

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(10):1392–1398; 4 October 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

厦门近海海水中多环芳烃降解菌的原位富集与降解菌多样性

陈亮^{1,2}, 董纯明², 何进^{1*}, 邵宗泽^{2*}

(¹ 华中农业大学生命科学技术学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

(² 国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

摘要:【目的】为了分析厦门近海原位海水中多环芳烃降解菌的多样性。【方法】将涂有菲的聚氯乙烯(PVC)板悬挂在厦门国际邮轮码头的海水中, 进行非降解菌的原位富集。利用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和16S rRNA基因文库两种方法分析了在PVC板表面富集微生物的菌群结构。之后, 在实验室模拟原位条件下, 对PVC板表面富集的非降解菌群进行进一步富集、分离和初步鉴定。【结果】PVC板在海水中浸没6 d后, 16S rRNA基因文库分析表明, 在涂菲的PVC板表面富集的菌群中解环菌属(*Cyclocasticus*)对应的克隆子占文库总克隆子的50%; 在未涂菲的PVC板表面吸附的菌群中红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)为优势菌, 其对应的克隆子占文库总克隆子的47%; 而解环菌属的克隆子只占文库总克隆子的2%。DGGE的分析结果也证明解环菌是非原位富集降解菌群中的优势菌。实验室进一步富集后, 从该菌群中分离鉴定出14株细菌, 其中一株新鞘氨醇杆菌B14(*Novosphingobium* sp. B14)具有非降解能力。但是, 解环菌未能获得纯培养。【结论】非原位富集发现, 厦门近海水体中解环菌是多环芳烃的主要降解菌。

关键词: 厦门近海; 多环芳烃; 解环菌; 生物降解; 原位富集

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010)10-1392-07

海上泄油、自然渗漏、非法排放、沿岸石油生产及精炼和陆源污染物的注入等都是海洋环境石油污染的重要来源。多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是石油中第二大组分, 其分子中含有两个或者两个以上苯环^[1], 它们对哺乳动物具有普遍的细胞毒性、致畸性以及致癌性^[2], 由于其化学性质稳定, 容易在海洋生物体内富集, 并通过食物链的传递最终威胁人类健康^[3]。

前人研究表明, 海洋环境中的土著微生物在PAHs降解中起到了重要作用。到目前为止, 已经从海洋环境中分离获得了多种PAHs降解菌, 如假单胞菌(*Pseudomonas*)^[4]、黄杆菌(*Flavobacter*)^[5]、

假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)^[6]、海杆菌(*Marinobacter*)^[7]、盐单胞菌(*Halomonas*)^[8]、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)^[9]、新鞘氨醇菌(*Novosphingobium*)^[10]、弧菌(*Vibrio*)^[11]、解环菌(*Cyclocasticus*)^[12]、*Neptunomonas*^[13]、短杆菌(*Brevibacterium*)^[14]和交替单胞菌(*Alteromonas*)^[15]等。

解环菌(*Cyclocasticus*)是海洋环境中专一的PAHs降解菌。最早是在1995年美国学者Dyksterhouse等在Puget Sound(华盛顿)的近海沉积物中首次分离得到, 后来该菌在许多地方不同海域都有解环菌的研究报道^[12,16–20]。2008年, 本课题

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2010J01206); 福建省科技项目(2009H0029); 国家自然科技资源平台项目(2005DKA21209)

* 通信作者。何进, Fax: +86–27-87280670, E-mail: hejin@mail.hzau.edu.cn; 邵宗泽, Tel: +86-592-2195321, Fax: +86-592-2085376, E-mail: shaozz@163.com

作者简介: 陈亮(1984–), 男, 浙江浦江人, 华中农业大学硕士研究生, 主要从事资源与环境微生物研究。E-mail: ligaoken@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-03-30; **修回日期:** 2010-05-24

组 Wang 等首次报道了分离自大洋深海环境具萜能力的解环菌,该菌是从 2003 年采自西太平洋暖池的沉积物经富集分离获得的^[21]。此外,Cui 等发现 2005 年采自大西洋中脊海底下 2.3m 沉积物中经富集也发现解环菌是 PAHs 降解菌群中的优势菌^[22]。前期研究表明,解环菌是海洋环境中重要的 PAHs 降解菌。

本实验室曾对厦门岛周边海域水体中 PAHs 降解菌开展过初步研究,分离获得的降解菌为新鞘氨醇菌和假单胞菌^[23-24]。无论近海还是深海,前人都是做实验室富集后进行降解菌多样性分析的。然而,室内研究结果不能完全代表海洋原位环境中的自然状况。国内外对 PAHs 降解菌在原位海水中情况了解较少。为此,本实验通过 PAHs 挂板实验,在近海原位海水中钓取 PAHs 降解菌,以观测天然海洋环境中的优势 PAH 降解菌多样性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: NH 培养基和 216L 培养基配方参考文献[25]。

1.1.2 主要试剂和仪器: 主要试剂和仪器参考文献[25], DGGE 设备(Bio-rad)。

1.2 海水挂板与非降解菌富集

把 10 mL 浓度为 5 g/L 的非(含量 $\geq 97\%$,购自 Sigma 公司)三氯甲烷溶液均匀地涂在 PVC 板(30cm \times 30 cm, 0.6 cm 厚)上。等三氯甲烷挥发后,非在板上结晶成一层薄膜。然后把 PVC 板悬挂在一个浮动的船坞上,板浸没在水中 1 m 左右的深度。涂有非的面作为样品面,而未涂非的面为对照面。富集 48 h 后开始收集样品,之后每隔 24 h 回收一块 PVC 板并收集样品。

将板从水中取出后,用灭菌海水轻轻润洗板的表面(主要目的是冲走海水中未附着的微生物),等水分挥发待干时,用灭菌纱布抹下吸附在板上的微生物,并将纱布放在无菌的 50 mL 离心管中带回实验室^[26],进行基因组 DNA 提取或转接培养。

原位富集地点经纬度:118°04'14.41"(E),24°28'55.67"(N);富集时间:第 1 次实验时间 2008 年 12 月 23 号,此后 3 次重复实验是在 2009 年 1 月。实验期间原位海水的物理参数(平均值):盐度 2.7‰、温度 16℃、pH 7.5。

1.3 实验室富集与降解菌分离

把原位取回的纱布放入装有 100 mL 的 NH 培

养基三角瓶中,以非作为唯一碳源和能源,在 16℃、100 r/min 避光培养。3 d 后,培养物变棕红色,取一定量的培养物用 NH 培养基做极限梯度稀释并涂布 216L 平板,同时将不同稀释度的稀释液分别接种到新鲜 NH 加菲培养基中进行培养。培养 3-4 d 后,出现降解现象的最大稀释度的培养液涂 NH 平板,以非为碳源在 16℃避光培养,进行 PAHs 降解菌的分离;同时抽提最大稀释度富集菌群的总 DNA,用于 DGGE 菌群结构分析。此外,将 216L 平板和 NH 加菲平板上分离得到的单菌接回以非为碳源的 NH 液体培养基中,进行降解能力验证。

1.4 菌群及单菌的 DNA 提取及系统进化分析

用 TE buffer (Tris-HCl 10 mmol/L、EDTA 1 mmol/L、pH 8.0)浸没纱布,在振荡器上振荡 5 min,取出纱布剩余的悬浊液 8000 r/min 离心 10 min。得到的沉淀用 TE 重悬,加 1% 的 SDS 和溶菌酶(10 g/L)溶液,37℃处理 30 min,菌群 DNA 的提取参考文献[27]。单菌 DNA 提取采用赛百胜细菌基因组 DNA 提取试剂盒。16S rRNA 基因扩增及测序参考文献[21,27],测序结果在 NCBI 进行 Blast 分析。

1.5 16S rRNA 基因 PCR-DGGE

以 PVC 板上吸附菌群的 DNA 为模板,PCR-DGGE 扩增及产物浓缩参考文献[27]。

1.6 16S rRNA 基因文库构建

以 PVC 板上吸附菌群的 DNA 为模板构建 16S rRNA 基因文库,文库构建参考文献[21]。

2 结果

2.1 原位富集菌群结构的 DGGE 分析

抽提第 2-7 天吸附在涂菲和未涂菲板上菌群 DNA,然后进行 PCR-DGGE 分析。结果表明,在第 2-3 天,涂菲和未涂菲板的菌群结构大致相同。第 4 天后,涂菲和未涂菲板的菌群结构出现了差异,到第 5 天和第 6 天时差异更加明显(图 1)。以第 6 天为例,涂菲 PVC 板上的菌群(泳道 10)明显与未涂菲 PVC 板上的菌群(泳道 9)不同:在非富集板上有一条明显的亮带,而该亮带并没有出现在对照板上。通过切胶、克隆、测序得到一段 V3 区 194 bp 的序列。Blast 分析表明,它与模式种 *Cycloclasticus pugetii* PS-1(T)的相似性为 100%。

2009 年 1 月份的 3 次重复实验结果见图 2。在 3 次重复实验中,涂菲 PVC 板上富集菌群中优势菌的条带均同用作参照解环菌的条带相对应。说明在

3 次重复实验中解环菌都是优势菌。

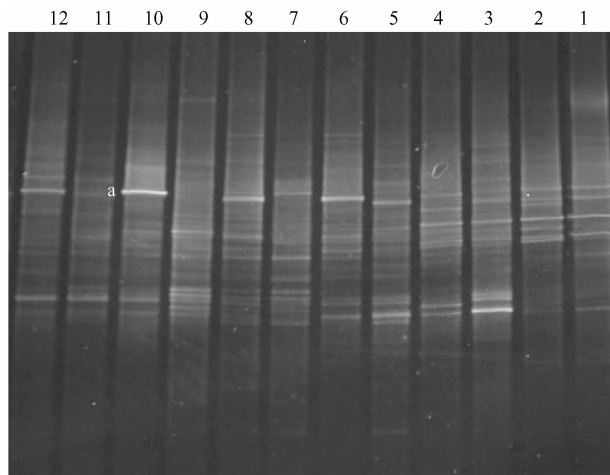


图 1 PVC 板上菲原位富集降解菌群结构的 DGGE 图谱

Fig. 1 Consortium structure based on DGGE analysis of the colonizing bacteria on the Phe-coated plates *in situ* of coastal water. Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11: surface-colonizing bacteria on the Phe-absent plates from second to seventh day, Lane 2, 4, 6, 8, 10, 12: enriched bacteria on Phe-coated plates from second to seventh day.

2.2 原位富集菌群的 16S rRNA 基因文库分析

为了进一步分析板上吸附菌群的组成结构,构建了第 6 天的涂菲和未涂菲 PVC 板上吸附菌群的 16S rRNA 基因文库,分别挑取了 81 个和 49 个克隆子,通过双酶切(*Hae* III 和 *Afa* I)分析分别得到 14 个和 21 个不同的酶切类型,每个酶切类型挑取一个克隆子进行测序。测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,比对结果(表 1 和 2)。

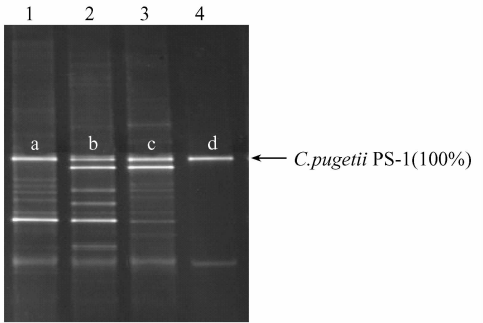


图 2 三次重复富集的原位菲降解菌群结构的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of structure of the colonizing bacteria on the Phe-coated plates *in situ* of the Xiamen coastal sea water. Lane 1, 2, 3: each time of colonizing bacterial on the Phe-coated plates after six day respectively, Lane 4: clone of the *Cycloclasticus*.

在涂菲 PVC 板菌群 16S rRNA 基因文库克隆子中有 94% 的克隆子归属于变形菌门(Proteobacteria),其中 60% 归属于 γ -变形菌亚群(γ -Proteobacteria),属于 γ -变形菌亚群的克隆子分别隶属于 *Cycloclasticus* 属、*Neptuniibacter* 属、*Alcanivorax* 属、*Rhodanobacter* 属和 *Alteromonas* 属,其中解环菌属(*Cycloclasticus*)的克隆占整个文库克隆子数的 50%;同时,有 33% 的克隆归属于 α -变形菌亚群(α -Proteobacteria),它们分别隶属于 *Sulfitobacter* 属、*Phaeobacter* 属、*Roseovariucr* 属,这些菌属都属于红细菌科(Rhodobacteraceae)。放线菌门(Actinobacteridae)克隆都分别只占文库克隆总数的 1%,此外,还有 5% 的克隆子无法归属于目前已知的细菌类群中。

表 1 涂菲 PVC 板上富集菌群的 16S rRNA 基因文库分析

Table 1 16S rRNA gene clone library analysis of colonizing bacteria on the Phe-coated plates				
Phylogenetic group	Closest match	Accession No. of clone (NCBI)	Sequence identity/%	Percentage of clone library
α -Proteobacteria	<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium LS53	HM116852	97	2/81
	<i>Sulfitobacter</i> sp. BSi20563	HM116854	99 – 100	6/81
	Bacterium clone EB39. 6	HM116846	97 – 99	8/81
	<i>Phaeobacter arcticus</i>	HM116850	97 – 99	6/81
	<i>Roseovarius crassostreae</i>	HM116853	97 – 98	3/81
	Uncultured clone GOM-WB10 – 40	HM116855	99	2/81
γ -Proteobacteria	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	HM116844	99	1/81
	<i>Neptuniibacter caesariensis</i>	HM116849	97 – 98	3/81
	<i>Cycloclasticus pugetii</i>	HM116848	99 – 100	43/81
	<i>Alteromonas macleodii</i>	HM116845	99	1/81
	<i>Rhodanobacter terrae</i>	HM116851	99	1/81
	<i>Brevibacterium casei</i>	HM116847	99	1/81
	Uncultured clone SJTU_G_10_20	HM116856	99	3/81
Actinobacteria	Uncultured clone SJTU_G_10_20	HM116856	99	3/81
Unclassified	Uncultured clone IHE3_034	HM116857	98	1/81

Identity values are based on approximately 1500 sequenced base pairs.

表 2 未涂菲 PVC 板上吸附菌群的 16SrRNA 基因文库分析

Table 2 The 16S rRNA gene clone library analysis of surface-colonizing bacteria the Phe-absent plates

Phylogenetic group	Closest match	Accession No. of clone (NCBI)	Sequence identity/%	Percentage of clone library
α -Proteobacteria	<i>Sulfitobacter</i> sp. BSi20563	HM116854	99 – 100	14/49
	<i>Donghicola eburneus</i>	HM116859	100	3/49
	<i>Phaeobacter arcticus</i>	HM116850	99	2/49
	<i>Roseobacter</i> sp. P81	HM116862	99	2/49
	Uncultured clone MD2. 54	HM116871	98	4/49
	Uncultured clone MD3. 37	HM116872	96	1/49
γ -Proteobacteria	<i>Dyella ginsengisoli</i>	HM116860	99	1/49
	<i>Alteromonas macleodii</i>	HM116845	99	1/49
	<i>Psychrobacter</i> sp. BSw20879	HM116861	99	1/49
	<i>Cycloclasticus pugetii</i>	HM116848	99	1/49
	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	HM116844	99	3/49
	Uncultured clone87 T0h-oil	HM116870	97	4/49
Unclassified	Uncultured clone L48	HM116858	97	1/49
	Uncultured clone N13	HM116865	97	1/49
	Uncultured clone SGUS1308	HM116868	94	1/49
	Uncultured clone 254ds10	HM116863	91	1/49
	Uncultured clone S25_718	HM116867	97	1/49
	Uncultured clone; Uni121_Flocs	HM116873	97	1/49
	Uncultured clone S2 – 58	HM116866	99	3/49
	Uncultured clone ELB19 – 203	HM116869	98	2/49
	Uncultured clone AD12 – E7	HM116864	98	1/49

Identity values are based on approximately 780 sequenced base pairs

在未涂菲 PVC 板吸附菌群 16S rRNA 基因文库克隆子中, 75% 的克隆子归属于变形菌门 (Proteobacteria), 其中 53% 的归属于 α – 变形菌亚群 (α -Proteobacteria), 它们分别隶属于红细菌科 (Rhodobacteraceae) 的 *Sulfitobacter* 属、*Phaeobacter* 属、*Donghicola* 属和未培养 *Rhodobacteraceae* 属, 其中 *Sulfitobacter* 属占总克隆子的 28% ; 另外, 22% 的克隆归属于 γ -变形菌亚群 (γ -Proteobacteria), 它们别

隶属于 *Dyella* 属、*Alteromonas* 属、*Psychrobacter* 属、*Alcanivorax* 属、*Cycloclasticus* 属和未培养 γ -Proteobacteria, 其中 *Cycloclasticus* 属的克隆仅占文库总克隆子的 2% 。无法归属于目前已知的细菌类群克隆子占总文库的 25% 。

2.3 菲降解菌的实验室富集

从实验室的菲富集菌群中分离到的菌株见表 3, 但是原位富集中发现的解环菌也没有分离得到。

表 3 菲富集菌群中分离得到的单菌

Table 3 Bacterial isolates from the Phe-enriched consortium

MCCC accession number #	Original number	Closest match	Accession No. of closest organism (NCBI)	Similarity /%
1A06390	B1	<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601	DQ178660	99
1A06386	B2	<i>Alteromonas marina</i> SW-47	AF529060	99
1A00408	B3	<i>Erythrobacter flavus</i> SW-46	AF500004	99
1A00410	B4	<i>Phaeobacter arcticus</i> 20188	DQ514304	99
1A06380	B5	<i>Meridianimaribacter flavus</i> NH57N	FJ360684	100
1A06381	B6	<i>Thalassospira lucentensis</i> DSM 14000	AM294944	99
1A06382	B7	<i>Thalassospira tepidiphila</i> 1-1B	AB265822	99
1A06383	B8	<i>Brachybacterium rhamnosum</i> LMG 19848	AJ415376	100
1A06387	B9	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719	X76443	99
1A06388	B10	<i>Labrenzia aggregata</i> IAM 1261	AAUW01000037	99
1A06384	B11	<i>Halomonas ventosae</i> Al12	AY268080	98
1A06385	B12	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447	X87756	99
1A06389	B13	<i>Roseovarius pacificus</i> 2-81	DQ120726	100
1A02088	B14	<i>Novosphingobium naphthalenivorans</i> TUT562	AB177883	96

#MCCC: Marine Culture Collection of China. Identity values are based on approximately 780 sequenced base pairs.

为了确定并分离到降解菌群中关键菌,我们用 NH 培养基对富集液进行极限梯度稀释,然后选择性培养,发现有降解现象的最大稀释度是 10^8 。把 10^8 稀释度的二次富集液涂在 NH 固体培养基上,以菲作为唯一碳源和能源培养,最后得到一株单菌 B14,并经过以菲唯一碳源的 NH 培养基培养,证明该菌株确实具有菲降解能力。16S rRNA 基因序列结果表明, B14 和模式种 *Novosphingobium naphthalenivorans* TUT562 相似度为 96%,说明它是潜在的新种。

经过 DGGE 分析最高稀释度的二次富集液的菌群结构,发现单菌 B14 是菌群中的主要亮度之一(图 3, Band b)。此外,还有一条更亮的优势菌条带,经序列分离确证为解环菌(图 3, Band c)。但是,实验室二次富集液中的解环菌在以菲为碳源的 NH 平板上仍未分离成功。

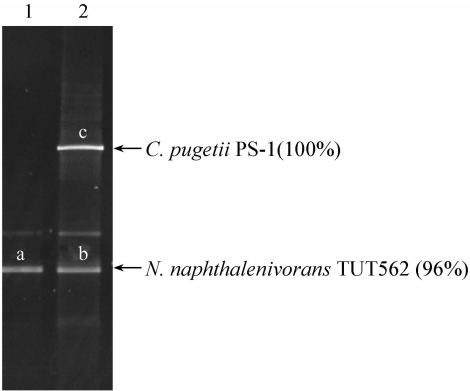


图 3 实验室富集菲降解菌群结构的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE profile of the bacterial community structure after Phe-enrichment in lab. 1. The B-14; 2. The structure of Phe-enriched bacteria under lab conditions.

3 讨论

海洋 PAHs 微生物降解菌的实验室研究已经有较多,但是对海洋水体原位环境中微生物的降解作用研究未见报道。本研究以涂菲和未涂菲的 PVC 板作为载体,在厦门国际邮轮码头的原位海水中以菲为诱饵,钓取 PAHs 降解菌,并进行了多样性分析。通过对涂菲和未涂菲板上吸附菌群 16S rRNA 基因文库比较发现,在涂菲板上吸附菌群中解环菌是优势菌,其在文库中的比例高达 50%。PCR-DGGE 的结果也证实解环菌在原位降解菌群中的确是优势菌。这些结果说明在厦门近海水体中菲的主要降解菌是解环菌。在未涂菲板吸附菌群 16S rRNA 基因文库中,也有 2% 解环菌的存在。这可能

是因为在原位富集时,处理板与对照板之间的距离比较近(0.5 m),菲对周围水体环境中的释放造成一个小的污染区,对解环菌起到了富集作用,并附着在了未涂菲的板上。

在涂菲板吸附菌群的 16S rRNA 基因文库中有交替单胞菌和微杆菌出现,但从数量上看它们分别只占文库的 1%,说明它们可能是原位 PAHs 降解菌群中的次要降解菌。红杆菌科细菌在未涂菲和涂菲板上吸附菌群中都是重要的组成部分,特别是 *Sulfitobacter* 属和 *Phaeobacter* 属,这 2 个属在两个克隆文库中都有出现。红杆菌科细菌是浸设在海洋中固体表面吸附的先锋菌^[26],但有关红杆菌科细菌对 PAHs 降解的研究还未见报道。所以推测红杆菌科细菌只是板表面的吸附菌,并非降解菌。

为了分离得到解环菌的纯培养,在实验室条件下做了进一步富集。DGGE 分析发现,降解菌群中解环菌和新鞘氨醇菌是优势菌。以菲作为唯一碳源和能源的 NH 平板培养,只得到了新鞘氨醇菌(*Novosphingobium* sp. B14)。但是新鞘氨醇菌在原位富集菌群中并没有发现,说明该属的菌容易在实验室条件下生长。而解环菌是专门的 PAHs 降解菌,属于寡营养菌,对常见的简单碳源不利用,在常用的海洋细菌培养基上也难以培养。本实验曾多次尝试蔡平板熏蒸法分离解环菌,但均未能成功。

总之,本研究是对原位海水中 PAHs 降解菌多样性的首次报道。原位富集实验证明,在厦门近海海水中解环菌是主要 PAHs 降解菌。至于它在原位环境中对 PAHs 的降解效率与降解范围,尚有待进一步研究。

参考文献

[1] Fetzer JC. Polycyclic Aromatic compounds. 27:143. New York: Wiley Press, 2000.
[2] Andreas L. The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons. London: Imperial College Press, 2005.
[3] Meador JP, Stein JE, Varansi U. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon by marine organism. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 1995, 143:79-165.
[4] Shiaris MP, Cooney JJ. Replica plating method for estimating phenanthrene-utilizing and phenanthrene - cometabolizing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45:706-710.
[5] Trzesicka MD, Ward OP. Degradation of polycyclic

- aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian journal of microbiology*, 1995, 41 (6):470-476.
- [6] Hedlund BP, Staley JT. Isolation and characterization of *Pseudoaltreomonas* strains with divergent polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic properties. *Environmental Microbiology*, 2006, 8:178-182.
- [7] Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquavia M, Bonin P, Bertrand JC,. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. Nov., a new, Extremely halotolerant, Hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42:568-576.
- [8] Melcher RJ, Apotz SE, Hemmingse BB. Impact of Irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68:2858-2868.
- [9] Zylstra GJ, Kin E, Goyal AK. Comparative molecular analysis of genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Genetic engineering*, 1997, 19:257-269.
- [10] Romine MF, Stillwell LC, Saffer JD, Wong KK, Thurston SJ, Sisk EC, Sensen C, Gassterland T, Fredrickson JK, Saffer JD. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181:585-1602.
- [11] West PA, Okpokwasili GC, Brayton PR, Grimes DJ, Colwell RR. Numerical taxonomy of phenanthrene-degrading bacteria isolated from Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48:988-993.
- [12] Dyksterhouse SE, Gray JP, Staley JT. *Cycloclasticus pugetii* gene. nov., sp. nov., and aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45:116-123.
- [13] Hedlund BP, Geiselsbrecht AD, Staley JT. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptuomonas naphthovovrans* gen. nov., sp. Nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65:251-259.
- [14] Farahat LA, El-Gendy Nour Sh. Biodegradation of baleym mix crude oil in soil microcosm by some locally isolated egyptian bacterial strains. *Soil and Sediment Contamination*, 2008, 17:150-162.
- [15] Zaidi BR, Imam SH. Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the Caribbean coastal water. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 38:737-742.
- [16] Geiselsbrecht AD, Hedlund BP, Staley JT, Tichi MA. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of Their PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 12: 4703-4710.
- [17] Wang Y, Lau PC, Button DK. A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil Pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 2169-2173.
- [18] Kasai Y, Hideo K, Harayama S. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 5625-5633.
- [19] Michail M, Yakimov MM, Maria G, Denaro R, Cappello S, Chernikova TN, Timmis KN, Golyshin PN, Giluliano L. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiology*, 2005, 7: 1426-1441.
- [20] McKew BA, Frédéric C, Osborn AM, Timmis KN, Mcgenity TJ. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*, 2007, 9: 165-176.
- [21] Wang BJ, Lai QL, Cui Z, Tan T, Shao ZZ. A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1. *Environmental Microbiology*, 2008, 10: 1948-1963.
- [22] Cui ZS, Lai QL, Dong CM, Shao ZZ. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10: 2138-2149.
- [23] 徐虹, 章军, 刘陈立, 邵宗泽. PAHs 降解菌的分离、鉴定及降解能力测定. 海洋环境科学 (*Marine Environmental Science*), 2004, 23 (3) :61-64.
- [24] 崔志松, 邵宗泽. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 phe-8 (*Novosphingobium* sp.) 的 PAHs 降解基因和降解特性. 厦门大学学报 (*Journal of Xiamen University*), 2006, 45 (sup) :257-261.
- [25] 袁军, 赖其良, 郑天凌, 邵宗泽. 深海多环芳烃降解菌新鞘氨醇杆菌 H25 的降解特性及降解基因. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48 (9) :1208-1213
- [26] Dang HY, Lovell CR. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rDNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 60 (2) :467-475.

[27] 刘真, 邵宗泽. 南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性初步分析. 微生物学报 (Acta

Microbiologica Sinica), 2007, 47(5): 869-873.

In situ enrichment and diversity analysis of polycyclic aromatic carbon degrading bacteria in the coastal seawater of Xiamen Island

Liang Chen^{1,2}, Chunming Dong², Jin He^{1*}, Zongze Shao^{2*}

(¹ College of Life Science and Technology, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, the Third Institute of Oceanography, State of Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study is to assess the diversity of polycyclic aromatic carbon (PAH)-degrading bacteria in the coastal seawater of Xiamen Island. [**Methods**] The phenanthrene-degrading bacteria were enriched by suspending phenanthrene-coated Polyvinylchloride (PVC) plates in the seawater close to Xiamen International Cruise Dock. PCR-DGGE and 16S rRNA gene clone library were used to analyze the bacteria colonizing on the PVC plates. Further, PAH-degrading bacteria were re-enriched in lab after the *in situ* enrichment and subjected to diversity analysis and bacterial isolation. [**Results**] After 6 days incubation, the genus *Cycloclasticus* was shown to be the dominant bacterium on the phenanthrene (Phe)-coated plates, which accounted for 50% of the total clones in 16S rRNA gene clone library. However, on the control plates without Phe-coating, bacteria of Rhodobacteraceae were the dominant member, which accounted for 47% of the total clones. PCR-DGGE results reconfirmed the genus *Cycloclasticus* as the dominant member on the Phe-coated plates. After re-enrichment with Phe in laboratory, 14 strains were isolated from the consortium, which contained a potential novel species of genus *Novosphingobium*, named strain B-14 and identified as a Phe degrader. However, the most predominant member *Cycloclasticus* can not be cultivated into pure culture. [**Conclusion**] Genus *Cycloclasticus* is the most important PAH-degrading bacterium in the coast sea water of Xiamen Island. This is the first evidence to our knowledge about the *in situ* enrichment PAH-degrading bacterium in seawater.

Keywords: Xiamen coastal sea; PAHs, *Cycloclasticus*, biodegradation, *in situ* enrichment

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2010J01206), the Fujian Province Science and Technology Program (2009H0029) and the National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology Program of China (2005DKA21209)

* Corresponding authors. Zongze Shao, Tel: +86-592-2195321, Fax: +86-592-2085376, E-mail: shaozz@163.com; Jin He, Fax: +86-27-87280670, E-mail: hejin@mail.hzau.edu.cn

Received: 30 March 2010/Revised: 24 May 2010