



## 研究报告

## 一株海草沉积物菲降解菌的筛选、鉴定和降解特性

张煜航<sup>1,2,3,4,5</sup> Manzoor Ahmad<sup>1</sup> 董俊德<sup>1,2,3,4</sup> 杨清松<sup>1,2,3,4</sup> 周卫国<sup>1,2,3,4</sup> 凌娟<sup>\*1,2,3,4</sup>

1 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东省应用海洋生物学重点实验室 广东 广州 511458

2 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州) 广东 广州 511458

3 三亚中科海洋研究院 海南省热带海洋生物技术重点实验室 海南 三亚 572000

4 中国科学院南海生态环境工程创新研究院 广东 广州 511458

5 中国科学院大学 北京 100049

**摘要:**【背景】多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是一类高毒性的有机污染物,在海洋环境尤其是沿海环境中广泛分布。海草床生态系统作为沿海环境的重要组成部分,深受环境污染等人类活动的影响而处于严重衰退的状态。微生物修复是修复环境中多环芳烃污染的重要途径,具有经济简便、环境友好和无二次污染等特点。【目的】从深圳市大亚湾的海草床沉积物中筛选获得高效多环芳烃降解菌,并分析其降解特性,从而探究海草床生态系统中多环芳烃污染物的微生物修复可行性。【方法】以多环芳烃菲为唯一碳源从海草床沉积物样品中筛选菌株,再通过形态学观察、生理生化实验和 16S rRNA 基因序列对筛选的菌株进行鉴定,并利用特定引物扩增多环芳烃降解的功能基因——双加氧酶(*nidA*)基因,最后通过培养实验分析该菌株对菲的降解特性。【结果】筛选出一株高效降解菲的菌株 SCSIO 43702,经鉴定为玫瑰杆菌属(*Roseovarius*)的潜在新菌,并成功扩增得到双加氧酶相似(*nidA* like)基因;培养实验结果表明,玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在 10 d 内对 100 mg/L 菲的降解率最高可达 96%,而且其对菲的最适降解条件为:温度 30 °C、pH 值 7.5 和 8.0、盐度 3%。

【结论】玫瑰杆菌 SCSIO 43702 凭借其良好的菲降解能力和较强的环境适应性,具有进一步被开发为微生物菌剂以用于多环芳烃污染修复的巨大潜力,为海草床生态系统中多环芳烃污染的微生物修复研究提供了理论依据和可利用的微生物资源。

**关键词:** 多环芳烃, 海草床生态系统, 多环芳烃降解菌, 双加氧酶(*nidA*)基因

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (41676163); Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Class A) (XDA13020300); National Key Research and Development Program of China (2017YFC0506301, 2018YFC1406505); Major Special Projects for Team Introduction of Talents of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) (GML2019ZD0402); Guangzhou Pearl River Science and Technology Nova Project (201806010017); Innovation and Development Fund of South China Sea Eco-environmental Engineering Innovation Institute, Chinese Academy of Sciences (ISEE2018ZD02); Science and Technology Project of Guangdong Province (2020B1212060058)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-20-89107830; E-mail: lingjuan@scsio.ac.cn

**Received:** 26-08-2020; **Accepted:** 29-10-2020; **Published online:** 27-01-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(41676163); 中国科学院战略性先导科技专项 A (XDA13020300); 国家重点研发计划(2017YFC0506301, 2018YFC1406505); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402); 广州市珠江科技新星专项(201806010017); 中国科学院南海生态环境工程创新研究院创新发展基金(ISEE2018ZD02); 广东省科技计划(2020B1212060058)

**\*通信作者:** Tel: 020-89107830; E-mail: lingjuan@scsio.ac.cn

**收稿日期:** 2020-08-26; **接受日期:** 2020-10-29; **网络首发日期:** 2021-01-27

## Isolation, identification and degradation characteristics of a phenanthrene degrading bacteria derived from seagrass sediment

ZHANG Yuhang<sup>1,2,3,4,5</sup> Manzoor Ahmad<sup>1</sup> DONG Junde<sup>1,2,3,4</sup> YANG Qingsong<sup>1,2,3,4</sup>  
ZHOU Weiguo<sup>1,2,3,4</sup> LING Juan<sup>\*1,2,3,4</sup>

1 CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 511458, China

2 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou, Guangdong 511458, China

3 Hainan Key Laboratory of Tropical Marine Biotechnology, Sanya Institute of Oceanology, Sanya, Hainan 572000, China

4 Innovation Academy of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 511458, China

5 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Background] Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are highly toxic organic contaminants which are widely spread in the marine environment, especially in the coastal environment. As an important component of the coastal environment, seagrass ecosystems are under serious degradation status because of the effect of artificial activities including environmental pollutions. Microbial bioremediation has many advantages, such as cost-effective and environmentally friendly without secondary pollutions, and becomes the important way to restore PAHs-contaminated environments. [Objective] This study aimed to explore the feasibility of microbial remediation of PAHs-contaminants in seagrass ecosystems. Seagrass sediment from Daya Bay in Shenzhen City has been collected to isolate the effective PAHs-degrading bacterium, and the degrading characteristics of the strain have been analyzed. [Methods] The PAHs-degrading bacterium was isolated by phenanthrene as the sole carbon source, and the morphological observations, physiological and biochemical experiments and 16S rRNA gene sequences molecular analysis had been conducted for its identification. In the meanwhile, *nidA* gene, a functional gene for PAHs degradation, was amplified from the strain by specific primer. Finally, we used incubation experiments to analyze the strain's degradation characteristics. [Results] A highly effective phenanthrene-degrading strain SCSIO 43702 was isolated and identified as a potentially novel species of the genus *Roseovarius*, and *nidA* gene was successfully amplified from *Roseovarius* SCSIO 43702. The result of incubation experiments showed that *Roseovarius* SCSIO 43702 could degrade 96% phenanthrene (100 mg/L) within ten days, and its optimal degrading conditions were as follows: the temperature at 30 °C, pH value at 7.5 or 8.0, salinity at 3%. [Conclusion] The bacterium *Roseovarius* SCSIO 43702 has high phenanthrene-degrading ability and environmental adaptability, these characteristics indicate the bacterium has great potential to be developed as microbial agents for PAHs bioremediation. All these findings in this study provide a theoretical basis and available microbial resource for bioremediation of PAHs-contaminants in the seagrass ecosystem.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), seagrass ecosystem, PAHs-degrading bacteria, *nidA* gene

多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是一类由 2 个及 2 个以上苯环所构成的具有致癌、致畸、致突变效应的芳香族化合物。作为重要的环境污染物之一,多环芳烃主要是由化石能源燃烧、工业排放污染等人类活动所产生<sup>[1-2]</sup>。随着

人类在沿海地区的活动日益频繁,沿海地区的多环芳烃污染问题也越来越引起人们的关注。海草床生态系统是沿海地区生态环境的一个重要组成部分,具有改善浅水水质、为海洋生物提供食物和栖息地、连接沉积物和水相之间的营养循环等作用<sup>[3]</sup>。

但是,全球的海草床生态系统却面临着严重的威胁,Waycott 等的研究表明,由于沿海地区的人为开发和环境污染等原因,海草床生态系统的消失速度从 1940 年之前的 1% 上升到了 1990 年的 7%<sup>[4-5]</sup>。有文献显示,多环芳烃的亲脂性能够使其穿过海草的细胞膜并在叶绿体的类囊体膜中富集,对海草产生毒害作用,是海草床生态系统被破坏的重要因素之一<sup>[5-6]</sup>。

多环芳烃污染物的微生物修复是利用细菌、真菌等微生物对多环芳烃进行转化和降解成为低毒性或无毒性化合物的一种方法,具有经济简便、环境友好和无二次污染等特点,是修复环境中多环芳烃污染的重要途径<sup>[7-9]</sup>。随着多环芳烃微生物修复研究的深入,研究人员从各种受多环芳烃污染的环境中筛选出大量 PAHs 高效降解菌,如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等<sup>[10-13]</sup>。然而,近年来海草床生态系统中多环芳烃污染物的生物修复研究多关注于植物(海草)修复<sup>[14-16]</sup>;但是 Ling 等的研究发现,在混合 PAHs 的胁迫下海草沉积物中部分细菌的生长得到了促进作用<sup>[5]</sup>,这表明了海草床生态系统蕴含着数量可观的多环芳烃降解菌,然而关于这些降解菌分离和鉴定的研究却少有报道。反观作为沿海生态环境中同样深受多环芳烃污染物所影响的红树林生态系统,其多环芳烃污染物的微生物修复和降解菌分离与鉴定的研究得到了广泛的关注和讨论<sup>[17-19]</sup>。因此,作为同样含有丰富微生物资源的海草床生态系统,其多环芳烃污染物的微生物修复研究具有广阔的探索前景。

本研究从中国广东省深圳市大亚湾海草床的喜盐草(*Halophila ovalis*)沉积物中分离出一株高效降解菲的菌株 SCSIO 43702,通过形态学观察、生理生化实验和 16S rRNA 基因序列比对等多相分类分析,鉴定该菌株为玫瑰杆菌属(*Roseovarius*)的潜在新菌,并在实验室条件下探究了该菌株对菲的降

解特性,发现其有进一步开发为用于多环芳烃修复的微生物菌剂的潜力,也为海草床生态系统中多环芳烃污染的微生物修复提供了理论依据和可利用的微生物资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

海草床沉积物样品于 2016 年 7 月 15 日采集自中国广东省深圳市大亚湾的喜盐草(*Halophila ovalis*)生长区域(22°33'17"N, 114°29'56.4"E)表层 0–10 cm 处的沉积物。在低潮期时利用无菌铲在 3 个相距约 50 m 的不同区域采集沉积物样品,并用无菌的聚乙烯袋带回实验室,立即进行多环芳烃降解菌的富集培养。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

纯度为 97% 的菲和分析纯的丙酮,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司;PCR 所用试剂,宝日医生物技术有限公司。PCR 仪, Thermo Fisher Scientific 公司;高效液相色谱仪, Agilent Technologies 公司。

富集培养基为无机盐 MSM 培养基,配方参考文献[20],用 1.0 mol/L NaOH 溶液调节培养基 pH 至 7.50。

菌液富集后的涂布培养基为 216L 培养基,配方参考文献[20],固体培养基中再加入 15.0 g/L 的琼脂,用 1.0 mol/L NaOH 溶液调节培养基 pH 至 7.50。

研究多环芳烃降解菌的特性所用培养基为无碳无机盐培养基 CFMM (Carbon-Free Mineral Medium),配方参考文献[21],用 1.0 mol/L NaOH 溶液调节培养基 pH 至 7.00。

以上培养基所用试剂均来自广州化学试剂厂(分析纯,纯度>99%),而且各培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 下高温湿热灭菌 20 min 后使用。

### 1.3 菲降解菌的分离筛选

称取 100 mg 菲用 10 mL 丙酮溶解,在超净工作台中使用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤灭菌后制成 10 mg/mL

菲的丙酮溶液。吸取 1 mL 的 10 mg/mL 菲的丙酮溶液加入至装有 100 mL MSM 液体培养基的锥形瓶(培养基和锥形瓶均已灭菌)中,使菲的终浓度为 100 mg/L;待瓶中的丙酮挥发完全(放置于摇床中 40 °C、150 r/min 避光挥发大于 12 h<sup>[22]</sup>)后,加入 10 g 海草床沉积物样品,用封口膜将锥形瓶封口,置于 30 °C、180 r/min 的摇床中避光培养 35 d。培养 35 d 后,用无菌生理盐水对培养液进行梯度稀释为  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  后涂布于 216L 固体培养基,置于恒温培养箱中 30 °C 培养 2 周。待菌落生长后,对获得的菌落进行形态学分离和纯化,共得到纯化的菌株 35 株。将所有纯化的菌株分别接种于以 100 mg/L 菲为唯一碳源的 CFMM 培养基中,再置于 30 °C、180 r/min 的摇床中避光培养 10 d。

培养 10 d 后使用高效液相色谱法测定各菌株对菲的降解率,以比较各菌株对菲的降解能力,最终获得菲的高效降解菌株并命名为 SCSIO 43702。样品制备流程如下:用 40 mL (2 倍的培养液体积)乙酸乙酯对培养结束的样品进行萃取,并收集萃取上清液,再将萃取液旋转蒸发后用 1 mL 的甲醇进行溶解。HPLC 设置条件如下:使用 INertSil ODs 4.6 mm×150 mm 色谱柱,流动相为 80%甲醇,流速为 1 mL/min,UV 探测器波长设置为 275 nm,进样量为 10  $\mu$ L,柱温为 40 °C<sup>[22]</sup>。

## 1.4 菌株的鉴定

### 1.4.1 形态学观察和生理生化实验

根据《微生物学实验》<sup>[23]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[24]</sup>对菌株 SCSIO 43702 进行形态学观察和生理生化实验。

### 1.4.2 16S rRNA 基因分子生物学鉴定

按照细菌 DNA 提取试剂盒的使用说明书提取菌株 SCSIO 43702 的基因组 DNA,并以其为模板,使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')对该菌株的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增<sup>[25]</sup>。PCR 反应体系: *rTaq* Premix 12.5  $\mu$ L, 27F 0.2  $\mu$ mol/L, 1492R 0.2  $\mu$ mol/L,

模板 DNA 1  $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物通过 1.8%的琼脂糖凝胶电泳检测后将阳性产物送至天一辉远生物科技有限公司测序。测序结果通过 EzBioCloud 数据库进行相似性比对,并使用 MEGA 7.0 的邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育树<sup>[26]</sup>。

### 1.4.3 菌株的双加氧酶 *nidA* 基因的扩增

根据 Zhou 等报道中所用的 *nidA* 引物及其嵌套的 PCR 反应体系和反应条件对菌株 SCSIO 43702 的 *nidA* 基因进行 PCR 扩增<sup>[27]</sup>,使用引物为 *nid*-for (5'-TCCRMTGCCCDTACCACGG-3')和 *nid*-rev1 (5'-GAASGAYARRTTSGGGAACA-3')、*nid*-rev2 (5'-GCGSCKRKCTTCCAGTTCG-3')。PCR 体系: 第 1 轮 PCR: *Ex Taq* Premix 12.5  $\mu$ L, *nid*-for 0.2  $\mu$ mol/L, *nid*-rev1 0.2  $\mu$ mol/L, BSA (20 mg/mL) 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L; 第 2 轮 PCR: *Ex Taq* Premix 12.5  $\mu$ L, *nid*-for 0.2  $\mu$ mol/L, *nid*-rev2 0.2  $\mu$ mol/L, BSA (20 mg/mL) 1  $\mu$ L, 以 0.1  $\mu$ L 的第 1 轮 PCR 产物为第 2 轮模板,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s; 72 °C 5 min; 其中,第 1 轮 PCR 进行 40 个循环,第 2 轮 PCR 进行 30 个循环。第 2 轮的 PCR 产物通过 1.8%的琼脂糖凝胶电泳检测,再将阳性产物送至天一辉远生物科技有限公司测序。将测序结果通过 NCBI 数据库进行相似性比对,并使用 MEGA 7.0 的邻接法构建系统发育树<sup>[26]</sup>。

## 1.5 菌株对菲的降解特性研究

### 1.5.1 菌液的制备

使用 216L 液体培养基对菌株 SCSIO 43702 在 30 °C、180 r/min 下进行富集培养 48 h,培养结束后取培养液于 4 000 r/min 下离心 10 min,弃上清液,用生理盐水重悬 2 次细胞沉淀以清洗细胞,最后用 CFMM 培养基重悬细胞至细胞悬液的 OD<sub>600</sub> 值为 0.2。

### 1.5.2 菌株生长曲线的绘制

在 50 mL 锥形瓶中加入 18 mL CFMM 培养基, 再加入 0.2 mL 10 mg/mL 菲的丙酮溶液使菲的终浓度在后续添加菌液后为 100 mg/L, 待丙酮完全挥发(放置于摇床中 40 °C、150 r/min 避光挥发大于 12 h<sup>[22]</sup>)后, 加入 2 mL 上述制备的菌液, 对照组不加入菌液而用等量的 CFMM 培养基替代。将锥形瓶封口放入摇床中在 30 °C、180 r/min 的条件下避光培养, 每个实验组和对照组设 3 个重复, 每 12 h 测量培养液的  $OD_{600}$  值以绘制生长曲线。

同时, 在 50 mL 锥形瓶中加入 18 mL 216L 培养基, 加入 2 mL 上述制备的菌液(最后细胞的重悬操作使用 216L 培养基代替 CFMM 培养基), 但是不加入菲的丙酮溶液, 对照组不加入菌液而用等量 216L 培养基替代, 每个实验组和对照组设 3 个重复。将锥形瓶封口放入摇床中, 在 30 °C、180 r/min 的条件下培养, 定时测量培养液的  $OD_{600}$  值以绘制生长曲线。

### 1.5.3 温度对菲降解的影响

在 50 mL 锥形瓶中加入 18 mL CFMM 培养基, 再加入 0.2 mL 10 mg/mL 菲的丙酮溶液使菲的终浓度在后续添加菌液后为 100 mg/L, 待丙酮完全挥发(放置于摇床中 40 °C、150 r/min 避光挥发大于 12 h<sup>[22]</sup>)后, 加入 2 mL 上述制备的菌液。各实验组设定温度分别为 20、25、30、35、40 °C, 同时设置对照组观察菲的非生物降解, 对照组中不加入菌液, 而用等量的 CFMM 培养基替代。将所有实验组和对照组放入摇床中, 以 180 r/min 分别避光培养 2、5 和 10 d。每个实验组和对照组设 3 个重复。

### 1.5.4 pH 值对菲降解的影响

使用 1 mol/L 的 HCl 溶液和 NaOH 溶液调节 CFMM 培养基的 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 菲和菌液的添加以及对照组的设置同 1.5.3。将所有实验组和对照组放入摇床中, 以 30 °C、180 r/min 的条件分别避光培养 2、5 和 10 d。每个实验组和对照组设 3 个重复。

### 1.5.5 盐度对菲降解的影响

调节 CFMM 培养基的盐度(质量分数)为 1%、3%、6%、9%、12%、15%, 菲和菌液的添加以及对照组的设置同 1.5.3。将所有实验组和对照组放入摇床中, 以 30 °C、180 r/min 的条件分别避光培养 2、5 和 10 d。每个实验组和对照组设 3 个重复。

### 1.5.6 样品处理

使用 HPLC 对培养结束的样品中剩余的菲浓度进行测定, 具体样品制备流程和 HPLC 的设置条件同 1.3。

## 1.6 数据分析

使用数据处理软件 SPSS 25.0 对实验所得数据进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

菌株 SCSIO 43702 的初步形态学观察结果显示, 该菌株为革兰氏阴性菌, 小杆状, 无鞭毛, 长 1.69  $\mu\text{m}$ , 在 216L 固体培养基中呈黄色, 菌株的电镜观察图见图 1。EzBioCloud 数据库的比对结果显示, 该菌株 16S rRNA 基因序列的最相近序列为玫瑰变色菌属 *Roseovarius confluentis* SAG6<sup>T</sup> (KX268605), 相似度为 95.58%; 将该菌株的 16S rRNA 基因序列与 EzBioCloud 数据库中相似菌株的序列进行系统发育树的构建, 结果见图 2。对菌株 SCSIO 43702 和玫瑰变色菌属 *Roseovarius confluentis* SAG6<sup>T</sup> (KX268605) 的部分生理生化反应结果进行比较<sup>[28]</sup>, 结果见表 1。生理生化反应结果显示: 2 株菌都能利用淀粉、葡萄糖、半乳糖和甘露醇, 可以进行硝酸盐还原、L-苯丙氨酸反应, 但是在麦芽糖利用和明胶分解 2 个反应的结果中存在差异, 其中菌株 SCSIO 43702 的麦芽糖利用反应的结果为阴性, 明胶分解反应的结果为阳性。

由于菌株 SCSIO 43702 与最相似菌株 *Roseovarius confluentis* SAG6<sup>T</sup> (KX268605)<sup>[28]</sup> 的 16S rRNA 基因序列的相似度为 95.58%, 根据《微生物学》<sup>[29]</sup>中提到细菌的 16S rRNA 基因序列的相似性低于 97%

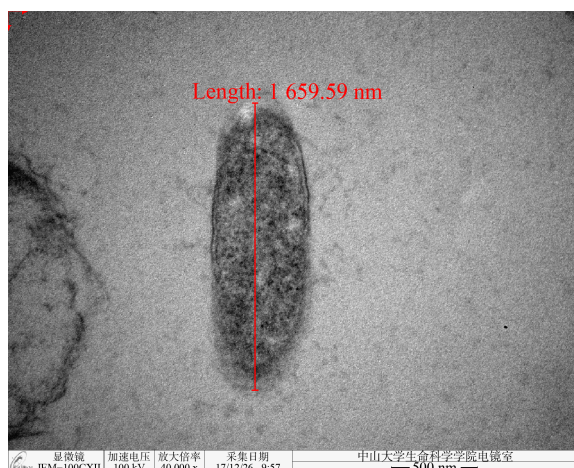


图1 玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的电子显微镜图(40 000×)  
Figure 1 Scanning electron microscope graph of *Roseovarius* SCSIO 43702 (40 000×)

时可认为两者是不同种,而且这2株菌在部分生理生化反应的结果中存在差异,因此鉴定本研究中所分离得到的菌株 SCSIO 43702 为玫瑰杆菌属(*Roseovarius*)的一株潜在新菌(下称玫瑰杆菌 SCSIO 43702)。玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的 16S rRNA 基因序列已提交至 NCBI 数据库,登录号为 MW018357。

根据已报道的 *nidA* 基因引物对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 进行巢式 PCR 扩增并测序,获得了长度约 300 bp 的 *nidA* like 基因序列,该序列已提交至 NCBI 数据库,登录号为 MW034583。使用 NCBI

数据库对该序列进行相似性比对,结果显示:该菌株与微黄分枝杆菌(*Mycobacterium gilvum*)菌株 BB1 的 *nidA* 基因相似性为 93.13%。使用 MEGA 7.0 软件的邻接法对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的 *nidA* like 基因序列与 NCBI 数据库的相似序列一起构建系统发育树,结果见图 3。

## 2.2 菌株对菲的降解特性

玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在以 100 mg/L 菲为唯一碳源的 CFMM 培养基和 216L 培养基中的生长曲线如图 4 所示。

通过对比菌株在以 100 mg/L 菲为唯一碳源的培养基和 216L 培养基中的生长曲线,可以看出:玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在 2 种培养基中的生长曲线存在明显差异。在营养充足的 216L 培养基中,菌株经过 24 h 的适应期后大量生长繁殖,并在培养 56 h 后达到生长繁殖的峰值,此后菌株进入平台期,生长繁殖相对趋于稳定。然而以 100 mg/L 菲为唯一碳源的 CFMM 培养基,在前 48 h 的培养时间中,玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的生长都受到了明显的抑制作用,培养液的  $OD_{600}$  值不断下降;在培养 48 h 后,培养液的  $OD_{600}$  值逐渐趋于稳定,可是该菌株仍然无法大量生长繁殖。2 条生长曲线的差异体现了 100 mg/L 菲对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的生长繁殖具有明显的抑制作用。

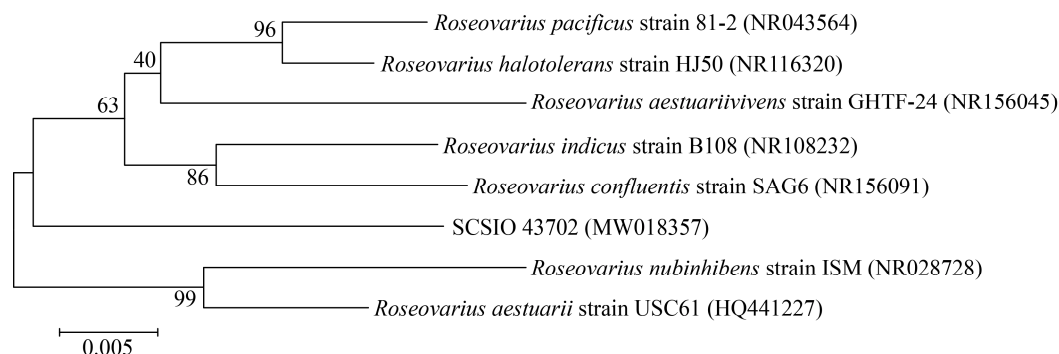


图2 玫瑰杆菌 SCSIO 43702 与相关菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of *Roseovarius* SCSIO 43702 and other related strains

注: 括号中序号是相关菌株的登录号, 分支点上的数字是 Bootstrap 支持率, 标尺刻度 0.005 是序列差异的分支长度

Note: The numbers in parentheses are accession numbers of related strains, the numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap, bar=0.005 is nucleotide divergence



表 1 玫瑰杆菌 SCSIO 43702 与 *Roseovarius confluentis* SAG6<sup>T</sup> 的部分生化反应结果的对比

Table 1 Comparison of the partial physiological and biochemical reaction results between *Roseovarius* SCSIO 43702 and *Roseovarius confluentis* SAG6<sup>T</sup>

特征 Characteristics	<i>Roseovarius</i> SCSIO 43702	<i>Roseovarius</i> <i>confluentis</i> SAG6 <sup>T</sup>
淀粉利用 Starch utilization	—	—
葡萄糖利用 Glucose utilization	+	+
半乳糖利用 Galactose utilization	—	—
麦芽糖利用 Maltose utilization	—	+
甘露醇利用 Mannitol utilization	+	+
鼠李糖-水合物 Rhamnose-monohydrate	+	ND
生成硫化氢 H <sub>2</sub> S production	—	ND
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
蛋白酶活性 Protease activity	—	ND
明胶酶活性 Gelatinase activity	+	—
L-苯丙氨酸 L-phenylalanin	—	—
V-P 实验	—	ND
Vogouse proskaure test		

注：+：阳性；—：阴性；ND：无法确定  
Note: +: Positive; -: Negative; ND: Unable to determine

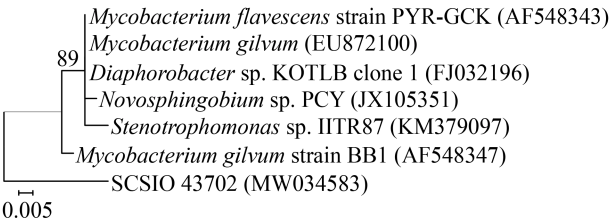


图 3 玫瑰杆菌 SCSIO 43702 与相关菌株基于 *nidA* like 基因序列构建的系统发育树

Figure 3 The phylogenetic tree based on *nidA* like gene sequences of *Roseovarius* SCSIO 43702 and other related strains

注：括号中序号是相关菌株的登录号，分支点上的数字是 Bootstrap 支持率，标尺刻度 0.005 是序列差异的分支长度  
Note: The numbers in parentheses are accession numbers of related strains, the numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap, bar=0.005 is nucleotide divergence

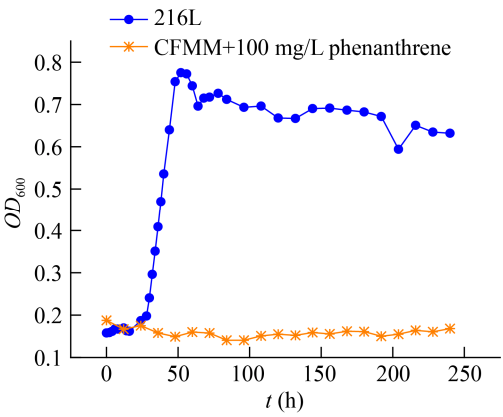


图 4 玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在 216L 培养基和含有 100 mg/L 菲的 CFMM 培养基的生长曲线

Figure 4 The growth curve of *Roseovarius* SCSIO 43702 in 216L medium and CFMM medium with 100 mg/L phenanthrene

将纯化后的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 菌液( $OD_{600}$  值为 0.2)接种到以初浓度 100 mg/L 菲为唯一碳源的 CFMM 液体培养基中培养，同时设置不接种菌液的对照组以测量菲的非生物降解率。培养实验结束后，使用高效液相色谱法对各实验组和对照组的剩余菲浓度进行测定。

以温度为变量的培养实验结果如图 5 所示。在培养 5 d 和 10 d 的实验组中，25、30 和 35 °C 实验组的菲的降解率明显高于同期其他温度实验

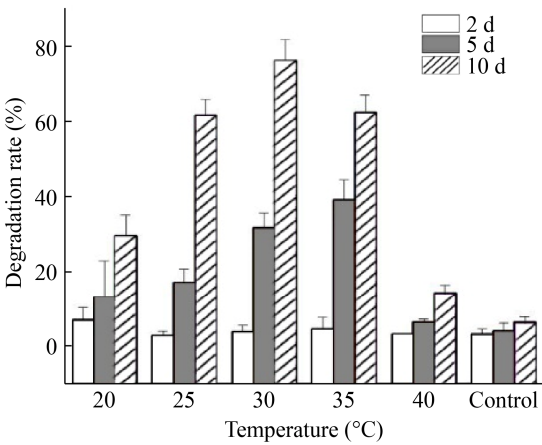


图 5 温度对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 降解菲的影响  
Figure 5 Effect of temperature on phenanthrene degradation by *Roseovarius* SCSIO 43702

组的降解率,其中,培养 10 d 的 30 °C 实验组测得最高降解率为 78%,约为同期的最低降解率 15% (40 °C 实验组)的 5 倍。不同温度处理下降解率的显著差异表明了温度对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在培养 5 d ( $P<0.05$ )和 10 d ( $P<0.001$ )的菲的降解能力有着显著性的影响。此外,培养 10 d 的实验组中菲的降解率都高于同期对照组的菲降解率,这说明玫瑰杆菌 SCSIO 43702 具有在 20–40 °C 这一温度区间中降解菲的能力。

以 pH 为变量的培养实验结果如图 6 所示。在培养 5 d 的实验组中,不同 pH 值实验组的菲降解率之间存在显著的差异,偏酸性实验组的菲降解率较低,pH 值 5.5 和 6.0 的实验组的降解率接近同期的对照组降解率(5%);而偏碱性实验组的菲降解率较高,最高降解率是 pH 值 7.0 的实验组(78%),这一现象说明了 pH 值对培养 5 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的菲降解能力具有显著的影响( $P<0.01$ )。然而,培养 10 d 的实验组显示,偏酸性培养实验组的菲降解率仅略低于同期的偏碱性实验组,数据的显著性检测结果( $P>0.05$ )表示 pH 值对培养 10 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的菲降解能力不具有显著的影响;同时,培养 10 d 的实验组的菲降解率

均大于 70%且远高于同期对照组的菲降解率(约为 10%),其中,最高的菲降解率是 pH 值为 8.0 实验组的菲降解率(96%),这说明玫瑰杆菌 SCSIO 43702 具有在 pH 值为 5.5–8.5 的区间中高效降解菲的潜力。

以盐度为变量的培养实验结果如图 7 所示。在培养 5 d 的实验组中,除玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在盐度为 15%的培养条件下对菲的降解率接近同期对照组的菲降解率外,其他盐度实验组的菲降解率虽高于对照组,但各组之间降解率的差异不大,显著性检测结果( $P>0.05$ )显示盐度对培养 5 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的菲降解能力不具有显著的影响。然而,玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在培养 10 d 后,不同盐度处理的菲降解率之间产生了明显的差异,盐度为 1%、3%和 6%的实验组的菲降解率(76%–86%)远高于其他实验组和对照组的菲降解率(低于 25%),其中,具有最高菲降解率(86%)的是 3%盐度处理的实验组。降解率的显著差异说明了盐度对培养 10 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的菲降解能力具有显著的影响( $P<0.001$ ),也表明了该菌株能够在盐度为 1%、3%和 6%的条件下高效降解菲。

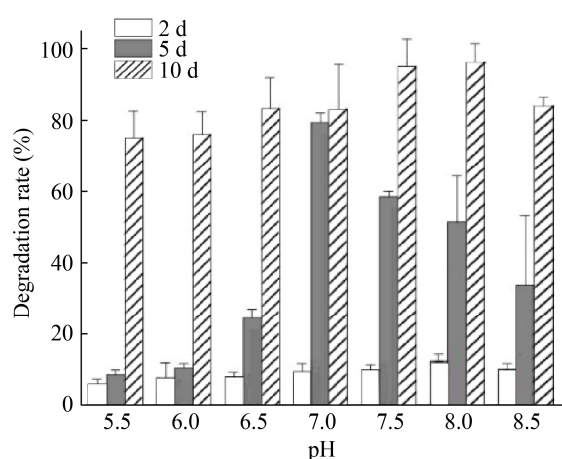


图 6 pH 值对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 降解菲的影响  
Figure 6 Effect of pH on phenanthrene degradation by *Roseovarius* SCSIO 43702

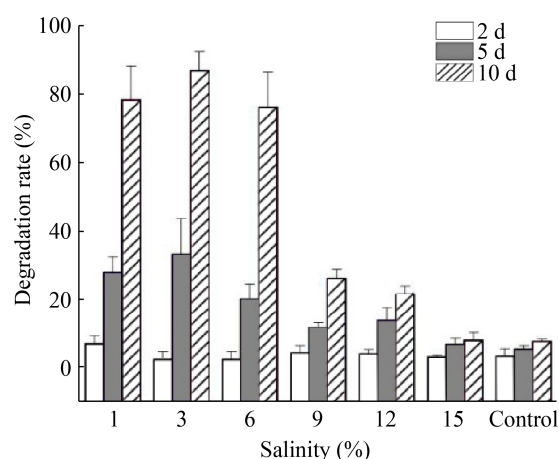


图 7 盐度对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 降解菲的影响  
Figure 7 Effect of salinity on phenanthrene degradation by *Roseovarius* SCSIO 43702



### 3 讨论与结论

本研究以菲为唯一碳源,从深圳市大亚湾的喜盐草(*Halophila ovalis*)海草床沉积物样品中富集培养并筛选出一株细菌 SCSIO 43702,对该菌株进行形态学观察、生理生化实验和分子生物学的多相分类鉴定,结果显示其 16S rRNA 基因序列与 EzBioCloud 数据库中玫瑰变色菌属 *Roseovarius confluentis* SAG6<sup>T</sup> (NR156091)的序列相似度为 95.58%,而且该菌株与最相似菌的生理生化反应结果具有一定差异,因此鉴定该菌株为玫瑰杆菌属(*Roseovarius*)的潜在新菌。玫瑰杆菌属的细菌常见于受多环芳烃污染的环境中,是多环芳烃降解的重要细菌之一,已有许多研究通过分子生物学 PCR-DGGE 方法从多环芳烃富集的样品中发现了许多玫瑰杆菌属的细菌<sup>[30-31]</sup>。同样地, Lai 等利用芘和菲等多种多环芳烃的混合物从印度洋深海海水中分离得到一株玫瑰杆菌属的新菌 *Roseovarius indicus*<sup>[32]</sup>, Gutierrez 等也以菲为唯一碳源从苏格兰西海岸的浮游生物网样品中分离出一株玫瑰杆菌属新菌 *Roseovarius* sp. strain MCTG156(2b)<sup>[33]</sup>。这些研究报道在细菌谱系水平上说明了本研究中分离得到的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 具有降解多环芳烃的潜力。

芳香环羟基化双加氧酶(Ring-Hydroxylating Dioxygenases)是细菌在有氧环境下降解多环芳烃的关键酶,是由电子传递链和末端双加氧酶组成的多组分酶系,其中,末端双加氧酶由大  $\alpha$  亚基和小  $\beta$  亚基所组成,而 *nidA* 基因和 *nidB* 基因分别是编码末端双加氧酶的大  $\alpha$  亚基和小  $\beta$  亚基的基因<sup>[34-36]</sup>。本研究使用 Zhou 等所用 *nidA* 引物,成功扩增出玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的 *nidA* like 基因<sup>[27]</sup>。比对结果显示,玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的 *nidA* like 基因序列与微黄分枝杆菌(*Mycobacterium gilvum*)菌株 BB1 的 *nidA* 序列相似性为 93.13%。菌株 BB1 是由 Boldrin 等从原煤气化点的样品中分离而得,研究显示菌株 BB1 具有合成双加氧酶和降解菲、荧蒹等多环芳烃的能力<sup>[37]</sup>。玫瑰杆菌 SCSIO

43702 的 *nidA* like 基因的成功扩增,在分子生物学水平上证实了该菌株具有降解多环芳烃菲的潜力。

本研究分别设置了以温度、pH 和盐度为变量的培养实验,同时测量了玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在 216L 培养基和以 100 mg/L 菲为唯一碳源的 CFMM 培养基中的生长曲线,用于探究该菌株对初浓度 100 mg/L 菲的降解特性。生长曲线的结果显示,玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在以 100 mg/L 菲为唯一碳源的 CFMM 培养基(pH 为 7.0)中的生长速率明显低于其在 216L 培养基中的生长速率。同样地,在 Kafilzadeh 等的研究中,一株 *Bacillus cereus* 菌株 Z4B-11 能在培养 7 d 后对初浓度 500 mg/L 菲的降解率达到 50%,但当培养体系中的菲浓度提高到 800 mg/L 时,其生长繁殖受到了很大的抑制,培养 7 d 的培养液中  $OD_{600}$  值始终处于 0.2 以下<sup>[38]</sup>。虽然 100 mg/L 菲无法使玫瑰杆菌 SCSIO 43702 大量生长繁殖,但是后续以 pH 为变量的培养实验的结果表明,玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在 pH 为 7.0 的实验组中培养 120 h 和 240 h 后对 100 mg/L 菲的降解率达到了 78%和 82%。结合上述实验结果表明:虽然玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在含有 100 mg/L 菲的 CFMM 培养基(pH 为 7.0)中无法大量生长繁殖,但是其却能高效地降解培养体系中的菲,用以维持自身的生长繁殖活动。此外,有部分研究发现,菲通过微生物降解能够生成的一些降解产物如 2-羟基粘康酸半醛和  $\beta$ -胡萝卜素等使得培养液变为茶色或黄棕色<sup>[39-40]</sup>,但本次实验中,培养液的颜色并未发生变化,其原因可能是玫瑰杆菌 SCSIO 43702 对菲的降解途径中不产生能够使培养基变为茶色或黄棕色的降解产物。

在所有培养实验中,玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在培养 2 d 时对菲的降解率与同期对照组的降解率相近,显著性检测结果( $P>0.05$ )显示 2 d 的培养时间对玫瑰杆菌 SCSIO 43702 降解菲的能力不具有显著的影响。造成这个现象的原因可能是由于该菌株被接种于实验培养体系的 48 h 中,细菌的生长

繁殖状况和代谢活动水平仍处于适应期<sup>[41]</sup>, 还无法高效地降解菲, 因此导致培养 2 d 实验组中菲的降解率接近同期对照组的降解率。

以温度为变量的实验结果显示, 温度对于培养 5 d 和 10 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 降解菲的能力具有显著的影响。玫瑰杆菌 SCSIO 43702 高效降解菲的温度区间为 25–35 °C, 其中, 30 °C 为最佳降解温度(培养 10 d 的降解率为 78%)。在 Huang 等和 Xu 等的研究中, 一株 *Rhizobium* 属菌株 SL-1<sup>[42]</sup> 和 *Delftia* 属菌株 FM6-1、*Achromobacter* 属菌株 FM8-1<sup>[43]</sup> 都在 25–35 °C 的温度区间对菲具有更高的降解能力。同样地, 在 Lin 等分离得的 *Bacillus fusiformis* 也在上述温度区间对萘产生更高的降解效果<sup>[44]</sup>。Leahy 等报道中提出温度的升高能够提高多环芳烃的生物利用率和多环芳烃降解酶的酶活性, 从而提高菲的降解率<sup>[41]</sup>。相对地, 不同于嗜热细菌如 *Aeribacillus* 属菌株 SL-1<sup>[45]</sup> 和 *Geobacillus* 属菌株 A-2<sup>[46]</sup> 等在高温环境中对多环芳烃具有良好的菲降解能力, 本研究的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 作为嗜温细菌, 其在培养温度达到 40 °C 时对菲的降解率显著降低, 但仍具有一定的菲降解能力, 体现了该菌株对温度的变化具有一定的适应能力。

在以 pH 为变量的实验中观察到, pH 值会对培养 5 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的非降解能力产生显著性影响, 其中, 偏碱性实验组中菲降解率明显高于偏酸性实验组。同样地, Huang 等研究中的 *Rhizobium petrolearium* 菌株 SL-1<sup>[42]</sup>、Wang 等研究中的 *Diaphorobacter* 菌株 YM-6<sup>[47]</sup>、吴霜等研究中的 *Rhodococcus* 菌株 UMBR 0020<sup>[48]</sup> 和杜彦玲等研究中的 *Pseudomonas* 菌株 X20<sup>[49]</sup> 都在偏碱性培养条件下对菲具有更高的降解率。在 Wong 等<sup>[50]</sup> 的报道中, 菌株 BU-3 (*Burkholderia cocovenenans*) 在酸性培养条件(pH 值为 5.5)下对菲的降解率也明显低于其在中性培养条件下的降解率, 他们认为造成这个现象的原因可能是菲的降解产物(如邻苯二甲酸、原儿茶酸等)会降低培养体系中的 pH 值, 因

此菌株在酸性条件下对菲的降解能力会受到一定的影响。但是本研究的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在培养 10 d 后, pH 值对其降解菲的能力却不产生显著的影响, 而且所有实验组都具有良好的菲降解率, 这一现象表明了该菌株具有良好的对偏酸性培养环境的适应能力并能在 pH 值为 5.5–8.5 这一区间对菲进行高效的降解。

在以盐度为变量的实验中显示, 盐度对培养 5 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的非降解能力不具有显著的影响, 但是会对培养 10 d 的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 的非降解能力产生显著影响。同样地, Badejo 等发现, 一株分离于受工业污染的近河口地区沉积物的分枝杆菌属(*Mycobacterium*)菌株 PYR-GCK 和本研究的菌株相似, 都在盐度为 0–1 mol/L (约为 0–6%质量分数)范围内对多环芳烃萘具有良好的降解效率<sup>[51]</sup>。在 Huang 等<sup>[42]</sup>和 Xu 等<sup>[43]</sup>研究中, 从土壤样品中分离得到的 *Rhizobium* 菌株 SL-1 和 *Delftia* 菌株 FM6-1 都在盐度高于 4% 后对菲的降解能力显著下降。相对地, 本研究中分离于海洋环境的玫瑰杆菌 SCSIO 43702 在降解菲的过程中所表现出的嗜盐性, 使其具有在大多数陆地和海洋环境中对菲污染物进行微生物修复的潜力。

综上所述, 本研究从中国深圳市大亚湾的喜盐草(*Halophila ovalis*)沉积物中分离得到一株菲降解菌株 SCSIO 43702, 经形态学观察、生理生化实验和分子生物学的多相鉴定后, 鉴定该菌株为一株玫瑰杆菌(*Roseovarius*)属的潜在新菌, 并进一步扩增获得了双加氧酶 *nidA* like 基因, 在分子生物学水平上说明了该菌株具有降解多环芳烃菲的潜力。

本研究通过培养实验探究了玫瑰杆菌 SCSIO 43702 对菲的降解特性。实验结果显示, 该菌株高效降解初浓度 100 mg/L 菲的条件(培养 10 d 后的菲降解率高于 60%)为: 温度 25–35 °C, pH 值 5.5–8.5, 盐度 1%–6%; 其中, 最适降解温度为 30 °C、最适降解 pH 值为 7.5 和 8.0、最适降解盐度为 3%; 该菌株在 10 d 的培养实验中对菲的最高

降解率为 96%。培养实验的结果表明了玫瑰杆菌 SCSIO 43702 有着高效的非降解能力和较强的环境适应能力, 具有进一步开发为用于多环芳烃污染修复的微生物菌剂的潜力, 为海草床生态系统中多环芳烃污染的微生物修复提供了理论依据和可利用的微生物资源。

## REFERENCES

- [1] Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment[J]. *Environmental Science & Technology*, 1992, 26(7): 1278-1284
- [2] Liu LY, Wang JZ, Wei GL, Guan YF, Zeng EY. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in continental shelf sediment of China: implications for anthropogenic influences on coastal marine environment[J]. *Environmental Pollution*, 2012, 167: 155-162
- [3] Guy H. The microbial role in carbon cycling within seagrass sediments[J]. *The Plymouth Student Scientist*, 2010, 3(1): 234-244
- [4] Waycott M, Duarte CM, Carruthers TJB, Orth RJ, Dennison WC, Olyarnik S, Calladine A, Fourqurean JW, Heck Jr KL, Hughes AR, et al. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(30): 12377-12381
- [5] Ling J, Jiang YF, Wang YS, Dong JD, Zhang YY, Zhang YZ. Responses of bacterial communities in seagrass sediments to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress[J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(7/8): 1517-1528
- [6] Ren LS, Huang XD, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM. Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (fluoranthene, *Pyrene*, and naphthalene) to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1994, 28(2): 160-171
- [7] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169(1/2/3): 1-15
- [8] Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 223: 277-286
- [9] Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. Corrigendum: current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1369
- [10] Duran R, Cravo-Laureau C. Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(6): 814-830
- [11] Liu SH, Zeng GM, Niu QY, Liu Y, Zhou L, Jiang LH, Tan XF, Xu P, Zhang C, Cheng M. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: a mini review[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 25-33
- [12] Tian Y, Zheng TL, Hu Z. Advances on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine environment[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2003, 9(4): 439-443 (in Chinese)  
田蕴, 郑天凌, 胡忠. 海洋环境中多环芳烃的微生物降解研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(4): 439-443
- [13] Xue JL, Yu Y, Bai Y, Wang LP, Wu YN. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review[J]. *Current Microbiology*, 2015, 71(2): 220-228
- [14] Huesemann MH, Hausmann TS, Fortman TJ, Thom RM, Cullinan V. *In situ* phytoremediation of PAH-and PCB-contaminated marine sediments with eelgrass (*Zostera marina*)[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(10): 1395-1404
- [15] Macinnis-Ng CMO, Ralph PJ. *In situ* impact of petrochemicals on the photosynthesis of the seagrass *Zostera capricorni*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(11): 1395-1407
- [16] Ralph PJ, Burchett MD. Impact of petrochemicals on the photosynthesis of *Halophila ovalis* using chlorophyll fluorescence[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1998, 36(6): 429-436
- [17] Santos HF, Carmo FL, Paes JES, Rosado AS, Peixoto RS. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2011, 216(1/2/3/4): 329-350
- [18] Bayen S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: a review[J]. *Environment International*, 2012, 48: 84-101
- [19] Aziz A, Agamuthu P, Alaribe FO, Fauziah SH. Biodegradation of benzo[a]Pyrene by bacterial consortium isolated from mangrove sediment[J]. *Environmental Technology*, 2018, 39(4): 527-535
- [20] Yuan J, Lai QL, Sun FQ, Zheng TL, Shao ZZ. The diversity of PAH-degrading bacteria in a deep-sea water column above the Southwest Indian Ridge[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 853
- [21] Wanapaisan P, Laothamteep N, Vejarano F, Chakraborty J, Shintani M, Muangchinda C, Morita T, Suzuki-Minakuchi C, Inoue K, Nojiri H, et al. Synergistic degradation of *Pyrene* by five culturable bacteria in a mangrove sediment-derived bacterial consortium[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 342: 561-570
- [22] Ahmad M, Yang QS, Zhang YY, Ling J, Sajjad W, Qi SH, Zhou WG, Zhang Y, Lin XC, Zhang YH, et al. The distinct response of phenanthrene enriched bacterial consortia to different PAHs and their degradation potential: a mangrove sediment microcosm study[J]. *Journal of Hazardous Materials*,

- 2019, 380: 120863
- [23] Shen P. Microbiology Experiment[M]. 3 ed. Beijing: Higher Education Press, 1999 (in Chinese)  
沈萍. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [24] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [25] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703
- [26] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [27] Zhou HW, Guo CL, Wong YS, Tam NFY. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 262(2): 148-157
- [28] Jia XM, Kim HR, Jia BL, Jeon HH, Baek K, Choi SH, Jeon CO. *Roseovarius confluentis* sp. nov., isolated from estuary sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(2): 346-351
- [29] Min H. Microbiology[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011 (in Chinese)  
闵航. 微生物学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011
- [30] Vila J, Nieto JM, Mertens J, Springael D, Grifoll M. Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 73(2): 349-362
- [31] McKew BA, Coulon F, Osborn AM, Timmis KN, McGenity TJ. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(1): 165-176
- [32] Lai QL, Yuan J, Wu CL, Shao ZZ. *Oceanibaculum indicum* gen. nov., sp. nov., isolated from deep seawater of the Indian Ocean[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1733-1737
- [33] Gutierrez T, Whitman WB, Huntemann M, Copeland A, Chen A, Vargese N, Kyrpides NC, Pillay M, Ivanova N, Mikhailova N, et al. Genome sequence of *Roseovarius* sp. strain MCTG156(2b) isolated from a phytoplankton net trawl on the Scottish west Coast[J]. Genome Announcements, 2017, 5(35): e00837-e00817
- [34] Brezna B, Khan AA, Cerniglia CE. Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp.[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223(2): 177-183
- [35] Mason JR, Cammack R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases[J]. Annual Review of Microbiology, 1992, 46(1): 277-305
- [36] Khan AA, Wang RF, Cao WW, Doerge DR, Wennerstrom D, Cerniglia CE. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3577-3585
- [37] Boldrin B, Tiehm A, Fritzsche C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and Pyrene by a *Mycobacterium* sp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1927-1930
- [38] Kafilzadeh F, Khosrobak A, Jamali H. Isolation and identification of phenanthrene degrading bacteria from the soil around oil company of andimeshk and investigation of their growth kinetics[J]. Polycyclic Aromatic Compounds, 2016, 36(1): 58-71
- [39] Zhong L, Zhou LX, Wang SM. Isolation and identification of phenanthrene degrading bacteria and their roles in bioremediation of phenanthrene-contaminated soil[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(3): 465-470 (in Chinese)  
钟磊, 周立祥, 王世梅. 菲降解菌的分离鉴定及其在污染土壤生物修复中的应用[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(3): 465-470
- [40] Zhang Q, Bai HJ, Sun HM, Ren XB. Isolation and identification of an efficient phenanthrene-degrading strain and removal characteristics[J]. Applied Chemical Industry, 2020, 49(7): 1720-1726 (in Chinese)  
张晴, 白红娟, 孙慧敏, 任晓斌. 一株菲高效降解菌的分离鉴定及去除特性[J]. 应用化工, 2020, 49(7): 1720-1726
- [41] Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment[J]. Microbiological Reviews, 1990, 54(3): 305-315
- [42] Huang X, Shi J, Cui C, Yin H, Zhang R, Ma X, Zhang X. Biodegradation of phenanthrene by *Rhizobium petrolearium* SL-1[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(6): 1616-1626
- [43] Xu XJ, Liu WM, Wang W, Tian SH, Jiang P, Qi QG, Li FJ, Li HY, Wang QY, Li H, et al. Potential biodegradation of phenanthrene by isolated halotolerant bacterial strains from petroleum oil polluted soil in Yellow River Delta[J]. Science of the Total Environment, 2019, 664: 1030-1038
- [44] Lin C, Gan L, Chen ZL. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN)[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 182(1/2/3): 771-777
- [45] Tao WY, Lin JZ, Wang WD, Huang H, Li S. Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons by the thermophilic bioemulsifier-producing *Aeribacillus pallidus* strain SL-1[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 189: 109994

- [46] Zhou JF, Gao PK, Dai XH, Cui XY, Tian HM, Xie JJ, Li GQ, Ma T. Heavy hydrocarbon degradation of crude oil by a novel thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain A-2[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 126: 224-230
- [47] Wang P, Zhang YM, Jin J, Wang TH, Wang J, Jiang BY. A high-efficiency phenanthrene-degrading *Diaphorobacter* sp. isolated from PAH-contaminated river sediment[J]. Science of the Total Environment, 2020, 746: 140455
- [48] Wu S, Liu C, Yang LF, Long H, Xuan JC, Jiang MG. Screening, identification and degradation characteristics of three phenanthrene-degrading bacteria isolated from mangrove soil[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 42(3): 73-79 (in Chinese)  
吴霜, 刘聪, 杨立芳, 龙寒, 谟金彩, 姜明国. 3 株红树林土壤来源非降解菌的鉴定及其降解特性[J]. 环境科学与技术, 2019, 42(3): 73-79
- [49] Du YL, Tai PD, Shi QF, Li PJ. Identification and degrading characteristics of PAHs-degrading bacterial strain X20[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(6): 1208-1212 (in Chinese)  
杜彦玲, 台培东, 施秋峰, 李培军. 多环芳烃降解菌 X20 的鉴定及降解特性[J]. 生态学杂志, 2010, 29(6): 1208-1212
- [50] Wong JWC, Lai KM, Wan CK, Ma KK, Fang M. Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation[J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2002, 139(1/2/3/4): 1-13
- [51] Badejo AC, Badejo AO, Shin KH, Chai YG. A gene expression study of the activities of aromatic ring-cleavage dioxygenases in *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK to changes in salinity and pH during Pyrene degradation[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e58066

**编辑部公告****邀请您关注《微生物学通报》公众微信号**

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

**关注办法:**

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

