

异养同化降解氯代烃的研究现状、微生物代谢特性及展望

张浩¹, 邢志林¹, 汪军², 赵天涛¹

1 重庆理工大学 化学化工学院, 重庆 400050

2 重庆市环境科学研究院, 重庆 401147

张浩, 邢志林, 汪军, 等. 异养同化降解氯代烃的研究现状、微生物代谢特性及展望. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1083-1100.

Zhang H, Xing ZL, Wang J, et al. Advances in microbial degradation of chlorinated hydrocarbons. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1083-1100.

摘要: 氯代烃 (Chlorinated hydrocarbons, CAHs) 污染遍布全球, 其三致效应和遗传毒性对人类健康和生态环境构成重大威胁。CAHs 异养同化具有降解彻底、无二次污染和降解效率高的特点, 全面认识 CAHs 异养同化过程, 对于强化和应用异养同化降解, 扩大 CAHs 的修复途径具有重要的推动作用。文中首先分析了微生物细胞异养同化降解 CAHs 主要方式, 阐述了异养同化的两大优势; 针对 CAHs 异养同化的研究现状进行了系统性的总结, 明确了可发生异养同化作用的 CAHs 种类及特征; 基于氯代烷烃、氯代烯烃和氯代芳烃分类, 概述了异养同化微生物的主要菌属及代谢特征; 针对典型氯代烃, 系统分析了参与代谢过程关键酶及特征基因, 归纳了异养同化代谢途径; 最后, 根据当前研究现状对异养同化研究存在的问题进行了综述并对未来的发展方向进行了展望。

关键词: 氯代烃, 异养同化, 代谢特性, 生物修复

Advances in microbial degradation of chlorinated hydrocarbons

Hao Zhang¹, Zhilin Xing¹, Jun Wang², and Tiantao Zhao¹

1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China

2 Chongqing Academy of Environmental Sciences, Chongqing 401147, China

Abstract: Chlorinated hydrocarbons (CAHs) threaten human health and the ecological environment due to their strong carcinogenic, teratogenic, mutagenic and heritable properties. Heterotrophic assimilation degradation can completely and

Received: October 12, 2019; **Accepted:** April 9, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 51978117), Chongqing Technological Innovation and Application Demonstration (No. stc2018jszx-zdyfxmx0019), Scientific Research Special Project of Chongqing Ecological Environment Bureau (No. 2019-21), Chongqing Graduate Student Innovation Fund (No. CYS19322).

Corresponding author: Zhilin Xing. Tel/Fax: +86-23-62563225; E-mail: xingzhilin@cqut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 51978117), 重庆市技术创新与应用示范 (No. stc2018jszx-zdyfxmx0019), 重庆市生态环境局科研专项 (No. 2019-21) 和重庆市研究生创新基金 (No. CYS19322) 资助。

网络出版时间: 2020-05-15

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200514.1529.001.html>

effectively degrade CAHs, without secondary pollution. However, it is crucial to comprehensively understand the heterotrophic assimilation process of CAHs for its application. Therefore, we review here the characteristics and advantages of heterotrophic assimilation degradation of CAHs. Moreover, we systematically summarize current research status of heterotrophic assimilation of CAHs. Furthermore, we analyze bacterial genera and metabolism, key enzymes and characteristic genes involved in the metabolic process. Finally, we indicate existing problems of heterotrophic assimilation research and future research needs.

Keywords: chlorinated hydrocarbon, heterotrophic assimilation, metabolic characteristics, bioremediation

氯代烃 (Chlorinated hydrocarbons, CAHs), 包括氯代烷烃、氯代烯烃和氯代芳烃, 其作为重要化工原材料和有机溶剂在工业生产和生活中被广泛使用^[1]。由于 CAHs 存储和处置不当, 造成了世界范围内工业园区、冶金矿业、医药企业等场地及地下水的严重污染^[2-3]。美国环保局对 39 个小城镇地下水水源进行检测, 在已处理和未经处理的地下水都发现了 11 种 CAHs^[4], 德国 Bitterfeld 地区经过近百年的化学工业发展, 土壤和地下水受到了 CAHs 的严重污染, 涉及的土壤面积高达 25 km², 约有 2 亿 m³ 的地下水遭受污染^[5]。我国“水中优先控制污染物”中前 9 种均为 CAHs, 且 CAHs 具有潜在的“三致”(致癌、致畸、致突变) 效应和遗传毒性效应, 对人类健康和生态环境构成重大威胁^[1]。尽管 CAHs 的污染控制已经持续研究了 60 多年, 但当前治理现状依然不容乐观。因此, 采取有效措施减少环境中的 CAHs 污染迫在眉睫。

生物法作为一种降解高效、环境友好和成本较低的修复方式, 在 CAHs 的去除中一直备受关注^[6]。厌氧还原脱氯、好氧共代谢和异养同化是 CAHs 生物降解的主要途径^[7]。在严格厌氧条件下, CAHs 作为电子受体, 还原性物质作为电子供体, 通过水解作用或亲核反应脱去氯原子的过程即为厌氧还原脱氯^[8]。科研工作者针对厌氧脱氯开展了广泛系统的研究^[9-11], 包括厌氧脱氯相关微生物、脱氯机理、降解酶及影响因子等。厌氧脱氯主要发生在三氯乙烯 (Trichloroethylene, TCE)、四氯乙烯 (Perchloroethylene, PCE)、三氯

苯 (Trichlorobenzenes, TCBs) 和六氯苯 (Hexachlorobenzene, HCB) 等高氯取代烃中, 这些 CAHs 在还原脱氯酶的作用下转化为低氯取代物^[12]。典型厌氧脱氯微生物有脱氯杆菌属 *Dehalobacter*、脱氯拟球菌属 *Dehalococcoides*、脱硫杆菌属 *Desulfitobacterium*、地杆菌属 *Geobacter*^[13], 但只有 *Dehalococcoides* 可实现氯原子的全部脱除。好氧共代谢是 CAHs 生物降解的另一途径, 微生物通过代谢生长基质诱导细胞产生单加氧酶或双加氧酶实现 CAHs 的降解^[14], CAHs 不作为碳源和能源也不能被微生物转化为生物质^[15]。好氧共代谢研究持续多年, 涉及共代谢降解微生物的筛选、生长基质的优化以及共代谢降解机理的解析^[7,16]。最典型共代谢微生物为甲烷氧化菌 *Methanotrophs*^[17]。这些研究为 CAHs 污染的修复提供了重要的理论基础, 基于这些理论, 研究者正开展 CAHs 的场地修复工作^[7]。

异养同化作用是 CAHs 降解的第 3 种途径, 与厌氧脱氯和共代谢降解相比, 异养同化过程避免额外添加有机物, 同时不会产生二次污染, 在 CAHs 污染降解中具有重大应用潜力^[18]。当前, 已报道可通过微生物异养同化作用降解的 CAHs 种类十分有限, 利用异养同化作用实现场地修复的研究还未有报道。开展 CAHs 异养同化过程的系统性认识, 明晰 CAHs 异养同化规律, 对于如何强化、应用异养同化过程, 扩大 CAHs 的修复途径将具有重要的推动作用。国内外许多研究对厌氧脱氯和好氧共代谢过程已进行系统性总结^[9-11,15-16], 对于如何优化调控厌氧脱氯和好氧共代谢过程有了

一定的依据。而关于 CAHs 异养同化过程的总结还未见报道。基于此, 本文将对异养同化降解的研究现状进行系统性总结, 包括可发生异养同化 CAHs 的类型、降解特性, 典型氯代烃异养同化的降解机理、相关微生物及其降解酶, 并基于异养同化降解 CAHs 存在的问题提出未来重点关注的发展方向, 将为 CAHs 异养同化的深入研究和场地修复实践提供重要的理论依据。

1 CAHs 异养同化过程及优势

CAHs 三种代谢途径的特点如表 1 所示。厌氧还原脱氯过程 CAHs 作为电子受体, 还原性物质作为电子供体, 通过水解作用或亲核反应脱去氯原子。所有氯代烃均可发生还原脱氯, 但随着分子中氯原子数量的减少, 还原脱氯的速率会迅速降低^[19]。另外, 厌氧脱氯发生环境要求苛刻, 菌群数量和活性往往较低, 且还需要不断添加电子供体。因此, 该过程极易造成低氯取代物和其他副产物的大量积累^[20-21]。好氧共代谢降解过程中 CAHs 被细胞代谢生长过程中产生的单加氧酶

或双加氧酶降解, CAHs 不为微生物提供能源和碳源, 该过程需要添加大量生长基质, 极易造成环境的二次污染; 共代谢降解产生的环氧化合物和氯代醛类化合物也会造成微生物的活性降低; 同时降解过程中生长基质和 CAHs 污染物会与关键酶竞争活性位点, 产生竞争性抑制^[22]。尽管已有厌氧脱氯和好氧共代谢过程用于场地修复的案例^[23], 但由于上述问题的限制, 往往造成处理成本过高、修复效果差和修复时间长等问题。因此, 面对日益严格环保需求, 扩大 CAHs 的生物修复途径已十分必要。

CAHs 异养同化作为另一种途径为场地修复提供了新的选择, 异养同化过程中微生物以 CAHs 为唯一碳源和能源进行生长, 将其矿化为 H₂O、CO₂ 和 Cl⁻ 等小分子化合物并合成自身生物质^[24]。CAHs 在微生物细胞内的异养同化过程如图 1 所示。CAHs 通过主动运输进入微生物细胞内, 在酶的作用下发生转化, 为微生物生长提供必需的碳源和能源, 同时中间产物通过丝氨酸途径转化为生物质, 代谢生成的氯离子最终排出细胞外。

表 1 CAHs 三种代谢途径的特点^[26]

Table 1 Characteristics of three metabolic pathways of CAHs^[26]

Reaction	Description	Reaction process	Characterization information	Toxic by-product	Half lives
Reductive dechlorination	Dechlorination of a compound where the compound is used as an electron acceptor, the bacteria may or may not gain energy by reduction of the compound. This reaction removes one chloride atom from the compound and replaces it with a proton	$\begin{array}{c} \text{CCl}_3 \\ \\ \text{R} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CHCl}_2 \\ \\ \text{R} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{Cl} \\ \\ \text{R} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	Strictly anaerobic, requiring electron donors	Low chlorine substituted	Slow
Aerobic co-metabolism	Dechlorination of a compound is fortuitously degraded by an enzyme used in cellular metabolism-typically a monooxygenase enzyme	$\begin{array}{c} \text{CCl}=\text{CHCl} \\ \\ \text{R} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{Cl} \quad \text{H} \end{array} \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{Cl}^-$	Additional growth substrate	Epoxy compounds	Fast
Aerobic direct metabolism	Use of the chlorinated compound as an electron donor for aerobic metabolism	$\text{R}-\text{CH}_2\text{Cl} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{Cl}^-$	No additional information is needed	None	Fast

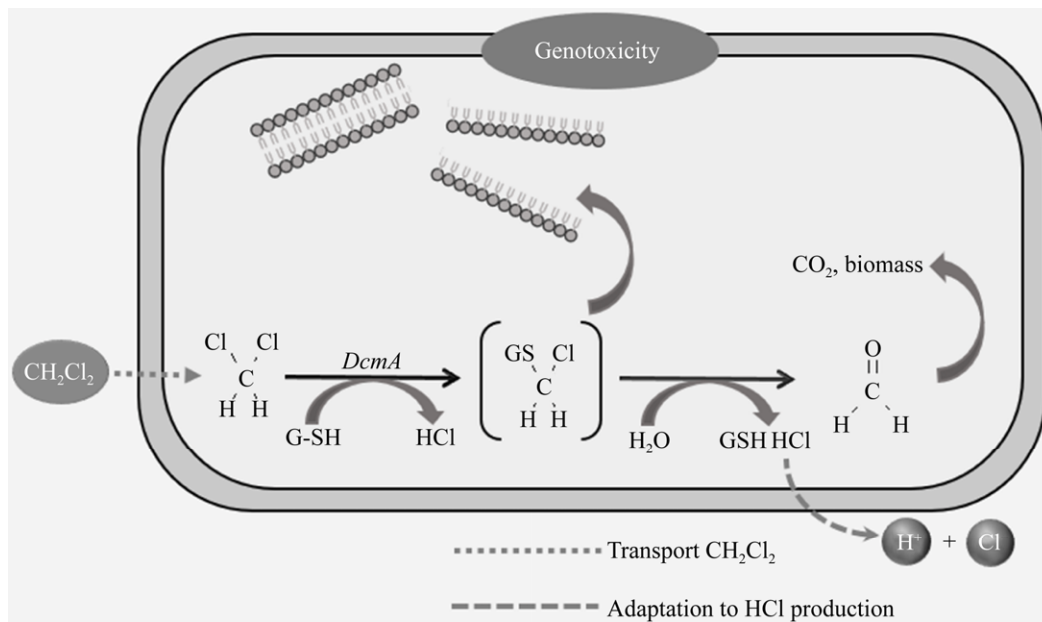


图1 微生物细胞中典型氯代烃异养同化过程^[27]
Fig. 1 Assimilation of CAHs in microbial cell^[27].

与好氧共代谢和厌氧脱氯相比，异养同化优势体现在以下方面：(1) 避免有毒中间产物的生成，特别是对降解酶和微生物有毒害作用的环氧化合物，同时异养同化避免产生低氯取代烃^[21]。(2) 无需添加额外生长基质，无二次污染，同时避免了在代谢过程中生长底物与 CAHs 竞争活性位点^[22]以及生长底物对氧的消耗^[21-22,25]。如何利用 CAHs 异养同化过程也将是未来场地修复研究的热点。

2 CAHs 异养同化降解研究概述

2.1 可发生异养同化降解的 CAHs 种类

目前，研究报道可通过异养同化途径降解的 CAHs 有一氯甲烷 (Chloromethane, CM)^[28]、二氯甲烷 (Dichloromethane, DCM)^[29-30]、三氯甲烷 (Chloroform, CF)、四氯化碳 (Carbon tetrachloride, CT)^[31]等氯代烷烃；氯乙烯 (Vinyl chloride, VC)^[32-33]、顺式二氯乙烯 (*cis*-1,2-dichloroethene, *c*-1,2-DCE)^[21,34]、反式二氯乙烯 (*trans*-1,2-dichloroethylene, *t*-1,2-DCE)^[18]、TCE 等氯代烯烃；

氯苯 (Chlorobenzene, CB)^[35-36]、1,2-二氯苯 (1,2-dichlorobenzene, 1,2-DCB)^[37]、1,4-二氯苯 (1,4-dichlorobenzene, 1,4-DCB)^[38]、1,2,3-三氯苯 (1,2,3-trichlorobenzene, 1,2,3-TCB)、1,3,5-三氯苯 (1,3,5-trichlorobenzene, 1,3,5-TCB)^[39]等氯代芳烃。典型 CAHs 的 Cl/C 比结果如图 2 所示。随氯取代程度的增大，氯代烷烃异养同化降解性急剧下降，除 CT 外，其他全氯代烃无法通过异养同化途径降解。所有氯代甲烷都可作为微生物碳源和能源被降解^[28-29,31]，表明氯代烷烃可以广泛地被微生物同化。除四氯乙烯外，其他氯代乙烯均可发生异养同化降解，发生异养同化的氯代烯烃 Cl/C 的比值低于 2。氯代芳烃中，氯取代程度小于 3 的氯代芳烃可通过异养同化降解是广泛报道的。CAHs 中氯取代程度越高，化合物电负性越强，在有氧条件下难以发生异养同化^[40]。综上所述，能通过异养同化途径进行降解的 CAHs 以氯取代烃 (1-3 个氯原子) 为主，准确认识场地 CAHs 污染特性也是开展场地修复的重要前提。

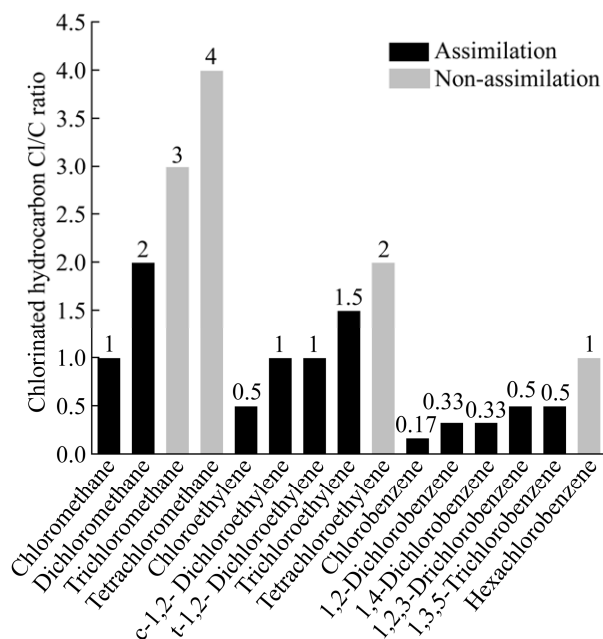


图2 典型氯代烃 Cl/C 比

Fig. 2 Cl/C ratio of typical CAHs.

2.2 CAHs 异养同化的微生物及降解特性

已报道 CAHs 异养同化微生物主要来自污染场地土壤、地下水、化工废水处理厂的活性污泥以及人工驯化的专性降解菌^[31,38], 这些微生物包括纯菌株和混合菌, 混合菌相对于纯菌对污染物

表2 异养同化微生物的生长及代谢特征

Table 2 Growth and metabolic characteristics of CAH-assimilating microorganisms

Types of CAHs	Microorganisms	Concentration (mmol/L)	Cell growth rates (h ⁻¹)	Degradation rates	Experiment conditions	References
CH ₃ Cl	<i>Hyphomicrobium</i> sp. MC1	0.35	0.09	–	pH 7.2 30 °C	[53]
	<i>Hyphomicrobium</i> sp.		0.09–0.17			
	<i>Aminobacter</i> sp.	0.71	0.15	–	pH 7.0 30 °C	[42]
	<i>Nocardioides</i> sp.		0.18			
	<i>Leisingera methylohalidivorans</i> MB2 ^T	0.37	0.05	–	pH 7.7 27 °C 200 r/min	[28]
	<i>Pseudomonas</i> sp. DM1	2–5	0.11	–	pH 6.9 30 °C	[54]
	<i>Hyphomicrobium</i> DM2	10.00	0.07	100% (60 h)	pH 7.2 30 °C	[52]
CH ₂ Cl ₂	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> H13	5.00	2.49	100% (23 h)	pH 7.0 30 °C 160 r/min	[29]
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> wh22	32.00	–	93.8% (72 h)	pH 6.5 30 °C 200 r/min	[30]
	<i>Hyphomicrobium</i> sp. CM2	0.31	0.08	–	pH 7.2 30 °C	[55]
	<i>Methylobacterium</i> sp. CM4		–	–	140 r/min	
	<i>Paracoccus methylylutens</i> sp. nov. DM12	10.00	–	–	pH 7.2 29 °C 180 r/min	[43]

(待续)

具有更好的降解效率, 且对环境具备更好的适应性^[20]。已分离的典型 CAHs 异养同化降解菌属主要有生丝微菌属 *Hyphomicrobium*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、分支杆菌属 *Mycobacterium*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、类诺卡氏菌属 *Nocardioides*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 等, 大多数的降解菌只对特定的 CAHs 产生作用, 但也有少部分降解菌如铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* strain S1-2^[181]、肠杆菌 *Enterobacter* sp. SA-2、*Pseudomonas* sp. SA-6^[39]、红球菌 *Rhodococcus phenolicus* G2PT^[41] 等可降解两种及以上的 CAHs。对已分离筛选具有 CAHs 异养同化作用的微生物进行了系统总结, 结果如表 2 所示。

2.2.1 氯代烷烃异养同化微生物

已报道分离的氯代烷烃异养同化降解菌属主要包括 *Hyphomicrobium*、*Pseudomonas*、*Nocardioides*、氨基杆菌属 *Aminobacter*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、副球菌属 *Paracoccus*、*Bacillus* 等。氯代烷烃类污染物分布广泛, 多种氯代烷烃均可作为微生物底物, 研究人员从多种环境分离了这些菌株。McAnulla 等^[42]从陆地、河口、

							(续表 2)
CHCl ₃	<i>Bacillus</i> (GBB416)	0.12	4.63±0.51	–	pH 7.0 26 °C	[31]	
	<i>Pseudomonas</i> (GBB417)		2.87±0.06				
CCl ₄	<i>Bacillus</i> (GBB416)	0.10	6.69±0.31	–	pH 7.0 26 °C	[31]	
	<i>Pseudomonas</i> (GBB417)		2.41±0.04				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MF1	6.00	0.002	100% (840 h)	pH 7.1 23 °C	[44]	
	Mixed culture	0.25	–	–	pH 7.0 30 °C	[20]	
VC	<i>Mycobacterium</i> strains (JS60 JS61 JS616 JS617)	0.15	0.007–0.010	99.0% (72 h)	pH 7.2 30 °C	[56]	
	<i>Nocardioides</i> sp. JS614		0.03				
	<i>Mycobacterium</i> strains (JS622, JS623, JS624 and JS625)	0.80–1.00	–	–	pH 7.0 30 °C	[32]	
	<i>Ochrobactrum</i> sp. TD	0.29	–	–	pH 7.2 30 °C	[57]	
	<i>Mycobacterium</i> strain JS623	0.77	–	–	pH 7.2 30 °C	[33]	
	<i>Mycobacterium rhodesiae</i> JS60	0.69	0.017	–	pH 6.5 30 °C	[58]	
	<i>Ralstonia</i> sp. TRW-1	0.20	0.19	94.8% (132 h)	pH 7 30 °C	[45]	
	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	0.04	–	100% (108 h)	pH 7.0 20 °C	[59]	
	Mixed culture	0.80	–	100% (408 h)	pH 7.0 23 °C	[21]	
	c-1,2-DCE	<i>Corynebacterium</i> sp.	10.00	15.72±0.10	–	pH 7.5 35 °C	[46]
		<i>Bacillus</i> sp.		14.23±0.26			
		<i>Burkholderia</i> sp.		9.77±0.09			
		<i>Micrococcus</i> sp.		12.91±0.36			
<i>Pseudomonas</i> sp.		12.05±0.44					
c-1,2-DCE/ t-1,2-DCE	Jacksonville stream Bed sediments microorganism	0.05	–	–	pH 7.2	[47]	
	<i>Acinetobacter</i> species						
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain 2002-55549		–				70%–75% (168 h)
	<i>Klebsiella</i> sp. HL1		0.014–0.023				60%–72% (168 h)
	<i>Bacillus</i> species		0.019–0.028				60%–72% (168 h)
TCE	<i>Bacillus</i> sp. 2479	1.00	–	–	pH 6.9 37 °C	[49]	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> PM102	0.33	–	90.0% (2 h)	pH 7.0 37 °C	[48]	
	<i>Delftia tsuruhatensis</i> LW26	0.14	0.420	99.7% (16 h)	pH 7.2 30 °C	[36]	
CB	<i>Acinetobacter</i> sp. CB001	0.44	0.002	98.2% (120 h)	pH 7.2 25 °C	[35]	
	<i>Acidovorax avenae</i>	0.17	0.004	–	pH 7.0 30 °C	[37]	
1,2-DCB	<i>Pseudomonas</i> sp. JS100	0.002–0.004	–	–	pH 7.0 30 °C	[37]	
	<i>Flavobacterium</i> sp. DEB-1	0.68	0.05	94.5% (24 h)	pH 7.8 30 °C	[38]	
1,4-DCB	<i>Xanthobacter flavus</i> 14p1	0.27	0.035	–	pH 7.5 30 °C	[60]	
CB	<i>Rhodococcus phenolicus</i> G2P ^T	–	–	–	pH 7.0 30 °C	[41]	
1,4-DCB	<i>Enterobacter</i> sp. SA-2	0.43–0.9	0.02–0.04	80.0%–90.0% (200 h)	pH 7.0 25 °C	[39]	
1,2,3-DCB							
1,3,5-TCB							

海洋中分离出 6 株属于 *Hyphomicrobium* sp.、*Aminobacter* sp. 和 *Nocardioides* sp. 的 CM 降解菌。Jeffra 等^[28]从海水中分离的菌株 *Leisingera methylohalidivorans* MB2^T 不仅能以 CM 为唯一碳源进行生长还能同化溴甲烷和碘甲烷。Doronina 等^[43]从污染地下水中分离出一种新型的革兰氏阴性菌株 *Paracoccus methylyutens* sp. nov. DM12, 该菌株可以 DCM 为唯一碳源。而 Wu 等^[30]从制药污水中分离出的 DCM 降解微生物芽孢杆菌 *Lysinibacillus sphaericus* wh22, 还能以 1,2-二氯乙烷 (1,2-dichloroethane, 1,2-DCA)、氯溴甲烷 (Chlorobromomethane, CBM)、1,1,1-三氯乙烷 (1,1,1-trichloroethane, 1,1,1-TCA) 和 TCE 为唯一碳源进行生长。CF 和 CT 等高氯代烷烃, 难以作为微生物生长的唯一碳源, Olaniran 等^[31]分离出两株能以底物浓度为 0.1% (W/V) 的 CF 和 CT 为唯一碳源和能源的降解菌 *Bacillus* (GBB416) 和 *Pseudomonas* (GBB417), 这是唯一一篇报道的对 CT 具有异养同化降解功能的菌株, 实现了高氯代烷烃异养同化降解研究的突破。氯代烷烃类污染物分布广泛, 多种氯代烷烃均可作为微生物底物, 在氯代烷烃污染场地, 异养同化降解是十分有效的修复途径。

2.2.2 氯代烯烃异养同化微生物

氯代烯烃在环境中的检出率较高, 毒性更大, 研究人员在污染场地中分离出许多氯代烯烃异养同化降解菌, 主要包括 *Pseudomonas*、*Mycobacterium*、*Nocardioides*、*Stenotrophomonas* 和苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 等。大多数氯代烯烃异养同化微生物是以特定的基质为生长底物、通过长期驯化衍生的特异性菌株。Verge 等^[44]报道了第一株以 VC 为唯一碳源的 *Pseudomonas aeruginosa* MF1, 该菌株以 VC 为唯一基质长期驯化筛选获得, 菌株 MF1 不仅具有长时间的耐饥饿能力, 还具有很强的 VC 耐受能力, 当 VC 浓度增加到 7.3 mmol/L 时对生长也无抑制作用。除纯

菌外, Singh 等^[20]通过长期驯化从污染场地中筛选出一组由 *Mycobacteria* 和 *Rhodococcus* 构成的混合菌, 当 VC 浓度为 50–250 $\mu\text{mol/L}$ 时可被混合菌迅速降解。相同功能的不同菌株降解能力差异明显, Elango 发现从高浓度 VC 环境分离出的罗尔斯通菌 *Ralstonia* sp. TRW-1 对 VC 的降解能力是其他分枝杆菌的 3–10 倍^[45]。

除 VC 外, c-1,2-DCE 也能作为微生物生长的唯一碳源。Schmidt 等研究了污染地下水中 c-1,2-DCE 的异养同化过程, 在多种条件下观察到了 c-1,2-DCE 生物降解过程的稳定性同位素分馏, 通过蛋白质的形成证明了 c-1,2-DCE 可作为微生物生长的唯一碳源和能源^[21]。随后, Olaniran 等利用富集培养技术从尼日利亚和南非的污染场地分离出 5 株 c-1,2-DCE 的异养同化降解菌, 分别属于棒状杆菌属 *Corynebacterium* sp.、*Bacillus* sp.、伯克氏菌属 *Burkholderia* sp.、微球菌属 *Micrococcus* sp. 和 *Pseudomonas* sp., 这些菌均可以 c-1,2-DCE 为唯一碳源和能源, 降解率为 59%–86%^[46]。此外, Bradley 等^[47]从黑臭水体中分离出一组 c-1,2-DCE 降解混合菌, 在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下可以实现 c-1,2-DCE 的完全降解并检测出大量 CO_2 的生成, 表明该混合菌具有高效的 c-1,2-DCE 同化能力。尽管 VC 和 DCE 容易作为微生物碳源被异养同化降解, 但随着氯取代程度的增大, 异养同化降解难度急剧增大。迄今为止, 只发现嗜麦芽窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* PM102^[48] 和 *Bacillus* sp. 2479^[49] 具有 TCE 的异养同化降解能力, 还未有直接证据证明 PCE 可通过异养同化途径实现降解。因此, 在多氯取代烯烃的污染场地, 采用异养同化与厌氧还原脱氯结合的修复措施可实现污染物的有效去除。

2.2.3 氯代芳烃异养同化微生物

氯代芳烃作为持久性有机污染物, 其异养同化微生物的筛选分离研究已开展多年, 研究主要集中在氯取代数小于 3 的氯苯类有机物。研究人员以 CB

为唯一碳源,分离筛选的不动杆菌 *Acinetobacter* sp. CB001^[35]和代尔夫特菌 *Delftia tsuruhatensis* LW26^[36]除了能以 CB 为唯一碳源外,也能以二氯苯 (Dichlorobenzenes, DCBs) 为唯一碳源进行生长。另外, Haigler 等^[50]从活性污泥中分离出一株以 1,2-DCB 为唯一碳源和能源生长的菌株 *Pseudomonas* sp. JS100, 该菌株也能以 CB 为唯一碳源和能源进行生长。此外, Monferrán 等^[37]以 1,2-DCB 为唯一碳源筛选的燕麦食酸菌 *Acidovorax avenae* 降解污染物范围更广, 能够以 CB、1,3-DCB 和 1,4-DCB 为碳源和能源生长。TCBs 异养同化降解菌也存在类似的情况, Adebuseye 等^[39]分离的菌株 *Enterobacter* sp. SA-2 和 *Pseudomonas* sp. SA-6 不仅可以异养同化 1,2,3-TCB 和 1,3,5-TCB, 也能以 1,4-DCB 为唯一碳源和能源生长。以上结果表明, 氯代芳烃异养同化微生物之间可能存在较高的同源性。

2.2.4 异养同化微生物的生长代谢特性

氯代烷烃异养同化微生物生长 pH 值范围为 6.5–7.7, 温度为 25–30 °C。当 CAHs 浓度为 0.1–10 mmol/L 时, 最大比生长速率范围为 0.05–6.63 h⁻¹, 氯代烷烃的平均降解率均在 92% 以上。在异养同化过程中, 生长基质浓度对微生物生长和代谢速率有较大的影响。CAHs 浓度过高, 产生毒性抑制, 微生物生长缓慢; CAHs 浓度过低, 微生物底物匮乏, 限制微生物生长。菌株 *Hypomicrobium* sp. MC1 在气相浓度为 1% 的 MC 中最大比生长速率为 0.09 h⁻¹, 当气相浓度增到 10% 时最大比生长速率降为 0.04 h⁻¹^[51]。此外, 不同微生物对 CAHs 利用效率也具有很大差别, 当 DCM 浓度相同时, 菌株 *Hypomicrobium* DM2 和 *Pseudomonas* sp. DM1 的最大比生长速率分别为 0.07 h⁻¹ 和 0.11 h⁻¹^[52]。为进一步解析代谢机理, Wu 等^[30]从 DCM 异养同化菌株 *Lysinibacillus sphaericus* wh22 提取质粒 pRC11, 并转移到大肠杆菌中, 该重组大肠杆菌菌株能在 5–16 mmol/L

DCM 的条件下正常生长, 表明该基因可能是 DCM 代谢的关键基因。

氯代烯烃作为微生物生长的唯一碳源被广泛报道^[44], 这些氯代烯烃同化微生物的最适生长温度为 20–37 °C, pH 为 6.5–7.5。当氯代烯烃浓度为 0.15–10.00 mmol/L 时, 微生物最大比生长速率范围为 0.002–15.720 h⁻¹, 降解率在 60%–100%。菌株 *Pseudomonas aeruginosa* MF1 以 VC 为唯一碳源生长时, 6 mmol/L 的 VC 在 35 d 内可完全降解^[44]。氯代烯烃异构体同样影响微生物代谢特性, Olaniran 从非洲污染场地中分离出 7 株 DCE 异养同化微生物, 在 1 mmol/L 的 c-1,2-DCE 和 1.5 mmol/L 的 t-1,2-DCE 为唯一碳源进行生长时, 比生长速率分别为 0.014–0.023 h⁻¹ 和 0.019–0.028 h⁻¹, 平均降解率为 70%–75% 和 60%–72%, 其中 t-1,2-DCE 培养基中的细胞密度要高于 c-1,2-DCE, 可能是因为 c-1,2-DCE 氧化生成环氧化合物具有更高的毒性^[18]。与纯菌相比, 混合菌降解能力更高, Sing 分离的混合菌可迅速降解浓度为 50–250 μmol/L 的 VC^[20]。研究表明含氧量和 pH 可影响氯代烯烃的异养同化过程, VC 降解菌株 *Pseudomonas aeruginosa* MF1 在缺氧条件下培养 2.5 d, 并不能完全恢复在 VC 上的生长能力, 且降解过程中有 VC 环氧化合物的生成^[44]。同样的, VC 降解混合菌在缺氧条件下也有 VC 环氧化合物生成^[20], 表明缺氧状态使得 VC 的降解机理可能发生了改变。TCE 异养同化降解菌 *Stenotrophomonas maltophilia* PM102 在 pH 为中性时降解率可达到 90%, 而 pH 降为 5 时降解率下降到 77%^[48]。

氯代芳烃异养同化微生物最适 pH 值为 7.0–7.8, 最适温度为 25–30 °C, 当氯代芳烃浓度为 0.002–1.000 mmol/L 时, 微生物最大比生长速率为 0.002–0.420 h⁻¹, 降解效率范围 77%–99%, 表明氯代芳烃异养同化微生物的活性差异较大。李明堂等^[35]分离的菌株 *Acinetobacter* sp. CB001, 在 0.44 mmol/L 的 CB 条件下, 120 h 降解率可达

98.2%。该菌株还可同化 DCBs, 异养同化能力顺序为 1,3-DCB>1,2-DCB>1,4-DCB。Monferrán 等^[37]以 1,2-DCB 唯一碳源筛选的菌株 *Acidovorax avenae* 在 2 d 内可将 0.136 mmol/L 的 1,2-DCB 完全降解, 释放全部氯原子。同样地, 菌株 *Enterobacter* sp. SA-2 和 *Pseudomonas* sp. SA-6 以 1,2,3-TCB (0.44 mmol/L) 和 1,3,5-TCB (0.43 mmol/L) 为唯一碳源和能源生长时, 约 80%–90% 的 TCBs 可以在 200 h 内降解, 且细胞浓度增加 3 个数量级^[39]。与氯代烷烃和氯代烯烃相比, 氯代芳烃降解异养同化微生物特异性较低, 对多种氯代芳烃均具有降解能力, 在复合污染环境中适用性更强。基于当

前对 CAHs 异养同化降解菌筛选分离和生长特性的研究, 绝大多数降解菌具有较强的耐受性和降解能力, 能较好地适用于氯代烃类污染物场地的修复工作。

3 典型氯代烃的异养同化降解酶及机理

3.1 氯代烷烃的异养同化

MC 和 DCM 是异养同化降解研究最多的氯代烷烃, 现已充分揭示了两种氯代烷烃的代谢机理。基于文献报道总结的 MC 和 DCM 的降解机理如图 3 所示。MC 和 DCM 具有相似的代谢途径, MC 首先发生脱氯反应, 生成的甲基在 CmuA 和

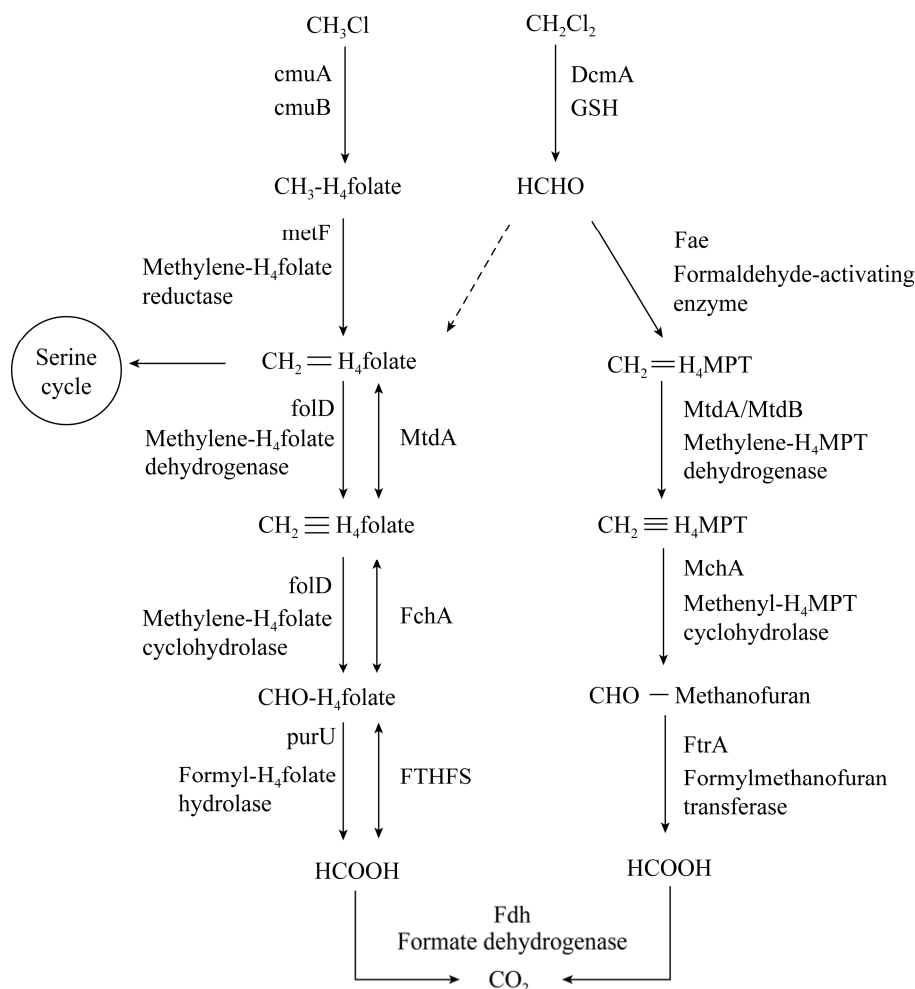


图 3 CM 和 DCM 同化途径^[64]

Fig. 3 Assimilation pathways of chloromethane and dichloromethane^[64].

CmuB 甲基转移酶的作用下转移到四氢叶酸 (Tetrahydrofolate, H_4 folate) 上形成甲基- H_4 folate, 四氢叶酸连接的中间体在亚甲基- H_4 folate 还原酶、亚甲基- H_4 folate 脱氢酶、甲基- H_4 folate 环水解酶、甲酰- H_4 folate 水解酶的相继作用下进一步氧化生成甲酸, 甲酸在甲酸脱氢酶的作用下生成 CO_2 。此外, 中间体亚甲基- H_4 folate 可以通过丝氨酸途径被微生物同化为自身的组成物质。与 MC 不同, DCM 首先在还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的作用下失去一个氯原子并与 GSH 结合生成中间产物 S-氯甲基谷胱甘肽, 中间会自发生成 S-羟甲基谷胱甘肽并最终生成甲醛 (HCHO) 和谷胱甘肽 (图 4)。形成的 HCHO 分别依赖于 H_4 folate 和四氢甲蝶呤 (Tetrahydromethanopterin, H_4 MPT) 途径进行代谢, H_4 MPT 降解途径普遍存在于大多数甲基营养菌中^[61]。HCHO 在甲醛活化酶的作用下与四氢甲蝶呤缩合成亚甲基- H_4 MPT, 而亚甲基- H_4 MPT 是丝氨酸循环和大多数微生物同化必需的^[62-63]。亚甲基- H_4 MPT 通过亚甲基- H_4 MPT 脱氢酶、甲基- H_4 MPT 环水解酶、甲酰甲基咪唑转移酶和甲酸脱氢酶的相继作用最终生成 CO_2 。

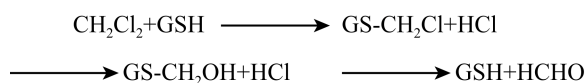


图 4 DCM 的中间代谢途径^[64]

Fig. 4 Intermediate metabolic pathway of dichloromethane^[64].

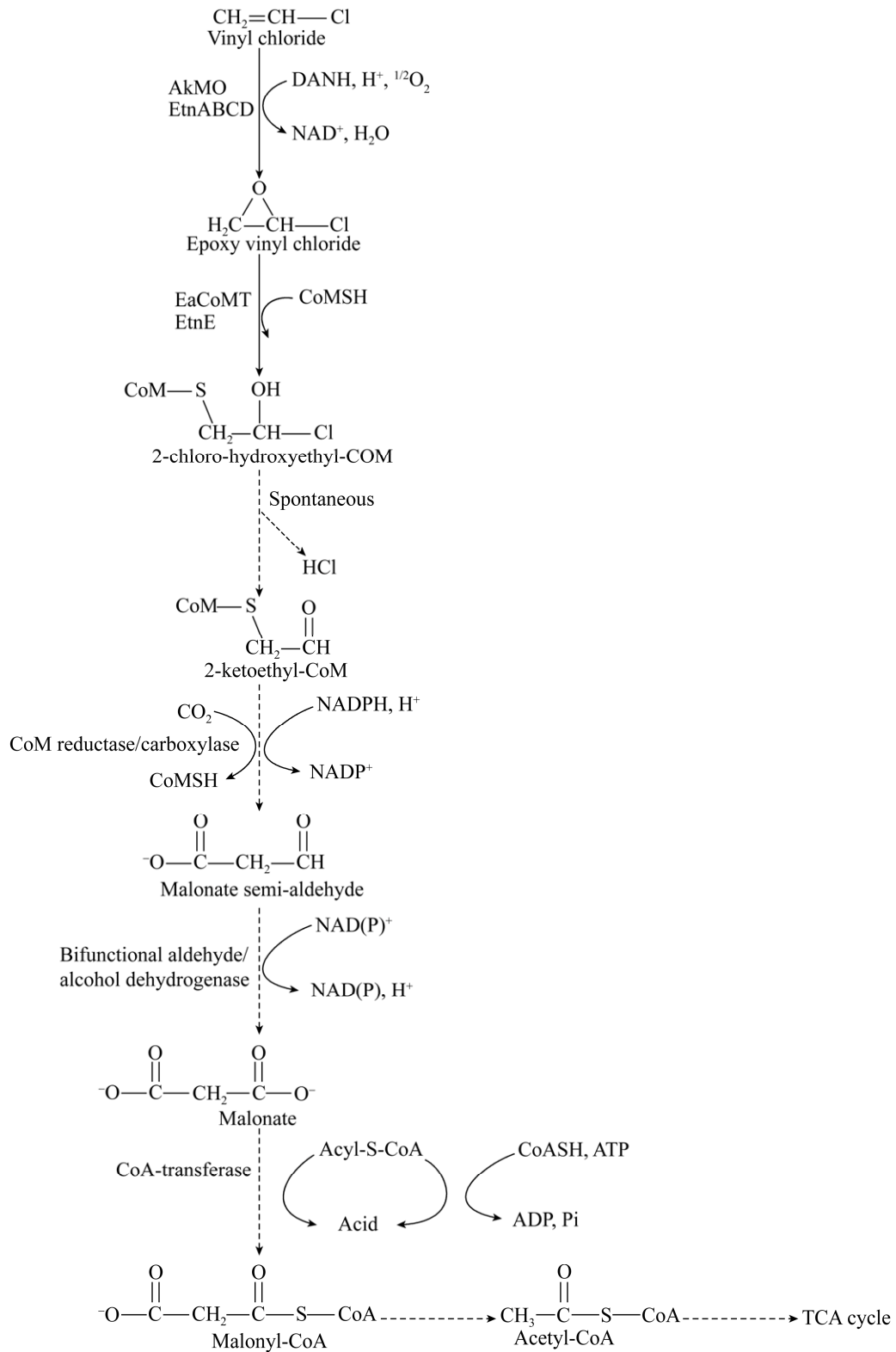
3.2 氯代烯烃的异养同化

氯代烯烃异养同化降解中, 只有 VC 异养同化代谢机理被系统解析, 降解途径如图 5 所示。VC 首先在烯烃单加氧酶 (Alkene monooxygenase, AkMO) 作用下转化为环氧氯乙烯^[22], 由辅酶 M 转移酶 (Coenzyme M transferase, EaCoMT) 介导的辅酶 M (Coenzyme M, CoM) 进一步与环氧乙烯结合形成 2-氯-羟乙基-CoM, 2-氯-羟乙基-CoM 自发地消除氯原子生成 2-酮乙基-CoM, 随后, 在 CoM-还原酶/羧化酶作用下生成丙二酸半醛和还

原性的 CoM。丙二酸半醛通过双官能醛/醇脱氢酶的氧化生成丙二酸, 在脱羧酶、辅酶 A (Coenzyme A, CoA) 合成酶和 CoA 转移酶的循环中转化为丙二酰-CoA, 最终进入三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA)^[22]。研究者针对氯代烯烃降解酶展开了深入研究, AkMO 和 EaCoMT 是 VC 异养同化微生物的重要酶系^[33], *Mycobacterium* sp. strain E20 降解乙烯的研究中首次发现 AkMO^[22], 研究还发现其他酶也参与 VC 的异养同化过程, Danko 等^[57]研究证明 *Ochrobactrum* sp. TD 菌株中的脱羧酶参与 VC 的降解过程, 对同化过程酶生成的编码基因进行了深入分析, 发现 2-3 个 ORFs 编码参与 *Mycobacterium* JS60 和 *Nocardioideis* JS614 菌株的 CoA 合成酶和 CoA 转移酶的合成。Chuang 等^[65]通过蛋白质组学和 RT-PCR 确认了 VC 代谢基因 *etnA*、*etnC*、*etnE* 和 *comA* 与双功能醇/醛脱氢酶、FAD/NAD(P)H 依赖性还原酶/羧化酶和 CoA 转移酶的表达过程受到了 VC 的诱导。这些为 VC 异养同化过程的有效调控提供了重要的理论依据。

3.3 氯代芳烃的异养同化

CB、DCBs 和 TCBs 等典型氯代芳烃的异养同化过程具有相似的代谢途径, 同化过程普遍遵循“先开环再脱氯”的降解机制^[36], 降解过程如图 6 所示。氯代芳烃在双加氧酶的作用下发生邻位或间位裂环脱氯, CB 被依次氧化生成邻氯苯酚、3-氯邻苯二酚, 然后在邻苯二酚 1,2-双加氧酶的作用下, 中间先后经历邻位开环、脱氯、氧化等过程, 最终将其矿化为 CO_2 和转化为生物质; 1,2-DCB 和 1,4-DCB 分别在 1,2-二氯苯双加氧酶和 1,4-二氯苯双加氧酶等酶的作用下, 先后经历开环、脱氯、氧化后生成脱氯产物 5-氯马来酸和 2-氯马来酸^[50]。研究表明, 参与氯代芳烃异养同化过程的邻苯二酚双加氧酶种类很多, 叶杰旭等^[36]在 *Delftia tsuruhatensis* 同化 CB 过程中发现 3-氯邻苯二酚在邻苯二酚 1,2-双加氧酶的作用下邻位开环

图 5 VC 异养同化代谢途径^[22]Fig. 5 VC assimilation pathway^[22].

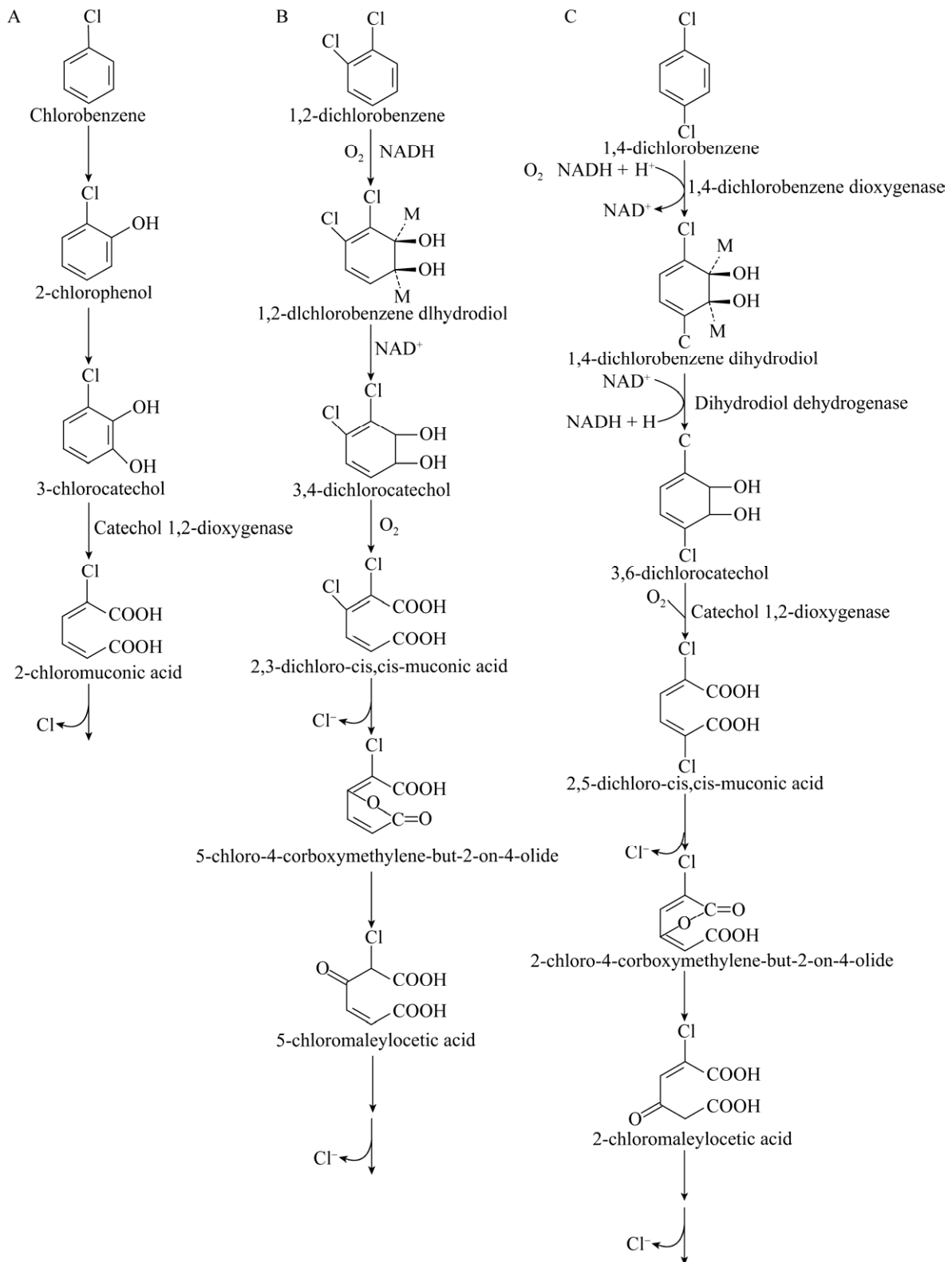


图 6 典型氯代芳烃异养同化生物降解途径 (A: CB^[36]; B: 1,2-DCB^[50]; C: 1,4-DCB^[60])

Fig. 6 Assimilation pathway for typical chlorinated aromatic hydrocarbon. (A) Chlorobenzene^[36]. (B) 1,2-dichlorobenzene^[50]. (C) 1,4-dichlorobenzene^[60].

生成 2-氯-粘康酸。在有氧条件下黄色杆菌 *Xanthobacter flavus* 14p1 对 1,4-DCB 的降解过程中, 邻苯二酚 1,2-双加氧酶将 3,6-二氯邻苯二酚转化为 2,5-二氯-粘康酸^[60]。菌株 *Enterobacter* sp. SA-2 和 *Pseudomonas* sp. SA-6 在降解 1,3,5-TCB 的过程中, 降解 3,6-二氯邻苯二酚的关键酶为邻苯二酚 2,3-双加氧酶, 且菌株 SA-2 比菌株 SA-6 酶活性略高^[39]。综上表明, 邻苯二酚双加氧酶是氯代芳烃异养同化过程中的关键酶。

3.4 典型氯代烃异养同化降解关键基因

不同 CAHs 异养同化过程功能基因差异很大, 不同 CAHs 具有不同的特征基因, 对特征基因的检测分析可明晰微生物或环境样品的异养同化降解功能。典型的 CAHs 异养同化过程特征基因的引物如表 3 所示。氯甲烷同化过程的特征基因因为 *cmuA* 和 *cmuB*^[66], 其中 *cmuA* 作为分子探针

而广泛应用。Miller 等^[67]设计了 *cmuA* 的引物 *cmuA802* 和 *cmuA1609r* 用于检测卤甲烷降解物。随后, Nadalig 开发了两个新的反向引物 *cmuA1802r* 和 MF2, 建立了 *cmuA* 的 qPCR 方法并用于研究绿藻球中的氯甲烷降解物^[68]。DCM 异养同化特征基因为 *dcmA*, *dcmA* 基因具有高度保守性, 开发的引物 CFOR/CREV^[69]和 DMfor/DMrev^[70]可准确定量环境中 DCM 异养同化微生物^[71]。VC 异养同化的特征基因为 *etnC* 和 *etnE*, 当前开发的引物可以准确定量功能微生物和地下水环境中特征基因含量^[71-72]。氯代芳烃异养同化的特征基因为 *adhA1*, Monferrán 等^[37]利用引物 17F 和 1406R 证实了菌株 *Acidovorax avenae* 对 1,2-DCB 的代谢途径。CAHs 特征基因的明确, 对明晰 CAHs 的降解产物、同化途径和实际污染场地功能微生物的定量工作具有重要的指导意义。

表 3 典型 CAHs 异养同化微生物的功能基因及其引物

Table 3 Primers and functional genes of CAHs-assimilation bacteria

Gene	CAHs	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	References
<i>cmuA</i>	CH ₃ Cl	<i>cmuA802</i>	TTCAACGGCGAYATGTATCCYGG	807	[67]
		<i>cmuA1609r</i>	TCTCGATGAACTGCTCRGGCT	984	
		<i>cmuA1802r</i>	TTVGCRTRCRAVCCGTA	167	[68]
		MF2	CCRCCRTTRTAVCCVACYTC		
<i>dcmA</i>	CH ₂ Cl ₂	Cfor	ATSATCYKGCRTCMCAGC	441-450	[69]
		Crev	TMAGCMAGTAWTYCTA		
		Dmfor	AAAAAAAAACATCTAGAGAATGACAACCGTGCGC		
		Dmrev	AAAAAAAAAAGGATCCGGTCATCGAAGGAATGC	1 225	[70]
		NVC105	CAGGAGTCSCTKGACCGTCA	360	
		NVC106	CARACCGCCGTAKGACTTTGT		
<i>etnC</i>	VC	RTC_F	ACCCTGGTCGGTGTKSTYTC	360	[74]
		RTC_R	TCATGTAMGAGCCGACGAAGTC	106	
		MRTC_F	AACTCGTCGGCGTTGTTTC (+7 others)	106	[72]
		MRTC_R	TCATGTACGAGCCGACGAAGTC (+5 others)		
		CoM-FIL	AACTACCCSAAYCCSCGCTGGTACGAC	891	[58]
		CoM-R2	TCGTCGGCAGTTTCGGTGATCGTGCTCTT		
<i>etnE</i>	VC	RTE_F	CAGAAYGGCTGYGACATYATCCA	151	[74]
		RTE_R	CSGGYGTRCCCGAGTAGTTWCC		
		MRTE_F	CAGAATGGCTGTGACATTATCCA (+5 others)	151	[72]
		MRTE_R	CTGGTGTGCCGGAGTAGTTTCC (+8 others)		
<i>adhA1</i>	1,2-DCB	17F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	730	[37]
		1406R	ACGGGCGGTGTGTA/GC		

4 总结与展望

异养同化作为 CAHs 的生物降解方式之一为污染场地生物修复提供了可选的修复方案, 与其他生物代谢过程相比具有显著优势。本文对可发生异养同化的 CAHs 进行了系统性的总结, 对典型 CAHs 的相关微生物、异养同化降解途径及其降解酶进行了系统阐述。目前, 报道的 CAHs 异养同化微生物和可降解 CAHs 的种类较少, 已分离的可进行 CAHs 异养同化微生物仅有十几个属, 可作为碳源和能源被微生物利用的 CAHs 仅限于低氯取代烃, 如 VC、DCE、DCM 和 CM, 且只有一篇文章报道了 TCE 的异养同化降解^[44]; 总结发现, 大多数微生物生长条件 (pH 6.5–7.5, 25–35 °C) 均比较温和, 对于极端条件下的微生物研究甚少; 另外, CAHs 的异养同化研究主要集中在分离的纯菌或群落结构简单的混合菌中, 对于实际 CHAs 的污染场地中, 异养同化降解菌的丰度、酶的种类、异养同化代谢强度、环境因子氧气的影响特性等的信息报道还十分有限; 此外, 污染场地中氯代烃组成复杂, 有些氯代烃无法作为异养同化微生物的碳源和能源, 共存氯代烃还会抑制其他氯代烃的同化降解^[75], 同化降解过程氯代烃间的相互作用影响还未得到有效解决。这些问题限制了异养同化降解微生物在 CAHs 污染处理中的应用。因此, 面对日益严峻的 CAHs 污染, 未来研究中关于 CAHs 的异养同化要更加关注以下几个方面: (1) 扩大菌株筛选范围, 获得具有抗逆性的多种 CAHs 降解能力的菌株; 通过基因工程和酶工程开发工程菌, 如已有利用基因工程手段获得具有 CAHs 异养同化降解功能的大肠杆菌^[30]。(2) 充分利用异养同化降解特点及快速、无二次污染的优势, 开发厌氧脱氯-异养同化, 共代谢-异养同化, 厌氧脱氯-共代谢-异养同化, 物化处理 (铁还原)-异养同化等联合 CAHs 处理工艺, 已有研究发现以 VC 为底物可共代谢降解 DCE^[20]。(3) 利用宏基因组和转录组测序等多组

学技术, 明晰污染场地异养同化微生物基因组信息, 解析不同种属微生物对 CAHs 的代谢机理^[76]。(4) 逐步开展异养同化降解的场地应用, 明晰场地环境中异养同化降解的影响因素, 建立有效的异养同化实施、监控和模拟方案。

附: 缩略词索引

CAHs: 氯代烃, Chlorinated hydrocarbons
 TCE: 三氯乙烯, Trichloroethylene
 PCE: 四氯乙烯, Perchloroethylene
 TCBS: 三氯苯, Trichlorobenzenes
 HCB: 六氯苯, Hexachlorobenzene
 CM: 一氯甲烷, Chloromethane
 DCM: 二氯甲烷, Dichloromethane
 CF: 三氯甲烷, Chloroform
 CT: 四氯化碳, Carbon tetrachloride
 VC: 氯乙烯, Vinyl chloride
 c-1,2-DCE: 顺式二氯乙烯, *cis*-1,2-dichloroethene
 t-1,2-DCE: 反式二氯乙烯, *trans*-1,2-dichloroethylene
 CB: 氯苯, Chlorobenzene
 1,2-DCB: 1,2-二氯苯, 1,2-dichlorobenzene
 1,4-DCB: 1,4-二氯苯, 1,4-dichlorobenzene
 1,2,3-TCB: 1,2,3-三氯苯, 1,2,3-trichlorobenzene
 1,3,5-TCB: 1,3,5-三氯苯, 1,3,5-trichlorobenzene
 1,2-DCA: 1,2-二氯乙烷, 1,2-dichloroethane
 CBM: 氯溴甲烷, Chlorobromomethane
 1,1,1-TCA: 1,1,1-三氯乙烷, 1,1,1-trichloroethane
 DCBs: 二氯苯, Dichlorobenzenes
 H₄folate: 四氢叶酸, Tetrahydrofolate
 GSH: 谷胱甘肽, Glutathione
 H₄MPT: 四氢甲蝶呤, Tetrahydromethanopterin
 AkMO: 烯烃单加氧酶, Alkene monooxygenase
 EaCoMT: 辅酶 M 转移酶, Coenzyme M transferase
 CoM: 辅酶 M, Coenzyme M
 CoA: 辅酶 A, Coenzyme A
 TCA: 三羧酸循环, 1,1,2-trichloroethane

REFERENCES

- [1] Lei C, Sun YQ, Khan E, et al. Removal of chlorinated organic solvents from hydraulic

- fracturing wastewater by bare and entrapped nanoscale zero-valent iron. *Chemosphere*, 2018, 196: 9–17.
- [2] Chen HM, Wu MT. Residential exposure to chlorinated hydrocarbons from groundwater contamination and the impairment of renal function-An ecological study. *Sci Rep*, 2017, 7: 40283.
- [3] Liu S, Xing ZL, Li C, et al. The biotransformation mechanism of chloroform in landfill cover. *China Environ Sci*, 2018, 38(12): 4581–4590 (in Chinese). 刘帅, 邢志林, 李宸, 等. 典型污染物包覆层中氯仿的沿程生物转化机制. *中国环境科学*, 2018, 38(12): 4581–4590.
- [4] Lu Q, Li H, Lin KF, et al. Investigation of chlorinated hydrocarbons in groundwater from a typical contaminated site in Pudong District, Shanghai. *Acta Sci Circum*, 2016, 36(5): 1730–1737 (in Chinese). 陆强, 李辉, 林匡飞, 等. 上海浦东某氯代烃场地地下水污染现状调查. *环境科学学报*, 2016, 36(5): 1730–1737.
- [5] Heidrich S, Weiß H, Kaschl A. Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany). *Environ Pollut*, 2004, 129(2): 277–288.
- [6] Xing ZL, Zhang LJ, Zhao TT. Advances in degradation of chlorinated hydrocarbons by obligate and facultative methanotrophs. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 531–544 (in Chinese). 邢志林, 张丽杰, 赵天涛. 专一营养与兼性甲烷氧化菌降解氯代烃的研究现状、动力学分析及展望. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 531–544.
- [7] Liu S, Zhao TT, Xing ZL, et al. Advances in biotic and abiotic mutual promoting mechanism for chlorinated aliphatic hydrocarbons degradation. *Chin J Biotech*, 2018, 34(4): 510–524 (in Chinese). 刘帅, 赵天涛, 邢志林, 等. 氯代脂肪烃生物与非生物共促降解机制研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(4): 510–524.
- [8] Aulenta F, Majone M, Tandoi V. Enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents: Environmental factors influencing microbial activity and their relevance under field conditions. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, 81(9): 1463–1474.
- [9] Wang Q, Liu H, Jiang L, et al. Effect of the coexistence of chlorobenzene homologue on anaerobic degradation of hexachlorobenzene. *Environ Sci*, 2014, 35(4): 1358–1365 (in Chinese). 王琪, 刘辉, 姜林, 等. 共存氯苯类同系物对六氯苯厌氧降解活性的影响. *环境科学*, 2014, 35(4): 1358–1365.
- [10] McLean JE, Ervin J, Zhou J, et al. Biostimulation and bioaugmentation to enhance reductive dechlorination of TCE in a long-term flow through column study. *Ground Water Monit Remed*, 2015, 35(3): 76–88.
- [11] Nijenhuis I, Kuntze K. Anaerobic microbial dehalogenation of organohalides — state of the art and remediation strategies. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 38: 33–38.
- [12] Tiehm A, Schmidt KR. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes-aspects of field application. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(3): 415–421.
- [13] Richardson RE. Genomic insights into organohalide respiration. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(3): 498–505.
- [14] Jesus J, Frascari D, Pozdniakova T, et al. Kinetics of aerobic cometabolic biodegradation of chlorinated and brominated aliphatic hydrocarbons: A review. *J Hazard Mater*, 2016, 309: 37–52.
- [15] Teng F, Yang XL, Li FM, et al. Microbial co-metabolism of persistent organic pollutants in environment. *J Microbiol*, 2016, 36(3): 80–85 (in Chinese). 滕菲, 杨雪莲, 李凤梅, 等. 微生物对环境中难降解有机污染物共代谢作用. *微生物学杂志*, 2016, 36(3): 80–85.
- [16] Tobajas M, Monsalvo VM, Mohedano AF, et al. Enhancement of cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol induced with phenol and glucose as carbon sources by *Comamonas testosteroni*. *J Environ Manage*, 2012, 95(2): S116–S121.
- [17] Yang X, Xing ZL, Zhang LJ. Advances in transformation and regulation biodegradation of chlorinated hydrocarbons in landfill. *Acta Microbiol Sin*, 2017, 57(4): 468–479 (in Chinese). 杨旭, 邢志林, 张丽杰. 填埋场氯代烃生物降解过程的机制转化与调控研究及展望. *微生物学报*, 2017, 57(4): 468–479.
- [18] Olaniran AO, Pillay D, Pillay B. Aerobic

- biodegradation of dichloroethenes by indigenous bacteria isolated from contaminated sites in Africa. *Chemosphere*, 2008, 73(1): 24–29.
- [19] Hauke S, Willem M DV. Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu Rev Microbiol*, 2004, 58(1): 43–73.
- [20] Sing H, Löffler FE, Fathepure BZ. Aerobic biodegradation of vinyl chloride by a highly enriched mixed culture. *Biodegradation*, 2004, 15(3): 197–204.
- [21] Schmidt KR, Augenstein T, Heidinger M, et al. Aerobic biodegradation of *cis*-1,2-dichloroethene as sole carbon source: Stable carbon isotope fractionation and growth characteristics. *Chemosphere*, 2010, 78(5): 527–532.
- [22] Mattes TE, Alexander AK, Coleman NV. Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(4): 445–475.
- [23] Frascari D, Zanaroli G, Danko AS. In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: a review. *J Hazard Mater*, 2015, 283: 382–399.
- [24] Taylor AE, Dolan ME, Bottomley PJ, et al. Utilization of fluoroethene as a surrogate for aerobic vinyl chloride transformation. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(18): 6378–6383.
- [25] Giddings CGS, Liu F, Gossett JM. Microcosm assessment of *Polaromonas* sp. JS666 as a bioaugmentation agent for degradation of *cis*-1,2-dichloroethene in aerobic, subsurface environments. *Ground Water Monit Remediat*, 2010, 30(2): 106–113.
- [26] Vangelas K, Truex MJ, Newell CJ, et al. Scenarios Evaluation Tool for Chlorinated Solvent MNA. United States, Washington Savannah River Company, 2007: 18–46.
- [27] Trotsenko YA, Torgonskaya ML. The aerobic degradation of dichloromethane: Structural-functional aspects (a review). *Appl Biochem Micro*, 2009, 45(3): 233–247.
- [28] Schaefer JK, Goodwin KD, McDonald IR, et al. *Leisingera methylohalidivorans* gen. nov., sp. nov., a marine methylotroph that grows on methyl bromide. *Int J Syst Evol Micr*, 2002, 52(3): 851–859.
- [29] Liu HX, Zhu RY, Ouyang DJ, et al. Isolation and degradation characteristics of dichloromethane-degradation bacterial strain by *Methylobacterium rhodesianum* H13. *Environ Sci*, 2013, 34(9): 3613–3619 (in Chinese).
刘洪霞, 朱润晔, 欧阳杜娟, 等. 二氯甲烷降解菌 *Methylobacterium rhodesianum* H13 的分离鉴定及降解特性研究. *环境科学*, 2013, 34(9): 3613–3619.
- [30] Wu SJ, Hu ZH, Zhang LL, et al. A novel dichloromethane-degrading *Lysinibacillus sphaericus* strain wh22 and its degradative plasmid. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 82(4): 731–740.
- [31] Olaniran AO, Okoh AI, Ajisebutu S, et al. The aerobic dechlorination activities of two bacterial species isolated from a refuse dumpsite in Nigeria. *Int Microbiol*, 2002, 5(1): 21–24.
- [32] Jin YO, Mattes TE. Adaptation of aerobic, ethene-assimilating *Mycobacterium* strains to vinyl chloride as a growth substrate. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(13): 4784–4789.
- [33] Jin YO, Cheung S, Coleman NV, et al. Association of missense mutations in epoxyalkane coenzyme M transferase with adaptation of *Mycobacterium* sp. strain JS623 to growth on vinyl chloride. *Appl Environ Microb*, 2010, 76(11): 3413–3419.
- [34] Mundle SOC, Spain JC, Lacrampe-Couloume G, et al. Branched pathways in the degradation of cDCE by cytochrome P450 in *Polaromonas* sp. JS666. *Sci Total Environ*, 2017, 605–606: 99–105.
- [35] Li MT, Hao LL, Cui JT, et al. Identification and characterization of an aerobic bacterium degrading chlorobenzene. *Acta Microbiol Sin*, 2010, 50(5): 586–592 (in Chinese).
李明堂, 郝林琳, 崔俊涛, 等. 好氧氯苯降解菌的分离鉴定. *微生物学报*, 2010, 50(5): 586–592.
- [36] Ye JX, Lin TH, Luo YH, et al. Isolation and identification of a chlorobenzene-degrading bacterium and its degradation characteristics. *Environ Sci*, 2017, 38(2): 802–808 (in Chinese).
叶杰旭, 林彤晖, 骆煜昊, 等. 1 株氯苯高效降解菌的分离鉴定及降解特性. *环境科学*, 2017, 38(2): 802–808.
- [37] Monferrán MV, Echenique JR, Wunderlin DA. Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer.

- Chemosphere, 2005, 61(1): 98–106.
- [38] Dai QH, Cao XD, Sun XW. Study on isolation and characterization of a dichlorobenzene-degrading bacterial strain. *Chin J Environ Eng*, 2009, 3(12): 2219–2222 (in Chinese).
戴青华, 曹晓丹, 孙向武. 1,4-二氯苯降解菌的分离及其降解特性研究. *环境工程学报*, 2009, 3(12): 2219–2222.
- [39] Adebusoye SA, Picardal FW, Ilori MO, et al. Aerobic degradation of di- and trichlorobenzenes by two bacteria isolated from polluted tropical soils. *Chemosphere*, 2007, 66(10): 1939–1946.
- [40] Liu H, Jiang L, Wang Q, et al. Progress on microbial degradation of hexachlorobenzene. *Environ Pollut Control*, 2013, 35(1): 86–92 (in Chinese).
刘辉, 姜林, 王琪, 等. 六氯苯微生物降解研究进展. *环境污染与防治*, 2013, 35(1): 86–92.
- [41] Rehfuß M, Urban J. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Syst Appl Microbiol*, 2005, 28(8): 695–701.
- [42] McAnulla C, McDonald IR, Murrell JC. Methyl chloride utilising bacteria are ubiquitous in the natural environment. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 201(2): 151–155.
- [43] Szymanik M, Welc-Faleciak R, Bartosik D, et al. Replication system of plasmid pMTH4 of *Paracoccus methylutens* DM12 contains an enhancer. *Pol J Microbiol*, 2006, 55(4): 261–270.
- [44] Verce MF, Ulrich RL, Freedman DL. Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions. *Appl Environ Microb*, 2000, 66(8): 3535–3542.
- [45] Elango VK, Liggenstoffer AS, Fathepure BZ. Biodegradation of vinyl chloride and cis-dichloroethene by a *Ralstonia* sp. strain TRW-1. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 72(6): 1270–1275.
- [46] Olaniran AO, Pillay D, Pillay B. Haloalkane and haloacid dehalogenases from aerobic bacterial isolates indigenous to contaminated sites in Africa demonstrate diverse substrate specificities. *Chemosphere*, 2004, 55(1): 27–33.
- [47] Bradley PM, Chapelle FH. Aerobic microbial mineralization of dichloroethene as sole carbon substrate. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(1): 221–223.
- [48] Mukherjee P, Roy P. Purification and identification of trichloroethylene induced proteins from *Stenotrophomonas maltophilia* PM102 by immuno-affinity-chromatography and MALDI-TOF Mass spectrometry. *SpringerPlus*, 2013, 2: 207.
- [49] Dey K, Roy P. Degradation of trichloroethylene by *Bacillus* sp.: isolation strategy, strain characteristics, and cell immobilization. *Curr Microbiol*, 2009, 59(3): 256–260.
- [50] Haigler BE, Nishino SF, Spain JC. Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microb*, 1988, 54(2): 294–301.
- [51] Fetzner S. Aerobic degradation of halogenated aliphatics//Timmis KN, Ed. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010: 865–885
- [52] Liu L. Cloning and characterization of dichloromethane dehalogenase for dichloromethane degradation[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2015 (in Chinese).
刘靓. DCM 脱卤酶基因的克隆表达及特性的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.
- [53] Nadalig T, Greule M, Bringel F, et al. Hydrogen and carbon isotope fractionation during degradation of chloromethane by methylotrophic bacteria. *Microbiology Open*, 2013, 2(6): 893–900.
- [54] Krausova VI, Robb FT, González JM. Bacterial degradation of dichloromethane in cultures and natural environments. *J Microbiol Meth*, 2003, 54(3): 419–422.
- [55] Studer A, Stupperich E, Vuilleumier S, et al. Chloromethane: tetrahydrofolate methyl transfer by two proteins from *Methylobacterium chloromethanicum* strain CM4. *Eur J Biochem*, 2001, 268(10): 2931–2938.
- [56] Coleman NV, Mattes TE, Gossett JM, et al. Phylogenetic and kinetic diversity of aerobic vinyl chloride-assimilating bacteria from contaminated sites. *Appl Environ Microb*, 2002, 68(12): 6162–6171.
- [57] Danko AS, Freedman DL. Involvement of carbon dioxide in the aerobic biodegradation of ethylene oxide, ethene, and vinyl chloride. *Process Biochem*, 2008, 43(5): 517–521.
- [58] Fung HKH, Gadd MS, Drury TA, et al. Biochemical

- and biophysical characterisation of haloalkane dehalogenases *DmrA* and *DmrB* in *Mycobacterium* strain JS60 and their role in growth on haloalkanes. *Mol Microbiol*, 2015, 97(3): 439–453.
- [59] Coleman NV, Mattes TE, Gossett JM, et al. Biodegradation of *cis*-dichloroethene as the sole carbon source by a β -proteobacterium. *Appl Environ Microb*, 2002, 68(6): 2726–2730.
- [60] Spiess E, Sommer C, Görisch H. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Xanthobacter flavus* 14p1. *Appl Environ Microb*, 1995, 61(11): 3884–3888.
- [61] Studer A, McAnulla C, Büchele R, et al. Chloromethane-induced genes define a third C_1 utilization pathway in *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *J Bacteriol*, 2002, 184(13): 3476–3484.
- [62] Kayser MF, Ucurum Z, Vuilleumier S. Dichloromethane metabolism and C_1 utilization genes in *Methylobacterium* strains. *Microbiology*, 2002, 148(6): 1915–1922.
- [63] Vorholt JA, Marx CJ, Lidstrom ME, et al. Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J Bacteriol*, 2000, 182(23): 6645–6650.
- [64] Trotsenko YA, Doronina NV. The biology of *Methylobacteria* capable of degrading halomethanes. *Mikrobiologiya*, 2003, 72(2): 149–160.
- [65] Chuang AS, Mattes TE. Identification of polypeptides expressed in response to vinyl chloride, ethene, and epoxyethane in *Nocardioides* sp. strain JS614 by using peptide mass fingerprinting. *Appl Environ Microb*, 2007, 73(13): 4368–4372.
- [66] Cox MJ, Schäfer H, Nightingale PD, et al. Diversity of methyl halide-degrading microorganisms in oceanic and coastal waters. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 334(2): 111–118.
- [67] Miller LG, Warner KL, Baesman SM, et al. Degradation of methyl bromide and methyl chloride in soil microcosms: Use of stable C isotope fractionation and stable isotope probing to identify reactions and the responsible microorganisms. *Geochim Cosmochim Acta*, 2004, 68(15): 3271–3283.
- [68] Nadalig T, Ul Haque MF, Roselli S, et al. Detection and isolation of chloromethane-degrading bacteria from the *Arabidopsis thaliana* phyllosphere, and characterization of chloromethane utilization genes. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, 77(2): 438–448.
- [69] Vuilleumier S, Ivos N, Dean M, et al. Sequence variation in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases. *Microbiology*, 2001, 147(3): 611–619.
- [70] Firsova JE, Doronina NV, Trotsenko YA. Analysis of the key functional genes in new aerobic degraders of dichloromethane. *Microbiology*, 2010, 79(1): 66–72.
- [71] Coleman NV. Primers: functional genes for aerobic chlorinated hydrocarbon-degrading microbes// McGenity T, Timmis K, Nogales B, Eds. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015: 141–175.
- [72] Jin YO, Mattes TE. Assessment and modification of degenerate qPCR primers that amplify functional genes from ethenotrophs and vinyl chloride-assimilators. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 53(5): 576–580.
- [73] Coleman NV, Bui NB, Holmes AJ. Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethene enrichments. *Environ Microbiol*, 2006, 8(7): 1228–1239.
- [74] Jin YO, Mattes TE. A quantitative PCR assay for aerobic, vinyl chloride- and ethene-assimilating microorganisms in groundwater. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(23): 9036–9041.
- [75] Zhao HP, Schmidt KR, Tiehm AT. Inhibition of aerobic metabolic *cis*-1,2-dichloroethene biodegradation by other chloroethenes. *Water Res*, 2010, 44(7): 2276–2282.
- [76] Xing ZL, Zhao TT, Zhang LJ, et al. Effects of copper on expression of methane monooxygenases, trichloroethylene degradation, and community structure in methanotrophic consortia. *Eng Life Sci*, 2018, 18(4): 236–243.

(本文责编 郝丽芳)