

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150146

一株烷烃降解细菌的分离鉴定及其降解特性

孙 晶, 宋东辉, 刘凤路, 邸富荣

(天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457)

摘 要: 从天津海域采集的水样中筛选获得一株烷烃降解细菌, 经 16S rRNA 基因鉴定, 结合菌株的形态学特征和生理生化特性分析, 鉴定为柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*), 命名为 *Citrobacter* sp. TUST-S5. 利用 GC-MS 检测出菌株 *Citrobacter* sp. TUST-S5 能降解链长 C11—C28 的烷烃; 对 C20 以上的长链烷烃, 降解率为 80% 以上, 且降解率随碳链长度的增加呈升高的趋势; 菌株的生长曲线及降解曲线显示菌株对烷烃的降解率的变化与菌浓度紧密相关; 菌株的乳化活性为 47.86%, 疏水性为 38.30%. 菌株 *Citrobacter* sp. TUST-S5 对中长链烷烃的降解效果显著, 乳化作用明显, 对于修复海洋石油污染具有重要的作用.

关键词: 烷烃降解细菌; 柠檬酸杆菌属; 降解率; 乳化活性; 疏水性

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)05-0019-06

Isolation and Identification of an Alkane Degrading Bacterium and its Degradation Characteristics

SUN Jing, SONG Donghui, LIU Fenglu, DI Furong

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: An alkane degrading bacterium was isolated from the water samples collected from Tianjin sea area. The strain was defined as *Citrobacter* sp. TUST-S5 according to its physiological and biochemical characteristics as well as 16S rRNA phylogenetic tree. Its degradation rate was determined by GC-MS. Results showed that *Citrobacter* sp. TUST-S5 had the capacity of degrading C11-C28 alkane and its degradation rate of long chain alkane over C20 was more than 80%. The growth curve and degradation curve of the strain displayed a change of the degradation rate closely related to the concentration of bacteria. Its emulsifying activity and the hydrophobicity were 47.86% and 38.30%. Therefore, *Citrobacter* sp. TUST-S5 has a good ability to degrade C11-C28 alkane, and will play an important role in remedying marine oil pollution.

Key words: alkane degrading bacteria; *Citrobacter*; degradation rate; emulsifying activity; hydrophobicity

海上发生的漏油事件对海洋环境具有很大的危害^[1], 严重地破坏了周围的生态系统^[2]. 目前, 海洋石油污染的处理方法主要有物理法、化学法和生物法. 与物理法和化学法相比, 生物法具有经济花费少、对环境的影响小、遗留问题少、修复时间短、就地修复、操作方便等优势^[3-4].

石油烃降解菌 (hydrocarbon degradation bacteria, HDB) 是能将石油烃作为唯一碳源进行生物降解, 并产生气体、脂肪酸及生物表面活性剂等代谢产物的一

类微生物^[5], 在生物修复中起到至关重要的作用, 而烷烃降解细菌又是石油烃降解细菌中不可或缺的一类. 目前, 已有多株烷烃降解细菌被分离出来, 如假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、弧菌属 (*Vibrio*)、不动杆菌属 (*Aerobacter*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属

收稿日期: 2015-10-09; 修回日期: 2015-12-10

基金项目: 天津市海洋局科技兴海项目 (KJXH2013-16)

作者简介: 孙 晶 (1990—), 女, 山东禹城人, 硕士研究生; 通信作者: 宋东辉, 教授, dhsong@tust.edu.cn.

(*Staphylococcus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)等属^[6-7]由碳氢化合物形成的烃类构成石油的主要成分,约占95%~99%^[8]。在海洋环境中,由于风化等作用,石油烃中的轻组分大量减少,而重组分因难以挥发及生物降解缓慢而长期留在环境中造成污染^[9]。目前,针对海洋石油污染状况,采用最多的是分离海洋微生物来进行海洋石油污染的生物修复研究^[10],因为该类微生物能更好地适应海洋环境。因此,筛选到能够快速、有效地降解石油烃的微生物对修复石油污染的海洋环境具有重要的意义。

本文从天津石油污染海域分离出能够有效降解石油中烷烃组分的烷烃降解细菌,对其进行生理生化分析及分子生物学鉴定,并对菌株的烷烃降解能力及其他促进降解的因素进行探究,旨在了解菌株在烷烃降解方面的优势,为海洋石油污染治理工作提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

实验样品采自天津港南疆港区原油装卸码头海域(38°41'N, 117°22'E)表层海水。

1.1.2 培养基

筛选培养基为 Bushnell Haas Mineral Salts (BHMS) 培养基^[11](g/L): KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCl_2 0.02, NH_4NO_3 1, 60% FeCl_3 溶液 2 滴,加海水(盐度 29)至 1 L, pH 7.0。加入体积分数为 1% 的 0.22 μm 滤膜过滤的 0[#]柴油(市售), 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min。

细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基^[12](g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 5, NaCl 3, 加入蒸馏水至 1 L, 搅拌均匀使其溶解, pH 7.0~7.2, 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选

在 100 mL 筛选培养基中加入 5 mL 采集样品, 28 °C、150 r/min 振荡培养 2 周, 取 1% 接种至新鲜的筛选培养基, 培养 1 周, 重复 3 次。菌液经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 稀释后在固体 BHMS 培养基涂布, 28 °C 培养至长出菌落, 选取不同形态特征的单菌落, 划线培养纯化出单菌落。

1.2.2 菌株的鉴定

菌株的分子生物学分析: 在 100 mL 细菌培养基

中接种 1 mL 活化菌株, 28 °C、150 r/min 振荡培养, 在菌液 A_{600} 为 1.0~1.5 时, 提取基因组 DNA, 进行 16S rRNA 基因扩增。正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG-3', 反向引物为 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', 反应体系及反应条件参考文献[13]: 25 μL 的 PCR 扩增体系如下: 引物 27F 1 μL ; 引物 1492R 1 μL ; dNTP Mixture 0.25 μL (20 mmol/L); 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL ; *taq* 酶 0.5 μL (5 U/ μL); DNA 样本 1 μL ; 无菌水 18.75 μL 。扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; PCR 产物于 4 °C 保存, 待测。将 PCR 产物进行双向测序。在 Eztaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) 中进行核酸序列的比对, 并在 MEGA5.2 软件中用 Neighbour-Joining 法进行建树分析^[14], Bootstrap 选择 1 000 次。

菌株及菌落的形态学分析: 观察单菌落的颜色、大小、形状、边缘、凸起、透明度及光泽等特征。从单菌落中挑取菌株固定于玻片后, 经不同浓度的乙醇梯度脱水^[15], 在扫描式电子显微镜下观察菌株的形态。

菌株的生理生化分析: 对菌株进行革兰氏染色、甲基红、V. P.、接触酶、酯酶、蛋白酶、脲酶、纤维素酶、硝酸盐还原、葡萄糖氧化发酵等一系列生理生化分析^[16-17]。

1.2.3 菌株的降解特性

样品萃取: 在 100 mL BHMS 培养基中, 加入体积分数为 1% 的 0.22 μm 滤膜过滤的 0[#]柴油, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后, 加入 1% 菌悬液, 以此作为实验组; 设置未加菌悬液的培养基为对照组。28 °C、150 r/min 振荡培养 10 d, 用正己烷萃取降解后培养基中的残油组分, 除水, 再用 0.22 μm 滤膜过滤, 4 °C 保存。

GC-MS 对采集的样品进行分析时, 选择的标准品为 C7—C30 正构烷烃及异三十烷, 标准品的配制及程序升温条件参考文献[18]: 取 C7—C30 的正构烷烃标准品溶解于正己烷溶液中, 稀释到终质量浓度为 100 mg/L, 将异三十烷作为内标物 (IS), 用正己烷溶液溶解, 稀释成质量浓度为 100 mg/L, 将内标物与标准品等体积混合, 并在每个样本中都加入相同体积的内标物, 混合均匀后, 待测。测得各组分质量浓度后, 按照式(1)—式(3)计算降解率。

$$D_1 = (\rho_{\text{前}} - \rho_{\text{实}}) / \rho_{\text{前}} \times 100\% \quad (1)$$

$$D_2 = (\rho_{\text{前}} - \rho_{\text{对}}) / \rho_{\text{前}} \times 100\% \quad (2)$$

$$D_3 = D_1 - D_2 \quad (3)$$

式中: $\rho_{\text{前}}$ 为降解前培养基中正构烷烃的质量浓度 (mg/L), $\rho_{\text{实}}$ 、 $\rho_{\text{对}}$ 分别为降解后的实验组和对照组中正构烷烃的质量浓度 (mg/L), D_1 为培养基中残油的总降解率 (%), D_2 为自然风化等作用引起的降解率 (%), D_3 为菌株对柴油的降解率 (%).

1.2.4 菌株的生长与降解

在 100 mL BHMS 培养基中, 加入体积分数为 1% 的十六烷后, 接种 1 mL 菌悬液, 28 °C、150 r/min 振荡培养, 每隔 24 h 测定 A_{600} , 绘制菌株的生长曲线. 同时, 利用气相色谱法, 测定菌株降解率, 绘制降解曲线.

1.2.5 乳化活性与疏水性

相同体积的菌悬液和正十六烷涡旋混合, 静置 24 h 后分层. 按照式 (4) 计算乳化活性 (%)^[19].

$$\text{乳化活性} = h_1 / h_2 \times 100\% \quad (4)$$

式中: h_1 和 h_2 分别为乳化层高度 (mm) 和总的液柱高度 (mm).

相同体积的菌悬液和正十六烷涡旋混合, 静置 24 h 后分层. 取下相, 以磷酸缓冲液 (pH 7.0) 为空白对照, 测定 600 nm 下的吸光度, 按照式 (5) 计算疏水性 (%)^[20].

$$\text{疏水性} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\% \quad (5)$$

式中: $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{实验}}$ 分别为对照组和实验组吸光度.

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从样本中共分离出 6 株能降解烷烃的菌株, 其中 1 株菌株不仅在菌落形态、颜色等方面与其他菌株不同, 而且环境适应能力相对较强, 降解率也相对较高, 标记为 TUST-S5, 并对其进行进一步的研究.

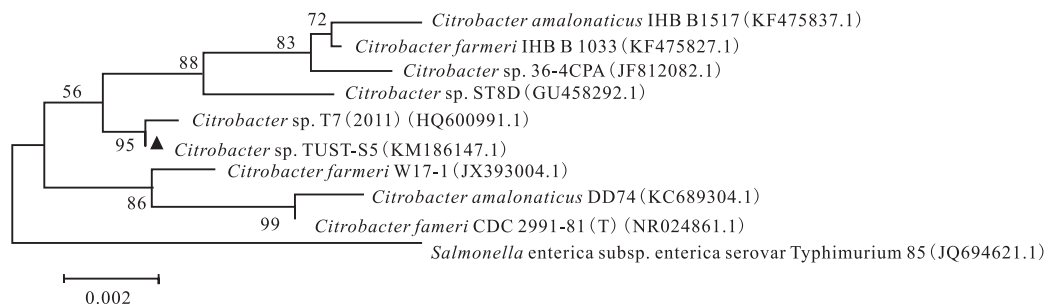


图 2 菌株 TUST-S5 的 16S rRNA 系统进化树

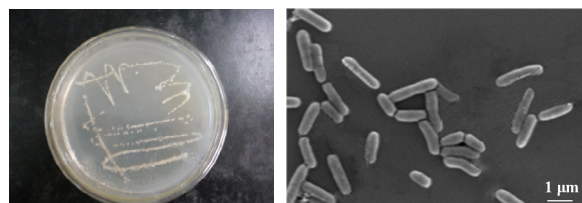
Fig. 2 Phylogenetic tree of TUST-S5 16S rRNA

2.3 菌株的降解特性

降解前培养基中的油组分分布图, 如图 3(a) 所示; 培养 10 d 后, 对照组和实验组培养基中的残油组

2.2 菌株的鉴定

菌株 TUST-S5 在 BHMS 培养基上形成单菌落, 如图 1(a) 所示, 菌落呈乳白色, 圆形, 直径达 1.5 mm, 中间隆起, 边缘光滑, 不透明. 菌株 TUST-S5 电镜扫描的结果如图 1(b) 所示, 菌株为杆状菌, 长短不一, 其长度大约为 1 ~ 2 μm .



(a) 菌落形态

(b) 扫描电镜图

图 1 菌株 TUST-S5 的菌落形态图和扫描电镜图

Fig. 1 Colony morphology and electron microscope scanning map of strain TUST-S5

菌株 TUST-S5 的部分生理生化特征如下: 革兰氏阴性菌, 不具有运动性, 甲基红实验、硝酸盐还原实验均成阳性; 能产生过氧化氢酶、脂肪酶、蛋白酶及脲酶; V. P. 反应呈阴性; 不产生淀粉酶、纤维素酶; 葡萄糖氧化发酵类型为发酵型.

16S rRNA 基因扩增产物测序后得到序列长度为 1 432 bp, 在 Eztaxon (<http://www.ezbiocloud.net/ez-taxon>) 比对, 发现该菌与间甲酚降解菌 (*Citrobacter farmeri*) 中的模式株 *Citrobacter farmeri* CDC 2991-81 (T) 的相似性达 98.46%. 菌株 TUST-S5 的系统进化树如图 2 所示, 菌株 TUST-S5 与柠檬酸杆菌属中 *Citrobacter* sp. T7 (2011) (HQ600991.1) 的亲缘关系最近, 结合菌株的形态学特征及生理生化特征, 将菌株归类为柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter* sp.), 命名为 *Citrobacter* sp. TUST-S5, GeneBank 登录号为 KM186147.

分分布图, 如图 3(b) 和图 3(c) 所示. 残油组分的浓度根据出峰时间和峰面积得出, 根据降解率计算式 (1) 一式 (3), 分别计算出不同组分的总降解率、自然

降解率及菌株的降解率, 结果见表 1.

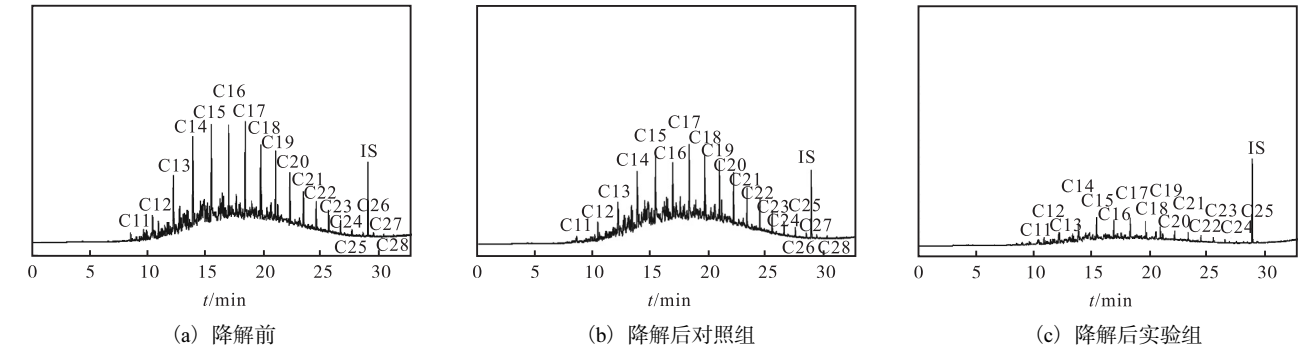


图 3 培养基中烷烃峰图
Fig. 3 Peak diagram of residual oil component in culture medium

表 1 培养基中烷烃质量浓度及菌株的降解率

Tab. 1 Concentration of residual oil in culture medium and the degradation rate of the strain						
烷烃	$\rho_{\text{前}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{后}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{实}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$D_1 / \%$	$D_2 / \%$	$D_3 / \%$
C11	41.68	34.47	8.20	80.31	17.29	63.02
C12	113.10	88.34	11.14	90.15	21.89	68.25
C13	223.80	184.20	29.39	86.86	17.69	69.17
C14	324.70	263.10	42.34	86.96	18.97	67.98
C15	322.80	268.10	50.69	84.29	16.94	67.35
C16	288.30	234.30	47.92	83.37	18.73	64.64
C17	305.80	254.60	50.65	83.43	16.74	66.69
C18	213.70	172.90	26.16	87.75	19.09	68.66
C19	192.00	150.20	21.70	88.69	21.77	66.92
C20	155.30	132.50	18.36	88.17	14.68	73.49
C21	103.00	97.72	12.22	88.13	5.12	83.00
C22	79.40	76.15	9.91	87.51	4.09	83.42
C23	53.55	49.85	5.08	90.51	6.90	83.60
C24	31.81	29.88	3.04	90.44	6.06	84.37
C25	22.92	21.77	2.42	89.41	5.01	84.40
C26	14.41	12.85	0.00	100.00	10.82	89.17
C27	10.81	9.61	0.00	100.00	11.06	88.93
C28	6.54	6.18	0.00	100.00	5.54	94.45

菌株 TUST-S5 能降解链长 C11—C28 的烷烃, 降解率集中在 60% ~ 95%, 对于链长在 C20 以上的烷烃, 菌株的降解率达到了 80% 以上, 且降解率随着碳链长度的增加呈升高的趋势, 如图 4 所示. 菌株对

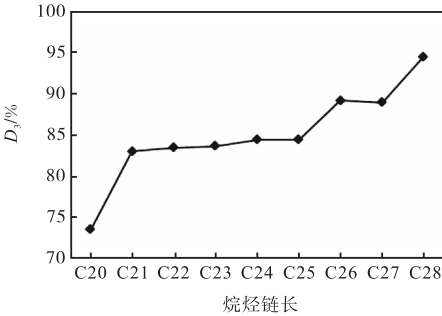


图 4 菌株的降解率随烷烃链长的变化图
Fig. 4 Change of degradation rate with alkane chain length

短链烷烃的降解率相对较低, 但也达到了 60%.

2.4 菌株以正十六烷为唯一碳源的生长与降解
菌株的生长曲线及降解曲线如图 5 所示.

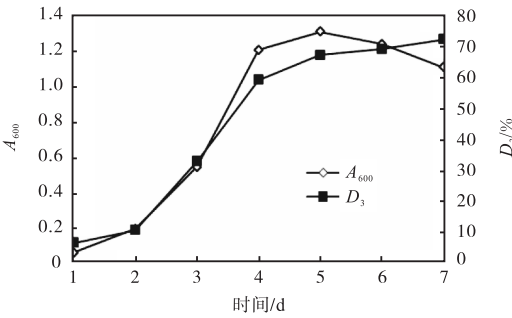


图 5 菌株 *Citrobacter* sp. TUST-S5 的生长曲线与降解曲线
Fig. 5 Growth curve and degradation curve of *Citrobacter* sp. TUST-S5

正十六烷的降解与菌浓度紧密相关, 菌株在培养的第 1~2 天, 生长十分缓慢, 处于延滞期, 大约有 10% 的正十六烷被降解; 从第 2 天菌株开始进入对数期, 整个对数期持续 2 d 左右, 对正十六烷的降解率由 10% 上升到 60%; 在第 4~5 天菌株进入了稳定期; 之后菌浓度出现了下降的趋势, 进入了衰退期, 此时, 正十六烷的降解率上升到 72% 左右。

2.5 菌株的乳化活性与疏水性

在菌株培养过程中产生明显的乳化现象, 实验测得菌株的乳化活性为 47.86%, 疏水性为 38.30%。

3 讨 论

柠檬酸杆菌属的菌株多为肠道菌^[21]。从天津石油污染海域分离出 1 株烷烃降解细菌, 鉴定为柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*), 命名为 *Citrobacter* sp. TUST-S5 (GeneBank 登录号为 KM186147)。 *Citrobacter* sp. TUST-S5 在培养过程中对环境的适应能力较强, 且能有效地降解石油烃中的烷烃组分, 尤其对中长链烷烃的降解率达 80% 以上, 降解效果明显。菌株对短链烷烃的降解效果相对较低, 推测原因为短链烷烃对菌株本身具有一定的毒性^[22]。

目前, 已有相当多的烷烃降解细菌被分离出来, 其中也不乏一些降解能力较好的菌株, 但在对烷烃的降解范围上又存在瑕疵, 例如芽胞杆菌 (*Geobacillus*) strain DM-2^[23]能降解 C16—C36 的烷烃, 其中对 C28 的降解量最高, 达 88.95%, 对链长小于 C15 的烷烃降解作用极小, 其中对 C14 的降解率仅为 2%; 嗜热脂肪芽胞杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 对 C15—C17 的烷烃降解率高达 88.5%, 但是对链长小于 C15 及大于 C17 烷烃只有极小的降解作用^[24]; 嗜热芽胞杆菌 (*Thermophilic bacillus*) NG80-2 只能降解 C15—C36 的烷烃, 对 C8—C14 的烷烃及链长大于 C40 的烷烃没有任何降解作用^[25]。石油污染物成分复杂^[26], 其中烷烃组分占有很大一部分, 仅能够降解长链烷烃或短链烷烃的菌株都不能很好地降解石油污染物, 而菌株 *Citrobacter* sp. TUST-S5 在这方面存在明显的优势。如果将该菌株与其他降解短链烷烃的优势菌株建立混合菌群^[27], 混合菌群之间具有协同降解作用, 其降解效果明显高于单株培养菌^[28], 更有利于海洋环境的治理。

生物表面活性剂是微生物在特定条件下生长过程中分泌并排出体外的具有表面活性的代谢产

物^[29], 烷烃降解菌株的乳化活性对菌株的降解能力起到一定的促进作用^[30]。Suzuki 等^[31]发现菌体表面的疏水性也能够促进细菌对石油的降解率。菌株 TUST-S5 与某些同功能的菌株如 *Rhodococcus erythropolis* G2^[32] (乳化活性为 30.8%, 疏水性为 27%) 及 *Achromobacter piechaudii* strain O1^[31] (乳化活性为 35.7%, 疏水性为 32%) 比较, 该菌株的乳化活性及疏水性均相对较高。菌株 TUST-S5 作用于正十六烷时, 菌株通过较高的疏水性与正十六烷接触, 乳化作用进一步促进正十六烷的降解。进一步了解乳化作用及疏水作用促进降解的机理将更加有利于提高菌株对烷烃的降解率。

关于烷烃降解菌株对烷烃降解途径的研究已有相关的报道^[33]。今后将对 *Citrobacter* sp. TUST-S5 的降解途径及降解机理进行探究, 这对于进一步提高菌株的降解能力具有重要的实际意义。

参考文献:

- [1] 郭平, 曹滨霞, 张君, 等. 海洋石油降解菌的筛选与降解性能研究[J]. 科学技术与工程, 2015, 15 (11): 152-154.
- [2] 方曦, 杨文. 海洋石油污染研究现状及防治[J]. 环境科学与管理, 2007, 23 (9): 78-80.
- [3] 牛炳旭. 细菌与石油污染的治理[J]. 生物学通报, 2004, 39 (4): 13-14.
- [4] 丁明宇, 黄健, 李永祺. 海洋微生物降解石油的研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21 (1): 84-88.
- [5] 易绍金, 刁浪滔. 石油烃降解菌菌数测定方法评述[J]. 石油与天然气化工, 2004, 33 (3): 206-216.
- [6] 张爱君, 郝建安, 杨波, 等. 海洋石油降解菌的筛选、鉴定及降解活性[J]. 化学工业与工程, 2015, 32 (1): 31-36.
- [7] 王晓娟, 金樑, 顾宗谦. 机油降解菌的筛选及其降解能力的研究[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2001, 40 (5): 562-565.
- [8] Das K, Mukherjee A K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India [J]. Bioresource Technology, 2007, 98 (7): 1339-1345.
- [9] 韩平, 郑立, 崔志松, 等. 胜利油田滩涂区石油降解菌的筛选、鉴定及其多样性分析[J]. 应用生态学, 2009, 20 (5): 1202-1208.
- [10] 刘慧杰, 张虎山. 海洋石油污染及治理措施[J]. 广州

- 环境科学, 2012 (4) : 35–38.
- [11] Kohno T, Sugimoto Y, Sei K, et al. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria[J]. *Microbes & Environments*, 2002, 17 (3) : 114–121.
- [12] 胥九兵, 迟建国, 邱维忠, 等. 石油降解菌剂的研制及其在石油污染土壤修复中的应用[J]. *生物加工过程*, 2009, 7 (6) : 21–24.
- [13] Tan Zhiyuan, Hurek T, Vinusea P, et al. Specific detection of Bradyrhizobium and Rhizobium strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (8) : 3655–3664.
- [14] 李亚玲, 韩国民, 何沙娥, 等. 基于 DNA 分子标记数据构建系统进化树的新策略[J]. *生物信息学*, 2008, 6 (4) : 168–171.
- [15] 肖媛, 刘伟, 汪艳, 等. 生物样品的扫描电镜制样干燥方法[J]. *实验室研究与探索*, 2013, 32 (5) : 45–53.
- [16] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌系统鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [17] 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.
- [18] 叶新荣, 史君贤, 陈忠元. 海洋石油降解细菌对石油烃降解效果的气相色谱法分析[J]. *分析测试学报*, 2007, 26 (6) : 847–850.
- [19] Hassanshahian M, Tebyanian H, Cappello S. Isolation and characterization of two crude-oil degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32 from the Persian Gulf[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64 (7) : 1389–1391.
- [20] Pruthi V, Cameotra S S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique[J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11 (9) : 671–674.
- [21] 何晓青. 柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)的分类与鉴定[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15 (12) : 1535–1536.
- [22] Hassanshahian M, Zeynalipour M S, Musa F H. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 82 (1/2) : 39–44.
- [23] 刘清坤, 王君, 李国强, 等. 嗜热地芽胞杆菌 DM-2 烃降解特性研究[J]. *环境科学*, 2008 (12) : 3554–3560.
- [24] Sorkhoh NA, Ibrahim A S, Ghannoum M A, et al. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 39 (1) : 123–126.
- [25] Wang Lei, Tang Yun, Wang Shuo, et al. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes[J]. *Extremophiles*, 2006, 10 (4) : 347–356.
- [26] 黄艺, 礼晓, 蔡佳亮. 石油污染生物修复研究进展[J]. *生态环境学报*, 2009, 18 (1) : 361–367.
- [27] 张秀霞, 武海杰, 白雪晶, 等. 土壤修复过程中微生物数量、酶活性与石油降解率的关系[J]. *石油学报: 石油加工*, 2014, 30 (1) : 94–99.
- [28] 郑金秀. 高效石油烃降解菌群的构建及其在生物修复中的强化作用研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2005.
- [29] 牛明芬, 李凤梅, 韩晓日, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选及表面活性剂稳定性研究[J]. *生态学杂志*, 2005, 24 (6) : 631–634.
- [30] 吴小红, 曾光明, 袁兴中, 等. 生物表面活性剂鼠李糖脂对水体中石油烃降解的促进作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12 (4) : 570–573.
- [31] Suzuki T, Yamaguchi T, Ishida M. Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons[J]. *Process Biochemistry*, 1998, 33 (5) : 541–546.
- [32] Hassanshahian M, Ahmadinejad M, Tebyanian H, et al. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 73 (1) : 300–305.
- [33] 李会爽, 周磊, 柳青, 等. 石油污染物生物降解的机理研究[J]. *安徽理工大学学报: 自然科学版*, 2011, 31 (3) : 68–71.

责任编辑: 郎婧