

红树林根际土壤中耐高盐苯酚降解菌的分离鉴定

曹宏明^{1,3} 龚 斌^{2,3*} 朱丽娟³ 潘贵妮³ 刘飞琪³ 李世盛³

(1.广西北部湾海洋灾害研究重点实验室 广西 钦州 535011; 2.广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西 钦州 535011; 3.北部湾大学海洋学院 广西 钦州 535011)

摘要: 苯酚对海洋生态环境具有较大的威胁,从红树林根际土壤中分离获得对环境具有高适应性的高效芳烃降解菌具有重要的意义。本研究对北部湾红树林根际土壤中的苯酚降解菌进行富集培养,经过分离纯化得到30株菌株,筛选得到5株菌株FGYS1、FGYS7、FGYS11、FGYB1和FGYB5,可耐受70 g/L NaCl的高盐环境,最高可降解1 500 mg/L的苯酚。采用形态观察、BOX-PCR菌种多样性分析、16S rRNA序列分析等方法对菌株进行鉴定,均为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。菌株FGYS1、FGYS7和FGYS11为同一种假单胞菌,与*Pseudomonas extremaustralis* 14-3^T和*Pseudomonas meridiana* CMS 38^T的16S rRNA序列相似性分别达到99.71%和99.64%。菌株FGYB1和FGYB5为同一种假单胞菌,分别与*Pseudomonas veronii* DSM 11331^T和*Pseudomonas extremaustralis* 14-3^T的16S rRNA序列相似性均达到99.64%。16S rRNA序列的系统发育树分析表明菌株FGYS1、FGYS7、FGYS11、FGYB1和FGYB5在进化上与*P. veronii*为同一个分支,而与假单胞菌属其他模式菌株的序列进化关系相距较远。菌株FGYS1降解苯酚的适宜温度为25~35℃、适宜pH为4~6、最高耐NaCl含量为60 g/L;菌株FGYB1降解苯酚的适宜温度为25~35℃、适宜pH为4~6、最高耐NaCl含量为100 g/L,两株菌株对pH、温度和盐度的适应范围较广。菌株FGYS1和FGYB1还可以同时降解邻苯二酚、对苯二酚和间苯二酚。本研究分离得到的苯酚降解菌在应对红树林芳烃污染和生态环境修复方面显示了较大的潜力。

关键词: 海洋生物学; 红树林根际土壤; 苯酚; 微生物降解; 环境因素

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4972.2021.02.001

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2021)02-0179-10

苯酚是一种常见的工业原料,对动物具有明显的急慢性毒性^[1-4]。在海洋环境中,苯酚广泛存在于海水^[5]、沉积物^[6]及各种海洋生物体内^[7-8],对海洋生态环境具有潜在的威胁。近10年来,许多研究者分离出上百种能降解苯酚的微生物,并对菌株的降解特性和降解形式做了全面深入的研究^[9-14]。国内外已分离和鉴定的苯酚降解菌有芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[15]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[11-12,16-17]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[18]、无色杆菌属(*Achro-*

mobacter)^[19]等,真菌有镰刀菌属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)^[20]、罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*)等^[21]。但是,从海洋环境中分离降解苯酚的微生物的研究还比较少,胡忠等(2007)报道从海洋沉积物中分离、筛选到一株能以苯酚作为唯一碳源和能源的假丝酵母菌(*Candida* sp.),其能在较高含量的苯酚条件下生长,在72 h内可以降解苯酚95%以上^[22]。Fumihisa等(2012)从海洋动物体内分离的细菌*Acinetobacter* sp. EBR01和*Acineto-*

收稿日期: 2019-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560727); 广西自然科学基金资助项目(2018JJA130187, 2020GXNSFDA238015); 广西高校中青年
教师基础能力提升项目资助项目(2017KY0778); 广西北部湾海洋灾害研究重点实验室资助项目(2017ZD01); 国家级大学生创新
创业训练计划资助项目(201811607038); 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室自主课题资助项目(2021ZA01)

作者简介: 曹宏明(1976—)男,博士,副教授; E-mail: caohm@bbgu.edu.cn

* 通讯作者: 龚斌(1979—)男,博士,教授; E-mail: 342965691@qq.com

bacter sp. EBR02 可以降解海水中的苯酚^[23]。Hideshi 等(1992)从高盐的样品中分离得到嗜热嗜盐的苯酚降解菌嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)和根瘤菌科的细菌^[24]。Sivasubramanian 等(2016)从红树林蟹类肠道中分离到的降酚菌包括假单胞菌属、芽孢杆菌属和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)^[25]。Zhou 等(2016)从太平洋的热液喷口中分离到苯酚降解菌嗜酸硫杆菌 *Sulfobacillus acidophilus*, 该菌通过 Meta 通路实现对苯酚的降解^[26]。

广西北部湾是我国海洋生态环境保护地最好的区域之一,拥有我国最大面积的红树林保护区和白海豚、鲎等珍稀物种。然而近年来,随着临海工业的发展,海洋环境也面临着一定威胁。例如 Wang 等(2017)报道对 35 份茅尾海的表层沉积物样品进行 20 种目标氯化多环芳香烃化合物检测,发现有 18 种同系物被检出^[27]。因此非常有必要从海洋环境中分离高效苯酚降解菌并进行深入研究。本研究从广西北部湾红树林根际土壤中分离出能高效降解苯酚的菌种,并研究其降解特性,可为海洋生态环境修复工程提供一定的理论依据,对海洋生态系统保护、健康化养殖、海岸带养护等都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 培养基和试剂

LB 培养液:胰蛋白胨 10 g、酵母粉 10 g、NaCl 5 g、蒸馏水定容至 1 L。无机盐培养基: NH_4NO_3 1.0 g、 CaCl_2 0.1 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、NaCl 10 g、 MgSO_4 0.25 g、海水晶 15 g,蒸馏水定容至 1 L。高盐(70 g/L NaCl)无机盐培养基:前述无机盐培养基中 NaCl 增加至 55 g 即可。

1.2 细菌的富集和分离

本实验所用菌株采自山口红树林国家级自然保护区、北海金海湾红树林、广西茅尾海红树林自然保护区的红树林根际土壤。各取 20 g 采集的土壤样本加入 100 mL 苯酚含量为 400 mg/L 的高盐无机盐培养基中,放入恒温振荡培养箱中,培养条件为 28 °C、150 r/min,培养 7 d。移取培养液 1 mL 加入装有 100 mL 高盐无机盐培养基的锥形瓶中,加入苯酚作为唯一碳源,连续转接富集培养 4 次,苯酚梯度依次递增为 800、1 200、1 500、2 000 mg/L,最后取各梯度富集培养液涂布到 500 mg/L 苯酚为碳源的无机盐培养基平板上,28 °C 培养 5 d 后挑取形态上有差异的单菌落在含量为 500 mg/L 苯酚为碳源的无机盐培养基平板上划线分离培养,得到纯种的菌株,再测定其苯酚降解特性。

1.3 菌体生物量和苯酚含量的测定

取 5 mL 培养液于 12 000 r/min 下离心 10 min 后,用空白无机盐培养基作为参比,沉淀以等量蒸馏水悬浮后测定其 OD_{600} 值,用来表示菌体生物量;上清液用于苯酚含量的测定,采用 4-氨基安替比林法进行^[28]。

1.4 菌株的鉴定

菌株的生理生化特性鉴定参照文献^[29]进行,菌株 16S rRNA 基因序列的扩增、测定和同源性比较参照文献进行^[30]。

1.4.1 降解菌株的 16S rRNA 与 *gyrB* PCR 扩增与测序 选取降解率高、生长速度快的不同种属的菌株进行基因扩增,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Phygene)方法提取菌株 DNA,以基因组 DNA 作为模板,进行菌株的 16S rRNA 和 *gyrB* PCR 扩增,16S rRNA 基因扩增引物参考文献^[31], *gyrB* 基因扩增引物参考文献^[32]。反应体系(50 μL): 2 $\times$ Taq Master-Mix 25 μL , 细菌通用引物 4 μL , 模板 1 μL , 超纯水 20 μL ; 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 12 °C 保存。扩增产物送去南京金斯瑞生物科技有限公司测序,16S rRNA 序列用 EzBioCloud 数据库进行同源性比较, *gyrB* 序列在 GenBank 数据库中用 NCBI-BLAST 软件进行同源性比较。取同源性较高的序列,用 Mega 5.0 软件构建系统发育树。

1.4.2 菌株 DNA BOX-PCR 遗传多样性分析 本研究 BOX-PCR 引物参考文献^[33]。10 μL 反应体系: 2 $\times$ Taq MasterMix 5 μL , 引物 2 μL , 模板 1 μL , 超纯水 2 μL 。BOX-PCR 反应程序: 95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 65 °C 延伸 8 min, 30 个循环; 65 °C 延伸 18 min, 12 °C 保存。

1.5 苯酚降解菌的降解特性

1.5.1 苯酚降解曲线 取在 20% 甘油中保藏的苯酚降解菌种 100 μL 接入 5 mL 的 LB 培养液中过夜活化,然后转接 1 mL 菌液加入苯酚含量为 1 000 mg/L 的无机盐培养基中,放入 28 °C、150 r/min 的摇床中培养。分时段取样测定苯酚降解率及菌体 OD_{600} 值。

1.5.2 环境因素影响 分别研究温度(20、25、30、35、40 °C)、pH(2、4、6、8、10)、NaCl 含量(20、40、60、80、100 g/L)对菌株苯酚降解率的影响。

1.5.3 降解谱的测定 分别向以含量为 200 mg/L 的邻苯二酚、对苯二酚、蒽、萘、甲苯、二甲苯、苯甲酸钠、邻二氯苯和间苯二酚为唯一碳源的无机盐培养基中,按 1:50(V/V)接入活化的降解菌,于 28 °C、150 r/min 的摇床中培养。用紫外分光光度计在 200 nm

波长下测定培养上清液中上述芳香化合物的含量,结合细菌的生长情况,判断苯酚降解菌的降解谱。

2 结果与讨论

2.1 红树林根际土壤中苯酚降解菌的分离

经对山口红树林国家级自然保护区、北海金海湾红树林、茅尾海红树林自然保护区的红树林根际土壤分别富集培养,得到苯酚降解菌 30 株。从山口红树林国家级自然保护区根际土壤中纯化了 16 株,其中耐高盐(70 g/L NaCl)环境降解菌有 11 株;从北海金海湾红树林自然保护区根际土壤中纯化了

11 株,耐高盐(70 g/L NaCl)环境有 6 株;从茅尾海红树林自然保护区土壤中纯化了 3 株,都不能耐高盐(70 g/L NaCl)环境。经过 BOX-PCR 实验证明,这 30 株菌株具有相似的电泳多态性特征。30 株菌株的苯酚降解率如表 1 所示,当苯酚含量为 1 000 mg/L 时,有 5 株苯酚降解菌在 48 h 后降解率达 80%以上,降解苯酚的效率比较高。这 5 株菌株都能耐受 70 g/L NaCl 的高盐环境,其中 3 株来自山口红树林国家级自然保护区,有 2 株来自北海金海湾红树林自然保护区,编号分别是 FGYS1、FGYS7、FGYS11、FGYB1 和 FGYB5。

表 1 红树林根际土壤中苯酚降解菌的降解率

Tab. 1 Degrading rate of phenol-degrading bacteria from rhizosphere soil of mangrove

菌株编号	分离地点	耐高盐	OD_{600} 值	降解率/%
FS1	山口红树林国家级自然保护区	-	0.428	25
FS2	山口红树林国家级自然保护区	-	0.645	42
FS3	山口红树林国家级自然保护区	-	0.509	49
FS4	山口红树林国家级自然保护区	-	0.481	41
FS5	山口红树林国家级自然保护区	-	0.613	46
FB1	北海金海湾红树林自然保护区	-	0.537	56
FB2	北海金海湾红树林自然保护区	-	0.412	28
FB3	北海金海湾红树林自然保护区	-	0.490	54
FB4	北海金海湾红树林自然保护区	-	0.575	50
FB5	北海金海湾红树林自然保护区	-	0.420	29
FM1	茅尾海红树林自然保护区	-	0.524	29
FM2	茅尾海红树林自然保护区	-	0.420	39
FM3	茅尾海红树林自然保护区	-	0.676	57
FGYS1	山口红树林国家级自然保护区	+	1.068	97
FGYS2	山口红树林国家级自然保护区	+	0.446	41
FGYS3	山口红树林国家级自然保护区	+	0.564	53
FGYS4	山口红树林国家级自然保护区	+	0.552	46
FGYS5	山口红树林国家级自然保护区	+	0.484	43
FGYS6	山口红树林国家级自然保护区	+	0.483	41
FGYS7	山口红树林国家级自然保护区	+	1.183	98
FGYS8	山口红树林国家级自然保护区	+	0.537	56
FGYS9	山口红树林国家级自然保护区	+	0.576	50
FGYS10	山口红树林国家级自然保护区	+	0.615	52
FGYS11	山口红树林国家级自然保护区	+	0.785	83
FGYB1	北海金海湾红树林自然保护区	+	0.799	85
FGYB2	北海金海湾红树林自然保护区	+	0.681	57
FGYB3	北海金海湾红树林自然保护区	+	0.564	37
FGYB4	北海金海湾红树林自然保护区	+	0.466	51
FGYB5	北海金海湾红树林自然保护区	+	0.967	96
FGYB6	北海金海湾红树林自然保护区	+	0.710	55

注 “+”表示能耐高盐,在 70 g/L NaCl 条件下菌株能生长,“-”表示不能生长; OD_{600} 值为细菌在苯酚含量为 1 000 mg/L 的无机盐培养基中生长情况。

2.2 高效苯酚降解菌株的鉴定

经过鉴定分离到的 5 株苯酚降解菌菌落光滑,革兰氏染色为阴性,呈杆状,能运动,不能发酵葡萄糖。提取菌株 FGYS1、FGYS7、FGYS11、FGYB1 和 FGYB5 的总 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增。通过 Clustal W 软件多序列比对分析表明,来自山口红树林国家级自然保护区的菌株 FGYS1、FGYS7 和 FGYS11 的 16S rRNA 序列完全相同,而来自北海金海湾红树林自然保护区的菌株 FGYB1 和 FGYB5 16S rRNA 序列完全相同,而以上两组序列仅在 3 个位点存在差异。

将菌株的序列与 EzBioCloud 数据库中的细菌

16S rRNA 序列进行相似性比较,5 株苯酚降解菌均属于假单胞菌属。菌株 FGYS1、FGYS7 和 FGYS11 与假单胞菌 *Pseudomonas extremaustralis* 14-3^T 和 *Pseudomonas meridiana* CMS 38^T 的 16S rRNA 序列相似性分别达到 99.71% 和 99.64%。菌株 FGYB1 和 FGYB5 与假单胞菌 *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T 和 *Pseudomonas extremaustralis* 14-3^T 的 16S rRNA 序列相似性均达到 99.64%。通过 16S rRNA 序列的系统发育树分析,结果表明菌株 FGYS1、FGYS7、FGYS11、FGYB1 和 FGYB5 在进化上与 *P. veronii* 为同一个分支(图 1)。

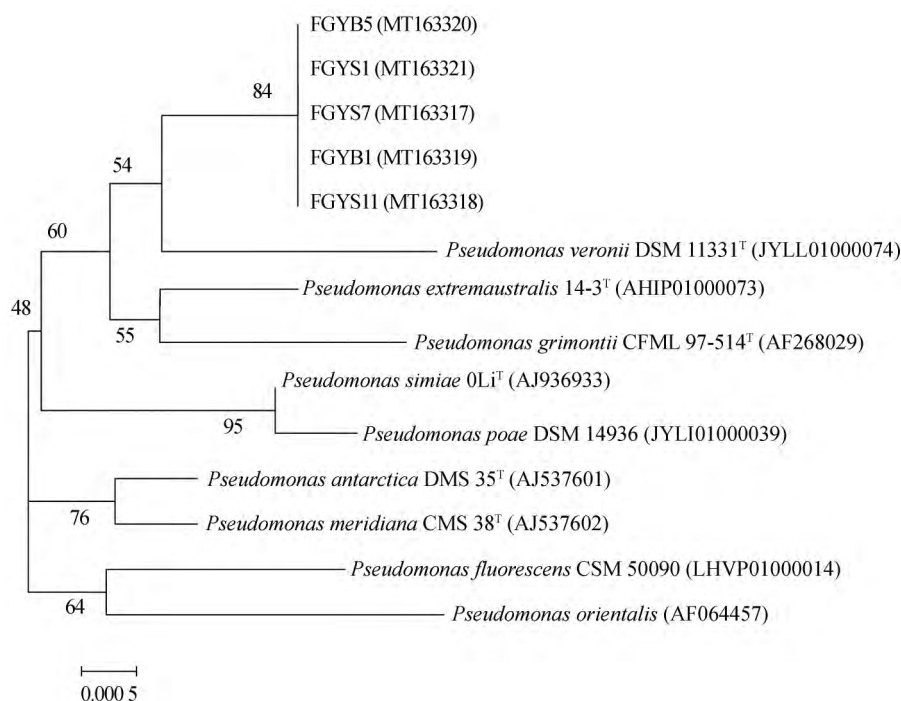


图 1 苯酚降解菌 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of the phenol-degrading bacteria

经检测菌株 FGYS1 与假单胞菌 *Pseudomonas extremaustralis* DSM 17835^T 的 *gyrB* 序列相似度最高,为 92%。通过对菌株 FGYS1 与 GenBank 数据库中其他 *gyrB* 序列的比对分析,我们构建了基于 *gyrB* 序列相似性的系统发育树,结果表明菌株 FGYS1 与假单胞菌 *Pseudomonas extremaustralis* DSM 17835^T 在同一个分支(图 2)。

2.3 苯酚降解特性

2.3.1 苯酚降解菌的降解能力 菌株 FGYS1 可 3 d 后完全降解 1 500 mg/L 苯酚,菌株 FGYB1 可 5 d 后完全降解 1 500 mg/L 苯酚。以含量为 1 000 mg/L 的苯酚作为唯一碳源,菌株 FGYS1 和 FGYB1 在 40 h 时将苯酚完全降解(图 3)。两株菌株的生长速

度和其对苯酚的降解率均呈线性增长,菌株 FGYS1 在 30 h 时苯酚的降解率达到 79%,菌株 FGYB1 在 30 h 时苯酚的降解率为 63%,菌株 FGYS1 的降解速度快于菌株 FGYB1。

2.3.2 环境因素对菌株苯酚降解率的影响 微生物的生长和降解特性对环境条件的变化较为敏感,本研究探讨了温度、盐度和 pH 等因素对菌株 FGYS1 和 FGYB1 生长速度及降解苯酚性能的影响。如图 4(a) 所示,菌株 FGYS1 在 20~30 ℃ 时,其菌体生长速度和对苯酚的降解率均随温度的升高而增大,在 30~35 ℃ 时对苯酚的降解率和生长速度达到最大;当苯酚的初始含量为 500 mg/L 时在 24 h 时将苯酚完全降解,而高于 35 ℃ 时随温度的上升苯酚

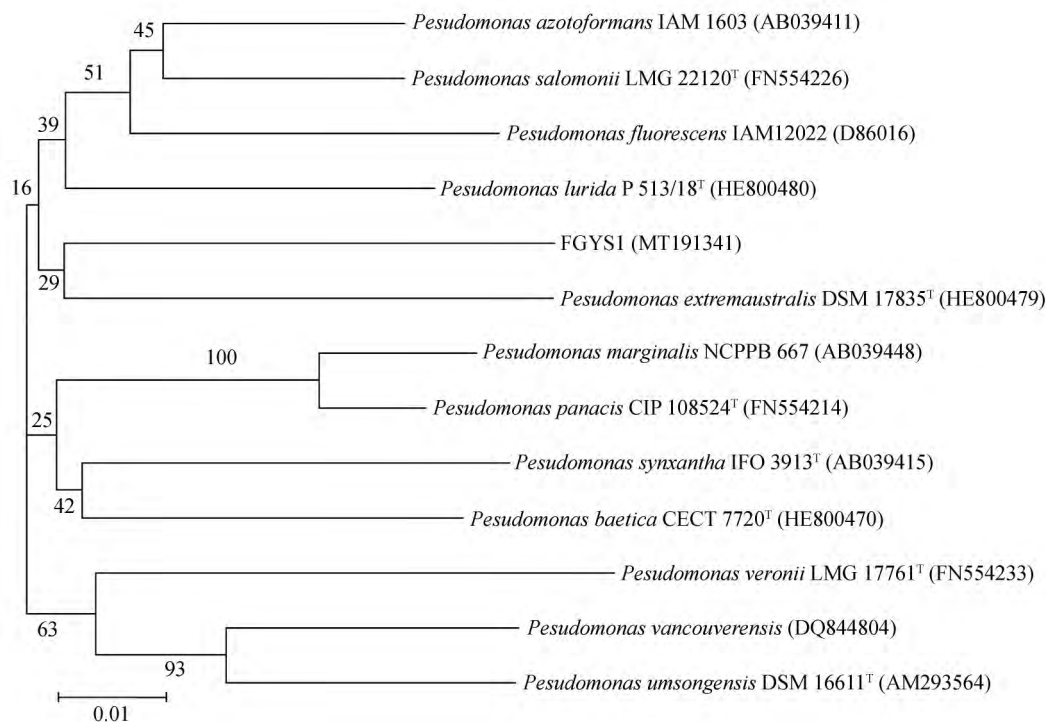
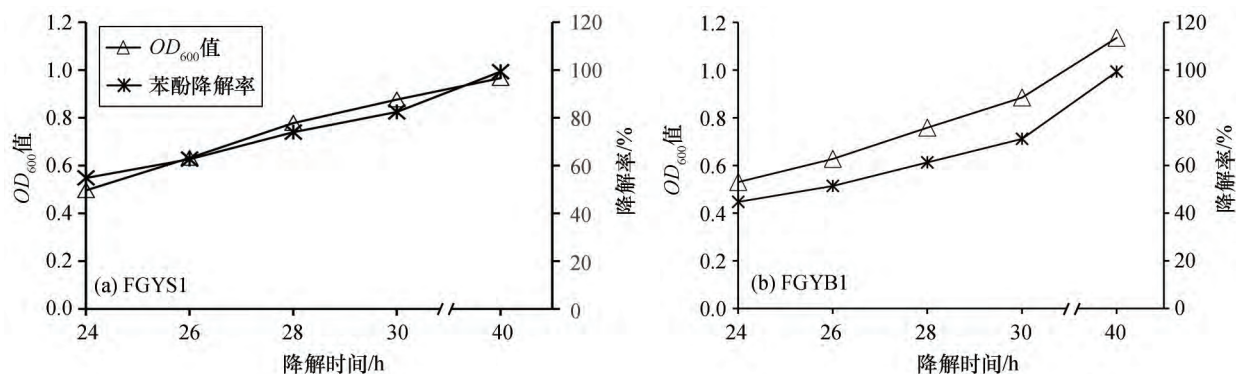
图2 苯酚降解菌 *gyrB* 序列系统发育树Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of *gyrB* gene sequence of the phenol-degrading bacteria

图3 苯酚降解菌生长曲线及其对苯酚的降解率

Fig. 3 Growth curves and phenol degradation by strains FGYS1 and FGYB1

的降解率明显降低;如图4(b)所示,菌株FGYB1在20~25℃时菌体生长速度和对苯酚的降解率随温度升高而增大,在25~30℃时对苯酚的降解率和生长速度达到最大;当苯酚的初始含量为500 mg/L时在24 h将苯酚完全降解,而高于30℃时随温度的上升苯酚的降解率明显降低。

pH对苯酚降解率影响的实验结果(图5)表明,当溶液中苯酚含量为1 000 mg/L时,菌株FGYS1在初始pH为2~4时生长速度和对苯酚的降解率随pH的增大而升高,在pH为4时苯酚降解率达到最高(66%),此时菌体生物量也达最大

(OD_{600} 值为0.779),最适pH为4。当pH大于4时,随着pH的增大,菌株FGYS1的生长速度和对苯酚的降解率呈下降之势。菌株FGYB1在初始pH为2~4时菌体生长速度和对苯酚的降解率随pH的增大而升高,在pH为4时达到最高,随后菌体生长速度和苯酚降解率随pH值的增大而降低。以上结果说明,两株菌株在酸性条件下生长情况和降酚能力较好,在偏碱性条件下生长缓慢且苯酚降解率下降。

菌株FGYS1在NaCl含量为20~40 g/L时菌株降解苯酚效果好[图6(a)],24 h后对含量为

500 mg/L 的苯酚降解率可达 100%; 在 NaCl 含量大于 40 g/L 时, 菌株的生长速度和对苯酚的降解率开始受到抑制。经培养 72 h 后, 苯酚在 NaCl 含量为 60 g/L 的条件下可被完全降解, 在 NaCl 含量为 80 g/L 时 5 d 后可被完全降解, 在 NaCl 含量为 100 g/L 的情况下菌株生长速度和降解率都受到严重抑制。菌株 FGYS1 的生长速度和对苯酚的降解

率随 NaCl 含量的增大而下降 [6(b)], 但在 NaCl 含量为 100 g/L 时培养 4 d 后 500 mg/L 苯酚也能被完全降解。说明高盐度影响降解菌的生长速度和对苯酚的降解率, NaCl 含量大于 40 g/L 时明显延缓了苯酚的降解速度, 但两株菌株都有很强的耐高盐能力。

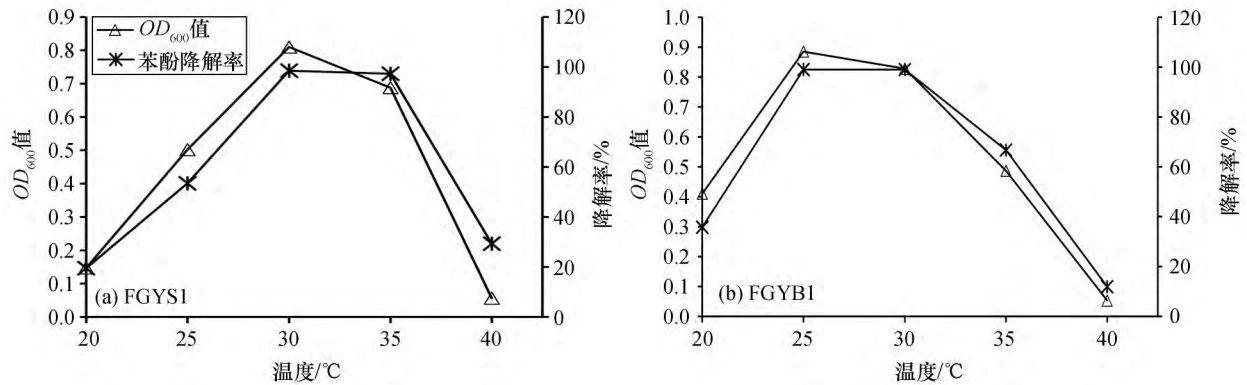


图 4 温度对苯酚降解菌的降解率与生长的影响

Fig. 4 Effects of temperature on phenol degradation and growth by strains FGYS1 and FGYS1

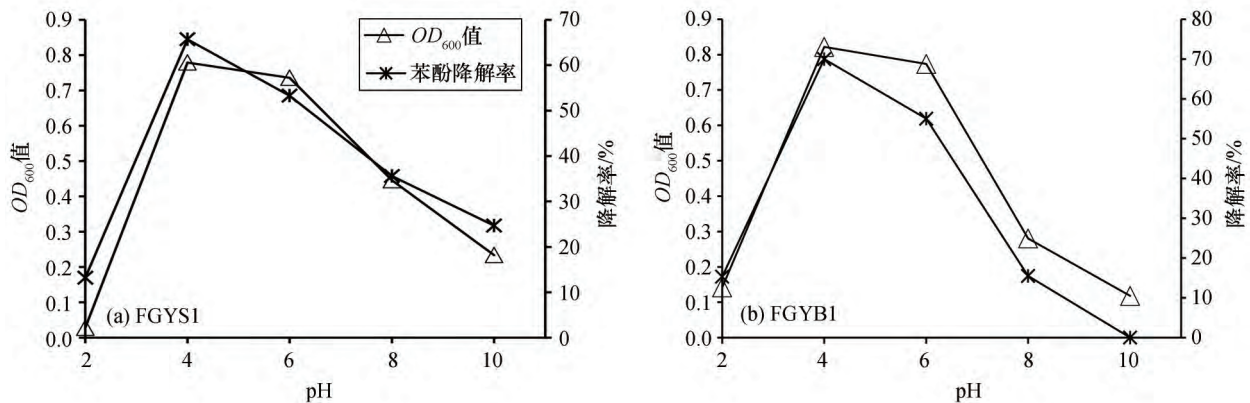


图 5 pH 对苯酚降解菌的降解率与生长的影响

Fig. 5 Effects of pH value on phenol degradation and growth by strains FGYS1 and FGYS1

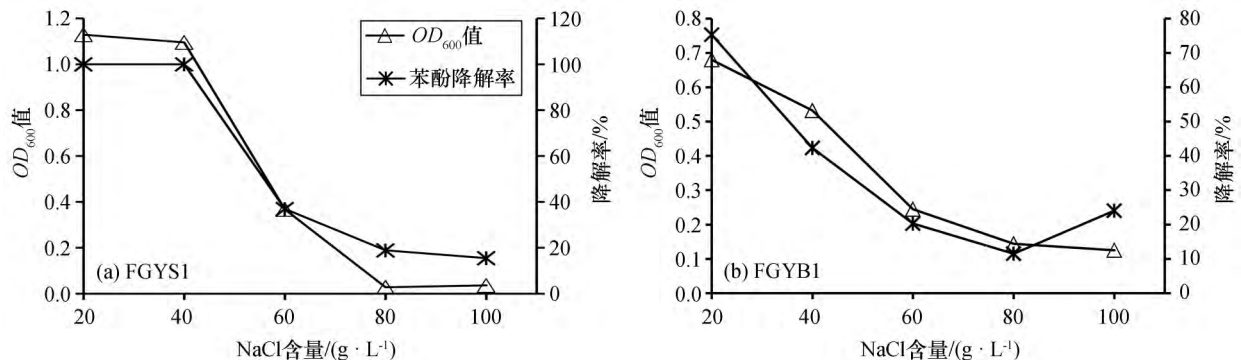


图 6 NaCl 含量对苯酚降解菌的降解率与生长的影响

Fig. 6 Effects of sodium chloride concentration on phenol degradation and growth by strains FGYS1 and FGYS1

2.3.3 苯酚降解菌的降解谱 研究表明,苯酚降解菌 FGYS1 和 FGYB1 的降解谱相同。在有机物含量为 200 mg/L 时,菌株 FGYS1 和 FGYB1 能够分别在以邻苯二酚、对苯二酚和间苯二酚为唯一碳源的液体无机盐培养基中生长,并将有机物完全降解。其他被检测的有机物如蒽、萘、甲苯、二甲苯、苯甲酸钠和邻二氯苯不能被降解。

2.4 讨论

随着我国经济发展,很多沿海城市布局了芳香烃类企业。广西北部湾原本是我国近海海洋环境最好的地区之一,近年来也在钦州港布局了多个芳香烃化工企业,这给环境造成了很大压力。从海洋环境中分离获得高效芳烃降解菌,不仅对海洋微生物资源的利用具有重要意义,也为海洋生态修复和保护奠定了很好的基础。研究表明,向苯酚污染的环境中引入苯酚降解菌,有利于环境的改善。例如,Ibáñez 等(2014)报道,向环境中引入一种降解酚的芽孢杆菌后,可以明显促进苯酚污染的环境中箭筈豌豆(*Vicia sativa*)根的伸长率和发芽指数,并且可以加速去除土壤中的酚污染^[34];Cordova-Rosa 等(2009)研究表明,向活性污泥中引入一种苯酚降解菌(*Acinetobacter calcoaceticus*,最高可降解苯酚含量为 1 200 mg/L),可以明显强化活性污泥的苯酚降解能力,经过 20 d 的生物强化,污泥-土壤基质的残留苯酚含量为 1.13 mg/kg^[35]。本研究从广西北部湾红树林根际土壤中分离的高效苯酚降解菌,不仅降解能力非常强(最高可降解含量为 1 500 mg/L 的苯酚),而且具有能够适应本土红树林环境的优点,还兼具耐高盐、耐酸和同时降解多种芳香化合物的特性,在应对将来红树林芳烃污染和生态环境修复方面显示了较大的潜力。

目前发现和研究比较多的假单胞菌属苯酚降解菌有 *Pseudomonas fluorescence*^[36]、*Pseudomonas aeruginosa*^[37]、*Pseudomonas putida*^[38] 和 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*^[39] 等菌株,还有其他未被鉴定到种的假单胞菌属苯酚降解菌^[40-41]。本研究从红树林根际土壤中发现的苯酚降解率最高的菌株 FGYS1 通过 16S rRNA 和 *gyrB* 序列比对分析,进化关系上

与 *P. extremaustralis* 和 *P. veronii* 关系较近。Tribelli 等(2018)的研究表明, *P. extremaustralis* 具有降解烷烃的能力^[42];另有研究发现 *P. extremaustralis* 具有很强的极端环境适应能力^[43]。*P. veronii* 曾被发现具有降解甲苯^[44]和苯^[45]的能力。但是 *P. extremaustralis* 和 *P. veronii* 目前均没有报道可以降解苯酚。

本研究从北部湾 3 个不同的红树林区根际土壤中最终筛选得到的 5 株耐高盐的高效苯酚降解菌,其 16S rRNA 序列非常接近,来自山口红树林国家级自然保护区的菌株 FGYS1、FGYS7 和 FGYS11 的 16S rRNA 序列完全相同,而来自北海金海湾红树林自然保护区的菌株 FGYB1 和 FGYB5 的 16S rRNA 序列完全相同,而以上两组序列仅在 3 个位点存在差异,这印证了 Rutger 等(2006)提出的微生物全球分布的假说(即 Baas Becking 假说),该假说认为不同环境中微生物的差异是由环境决定的^[46]。本研究中,可能苯酚降解菌的类型特征在不同红树林生境中是随机分布的,所以从北部湾几个不同红树林区根际土壤中得到的耐高盐的高效苯酚降解菌的分类地位是相同的,只是由于不同的红树林环境的选择作用,导致不同生境中的苯酚降解菌会向不同的遗传方向突变和进化。

3 结论

(1) 从北部湾红树林根际土壤中筛选到 5 株耐高盐的高效苯酚降解菌,为假单胞菌属,最高可降解含量为 1 500 mg/L 的苯酚。菌株 FGYS1 和 FGYB1 可分别 3 d 和 5 d 后完全降解 1 500 mg/L 苯酚。

(2) 菌株 FGYS1 降解苯酚的适宜温度为 25~35℃、适宜 pH 为 4~6、最高耐 NaCl 含量为 60 g/L。菌株 FGYB1 降解苯酚的适宜温度为 25~35℃、适宜 pH 为 4~6、最高耐 NaCl 含量为 100 g/L。菌株 FGYS1 和 FGYB1 对 pH、温度和盐度的适应范围较广,具有应用于苯酚污染的生态环境修复的潜力。

(3) 菌株 FGYS1 和 FGYB1 能够分别在以邻苯二酚、对苯二酚和间苯二酚为唯一碳源的液体无机盐培养基中生长。

参考文献:

- [1] 高会,张硕慧,熊德琪,等. 苯酚、苯胺对两种海洋生物的急性毒性研究[J]. 海洋环境科学, 2006, 25(1): 33-36.
GAO H, ZHANG S H, XIONG D Q, et al. Study on acute toxicities of phenol and aniline to two marine organisms[J]. Marine Environmental Science, 2006, 25(1): 33-36.
- [2] 李铁军,郭远明,薛彬,等. 苯酚和苯胺对脊尾白虾的毒性及安全评价研究[J]. 广州化工, 2014, 42(3): 84-86.
LI T J, GUO Y M, XUE B, et al. Study on acute toxicity and safety evaluation of phenol and aniline on *Exopalaemon carinicauda* [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2014, 42(3): 84-86.

- [3] SACHEM G, GUHA A, DIVAY C, et al. A cute phenol poisoning: a life-threatening hazard of chronic pain relief[J]. *Clinical Toxicology*, 2008, 46(3): 250-253.
- [4] EVANS S J. A cute phenol poisoning[J]. *British Journal of Industrial Medicine*, 1952, 9(3): 227-229.
- [5] REINEKE N, BISELLI S, FRANKE S, et al. Brominated indoles and phenols in marine sediment and water extracts from the North and Baltic Seas-concentrations and effects[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 51(2): 186-196.
- [6] 吴萍, 杨桂朋, 赵润德. 苯酚在海洋沉积物上的吸附作用[J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(4): 345-354.
WU P, YANG G P, ZHAO R D. Sorption behavior of phenol in marine sediments[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, 34(4): 345-354.
- [7] ZHOU Q X. Combined chromium and phenol pollution in a marine prawn fishery[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 62(4): 476-482.
- [8] AGOSTINI S, DESJOBERT J M, PERGENT G. Distribution of phenolic compounds in *Posidonia oceanica* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(4): 611-617.
- [9] MASSALHA N, SHAIVIV A, SABBAH I. Modeling the effect of immobilization of microorganisms on the rate of biodegradation of phenol under inhibitory conditions[J]. *Water Research*, 2010, 44(18): 5 252-5 259.
- [10] EDALATMANESH M, MEHRVAR M, DHIB R. Optimization of phenol degradation in a combined photochemical-biological wastewater treatment system[J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2008, 86(11): 1 243-1 252.
- [11] KAYMAZ A, BABAÖGLU Y, PAZARLIOĞLU A, et al. Biodegradation kinetics of o-cresol by *Pseudomonas putida* DSM 548 (pJP4) and o-cresol removal in a batch-recirculation bioreactor system[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2012, 15(1): 225-37.
- [12] NWEKE C O, OKPOKWASILI G C. Kinetics of growth and phenol degradation by *Pseudomonas* species isolated from petroleum refinery wastewater[J]. *International Journal of Biosciences*, 2014, 4(7): 28-37.
- [13] 武洪杰, 谭周亮, 刘庆华, 等. 一株高浓度苯胺-苯酚降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(2): 252-255.
WU H J, TAN Z L, LIU Q H, et al. Isolation and characterization of an aniline-degrading and phenol-degrading bacterium[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(2): 252-255.
- [14] 刘鸿杰, 何熙璞, 张敏, 等. 一株苯酚降解菌的筛选、鉴定及其降解特性[J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(3): 336-341.
LIU H J, HE X P, ZHANG M, et al. Screening, identification and degrading characteristics of a phenol degrading bacterial strain[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2011, 30(3): 336-341.
- [15] BANERJEE A, GHOSHAL A K. Biodegradation of real petroleum wastewater by immobilized hyper phenol-tolerant strains of *Bacillus cereus* in a fluidized bed bioreactor[J]. *3 Biotech*, 2016, 6(2): 137.
- [16] TOLKER-NIELSEN T, BRINCH U C, RAGAS P C, et al. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(22): 6 482-6 489.
- [17] ZILLI M, CONVERTI A, LODI A, et al. Phenol removal from waste gases with a biological filter by *Pseudomonas putida* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 41(7): 693-699.
- [18] AHMAD S A, SHAMAAN N A, ARIF N M, et al. Enhanced phenol degradation by immobilized *Acinetobacter* sp. strain AQ5NOL1 [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28(1): 347-352.
- [19] QUAN X, SHI H, ZHANG Y, et al. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp. [J]. *Separation and Purification Technology*, 2004, 34(1): 97-103.
- [20] SANTOS V L, LINARDI V R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(8): 1 001-1 006.
- [21] AZIZINIKOO P, SHAVANDI M, SOLEIMANI M, et al. Biodegradation of phenol by newly isolated phenol-degrading bacterium *Ralstonia* sp. strain PH-S1 [J]. *Journal of Petroleum Science and Technology*, 2012, 2(2): 58-62.
- [22] 胡忠, 吴奕瑞, 徐艳, 等. 海洋苯酚降解菌 *Candida* sp. P5 的分离鉴定及其降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(2): 243-247.
HU Z, WU Y R, XU Y, et al. Screening of a marine phenol-degrading yeast *Candida* sp. P5 and its biodegradation characteristics[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007, 13(2): 243-247.
- [23] FUMIHISA K, TERUYA M, YOSHITOSHI N. Biodegradation of phenol in seawater using bacteria isolated from the intestinal contents of marine creatures[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 69(3): 113-118.
- [24] YANASE H, ZUZAN K, KITA K, et al. Degradation of phenols by thermophilic and halophilic bacteria isolated from a marine brine sample[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 74(5): 297-300.
- [25] SIVASUBRAMANIAN K, RAVICHANDRAN S, VIGNESHWARAN P. Isolation of phenol-degrading bacteria from decapods mangrove crabs[J]. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, 2016, 4: 1-5.
- [26] ZHOU W G, GUO W B, ZHOU H B, et al. Phenol degradation by *Sulfobacillus acidophilus* TPY via the meta-pathway[J]. *Microbiological Research*, 2016, 190: 37-45.
- [27] WANG Y J, LIAO R Q, LIU W L, et al. Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment from Maowei Sea, Guangxi, China: occurrence, distribution, and source apportionment[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(1): 1-12.
- [28] FOLSOM B R, CHAPMAN P J, PRITCHARD P H. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(5): 1 279-1 285.
- [29] 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: 370-410.
DONG X Z, CAI M Y. Manual of systematic determinative bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-410.

- [30] 龚斌, 刘津, 赵斌. 一株高效苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(12): 2 008-2 012.
GONG B, LIU J, ZHAO B. The isolation and identification of a phenol-degrading strain and study on its degrading characterization[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(12): 2 008-2 012.
- [31] GONG B, CHEN S, LAN W W, et al. Antibacterial and antitumor potential of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea of the southern coast of China[J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2018, 17(4): 1 339-1 346.
- [32] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(10): 1 104-1 109.
- [33] 宋静静, 江保秀, 龚斌. 阔苞菊内生放线菌的分离鉴定和抗菌活性研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(9): 4 077-4 085.
SONG J J, JIANG B X, GONG B. Isolation and identification of endophytic actinomycetes *Pluchea indica*(L) less and its antibacterial activity study[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(9): 4 077-4 085.
- [34] IBÁÑEZ S G, MERINI L J, BARROS G G, et al. *Vicia sativa*-rhizospheric bacteria interactions to improve phenol remediation[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2014, 11(6): 1 679-1 690.
- [35] CORDOVA-ROSA S M, DAMS R I, CORDOVA-ROSA E V, et al. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 164(1): 61-66.
- [36] AGARRY S E, SOLOMON B O. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescence* [J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2008, 5(2): 223-232.
- [37] KOTRESHA D, VIDYASAGAR G M. Isolation and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996 [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 24(4): 541-547.
- [38] ANNADURAI G, JUANG R S, LEE D J. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge [J]. Waste Management, 2002, 22(7): 703-710.
- [39] JÕESAAR M, VIGGOR S, HEINARU E, et al. Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate [J]. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0173180.
- [40] BHARDWAJ P, SHARMA A, SAGARKAR S, et al. Mapping atrazine and phenol degradation genes in *Pseudomonas* sp. EGD-AKN5 [J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 102: 125-134.
- [41] ARYAL M, LIAKOPOULOU M. Phenol degradation in aqueous solutions by *Pseudomonas* sp. isolated from contaminated soil of mining industry [J]. Journal of Water Sustainability, 2015, 5: 45-57.
- [42] TRIBELLI P M, ROSSI L, RICARDI M, et al. Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2018, 45(1): 15-23.
- [43] IUSTMAN L J R, TRIBELLI P M, IBARRA J G, et al. Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance [J]. Extremophiles, 2015, 19(1): 207-220.
- [44] MORALES M, SENTCHILLO V, BERTELLI C, et al. The genome of the toluene-degrading *Pseudomonas veronii* strain 1YdBTEX2 and its differential gene expression in contaminated sand [J]. PLoS ONE, 2016, 11(11): e0165850.
- [45] LIMA-MORALES D D, CHAVES-MORENO D, WOS-OLLEY M L, et al. Degradation of benzene by *Pseudomonas veronii* 1YdBTEX2 and 1YB2 is catalyzed by enzymes encoded in distinct catabolism gene clusters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(1): 167-173.
- [46] RUTGER D W, THIERRY B. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(4): 755-758.

Isolation and identification of halotolerant and phenol-degrading bacterial strains from rhizosphere soil of mangrove

CAO Hong-ming^{1 3}, GONG Bin^{2 3*}, ZHU Li-juan³, PAN Gui-ni³, LIU Fei-qi³, LI Shi-sheng³

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Disaster in the Beibu Gulf, Qinzhou 535011, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, Qinzhou 535011, China;

3. School of Ocean Sciences, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China)

Abstract: Phenol is a great threat to marine ecological system, so it is of great significance to isolate phenol-degrading bacteria characterizing higher effectiveness and higher adaptation of marine environment. In present work, phenol-degrading bacteria were enriched and isolated from rhizosphere soil of mangrove around Beibu Gulf. A total of 30 strains were isolated and purified. As a result, five strains named FGYS1, FGYS7, FGYS11, FGYB1 and FGYB5 were obtained. It shows that they could tolerate 70 g/L high concentration of sodium chloride and degrade phenol up to 1 500 mg/L. They were identified by morphological observation, BOX-PCR diversity analysis, 16S rRNA and *gyrB* gene sequence analysis. All of them were *Pseudomonas*. FGYS1, FGYS7 and FGYS11 are con-

sistent in 16S rRNA gene sequence. The nucleotide sequence similarity of 16S rRNA gene to those of *Pseudomonas extremaustralis* 14-3^T and *Pseudomonas meridiana* CMS 38^T in the EzBioCloud data base was 99.71% and 99.64% , respectively. It is the same for the strains FGYS1 and FGYS7 , the similarity of 16S rRNA gene to those of *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T and *Pseudomonas extremaustralis* 14-3^T was both 99.64% , respectively. The phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene showed that FGYS1 , FGYS7 , FGYS11 , FGYS1 and FGYS5 located in the same branch with *P. veronii* , but relatively far away from other model strains of *Pseudomonas*. The suitable growth conditions for phenol degradation by strain FGYS1 were 25–35 °C , pH 4–6 and the sodium chloride concentration less than 60 g/L. While for strain FGYS1 , the conditions for phenol degradation were 25–35 °C , pH 4–6 , and the sodium chloride concentration less than 100 g/L. FGYS1 and FGYS1 could also degrade catechol , hydroquinone and resorcinol simultaneously. These phenol-degrading bacteria exhibited potential utilization in the disposition of aromatic pollution and the restoration of environment in mangrove ecosystem.

Key words: marine biology; rhizosphere soil of mangrove; phenol; microbial degradation; environmental factor
DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.2021.02.001

(责任编辑: 王 静)