

复合菌群的构建及其对石油污染土壤修复的研究

赵硕伟¹, 沈嘉澍², 沈 标^{3*}

(1.镇江市环境科学研究所, 江苏 镇江 212001; 2.南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; 3.南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要:从石油污染土壤中富集分离、筛选出 3 株高效降解石油的微生物菌株,通过生理生化特性研究及 16S rRNA 基因序列分析,确定 3 株菌均属于红球菌属(*Rhodococcus* sp),研究和比较了它们与实验室保存的 4 株菌(分别属于 *Gordonia* sp, *Comamonas* sp, *Pseudomonas* sp)降解石油的能力。这 7 株菌株对石油的不同组分具有不同的降解能力,对 7 株菌进行不同的组合用以研究复合菌群对石油的降解。结果表明,由两株 *Rhodococcus* sp,一株 *Gordonia* sp 和一株 *Pseudomonas* sp 组成的复合菌群 D,降解石油的能力超过任何单一菌株和其他组合菌群。混合菌群 D 在 5 d 的培养中能降解 70.3% 的石油总量和 71.4% 的芳香化合物。混合菌群 D 能降解 99.8% 的 C₁₃₋₁₉ 烷烃,92.6 % 的 C₂₀₋₂₆ 烷烃,82.2% 的 C₂₇₋₃₂ 烷烃以及 90.2% 的植烷。在实验室模拟条件下,对土壤中石油的降解率达到 50% 以上。降解土壤中石油的最适温度为 10~30 ℃、pH 值为 6.5~9.5,接种量需要在 10⁶ CFU·g⁻¹ 以上。

关键词:石油污染土壤;降解菌;复合菌群;生物修复

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)08-1567-06

Construction of Multiple Bacterial Consortium and Its Application in Bioremediation of Petroleum-contaminated Soil

ZHAO Shuo-wei¹, SHEN Jia-shu², SHEN Biao^{3*}

(1.Zhenjiang Institute of Environment Sciences, Zhenjiang 212001, China; 2.College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3.College of Natural Resource and Environment Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Three bacterial strains were isolated from petroleum-contaminated soil and identified as *Rhodococcus* sp. based on their 16S rRNA gene sequences and morphological, biochemical and physiological characteristics. Abilities to degrade petroleum were studied and compared among three isolates and four strains instored in our laboratory. The seven strains preferred to degrade different component of petroleum respectively. Multiple bacterial consortia were composed by different combination among the seven strains. Consortium D which consists of two strains of *Rhodococcus* sp, a *Gordonia* sp and a *Pseudomonas* sp showed much higher degrading-oil efficiency than any single strains and other consortia. Consortium D could degrade 70.3 % of petroleum totally and 71.4% of aromatic component in petroleum in 5 days incubation. Consortium D could also degrade 99.8% of C₁₃₋₁₉ alkanes, 92.6 % of C₂₀₋₂₆ alkanes, 82.2% of C₂₇₋₃₂ alkanes and 90.2% phytane in petroleum. When consortium D used in bioremediation of petroleum-contaminated soil, it could remove more than 50% petroleum in soil. In condition of 10~30 ℃, pH 6.5~9.5 and inoculum 10⁶ CFU·g⁻¹, the consortium D could degrade petroleum faster. The results indicated that Consortium D had potential used in bioremediation of petroleum-contaminated soil.

Keywords: oil polluted soil; degrading bacteria; multiple flora; bioremediation

油田在开采、运输过程中造成的泄漏,会直接严重污染土壤、地下水等环境。石油烃在进入土壤后,使土壤的透气性和渗水性降低,阻碍植物根系的吸收与

呼吸,引起根系腐烂,进而导致死亡。而石油烃类物质属于难生物降解性物质,在环境中一般需要较长的时间才能被降解。

对石油污染土壤的修复有物理的、化学的和生物的方法^[1-3]。其中生物修复技术由于没有二次污染、费用低、原位降解污染物等优点而受到人们的高度重视,也取得了一定的进展^[4-5]。目前大多数生物修复是采用向土壤中添加 N、P 等营养物质以促进土著微生物

收稿日期:2011-03-15

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30870081)

作者简介:赵硕伟(1960—),男,江苏镇江市人,学士,高级工程师,主要从事农业环境科学研究。

* 通讯作者:沈 标 E-mail:shenbiao@njau.edu.cn

物生长,进而达到降解石油污染物的目的。也有报道向土壤中投加能降解石油的菌剂来提高石油污染生物修复效率,而且效果非常显著^[6-9],如美国环保局在处理阿拉斯加 Exxon valdex 石油泄漏事故中,通过投加石油降解微生物的方法,在短时间内消除了石油污染,为石油污染的生物修复提供了第一个成功的例证^[10]。人工接种微生物菌剂技术已广泛应用于环境有机污染物的处理^[11-12],由于石油的难降解性以及生物修复容易受环境因素的影响^[13],虽然降解石油的微生物已有许多报道,但筛选高效、对环境适应能力强的微生物菌株仍是研究工作的重点。

本研究通过分离、筛选降解石油不同组分的高效菌株,并构建高效降解石油的菌群,以期提高石油污染土壤的生物修复效率,为石油污染土壤的生物强化修复积累知识和提供指导。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤为潮土,取自山东东营胜利油田马朗村某油井附近含石油土壤(0~20 cm),土壤样品采集后,用塑料袋封装,带回实验室,除去其中根系、沙砾等杂物,再过 20 目筛。供试土壤理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的理化性质及含油量组分

Table 1 Physico-chemical properties of soil tested and oil concentration and fraction percentages

土壤类型	pH	含水量/ g·kg ⁻¹	全 N/ g·kg ⁻¹	全 P/ g·kg ⁻¹	含油量/ g·kg ⁻¹	饱和烃/ %	芳香烃/ %
潮土 H	7.8	45	0.19	0.23	44.6	66	12

1.2 液体培养基

无机盐培养基:(NH₄)₂SO₄ 2 g;K₂HPO₄·3H₂O 2 g;NaH₂PO₄·H₂O 0.6 g;MgCl₂ 0.5 g;NaCl 1g;CaCl₂ 0.02 g,蒸馏水 1 L,pH 7.2。LB 培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,蒸馏水 1 L,pH 7.2。

1.3 菌种筛选与鉴定

取一定量的石油污染土壤于 250 mL 三角瓶中,加入 100 mL 无机盐培养基,30 ℃摇床培养 7 d,然后将培养液进行稀释,取稀释液接种到以石油为唯一碳源的无机盐平板,30 ℃培养 1 周,挑选生长良好的菌落在 LB 培养基平板上进一步分离、纯化,获得石油降解菌的纯培养。

将分离纯化得到的菌株进行形态观察、生理生化试验(方法参见文献[14])及 16S rDNA 序列同源性比对分析,确定其分类地位。

菌株的 16S rDNA 序列分析^[15]:提取细菌的总 DNA,然后以细菌的 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增引物 F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG CA-3',由金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为:10×Taq buffer 2.5 μL,Mg²⁺(25 mmol·L⁻¹)1.5 μL,dNTP (2.5 mmol·L⁻¹)1.5 μL,5'端引物 (10 pmol μL·L⁻¹)2 μL,3'端引物(10 pmol μL·L⁻¹)2 μL,模板 DNA 1 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U μL·L⁻¹)0.5 μL,H₂O 15.5 μL,总体积 25 μL。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min 30 s,30 个循环,补充延伸 10 min。PCR 产物采用试剂盒(Axyprep DNA Gel Extraction Kit,Axygen Biosciences)纯化后进行测序。测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性检索。

1.4 菌株降解石油能力的测定

将试验菌株接种到 5 g·L⁻¹ 原油的无机盐培养基中,5 d 后用石油醚和正己烷萃取,然后分别采用重量法^[17]、紫外法^[18]、GC 法^[19]分析其对石油的降解。

1.5 高效复合菌群的构建

将分离的菌株和实验室保存的其他菌株分别在 LB 液体培养基中 30 ℃振荡培养 30 h,用灭菌的蒸馏水洗涤二次,然后悬浮在灭菌的 0.1 mol·L⁻¹(pH 7.2)磷酸缓冲液中,并将不同的菌株调节到相同的浓度。然后进行不同的组合,不同菌株的菌悬液等比例混合后接种到以石油为唯一碳源的培养基中,30 ℃振荡培养 5 d 后分别采用重量法、紫外法、GC 法分析其对石油的降解,根据降解率确定高效复合菌群。

1.6 复合菌剂对灭菌和未灭菌土壤中石油的降解

菌悬液的制备:将菌株分别接种到液体 LB 培养基,摇床培养至对数生长后期,离心收集菌体并用灭菌的蒸馏水洗涤二次,最后用 0.1 mol·L⁻¹(pH 7.2)磷酸盐缓冲液重悬,然后等比例混合就得到复合菌群菌悬液。

试验设置 3 组处理,分别为:对照(未灭菌土+灭活降解菌剂 D);处理 1(灭菌土+菌剂 D);处理 2(未灭菌土+菌剂 D)。每盆装土 0.1 kg(盆上口径 8.5 cm,下口径 5.0 cm,高 7.5 cm),复合降解菌剂 D 的加入量为 10⁶ CFU·g⁻¹,于 30 ℃下培养,每日喷水使土壤含水量在 20%。薄膜封口,留有少许气孔,以维持通气量。每 5 d 取样测定土壤中石油的含量。土壤和菌剂的灭菌均采用高压蒸汽灭菌。每个处理设 3 个重复,取 3 次重复的平均值。

1.7 土壤 pH 对石油污染生物修复的影响

向试验土壤中添加 HCl 或 NaOH, 调节土壤的 pH 分别为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5。试验设置处理和对照(加等量的 0.1 mol·L⁻¹(pH 7.2)磷酸盐缓冲液), 于 30 ℃下培养, 每日喷水使土壤含水量在 20%。每 5 d 取样测定。每个处理设 3 个重复, 取 3 次重复的平均值。试验用土壤及接种量和 1.5 节相同。

1.8 温度对石油降解的影响

试验设置处理和对照, 分别于 10、20、30、40 ℃下培养, 每日喷水使土壤含水量在 20%。每 5 d 取样测定。每个处理设 3 个重复, 取 3 次重复的平均值。试验用土壤及接种量和 1.5 节相同。

1.9 土壤中石油的提取与测定

参照文献方法^[17]做如下修改: 称取土样 5 g, 于 40 ℃下烘干 24 h, 碾碎, 置于具塞试管中, 加入石油醚 5 mL, 剧烈振荡 30 s, 放入超声波水浴中混匀 10 min, 重复操作 1 次。上层有机相用移液器取出, 残渣再用 10 mL 石油醚混合提取, 合并两次萃取液, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取出上清液, 用紫外分光光度法和石油重量法, 测定其对原油中芳香烃的降解率和对原油总量的降解率。剩余液在旋转蒸发器上蒸干后, 用正己烷溶解, 经孔径 0.45 μm 的针头过滤器过滤, 用 GC 检测烷烃降解谱。

色谱条件: 气相色谱仪为 Thermo trace GC UL-TRA, 色谱柱为 TRB-5, FID 检测器。80 ℃保持 5 min, 以 3 ℃·min⁻¹ 升至 165 ℃, 保持 2 min, 然后以 5 ℃·min⁻¹ 升至 270 ℃, 保持 10 min。进样口温度 250 ℃, 检测器温度 280 ℃, 无分流比。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的分离和鉴定

从石油污染土壤中共分离得到 14 株石油降解

菌, 通过石油降解实验, 筛选出 3 株降解效率高的菌株, 其生理生化特性结果见表 2。菌株的形态和生化特征以及 16S rDNA 序列测定表明, 这 3 株菌均属于 *Rhodococcus* sp。

2.2 菌株对石油的降解

本研究筛选得到的 3 株菌以及实验室保存的其他 4 株菌对石油的降解效果见表 3, 其中菌株 4、5 为 *Gordonia* sp、菌株 6 为 *Comamonas* sp、菌株 7 为 *Pseudomonas* sp^[20]。这 7 株菌对原油的降解能力各有不同, 菌株 1、2、3 能有效降解 C₁₃₋₂₆ 的中长链正构烷烃, 菌株 4、5 对 C₂₆₋₃₂ 的超长链烷烃的降解效率较高, 菌株 6、7 主要降解芳香烃。植烷是支链烷烃中最重要的异戊二烯类化合物的代表, 较难降解, 菌株 1、2 对其降解率在 50% 以上。结果表明这 7 株菌在降解石油的方式上存在多样性。

表 3 各菌株对原油的降解率(%)
Table 3 Degradation efficiency of petroleum by bacterial strains(%)

菌株	属名	降解率/%					
		总重量	芳香烃	C ₁₃₋₁₉	C ₂₀₋₂₆	C ₂₇₋₃₂	植烷
菌株 1	<i>Rhodococcus</i> sp.	44.4	30.4	93.2	91.4	43.1	92.1
菌株 2	<i>Rhodococcus</i> sp.	50.3	43.6	86.2	88.3	54.2	54.2
菌株 3	<i>Rhodococcus</i> sp.	38.8	64.2	87.3	90.3	37.4	0
菌株 4	<i>Gordonia</i> sp.	33.9	41.2	66.4	68.7	62.5	14.2
菌株 5	<i>Gordonia</i> sp.	43.1	56.5	63.9	73.3	73.2	22.2
菌株 6	<i>Comamonas</i> sp.	20.3	65.2	79.3	53.2	13.4	0
菌株 7	<i>Pseudomonas</i> sp.	30.3	75.2	77.3	36.4	22.4	7.2

注: 菌株 1、2、3 为本研究分离, 菌株 4、5、6、7 为实验室保存菌株。

2.3 复合降解菌群的构建

不同菌株之间往往存在协同效应, 利用混合菌群提高石油的降解已有许多报道^[13, 19-20]。选择筛选到的 3 株菌以及实验室保存的其他 4 株菌进行组合构建石油降解微生物菌群。表 4 为部分组合方案及其对石油

表 2 降解菌株形态学观察和生理生化结果

Table 2 Morphological, physiological and biochemical characteristics of strains

鉴定特征	菌株 1	菌株 2	菌株 3	鉴定特征	菌株 1	菌株 2	菌株 3
菌落形状	圆形	圆形	圆形	淀粉水解	+	-	-
菌落颜色	橙色	杏黄色	杏黄色	硝酸盐还原	-	-	-
菌落表面特征	湿润	湿润	干燥	明胶液化	-	-	-
革兰氏染色	+	+	+	V-P	-	-	-
氧化酶	-	-	-	甲基红	-	-	-
接触酶	+	+	+	柠檬酸利用	+	+	+
酯酶	w	+	+	蔗糖	w	+	w
半乳糖	-	-	-	葡萄糖	w	+	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性, “w”表示弱反应。

表 4 部分菌群对原油中不同组分的降解率(%)

Table 4 Degradation efficiency of petroleum by multiple bacterial consortium(%)

菌群	菌株	降解率/%					
		总重量	芳香烃	C ₁₃₋₁₉	C ₂₀₋₂₆	C ₂₇₋₃₂	植烷
菌群 A	菌株 1、3、4、5	54	38.4	91.5	78.3	80.7	90.6
菌群 B	菌株 3、5、7	28.8	45.6	92.7	66.3	29.8	1.3
菌群 C	菌株 1、2、4、6	37.2	55.9	89.0	90.3	78.6	85.2
菌群 D	菌株 1、3、4、7	70.3	71.4	99.8	92.6	82.2	90.2
菌群 E	菌株 2、3、6、7	33.3	21.1	90.3	69.3	4.5	33.9
菌群 F	菌株 2、4、5、6、7	16.3	30	78.2	59.3	22.9	8.2
菌群 G	菌群 1、2、3、4、5、6、7	34	36.9	87.3	68.4	54.2	29.7

的降解效果。通过对石油重量法、紫外法、GC 法测定分析,结果表明菌株 1、3、4、7 构建的菌群 D 对石油的降解效果最好,在装液量 100 mL、总接种量 4 mL、石油浓度 5 g·L⁻¹ 的液体无机盐培养基中,7 d 内石油降解率达到 70.3%(重量法)、71.4%(紫外法),其降解石油的效率远高于单一菌株和其他复合菌群。

2.3 复合菌剂对灭菌和未灭菌土壤中石油的降解

降解结果参见图 1。对照中石油的降解是由土著微生物进行的,结果表明土著微生物对石油的降解非常缓慢,在石油浓度为 44.6 g·kg⁻¹ 的潮土 H 中 30 d 后的降解率仅为 12.6%(紫外法为 15%)。而接种复合菌群 D 的处理对石油的降解明显提高,在灭菌和不灭菌土壤中,接种菌剂对石油的降解率都达到了 50% 以上(紫外法为 61.2%)。在接菌处理中,石油的降解主要发生在前 15 d 中,在后 15 d 降解非常缓慢。

2.4 土壤 pH 对复合菌剂生物修复石油污染的影响

土壤 pH 对复合菌剂生物修复石油污染的影响见图 2。在 pH 4.5、pH 5.5 土壤中,复合菌群对石油的降解率较低,表明在偏酸性环境中,菌株的生长受到很大影响。随 pH 值的升高,菌剂对石油降解的强化作用逐渐增强,其中 pH 6.5~9.5 中性偏碱的土壤生物

修复效果较好,在 pH 为 8.5 时,生物强化降解率已经增加到 64.9%(紫外法为 65.9%)。菌群 D 总体上适合中性偏碱的 pH 环境,具有潜在的生物修复石油污染土壤的能力。

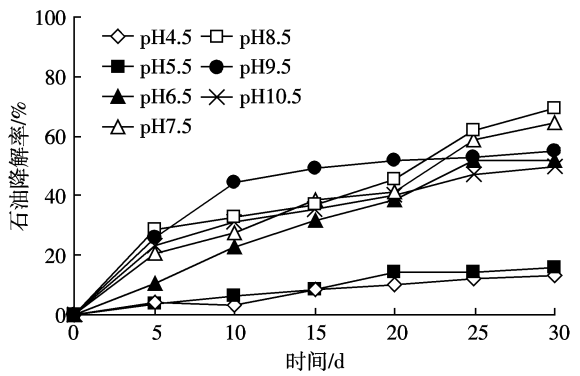


图 2 土壤 pH 值对菌群降解石油的影响
Figure 2 Effect of soil pH on petroleum degradation by bacterial consortium D

2.5 温度对复合菌剂生物修复石油污染的影响

温度对微生物的影响是巨大的,影响着微生物的生长和代谢活性。本研究的结果表明(图 3),该菌群在进行石油污染土壤的修复时,对温度的适应范围较

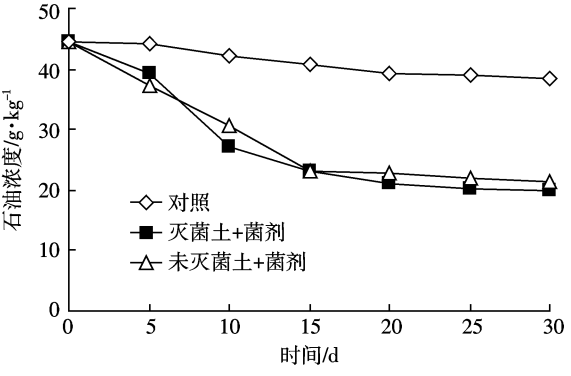


图 1 复合菌群对污染土壤中石油的降解
Figure 1 Degradation of petroleum by bacterial consortium D in tested soils

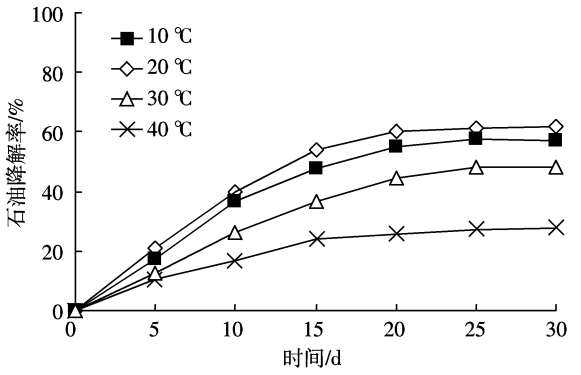


图 3 温度对复合菌群生物修复石油污染土壤的影响
Figure 3 Effect of soil temperature on petroleum degradation by bacterial consortium D

广,其中在 20 ℃时对石油的降解效果最好,30 d 内石油降解率高达 61.4%(紫外法为 72.4%);在 10 ℃和 30 ℃时 also 具有很好的降解效果,而 40 ℃显然抑制了微生物的作用,不利于其对石油的降解。该菌群在低温下对石油降解的良好效果对其用于石油污染土壤的生物修复是十分重要的。

2.6 接种量对石油污染土壤生物修复的影响

接种量对石油污染土壤生物修复的影响见图 4,总的来说,接种量与石油的降解速率呈正相关。但接种量在 $10^7 \sim 10^9$ CFU·g⁻¹ 土范围内,石油的降解率的差异不明显。接种量 10^6 CFU·g⁻¹ 土对石油污染土壤的生物修复效果也比较好的。

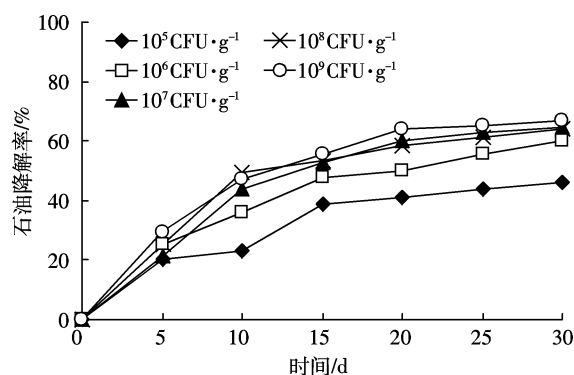


图 4 接种量对菌群降解石油的影响

Figure 4 Effect of inoculum size on petroleum degradation by bacterial consortium D

3 讨论

尽管土壤中有许多能降解石油不同组分的土著微生物存在,但其降解效率还是很低的,而且数量上也不占优势,这也是石油污染难于短时间内消除的原因之一,接种高效降解菌是加速石油污染降解的必然选择。Sanjeet Mishra 等^[20]研究了用 *A. baumannii* S30 pJES 进行石油污染土壤的强化修复,结果表明 90 d 中土壤中石油由 89.3 g·kg⁻¹ 降到 53.9 g·kg⁻¹。Kishore Das 等^[22]用 *P. aeruginosa* M 和 NM 富集物以及 *B. subtilis* 菌株进行石油污染土壤的生物修复(120 d),结果表明,相对于对照土壤,接菌的处理土壤中石油的降解明显提高。而且 *P. aeruginosa* 比 *B. subtilis* 更有效。

石油是多种成分组成的化合物,但大多数微生物菌株总是选择性地降解石油中的某一组分,使用单一菌株也就不能有效地修复石油污染土壤,因而复合菌群用于石油污染的生物修复受到人们的重视^[22-24]。但并不是将各种菌株简单地混合就可以达

到目的。本研究发现,各种复合菌群对石油的降解是很不相同的,有的复合菌群具有较好的降解效果,而有的菌群并不比单一菌株的降解效果好。由菌株 1、菌株 3(*Rhodococcus* sp)、菌株 4(*Gordonia* sp)和菌株 7(*Pseudomonas* sp)组成的菌群在 5 d 时间内对石油的降解率达到 70%左右,远高于任何一株单一菌株。产生这种协同作用可能是由于这几株菌他们各自降解石油中的不同组分,如菌株 1、2 有效降解 C₁₃₋₂₆ 的中长链正构烷烃,菌株 4 对 C₂₆₋₃₂ 的超长链烷烃的降解效率较高,而菌株 7 主要降解石油中的芳香烃。它们的生长底物之间没有竞争性,所以能很好的协同生长。由于各不同的菌株降解石油不同的组分,它们联合作用就对石油具有很高的降解率。Komukai-Nakamura 等^[25]也观察到同样的现象。他们将降解烷烃的 *Acinetobacter* sp、*Rhodococcus* sp 菌株、一株降解烷基苯的菌株 *Pseudomonas putida* 和一株降解菲的菌株 *Sphingomonas* sp 进行不同的组合以研究烷烃降解菌和芳香烃降解菌之间的相互作用。结果表明 *Acinetobacter* sp 和 *P. putida* 的组合是最有效的,能降解石油中 40% 的饱和烃和 21% 的芳香烃。因此,利用复合菌群修复石油污染土壤具有潜在的应用价值。

4 结论

(1) 本研究从原油污染土壤中分离到 3 株高效广谱石油降解菌,经初步鉴定,它们均属于 *Rhodococcus* sp。

(2) 将筛选的上述 3 株菌和实验室已有的另外 4 株菌进行不同的组合,以构建高效降解石油的复合菌群,结果表明,菌株 1、3、4、7 构建的菌群 D 降解效果最好,在装液量 100 mL、总接种量 4 mL、石油浓度 5 g·L⁻¹ 的液体无机盐培养基中,7 d 内石油降解率达到 70.3%(重量法)、71.4%(紫外法),复合菌群之间的相互协同作用使石油的降解作用大大提高。

(3) 混合菌群在实验室模拟条件下,能够很好地降解土壤中的石油。降解土壤中石油的最适温度为 10~30 ℃、pH 值为 6.5~9.5,接种量需要在 10^6 CFU·g⁻¹ 以上。

参考文献:

- [1] Javier Rivas, Olga Gimeno, Ruth G. de la Calle, et al. Ozone treatment of PAH contaminated soils: Operating variables effect[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169: 509-515.
- [2] Javier Rivas, Olga Gimeno, Ruth G. de la Calle, et al. Remediation of PAH spiked soils: Concentrated H₂O₂ treatment/continuous hot water

- extraction-oxidation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 168: 1359-1365.
- [3] 何 翊, 吴 海, 魏 薇. 石油污染土壤菌剂修复技术研究[J]. 土壤, 2005, 37(3): 338-340.
- HE Yi, WU Hai, WEI Wei. Bacteria-based bioremediation technique for oil-polluted soil[J]. *Soils*, 2005, 37(3): 338-340.
- [4] 李春荣, 王文科, 柴丽红. 石油污染土壤的生物修复技术研究 [J]. 土壤, 2008, 40(5): 824-827.
- LI Chun-rong, WANG Wen-ke, CHAI Li-hong. Study on bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Soil*, 2008, 40(5): 824-827.
- [5] 宋雪英, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 石油污染土壤生物修复中外源微生物的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(7): 1168-1173.
- SONG Xue-ying, SONG Yu-fang, SUN Tie-heng, et al. Limited effect of introduced microbial inoculants in the bioremediation of petroleum-contaminated soils[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(7): 1168-1173.
- [6] Rengathavasi Thavasi, Singaram Jayalakshmi, Ibrahim M Banat. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 772-778.
- [7] Isabella Gandolfi, Matteo Siculo, Andrea Franzetti, et al. Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 568-575.
- [8] Mark A S, James S B, Cheryl A P, et al. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland[J]. *Ecological Engineering*, 2004, 22: 263-277.
- [9] Mancera-Lopez M, Esparza-Garcia F, Chavez-Gomez B, et al. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 61: 151-160.
- [10] Pritchard P H, Mueller J G, Rogers J C. Oil spill bioremediation experiences, lessons and results from the Exxon valdez oil spill in Alaska[J]. *Biodegradation*, 1992, 23(3): 315-335.
- [11] Richard J Y, Vogel T M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 44: 93-100.
- [12] Sanjeet M, Jeevan J, Ramesh C K, et al. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1675-1681.
- [13] 李毅然. 复合菌剂修复石油污染土壤的影响因素研究[J]. 衡阳师范学院学报, 2010, 31(6): 60-63.
- LI Yi-ran. Study on the affecting factors on multiple species inoculant during the biodegradation of oil in soil[J]. *Journal of Hengyang Normal University*, 2010, 31(6): 60-63.
- [14] 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 Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Booklet of common bacteria systematic Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-410.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989: 908-910.
- [16] 奚旦立, 孙裕生, 刘秀英. 环境监测[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995: 389-407.
- XI Dan-li, SUN YU-sheng, LIU Xiu-ying. Environmental detection [M]. Beijing: China Higher Education Press, 1995: 389-407.
- [17] 詹秀美, 吴丽卿. 海洋污染物分析方法[M]. 北京: 海洋出版社, 1992: 55-58.
- ZHAN Xiu-mei, WU Li-qing. Analysis method of marine pollutants [M]. Beijing: China Ocean Press, 1992: 55-58.
- [18] 陆 健, 黄 潇, 伍贤明, 等. 高效烷烃降解菌 X CZ 的分离鉴定及降解特性[J]. 土壤, 2008, 43(3): 460-464.
- LU Jian, HUANG Xiao, WU Xian-ming, et al. Study of a high-efficiency alkane-degrading bacterium X CZ[J]. *Soil*, 2008, 43(3): 460-464.
- [19] 刘怡辰, 曹 娟, 高国庆, 等. 萘降解菌 N19-3 的分离、鉴定和萘双加氧酶基因的检测[J]. 环境科学研究, 2008, 21(5): 27-31.
- LIU Yi-chen, CAO Juan, GAO Guo-qing, et al. Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria *Comamococcus* sp. N19-3 and study of its naphthalene-dioxygenase gene[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2008, 21(5): 27-31.
- [20] Sanjeet Mishra, Priyangshu M, Sarma Banwari Lal. Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 235: 323-331.
- [21] Kishore Das, Ashis K Mukherjee. 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: 1339-1345.
- [22] 胡长庆, 徐 伟, 鲍玉婷, 等. 丝状真菌的混合菌群降解原油的条件与效果[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2562-2565.
- HU Chang-qing, XU Wei, BAO Yu-ting, et al. Condition and effect of degrading crude oil by mixed strain group of filamentous fungi[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2010, 38(5): 2562-2565.
- [23] 李昌花, 林 波, 张志强. 复合菌群的构建及所产 MBF 处理印染废水的研究[J]. 工业水处理, 2007, 27(5): 50-53.
- LI Chang-hua, LIN Bo, ZHANG Zhi-qiang. Study on the construction of multiple microorganisms and the treatment of printing and dyeing wastewater with microbial flocculants[J]. *Industrial Water Treatment*, 2007, 27(5): 50-53.
- [24] Rahman K S M, Thahira-Rahman J, Kourkoutas Y, et al. Enhanced bioremediation of n-alkanes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 90: 159-168.
- [25] Komukai-Nakamura S, Sugiura K, Yamanuchi-Inomat, et al. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil[J]. *J Ferment Bioengineering*, 1996, 82: 570-574.