

两株高效烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性

蔡曼 杨蕾蕾 周宇光*

(中国科学院微生物研究所/中国普通微生物菌种保藏管理中心,北京 100101)

摘要 为获得可用于石油、农药污染生物修复的高效烃降解菌,以高黏度的超稠油为唯一碳源,从大庆油井采出液中分离和筛选烃降解菌,并通过残油族组分及全烃组分的分析,拟阐明这些菌株的烃降解特性。结果表明:菌株 H11 和 W14 对黏度为普通稠油 30 倍的超稠油有良好的乳化分散能力,经 16S rRNA 基因序列比对分析,初步鉴定这 2 菌株均为铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*,接种这 2 菌株后,培养液中稠油的饱和烃相对含量均降低 20% 以上,其中接种菌株 H11 后,沥青质的相对含量也降低 5%;同时,H11 和 W14 对长链烃类的降解范围较广,分别最高可作用至 C₂₆ 和 C₂₈ 碳链长度的化合物,并对烃组分有代谢利用选择性。显示了这 2 菌株具有良好的烃类降解能力,可为石油、农药污染物生物修复提供优良的菌种资源和应用前景。

关键词 烃降解菌;铜绿假单胞菌;石油污染;生物修复

中图分类号 S 565.1

文章编号 1007-4333(2016)06-0068-07

文献标志码 A

Isolation and degradation properties of two hydrocarbon-degrading *Pseudomonas* strains

CAI Man, YANG Lei-lei, ZHOU Yu-guang*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences/

China General Microbiological Culture Collection Center, Beijing 100101, China)

Abstract An investigation was conducted with a super heavy oil sample as sole carbon source to select highly efficient hydrocarbon-degrading strains among isolates from oil production water and analyze their degradation properties for oil four components and total hydrocarbon components. The results showed that: Strain H11 and W14, which belong to *Pseudomonas aeruginosa* based on 16S rRNA gene sequence analysis, could emulsify super heavy oil thoroughly; the relative contents of aliphatic hydrocarbons were reduced by 20% after incubation with these two strains; furthermore, the two strains could degrade long chain hydrocarbons with C₂₆ and C₂₈ as the longest ones, respectively. These data suggested that strain H11 and W14 could be reliable resources to emulsify and degrading heavy oil and hydrocarbons in oil- and farm chemical-contaminated environments.

Keywords hydrocarbon-degrading strain; *Pseudomonas aeruginosa*; oil- and farm chemical- contaminated environments; bioremediation

烃即碳氢化合物,指仅由碳和氢 2 种元素组成的有机化合物,是许多其他有机化合物的基体。包括:饱和烃,如烷烃;不饱和烃,如烯烃、炔烃;环烷烃,如环丙烷、环己烷;芳香烃,如苯、萘、菲等^[1]。烃类化合物均疏水亲油,短链烷烃易挥发,长链烷烃、环烃及多环芳烃等组分则不易挥发、有毒且难降

解^[2]。当烷烃挥发在空气中聚集,会引起动物麻醉、昏迷,高浓度时能破坏细胞导致动物死亡^[3]。当烃类积累在土壤中,会堵塞土壤孔隙,改变土壤有机质的组成和结构,并附着在植物的根系表面,形成粘膜,阻碍根系的呼吸和吸收作用^[4];一旦被植物吸收进入组织内部,还能破坏植物正常的生理机能^[5],并

收稿日期:2015-12-03

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(5144029)

第一作者:蔡曼,助理研究员,博士,主要从事微生物资源多样性及生态学研究,E-mail:caiman@im.ac.cn

通讯作者:周宇光,研究员,主要从事微生物资源与多样性研究,E-mail:zhouyg@im.ac.cn

在生物体内积累,最终通过食物链的传递进入人体,造成健康隐患^[6]。当烃类进入水体,疏水特性能使其吸附于水体中的悬浮颗粒上,或以胶体颗粒飘浮或沉积,水中滤食性生物从水中摄入悬浮颗粒和胶体颗粒,从而大量积累有机污染物^[3],以双壳贝类尤为突出^[7];同时,烃类会通过鱼类体肤渗透、呼吸代谢蓄积在鱼体中,造成畸形,影响生长繁殖,更主要的危害是烃类被鱼贝富集后,会通过食物链危害人体健康^[3]。这些烃污染的来源主要有2大类:一是原油污染,自然界最主要的烃来源就是原油^[8],同时随着世界经济发展,能源消耗不断激增,导致石油的大量开采、冶炼、使用和运输,使得含油废水的排放、污水灌溉、各种石油制品的挥发、不完全燃烧物飘落,以及原油泄露问题都日趋严峻,据统计,全世界每年有800万t石油进入环境,其中我国就有60多万t,严重污染土壤、地下水、河流和海洋^[2];另一类主要的烃污染来源则是农药污染,许多烃组分及其衍生物都是构成农药的主要化学物质,如环己烷、芳香烃中的苯、萘等,以及烃衍生物中的卤代烃、酚、酯等^[9],同时烃类也是溶解和稀释农药活性组分的一类重要农药助剂,随农药共同使用^[10],而我国正是农药生产和消费大国,每年施用农药高达50~60万t^[9],但利用效率很低,其中约80%的农药会直接进入土壤、水体^[11]。针对原油和农药污染,目前有化学修复、物理修复及生物修复等方法,其中微生物修复方法以其成本低、效率高、环境友好、无二次污染的优势备受关注^[12,13]。因此利用烃降解菌进行污染物修复的研究引起了越来越多研究者的重视。崔中利等^[9]近10年来,针对不同的农药品种进行降解性微生物的分离筛选,获得大量菌种资源,包含了 *Sphingomonas*、*Arthrobacter*、*Brevundimonas*、*Pseudomonas* 等20多个属。降解石油烃类的细菌微生物也已报道有30属100多种,主要包括 *Pseudomonas*、*Achromobacter*、*Arthrobacter*、*Micrococcus*、*Nocardia* 等属^[14]。但这些菌株大都针对单一农药品种、部分石油烃成分或是普通原油起作用。目前对于具有更大污染物修复潜力、能降解高黏度、高密度稠油的烃降解菌研究还较少。在我国,黏度达100~10 000 mPa·s为普通稠油,超过50 000 mPa·s为超稠油^[15]。2012年,任妍君等^[16]和王大威等^[17]分别报道了不同的稠油烃降解菌,降解稠油黏度分别为1 196和1 094 mPa·s;2010年张翼等^[18]报道的稠油烃降解菌作用稠油粘

度为13 700 mPa·s。本研究将从筛油井采出液中分离和筛选能降解黏度达300 000 mPa·s超稠油的高效烃降解菌,并在基因水平对菌株进行鉴定。通过观察菌株对超稠油的分散乳化能力、分析菌株降解后残油的族组分、全烃组分的分析,探讨其对不同烃类的降解能力差异,旨在为石油、农药污染的生物修复提供优秀的烃降解菌株资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

石油采出液样品采集于大庆油田萨南开发区高台子。超稠油样品采集于青海油田,原油动力黏度为300 000 mPa·s,是普通稠油黏度的近30倍。样品均采集于油井口,无菌罐封装,5℃冷藏条件下运输回实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株分离

LB(Luria-Bertani)固体培养基:酵母粉5 g/L,蛋白胨10 g/L,NaCl 10 g/L,琼脂粉15 g/L,pH 7.0。对大庆油田采出液样品中细菌进行稀释涂布分离、纯化筛选,培养温度和时间分别为30℃和3 d。

1.2.2 菌株筛选

稠油无机盐培养基:超稠油20 g/L,NaCl 5 g/L,NH₄H₂PO₄ 1 g/L,(NH₄)₂SO₄ 1 g/L,K₂HPO₄ 1 g/L,KNO₃ 3 g/L,MgSO₄ 0.2 g/L,pH 7.2,121℃灭菌30 min。将接种菌株分别配置成1 OD(600 nm吸收值)的菌悬液,逐一接种1 mL菌悬液于100 mL稠油无机盐培养基中,150 r/min,30℃振荡培养,观察原油的乳化分散情况。

1.2.3 菌株鉴定

提取纯培养菌株的细胞基因组DNA^[19]。扩增菌株16S rRNA基因序列:引物使用细菌通用引物27F和1492R,目的片段大小为1.5 kb。PCR反应体系: *Taq* PCR Mastermix(天根生化科技,北京) 25 μL,无菌去离子水 20 μL,20 pmol/L引物各2 μL,DNA模板1 μL。PCR扩增程序:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1.5 min,28个循环,然后72℃延伸10 min,4℃保存。PCR反应产物经浓度为10 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测。阳性PCR产物送至北京诺赛基因组研究中心有限公司检测。测得序列在EzTaxon(<http://www.ezbiocloud.net>)进行同源性分

析^[20],并使用软件 MEGA5,构建 Neighbor-Joining 系统发育树^[21]。

1.3 降解特性分析

1.3.1 原油族组分分析

将待萃取的 100 mL 样品倒入 250 mL 分液漏斗中,使用 14 mL 三氯甲烷洗脱三角瓶瓶壁残油,并倒入分液漏斗中,盖紧塞子,充分振荡后,置于漏斗架上,使三氯甲烷和水静置分层。待分层完全后,用已知重量的 100 mL 的三角瓶收集下层的三氯甲烷萃取液,再将剩余的水层用以上方法重复萃取两次,保证原油萃取完全。最后将 3 次的三氯甲烷萃取液收集于同一容器中,常温风干后,根据石油天然气行业标准^[22]进行族组分(饱和烃、芳香烃、非烃和沥青质)分析。

1.3.2 原油全烃组分分析

使用原油气相色谱对上述萃取样品进行全烃组分分析。分析依据行业标准进行^[23]。使用 Finnigan-Trace Ultra (Thermon, USA),载气 99.999% 氦气,恒流 1 mL/min,分流 60:1。进样

口 300 °C,检测器 FID 300 °C。色谱柱使用 HP-1 弹性石英毛细柱(60 m×0.25 mm×0.25 mm),柱温最初为 40 °C 保持 10 min,随后按 4 °C/min 的幅度升温至 300 °C,保持 60 min。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

通过对大庆油田采出液的稀释涂布培养,分离得到 10 株菌落形态不同的细菌菌株。将这 10 株菌株分别接种于以青海油田超稠油样品为唯一碳源的无机盐培养基中,摇床培养 3 d 后,发现菌株 H11 和 W14 对超稠油有明显的乳化分散能力如图 1 所示。未接种微生物的空白对照稠油无机盐培养基(图 1(a)),在摇床培养 3 d 后,原油在形态上不能观察到明显变化,而接种了菌株 H11(图 1(b))和 W14(图 1(c))的培养基中稠油已被乳化分散成微小油滴均匀分布于水相中,表明筛选得到的菌株 H11 和 W14 在生长繁殖过程中对超高粘度稠油有乳化和降解能力。

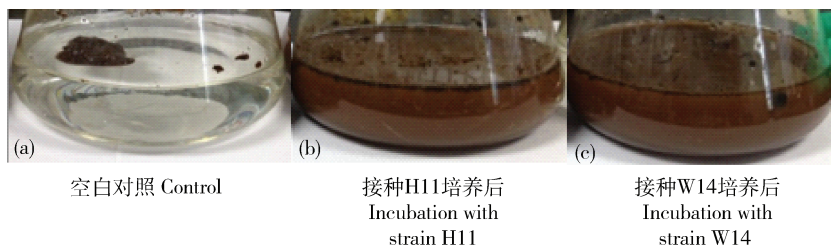


图 1 未接种(a)、接种菌株 H11(b)和 W14(c)培养后稠油乳化分散形态

Fig. 1 Emulsification of heavy oil after incubation empty control (a), strain H11 (b) and strain W14 (c)

2.2 菌株鉴定

将菌株 H11 和 W14 的 16S rRNA 基因序列与参比菌株序列进行两两比对分析,结果表明:2 菌株均与铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962(序列登录号 LC069033)相似性最高,达 100%;其次为菌株 *P. otitidis* MCC10330(相似性 98.08%,序列登录号 AY953147)和菌株 *P. alcaligenes* NBRC 14159(相似性 96.87%,序列登录号 BATH101000076)。以埃希氏大肠杆菌 ATCC 11775(序列登录号 X80725)为外群,构建系统发育树分析菌株的分类地位如图 2 所示。菌株 H11 和 W14 聚集在假单胞菌属菌株中,并与铜绿假单胞菌 JCM 5962 形成稳定的独立分支,初步鉴定菌株 H11 和 W14 为铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)。该菌种其他菌株也曾被报道能分

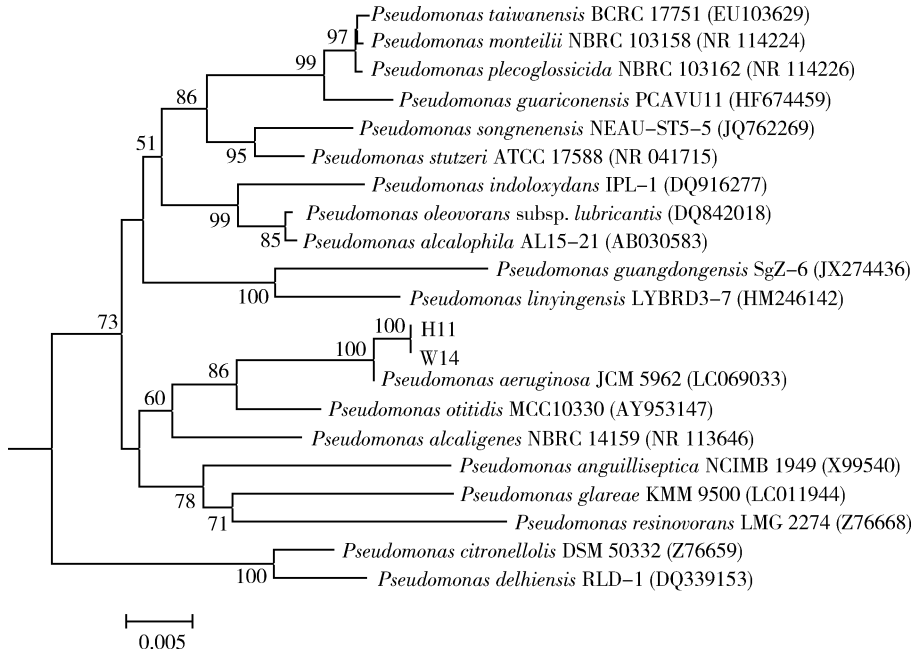
泌胞外鼠李糖脂及其他酶液,促进其降解石油烃及农药成分^[24,25]。

2.3 菌株对超稠油族组分降解分析

分别接种菌株 H11 和 W14 到稠油无机盐培养基中,同时以未接种菌株的超稠油无机盐培养基为空白对照,经过 3 d 培养后,分别检测各体系中原油组分。空白对照及菌株处理后的稠油族组分(饱和烃、芳香烃、非烃和沥青质)相对含量(质量分数)测定结果如图 3。空白对照体系中超稠油 4 族组分含量分别为 68%、14%、10%和 8%,菌株 H11 作用后的 4 族组分含量分别为 42%、19%、36%和 3%,菌株 W14 作用后的 4 族组分含量分别为 47%、18%、17%和 18%。结果表明:1)与对照相比,菌株作用后稠油族组分相对含量的波动明显,显示了 2 菌株对稠油中不同组分的代谢利用具有选择性^[26,27];2)

2 菌株处理后的体系饱和烃相对含量均明显降低，而芳香烃和非烃成分相对含量均明显增加，沥青质含量也发生变化但各不相同，由此推测 2 菌株对饱和烃也有利用，从而降低了它们的含量，同时代谢过程中产生了大量高碳有机酸等非烃类物，使得非烃

和沥青质相对含量升高^[28]；3) 菌株 H11 作用后，沥青质相对含量大幅下降至 3%，由此推测该菌株对沥青质中成分有较好的选择性降解作用，且沥青质中复杂的碳氢化合物成分可能被降解成非烃成分以至其相对含量大幅增加^[17]。



图中显示了菌株 H11 和 W14 与假单胞菌属相似菌株的系统进化关系。系统进化树的外群是大肠埃希氏菌 ATCC 11775 (序列登录号 X80725)，并显示出大于 50 的自举值，比例尺表示每 1 000 个核苷酸中 5 个核苷酸的差异。

This figure shows the phylogenetic positions of strains H11, W14 and the most closely members within the genus *Pseudomonas*. *E. coli* ATCC 11775 (X80725) was used as outgroup but not shown here. Bootstrap values (>50%) are shown at the nodes. Bar, 5 nucleotide substitutions per 1 000 nucleotides.

图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 2 Neighbor-Joining dendrogram of partial 16S rRNA gene sequence

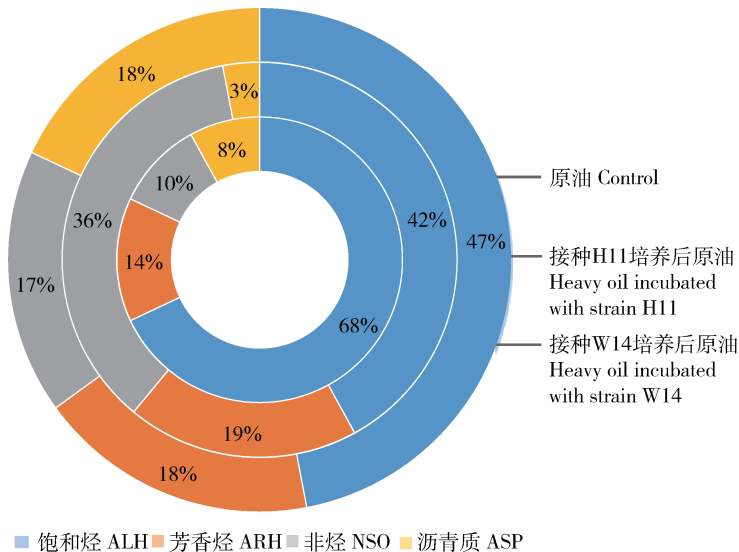


图 3 接种菌株培养后各体系中原油四族组分含量

Fig. 3 Relative content of four components in heavy oil control and samples after incubations with strain H11 and W14

2.4 菌株对超稠油全烃组分降解分析

将空白对照和菌株处理后的培养体系中残余原油进行全烃组分分析,可以反映出菌株对不同碳链长度烃的降解作用。3个体系中的全烃组分分析结果如图4所示。结果表明:1)与对照相比,菌株作用后全烃组分相对含量的波动明显,显示了2株菌对不同碳链烃的代谢利用的选择性^[26];2)菌株H11作用后的原油,C₂₆及其以下碳链长度的烃类相对含量明显降低,从而导致C₂₇、C₂₈和C₃₀碳链长度的烃类物质的相对含量升高,因此该菌株有较广谱的烃降解能力,对C₂₆即二十六烷及其以下碳链长度的多数烃类有较好的降解效果,因而其对更长碳链的烃类降解能力在此数据基础上不易判断;3)菌株H11作用后,对照原油中含量占9.4%的C₂₆烃类被

完全降解,而碳链长度较短的C₁₈、C₂₄等烃类仍都有被检测到,表明该菌株生长对较长碳链的C₂₆烃类有选择性^[27];4)菌株W14作用后的原油,C₂₈及其以下碳链长度的烃类相对含量都明显降低,仅有C₃₀烃类和19个碳链长度的四甲基十五烷含量升高,因此该菌株也有较广谱的烃降解能力;5)菌株W14作用后,19个碳链长度的四甲基十五烷含量被急剧提升,其在对照原油中含量仅占1.0%,而菌株W14作用后其含量增至65.3%,推测该菌株将nC₂₀~C₂₈的物质降解至C₁₉,同时该菌株又对19个碳链长度的四甲基十五烷这类物质降解性差或是不利用,以致大量积累;6)2菌株作用后,包含苯、萘、菲物质的nC₉~C₁₅化合物含量也明显降低。

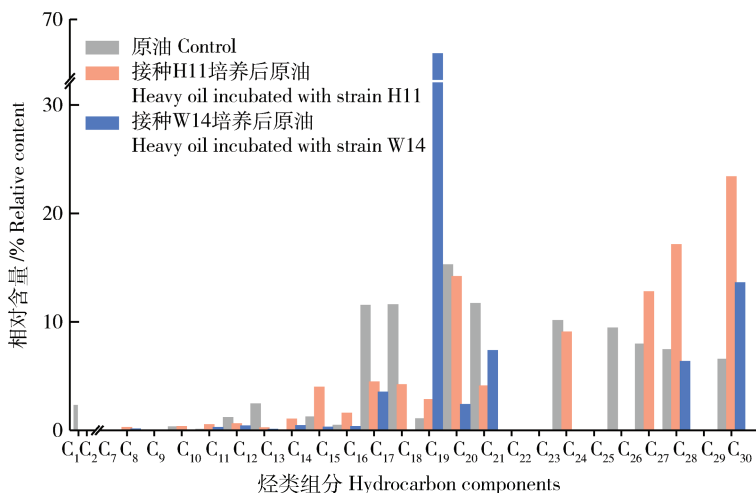


图4 接种菌株培养后各体系中全烃组分

Fig. 4 Analysis of total hydrocarbon components in heavy oil control and samples with incubations of strains H11 and W14

3 讨论

近几年,我国已有研究报道指出不同的稠油烃降解菌,这些菌株降解的稠油黏度分别为1 196、1 094和13 700 mPa·s^[16-18],而本研究筛选出菌株H11和W14可降解稠油黏度达300 000 mPa·s,是其他已报道稠油烃降解菌降解稠油黏度的30倍。经筛选及初步鉴定得到2株铜绿假单胞菌H11和W14,均能将稠油样品很好的乳化分散。曾有报道指出铜绿假单胞菌可产生表面活性剂鼠李糖脂^[24],因此推测良好的乳化效果可能与2菌株产生的胞外分泌物相关。分析菌株作用后的原油族组分及全烃组分发现2菌株对长链烷烃具有广泛的降解能力,

菌株H11可降解C₁₂、C₁₃、C₁₇、C₁₈、C₂₀、C₂₁、C₂₄、C₂₆碳链长度的烃类,W14可降解C₁₂、C₁₃、nC₁₅~C₁₈、C₂₀、C₂₁、C₂₄、nC₂₆~C₂₈碳链长度的烃类。2菌株作用后饱和烃相对含量明显下降,其他族组分相对含量大部分都有所提升,说明菌株对饱和烃有较好的利用,推测代谢过程中可能产生了大量高碳有机酸等非烃类物^[28],同时也由于饱和烃相对含量的降低促使其他族组分相对含量提高,但此处并不能说明菌株不利用相对含量升高的其他族组分,也曾有报道指出铜绿假单胞菌可降解nC₂₆~C₃₃正构烷^[24]。这点也正是本研究的局限性所在,随后需继续从定量角度分析2菌株的降解特性。菌株H11对沥青质中成分有较好的选择降解作用,而菌株W14作用

后使 C₁₉ 碳链长度的四甲基十五烷类物质大量积累,说明 2 菌株代谢利用选择性。虽然已有报道指出铜绿假单胞菌菌株对石油烃及农药成分的降解能力^[24,25],但未见对其烃组分的代谢利用选择性的详细报道,这将是本研究今后工作的着重点。

通过对黏度为普通稠油 30 倍的超稠油样品为碳源,分离筛选出 2 株具有高效烃降解功能的菌株 H11 和 W14,初步鉴定为铜绿假单胞菌。2 菌株能很好的乳化分散高黏度超稠油,并拥有广谱的烃降解能力,且对不同的烃组分有代谢利用选择性,是土壤、水体石油、农药污染生物修复的优良菌株资源,具有巨大应用前景。

参 考 文 献

- [1] 张洪生. 烃及烃的衍生物[M]. 山东: 山东教育出版社, 2001: 19-29
Zhang H S. *Hydrocarbon and Hydrocarbon Derivatives* [M]. Shandong: Shandong Education Publishing House, 2001: 19-29 (in Chinese)
- [2] 魏晓芳, 张忠智, 罗一菁, 郭绍辉. 重质石油污染土壤的生物修复[J]. 化学与生物工程, 2005(7): 7-9
Wei X F, Zhang Z Z, Luo Y J, Guo S H. Bioremediation of heavy oil contaminated soil[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2005(7): 7-9 (in Chinese)
- [3] 李波. 石油烃的污染及其检测方法综述[J]. 广东化工, 2010, 37(4): 269-271
Li P. Total petroleum hydrocarbons pollution and its detection methods[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2010, 37(4): 269-271 (in Chinese)
- [4] 宋玉芳, 周启星, 宋雪英, 张薇. 石油污染土壤污染物的残留与生态毒理[J]. 生态学杂志, 2004, 23(5): 61-66
Song Y F, Zhou Q X, Song X Y, Zhang W. Pollutants residue in soil and the eco-toxicity after irrigation with petroleum wastewater[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(5): 61-66 (in Chinese)
- [5] 孙清, 陆秀君, 梁成华. 土壤的石油污染研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(5): 390-393
Sun Q, Lu X J, Liang C H. Progress on contamination of soils by petroleum [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2002, 33(5): 390-393 (in Chinese)
- [6] Franco M, Viñas L, Soriano J A, de Armas B D, González J J, Beirasc R, Salas N, Bayonad J M, Albaigés J. Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain) after the Prestige oil spill[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2006(53): 260-271
- [7] 蔡友琼, 乔庆林, 徐捷. 贝类产生异味的体内石油烃阈值试验[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(2): 51-55
Cai Y Q, Qiao Q L, Xu J. Test of threshold concentration on petroleum hydrocarbon in molluscan shellfish[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2001, 10(2): 51-55 (in Chinese)
- [8] Clayden J, Greeves N, Warren S. *Organic Chemistry* [M]. Oxford: Oxford University Press, 2001: 21
- [9] 崔中利, 崔利霞, 黄彦, 闫新, 何健, 李顺鹏. 农药污染微生物降解研究及应用进展[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(5): 93-102
Cui Z L, Cui L X, Huang Y, Yan X, He J, Li S P. Advances and application of microbial degradation in pesticides pollution remediation[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2012, 35(5): 93-102 (in Chinese)
- [10] 李秀环. 常用农药助剂对大型溞的毒性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013
Li H X. The toxicity study of pesticide adjuvants to *Daphnia magna* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- [11] 杜蕙. 农药污染对生态环境的影响及可持续治理对策[J]. 甘肃农业科技, 2010(11): 24-28
Du H. Effects to eco-environment of pesticide pollution and its sustainable management strategies [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2010(11): 24-28 (in Chinese)
- [12] 王业耀, 孟凡生. 石油烃污染地下水原位修复技术研究进展[J]. 化工环保, 2005, 25(2): 117-120
Wang Y Y, Meng F S. Development of in-situ remediation technology for petroleum hydrocarbon contaminated groundwater [J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2005, 25(2): 117-120 (in Chinese)
- [13] 权桂芝. 土壤的农药污染及修复技术[J]. 天津农业科学, 2007, 13(1): 35-38
Quan G Z. Soil pesticide pollution and recovery techniques[J]. *Tianjin Agricultural sciences*, 2007, 13(1): 35-38 (in Chinese)
- [14] 李习武, 刘志培. 石油烃类的微生物降解[J]. 微生物学报, 2012, 42(6): 764-767
Li X W, Liu Z P. Microbial biodegradation of petroleum hydrocarbons[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 42(6): 764-767 (in Chinese)
- [15] 李秀娟. 国内外稠油资源的分类评价方法[J]. 内蒙古石油化工, 2008(21): 61-62
Li X J. Classification and evaluation system of heavy oil in the world[J]. *Inner Mongolia Petrochemical*, 2008(21): 61-62 (in Chinese)
- [16] 任妍君, 陈梅梅, 岳勇, 王磊, 王靖, 王万福. 高效稠油降解菌 DL1-G 的筛选及降解特性[J]. 中国环境科学, 2012, 32(6): 1080-1086
Ren Y J, Chen M M, Yue Y, Wang L, Wang J, Wang W F. Isolation and degradation properties of heavy oil-degrading strain *Bacillus flexus* DL1-G [J]. *China Environmental Science*, 2012, 32(6): 1080-1086 (in Chinese)

- [17] 王大威,张健,齐义彬,马挺. 稠油降解菌的筛选及其对胶质降解作用[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 353-359
Wang D W, Zhang J, Qi Y B, Ma T. Isolation of viscous-oil degrading microorganism and biodegradation to resin[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 353-359 (in Chinese)
- [18] 张翼,付波,韩大匡,李满仓. 稠油降解菌的筛选及特性研究[J]. 石油炼制与化工, 2010, 41(7): 68-71
Zhang Y, Fu B, Han D K, Li M C. Isolation of viscous oil degrading microorganism and characterization[J]. *Petroleum Processing Petrochemicals*, 2010, 41(7): 68-71 (in Chinese)
- [19] Pan X C, Geng S, Lv X L, Mei R, Jiangyang J H, Wang Y N, Xu L, Liu X Y, Tang Y Q, Wang G J, Wu X L. *Defluviimonas alba* sp nov, isolated from an oilfield[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65: 1805-1811
- [20] Chun J, Lee J H, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim B K, Lim Y W. EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2259-2261
- [21] Geng S, Pan X C, Mei R, Wang Y N, Sun J Q, Liu X Y, Tang Y Q, Wu X L. *Paradevosia shaoguanensis* gen nov, sp nov, isolated from a coking wastewater[J]. *Current Microbiology*, 2015, 70(1): 110-118
- [22] SY/T 5119-2008. 岩石可溶有机物和原油族组分分析[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
SY/T 5119-2008. Analysis method for fractions of rock extract and crude oil[S]. Beijing: Standard Press of China, 2008 (in Chinese)
- [23] SY/T 5779-2008. 石油和沉积有机质烃类气相色谱分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
SY/T 5779-2008. Analytical method of gas chromatography on saturated hydrocarbons of rock chloroform extract and crude oil[S]. Beijing: Standard Press of China, 2008 (in Chinese)
- [24] 马霞. 铜绿假单胞菌 NY3 胞外活性物对其降解石油烃的作用研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2014
Ma X. Effects of extracellular actives on the process of petroleum hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2014 (in Chinese)
- [25] 王博文. 铜绿假单胞菌 GF31 及其胞外粗酶液对高效氯氰菊酯的降解研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014
Wang B W. Study on B-cypermethrin degradation by *Pseudomonas aeruginosa* GF31 and extra cellular enzyme[D]. Nanning: Guangxi University, 2014 (in Chinese)
- [26] 张廷山, 兰光志, 邓莉, 邓晓皋, 张彩庆. 微生物降解稠油及提高采收率实验研究[J]. 石油学报, 2001, 22(1): 54-57
Zhang T S, Lan G Z, Deng L, Deng X G, Zhang C Q. Experiments on heaving oil degradation and enhancing oil recovery by microbial treatments[J]. *Acta Petrolei Sinica*, 2001, 22(1): 54-57 (in Chinese)
- [27] Nie Y, Liang J L, Fang H, Tang Y Q, Wu X L. Two novel alkane hydroxylase-rubredoxin fusion genes isolated from a *Dietzia* bacterium and the functions of fused rubredoxin domains in long-chain n-alkane degradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011(77): 7279-7288
- [28] 黄学, 伍晓琳, 侯兆伟. 短芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌降解原油烃机制研究[J]. 石油学报, 2006, 27(5): 92-95
Huang X, Wu X L, Hou Z W. Mechanism of degradation for petroleum hydrocarbon by *Brevibacillus brevis* and *Bacillus cereus*[J]. *Acta Petrolei Sinica*, 2006, 27(5): 92-95 (in Chinese)

责任编辑: 杨爱东