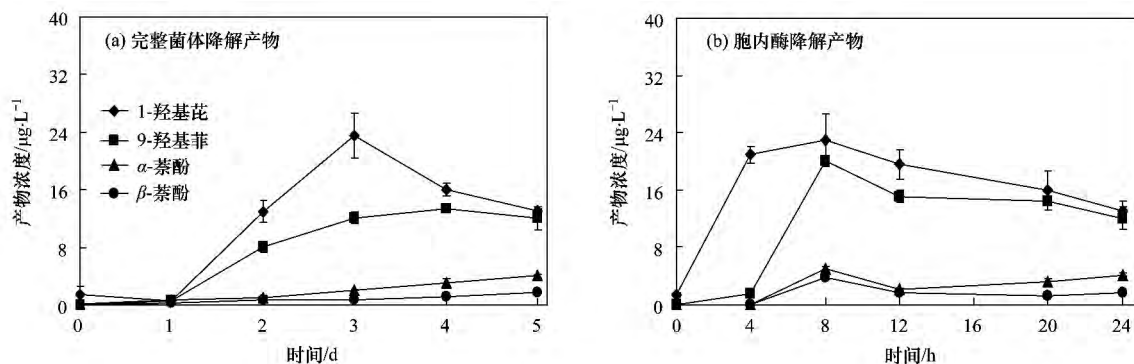


图2 单羟基产物的浓度随时间变化

Fig. 2 Changes of concentrations of mono-hydroxy products with time

质^[23]。因此,可以推测萘的降解过程经历了由四环类芳香烃化合物开环为三环菲类物质,并进入菲单加氧降解过程。

图2(b)所示为胞内酶降解萘的产物随着时间的变化。前期研究证实细菌胞内酶对萘的降解率在24 h内能达到最高值^[24],本实验中产物的生成也非常迅速,在4 h内1-羟基萘的含量快速累积至 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,随后略有下降且基本保持平稳。9-羟基菲在8 h时检测到有显著升高,在12 h时达到近 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,后保持平稳趋势直至20 h,24 h时含量略有下降。对比图2可看出,完整菌体在3 d和4 d后分别表现出对1-羟基萘和9-羟基菲的降解能力,而提取的胞内酶虽然在较短时间内对母体萘有良好的降解作用,但对于降解生成的中间大分子产物没有直接的降解作用,从而导致1-羟基萘和9-羟基菲在培养基内产生积累。此现象也反映出*B. brevis*完整菌体也许在初期并不具备一些中间产物的降解酶,但随着时间推移,可被诱导产生相关酶而对生成的新产物进行进一步降解。而小分子的 α -萘酚和 β -萘酚属于易降解物质,因此在直接与酶液反应的过程中,生成的两种萘酚在8 h时就开始出现下降趋势,说明*B. brevis*的胞内酶能直接降解萘酚类物质,将它们进一步转化为小分子产物。同时,从浓度上看 α -萘酚比 β -萘酚更易累积,且在后期略有上升现象,推测 α -萘酚在降解过程中更易由二三环的大分子生成,随着反应的进行,不断对其浓度进行补充。

2.3 芽胞对萘的降解

活性营养细胞用染料二乙酸荧光素(FDA)标记,FDA是一种非极性的酯类化合物,能够透过细胞膜进入细胞内,在活性细胞的非特异性脂酶的催化下,水解生成荧光素积累在细胞膜内,经激光激发发出荧光^[25]。芽胞壁厚且透性低,不能被FDA穿透着

色。因此FDA对萌发生成的营养菌体具有特异性标记的功能。通过流式细胞仪的前相角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)反映出细胞的大小与粒度,从而实现对细胞进行分类划区,准确找到细菌细胞所处区域^[26],消除碎片杂质的影响。同时,流式细胞仪还设有不同的荧光参数,可识别不同荧光所标记的细胞参数,并通过测量这些参数对细胞进行分类计数及统计分析。

将芽胞悬液($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)接种于含 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘MSM培养基内,以不加萘为空白对照组。考察0~5 d内由芽胞萌发成营养菌数量。如图3所示,在未添加萘的培养基内,芽胞在1 d时开始萌发为菌体,并且在随后的几天内数目迅速增长,在5 d时生成的营养细胞可达到 1.85×10^9 个 $\cdot\text{L}^{-1}$ 。获取芽胞时,热处理导致营养细胞的失活和死亡,但在悬液中存留失活细菌和细胞碎片,可作为碳源和氮源为芽胞萌发提供必要营养条件。推测在MSM体系中,芽胞主要依赖于接种悬液中的细胞碎片作为营养帮助萌发。在添加萘的体系中,芽胞的萌发略迟于对照组,在2 d时才检测到有少量的营养细胞生成,可能是萘作为外加毒物,对芽胞具有一定的胁迫作用,抑制了芽胞的萌发,但是在一定的适应期后,芽胞仍然可以萌发为菌体,并且随后大量增殖,到5 d时也达到 1.5×10^9 个 $\cdot\text{L}^{-1}$ 。此结果说明在实际的生物修复过程中,即使*B. brevis*菌体本身遭到外界不良条件的胁迫而失活,它的部分芽胞也能通过抗性机制抵御胁迫而后续萌发,图4对比了*B. brevis*菌体和芽胞对萘的降解效果,从中可知,即使在图3没有检测到萌发的0~1 d,芽胞仍然可以对萘产生降解作用,说明了芽胞本身对萘有一定降解作用。从3 d开始芽胞的降解率曲线有较明显的上升,至5 d时约达到15%左右,这表明随着时间推移,芽胞萌发的营养菌

体开始对芘产生降解作用. 此结果也进一步解释了 2.1 节中细菌的降解率在 2 d 后出现较大的上升的原因, 除了活性细胞本身的分裂增殖外, 芽胞萌发的菌体也贡献了降解率. 因此, 芽胞在 *B. brevis* 降解芘的过程中具有不可忽视的作用.

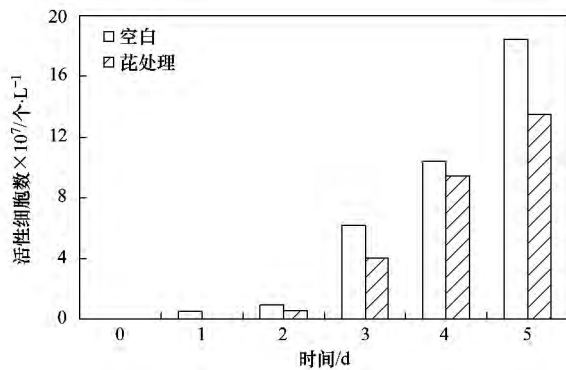


图3 降解体系中芽胞萌发的营养菌数目随时间的变化

Fig. 3 Change of vegetative cell numbers in the degradation system with time

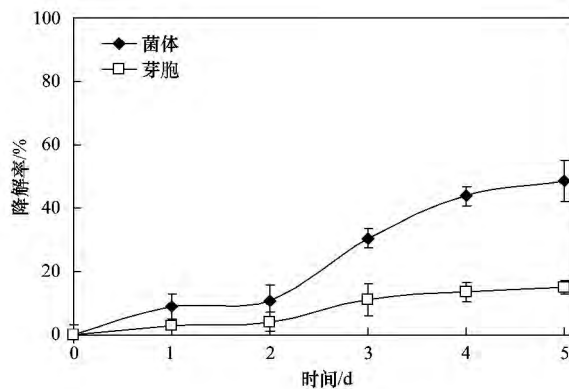


图4 *B. brevis* 芽胞对芘的降解率随时间的变化

Fig. 4 Change of degradation rate of pyrene by *B. brevis* spores with time

3 结论

(1) *B. brevis* 可较好地利用芘作为碳源和能源物质, $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌体 5 d 内对 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率可达 53%.

(2) 菌体降解芘过程中检测到 4 种单羟基降解产物, 分别为 1-羟基芘、9-羟基菲、 α -萘酚和 β -萘酚. 证实 *B. brevis* 降解芘可能直接在单加氧酶作用下开环, 且降解途径是由四环类芳香烃化合物开环为三环菲类物质, 并进入菲单加氧降解过程.

(3) 在降解体系中, 产物呈现先积累后下降的趋势, 说明 *B. brevis* 在降解初期并不具备一些中间产物的降解酶, 但随着时间推移, 可被诱导产生相关酶而对生成的新产物进行进一步降解.

(4) 在添加芘的无机盐培养基中芽胞悬液 5 d 内萌发生成的活性营养细胞可达到 1.5×10^9 个 $\cdot \text{L}^{-1}$, 对 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率达到 15%.

参考文献:

- [1] Bojes H K, Pope P G. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2007, 47(3): 288-295.
- [2] Cottin N C, Merlin G. Study of pyrene biodegradation capacity in two types of solid media [J]. Science of the Total Environment, 2007, 380(1-3): 116-123.
- [3] 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.
- [4] Ling J Y, Zhang G Y, Sun H B, et al. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A [J]. Science of the Total Environment, 2011, 409(10): 1994-2000.
- [5] Das K, Mukherjee A K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(7): 1339-1345.
- [6] Cheema S A, Khan M I, Tang X J, et al. Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 166(2-3): 1226-1231.
- [7] Lin Q, Shen K L, Zhao H M, et al. Growth response of *Zea mays* L. in pyrene - copper co-contaminated soil and the fate of pollutants [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 150(3): 515-521.
- [8] Viamajala S, Peyton B M, Richards L A, et al. Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAHs under thermophilic conditions [J]. Chemosphere, 2007, 66(6): 1094-1106.
- [9] 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.
- [10] Konecka E, Baranek J, Bielińska I, et al. Persistence of the spores of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves [J]. Science of the Total Environment, 2014, 472: 296-301.
- [11] Barreto R V G, Hissa D C, Paes F A, et al. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(7): 2121-2125.
- [12] Chang J, Zhang Y. Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger* [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(2): 195-200.
- [13] 史广宇, 尹华, 叶锦韶, 等. 铜绿假单胞菌胞内酶粗提液对十溴联苯醚的降解 [J]. 环境科学, 2013, 34(4): 1517-1523.
- [14] 蔡瀚, 尹华, 叶锦韶, 等. 1 株苯并[a]芘高效降解菌的筛选

- 与降解特性[J]. 环境科学, 2013, **34**(5): 1937-1944.
- [15] Chen S N, Yin H, Ye J S, *et al.* Effect of copper (II) on biodegradation of benzo [a] pyrene by *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. Chemosphere, 2013, **90**(6): 1811-1820.
- [16] Aouadhi C, Simonin H, Prévost H, *et al.* Optimization of pressure- induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and milk [J]. Food Microbiology, 2012, **30**(1): 1-7.
- [17] Khan M M T, Pyle B H, Camper A K. Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, **76**(15): 5088-5096.
- [18] Ye J S, Zhao H J, Yin H, *et al.* Triphenyltin biodegradation and intracellular material release by *Brevibacillus brevis* [J]. Chemosphere, 2014, **105**: 62-67.
- [19] Tang S Y, Bai J Q, Yin H, *et al.* Tea saponin enhanced biodegradation of decabromodiphenyl ether by *Brevibacillus brevis* [J]. Chemosphere, 2014, **114**: 255-261.
- [20] Luan T G, Fang S H, Zhong Y, *et al.* Determination of hydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully automated solid- phase microextraction derivatization and gas chromatography - mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2007, **1173**(1-2): 37-43.
- [21] Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 2000, **182**(8): 2134-2141.
- [22] Luan T G, Yu K S H, Zhong Y, *et al.* Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments [J]. Chemosphere, 2006, **65**(11): 2289-2296.
- [23] 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.
- [24] 张娜, 尹华, 何宝燕, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌 J12 对芘的降解特性[J]. 环境科学与技术, 2010, **33**(4): 6-9.
- [25] Xiao X, Han Z Y, Chen Y X, *et al.* Optimization of FDA - PI method using flow cytometry to measure metabolic activity of the cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* [J]. Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C, 2011, **36**(9-11): 424-429.
- [26] Wang Y Y, Hammes F, De Roy K, *et al.* Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology [J]. Trends in Biotechnology, 2010, **28**(8): 416-424.