

十二烷基聚氧乙烯醚 Brij-30 降解菌的分离及其对土壤微生物和 Brij-30 降解的影响

杨海君¹, 杨成建², 曾清如³, 肖启明¹

(1.湖南农业大学生物安全科技学院, 湖南 长沙 410128; 2.西安建筑科技大学环境与市政工程实验中心, 陕西 西安 710055;
3.湖南农业大学资源环境学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:从工厂排污口废水中分离、纯化并筛选出一株降解十二烷基聚氧乙烯醚(Brij-30)的菌株,鉴定为伯克氏菌属(*Pandoraea* sp.),命名为 B30。同时,采用室内培养法,研究了菌株 B30 对土壤微生物区系及 Brij-30 降解的影响。结果表明,非离子表面活性剂 Brij-30 的毒害作用抑制了细菌和放线菌的生长,且毒害作用主要来源于 Brij-30 降解后的中间产物,而 Brij-30 对真菌生长产生了明显的促进作用,其原因尚待进一步研究;菌株 B30 对土壤中非离子表面活性剂 Brij-30 有强降解作用,降解率在 67%~86%之间,非离子表面活性剂在土壤中的吸附作用会影响到菌株 B30 的降解能力,但土壤理化性质对菌株 B30 的降解效率没有太大影响。

关键词:非离子表面活性剂;降解菌;土壤;微生物

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)03-0953-06

Isolation of Alkyl-polyoxyethylene Brij-30 Degradation Bacterium Strain and Its Effect on Soil Microbial Community and Brij-30 Degradation

YANG Hai-jun¹, YANG Cheng-jian², ZENG Qing-ru³, XIAO Qi-ming¹

(1.College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Center Laboratorial for Environment & Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 3.College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A strain with high degradability to alkyl-polyoxyethylene (Brij-30), named B30, was isolated from the sewage of factory. According to bacteria morphology, dying reaction, physiological biochemical reaction and 16S rDNA sequence analysis, this strain was identified as *Pandoraea* sp. Furthermore, effects of the bacterium strain (B30) on soil microbial community and Brij-30 degradation were also studied based on house culture. The result showed that nonionic surfactant Brij-30 addition restrained the growth of bacteria and actinomycete in soils with poison which resulted mainly from the intermediate product during Brij-30 biodegradation, while it promoted the growth of fungi apparently. The strain B30 had a strong ability to degrade Brij-30, with the degradation efficiency 67%~86%. Brij-30 adsorption in soils would decrease Brij-30 biodegradation, but the strain B30 was likely to have a similar degeneration capability to Brij-30 in soils with different physical and chemical properties.

Keywords: nonionic surfactant; degeneration strain; soil; microorganism

聚氧乙烯醚类非离子表面活性剂是非离子表面活性剂的主要品种,包括脂肪醇聚氧乙烯醚、烷基酚聚氧乙烯醚、吐温以及脂肪酸甲酯乙氧基化物等系

列,它们被广泛用作乳化剂、分散剂、食品添加剂、化妆品助剂、洗涤剂 and 农药助剂等^[1],在工业生产中起着重要的作用。但是大量含有此类表面活性剂的污水在使用后被排放到环境中,引起了一系列的环境问题^[2]。由于聚氧乙烯醚类非离子表面活性剂对水生动植物、土壤微生物的损害比较大,因此对其治理显得非常重要。表面活性剂污染的治理方法很多,但最有效的是生物降解法^[3],如活性污泥法、生物膜法、筛选菌种法等^[4,5]。其中筛选菌种法具有处理效率高、环境影响小、

收稿日期:2007-09-17

基金项目:国家 863 计划(2001AA115240);湖南省科技攻关资助项目(05SK3097;06SK3060);湖南省环保局重大资助专项湘财建指[2007]185 号;省自然科学基金资助项目(03jjy3036)

作者简介:杨海君(1974—),男,湖南长沙人,博士,主要从事微生物生态学研究。E-mail:yanghaijun352@yahoo.com.cn

责任作者:肖启明 E-mail:xqm-xqm@sohu.com

可以就地处理等优点而得到广泛的研究^[4-7]。但是该研究大部分局限于表面活性剂废水的处理,而表面活性剂污染土壤的降解菌修复技术至今未见报道。其原因主要在于:一是筛选菌株在土壤中难于生存;二是筛选菌株和表面活性剂会对土壤微生物区系产生影响。

本研究从工厂废水中分离得到 1 株高效降解十二烷基聚氧乙烯醚 Brij-30 的菌株 B30,并对其生理生化性状及部分长度的 16S rDNA 序列进行了鉴定。同时,通过室内培养法研究了 Brij-30 和菌株 B30 对土壤微生物区系及菌株 B30 对 Brij-30 降解的影响,其结果可为表面活性剂污染土壤的降解菌修复技术研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

斜面培养基:普通牛肉汁蛋白胨培养基;富集培养基^[7]:NH₄Cl 3.00 g·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 0.25 g·L⁻¹,K₂HPO₄ 1.00 g·L⁻¹,KCl 0.25 g·L⁻¹,Brij-30 0.40 g·L⁻¹,FeSO₄ 痕量;降解培养基:Brij-30 浓度为 0.10 g·L⁻¹,其他成份与富集培养基一致。初筛平板培养基为普通牛肉汁蛋白胨培养基,Brij-30 浓度为 0.10 g·L⁻¹;复筛平板培养基为普通牛肉汁蛋白胨培养基,其中 Brij-30 的浓度为 0.20 g·L⁻¹。所有培养基均在 121 ℃条件下灭菌 30 min。

1.1.2 供试土壤

供试土壤分别采自湖南农业大学茶园基地和菜园基地,该土壤为常见的南方红壤,成土母质为第四纪红土。取样后自然风干,过 2 mm 筛,备用。土壤基本性质见表 1,其中土壤 pH 用 pHs-3C 型精密 pH 计测定;有机质含量用稀释热-重铬酸钾容量法^[8];CEC 采用氯化钡缓冲液法^[9];碱解氮用碱解扩散法^[10]。

1.2 菌株的筛选与鉴定

1.2.1 菌株的分离、筛选与驯化

取湖南丽臣洗涤厂和长沙毛巾厂共同排污口废水上清液 1 mL,加入到装有 50 mL 富集培养基的 250 mL 三角瓶中,用棉花塞紧瓶口,放入 30 ℃恒温振荡

培养箱中,150 r·min⁻¹ 振荡培养 3 d,备用。从加入废水水样并培养了 3 d 的初次富集培养基中取 1 mL 菌悬液,加入到 50 mL 富集培养基中,同样条件下培养 3 d,备用。上述步骤连续重复 3 次。取富集培养多次的富集培养基 0.2 mL,滴加到初筛平板培养基上,用涂布法均匀涂抹在培养基表面,翻转培养皿,30 ℃培养 3 d。用接种环挑取生长较快、菌苔丰厚的菌落接入复筛平板培养基划线分离。根据菌苔的形状、颜色,用接种环挑出一些单菌落接入平板培养基继续培养。经反复培养,找出菌落形状、颜色相同的菌株,初步推断为同一菌种。

将筛选出的菌株接入到富集培养基中,在 30 ℃和 150 r·min⁻¹ 条件下,振荡培养 3 d,然后逐步提高富集培养基中 Brij-30 的浓度(0.8、1.0、1.5 g·L⁻¹),对筛选菌株进行驯化培养。

1.2.2 菌株的鉴定

复筛培养基中的菌落经多次划线分离,置 30 ℃下培养 24 h 后观察菌落形态。按参考文献[11]制备扫描与透射电镜样品,鉴定菌体形态。

分离菌株的生理生化特性试验按文献 [12、13]进行:(1) 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定:用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(sangon)提取纯培养降解菌的基因组 DNA,具体方法见参考文献[14]。采用通用引物 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')和 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')扩增出菌株的 16S rDNA 序列,PCR 扩增反应体系 50 μL,扩增目标片段长度为 1 494 bp。测序由北京三博远志生物技术有限公司完成,方法为末端终止法。(2)菌株的 16S rDNA 序列分析:利用 BLAST 将所测得的基因序列与 GenBank 数据库进行序列同源性比较,获取相近典型菌株的基因序列,然后利用邻接法^[15、16]建立系统发育树进行系统发育分析。

1.3 降解菌对土壤微生物和 Brij-30 的降解试验

1.3.1 菌悬液制备

将菌种 B30 接入浓度为 400 mg·L⁻¹ 的 Brij-30 液体富集培养基中,25 ℃培养 72 h,备用。菌悬液 OD₅₀₀ 值为 0.833。

表 1 供试土壤的基本理化性状

Table 1 Primary physical and chemical properties of the tested soils

土壤类型	采样地点	pH	有机质/g·kg ⁻¹	CEC/cmole·kg ⁻¹	碱解氮/mg·kg ⁻¹	脲酶活性/mg·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
菜园土	新公路旁	5.50	18.69	11.03	91.12	30.72
茶园土	茶场	4.35	14.69	7.65	119.23	21.03

1.3.2 试验处理

(1) Brij-30 施用及降解菌 B30 接种

实验分 4 组:①空白组(BL):即不施用 Brij-30 和降解菌,但土壤用蒸馏水滴加,滴加量为 5 mL,混匀;②处理组 T1 (施用 Brij-30,不接种降解菌 B30):称取 5 g 干土样于 250 mL 三角瓶中,先用移液管移取 4 mL $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Brij-30 溶液均匀滴加、混匀,再移取 1 mL 蒸馏水均匀滴加、混匀,用棉花塞紧瓶口,25 ℃下培养 168 h,备用。③处理组 T2 (施用 Brij-30,立即接种降解菌 B30):称取 5 g 干土样于 250 mL 三角瓶中,先用移液管移取 4 mL $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Brij-30 溶液均匀滴加、混匀,再移取 1 mL 菌悬液均匀滴加、混匀,用棉花塞紧瓶口,25 ℃下培养 168 h,备用;④处理组 T3 (施用 Brij-30,缓后接种降解菌 B30):称取 5 g 干土样于 250 mL 三角瓶中,先用移液管移取 4 mL $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Brij-30 溶液均匀滴加、混匀,然后移取 1 mL 蒸馏水均匀滴加,用棉花塞紧瓶口,25 ℃下培养 168 h 后,再往土样中均匀滴加 1 mL 菌悬液、混匀,放入恒温培养箱中,25 ℃下培养 168 h,备用。每种样土各做 3 个平行样,室温保湿培养,分别于 7 d 或 14 d 后,测定土壤微生物及土壤中 Brij-30 的浓度。

土壤中施用 Brij-30 后,分立即和缓后两种情况加入降解菌 B30 是为了研究土壤受非离子表面活性剂污染后,在不同时间内接种降解菌的处理效果以及微生物区系的变化。

(2) 微生物区系分析

土壤中的好气性细菌、放线菌、真菌的计数采用稀释平板计数法,各做 3 个重复。好气性细菌(37 ℃)在牛肉膏蛋白胨琼脂中培养 24~48 h,放线菌和真菌

分别在高泽氏 1 号琼脂(28 ℃)和马丁-孟加拉红链霉素琼脂(28 ℃)中培养 5~7 d,分别观察结果。

(3) 土壤中残留非离子表面活性剂的测定^[7]

取充分研磨的待测土样 20 g,加入乙醇和蒸馏水的混和提取剂($V:V=1:1$) 20 mL,振荡 1 h,内容物移入布氏漏斗,用真空泵将提取剂抽滤入抽滤瓶,然后用混和提取剂清洗土壤 3 次,提取液移入蒸发皿,水浴后,用蒸馏水将残余物洗入容量瓶,冷却后定容。吸取一定量溶液加入 KI-I₂ 显色剂,显色反应 30 min,用可见光分光光度计于 500 nm 处测定。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的分离与鉴定

经多次分离筛选,得到 1 株 Brij-30 的降解菌,命名为 B30。菌株 B30 在复筛培养基平皿中经多次划线分离,置 30 ℃下培养 24 h 后,菌落不大,颜色均匀,有光泽,呈淡黄色且光滑。透射电镜观察结果表明(图 1),菌株 B30 单生个体形态规则,均为短杆菌和长杆菌,且大部分为长杆菌。单个个体均有荚膜,一菌一膜,没有多菌共膜现象。没发现对生个体,且没有单个个体存在,大部分个体为两两重叠排列。部分个体有鞭毛,且为偏端鞭毛菌,单个个体两端钝圆。

扫描电镜观察结果表明(图 2),菌株 B30 单个个体外形呈杆状,长短不一,大小约为 $(1.131\sim 1.820)\text{ }\mu\text{m}\times(0.385\sim 0.560)\text{ }\mu\text{m}$ 。有侧生鞭毛菌存在,且个体两端一般以钝圆为主,也存在两端略为尖锐的个体。在多数情况下为单生个体,也可见对生形式的个体。

菌株 B30 的生化指标氧化酶阳性,明胶液化阳性,革兰氏染色阴性。通过菌落、细胞形态及生理生化

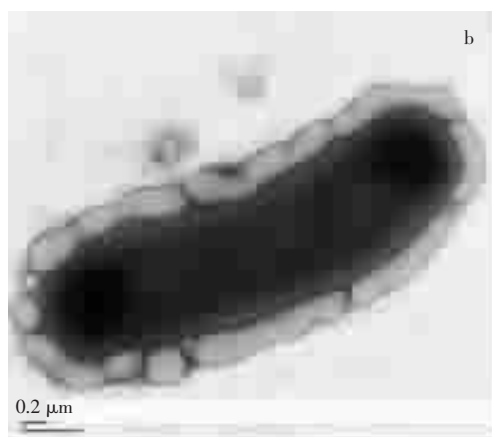
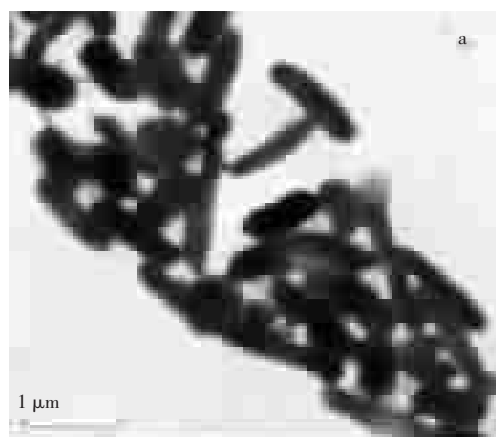


图 1 菌株 B30 的透射电镜照片 ($\times 25\ 000$)

Figure 1 Transmission electron micrograph of strain B30 ($\times 25\ 000$)

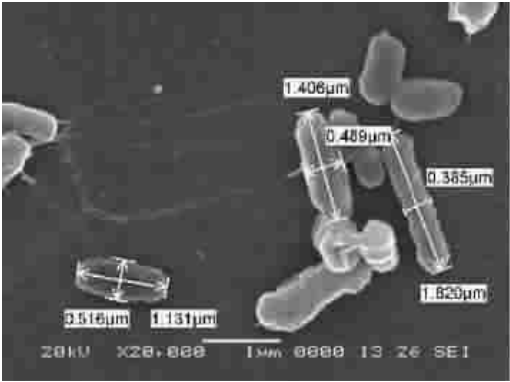


图 2 菌株 B30 扫描电镜照片(×18 800)

Figure 2 Scanning electron micrograph of strain B30 (×18 800)

等方面的分析，初步鉴定 B30 属于伯克氏菌属(*Pan-*
doraea sp.)。

采用 BLAST 将菌株 B30 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已登录[(Brij-30)–EF076032)]的基因序列进行对比，发现与菌株 B30 16S rRNA 基因同源性最高的是伯克氏菌属(*Pandoraea* sp.)，与 *Pandoraea* sp.LB-7 最为相似，同源性为 99%。根据菌株 B30 的 16S rDNA 序列与伯克氏菌属包括模式菌株的相关菌种的 16S rDNA 序列构建系统进化树(图 3)。结果表明，菌株 B30 与已知克隆菌株具有高度的同源性，同源性达 99%，它们可能是属于相同的属，甚至相同物

种。16S rDNA 扩增测序方法鉴定的结果与菌落、细胞形态及生理生化等的鉴定结果一致,进一步确证菌株 B30 属于伯克氏菌属(*Pandoraea* sp.)。

2.2 Brij-30 和降解菌 B30 对土壤微生物区系的影响

2.2.1 供试土壤的微生物数量

土壤细菌、真菌、放线菌是土壤生态系统中微生物区系的主要组成成分,在受到表面活性剂污染条件下微生物区系的变化(微生物种群数量)是反映土壤环境质量变化的重要生物学指标之一。由表 1 可知,两种样土均呈酸性，除碱解氮外，菜园土中的有机质、CEC、脲酶活性均高于茶园土。由表 2 可知,两种土壤中的细菌数最多,放线菌数次之,真菌数最少。细菌在土壤有机物和无机物转化过程中起着重要作用,放线菌的作用是分解植物和动物的某些难分解的组分,形成腐殖质，把植物残体和枯落物转化为土壤有机组分。而真菌主要参与有机质的分解,使枯落物中的蛋白质形成植物可直接吸收的可溶性 N 素氨基酸和铵盐等^[18]。菜园土的真菌数量大于菜园土,而细菌数量远小于菜园土。这是由于细菌的微生物碳氮比比真菌高^[19],细菌碳氮比在 315 左右,真菌在 10~15 左右^[20],而菜园土的碱解氮远大于菜园土，是菜园土的 1.31 倍,碱解氮含量增加可能导致真菌生长占优势,也可能使细菌生长受抑制^[18]。

2.2.2 Brij-30 和降解菌 B30 的施用对土壤微生物区

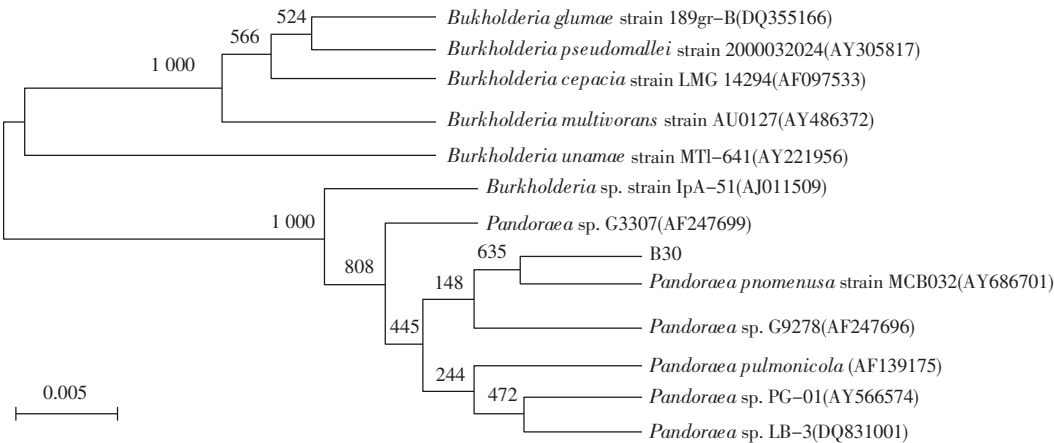


图 3 B30 的 16S rDNA 基因系统发育树

Figure 3 Phylogenetic and molecular evolutionary analyses of B30 based on 16S rDNA

表 2 供试土壤三大类土壤微生物数量

Table 2 The quantities of three main groups of microbes in the tested soil

土壤类型	细菌/10 ⁵ cfu·g ⁻¹	放线菌/10 ⁵ cfu·g ⁻¹	真菌/10 ³ cfu·g ⁻¹	三大类微生物总量/10 ⁵ cfu·g ⁻¹
茶园土	2.11	11.45	10.51	13.71
菜园土	19.60	7.55	2.71	37.20

系的影响

Brij-30 和降解菌 B30 的施用对土壤微生物区系影响的情况如表 3 所示。由表 3 可知,与空白实验组相比,3 种处理方式均使得细菌和放线菌数量及三大类微生物总量在 2 种土壤中的数量明显的减少,而 T3 处理的减少量最低,这是由于非离子表面活性剂毒害作用抑制了细菌和放线菌的生长。Helenius 等的研究表明,表面活性剂对微生物毒性的影响主要有两方面^[21]:①通过与细胞膜中液态成分的相互作用使细胞膜溶解;②表面活性剂分子对生物细胞功能的改变。另外,也有学者认为表面活性剂生物降解产生的代谢中间产物的毒性通常比原有表面活性剂的毒性更大^[22],因此,在 T2 处理中,降解菌 B30 的立即加入并没有明显地降低表面活性剂的毒性,甚至毒性增加了(如放线菌),而在 T3 处理中,先加入表面活性剂培养 168 h,提高了细菌和放线菌对表面活性剂及其中间产物毒性的耐受性^[22],缓后加入降解菌 B30 时,表面活性剂对细菌和放线菌的毒害作用减弱。此外,由表 3 可知,在 3 种处理中,真菌在土壤中的数量有明显增加的趋势,且茶园土大于菜园土,这可能与真菌呼吸作用弱及对 N 元素依赖性大有关^[18,22],但具体原因还有待进一步研究。

2.3 降解菌 B30 的施用对土壤中表面活性剂降解的影响

外源接种物能否在自然状态下充分发挥其功能,是关系到该菌株能否走向应用的至关重要的一步。实验研究了浓度为 80 mg·kg⁻¹ 的菌株 B30 对土壤中 Brij-30 的降解情况。由图 4 可知,与 BL 处理相比,T2、T3 处理后,Brij-30 在两种土壤中的降解作用明显增加,降解效率分别为 84%~86%、67%~74%。这说明菌株 B30 接入土壤后,对土壤环境表现出很强的适应能力,仍对 Brij-30 具有较强的降解能力。同时,Brij-30 在 T2 处理上的降解效率大于 T3 处理,土壤中

中施用 Brij-30 后立即接种降解菌 B30 的降解作用大于缓后接种,这是因为往土壤中加入 Brij-30 培养 168 h 后,Brij-30 与土壤产生了吸附,极大地影响了表面活性剂在土壤中的流动性和滞留性,并直接影响到降解菌 B30 对它的降解,表面活性剂在土壤中的吸附系数与其生物降解之间存在负相关系^[23];而菌株 B30 和 Brij-30 同时加入时,Brij-30 仍在溶液状态时,菌株 B30 就开始对其进行降解,因此提高了对表面活性剂降解效率。此外,菌株 B30 在茶园土和菜园土中对 Brij-30 的降解情况没有明显的差异,这说明土壤理化性质对菌株 B30 的降解效率没有太大的影响。

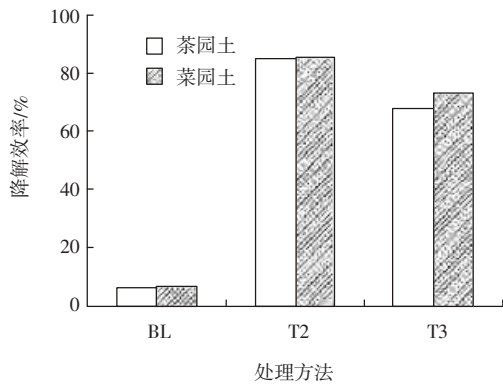


图 4 菌株 B30 在土壤中对 Brij-30 的降解情况
Figure 4 The degradation of Brij-30 by strain B30 in soil

3 结论

- (1) 从湖南丽臣洗涤厂和长沙毛巾厂共同排污口废水中筛选得到 1 株高效降解 Brij-30 的革兰氏染色阴性菌 B30,从形态、生理生化特征和 16S rDNA 的分析鉴定该菌株为伯克氏菌属(*Pandoraea* sp.)。
- (2) 非离子表面活性剂 Brij-30 的毒害作用抑制了细菌和放线菌的生长,且毒害作用主要来源于 Brij-30 降解后的中间产物。

表 3 Brij-30 及降解菌 B30 的施用对土壤中微生物数量的影响					
Table 3 Effect of applying of Brij-30 and strain B30 on quantities of microorganisms in the tested soils					
土壤类型	处理方式	细菌/10 ⁵ cfu·g ⁻¹	放线菌/10 ⁴ cfu·g ⁻¹	真菌/10 ³ cfu·g ⁻¹	三大类微生物总量/10 ⁵ cfu·g ⁻¹
茶园土	BL	2.11	114.52	10.51	13.71
	T1	0.16	0.96	8.71	0.34
	T2	0.95	0.55	5.70	1.06
	T3	0.81	13.92	180.01	5.01
菜园土	BL	19.60	75.54	2.71	37.20
	T1	0.45	1.76	19.51	0.82
	T2	1.01	0.13	26.71	1.31
	T3	13.9	36.73	29.31	17.92

(3) 菌株 B30 对土壤中非离子表面活性剂 Brij-30 有强降解作用, 立即接种菌株 B30 时, Brij-30 降解率在 84%~86%之间, 而缓后接种时, 降解率在 67%~74%之间, 非离子表面活性剂在土壤中的吸附作用会影响到菌株 B30 的降解能力。同时, 土壤理化性质对菌株 B30 的降解率没有太大影响。但菌株 B30 对 Brij-30 的降解产物以及产生机理有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 王 霞, 孙向田. 水环境中非离子表面活性剂生物降解性的研究[J]. 内蒙古环境保护, 2005, 17(1): 28-31.
WANG Xia, SUN Xiang-tian. Research on the biological degradation of nonionic surface-active agent in the water environment[J]. *Inner Mongolia Environmental Protection*, 2005, 17(1): 28-31.
- [2] 臧瑞玲, 胡晓芳, 印春生, 等. 农田土壤中辛基酚聚氧乙烯醚降解菌的分离[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(4): 11-13.
ZANG Rui-ling, HU Xiao-fang, YIN Chun-sheng, et al. Octylphenol polyethoxylates segrading atrains isolated from soil samples of farmland [J]. *Environmetal Science & Technology*, 2006, 29(4): 11-13.
- [3] Matthew J S, Malcolm N J. The biodegradation of surfactants in the environment [J]. *Biochemical Biophysical Acta*, 2000, 1508: 235-251.
- [4] 李 轶, 王 栋, 周集体. 我国表面活性剂 LAS 废水的处理技术发展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(1): 65-71.
LI Yi, WANG Dong, ZHOU Ji-ti. Technical advances in treatment of surfactant LAS wastewater in China [J]. *Techniques and Equipment for Enviro POLL CONT*, 2000, 1(1): 65-71.
- [5] 吴茂英, 李堃宝. 表面活性剂污染及其治理研究进展[J]. 自然杂志, 2002, 24(3): 138-141.
WU Mao-ying, LI Kun-bao. Advances in research on treatment of surfactant pollution[J]. *Nature Magazine*, 2002, 24(3): 138-141
- [6] 林 力, 杨惠芳, 夏星辉, 等. 细菌降解非离子表面活性剂的研究[J]. 环境科学, 1996, 17(6): 17-21.
LIN Li, YANG Hui-Feng, XIA Xing-hui, et al. Study on biodegradation of nonionic surfactant by bacteria[J]. *Chinese Jouranal of Enviromental Science*, 1996, 17(6): 17-21.
- [7] 李学军, 韦平英, 胡明成. LAS、AE 降解菌的筛选及降解效率的研究[J]. 上海环境科学, 2002, 21(12): 725-728.
LI Xue-jun, WEI Ping-ying, HU Ming-cheng. Screening on bacteria strains and study on biodegradation efficiency of LAS and AE[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2002, 21(12): 725-728.
- [8] 刘光崧. 土壤理化分析与剖面描述[M]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
LIU Guang-song. Soil physical and chemical analysis&description of soil profiles (In Chinese)[M]. Beijing: Standards Press of China, 1996. 35-38.
- [9] 王 虹, 崔桂霞. 用氯化钡缓冲液法测定土壤阳离子交换量[J]. 土壤, 1989, 21(1): 49-51.
WANG Hong, CUI Gui-xia. Determination of cation exchange capaci-

- ties in soil with the BaCl₂ Buffer method[J]. *SOIL*, 1989, 21(1): 49-51
- [10] 鲍士旦主编. 土壤农化分析 (第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 70-71.
BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis (In Chinese)[M]. Beijing: Agriculture Press of China, 2000. 49-50.
 - [11] 周德庆. 微生物实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
ZHOU De-qing. Guide book of microbiology experiment[M]. Shanghai: Science Press. (in Chinese), 1983.
 - [12] 布坎南 RE, 吉本 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. (中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册编译组) 北京: 科学出版社, 1984.
Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th. Ed [M]. The translation and editing group of Bergey's manual of determinative bacteriology of microbiological institute of Chinese Academy of Science Beijing: Science Press. (in Chinese), 1984.
 - [13] 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.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of systematic bacteriology[M]. Beijing: Science Press (in Chinese), 2001.
 - [14] Treadway S L, Yanagimachi K S, Lankenau E. Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain 24[J]. *Ap Microbil Biotechnol*, 1999, 51(6): 786-793.
 - [15] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22 (22): 4673-4680
 - [16] Kumar S, Tamura K, Jakobsen, et al. Mega molecular evolutionary genetic analysis [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 1244-1245
 - [17] 杨建成, 曾清如, 杨海君. 几种聚氧乙烯型非离子表面活性剂的分光光度法测定及其应用[J]. 分析化学, 2006, 34(5): 642-646.
YANG Cheng-jian, ZENG Qing-ru, YANG Hai-jun. Spectrophotometric determination of some polyoxyethylene nonionic surfactants and its application[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(5): 642-646.
 - [18] 黎 宁, 李华兴, 朱凤娇, 等. 菜园土壤微生物生态特征与土壤理化性质的关系[J]. 应用生态学报, 2006, 17(2): 285-290.
LI Ning, LI Hua-xing, ZHU Feng-jiao, et al. Relationships between soil microbial ecological characteristics and physical-chemical properties of vegetable garden soil [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(2): 285-290.
 - [19] Anderson J P E, Domsch K H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils[J]. *Soil Sci*, 1980, 130: 211-216.
 - [20] Paul E A, Clear F E. Soil Microbiology and Biochemistry [M]. London: Academic Press, 1996.
 - [21] Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents [J]. *Bio-Chem Biophys Acta*, 1975, 415: 29-79.
 - [22] Holt M S, Mitchel G C, Watkinson R J. The environmental chemistry, fate and effects of nonionic surfactants [M]. Hutzinger: The Handbook of Environmental Chemistry, 1992.
 - [23] Litz N, Doering H W, Thiele M. The behavior of linear alkylbenzene sulfonate in different soils: A comparison between field and laboratory studies[J]. *Ecotoxicol Environ saf*, 1987, 14: 103-116.