



红树林沉积物中多环芳烃降解菌 *Aquabacter sediminis* P-9^T 的分离、鉴定及降解机制的研究

李嘉谊^{1,2}, 黄雨晗^{1,2,3}, 刘力睿^{1,2}, 李猛^{1,2*}

1 深圳大学高等研究院 古菌生物学研究中心, 广东 深圳 518060

2 深圳大学高等研究院 深圳市海洋微生物组工程重点实验室, 广东 深圳 518060

3 深圳大学生命与海洋学院, 广东 深圳 518060

李嘉谊, 黄雨晗, 刘力睿, 李猛. 红树林沉积物中多环芳烃降解菌 *Aquabacter sediminis* P-9^T 的分离、鉴定及降解机制的研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 2115-2132.

LI Jiayi, HUANG Yuhang, LIU Lirui, LI Meng. Isolation, identification, and mechanism of the polycyclic aromatic hydrocarbons degrader *Aquabacter sediminis* P-9^T in mangrove sediment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 2115-2132.

摘要: 多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类具有致畸、致癌和致突变特性的高风险有毒污染物, 近年来, 关于红树林生态系统受到 PAHs 污染的报道引起广泛关注, 微生物降解被认为是处理 PAHs 污染的有效、经济和多功能替代方法。目前, 研究者发现了大量细菌利用 PAHs 污染作为碳源和能源, 然而其普遍存在降解效率偏低、降解谱系窄、对高盐环境适应性差等问题, 红树林来源的 PAHs 降解菌的降解机理尚待充分挖掘。【目的】在红树林沉积物中定向筛选针对 PAHs 的高效广谱降解菌, 并深入探讨其降解效能与作用机制, 以为红树林生态系统中微生物污染修复技术的创新研发提供坚实的科学基础。【方法】从深圳福田红树林沉积物筛选出一株降解 PAHs 的潜在新菌株 P-9^T, 通过形态学观察、生理生化特性检测和 16S rRNA 基因序列分析, 对该菌株进行鉴定; 基于菌株基因组测序与分析预测该菌株的 PAHs 代谢潜能; 在不同温度(25–40 °C)、不同 pH (5.0–9.0)和不同底物条件下, 对菌株 P-9^T 的降解能力进行测定; 利用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-ESI-MS/MS)技术检测菌株降解 PAHs 的中间代谢产物, 初步揭示 P-9^T 降解 PAHs 的代谢机制。【结果】菌株 P-9^T 为黄色杆菌科(Xanthobacteraceae)水杆菌属(*Aquabacter*)的潜在新种, 暂命名为 *Aquabacter sediminis* P-9^T, 也是 *Aquabacter* 属中首次发现的

资助项目: 深圳市科技研发资金基础研究重点项目(JCYJ20200109105010363); 广东省基础与应用基础研究重大项目(2023B0303000017); 国家科技基础资源调查计划(2019FY100700)

This work was supported by the Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20200109105010363), the Guangdong Major Project of Basic and Applied Basic Research (2023B0303000017), and the National Science and Technology Fundamental Resources Investigation Program of China (2019FY100700).

*Corresponding author. E-mail: limeng848@szu.edu.cn

Received: 2024-03-22; Accepted: 2024-05-21; Published online: 2024-05-23

PAHs 降解菌种; 在菌株 *A. sediminis* P-9^T 的基因组中则发现了一条完整的苯甲酸盐降解通路, 以及参与萘和其他 PAHs 降解的脱氢酶、水杨酸羟化酶和细胞色素 P450 等关键基因。菌株 P-9^T 可以在 25–40 °C 和 pH 5.0–8.0 的条件下降解菲, 并且可分别以萘、菲、芘为唯一碳源生长繁殖。在菲初始浓度为 50 mg/L 下培养 5 d 降解率达 100%。利用 HPLC-ESI-MS/MS 技术检测发现, 该菌株对萘、菲、芘降解的中间代谢产物包括 1-羟基-2-萘甲酸、1,2-萘二酚和儿茶酚和 1-羟基-2-萘醛。推断菌株 P-9^T 是采用水杨酸途径降解 PAHs。【结论】*A. sediminis* P-9^T 是 *Aquabacter* 属的新种, 而且是该属中首次发现的 PAHs 降解菌, 最佳降解条件为 37 °C 和 pH 7.0, 可通过水杨酸途径高效降解萘、菲及芘。

关键词: 红树林沉积物; *Aquabacter sediminis* P-9^T; 多环芳烃降解; 水杨酸降解途径

Isolation, identification, and mechanism of the polycyclic aromatic hydrocarbons degrader *Aquabacter sediminis* P-9^T in mangrove sediment

LI Jiayi^{1,2}, HUANG Yuhan^{1,2,3}, LIU Lirui^{1,2}, LI Meng^{1,2*}

1 Archaeal Biology Center, Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

2 Shenzhen Key Laboratory of Marine Microbiome Engineering, Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

3 College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a kind of teratogenic, carcinogenic, and mutagenic organic pollutants. In recent years, the pollution of PAHs in mangrove ecosystems has attracted widespread attention, for which microbial degradation has been recognized as an effective, economical, and multifunctional treatment approach. Researchers have identified a large number of bacteria that utilize PAHs as carbon and energy sources, whereas these bacteria generally suffer from low degradation efficiency, narrow degradation spectra, and poor adaptability to high-salinity environments. In addition, the degradation mechanisms of PAH-degrading bacteria from mangroves remain to be fully explored. **[Objective]** The present study screened efficient and broad-spectrum PAH-degrading strains in mangrove sediments and explored their degradation efficiency and mechanism, with a view to providing a solid scientific foundation for the innovative research and development of microbial remediation technologies in mangrove ecosystems in the future. **[Methods]** A new PAH-degrading strain P-9^T was isolated from mangrove sediments collected from Futian, Shenzhen and identified based on the phenotypic and biochemical characteristics and phylogenetic relationship. The genomic DNA of this strain was extracted and sequenced, and the potential of P-9^T in degrading PAHs was investigated by genomic analysis. The degradation ability of P-9^T was measured at different temperatures (25–40 °C), pH (5.0–9.0), and substrate conditions. Finally, according to the intermediate metabolites detected by high

performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS), we preliminarily revealed the mechanism of P-9^T in degrading PAHs. **[Results]** Strain P-9^T was proposed to represent a potential novel species belonging to *Aquabacter* of *Xanthobacteraceae* and named as *Aquabacter sediminis* P-9^T, which was also the first PAH-degrader identified within this genus. A complete benzoate degradation pathway and key genes encoding dehydrogenase, salicylate hydroxylase, and cytochrome P450 involved in PAHs degradation were found identified in the genome of P-9^T. Strain P-9^T could use naphthalene, phenanthrene, or pyrene as the sole carbon and energy source and grow at 25–40 °C and pH 5.0–8.0. In a mineral salt medium (MSM) with phenanthrene (50 mg/L) as the substrate, the degradation efficiency reached 100% after five days. Several metabolites, such as 1-hydroxy-2-naphthoic acid, 1,2-naphthalenediol, catechol, and 1-hydroxy-2-naphthaldehyde were detected, which indicated that strain P-9^T might degrade PAHs via the salicylate pathway. **[Conclusion]** *A. sediminis* P-9^T, the first strain of *Aquabacter* identified to be capable of degrading PAHs could efficiently degrade naphthalene, phenanthrene, and pyrene via the salicylate pathway, with the optimum degradation performance at 37 °C and pH 7.0.

Keywords: mangrove sediments; *Aquabacter sediminis* P-9^T; degradation of PAHs; salicylate pathway

受人为活动的影响, 自然环境中多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 等有机污染物累积问题日益突出。红树林湿地作为沿海地区重要的生态系统, 海陆交接的地域优势为其带来了丰富的生物多样性, 同时也带来了大量污染物累积的严重威胁^[1]。经监测, 近年来海南、湛江地区红树林湿地表层水体和表层沉积物受 PAHs 污染, 处于中度生态风险^[2-3]; 而深圳市红树林表层沉积物 PAHs 在 2013 年的总含量均值达 996.0 ng/g, 其中萘和菲所占比例最高^[4]。

PAHs 可通过皮肤接触、饮食、抽烟甚至呼吸进入人体, 达到一定浓度可造成内分泌紊乱, 甚至损伤细胞 DNA, 造成染色体畸变, 进一步导致组织器官病变^[5-6]。因其具有“三致性”且自然降解效率慢, 是环境污染物治理的重点对象。在许多环境修复改良方法中, 微生物降解是主要的解决手段, 至今已发现许多降解菌可通过水杨酸途径或者邻苯二甲酸途径来彻底降解 PAHs^[7-9]。红树林沉积物中孕育着丰富的 PAHs 降解菌, 其中不乏至今仍未被发现的新物

种。2018 年, 蔡丽希等通过富集驯化培养, 从广西钦州茅尾海红树林表层土样中筛选出茈的降解菌群 YL, 该菌群 21 d 内对 50 mg/L 茈的降解率可达 92.09%^[10]; 2021 年, 赵梦飞对广西北海红树林表沉积物苯并(a)茈驯化菌群进行分离培养鉴定, 获得 7 株新菌, 其中 6 株细菌为需酸红树林单胞菌属(*Acidimangrovimonas*), 1 株细菌为土壤红细菌属(*Solirhodobacter*)^[11]。虽然关于 PAHs 降解菌的研究已有不少报道, 但是对于红树林沉积物中高效降解菌降解机制的研究报道并不多, 尤其是一些新发现的 PAHs 降解菌属, 它们的降解机制仍有待深入探索。

本研究以深圳福田红树林自然保护区的红树林湿地沉积物为材料, 从中分离鉴定可降解 PAHs 的潜在新种, 综合基因组的分析与代谢中间产物的检测来揭示红树林沉积物中 PAHs 微生物降解的代谢途径。研究结果可为构建红树林特色功能菌库提供资源, 揭示降解菌的降解能力和代谢机制, 加强微生物修复红树林沉积物 PAHs 污染的理论依据和应用基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 沉积物来源

沉积物样品取自深圳湾福田红树林自然保护区, 凤塘河口小岛对面 (22°31'35"N, 114°1'34"E), 采集表层 0–30 cm 的沉积物, 存放于无菌自封袋中, 4 °C 保藏。

1.1.2 培养基及试剂

无机盐培养基(minimal salt medium, MSM) (g/L): (NH₄)₂SO₄ 2.00, MgSO₄·7H₂O 0.20, KH₂PO₄ 1.50, Na₂HPO₄·12H₂O 1.50, CaCl₂·2H₂O 0.01, 固体培养基额外加入琼脂 15.00, 121 °C 灭菌 30 min, 常温冷却后加入 500.00 μL Wolfe 氏矿物溶液备用; R2A 培养基购自青岛海博生物技术有限公司。

多环芳烃母液: 萘、菲、芘各 0.05 g/mL, 丙酮为溶剂, 过滤除菌后避光常温保存备用; 基因组提取采用 TaKaRa MiniBEST Kit (TaKaRa 公司)。

1.2 降解菌株的筛选

称取沉积物样品 5 g, 添加到 250 mL 的 MSM 液体培养基(菲 50 mg/L)中, 在 37 °C、180 r/min 的恒温振荡摇床中富集培养约 10 d 为一代, 驯化至第三代后取样进行梯度稀释, 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 这 3 个梯度各取 100 μL 均匀涂布在含有菲 (50 mg/L) 的 MSM 固体培养基上, 每个梯度做 3 个重复, 37 °C 恒温培养 5–7 d。根据菌落形态差异筛选菌株, 划线转接至少 5 代, 得到纯化的菲降解菌, 然后接种至 R2A 培养基, 于 37 °C 恒温培养, 添加体积分数为 25% 的甘油保藏于 -80 °C 备用。

1.3 菌株 P-9^T 的鉴定

1.3.1 形态学鉴定

P-9^T 划线接种至 R2A 固体培养基培养 3–5 d 后观察单菌落形态的大小、颜色、边缘整齐度等特征; 取液体培养对数生长期菌液参照梁静南等^[12]的方法进行制样, 对单细胞形态进行扫

描电镜观察; 根据革兰氏染色试剂盒(青岛海博生物技术有限公司)的说明进行革兰氏染色后, 利用光学显微镜观察染色结果。

1.3.2 生理生化表征

以 1% 接种量进行接种至 R2A 液体培养基中, 分别放置在 15、20、25、28、30、37、40、45、50 °C 的恒温振荡培养箱中, 每个温度做 3 个平行, 同一转速(180 r/min)进行培养。pH 生长范围检测则是以同一接种量(1%)接种至 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的液体培养基中, 每个梯度做 3 个平行, 在 37 °C 和 180 r/min 的条件下进行恒温培养, 分别在 0、24、48、72、96 和 120 h 取样, 用多功能酶标仪检测菌液的 OD₆₀₀ 值。将菌株接种至 R2A 固体培养基中放入 25 L 的密封培养袋, 分别加入厌氧产气包和微需氧产气包, 消耗袋中氧气营造厌氧和微需氧条件。在 37 °C 条件下, 进行为期 14 d 的恒温培养后观察菌株是否具有在低氧条件下生长的能力。

取 50 μL 生长良好的菌液, 加入 100 μL 体积分数为 3% 的过氧化氢溶液, 观察是否产生气泡, 有气泡产生表示具有过氧化氢酶活性, 否则为阴性; 滴加 10 μL 去离子水至含有 N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐的氧化酶检测试纸, 用无菌接种环挑取单菌落均匀涂抹至湿润的试纸中, 等待 30–60 s, 30 s 内试纸变蓝表明氧化酶强阳性, 60 s 内变蓝为阳性, 不变色则为阴性。

1.3.3 分子生物学鉴定

挑取平板上的单菌落重悬浮于 10 μL 的灭菌去离子水中作为菌落 PCR 模板, 选择通用引物 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 和 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')^[13] 扩增 16S rRNA 基因, 利用 Sanger 测序法[生工生物工程(上海)股份有限公司]进行检测。将获得的序列与 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud>.)

net/identify)数据库中的模式菌株进行初步的分类比对^[14], 此外, 将新种的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)注册编号。收集比对相似度较高的模式菌株 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA X^[15]软件通过 Clustal W 程序^[16]对 16S rRNA 基因序列集进行多序列比对, 获得整齐的基因序列集, 基于 Kimura two-parameter 模型, 分别通过邻接 (neighbor-joining, NJ) 法^[17]、最小进化 (minimum-evolution, ME) 法^[18]和最大似然 (maximum-likelihood, ML) 法^[19]构建系统发育树, 基于 1 000 次重复的自举分析来评估不同分支和簇的稳定性。使用以下软件及网站分析基因组之间的平均核苷酸相似性 (average nucleotide identity, ANI)、平均氨基酸相似性 (average amino acid identity, AAI) 和基因组间距离 (digital DNA-DNA hybridization, dDDH): EzBioCloud 的 ANI 计算器服务 (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)^[20]; 环境微生物基因组学实验室 (Environmental Microbial Genomics Laboratory) 在线计算服务 (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>); Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC, <https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)^[21], 数据来自菌株 P-9^T 及 3 个近缘模式株洞穴水杆菌 (*Aquabacter cavernae*) Sn-9-2^T (GCA_003993795.1, 4.52 Mb)^[22]、圣灵湖水杆菌 (*Aquabacter spiritensis*) DSM 9035^T (GCA_004346185.1, 5.16 Mb)^[23]、自养黄色杆菌 (*Xanthobacter autotrophicus*) DSM 432^T (GCA_005871085.1, 5.01 Mb)^[24]的基因组。

1.4 菌株 P-9^T 基因组的测序及分析

提取 P-9^T 全基因组 DNA 样品并送交广东美格基因科技有限公司进行上机质量检测 and 细菌全基因组测序, 采用 Illumina HiSeq 平台、PE150 测试策略和 2×150 bp 的配对读码进行测序。使用 SPAdes 软件 (v3.15.1)^[25]对 DNA 短序列

进行拼接, 组装获得长片段 (contigs 或 scaffolds), 最后用 CheckM (v1.1.3)^[26]对基因组进行质控检查。基因组序列的主要分析内容包括: 环形基因组图谱绘制、基因预测和基因功能注释。基因组环形图: 利用 Proksee 基因组可视化系统网站 (<https://proksee.ca/>) 预测 rRNA、tRNA, 计算 G+C 含量, 同时根据基因位置信息绘制出相应基因在基因组的位置分布。通过 NCBI 数据库的 Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) 进行基因预测^[27]。基因功能注释: 将获得的氨基酸序列与 KEGG (<https://www.kegg.jp/>)、NCBI 的 COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>) 和 SwissProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库中已知功能的序列进行比对, 预测并注释出基因的功能。

1.5 PAHs 降解条件优化

菲降解条件的优化: 以 3% 的接种量转接至添加 50 mg/L 菲的 MSM 液体培养基中。在接种量、菲浓度、pH 一致的条件下, 设定 4 个温度梯度 (25、30、37、40 °C) 作为变量; 设定 5 个 pH 梯度 (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 作为变量, 每个梯度 3 个平行, 在接种量、菲浓度、温度 (37 °C) 一致的条件下, 避光培养 1 周, 分别在 1、3、5、7 d 进行取样, 根据降解情况适当调整培养周期。采用液-液萃取的方法萃取培养基中剩余的菲, 取 5 mL 菌液, 6 000 r/min 离心 5 min 后取上清加入等体积的乙腈, 漩涡振荡萃取 10 min, 经 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤后通过 HPLC 检测菲的残留量并计算相应的降解效率。选用 C18 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 使用 HPLC 色谱仪 (Agilent 公司) 对待测样品进行检测, 流动相为 80% 乙腈: 20% 0.05 mol/L 醋酸铵 (pH 4.2), 色谱柱检测温度为 35 °C, 流速 1 mL/min, 检测波长为 254 nm, 进样量 15 μL, 保留时间 10 min^[28]。利用外标法, 根据

出峰时间和出峰面积进行定性定量, 检测样品中的污染物底物浓度并计算相应的降解率, 见公式(1)。

$$\text{降解率}(\%) = (C_n - C_0) / C_0 \times 100 \quad (1)$$

式中, C_n 代表终浓度, C_0 代表起始浓度。

1.6 降解产物分析

将菌株 P-9^T 接种到萘、菲和芘含量均为 50 mg/L 的 MSM 液体培养基中, 在最适的条件下恒温避光培养, 留取降解初期(第 5 天)、中期(第 10 天)和后期(第 14 天)的培养液约 5 mL, 常温 6 000 r/min 离心 5 min 后取上清, 加入等体积的乙腈, 漩涡振荡萃取 10 min, 加入 0.1 mg/L 的 NaCl 上下摇匀 1 min 后静置 10 min, 待有机相和水相分层后, 取下层无机层, 经 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤后通过 HPLC 检测菲降解中间产物的产生情况, 并接取相应出峰时间的流分, 进一步进行液相色谱质谱检测分析。采用液相色谱串联四极杆飞行时间质谱 Xevo G2-XS Qtof (Waters 公司)^[29]和高效液相色谱-电喷雾-质谱联用仪器(HPLC-ESI-MS/MS)进行菲代谢产物分离检测, 通过 UNIFI 软件(v1.9.4)处理分析数据, 鉴定菌株 P-9^T 降解 PAHs 的中间产物^[29]。液相体系如下, 流动相 A: 含 0.1% 甲酸的水; 流动相 B: 含 0.1% 甲酸的乙腈, 流速 0.4 mL/min, 梯度程序: 0–1 min (2% B), 1–4 min (15% B), 4–8 min (50% B), 8–13 min (50%–98% B), 13–16.4 min (98% B), 16.4–17.4 min (98%–2% B), 17.4–20 min (2% B)。质谱条件如下, 电离方法: ESI+/-; 数据采集方式: MSE; MSE 冲击能量: 低能 6 V, 高能 25–40 V; 采集质量范围: 50–1 200 Da^[29]。结合已知的菲代谢产物分子质量和分子式与数据库进行比对。

1.7 其他 PAHs 降解能力的初步分析

分别接种至以萘(25 mg/L)、菲(25 mg/L)、芘(25 mg/L)及其混合物为唯一碳源的 MSM 液

体培养基, 各做 3 个平行, 接种量统一为 3%, 在 37 °C、180 r/min 的避光条件下恒温培养 8 d。每天取样, 利用多功能酶标仪检测菌液 OD_{600} 值。在第 8 天用高效液相色谱仪(HPLC)检测并计算降解菌对多环芳烃的降解率。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的分离

成功分离出 4 株生长速度较快的非降解菌 P-1、P-2、P-6、P-9^T。结果如表 1 所示, 4 个降解菌与分枝菌酸小杆菌属(*Mycolicibacterium*)和 *Aquabacter* 两个属的亲缘关系最近。其中菌株 P-1 和 P-2 与产黏液分枝菌酸小杆菌(*Mycolicibacterium mucogenicum*)比对的 16S rRNA 基因相似性最高, 分别达到 98.88% 和 99.15%, 表明这两株菌属于 *Mycolicibacterium mucogenicum*。菌株 P-6 和 P-9^T 与 *Aquabacter cavernae* 的序列相似性最高, 分别为 98.26% 和 98.19%, 低于 98.65% 的细菌定种阈值, 表明菌株 P-6 和 P-9^T 是 *Aquabacter* 属潜在的新种^[30]。

2.2 菌株 P-9^T 的鉴定

2.2.1 形态学鉴定

以菲为唯一碳源, 筛选出降解菲的潜在新种菌株 P-9^T, 接种至 R2A 固体培养基中划线培养 3 d 后进行观察。如图 1A 所示, 单菌落形态呈圆形凸起, 白色, 表面光滑水润, 直径 0.5–2.5 mm。通过扫描电镜观察菌株 P-9^T 的单细胞形态见图 1B,

表 1 分离的非降解菌株

Table 1 Identification of phenanthrene-degrading strains

Strains	Identification	16S rRNA gene similarity (%)
P-1	<i>Mycolicibacterium mucogenicum</i>	98.88
P-2	<i>Mycolicibacterium mucogenicum</i>	99.15
P-6	<i>Aquabacter cavernae</i>	98.26
P-9 ^T	<i>Aquabacter cavernae</i>	98.19

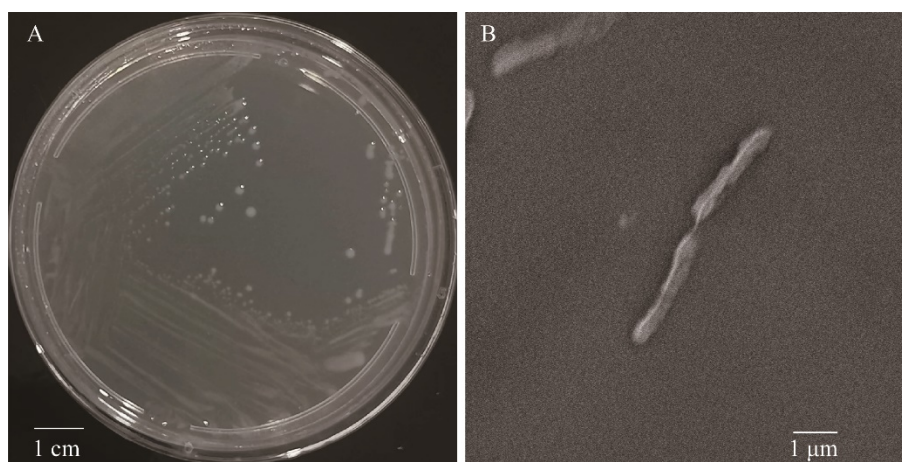


图 1 菌株 P-9^T 的菌落(A)和单细胞(B)形态

Figure 1 The colony (A) and single cell (B) morphology of strain P-9^T.

细胞形似棒状, 宽 0.3–0.7 μm, 长 1.5–3.0 μm, 与模式株 *A. cavernae* Sn-9-2^T 的淡黄色菌落形态有着较大的差异^[22]。

2.2.2 生理生化特征

比对结果表明, 菌株 P-9^T 与 *Aquabacter cavernae* Sn-9-2^T 的 16S rRNA 基因序列相似性最高 (98.26%), 其次是 *Xanthobacter autotrophicus* DSM 432^T (97.16%)、*Aquabacter spiritensis* DSM 9035^T (97.06%); 在 NJ、ME 和 ML 法重建的基于 16S rRNA 基因的系统发育树中(图 2), 菌株 P-9^T 与 *A. cavernae* Sn-9-2^T 形成了一个独立的簇, 表明菌 P-9^T 可能是 *Aquabacter* 属的一个新物种。菌株 P-9^T 和 *A. cavernae* Sn-9-2^T、*A. spiritensis* DSM 9035^T、*X. autotrophicus* DSM 432^T 之间的 ANI 值分别为 78.45%、76.91% 和 77.12%; AAI 值分别为 73.37%、72.53% 和 69.25%; 菌株 P-9^T 与这些模式菌株之间的 dDDH (formula 2) 值分别为 22.7%、21.9% 和 22.0%, 它们均低于物种划分的阈值 (ANI 95.00%, AAI 95.00%–96.00%, dDDH 70.0%)^[14]。菌株 P-9^T 在系统发育树上与 *A. cavernae* Sn-9-2^T 处于单独的

分支, 亲缘关系最近, 并且基因组间 ANI 值、AAI 和 dDDH 值均符合鉴定为新种的标准。

2.2.3 分子生物学鉴定

表 2 汇总了菌株 P-9^T 与 *A. cavernae* Sn-9-2^T^[22]、*A. spiritensis* DSM 9035^T^[23]、*X. autotrophicus* DSM 432^T^[24] 的生理生化特征。菌株 P-9^T 为革兰氏阴性菌, 与其他 3 个模式株一致, 好氧生长, 不能在低氧及无氧条件下培养。菌株 P-9^T 可以在 15–40 °C 的温度范围内生长, 其中 35 °C 为最适温度, 而 pH 生长范围在 5.0–9.0 (最适 pH 为 7.0–8.0)。过氧化氢酶和氧化酶活性检测结果都呈阳性。在平板菌落颜色上, 菌株 P-9^T 与 *A. cavernae* Sn-9-2^T 有着明显差异, 与 *A. spiritensis* DSM 9035^T 更为相似。在氧化酶活性检测中也是与 *A. cavernae* Sn-9-2^T 有着相反的结果。综上所述, 基于形态学表型、生理生化分类学以及系统发育和基因组的分析结果, 本研究提出将菌株 P-9^T 作为 *Xanthobacteraceae* 科, *Aquabacter* 属的新种菌株, 并暂命名为 *Aquabacter sediminis* P-9^T (保藏编号: CGMCC 1.56041)。

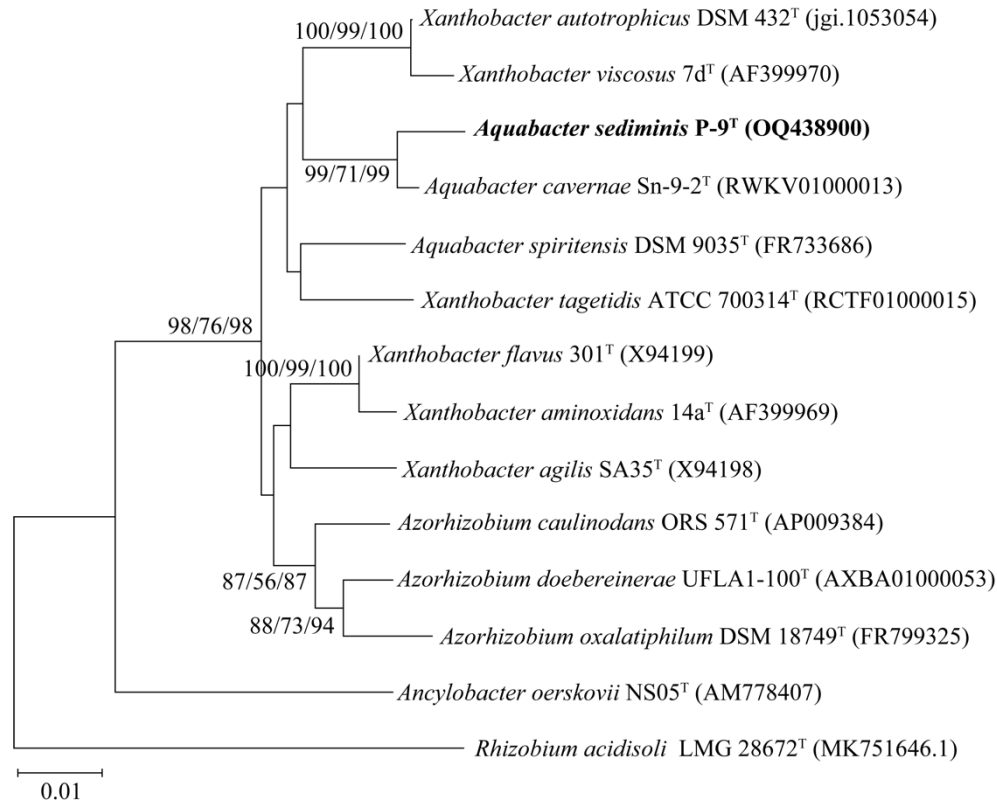


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建 *Aquabacter sediminis* P-9^T 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA genes of *Aquabacter sediminis* P-9^T (in bold type) and other related species. The value on the branch represents the confidence (%) of 1 000 bootstrap tests in the ME, ML and NJ algorithms for this node, the length of the branch represents the evolutionary distance, and the lower left scale represents 0.01 nucleotide substitutions at each site.

表 2 *Aquabacter sediminis* P-9^T 与 3 个模式株的生理生化特征

Table 2 Different characteristics among *Aquabacter sediminis* P-9^T, *Aquabacter cavernae* Sn-9-2^T, *Aquabacter spiritensis* DSM 9035^T and *Xanthobacter autotrophicus* DSM 432^T

Characteristic	1	2*	3*	4*
Colony color	White	Yellow	White	Yellow
Gram stain	–	–	–	–
Growth temperature (°C)	15–40	15–40	15–40	10–35
Growth pH	5.0–9.0	5.0–9.0	5.0–8.0	6.0–8.0
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	–	+	+
16S rRNA gene similarity (%)		98.26	97.01	97.16
Genome size (Mb)	5.3	4.5	5.2	5.0
DNA G+C content (%)	66.9	67.5	67.6	67.6
ANI (%)		78.45	76.91	77.12
AAI (%)		73.37	72.53	69.25
dDDH (%)		22.7	21.9	22.0

1: *Aquabacter sediminis* P-9^T; 2: *Aquabacter cavernae* Sn-9-2^T; 3: *Aquabacter spiritensis* DSM 9035^T; 4: *Xanthobacter autotrophicus* DSM 432^T. *: Data from references^[22-24]; +: Positive; -: Negative.

2.3 *Aquabacter sediminis* P-9^T 的基因组分析

拼接获得的 *A. sediminis* P-9^T 菌株基因组全长 5 334 632 bp, 分为 34 个 contigs, 污染率为 0.11%, 完整度 99.65%, N50 值为 548 030 bp, 基因组的 G+C 含量为 66.9%。菌株 P-9^T 基因组包含 1 套 5S rRNA 基因、16S rRNA 基因、23S rRNA 基因和 48 个 tRNA 基因。经 PGAP 预测获得 4 806 个基因, 其中有 4 716 个为蛋白编码基因。该基因组序列和 16S rRNA 基因序列已提交至 NCBI 的 GenBank 数据库, 登录号分别为 JARBFX000000000 和 OQ438900。

经 KEGG、COG、SwissProt 数据库分析, *A. sediminis* P-9^T 基因组中分别注释出 4 370 个(91.71%)、3 900 个(81.85%)和 1 679 个(35.24%)功能基因。通过 KEGG 数据库对基因的功能进行分类注释, 主要分成细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理和代谢 4 个类别。其中代谢类别的功能基因数占比最大(35.8%), 具有遗传信息处理类别功能的基因数占 4.5%, 环境信息处理类别的功能基因数占 9.0%, 而细胞过程类别的功能基因数占 7.5%。代谢类别中参与碳水化合物代谢和氨基酸代谢的基因数最多, 分别有 394 个和 388 个, 涵盖完整的糖酵解、柠檬酸循环和戊糖磷酸循环的代谢通路(图 3A)。此外, 环境信息处理类别中的膜运输(302 个基因)和代谢类别中的外源物的降解与代谢(165 个基因)基因数仅次于碳水化合物代谢、能量代谢和氨基酸代谢, 可能在菌株通过跨膜运输将环境中的 PAHs 污染物转入体内进而完成降解与能量释放这一代谢过程中发挥着重要作用^[31]。针对外源生物的降解与代谢的相关基因(图 3B)进一步分析发现, *A. sediminis* P-9^T 基因组中含有丰富的外源物降解基因, 165 个功能基因共参与了 16 个不同的降解途径, 具有降解多种外源化合物及其衍生物的代谢潜能, 其中参与苯甲酸盐降解的基

因 26 个、萘降解的基因 4 个、多环芳烃降解的基因 2 个。

如表 3 所示, *A. sediminis* P-9^T 基因组中含有编码苯甲酸盐氧化还原酶(BenC)、脱氢酶(BenD)^[32]、邻苯二酚 1,2-双加氧酶(CatA)^[33]、辅酶 A 转移酶(PcaJ)、乙酰辅酶 A 酰基转移酶(FadA)的基因, 可以组成完整的苯甲酸盐降解通路^[34], 另外还发现萘降解、多环芳烃降解通路中需要的脱氢酶以及非常重要的细胞色素 P450 酶^[35]、单加氧酶(又名水杨酸羟化酶)^[36]和苯环裂解双加氧酶的编码基因^[37]。

2.4 *Aquabacter sediminis* P-9^T 降解 PAHs 的最适条件

在不同 pH 条件的降解实验中, 设了 5 个梯度(pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0), 结果如图 4A 所示, *A. sediminis* P-9^T 在 pH 5.0–8.0 的条件下皆可利用菲进行生长繁殖, pH 7.0 为 *A. sediminis* P-9^T 最佳降解条件, 降解率达 100%, 耗时最短(5 d), pH 6.0 次之; 在 pH 5.0 的条件下, 滞缓期延长至 5 d, 在第 7 天降解率升至 100%; 而在 pH 8.0 的条件下, 滞缓期没有延长, 但是在第 5–7 天降解效率趋于平缓, 降解率超过 90% 至少需要 11 d。综合上述, 弱酸或中性(pH 5.0–7.0)条件有利于 *A. sediminis* P-9^T 对菲的降解。

本实验设了 4 个培养温度, 在其他培养条件一致的状态下进行培养, 定期检测不同温度下 *A. sediminis* P-9^T 在菲降解体系中的生长情况。温度范围设为 25、30、37、40 °C。为期 14 d 的培养检测结果显示(图 4B), *A. sediminis* P-9^T 在 37 °C 条件下降解菲的活性最强, 30 °C 次之, 25 °C 和 40 °C 不利于 *A. sediminis* P-9^T 对菲的降解(降解效率 < 20%)。在 37 °C 培养条件下, 第 0–3 天, *A. sediminis* P-9^T 处于生长阶段的滞缓期, 生长缓慢, 底物浓度无明显的变化; 第 4–5 天降解效率显著增大, 并在第 7 天降解率达 100%。

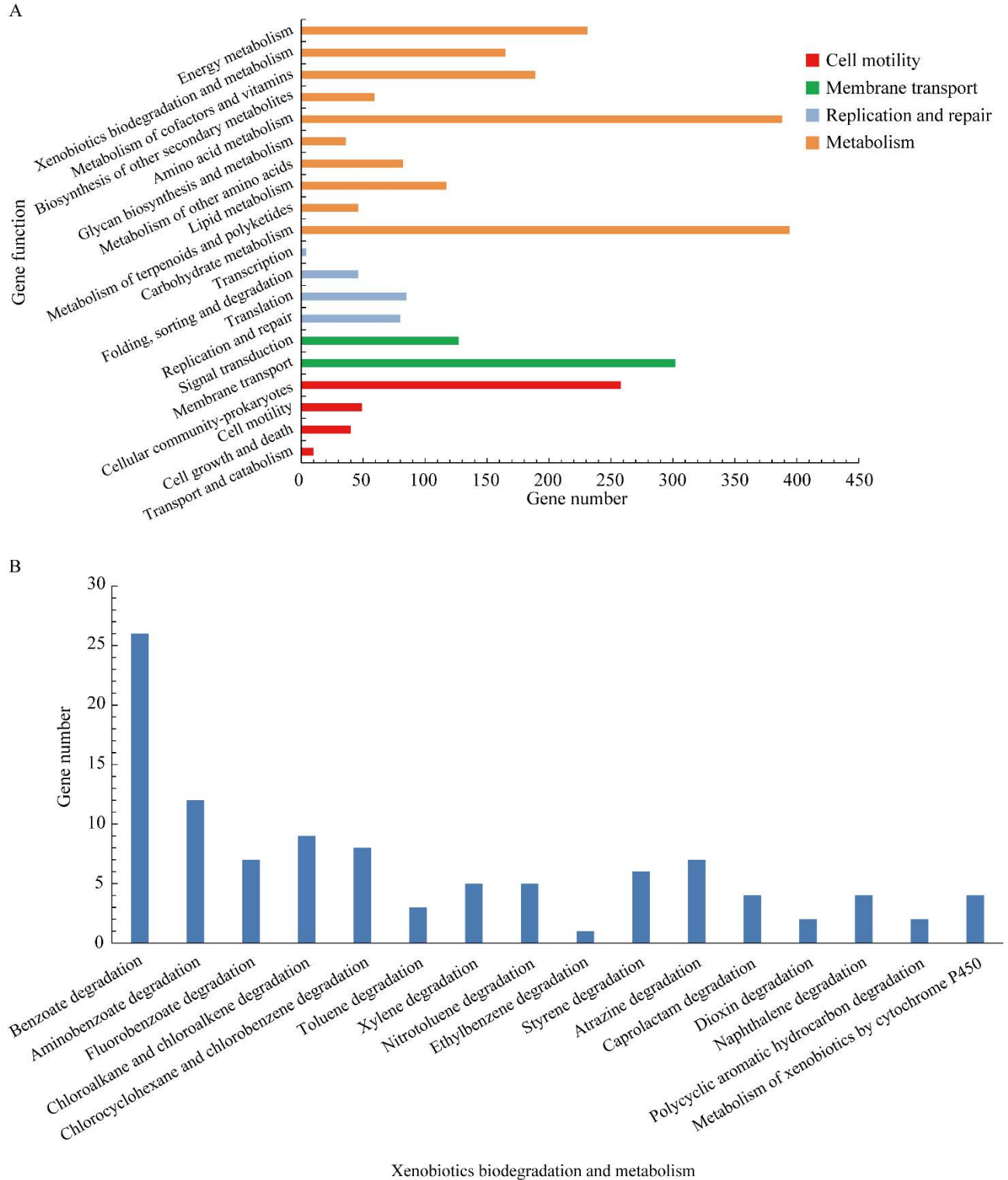


图 3 *Aquabacter sediminis* P-9^T 基因组的 KEGG 注释

Figure 3 Genome annotation of *Aquabacter sediminis* P-9^T based on KEGG database. A: Function and number of coding genes. B: Number of coding genes in xenobiotics biodegradation and metabolism.

表 3 *Aquabacter sediminis* P-9^T 中参与 PAHs 降解的关键基因

Table 3 Genes involved in PAHs degradation of *Aquabacter sediminis* P-9^T

Gene name	Annotated protein	Refseq_ID
<i>benC</i>	Benzoate 1,2-dioxygenase reductase component	WP_274775006.1
<i>benD</i>	Dihydroxy cyclohexadiene carboxylate dehydrogenase	WP_274776462.1
<i>catA</i>	Catechol-1,2-dioxygenase	WP_274776463.1
<i>pcaJ</i>	CoA-transferase	WP_274776942.1
<i>fadA</i>	Acetyl-CoA acyltransferase	WP_274776900.1
<i>GST</i>	Cytochrome P450	WP_274773836.1
<i>adhP</i>	Alcohol dehydrogenase	WP_274773956.1
<i>nah</i>	Salicylate hydroxylase	WP_274777967.1
<i>ligB</i>	Extradiol ring-cleavage dioxygenase	WP_274776980.1

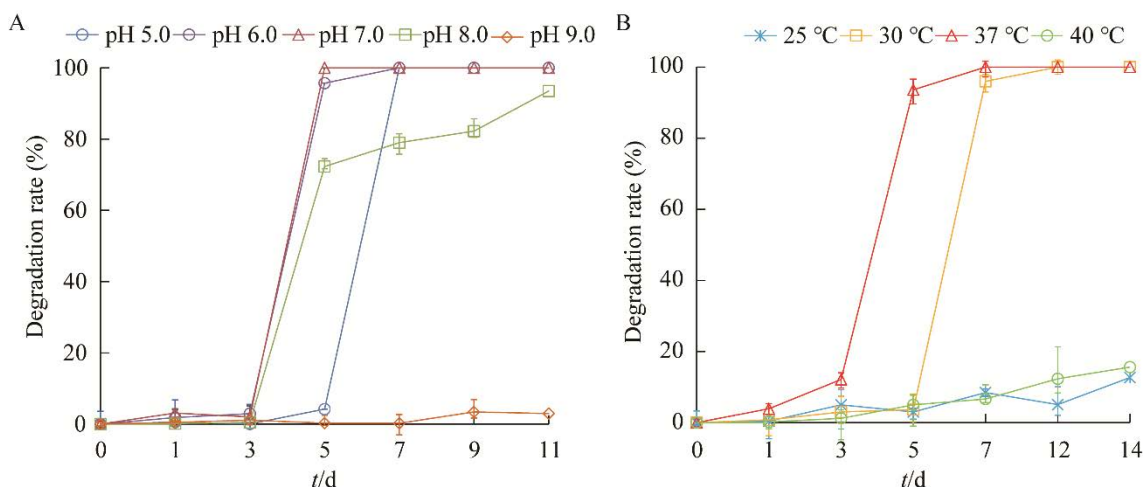


图 4 *Aquabacter sediminis* P-9^T 在不同 pH (温度 37 °C) 和不同温度 (pH 7.2) 下的菲降解曲线
Figure 4 Effects of pH and temperature on the degradation rate of phenanthrene by *Aquabacter sediminis* P-9^T. A: Degradation rate under pH 5.0 to 9.0. B: Degradation rate under 25 °C to 40 °C.

2.5 *Aquabacter sediminis* P-9^T 的 PAHs 降解机制

如图 5A 所示, 据液相色谱检测结果, *A. sediminis* P-9^T 在菲的降解前期(前 7 d)主要产生一种中间产物 A。其中菲的出峰时间为 2.136 min, 中间产物 A 的出峰时间为 1.245 min, 1.646 5 min 是溶剂峰(图 5A)。降解前期中间产物 A 随着菲含量的降低而逐渐增加。在降解中期(第 7-10 天), 主要检测出另一种代谢产物(B), 出峰时间集中于 1.291 min (图 5B)。而在降解后期(第 10-14 天), 主要代谢产物(C)出峰时间在 1.389 min (图 5C)。为了揭示 *A. sediminis* P-9^T 降解菲的途径, 利用

液相色谱串联高分辨质谱技术(HPLC-ESI-MS/MS)对 *A. sediminis* P-9^T 降解菲的 3 个不同时期产生的中间代谢物进行了鉴定。以已知的水杨酸和邻苯二甲酸途径中间产物的分子式和分子量为参考进行比对鉴定, 通过负离子模式进行扫描, 中间产物 A 洗脱时间为 13.015 min, 质谱显示其分子离子(M-H)在 m/z 值 187.039 8 处, 通过设置分子式中 C (6-15)、H (5-10)、O (2-6) 的个数区间进行检索, 确定中间产物 A 是 1-羟基-2-萘甲酸^[38-39]。中间产物 B 和 C 分别在正离子扫描模式下的 0.624 min 和 9.909 min 具有质谱峰。中间产物 B 的分子离子(M+H)在 m/z 值 161.132 2 处, 鉴定为 1,2-萘二

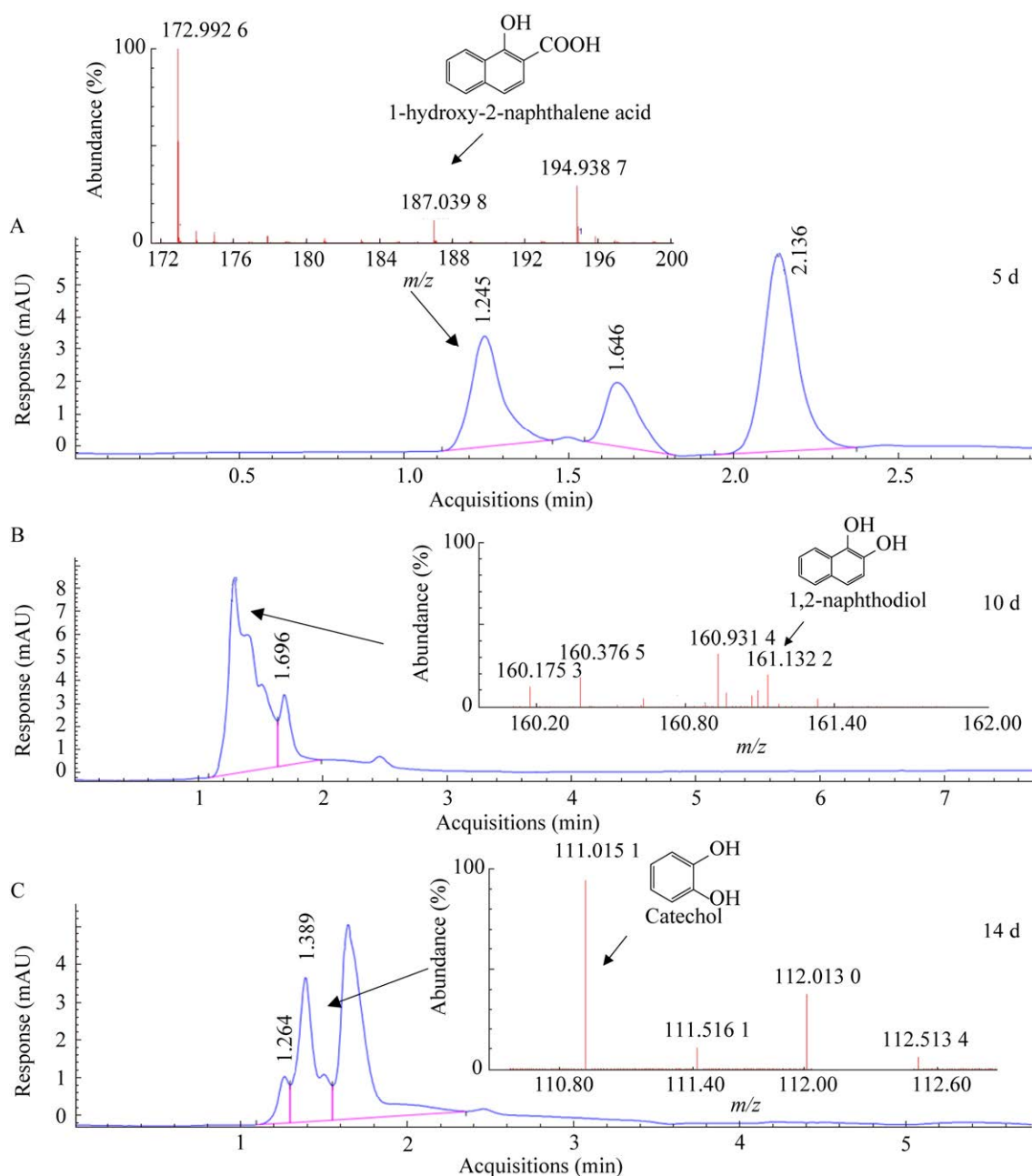


图5 *Aquabacter sediminis* P-9^T降解菲 5 d、10 d 和 14 d 后的主要代谢产物质谱图

Figure 5 Mass spectrum of the major metabolites of phenanthrene on the 5th, 10th and 14th day degraded by *Aquabacter sediminis* P-9^T. A: Major metabolite of phenanthrene on the 5th day. B: Major metabolite of phenanthrene on the 10th day. C: Major metabolite of phenanthrene on the 14th day.

酚^[38-39]。中间产物 C 的分子离子(M+H)则在 m/z 值 111.015 1 处, 鉴定为邻苯二酚, 又名儿茶酚。

2.6 初步检测 *Aquabacter sediminis* P-9^T 对其他 PAHs 的降解能力

A. sediminis P-9^T 不仅能利用菲还具有降解萘、

芘及其混合物的能力(图 6)。在 8 d 的培养时间内对 25 mg/L 萘、菲、芘的降解率均达 100.0%。此外, 在萘、菲、芘 3 种底物共存且总浓度达 75 mg/L 的情况下, *A. sediminis* P-9^T 的生长状况良好, 8 d 时间内对萘、菲、芘混合底物的降解率达 96.7% (表 4)。

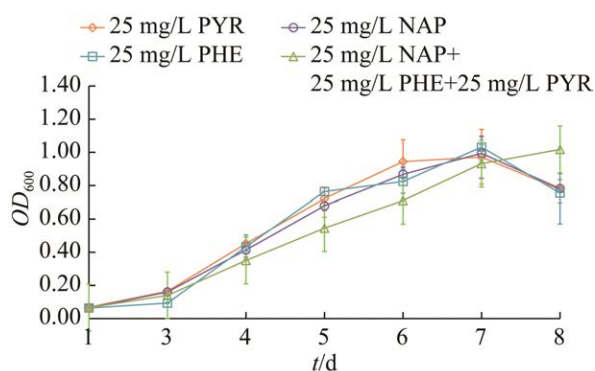


图 6 *Aquabacter sediminis* P-9^T 在不同底物下的生长曲线

Figure 6 The growth curve of *Aquabacter sediminis* P-9^T under different PAHs. NAP: Naphthalene; PHE: Phenanthrene; PYR: Pyrene.

表 4 *Aquabacter sediminis* P-9^T 在 8 d 内对不同底物的降解效率

Table 4 Degradation rate of different PAHs by *Aquabacter sediminis* P-9^T in 8 days

PAHs	Concentration (mg/L)	Degradation rate (%)
Naphthalene	25	100.0
Phenanthrene	25	100.0
Pyrene	25	100.0
Naphthalene+	25+25+25	96.7
Phenanthrene+Pyrene		

此外, 在 *A. sediminis* P-9^T 降解萘和芘的培养基中同时检测出了 1-羟基-2-萘醛, 在正离子扫描模式下, 分别在 11.461 min 和 11.951 min 检测出质谱峰, 分子离子(M+H)⁺相一致, 在 *m/z* 值 173.075 1 处(图 7)。

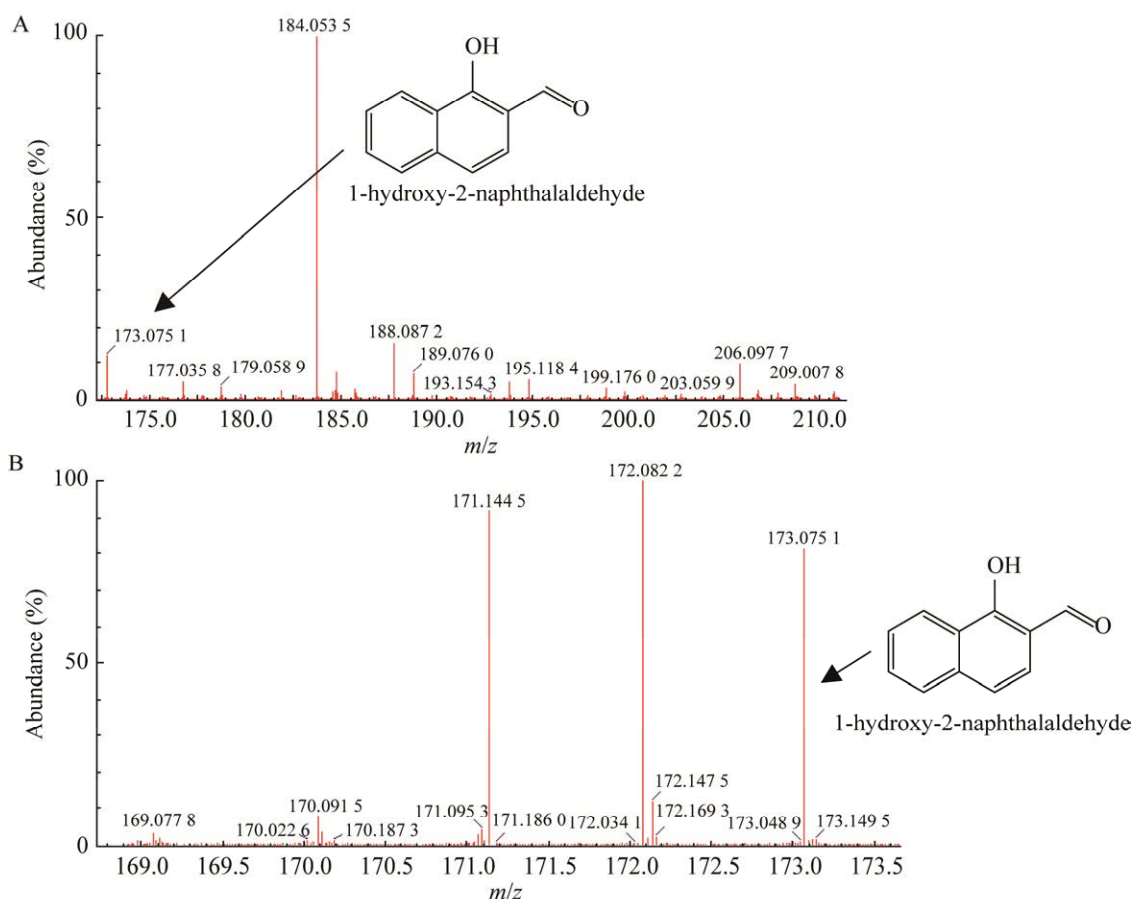


图 7 *Aquabacter sediminis* P-9^T 降解芘和萘的中间代谢产物质谱图

Figure 7 Mass spectrum of metabolites of pyrene and naphthalene degraded by *Aquabacter sediminis* P-9^T. A: Major metabolite of pyrene. B: Major metabolite of naphthalene.

3 讨论与结论

近年来,红树林沉积物逐渐成为 PAHs 降解菌分离筛选的重要研究对象。李玫等^[40-41]从珠海市淇澳岛受石油污染的红树林湿地土壤中富集、分离和筛选出 26 株萘降解菌,其中菌株 N1、N2、N3 和 N4 在为期 5 d 的培养中分别能降解 52.7%、52.5%、47.8%和 54.2%的萘(100 mg/L); 2019 年,吴霜等^[42]从广西红树林土样中分离出了 9 株菲降解菌,其中 3 株高效降解菌 UMBR 0019、UMBR 0020 和 UMBR 0197 对菲的降解效率分别为 48.80%、75.00%和 63.54%,协同作用后高达 99.07%; 2020 年,龚莹等^[43]从海南不同红树林沉积物中筛选出了 PAHs 的混合降解菌群,主要研究了不同菌群的降解特征。由此可见,红树林生态系统确实存在着许多不同种类的有效 PAHs 降解菌,本实验以深圳福田红树林沉积物为样品,成功筛选分离到 4 株 PAHs 降解菌,根据 16S rRNA 基因同源性分析,菌株 P-1 和 P-2 属于 *Mycobacterium mucogenicum*, 是常见的菲降解菌之一。前人对该菌属的降解能力、降解途径及其功能基因簇已有深入的研究,其中有研究发现该菌属具有广泛的底物谱,可以分解代谢蒽、蒽、芴和菲^[44-46]。另外两个菌株 P-6 和 P-9^T 与 *Aquabacter cavernae* 的序列最相似,而相似度小于 98.65%,挑选 P-9^T 进一步进行形态观察、生理生化表征和系统发育分析,鉴定为 *Xanthobacteraceae* 科, *Aquabacter* 属的新种,命名为 *Aquabacter sediminis* P-9^T。 *A. sediminis* P-9^T 在 25–40 °C 和 pH 5.0–8.0 的条件下皆可降解菲,其中最佳降解条件为 37 °C 和 pH 7.0。在萘、菲、芴分别为唯一碳源甚至三者混合的条件下可生长繁殖,菲浓度为 50 mg/L 时,最适条件下培养 5 d 降解率可达 100.0%,三者混合情况下(总浓度=75 mg/L)最适条件下培养 8 d 降解率可达 96.7%,说明 *A. sediminis* P-9^T 具有良好的 PAHs 降解能力和生长适应性。

值得注意的是,有关 *Aquabacter* 属可降解 PAHs 的研究尚未报道, *A. sediminis* P-9^T 的发现拓展了 *Aquabacter* 菌属解决环境 PAHs 的应用潜能,同时为研究该菌属的 PAHs 降解能力及降解机制提供了物质基础。Seo 等研究发现节杆菌属在非降解过程中,可以在菲的 1,2-C、3,4-C 和 9,10-C 上发生初始的双氧化,其中主要发生在 3,4-C 位置上^[39],随后在双加氧酶作用下裂解成 1-羟基-2-萘甲酸^[38-39],因此 1-羟基-2-萘甲酸是完成第一个裂解反应的重要标志^[47]。这一重要中间代谢产物一方面可以经由水杨酸和儿茶酚途径进入 TCA 循环,另一方面则是通过邻苯二甲酸和原儿茶酸途径完成降解^[48]。对 *A. sediminis* P-9^T 的全基因组进行测序分析发现其具有编码完整的苯甲酸盐降解通路基因以及参与萘和其他 PAHs 的脱氢酶、水杨酸羟化酶和细胞色素 P450 的关键基因。其中水杨酸羟化酶、邻苯二酚双加氧酶等组成完整的 PAHs 降解下游基因簇,与前人发现的恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) G7 中菲降解下游基因簇相一致^[49]。下游降解基因簇的发现一定程度上证明它具有通过水杨酸途径彻底降解 PAHs 的条件。利用 HPLC-ESI-MS/MS 检测 *A. sediminis* P-9^T 降解萘、菲、芴所产生的中间代谢产物。发现 *A. sediminis* P-9^T 可以将菲降解为 1-羟基-2-萘甲酸、1,2-萘二酚和儿茶酚,将萘和芴降解为 1-羟基-2-萘醛。综合基因组注释及中间代谢产物结果,如图 8 所示,推断 *A. sediminis* P-9^T 通过水杨酸途径降解 PAHs。本实验开展了深圳福田红树林沉积物 PAHs 降解菌的筛选及机制方面的初步研究,不仅丰富了研究 *Aquabacter* 中 PAHs 降解菌的资源,也为进一步深入研究其降解机制奠定了物质基础。为了加快 PAHs 降解菌在实际环境投入治理的应用,仍需进行更深入的研究工作,例如红树林原位降解实验和便捷式菌剂研发等。

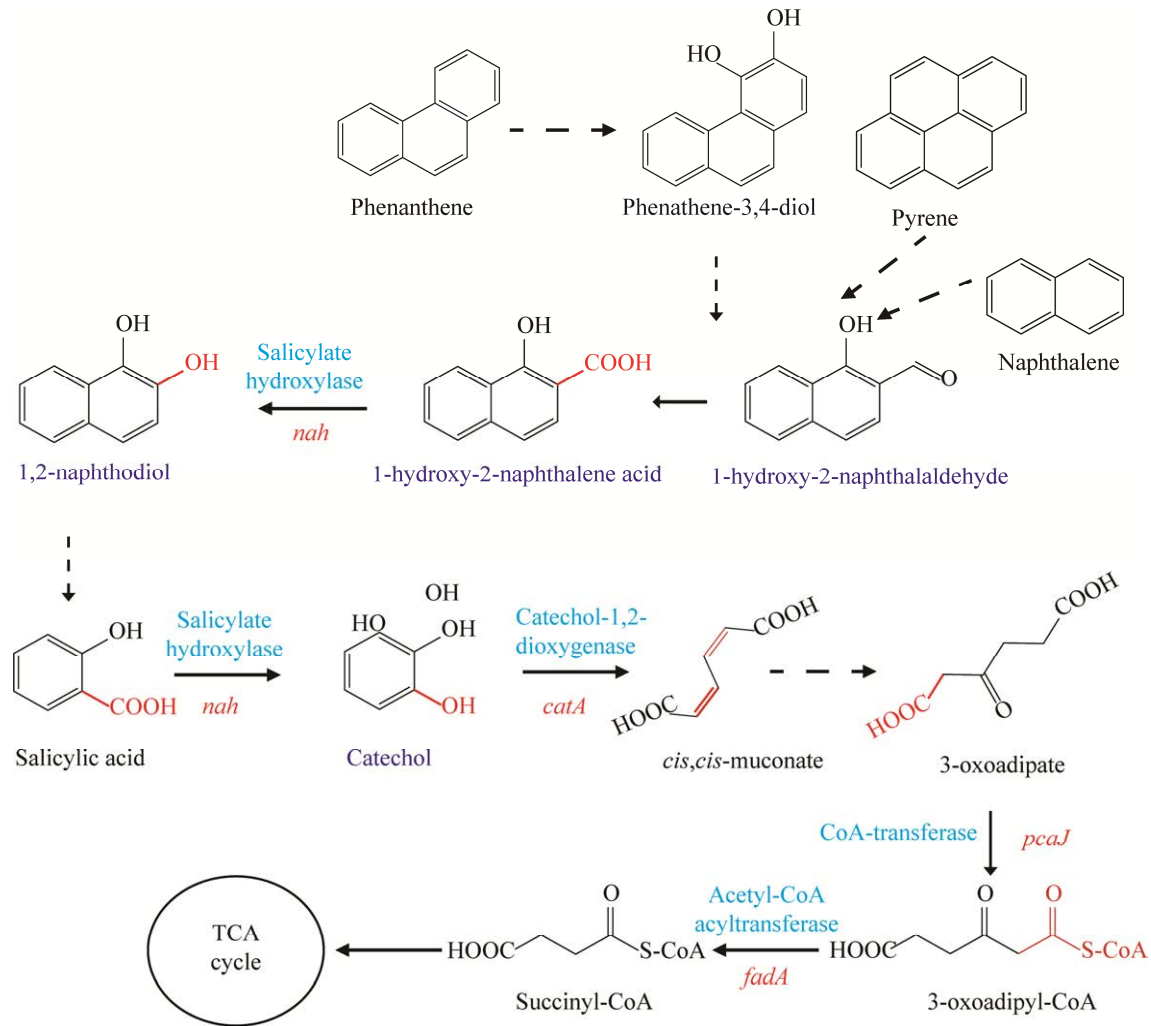


图 8 *Aquabacter sediminis* P-9^T 的 PAHs 降解途径

Figure 8 Proposed biodegradation pathways of PAHs by strain *Aquabacter sediminis* P-9^T. The dotted and solid arrows represent multi-step and one-step reactions, respectively. Red italic and blue font means genes and enzymes. Detected products are marked in purple and bold.

参考文献

[1] ZHANG CJ, PAN J, DUAN CH, WANG YM, LIU Y, SUN J, ZHOU HC, SONG X, LI M. Prokaryotic diversity in mangrove sediments across southeastern China fundamentally differs from that in other biomes[J]. *mSystems*, 2019, 4(5): e00442-e00419.

[2] 张禹, 刁晓平, 黎平, 程华民, 王海花, 项楠, 李森楠. 东寨港表层海水中多环芳烃(PAHs)的分布特征及来源分析[J]. *生态环境学报*, 2016, 25(11): 1779-1785.

ZHANG Y, DIAO XP, LI P, CHENG HM, WANG HH, XIANG N, LI SN. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater from coastal

areas of the Dongzhai Harbor[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2016, 25(11): 1779-1785 (in Chinese).

[3] 何森华, 郭洁, 张起源, 郭佳, 赵建刚, 刘谓承. 湛江红树林沉积物中 PAHs 的来源及风险评价[J]. *环境科学与技术*, 2021, 44(12): 211-218.

HE SH, GUO J, ZHANG QY, GUO J, ZHAO JG, LIU XC. Sources and ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of Zhanjiang mangroves[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 44(12): 211-218 (in Chinese).

[4] 曾小康, 李凤兰, 周凯, 杨骏达, 郝文龙, 咎启杰, 雷安平. 深圳坝光红树林沉积物和植物多环芳烃的分

- 布[J]. 环境科学与技术, 2013, 36(S2): 368-373.
- ZENG XK, LI FL, ZHOU K, YANG JD, HAO WL, ZAN QJ, LEI AP. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and plants of mangrove in baguang, Shenzhen[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 36(S2): 368-373 (in Chinese).
- [5] MASTRANGELO G, FADDA E, MARZIA V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104(11): 1166-1170.
- [6] SAMANTA SK, SINGH OV, JAIN RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(6): 243-248.
- [7] ROGOFF MH. Oxidation of aromatic compounds by bacteria[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 1961, 3: 193-221.
- [8] 周子康, 崔洁, 许平, 唐鸿志. 细菌降解低分子量多环芳烃的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2069-2080.
- ZHOU ZK, CUI J, XU P, TANG HZ. Progress in biodegradation of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(11): 2069-2080 (in Chinese).
- [9] 张丹, 李兆格, 包新光, 李江波, 梁海华, 段康民, 沈立新. 细菌降解萘、菲的代谢途径及相关基因的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(6): 726-734.
- ZHANG D, LI ZG, BAO XG, LI JB, LIANG HH, DUAN KM, SHEN LX. Recent advances in bacterial biodegradation of naphthalene, phenanthrene by bacteria: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(6): 726-734 (in Chinese).
- [10] 蔡丽希, 陈小萍, 刘黎星. 红树林沉积物中芘降解菌群及其代谢质粒转化菌的研究[J]. *生物学杂志*, 2018, 35(3): 39-42.
- CAI LX, CHEN XP, LIU LX. Effects of the pyrene degradation by microbial consortium and the transformed bacteria in Mangrove sediment[J]. *Journal of Biology*, 2018, 35(3): 39-42 (in Chinese).
- [11] 赵梦飞. 红树林沉积物中苯并(a)芘降解菌群及功能基因研究[D]. 汕头: 汕头大学硕士学位论文, 2021.
- ZHAO MF. The bacterial communities and functional genes involved in Benzo(a)pyrene degradation from mangrove sediments[D]. Shantou: Master's Thesis of Shantou University, 2021 (in Chinese).
- [12] 梁静南, 刘一苇, 谢家仪. 制备细菌类单细胞生物扫描电镜样品方法的改进[J]. *电子显微学报*, 2013, 32(3): 276-278.
- LIANG JN, LIU YW, XIE JY. The improvement of bacteria sample preparation method for scanning electron microscope observation[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2013, 32(3): 276-278 (in Chinese).
- [13] HIRAIISHI A. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1992, 15(5): 210-213.
- [14] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, CHRISTENSEN H, ARAHAL DR, Da COSTA MS, ROONEY AP, YI HN, XU XW, de MEYER S, TRUJILLO ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461-466.
- [15] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [16] THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673-4680.
- [17] ZHANG W, SUN ZR. Random local neighbor joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 47(1): 117-128.
- [18] RZHETSKY A, NEI M. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, 9(5): 945.
- [19] FELSENSTEIN J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, 17(6): 368-376.
- [20] YOON SH, HA SM, LIM J, KWON S, CHUN J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [21] MEIER-KOLTHOFF JP, KLENK HP, GÖKER M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 352-356.
- [22] DUO JL, CHA QY, ZHOU XK, ZHANG TK, QIN SC, YANG PX, ZHU ML, MO MH, DUAN YQ. *Aquabacter cavernae* sp. nov., a bacterium isolated from cave soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(12): 3716-3722.

- [23] IRGENS RL, KERSTERS K, SEGERS P, GILLIS M, STALEY JT. *Aquabacter spiritensis*, gen. nov., sp. nov. an aerobic, gas-vacuolate aquatic bacterium[J]. Archives of Microbiology, 1991, 155(2): 137-142.
- [24] WIEGEL J, WILKE D, BAUMGARTEN J, OPITZ R, SCHLEGEL HG. Transfer of the nitrogen-fixing hydrogen bacterium *Corynebacterium autotrophicum* baumgarten et al. to *Xanthobacter* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1978, 28(4): 573-581.
- [25] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, GUREVICH AA, DVORKIN M, KULIKOV AS, LESIN VM, NIKOLENKO SI, PHAM S, PRJIBELSKI AD, PYSHKIN AV, SIROTKIN AV, VYAHHI N, TESLER G, ALEKSEYEV MA, PEVZNER PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology, 2012, 19(5): 455-477.
- [26] PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes[J]. Genome Research, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [27] TATUSOVA T, DiCUCCIO M, BADRETDIN A, CHETVERNIN V, NAWROCKI EP, ZASLAVSKY L, LOMSADZE A, PRUITT KD, BORODOVSKY M, OSTELL J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(14): 6614-6624.
- [28] CAPOTORTI G, CESTI P, LOMBARDI A, GUGLIELMETTI G. Formation of sulfate conjugates metabolites in the degradation of phenanthrene, anthracene, pyrene and benzo[a]pyrene by the ascomycete *Aspergillus terreus*[J]. Polycyclic Aromatic Compounds, 2005, 25(3): 197-213.
- [29] ZHU RY, XU XF, SHAN QY, WANG KL, CAO G, WU X. Determination of differentiating markers in coicis *Semen* from multi-sources based on structural similarity classification coupled with UPCC-xevo G2-XS QTOF[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 549181.
- [30] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [31] CHEN S, YIN H, YE J, PENG H, LIU Z, DANG Z, CHANG J. Influence of co-existed benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* during biodegradation and transformation[J]. Bioresource Technology. 2014, 158: 181-187.
- [32] HARAYAMA S, REKIK M, BAIROCH A, NEIDLE EL, ORNSTON LN. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal benABC and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid xylXYZ, genes encoding benzoate dioxygenases[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(23): 7540-7548.
- [33] EHRT S, SCHIRMER F, HILLEN W. Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250[J]. Molecular Microbiology, 1995, 18(1): 13-20.
- [34] ELSHAHED MS, BHUPATHIRAJU VK, WOFFORD NQ, NANNY MA, McINERNEY MJ. Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate by “*Syntrophus aciditrophicus*” strain SB in syntrophic association with H₂-using microorganisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1728-1738.
- [35] KIM SJ, KWEON O, JONES RC, EDMONDSON RD, CERNIGLIA CE. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. Biodegradation, 2008, 19(6): 859-881.
- [36] YOU IS, GHOSAL D, GUNSALUS IC. Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (*nahG*) and its 3'-flanking region[J]. Biochemistry, 1991, 30(6): 1635-1641.
- [37] NODA Y, NISHIKAWA S, SHIOZUKA K, KADOKURA H, NAKAJIMA H, YODA K, KATAYAMA Y, MOROHOSHI N, HARAGUCHI T, YAMASAKI M. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(5): 2704-2709.
- [38] LIN M, HU X, CHEN W, WANG H, WANG C. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014, 94: 176-181.
- [39] SEO JS, KEUM YS, HU YT, LEE SE, LI QX. Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: initial

- 1,2-,3,4- and 9,10-dioxygenation, and *meta*- and *ortho*-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(11): 2388-2394.
- [40] 李玫, 廖宝文. 红树林湿地土壤萘降解菌的分离与鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(13): 7663-7664, 7679.
LI M, LIAO BW. Isolation and identification of naphthalene-degrading strains from mangrove wetland soil[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(13): 7663-7664, 7679 (in Chinese).
- [41] 李玫, 廖宝文, 陈玉军. 红树林湿地石油降解菌群的构建[J]. *生态科学*, 2012, 31(5): 553-557.
LI M, LIAO BW, CHEN YJ. Construction of petroleum-degrading bacterial consortium from mangrove sediments[J]. *Ecological Science*, 2012, 31(5): 553-557 (in Chinese).
- [42] 吴霜, 刘聪, 杨立芳, 龙寒, 禩金彩, 姜明国. 3株红树林土壤来源菲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.
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).
- [43] 龚莹, 王海花, 马思远, 林雨彬, 刁晓平. 海南红树林沉积物中多环芳烃降解菌群组成及降解率的比较研究[J]. *生态环境学报*, 2020, 29(5): 1005-1013.
GONG Y, WANG HH, MA SY, LIN YB, DIAO XP. Comparative study on the degradation rates of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) degradation bacteria in mangrove sediments in Hainan[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2020, 29(5): 1005-1013 (in Chinese).
- [44] NALOKA K, POLRIT D, MUANGCHINDA C, THOETKIATTIKUL H, PINYAKONG O. Bioballs carrying a syntrophic *Rhodococcus* and *Mycolicibacterium* consortium for simultaneous sorption and biodegradation of fuel oil in contaminated freshwater[J]. *Chemosphere*, 2021, 282: 130973.
- [45] YANG J, GU YJ, CHEN ZG, SONG Y, SUN FF, LIU J, WAIGI MG. Colonization and performance of a pyrene-degrading bacterium *Mycolicibacterium* sp. Pyr9 on root surfaces of white clover[J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 127918.
- [46] GOLUBEV SN, MURATOVA AY, PANCHENKO LV, SHCHYOGOLEV SY, TURKOVSKAYA OV. *Mycolicibacterium* sp. strain PAM1, an alfalfa rhizosphere dweller, catabolizes PAHs and promotes partner-plant growth[J]. *Microbiological Research*, 2021, 253: 126885.
- [47] 刘聪洋, 王美妮, 张佳梦, 钱袖粉, 肖锟, 王仁女, 董伟, 潘涛. 一株多环芳烃降解菌及其在多种强化体系中降解菲的潜力[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3696-3707.
LIU CY, WANG MN, ZHANG JM, QIAN YF, XIAO K, WANG RN, DONG W, PAN T. A polycyclic aromatic hydrocarbon degrading strain and its potential of degrading phenanthrene in various enhanced systems[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3696-3707 (in Chinese).
- [48] SAMANTA SK, CHAKRABORTI AK, JAIN RK. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 53(1): 98-107.
- [49] LAURIE AD, LLOYD-JONES G. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(2): 531-540.