

一株原油降解菌的分离鉴定及降解特性研究

信艳娟 刘亚男 吴佩春 曹旭鹏 薛松*

(中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组 辽宁 大连 116023)

摘要: 【目的】对从大连湾原油污染海域生长的海绵中分离的原油降解菌 2-9 进行鉴定及降解特性研究。【方法】采用 16S rRNA 基因序列同源性分析、生理生化指标测定、DNA G+C 含量测定、全细胞脂肪酸组成测定、碳源利用实验等多种方法对该菌株进行鉴定, 并通过降解实验测定其对原油的降解情况。【结果】菌株 2-9 鉴定为 *Nitratireductor basaltis*, 革兰氏阴性, 接触酶和氧化酶阳性。在 GenBank 中与其 16S rRNA 基因序列相似度最高的模式株为 *Nitratireductor basaltis* J3^T, 相似性为 99%。可生长的 pH 范围为 6.0–10.0, 最适生长 pH 值为 8.0; 可生长温度范围为 15 °C–42 °C, 最适生长温度为 30 °C; NaCl 浓度生长范围是 0–8% (W/V), 最适生长盐度为 2%。该菌株可以利用多种糖和有机酸的碳源, 其 DNA G+C 含量为 57.29 mol%, 主要脂肪酸组成为 ω 7c-十八碳单不饱和脂肪酸(63.61%)、 ω 8c 型环式十九碳饱和脂肪酸(16.97%)、饱和十八碳脂肪酸(4.28%)和十六碳饱和脂肪酸(3.39%)。同时, 考察了该菌株对原油的降解效果, 在人工海水培养基中, 14 d 内对原油(初始浓度为 1 g/L)的平均降解率为 63.5%。【结论】菌株 2-9 是一株具有开发潜力的原油降解菌。

关键词: 原油, 海绵, 鉴定, 生物降解

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31100092)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-411-84379069; ✉: xuesong@dicp.ac.cn

收稿日期: 2012-05-24; 接受日期: 2012-08-15

Studies on isolation, identification of crude oil degrading bacteria and its degradation capability

XIN Yan-Juan LIU Ya-Nan WU Pei-Chun CAO Xu-Peng XUE Song*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: [Objective] To identify and characterize a crude oil degrading bacteria 2-9 isolated from a crude oil contaminated marine sponge from Dalian Bay, China. [Methods] According to the 16S rRNA genes sequences analysis, physiological and biochemical characterizations, DNA G+C content assaying, determination of cellular fatty acids and testing of carbon sources. Its capability of degrading crude oil was further determined. [Results] The strain 2-9 was identified as *Nitratireductor basaltis*. Cells are Gram-negative with catalase-positive and oxidase-positive. The similarity between its 16S rRNA gene and that of its most closely related type strain in GenBank *Nitratireductor basaltis* J3^T was 99%. Growth of strain 2-9 occurred with 0–8% (W/V) NaCl (optimum 2%); strain 2-9 grew at 15 °C–42 °C (optimal 30 °C) and at pH 6.0–10.0 (optimum pH 8.0). It metabolized many carbohydrates and organic acids; the G+C content of its genomic DNA was 57.29 mol%. The major fatty acids were C18:1 ω 7c (63.61%), C19:0 cyclo ω 8c (16.97%), C18:0 (4.28%) and C16:0 (3.39%). When the initial concentration of crude oil was 1 g/L, the strain 2-9 could consume 63.5% of the crude oil in 14 days. [Conclusion] The strain 2-9 was a crude oil degrading bacteria, holding the potential of being applied in the bioremediation of oil spill.

Keywords: Crude oil, Marine sponge, Identification, Biodegradation

随着石油工业的迅速发展,人们越来越多地涉及海上石油开发,因此,井喷、运输船舶的石油泄漏、撞船、沉船以及输油管道的泄漏等事故,造成的海上溢油事故也时有发生,严重污染了海洋环境,给海洋的生态平衡带来了极大危害。因此,需要采取及时有效的措施对石油污染进行迅速处理。而目前公认的处理海洋石油污染最环保的方法就是利用微生物降解石油^[1-4]。石油降解菌的研究目前已经从近海环境扩展到大洋、极地等环境^[5-7],这些降解菌主要是从海水、海泥样品中分离获得,而从石油污染后引发一系列变化的生物体内筛选降解菌的研究并不多见。

海绵作为滤食性的低等海洋动物,体内共生着丰富的微生物菌群,菌群的多样性与海绵种属及其生存环境密切相关。同时海绵生存环境的变化,将会导致其共生微生物多样性的变化。海绵微生物和海绵互利共生,不仅能为海绵提供营养物质和能量^[8],还可通过生产和释放一些具有生物活性的化合物,参与海绵对抗化学污染的生物防御系统,其中一个重要的功能是降解污染^[9]。

本研究从大连原油污染海域生长的海绵中分离到一株原油降解菌 2-9,根据 16S rRNA 基因序列同源性分析、生理生化指标测定、DNA G+C 含量测定、全细胞脂肪酸组成测定、碳源利用实

验等多种方法对其进行了分类学鉴定,并初步研究该菌株对原油的降解效果,为将该菌应用于海洋石油污染的生物修复提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 降解菌的筛选

分离培养基: (1) 人工海水培养基(ASM, g/L): 参照文献[10], 修饰后培养基中 NaCl 含量为 30.0, 原油含量为 1.0, pH 7.2; (2) 固体平板分离培养基(ASM1, g/L): 上述人工海水培养基加琼脂 18.0; (3) 固体平板纯化培养基: 2216E (Difco)。

将采自大连湾石油污染海域海绵样品, 用无菌手术刀切成小块, 在烧杯中用无菌海水将样品洗涤 3 次, 以除去样品表面附着的微生物和其它杂质; 在无菌研钵中研磨 5 min, 使之成匀浆状; 取 5 mL, 加入到灭菌的含 100 mL/500 mL 人工海水培养基 ASM 的摇瓶中, 以原油(浓度 1 g/L)为唯一碳源和能源进行富集培养, 置于 28 °C、200 r/min 摇床中培养, 3 d 后观察培养液的浑浊程度, 7 d 为一个周期, 取 5 mL 的富集培养液转入新鲜的人工海水培养基中, 共转接 3 次。将最终的富集物梯度稀释, 涂布固体平板分离培养基 ASM1 上, 以不加原油的人工海水培养基为空白对照平板, 28 °C 培养 7-10 d, 挑取单菌落于 2216E 纯化平板, 多次划线分离单菌, 得到纯培养。挑取纯化后的单菌落接种在装有液体培养基的 2216E 试管中, 将试管置于 200 r/min 振荡培养箱中, 28 °C 振荡培养 72 h 左右, 取 200 μ L 菌液加入装有 1.8 mL 20% 甘油水溶液的冻存管中, -70 °C 保存备用。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 菌株生理生化特征: 菌株的碳源利用、DNA G+C 含量测定、全细胞脂肪酸组成分析及生理生化特征由中国科学院微生物研究所菌种

鉴定中心代为检测。

1.2.2 菌株培养特征分析: 通过 3 组实验分析菌株 2-9 在不同温度(4 °C、15 °C、25 °C、30 °C、37 °C、42 °C、45 °C)、不同 NaCl 浓度(0、2%、4%、6%、8%、10%)和培养基不同初始 pH 值(4、5、6、7、8、9、10)条件下的培养特征。

1.2.3 菌株基因组 DNA 提取: 将纯化菌株在 TSB 培养基上进行试管规模培养 3 d 左右, 采用改良细菌基因组 DNA 提取方法提取菌株基因组 DNA^[11]。

1.2.4 16S rRNA 的 PCR 扩增: 根据细菌 16S rRNA 保守序列^[12-13], 合成引物: F8 (5'-GAGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3')和 R1492 (5'-CGGCT ACCTTGTTACGAC-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 25 μ L 2 \times (G+C)缓冲液(Mg²⁺ plus), 8 μ L dNTPs 混合物(2.5 μ mol/L), 1 μ L 引物 F8 和 R1492 (20 μ mol/L), 2 μ L 模板 DNA, 0.5 μ L *LA Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)和 13.5 μ L 的纯水。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.5 DNA 序列测定和系统发生学分析: 16S rRNA 扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后进行测序分析。测序结果与 NCBI 的 GenBank 进行 BLAST 比对, 用序列分析软件 Phytit 构建系统发育树^[14]。

1.3 降解特性研究

将菌株 2-9 在 2216E 液体培养基中活化至对数生长期(OD_{600} 约为 0.6), 以 5% 的接种量转接到 100 mL ASM 液体培养基中(原油含量 1 g/L), 置于 30 °C、200 r/min 摇床培养 14 d。同时设不加菌及不加碳源两组阴性对照, 设 3 次重复实验。用等体积的二氯甲烷和正己烷(1:1, V/V)萃取降解后培养基中残留的油污, 从有机相准确量取 2 mL 溶液, 先用无水 Na₂SO₄ 脱水, 再用 0.22 μ m 耐有机溶剂滤膜过滤, 用氮气吹干, 然后以 1 mL 正己烷重新溶解, 移入 GC 样品瓶中, 用

GC-FID、GC-MS 对原油降解后残留的烷烃组分进行分析测定。另外, 从有机相吸取 50 mL 溶液, 用于重量法计算降解率。

原油组分的 GC-FID、GC-MS 分析, 色谱柱为 DB-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 石英毛细管柱; 检测器温度为 300 °C; 升温程序: 100 °C 恒温 2 min, 以升温速率为 4 °C/min 升温到 300 °C, 然后再恒温 20 min; 载气(N₂)流量为 1 mL/min; 进样口温度为 280 °C; 进样量为 1 μL; 分流比为 1:1 (V/V)。

2 结果

2.1 菌株 2-9 的鉴定

2.1.1 生化特征: 菌株 2-9 为革兰氏阴性细菌, 接触酶和氧化酶阳性, β-半乳糖苷酶、精氨酸双水解酶阳性, 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、脲酶和色氨酸脱氨酶阴性, 吡啶产生阴性, V-P 反应阳性, 柠檬酸盐利用阳性, 七叶灵水解阴性, 硝酸盐还原阳性。

2.1.2 培养特征: 菌株 2-9 的生长温度范围在 15 °C–42 °C, 其中以 30 °C 为最适生长温度; 菌株 2-9 可生长的 pH 范围为 6.0–10.0, 最适生长 pH 值为 8.0; 菌株 2-9 在 NaCl 浓度范围为 0–8% (W/V) 时可生长, 最适生长盐度为 2%。

2.1.3 细胞脂肪酸组成: 主要脂肪酸组成为 ω7c-

十八碳单不饱和脂肪酸(63.61%)、ω8c 型环式十九碳饱和脂肪酸(16.97%)、饱和十八碳脂肪酸(4.28%)、十六碳饱和脂肪酸(3.39%)、十七碳饱和脂肪酸(3.17%)、异式十七碳饱和脂肪酸(2.51%)、ω7c-十六碳单不饱和脂肪酸/ω6c-十六碳单不饱和脂肪酸(1.53%)、3-羟基异式十五碳饱和脂肪酸(1.43%)、ω8c-十七碳单不饱和脂肪酸(1.31%)。菌株 2-9 与最近模式菌株的主要脂肪酸组成比较见表 1。

2.1.4 DNA G+C 含量: 采用 HPLC 外标法, 根据公式计算得到该菌的基因组 DNA G+C 含量为 57.29 mol%。

2.1.5 Biolog 板碳源利用结果: 通过 Biolog 微生物自动鉴定系统得到其对 95 种碳源的利用结果。结果显示, 该菌可以利用 L-阿拉伯糖、D-果糖、D-半乳糖、β-羟基丁酸、γ-羟基丁酸、D,L-乳酸、琥珀酰胺酸等多种糖类和有机酸类的碳源, 还可以利用 L-谷氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸等几种氨基酸(表 2)。

2.1.6 分子鉴定结果: 对菌株 2-9 的 16S rRNA 序列(1 424 bp)进行测序, 并同 GenBank 中 16S rRNA 序列进行比对, 与其 16S rRNA 基因序列相似度最高的模式株为 *Nitratireductor basaltis* J3^T, 相似性达到 99%。采用 ClustalX 1.81 软件, 用 N-J

表 1 菌株 2-9 和 J3、NL21 的主要脂肪酸组成比较
Table 1 Comparison of the predominant fatty acid of strain 2-9, J3 and NL21

Fatty acid	<i>N. basaltis</i> 2-9	<i>N. basaltis</i> J3 ^T	<i>N. aquibiodomus</i> NL21 ^T
C16:0	3.39	2.48	2.16
C17:0	3.17	0.88	1.72
C18:0	4.28	3.95	4.23
C16:1ω7c/16:1ω6c	1.53	–	–
C15:0 iso 3OH	1.43	0.31	1.86
C17:0 iso	2.51	2.86	3.25
C17:1ω8c	1.31	0.37	0.59
C18:1ω7c	63.61	81.93	76.47
C19:0 cycloω8c	16.97	4.25	12.14

表 2 菌株 2-9 对 95 种碳源的利用结果
Table 2 Utilization of different carbon source on GN2 plates by strain 2-9

Carbon sources	Results	Carbon sources	Results	Carbon sources	Results
Water	-	β -Methyl-D-glucoside	-	p-Hydroxy phenylacetic acid	-
Dextrin	-	D-psicose	-	Itaconic acid	-
Glycogen	-	D-raffinose	-	α -Keto butyric acid	-
Tween 40	-	L-rhamnose	-	α -Keto glutaric acid	-
Tween 80	-	D-sorbitol	-	α -Keto valeric acid	-
N-acetyl-D-galactosamine	-	Sucrose	-	D,L-lactic acid	+
N-acetyl-D-glucosamine	-	D-trehalose	-	Malonic acid	-
Adonitol	-	Turanose	-	Propionic acid	-
L-arabinose	+	Xylitol	-	Quinic acid	-
D-arabitol	-	Methyl pyruvate	-	D-saccharic acid	-
D-cellobiose	-	Mono-methyl-succinate	+	Sebacic acid	-
i-erythritol	-	Acetic acid	-	Succinic acid	-
D-fructose	+	Cis-aconitic acid	-	Bromo succinic acid	-
L-fucose	-	Citric acid	-	Succinamic acid	+
D-galactose	+	Formic acid	-	Glucuronamide	-
Gentiobiose	-	D-galactonic acid lactone	-	L-alaninamide	+
α -D-glucose	-	D-galacturonic acid	-	D-alanine	+
m-inositol	-	D-gluconic acid	-	L-alanine	+
α -D-lactose	-	D-glucosaminic acid	-	L-alanyl-glycine	-
Lactulose	-	D-glucuronic acid	-	L-asparagine	-
Maltose	-	α -Hydroxy butyric acid	-	L-aspartic acid	-
D-mannitol	-	β -Hydroxy butyric acid	+	L-glutamic acid	+
D-mannose	-	γ -Hydroxy butyric acid	+	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-melibiose	-	α -Cyclodextrin	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
L-histidine	-	L-threonine	-	Putrescine	-
Hydroxy-L-proline	-	D,L-carnitine	-	2-Aminoethanol	-
L-leucine	-	γ -Amino butyric acid	-	2,3-Butanediol	-
L-ornithine	-	Urocanic acid	-	Glycerol	-
L-phenylalanine	-	Inosine	-	D,L- α -glycerol phosphate	-
L-proline	+	Uridine	+	Glucose-1-phosphate	-
L-pyroglutamic acid	-	Thymidine	-	Glucose-6-phosphate	-
D-serine	-	Phenylethylamine	-	L-serine	+

法建立菌株 2-9 与模式种的 16S rRNA 系统进化树。如图 1 所示, 菌株 2-9 与 *Nitratireductor basaltis* J3^T 处于同一分支, 100% 的自展值说明了这

一亚支的稳定性。结合生理生化指标、全细胞脂肪酸分析和培养特征, 可以鉴定菌株 2-9 与 *Nitratireductor basaltis* J3^T 为同一菌种。

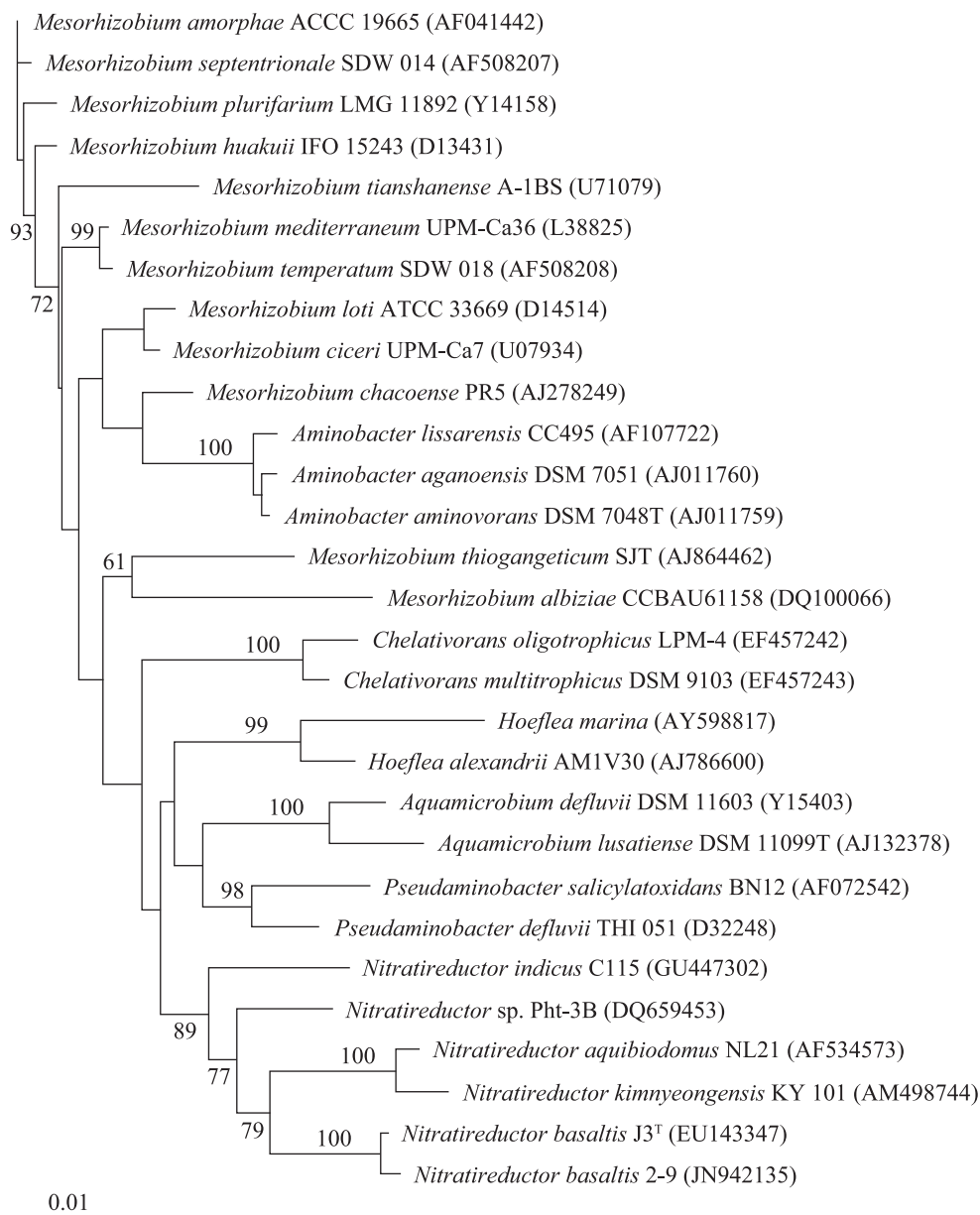


图 1 菌株 2-9 16S rRNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 1 Neighbor-Joining tree of strain 2-9 based on 16S rRNA gene sequences

注: 基于 16S rRNA 全长序列的系统发育树构建; 括号中编号是菌株在 GenBank 中的序列号; 自展值计算用 N-J 法经过 1 000 次重排, 计算值在 50% 以上的标记在相应的分支点上; 分支点上的数值代表自展值百分比; 标尺代表 0.01 核苷酸距离。

Note: The phylogenetic tree was constructed based on nearly full length 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values calculated from 1 000 resamplings using Neighbor-Joining are shown at the respective nodes when the calculated values were 50% or greater. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Scale bar equals approximately 1% nucleotide divergence.

2.2 原油降解实验结果

对菌株 2-9 的原油降解能力进行了测定, 发现该菌株能够以原油为唯一碳源生长。采用重量法测定生物降解后培养基中残留石油的重量, 并计算降解率。结果表明, 菌株 2-9 对原油的降解率为 63.5%。经过 14 d 摇床培养, 与阴性对照相

比, 菌株 2-9 对石油中的烷烃组分都有不同程度的降解(图 2)。通过 GC-MS 分析, 菌株 2-9 对石油中不同长度的烷烃降解率如图 3 所示, 结果表明, 菌株对长链烷烃(C23-C26)降解率达 50%以上。但尚未发现有降解支链烷烃或者多环芳烃(PAH)的能力。

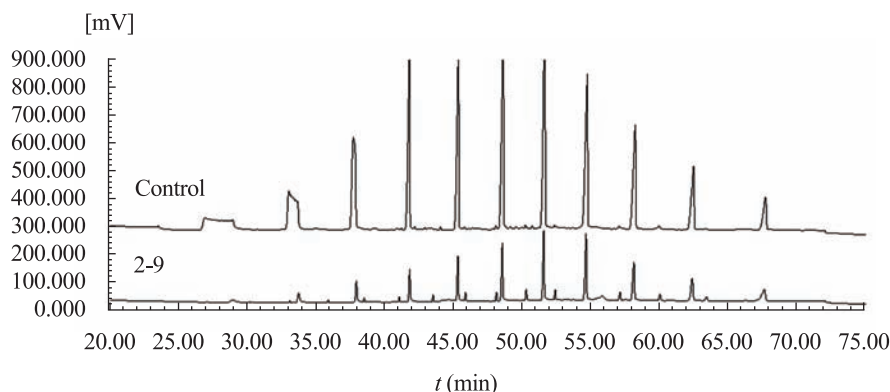


图 2 菌株 2-9 降解前后原油中烷烃组分气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatogram showing the biodegradation of the alkane fraction

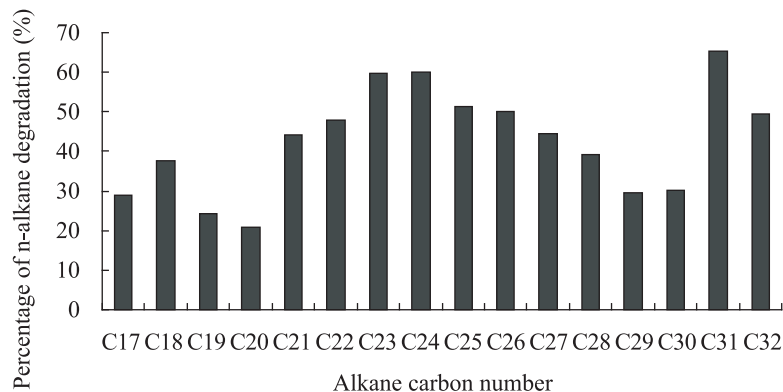


图 3 菌株 2-9 对原油中各不同链长烷烃的降解率

Fig. 3 Percentage of n-alkane degradation in crude oil by the strain 2-9

3 讨论

Nitrireductor 是 Labbé 等在 2004 年提出的新菌属, 属于叶杆菌科(Phyllobacteriaceae), 到目前为止仅包括 6 株模式菌种: *Nitrireductor aquibiodomus*^[15]、*Nitrireductor kimnyeongensis*^[16]、*Nitrireductor basaltis*^[17]、*Nitrireductor*

indicus^[18]、*Nitrireductor pacificus*^[19] 和 *Nitrireductor aquimarinus*^[20], 它们全都分离自海洋环境。本研究从大连湾原油污染海域生长的海绵中分离到一株原油降解菌 2-9, 根据其生理生化特征、全细胞脂肪酸分析、DNA G+C 含量测定和 16S rRNA 基因序列数据综合分析, 鉴定为 *Nitrireductor basaltis*, 与分离自韩国济州岛

黑沙海滩的 *Nitratireductor basaltis* J3 (KCTC22119^T)^[17]属于同一菌种。将菌株 2-9 与最近模式菌株的主要脂肪酸组成进行比较发现(表1), 该类菌属最明显的特征是不饱和脂肪酸 C18:1 ω 7c 占总脂肪酸 60%以上, 这是该类菌属的一个明显特征, 可以为该类菌株的鉴定提供非常有价值的参考信息。

Biolog 微生物自动鉴定系统数据库中的标准菌种信息主要是来自于陆源微生物, 本研究中海洋来源的细菌在生理生化特征上与之有明显差异, 较难获得匹配度较高的鉴定结果。通过 Biolog 碳源利用实验, 一方面可以快速得到某些重要的海洋菌种资源的生长碳源结果, 另一方面还可以扩充该鉴定系统的数据库。

菌株 2-9 可生长的 NaCl 浓度范围为 0–8% (W/V), 最适生长盐度为 2%, 这一培养特征与已发表的该属模式菌种相似, 如菌株 *N. aquibiodomus* NL21T^[15]可生长的 NaCl 浓度范围为 0–5% (W/V), 最适生长盐度为 1%; 菌株 *N. indicus* C115T^[18]和 *N. pacificus* pht-3BT^[19]可生长的 NaCl 浓度范围为 0–7% (W/V), 最适生长盐度为 3%。虽然这一种属的菌株在无 NaCl 存在的条件下也能生长, 但它们的最适生长盐度为 1%–3%, 这一特征说明该种属的菌株可能属于海洋细菌, 已适应于海洋高盐环境的生长特点。

菌株 2-9 分离自原油污染海域生长的海绵样品, 经初步的降解实验表明, 其对原油的降解率为 63.5%, 尤其是对原油中长链烷烃的降解有明显的优势。到目前为止尚未见到该菌属对原油降解的报导。虽然菌株 *N. indicus* C115T^[18]和 *N. pacificus* pht-3BT^[19]分别分离自印度洋深海富集培养的原油降解菌群和太平洋深海沉淀富集培养的萘降解菌群, 但是作者只对它们的分类地位进行了研究, 其降解特性尚未见相关报道。综上所述, 本文对从原油污染的海绵样品中分离的

菌株 2-9 进行了分类鉴定和降解活性研究, 结果表明, 菌株 2-9 的海洋来源特点和最适生长需要 NaCl 的存在, 以及对原油的降解能力, 为该菌种在海洋溢油污染的生物修复中有较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Swannell RP, Lee K, McDonagh M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(2): 342–365.
- [2] Head IM, Swannell RPJ. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(3): 234–239.
- [3] Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1990, 54(3): 305–315.
- [4] Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2000, 45(1/2): 57–88.
- [5] Gentile G, Giuliano L, D'Auria G, et al. Study of bacterial communities in Antarctic coastal waters by a combination of 16S rRNA and 16S rDNA sequencing[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(12): 2150–2161.
- [6] Judson RS, Martin MT, Reif DM, et al. Analysis of eight oil spill dispersants using rapid, *in vitro* tests for endocrine and other biological activity[J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(15): 5979–5985.
- [7] Camilli R, Reddy CM, Yoerger DR, et al. Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at deepwater horizon[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 201–204.
- [8] Wilkinson CR, Fay P. Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria[J]. *Nature*, 1979, 279(5713): 527–529.
- [9] Unson MD, Holland ND, Faulkner DJ. A

- brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue[J]. *Marine Biology*, 1994, 199(1): 1–11.
- [10] Liu CL, Shao ZZ. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1181–1186.
- [11] Lee YK, Kim HW, Liu CL, et al. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(2): 245–250.
- [12] Weisberg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *The Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [13] Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, et al. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3417–3418.
- [14] 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.
- [15] Labbé N, Parent S, Villemur R. *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(1): 269–273.
- [16] Kang HS, Yang HL, Lee SD. *Nitratireductor kimnyeongensis* sp. nov., isolated from seaweed[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(5): 1036–1039.
- [17] Kim KH, Roh SW, Chang HW, et al. *Nitratireductor basaltis* sp. nov., isolated from black beach sand[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(1): 135–138.
- [18] Lai QL, Yu ZW, Yuan J, et al. *Nitratireductor indicus* sp. nov., isolated from deep-sea water[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011a, 61(2): 295–298.
- [19] Lai QL, Yu ZW, Wang JN, et al. *Nitratireductor pacificus* sp. nov., isolated from a pyrene-degrading consortium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011b, 61(6): 1386–1391.
- [20] Jang G II, Hwang CY, Cho BC. *Nitratireductor aquimarinus* sp. nov., isolated from a culture of the diatom *Skeletonema costatum*, and emended description of the genus *Nitratireductor*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(11): 2676–2681.