

柴油降解菌的筛选鉴定及降解特性研究

王世杰^{1,2}, 王翔¹, 卢桂兰², 汪群慧¹, 李发生², 郭观林^{2*}

(1.北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083; 2.中国环境科学研究院土壤污染与控制研究室, 北京 100012)

摘要:以柴油为唯一碳源,在富集、驯化培养基础上,从胜利油田石油污染土壤中筛选出一株柴油降解微生物 WS14,通过外观形态、Biolog 鉴定等生理生化分析以及 16S rRNA 基因序列分析,确定该微生物为不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)。通过对筛选到柴油降解菌的生长因子研究发现: 适合 WS14 菌株生长的最佳 pH 值为 6.0~8.5,适宜温度为 35℃,最佳培养时间为 72 h,并且柴油含量为 11.5%时菌株的生长量最大;实验结果显示,WS14 菌株对高盐和高含量柴油具有一定的耐受性,能够在 5%含盐量和 30%柴油含量的环境生长。

关键词:柴油;微生物降解;筛选;菌种鉴定

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)01-0049-06

Screening and Identification of Diesel Fuel Degrading Microorganism

WANG Shi-jie^{1,2}, WANG Xiang¹, LU Gui-lan², WANG Qun-hui¹, LI Fa-sheng², GUO Guan-lin^{2*}

(1.Civil and Environmental Engineering School, University of Science and Technology, Beijing 100083, China; 2.Department of Soil Pollution Control, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: The diesel fuel degrading bacteria used in this study was isolated from the aged oily sludge of Shengli Oil Field, and tentatively identified as *Acinetobacter* sp. through morphological and Biolog microplate analysis, as well as 16S rRNA sequencing. The strain, designated as WS14, was further characterized for its ability to degrade diesel fuel through determining the optical density (OD₆₀₀), and the results of growth curves showed that the optimum condition was at pH 6.0~8.5, diesel concentration of 11.5%, and the inoculated temperature and time of 35℃ and 72 h, respectively. In addition, the WS14 strain had capacity to grow in 5% salty and 30% diesel containing medium. The WS14 strain was proposed a potential biodegradation for diesel oil and the biodegradation efficiencies varied as following 58.6%, 35.4%, 18.2% for 1%, 5% and 10% diesel concentration, respectively. In addition, the chromatographic fingerprints indicated that the alkenes with less carbon numbers were preferentially degraded.

Keywords: diesel fuel; biodegradation; screening; strain identification

柴油是一种非常重要的石油产品,预计 2011 年我国的柴油产量将达到每天 3 000 万桶。随着柴油产量和需求的不断提高,冶炼、储存、运输等环节泄漏所造成的水体、土壤和大气等环境污染相应突出^[1],并且油类污染物具有致癌、致畸、致突变等作用,易于在生物体内富集,严重危害和影响生态系统及人体健康^[2]。在自然环境中微生物分布广、数量多、具有较强的适应和突变能力,研究表明,环境中存在许多以石油类污染物为唯一碳源的微生物^[3-4],水体和土壤等介质中石油类污染物能够快速、有效地被微生物

降解去除^[5-7]。与物理、化学法相比,生物法修复石油污染土壤具有安全性好、无二次污染、易于管理等优点,因此,环境污染的生物修复技术日益受到国内外环保专家的重视。

柴油在环境中的迁移、转化等环境行为受到物理、化学和生物等诸多因素的影响。目前国内外对于微生物降解石油类污染物方面进行了很多的研究^[8-9],在这些研究中驯化和筛选能够高效降解石油类污染物的菌株是生物修复技术的关键和难点。Mukherji 等人从海底沉积物中筛选出能够耐受 3.5%含盐量的菌株,在好氧条件下 8 d 能够降解 30%的柴油污染物^[10]。由于石油类污染物的疏水性,生物表面活性剂用于促进微生物降解石油烃成为研究热点^[11-12]。近年来,研究发现微生物在寒冷、盐碱、厌氧等不利环境条件下也能降解柴油^[13-15]。庄铁诚和林鹏在红树林土壤

收稿日期:2010-07-14

基金项目:国际科技合作项目(2008DFR90550);全国土壤调查及污染防治专项(5120801)

作者简介:王世杰(1978—),男,山东莱州人,博士研究生。

* 责任作者:郭观林 E-mail:guogl@craes.org.cn

中筛选出 10 株柴油降解优势细菌类群,其在柴油含量为 1%的污染土壤中,7 d 后柴油的去除率达 75%^[10]。袁红莉等^[17]以及 Potter 和 Duval^[18]筛选出石油高效降解菌,对难生物降解沥青质组分的最高去除率分别为 53%和 40%。

本研究针对胜利油田油泥污染土壤盐含量和石油类污染浓度高的特点,通过富集、驯化筛选出高效柴油降解菌,经过 pH 值、温度、柴油浓度和培养时间的条件实验,得出高效柴油降解菌株的最佳生长条件,了解高效柴油降解菌株的生物降解规律和修复潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试土壤采自胜利油田孤东采油厂一号联合站 0~20 cm 表层土壤,其主要组成是落地原油、油罐清淤和含油污水处理浮渣等油泥污染土壤。供试柴油为商用 0# 柴油(GB/T 19147—2003),经高压灭菌后,室温下保存备用。

BH 培养基配方^[2]: $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{FeCl}_3$ 、 $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$, 121 °C 灭菌 30 min。菌种纯化保存培养基:细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基;真菌采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基;放线菌采用高氏培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 柴油降解菌种的筛选与鉴定

称取 10 g 石油污染土壤,置于 500 mL BH 培养基中,以浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的柴油为唯一碳源,以 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速,在 30 °C 温度下振荡培养 96 h。吸取 10 mL 富集液(2%接种量),接种相同新鲜培养基,连续富集培养 5 次,通过划线平板法分离纯化优势菌株。

将初步筛选的 2 株真菌、14 株细菌,分别接种于 BH 培养基中,逐步增大柴油浓度为 4、8、16、32、64、128 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 14 d 后测定柴油的降解率,选择柴油降解率最高的菌株 WS14(GenBank HM137727)。

采用 Biolog 系统(Biolog, Hayward, U.S.)对微生物利用碳源代谢特征进行分析。以 27F、1542R 为引物,测得 16S rRNA V3 区域基因序列全长,进行序列分析与系统树的构建^[19]。

1.2.2 WS14 柴油降解菌生理生化特性研究

斜面保存的菌种,经过活化处理后,分别以 2%接种量接种至 BH 培养基中,连续振荡培养 72 h 后测定

菌株生长量。分析不同因素(pH、温度、培养时间、污染物浓度)对菌株生长的影响,研究其生理生化特性:①以 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 或 NaOH 调节 pH 值为 4.3、5.4、6.0、7.4、8.5 和 9.1;②培养温度分别为 15、22、29、35、40 °C 和 45 °C;③在降解菌株培养过程中,分别在 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h 取样测定生长量;④柴油浓度分别为 1.0%、2.0%、3.8%、5.6%和 7.4%。细菌生长量采用菌悬液 OD₆₀₀ 表示:以含相同浓度柴油 BH 培养基为参比,在紫外分光光度计 600 nm 处测定吸光值,通过稀释使测量液的吸光度值在 0~0.8 之间。

按照 2%接种量,将活化后的 WS14 菌种转接至柴油浓度为 1%、5%、10%的 BH 培养基中,在 30 °C 温度下,以 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速连续培养,每隔 48 h 分析柴油残留量,同时设置空白对照,分析挥发因素造成的柴油减少量。

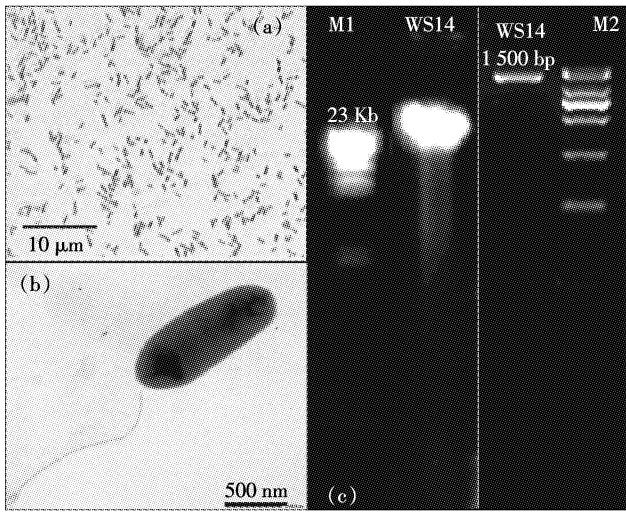
1.2.3 总石油烃(TPH)的测定

以正己烷为溶剂,采用超声-液液萃取的方法,萃取 BH 培养基中的柴油^[15],GC-FID(GC-2010 SHMADZU)参数如下:色谱柱为毛细管柱(DB-5, 30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm),1 μL 进样量,纯度为 99.99% 氮气为载气,总流量为 $13.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱流量为 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;起始柱温度为 45 °C(保持 3 min),以 $8\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率升温到 300 °C(保持 10 min),进样口温度为 250 °C,检测器温度为 340 °C,分流比为 4:1。

2 结果与讨论

2.1 柴油降解菌株的分离、鉴定

经富集分离、纯化培养后,石油污染土壤初步筛选出 2 株真菌、14 株细菌,主要为芽孢菌属、酵母菌属、球菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、黑曲霉和产黄青霉, Rosenberg(1992)等研究石油烃降解微生物得出类似的结论^[4]。WS14 的菌落特征、菌株形态等特征如图 1 所示。WS14 菌落较大,边缘规则,表面饱满,灰白色,半透明,有光泽;革兰氏染色阴性,透射电镜显示菌体有鞭毛,菌体为杆状($1.4\text{ }\mu\text{m}\times 2.0\text{ }\mu\text{m}$),静止期呈球形或不同长度的链状,无芽孢。如表 1 所示, Biolog 生理生化分析中 D-甘露糖、D-纤维二糖、N-乙酰葡萄糖胺、L-阿拉伯糖、D,L-乳酸、L-谷氨酸、L-脯氨酸、L-组氨酸的响应为正,且 WS14 菌株生长中触酶及氧化葡萄糖产酸酶的响应为正,在含盐量为 1%、2%、5%的培养基中均有菌落生长,说明 WS14 菌株具有极强的耐盐性。



(a)革兰氏染色(阴性);(b)菌体透射电子显微镜照片;(c)WS14 菌株 DNA 及 PCR 产物电泳图,M1 为 HandⅢ/λDNA,M2 为 DL2000

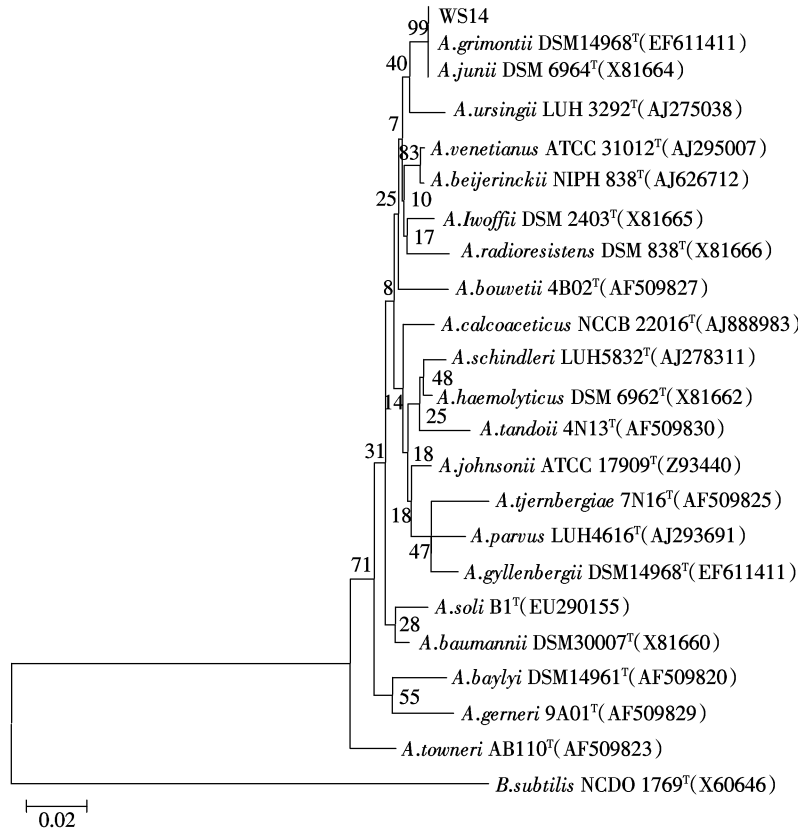
(a)Gaerung gram- negative;(b)transmission electron microscope;(c) DGGE profiles of WS14 DNA and PCR productions,M1 and M2 was standard marker HandⅢ/λDNA and DL2000,respectively.

图 1 WS14 柴油降解菌的形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of WS14 strain

表 1 WS14 菌株代谢特征分析							
Table 1 The metabolic characteristics of WS14 strain							
by Biolog analysis							
D-甘露醇	-	D-蜜二糖	-	D-甘露醇	-	L-果糖	-
D-甘露糖	+	甲基葡萄糖苷	-	麦芽糖	-	甘油	-
糊精	-	D-果糖	-	D-半乳糖	-	L-亮氨酸	-
糖原	+	D-棉子糖	-	龙胆二糖	-	L-鸟氨酸	-
柠檬酸	+	L-鼠李糖	-	a-D-乳糖	-	L-苯丙氨酸	-
D-阿糖醇	-	D-山梨醇	-	D,L-乳酸	+	L-脯氨酸	+
D-纤维二糖	+	蔗糖	-	肌苷	-	L-组氨酸	+
N-乙酰葡萄糖胺	+	D-海藻糖	-	L-谷氨酸	+	D-丝氨酸	-
核糖醇	-	松二糖	-	Tween 80	-	L-丝氨酸	-
L-阿拉伯糖	+	木糖醇	-	L-苏氨酸	-		
触酶	+	氧化酶	-	明胶水解酶	-	七叶灵水解酶	-
脲酶	-	氧化葡萄糖 + 产酸酶	+	硝酸盐还原酶	-		
1% NaCl	+	2% NaCl	+	5% NaCl	+	7% NaCl	-
10% NaCl	-	15% NaCl	-				

如图 2 所示,所提取土壤的 DNA 片段大于 23 Kb,满足 PCR 扩增的需求,并且 1 500 bp 处有一条特



(MEGA3.1 软件临界连接法显示,进行 1 000 次相似度重复计算;上标“T”:模式株;A:Acinetobacte; B:Bacillus)

(The Pro-bit connection analysis of MEGA3.1 software,1 000 similarity counting,and "T" was the model strains; A:Acinetobacte; B:Bacillus)

图 2 WS14 与相关种的 16S rRNA 系统发育树

Figure 2 16S rRNA phylogenetic tree of WS14 strain

异性条带,与目的条带大小一致。16S rRNA 序列系统发育分析结果显示,WS14 菌株同源与不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)的各模式菌株同源性较高且系统发育较近,其中与琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)和格氏不动杆菌(*Acinetobacter grimontii*)模式株同源性为 100%,与该属内的 *A.soli*、*A.baumannii*、*A.venetianus*、*A.ursingii*、*A.calcoaceticus*、*A.bouvetii*、*A.beijerinckii*、*A.lwoffii*、*A.haemolyticus* 和 *A.radioresistens* 等模式菌株序列同源性均在 97.5%以上。石油和柴油污染土壤中,不动杆菌属能够有效地降解石油烃类污染物^[20-21]。

2.2 柴油降解微生物最佳生长条件研究

在污染土壤和污水生物修复过程中,微生态环境因子制约着石油烃污染物的生物降解速率和降解动力学特性。以培养时间为横坐标,OD₆₀₀ 值为纵坐标,通过测定生长曲线,确定 WS14 菌株生长和柴油生物降解的最佳条件。实验结果表明,不同的 pH 值、温度、柴油浓度、培养时间等因素对菌株生长存在显著的影响:(1)如图 3A 所示,随着温度在 15~45 °C 范围内逐渐升高,菌体生长量变化呈倒钟形,当温度达到 35 °C 时菌体生长量最大;(2)1%柴油含量的 M9 培养基中,WS14 菌株在 pH 值 4.3~9.1 范围内均生长(图

3B),表明该菌株具有较广的适应范围,但其最适 pH 值范围为 6.0~8.5,pH 值低于 4.3 或高于 9.1 时菌株不生长;(3)由于种子液培养基与测定用培养基成分相同,菌体生长的延滞期很短,在培养 12 h 后菌株进入对数生长期,持续 72 h,随着活菌数的继续增加,72 h 后菌株生长量趋于稳定(图 3C),Mukherji 等报道了相似的生长曲线^[10];(4)柴油为微生物提供碳源,其浓度高低能在很大程度上影响微生物生长。如图 3D 所示,在 0~11.5% 范围内随着柴油浓度的增加,菌体生长量也增加;当柴油浓度达到 11.5% 时,微生物数量最大,如果柴油浓度继续增加,微生物的数量迅速下降,菌体的生长受到明显地抑制作用;但是,柴油的浓度达约 30%,菌株也能正常生长,说明 WS14 菌株可以利用和耐受高浓度柴油。

微生物油降解作用的强弱受到石油的组分、微生物的种类、数量以及相互作用的环境因子的影响(温度、盐度、pH、无机营养、有机质量及油浓度等)^[22-23]。温度改变微生物的代谢速度、酶活性等,影响石油烃类的降解^[24];低温条件下,菌体自身的生长代谢活动减慢,石油烃氧化酶的分泌受到抑制从而降低降解活性;在一定范围内随着温度升高,油降解菌数量增大,降解活性增强;当温度达到一定值,烃类物质的膜毒

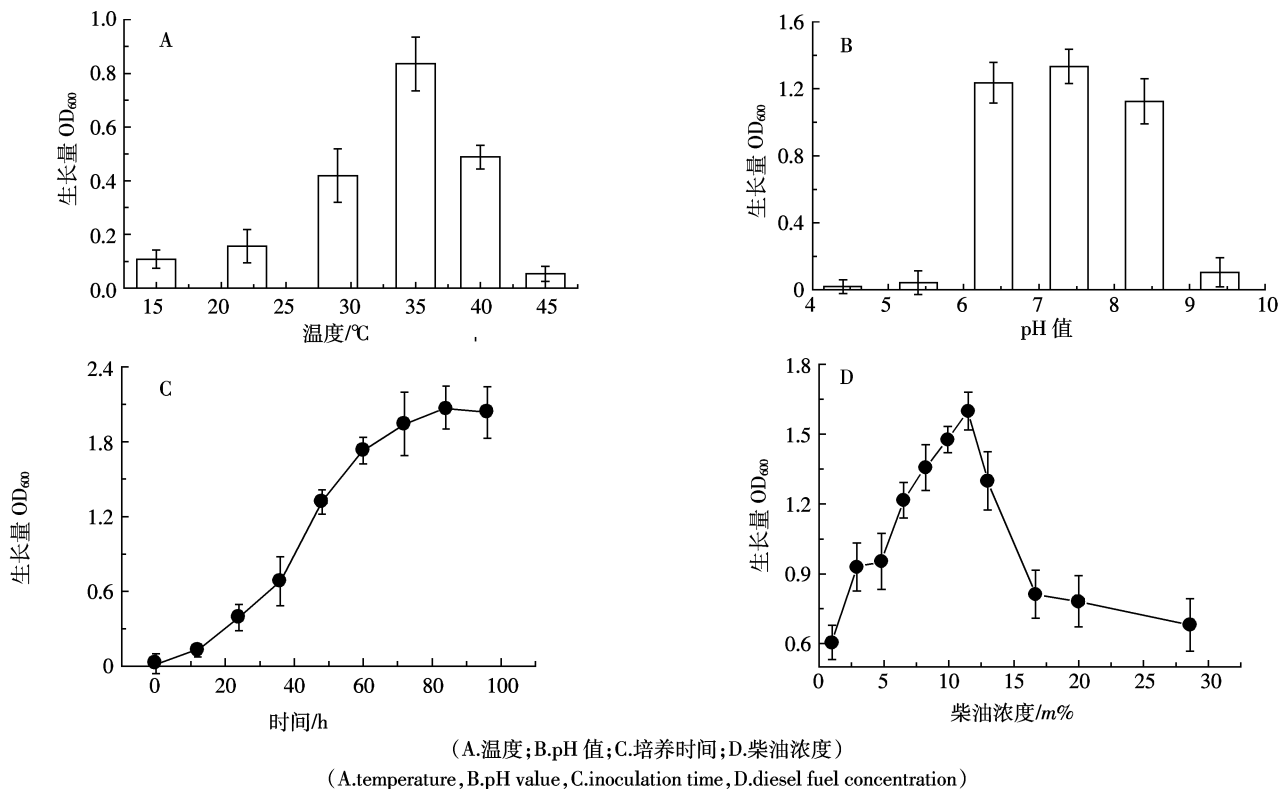


图 3 不同因素对 WS14 柴油降解菌生长量的影响

Figure 3 Effects of experimental condition on the growth of WS14 strain

性就会增大,抑制降解菌生长。Carriere 研究表明,油膜的微生物降解最佳温度范围是 20~35 ℃,石油烃类降解与温度呈正相关^[25]。pH 值影响微生物酶活性及其他活动,主要表现在细胞膜电荷变化,蛋白质、核酸等生物大分子所带电荷发生变化。

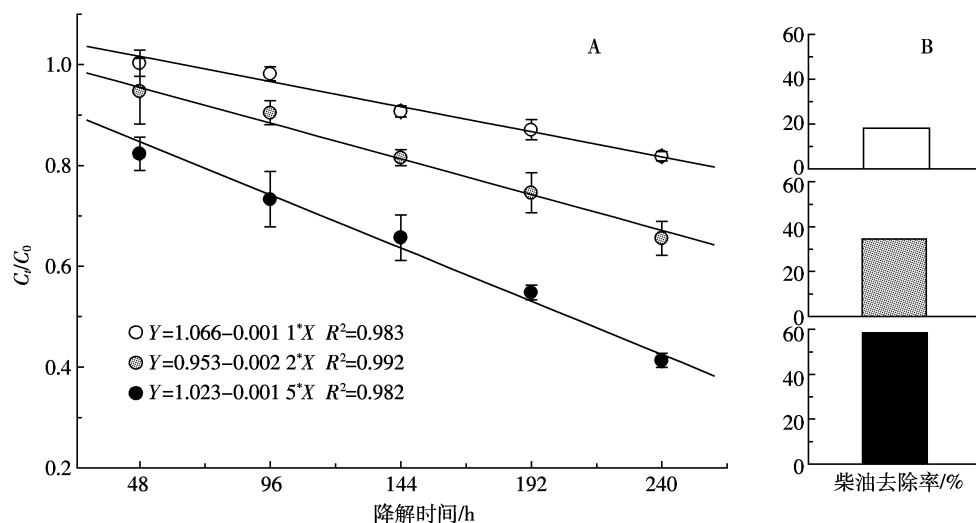
2.3 WS14 菌株对柴油的生物降解能力的测试

如图 4B 所示,在相同的菌剂投加量下,不同柴油含量的总石油烃去除率出现显著差异:在柴油含量为 1% 的培养基中,柴油去除率为 58.6%;而 10% 柴油含量的培养基中,柴油去除率仅为 18.2%。如图 4A 结果显示, C_t/C_0 与 t (降解时间, h) 呈显著线性负相关 ($R^2 > 0.98$), 其中线性回归方程的斜率表示柴油生物降解速率常数, 随着柴油浓度含量的增加而减小,分

别为 0.001 1 h⁻¹、0.002 2 h⁻¹、0.001 5 h⁻¹。Alexander 研究表明, 柴油的不同降解速率主要是受到剂量-毒性效应、可降解组分含量以及微生物生长速率等因素的影响^[26]。如图 5 所示, 微生物降解前后柴油不同碳链长度的烷烃分布, 碳原子数较少的直链烷烃优先被生物降解, 随着碳原子数增加, 去除率逐渐减小, 与国外的研究结果相一致^[14-15, 27-28]。

3 结论

(1) 以柴油为唯一碳源, 从老化油泥污染土壤中筛选出一株柴油降解微生物 WS14, 通过外观形貌、Biolog 碳源利用等生理生化分析及 16S rRNA 基因序列分析, 属于不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.); WS14 菌



(A) 降解动力学研究; (B) 柴油去除率变化。(白色代表柴油含量为 10%, 灰色代表柴油含量为 5%, 黑色代表柴油含量为 1%)

(A) kinetic analysis (B) varied diesel reduction (m%). The white, light gray and gray legend stands for 10%, 5% and 1% of diesel fuel concentration, respectively.

图 4 WS14 菌株生物降解不同浓度柴油含量

Figure 4 Diesel fuel biodegradation at the different concentration levels by WS14 strain

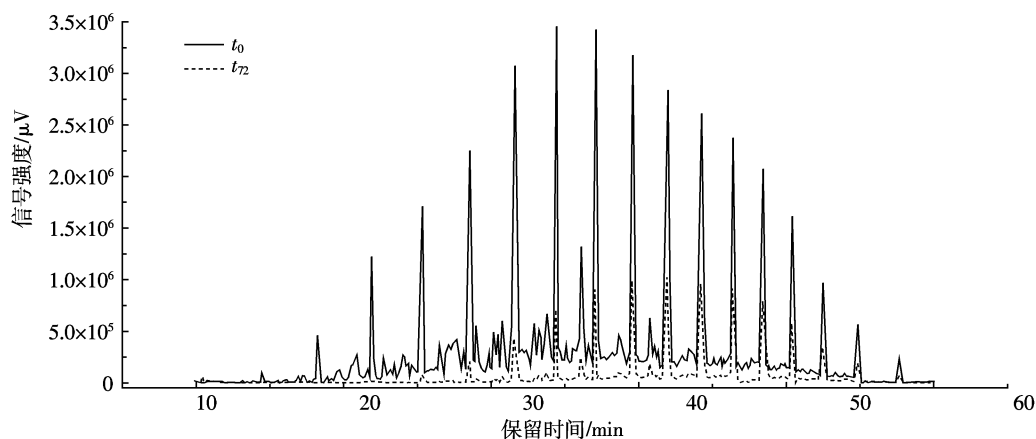


图 5 1% 柴油浓度含量下, 生物降解前后柴油烃各组分变化的气相色谱图

Figure 5 Comparison of 1% diesel biodegradation between 0 and 72 h using chromatographic fingerprint

株的最佳生长条件分别为:pH6.0~8.5,温度 35℃,培养时间 72 h,柴油含量 11.5%。

(2)WS14 菌株对高盐和柴油含量具有很强的耐受性,在 5%含盐量的培养基中有菌落生长,对柴油的最高耐受浓度为 30%,并且低浓度柴油能够促进菌株生长,而高浓度柴油则抑制菌株生长。

(3)WS14 菌株对柴油具有较强的降解能力,在相同的菌液投加量下,1%、5%和 10%柴油含量的生物降解率分别为 58.6%、35.4%、18.2%,而且碳原子数较少的烷烃优先被生物降解。

参考文献:

- [1] Watanabe K, Kodama Y, Syutsubo K. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(11):4803-4809.
- [2] Gallego J R, Loredó J, Llamas J F, et al. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation[J]. *Biodegradation*, 2001, 12:325-335.
- [3] Bossert I, Bartha R. The fate of petroleum in soil ecosystems//Petroleum Microbiology[M]. Atlas R M, New York: MacMillan Publishing Co., 1984:435-473.
- [4] Rosenberg E. The hydrocarbon-oxidizing bacteria//The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications[M]. Balows A, Truper H G, Dworkin M, et al. 2nd edition. New York: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K W, 1992:456-459.
- [5] Rittmann B E, McCarty P L. Environmental Biotechnology: Principles and Application. New York: McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2001.
- [6] DeMello J A, Carmichael C A, Peacock E E, et al. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study [J]. *Mar Pollut Bull*, 2007, 54:894-904.
- [7] Makareviciene V, Janulis P. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester[J]. *Renew Energ*, 2003, 28:2395-2403.
- [8] Johnsen A R, Wick L Y, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil[J]. *Environ Pollut*, 2005, 133:71-84.
- [9] Jürgensen K S, Puustinen J, Suortti A M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles [J]. *Environ Pollut*, 2000, 107:245-254.
- [10] Mukherji S, Jagadevan S, Mohapatra G, et al. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field[J]. *Bioresour Technol*, 2004, 95:281-286.
- [11] Whang L M, Liu P W G, Ma C C, et al. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil[J]. *J Hazard Mater*, 2008, 151:155-163.
- [12] Whang L M, Liu P W G, Ma C C, et al. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation: Effects of pH and ammonium addition[J]. *J Hazard Mater*, 2009, 164:1045-1050.
- [13] Margesin R, Schinner F. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganism in presence of sodium dodecyl sulfate[J]. *Chemosphere*, 1999, 15(38):3463-3472.
- [14] Yang L, Lai C T, Shieh W K. Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions[J]. *Water Res*, 2000, 13(34):3303-3314.
- [15] Boopathy R. Anaerobic biodegradation of No.2 diesel fuel in soil: A soil column study[J]. *Bioresour Technol*, 2004, 94:143-151.
- [16] 庄铁诚, 林鹏. 红树林下土壤微生物对柴油的降解[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(3):442-446.
ZHUANG Tie-cheng, LIN Peng. The degradation of diesel oil microorganisms in the mangrove-soil[J]. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 1995, 34(3):442-446.
- [17] 袁红莉, 杨金水, 王占生, 等. 降解石油微生物菌种的筛选及降解特性[J]. 中国环境科学, 2003, 23(2):157-161.
YUAN Hong-li, YANG Jin-shui, WANG Zhan-sheng, et al. Microorganism screening for petroleum degradation and its degrading characteristics[J]. *China Environmental Science*, 2003, 23(2):157-161.
- [18] Potter T L, Duval B. Cerro Negro bitumen degradation by a consortium of marine benthic microorganisms[J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35:76-83.
- [19] Kao C M, Chen C Y, Chen S C, et al. Application of in situ biosparging to remediate a petroleum hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation[J]. *Chemosphere*, 2008, 70:1492-1499.
- [20] Marín M, Pedregosa Ana, Ríos Santiago, et al. Biodegradation of diesel and heating oil by acinetobacter calcoaceticus MM5: Its possible applications on bioremediation[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 1995, 269-285.
- [21] Asperger O, Kleber H P. Metabolism of alkanes by Acinetobacter//The Biology of Acinetobacter: Taxonomy, Clinical Importance, Molecular Biology, Physiology and Industrial Relevance[M]. Towner K J, Bergogne-Berezin E, Fewson C A. New York: Plenum Press, 1991:232-350.
- [22] Atla R M. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation[J]. *Appl Microbial Biotechnol*, 1973, 30:396-383.
- [23] ZoBell C E. The occurrence effects and fate of oil polluting the sea[J]. *Adv Water Poll Res*, 1964, 3:85-118.
- [24] 倪纯治, 周宗澄, 蔡子平, 等. 海洋油污微生物降解研究 IV. 海洋微生物对原油和柴油的降解作用 [J]. 海洋学报, 1986, 3(8):360-364.
NI Chun-zhi, ZHOU Zong-cheng, CAI Zi-ping, et al. The microbial degradation of crude oil by marine microorganisms IV. The effects of marine microorganisms on the biodegradation of crude oil and diesel oil [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1986, 3(8):360-364.
- [25] Carriere P P E. Enhanced biodegradation of creosote-contaminated soil [J]. *Waste Manage*, 1995:579-583.
- [26] Alexander M. NAPLs and compounds with low water solubility//Biodegradation and Bioremediation [M]. Academic Press, San Diego, 1994:131-148.
- [27] Mohanty G, Mukherji S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2008, 61:240-250.
- [28] Owsianiak M, Chrzanowski L, Szulc A, et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants[J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100:1497-1500.