

文章编号: 2095—0411 (2012) 04—0001—07

石油污染土壤中降解菌的分离鉴定及降解基因筛选^{*}

秦 薇, 梁玉婷, 刘勇俊, 刘雨佳, 赵 远

(常州大学 环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164)

摘要: 为了得到高效的石油降解菌, 以原油为唯一碳源配制培养基, 从金南油田油污染土壤选取 4 处样品富集培养, 纯化出 14 株细菌, 8 株放线菌, 9 株真菌; 通过生理生化反应以及 16S rDNA 鉴定, 确定了 C-1 和 H-1 菌株均为芽孢杆菌属; 通过降解性能实验和优化实验, 初步绘制了 C-1 和 H-1 的生长曲线并确定了最佳生长条件和降解率; 经查询相关文献, 设计了 6 对降解基因引物, 应用 PCR 的方法对所筛选出的降解菌进行基因克隆, 确定 C-1 与 H-1 菌中含有可降解芳香族化合物的谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 的基因。

关键词: 石油烃降解菌; 分离鉴定; 生物降解; 基因

中图分类号: X 172

文献标识码: A

Isolation, Identification and Gene Cloning of Oil-Degrading Bacteria in Contaminated Soil

QIN Wei, LIANG Yu-ting, LIU Yong-jun, LIU Yu-jia, ZHAO Yuan

(School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: In order to get high degradation of oil bacteria, this study used oil as the only carbon source, chose samples from four places in the soil polluted by oil of Jinna oil field and purified the 14 strains of bacteria, 8 strains of actinomyces, and 9 strains of fungi. Through the physiological and biochemical reaction and identification of 16S rDNA, the C-1 and H-1 strains were determined to belong to the genus bacillus. After degrading performance and optimization experiments, C-1 and H-1 growth curves were drawn and the best growth conditions and degradation rate were identified. Based on the design of 6 pairs of primers of degradation genes and the PCR method for cloning genes after referring to the relevant references, C-1 and H-1 bacteria were found out to contain genes of glutathione S-shift enzyme (GSTs) that can degrade biodegradable aromatic compounds.

Key words: petroleum hydrocarbon degradation bacterium; isolation and identification; biodegradation; gene

石油是现代社会的重要能源, 被称作工业的血液、黑色的金子^[1]。据统计, 全世界每年约有近 800 万吨石油污染物进入环境, 污染水体、大气和土壤, 我国每年有近 60 万吨进入环境^[2], 大量的石油烃污染物进入环境, 使得人类生存环境逐渐恶

化。微生物修复技术具有速度快、消耗少、效率高、成本低、反应条件温和以及无二次污染等优点, 所以利用微生物对石油烃特别是土壤中的石油烃污染进行生物治理和修复是目前环境科学研究的重点和热点。有关石油烃降解微生物的筛选、鉴定

^{*} 收稿日期: 2012—09—07

基金项目: 国家自然科学基金 (41101233); 常州大学博士基金项目 (ZMF1002125)

作者简介: 秦薇 (1989—), 女, 江苏南通人, 硕士生; 通讯联系人: 赵远。

及其在石油烃污染物深度处理中的应用,国内外已有很多报道^[3-11]。由基因工程构建的高效总石油烃降解菌将成为总石油烃降解的主流菌种,这项研究正在逐渐被提上日程,微生物修复技术的环境风险评价技术也急待进一步被完善^[12-14]。这些都是当前总石油烃的微生物修复应用的主要研究对象。

实验从苏北金南油田周围长期受污染的土壤中取样,以原油为唯一碳源,通过富集培养、筛选分离得到高效的石油降解菌种,并对其中降解率较高的 8 株菌株进行了生理生化鉴定和 16S rDNA 序列测定,同时对其降解特性进行了初步研究,并筛选克隆了降解菌株的降解基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养基配制

土壤来源:考虑到对石油烃降解的针对性及原油组分等因素对降解菌的影响,从苏北油田周围 4 个不同位置油污土壤采样,土样编号分别为 A, C, E, H。

石油烃来源:富集培养时采用金南油田渣油,块状且含有少量泥沙,降解实验采用的是 120 # 溶剂油与渣油的混合物,其配比为 m (溶剂油): m (渣油)=1:3。

无机盐培养基: KH_2PO_4 0.85g, K_2HPO_4 1.55g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1g, CaCl_2 0.2g, NH_4Cl 2g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.004g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, H_3BO_3 0.01g, 蒸馏水 1 000mL, pH=7.5。

牛肉膏蛋白胨固体培养基:牛肉浸膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 蒸馏水 1 000mL, 琼脂 15—25g, pH=7.2—7.6。

真菌分离及斜面培养基:马铃薯 200g 煮出液,蔗糖 20g, 琼脂 15—20g, 蒸馏水 1 000mL, pH 自然。

放线菌分离培养基:可溶性淀粉 20g, KNO_3 1g, NaCl 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, MgSO_4 0.5g, FeSO_4 0.01g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1 000mL, pH=7.2—7.5。

发酵培养基: NaNO_3 3g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, CaCl_2 0.002g, 石油烃 1mL, 蒸馏水 1000mL, pH=7.2—7.5。

1.2 实验设备

HZQ—X100 恒温振荡培养箱; LA204 电子天平; LRH—250A 生化培养箱; LDZX—50KB 立式压力蒸汽灭菌锅; SW—CJ 型医用净化工作台; EPS300 型电泳仪; HE—120 型电泳槽; PCR 仪 (ABI 2720)。

1.3 石油降解菌的筛选

1.3.1 菌株的富集驯化

将少量石油污染土壤样品加入 100mL 无机盐培养基 (原油样品 $10\mu\text{L}$, 在 35°C , 150r/min 摇床振荡培养 5d。待培养液浑浊后,吸取 5mL 培养液转接入新鲜含油培养基内。连续转接 4 次。

1.3.2 石油降解菌株的初筛

采用稀释平板法进行分离,将培养液适度稀释后,取 0.1mL 稀释液涂布于分离固体培养基,培养 48h;取生长较好、菌落较大的菌株分别在细菌、真菌和放线菌分离培养基平板上分离、纯化、保种。观察菌株的生长情况、菌落特征和菌体形态。

1.3.3 石油降解菌株的复筛

将上述分离菌株重新接种于石油烃作为唯一碳源的发酵液体培养基中,在 35°C , 150r/min 摇床培养 3—4d,培养液变浑浊后,再用分离固体培养基分离出单菌落,将纯化菌株接种于斜面培养后, 4°C 冰箱中保存。

1.4 石油降解率测定的方法

红外分光光度法:采用四氯化碳萃取水中油类物质,然后将萃取剂通过硅酸镁吸附柱除去具有极性的动植物油类,根据石油烃中碳氢伸缩振动在红外光谱区产生的特征吸收来测定石油类的方法^[15]。

$$\text{石油烃的降解率} = \frac{C_0 - C}{C} \times 100\%$$

其中: C_0 —对照组残油的质量浓度 (mg/L); C —处理后样品的残油质量浓度 (mg/L)。

1.5 石油降解菌降解条件的优化

1.5.1 细菌生长曲线的绘制

菌液按 2mL/L 接种到液体油培养基中,摇床振荡培养,以液体油培养基为对照,每间隔 2h 取样测定培养液在 600nm 处的光密度值 OD,绘制生长曲线^[16]。

1.5.2 温度对石油降解菌降解率的影响

在 100mL 无机盐培养基中加入 120mg/L 的石
油烃 80μL，按 3% 的接种量将一定质量浓度菌悬
液接种至培养基中，分别放入 25、30、35、40、
45℃，150r/min 的振荡培养箱中培养，2d 后取出
测定降解率，确定其最适温度。

1.5.3 pH 对石油降解菌降解率的影响

在得到上述的最适温度后，调节培养基的
pH，使 pH 分别为 5，6，7，8，9，按 3% 的接种
量将一定浓度菌悬液接种至培养基中，放入 33℃，
150r/min 振荡培养箱中培养，2d 后取出测定其降
解率，确定其最适 pH。

1.5.4 底物质量浓度对石油降解菌降解率的影响

在 100mL 无机盐培养中分别加入一定质量浓
度的体积为 40、60、80、100、120μL 的原油，灭
菌后，然后按 3% 的接种量接入一定浓度的菌悬
液，在 33℃，150r/min 振荡培养箱中培养，2d 后
取出测定其降解率。

1.5.5 接种量对石油降解菌降解率的影响

在 100mL 无机盐培养基中加入 120mg/L 的石
油烃 80μL，然后分别按 2%、4%、6%、8%、
10% 的接种量接入一定浓度的菌悬液，放置振荡培
养箱中培养 2d，测其降解率。

1.6 菌种的鉴定

将分离得到的菌株通过观察生长情况、菌落特
征，参考生理生化实验手册^[17]，对菌株的染色反
应、生理生化反应进行鉴定。

同时，通过 PCR 扩增与测序进行菌种鉴定。
取 5mL 细菌悬浮液用上海捷瑞生物工程有限公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒提基因，并用 1.5%
的琼脂糖凝胶电泳检测。扩增引物为：引物 1（5′
—AGAGTTTGTATCATGGCTCAG—3′），引物 2
（5′—TACGGTTACCTTGTTACGACTT—3′）。

PCR 扩增条件为：95℃ 预变性 5min，94℃ 变
性 1min，54℃ 退火 1min，72℃ 延伸 90s，进行 30
次循环，最后 72℃ 延伸 10min。PCR 反应的产物
用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。16S rDNA 由
上海生物工程技术有限公司测序完成。

序列同源性分析：序列信息输入 NCBI（Na-
tional Center for Biotechnology Information）数
据库进行 BLASTN 分析。

1.7 降解基因筛选

查询文献 [18—19]，选取特异性引物序列；

加通用引物 PCR 产物寄至上海杰瑞生物有限公司
合成部进行合成；特异性引物序列见表 1。

表 1 特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequence	
引物名称	序列（5′to 3′）
D3	5′—TAC TTT AGA CGC TGC GGT AT—3′
	5′—TGT CAG TGC CTG GTG GGT A—3′
D5	5′—GGT GAA GAC AAA AGC AAT CC—3′
	5′—CAG CCT CAG ACT CAG AAG AAG—3′
D6	5′—TGA ATC GGC GGT AAA GA—3′
	5′—CAG CCT CAG ACT CAG AAG AAG—3′
D7	5′—CGG ATA ACG CCG TGA ACC A—3′
	5′—TTG CCA AAG CCG CAC CTC T—3′
GST	5′—GAT TTC CTG ACG GTC AAC CC—3′
	5′—GCC CAG CAT CAC GAA CAG ATA G—3′
PD39	5′—AGG CAT CAA GAT CAC CGA CTG—3′
	5′—CGC CAG AAC CAT TTA TCG ATC—3′

其中，特异性引物 D3、D5、D6、D7 均为海
杆菌烷烃羟化酶基因的克隆 PCR 引物，其作用是
降解石油污染土壤中的海杆菌烷烃羟；特异性引物
GST 为可降解芳香族化合物细菌中的谷胱甘肽 S
—转移酶（GSTs）基因的克隆引物，GST 可以催
化谷胱甘肽与异生物质的结合从而达到解毒的目
的；特异性引物 PD39 为酚羟化酶大亚基基因的克
隆 PCR 引物，其作用是降解石油污染土壤中酚羟
物质，从而降低其污染程度。

以上述提取的基因组 DNA 作为 PCR 扩增对
象，以 TaKaRa DNAMarker DL12000 作为分子质
量标准，空白对照作为阴性对照，用 1.5% 琼脂糖
凝胶电泳检测 PCR 产物。

2 结果与分析

2.1 菌种富集分离结果

土壤样品经富集培养及分离、纯化等步骤，共
得到 14 株细菌，8 株放线菌，9 株真菌，其中 9 株
来自土样 A，5 株来自土样 C，10 株来自土样 E，
7 株来自土样 H。

2.2 石油降解菌的降解结果

以原油为唯一碳源接种，对所分离的菌株进行
降解能力的初步研究，对照为不接菌的石油培养
液，降解实验结果表明，这 31 个单菌株对总石油
烃（TPH）的降解能力有很大差异。经 7d 降解
后，不同菌对原油的降解率明显不同，降解率最高
可达 65.4%，而最低只有 5.9%。其中细菌的降
解率可达 13.02%—65.4%，放线菌降解率可达

5.9%—32.55%，真菌的降解率可达 13.6%—57.68%。降解率达到 50% 以上的菌株有 8 株，这 8 株菌的来源、在含油平板上的菌落特征、TPH

降解率见表 2。结合降解过程中的现象观察，选取细菌 C-1，H-1 菌株作进一步的研究。

表 2 石油烃降解菌的生长特征及对石油烃的降解率

Table 2 Hydrocarbon degrading bacteria on growth characteristics and rate of degradation of petroleum hydrocarbons			
菌株编号	菌株来源	菌株形态	降解率/%
C-1	C	浅黄色，干燥紧实，不透明，圆形，菌落小且不易扩散	53.18
C-2	C	乳白色，表面湿润，不透明，菌落大易扩散	62.87
C-3	C	圆形、表面光滑、不透明、乳白色	65.40
A-1	A	鲜黄色，表面粘稠湿润，不透明，菌落较大易扩散	54.97
A-2	A	橙黄色，表面干燥，不透明	53.09
E-1	E	很大，白色，表面湿润粘稠，圆形	52.55
E-2	E	白色、边缘锯齿状、不透明、表面粗糙	57.68
H-1	H	乳白色，表面湿润，不透明，菌落大易扩散	62.34

2.3 石油降解菌降解条件的优化

2.3.1 2 株菌株生长曲线的绘制

图 1 为利用光电比浊法测定 C-1，H-1 菌株的生长曲线图。由图 1 可知细菌 H-1 菌的迟缓期较长，12h 左右才进入对数生长期，这也是其特殊之处，20h 到达最大 OD 值 1.329，24h 后进入衰亡期。C-1 6h 后进入对数期，16h 到达最大 OD 值 1.456，20h 后进入衰亡期。

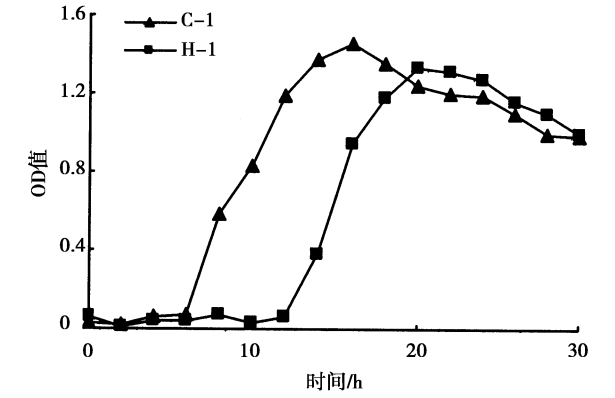


图 1 2 株细菌的生长曲线
Fig.1 Growth curves of two strains

2.3.2 温度和 pH 对石油降解菌降解率的影响

图 2、图 3 分别表示温度和 pH 对菌株 C-1 与 H-1 降解率的影响，由图 2 可知，在 35℃ 时，细菌 C-1 与 H-1 降解率达到最大，所以 C-1 与 H-1 的最适生长温度为 35℃。由图 3 可知，当 pH 为 7.5 时，C-1 的降解率最高，pH 为 7 时，H-1 的降解率最高，所以 C-1 与 H-1 的最适生长 pH 分别为 7.5 和 7。在综合温度与 pH 之后得出，细菌属于适应中性环境的异养菌，不属于极端微生物，这对于以后的培养有了较利的条件。

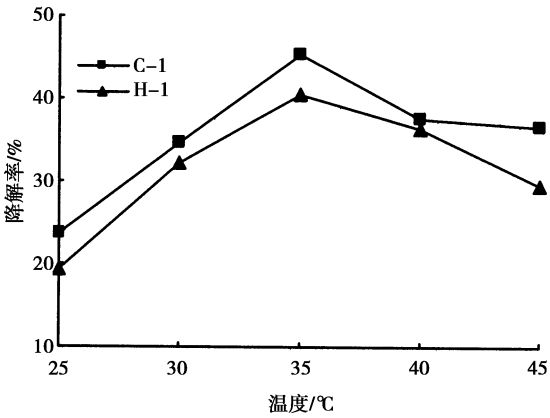


图 2 温度对石油降解菌降解率的影响
Fig.2 The effect of temperature on degradation rate

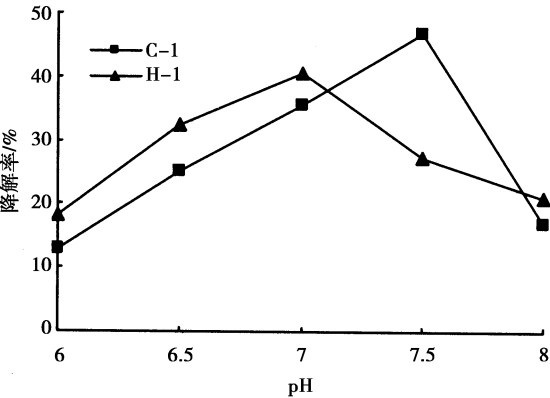


图 3 pH 对石油降解菌降解率的影响
Fig.3 The effect of pH on degradation rate

2.3.3 底物质量浓度对石油降解菌降解率的影响

图 4 表示底物质量浓度对 C-1 和 H-1 菌株降解率的影响。当原油投加量为 100μL 时，C-1 和 H-1 对石油烃的降解率最高。原油含量太低时，无法提供足够的碳源供微生物生长；当原油含量太高时，石油烃浓度增加，阻碍微生物的进一步生长，甚至死亡，从而降低石油降解菌的降解效率。

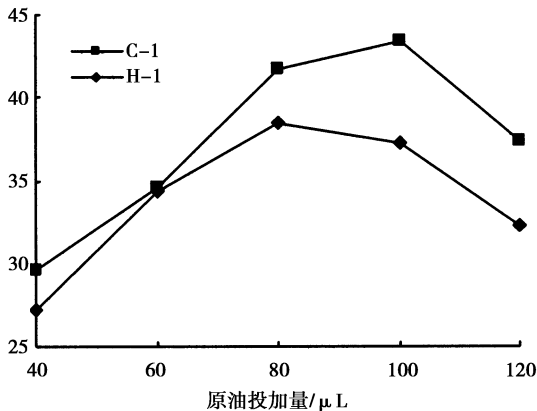


图 4 底物质量浓度对降解率影响

Fig. 4 The effect of substrate concentration on degradation rate

2.3.4 接种量对石油降解菌降解率的影响

图 5 表示接种量对 C-1 和 H-1 菌株降解率的影响。由图 4 可知接种量为 8% 时，C-1 对石油烃的降解率最大。接种量为 6% 时，H-1 对石油烃的降解率最大。接种量的大小是石油降解菌降解过程中的一个重要参数^[20]。投加较大量降解菌时，由于种子量大，会在短时间内发酵出大量菌体，代谢活动加强，从而加快降解速率。

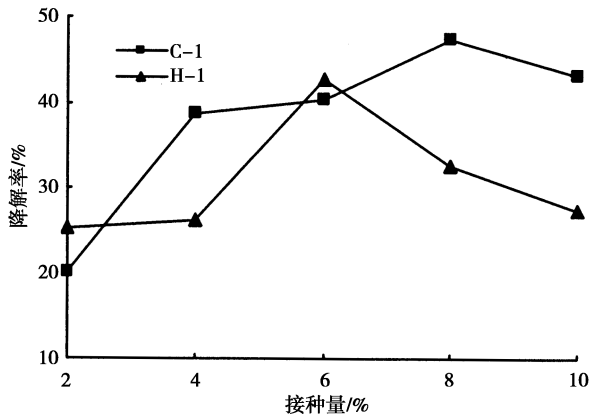


图 5 接种量对降解率的影响

Fig. 5 The effect of inoculum size on degradation rate

2.4 对 C-1 与 H-1 降解菌的鉴定

图 6 为 C-1 与 H-1 的 16S rDNA 在 1.5% 的琼脂糖上的电泳图，扩增产物在 1.5kb 处有特异性条与预期大小一致。泳道 1 为 DNA Marker，泳道 2 为 C-1 的 16S rDNA，泳道 3 为 H-1 的 16S rDNA。由上海生物工程技术有限公司测序。16S rDNA 序列的测定结果用 BLAST 软件与 GenBank 中已发表的 16S rDNA 序列进行同源性比较，结果表明 C-1 与 H-1 都与嗜气芽孢杆菌 (*Bacillus aerophilus*)、同温层芽孢杆菌 (*Bacillus strato-*

sphericus)、高地芽孢杆菌 (*Bacillus altitudinis*) 这 3 株菌株亲缘关系较近，同源性均达到 99%。结合形态观察和部分生理生化实验结果，经序列比对和系统发育学分析确定，可以将 C-1 与 H-1 鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。C-1 与 H-1 系统发育树如图 7。

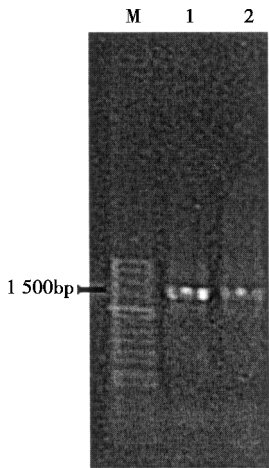


图 6 扩增菌株的 16S rDNA 在 1.5% 琼脂糖上的电泳图

Fig. 6 The electropherogram of amplification Strain 16S rDNA on 1.5% Agarose

2.5 降解基因的克隆

紫外灯下观察，采用凝胶成像系统拍照如图 8。从图 8 可以看到 19、20 扩增出两个明显的条带，19、20 泳道为 C-1、H-1 菌株，引物是根据可降解芳香族化合物细菌中的谷胱甘肽 S-转移酶的基因设计的，C-1 与 H-1 降解菌扩增成功，说明 C-1、H-1 降解菌中含有可降解芳香族化合物的谷胱甘肽 S-转移酶基因。

3 结 论

(1) 本文以苏北某油田周围长期受污染的土壤为研究对象，以原油为唯一碳源通过富集培养，筛选分离得到 14 株细菌，8 株放线菌，9 株真菌；对筛选出的 31 株降解菌的降解性能进行研究，经 5d 降解后，不同菌对原油的降解率明显不同，降解率最高可达 65.4%，而最低只有 5.9%。这是由于不同菌种代谢不同，在总石油烃生物降解工程中所起的作用不同，从而导致不同的菌种降解率不同。其中细菌的降解率可达 13.02%—65.4%，放线菌降解率可达 5.9%—32.55%，真菌的降解率可达 13.6%—57.68%。

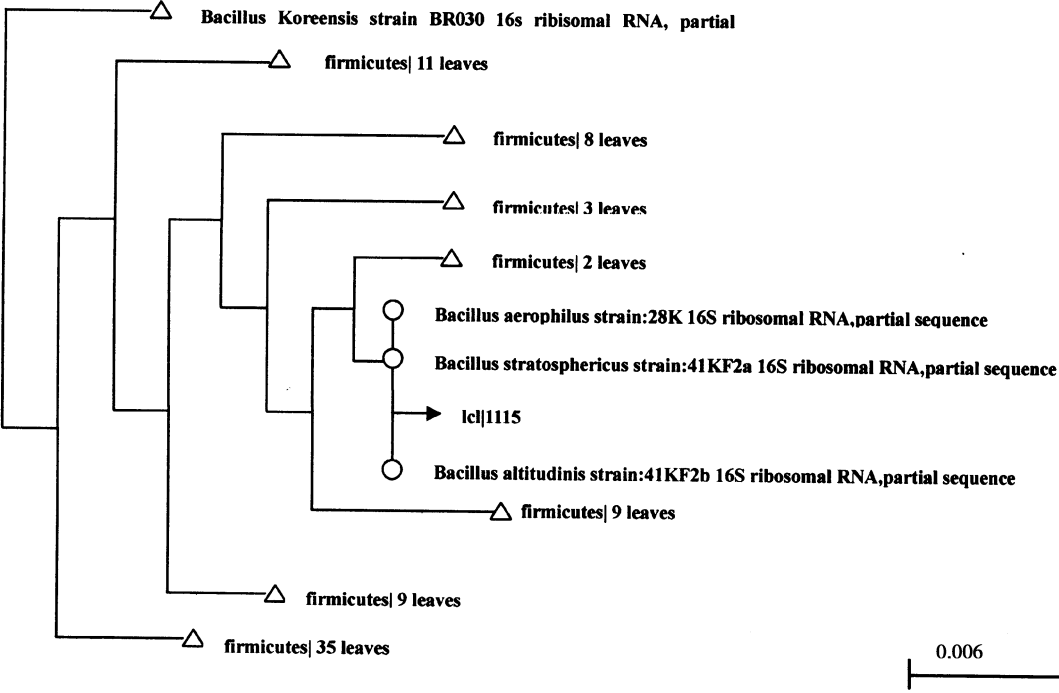
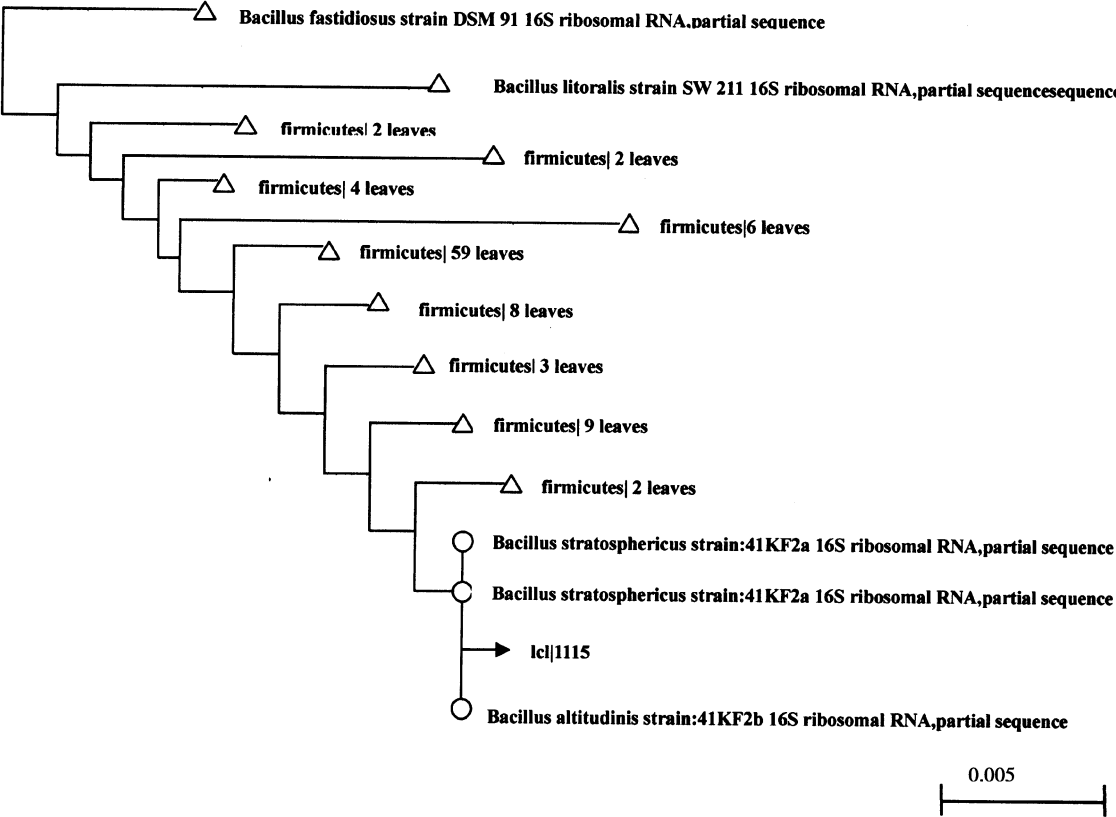


图 7 H-1 与 C-1 降解菌系统发育树

Fig. 7 16S rDNA sequence homology analysis of H-1 and C-1 degradation strain

经过一段时期的驯化培养确定了 C-1 和 H-1 的生长曲线和最佳生长条件。C-1 的最佳生长条件为：温度 35℃，pH 为 7.5，接种量为 8%，底物浓度为 100mg/L 左右。H-1 的最佳生长条

件为温度 35℃，pH 为 7，接种为 6%，底物浓度为 100mg/L。72h 内 C-1 菌株的降解率为 53.18%，H-1 菌株的降解率为 62.34%。结果表明，温度和 pH 对石油降解菌有一定影响。石油降

解菌适宜在中性或略偏碱性的环境下进行生长代谢活动,处于偏酸的环境中会产生大量的酵母菌及霉菌,使污然膨胀,阻碍降解进行。水中原油含量不宜太高,否则石油烃对微生物的毒害作用会大大影响降解效果,甚至死亡。

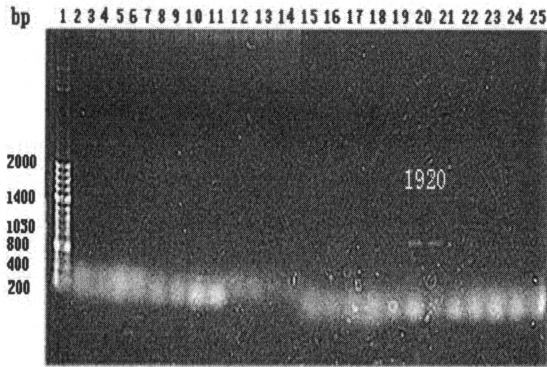


图8 石油降解菌 DNA PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图片

Fig. 8 Oil degradation bacterium DNA amplified PCR product agarose gel electrophoresis pictures

对其中 8 株石油降解菌的形态特征、生理生化特性及 16s rDNA 进行鉴定,均为革兰氏阳性菌,其中 C-1 和 H-1 均为芽孢杆菌属。C-1、H-1 降解菌中均含有可降解芳香族化合物的谷胱甘肽 S-转移酶基因。

(2) 石油降解菌的降解率除受到菌种自身的降解性能限制外,还受到来自外部多个条件的影响,比如温度、pH、底物质量浓度、接种量等多种因素影响。因此,为了获得最大降解效率,有必要对石油降解菌降解条件进行优化。石油降解菌的降解性能不光取决于菌种自身,还与所处的生长环境有直接密切的关系。

参考文献:

- [1] 李宝明. 石油污染土壤微生物修复的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [2] 陆秀君, 郭书海, 孙清, 等. 石油污染土壤的修复技术研究现状及展望 [J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34 (1): 63-67.
- [3] Tano Debrah K, Fukuyama S, Otonari N, et al. An Inoculum for the Aerobic Treatment of Wastewaters with High Concentrations of Fats and Oils [J]. Bioresource Technology, 1999, 69 (2): 133-139.
- [4] Van Hamme J D, Ward O P. Physical and meta-bolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during grow them crude oil and effect of a chemical surfactant on them [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 (10): 4874-4879.
- [5] Deborah D R, Joann A M, Cerniglia C E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment [J]. FEMSMicrobiol Eco, 2002, 41 (1): 1-7.
- [6] 梁生康, 王修林, 汪卫东, 等. 高效石油降解菌筛选及其在油田废水深度处理中的应用 [J]. 化工环保, 2004, 24 (1): 41-45.
- [7] 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.
- [8] 张景来, 李正要, 汪莉, 等. 海水中原油的生物降解 [J]. 北京科技大学学报, 2003, 25 (5): 410-413.
- [9] Whyte L G, Bourbonnier E L, Greer C W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychro-trophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (9): 3719-3723.
- [10] Folsom B R, Schieche D R, Digrazia P M, et al. Microbial desulfurization of a lkyated dibenzothio-phenes from a hydro-desulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* 1-19 [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (11): 4967-4972.
- [11] Koike K, Ara K, Adach I S, et al. Regiospecific internal desaturation of aliphatic compounds by a mutant *Rhodococcus* Strain [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (12): 5636-5638.
- [12] 徐金兰, 黄廷林, 唐智新, 等. 高效石油降解菌的筛选及石油污染土壤生物修复特性的研究 [J]. 环境科学学报, 2007, 7 (4): 62-67.
- [13] 张鲁进, 杨谦, 陈中祥, 等. 两株石油降解菌的降解性能研究 [J]. 南京理工大学学报, 2010 34 (6): 850-854.
- [14] Juarez M J B, Zafra-Gamez A, Luzon-Toro B, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *azotobacter chroococcum* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99 (7): 2392-2398.
- [15] 中国石化总公司环境监测总站. GB/T16488-1996 红外分光光度法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [16] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 103-110.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] 李友发. 福建稻田细菌群落 PCR-DGGE 分析和石油烃降解基因克隆 [D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- [19] Stairs T H M, Rsthlisberger M, Witholt B, et al. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains [J]. Environ Microbiol, 1999, 1 (4): 307-317.
- [20] 赵晴. 疏水石油烃降解菌强化降解系统的构建及其降解能力的研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2005.