

高温产生物乳化剂菌的筛选及其功能分析

徐爽^{1,2}, 黄志勇², 路福平¹, 王永莉³

1. 天津科技大学生物工程学院; 工业微生物教育部重点实验室, 天津 300457
2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308
3. 中国科学院油气资源研究重点实验室, 兰州 730000

摘要 从甘肃玉门油田鸭儿峡油藏样品中分离到 3 株可降解原油并具有很好乳化活性的嗜热菌株, 经 16S rRNA 基因序列分析和生理生化鉴定, 3 株分离菌分别为短小芽孢杆菌 (*Brevibacillus* sp. XS1) 和白色土芽孢杆菌 (*Geobacillus pallidus* XS2, XS3)。3 株分离菌均可在 50℃ 高温下生长, 其中菌株 XS2 的最适生长温度为 60℃, 在 pH 值为 5.5—9.5 范围内均可生长, 有良好适应性, 盐浓度对菌株生长影响不大。菌株 XS2 同时还具有很好的乳化活性和乳化稳定性, 在 100℃ 高温, 20% 盐浓度下, 乳化活性均无明显变化。通过对原油降解过程中色谱特征分析, 菌株 XS2 不仅可降解原油组分中的轻质组分, 而且还能很好地降解原油中重质组分, 提高原油流动性, 原油品质也得到大大改善, 可见菌株 XS2 是一株潜在驱油微生物, 在微生物采油中具有较好的应用前景。

关键词 嗜热微生物; 筛选; 驱油; 生物乳化剂

中图分类号 Q81

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.15.005

Screening Bioemulsifier-produced Microorganisms and Its Function Analysis

XU Shuang^{1,2}, HUANG Zhiyong², LU Fuping¹, WANG Yongli³

1. Key Lab of Industrial Microbiology, Ministry of Education; College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China
2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China
3. Key Laboratory of Petroleum Resource Research, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Abstract Three thermophilic bacteria were isolated from the crude oil contaminated soil samples gathered from Yaerxia oil reservoirs of Yumen oilfield in Gansu Province. According to their 16S rRNA gene analyses, and the physiological properties, the isolated XS1 was identified as *Brevibacillus* sp; and the isolated XS2 and XS3 were identified as *Geobacillus pallidus*. The three isolates could degrade crude oil and had effective emulsification activity. All the isolates can grow at a high temperature, with the optimal growth temperature of XS2 being 60℃, and have a wide adapt-ability to pH, in the range of 5.5—9.5. NaCl concentration has no obvious effect on the growth of three strains. Meanwhile, XS2 has an effective emulsification activity; and the emulsification activity has no apparent change at 100℃ and under 20% salinity conditions. The analysis of chromatogram characteristic changes of crude oil during biodegradation process shows that the strain XS2 can degrade not only the light-weight components of crude oil, but also its heavy-weight components, it enhances the fluidity of crude oil, and the quality of crude oil is also improved. It will have a good prospect in microbial enhanced oil recovery.

Keywords thermophilic microorganisms; screening; oil flooding; bioemulsifier

0 引言

石油是世界工业和经济发展的命脉, 目前全球原油已探

明储量约为 11500 亿桶, 近年来, 尽管探明储量增长了 10%, 但就目前的开采和使用速度来计算, 地球上的原油储量只够

收稿日期: 2011-02-23; 修回日期: 2011-04-11

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目群 (KZCX2-YW-Q05-05)

作者简介: 徐爽, 研究方向为微生物采油, 电子信箱: xushuang131@163.com; 黄志勇 (通信作者), 研究员, 研究方向为功能微生物高通量筛选, 电子信箱: huang_zy@tib.cas.cn

满足全世界 41 年的消费需求^[1]。因此,提高原油、尤其重油的采收率以及废旧油田的再开发成为近年来世界各国普遍关心的重大问题。

自 1926 年 Beckman^[2]提出细菌能采油以来,经过 80 多年的发展,微生物清蜡和降低重油黏度、微生物选择性封堵地层、微生物吞吐、微生物强化水驱等已成为一项成熟的提高采收率技术,并形成了继传统的热驱、化学驱、气驱之后的提高采收率的方法——微生物采油,又称微生物提高原油采收率技术(Microbial Enhanced Oil Recover, MEOR)^[3]。该技术主要通过微生物在油藏中的代谢作用,以及多种代谢产物作用于油藏残余油,改善原油的流动性,增加低渗透带的渗透率,提高采收率的一项高新生物技术^[4]。

中国早在 20 世纪 60 年代就开展了微生物采油技术的研究,近些年来,随着该技术的研 究步伐不断加快,促进了该项技术在国内油田大量应用,但是目前主要存在一些限制因素,如对油藏温度、盐浓度等要求较高,微生物需要在 60—90℃高温,盐浓度在 1.3%—2.5%条件下生长繁殖,而现阶段国内主要将中低温菌株(30—45℃)作用于油藏^[5],这些菌株在高温油藏中不能完全或甚至不能发挥其驱油功能,这导致该技术遇到了瓶颈,故采油微生物菌种转向嗜热菌将成为现阶段采油微生物研究的重点。

本实验中以原油为唯一碳源,从玉门油田鸭儿峡油藏样品分离筛选出 3 株高温细菌。经过一段时间的培 养,3 株菌株均可乳化原油,其中菌株 XS2 产生的生物乳化剂具有很好的乳化活性,而且能很好地降解原油重质组分,改善原油品质,是具有潜在驱油能力的菌株,有望在提高原油回收率的工业应用中发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 样品来源

样品采集于甘肃玉门油田鸭儿峡油藏。其中原油样品采自油井 Y565,含水量约为 15%,土壤样品分别采自油井 Y189、Y565、Y113、Y146 附近被污染的土壤样品。

1.2 菌株的富集和分离

称取样品土壤和原油各 5g,加入 50mL 无菌水,200r/min 室温下摇床振荡 2h;静置 15min 后取上清液 10mL 接种至装有 200mL 富集培养基的摇瓶中,于 60℃、200r/min 的恒温摇床上振荡培养 2d,然后对菌液做适当稀释,取适当稀释度的菌悬液在细菌分离培养基上进行平板涂布分离,选择生长较好的菌株划线纯化,挑取单菌落保存在-80℃冰箱中。

1.3 培养基

液体富集培养基参照文献 [6](含量稍有改动),成分包括:3g/L NaNO₃,1.2g/L K₂HPO₄,0.42g/L KH₂PO₄,0.5g/L FeSO₄·7H₂O,0.5g/L MgSO₄·7H₂O,0.05g/L CaCl₂,2%葡萄糖,1mL/L 微量元素母液,200μL/L 维生素母液。

微量元素:0.25g/L 硼酸,0.5g/L 硫酸铜,0.5g/L 硫酸锰,

0.06g/L 钼酸钠,0.7g/L 硫酸锌。

维生素溶液:0.04g/L D-泛酸钙,0.02g/L 肌醇,0.04g/L 烟酸,0.04g/L 维生素 6,0.02g/L 对氨基苯甲酸,0.5mg/L 维生素 B12。

细菌分离培养基:上述液体分离培养基+2%琼脂。

原油培养基:同富集培养基,添加 5%原油。

发酵培养基:同富集培养基。

1.4 分离菌株的筛选

1.4.1 乳化性能测定

取 1 支试管,将 1mL 十六烷和 1mL 发酵液充分混匀加到试管中,高速旋涡 2min,静置 24h 后,测量乳化液高度和总液相高度。则乳化活性 $E_{24}=(\text{乳化液高度}/\text{总液相高度})\times 100\%$ 。对有乳化活性的菌株继续静置 24h,可得出菌株产生的生物乳化剂是否具有稳定性^[7]。

1.4.2 表面张力的测定

采用全自动表面张力仪铂金板法^[8],分别对发酵液和去离子水在室温下测定了表面张力。

1.5 分离菌株的鉴定

1.5.1 分离菌生理生化特性

生理生化试验按文献[9]进行。

1.5.2 DNA 提取及细菌 16S rRNA 基因序列分析

DNA 提取参考文献[10],并略作改动。挑取培养好的单菌落,溶于 20μL 无菌水,煮沸 10min,10000g 离心 1min,冷却;取 1μL 上清液为模板,利用细菌通用引物 FC27/RC1387^[11]进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94℃、5min,30 个循环反应高温变性 95℃、30s,退火 55℃、45s,聚合 72℃、80s,72℃、7min,15℃保温。PCR 产物进行测序(华大基因公司,深圳),将得到的序列提交 Genbank 数据库,进行 BLAST 分析,比对确定该菌种的系统分类。将比对结果用 Clustalx1.83 和 TREECON 软件进行系统树绘制。

1.6 菌株产生物乳化剂乳化活性稳定性研究

不同浓度的 NaCl 溶液、pH 值的去离子水配制发酵液盐浓度为 0—30%、pH 值在 2—12 范围内,分别置于室温下考查乳化活性(方法见第 1.4.1 节),24h 后对数值进行记录。

将发酵液在 50—100℃高温下处理 2h,并冷却至室温,考察乳化活性,24h 后对数值进行记录。

1.7 菌株对原油的乳化能力

将菌株培养在以原油为碳源的培养基中进行培养,观察菌株对原油的作用效果,然后利用气相色谱-质谱对菌株作用后的原油烃成分进行分析,了解菌株对烃中轻质组分和重质组分作用效果。

气相色谱-质谱分析在中国科学院油气资源研究重点实验室完成。仪器采用美国惠普公司生产的气相色谱-质谱联用仪,型号为 HP6890/HP5973N GC-MS。色谱分析条件:DB-5 毛细管柱(50m×0.25mm×0.25μm),柱始温 80℃,以 3℃/min 程序升温至 300℃,终温恒定 20min,进样口温度 300℃,载气为

氦气。质谱分析条件:电离方式 EI,电离能量 70eV,离子源温度 230℃,GC-MS 接口温度 280℃。

2 结果与讨论

2.1 驱油菌株的分离、筛选与鉴定

从甘肃玉门油田鸭儿峡油藏油井附近的土壤样品和原油样品中,经过富集培养、平板分离,获得 13 株菌株。对 13 株菌株进行功能分析检测,结果如表 1 所示,其中有 3 株菌株 XS1、XS2 和 XS3 鉴定结果较好,对其进行详细研究。

表 1 油藏样品中分离菌株的原油乳化能力分析
Table 1 Emulsification activity analysis of microorganism
isolated from oil reservoirs

菌株	乳化活性/%	表面张力/(mN·m ⁻¹)	来源
XS1	36	49	Y189 地表土
XS2	49	42	Y565 原油
XS3	47	45	Y565 井口土
XS4	8	52	Y189 地表土
XS5	20	53	Y189 地表土
XS6	20	54	Y189 地表土
XS7	9	58	Y113 井口土
XS8	16	51	Y113 井口土
XS9	10	55	Y189 井口土
XS10	9	55	Y189 井口土
XS11	0	56	Y189 井口土
XS12	21	51	Y146 井口土
XS13	20	51	Y146 井口土

经过对3株分离菌生理生化性质的初步鉴定可知,3株分离菌株均为革兰氏阳性,兼性好氧的杆菌,结果如表2所示,+表示反应结果为阳性,-表示反应结果为阴性。

表 2 分离菌的生理生化特征
Table 2 Biochemical characteristics of the isolates

特征	XS1	XS2	XS3
革兰氏染色	+	+	+
需氧性	兼性好氧菌	兼性好氧菌	兼性好氧菌
糖发酵试验	产酸不产气	产酸不产气	产气不产酸
淀粉水解试验	-	+	+
柠檬酸盐利用	-	-	+
油脂水解	+	+	+
甲基红试验	+	+	-
乙酰甲基甲醇试验	-	-	-
H ₂ S 产生	-	-	-
苯丙氨酸脱氢酶	-	-	+
硝酸盐还原	+	+	+
尿素水解	-	-	+

通过 16S rRNA 基因序列分析,同时利用系统树进行同源性比较,可知:XS1 菌株属于短小芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)

sp.), XS2, XS3 菌株属于土芽孢杆菌属(*Geobacillus* sp.)。菌株 XS1 与波茨坦短芽孢杆菌(*Brevibacillus borstelensis*)序列相似度为 99%, 菌株 XS2, XS3 与白色土芽孢杆菌(*Geobacillus pallidus*)序列之间相似度分别为 100%和 99%(图 1)。

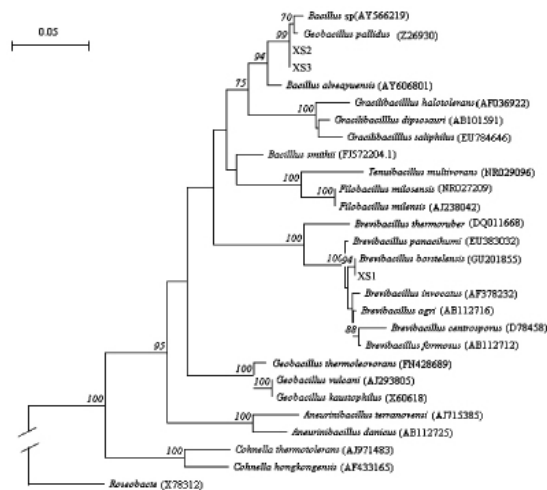


图 1 短小芽孢杆菌 XS1 和白色芽孢杆菌 XS2 和 XS3 系统树
Fig. 1 Phylogenetic tree of the *Brevibacillus* sp. XS1 and *Geobacillus pallidus* XS2 and XS3

2.2 分离菌最适生长条件

2.2.1 最适生长温度

由图 2 可知,菌株 XS1 可在 37—60℃ 温度下生长,最适生长温度为 50℃;菌株 XS2、XS3 可在 45—70℃ 温度下生长,最适生长温度分别为 60、55℃,3 株菌株均为高温菌,其中菌株 XS2 耐温性最好,可更好地应用于油藏地层环境中。现已报道的大多数驱油菌株均为低温菌株(30—45℃),如景贵成等^[5]从油田出水样品中分离得到一株 *Pseudomonas* sp. 菌,45℃ 就地增殖,获得理想的原油采收率。菌株 XS2、XS3 在高温下能很好的生长,因此对其进行详细分析对提高原油采收率具有较高的应用前景。

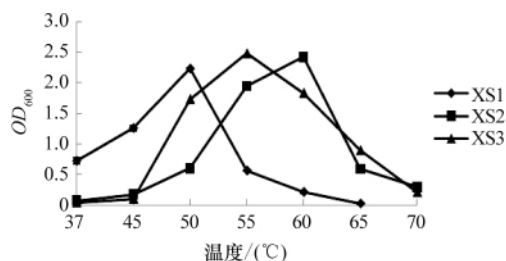


图 2 温度对菌株生长能力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the growth of strain

2.2.2 最适 pH 值

3株分离菌均能在较广泛的pH值范围内生长,最适pH值为7,结果如图3所示。其中菌株XS1的生长pH值范围为5—10;菌株XS2的生长pH值范围为4—9;菌株XS3的生长pH值范围为4—9。

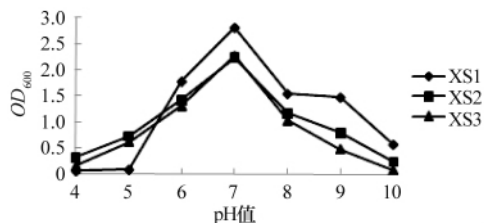


图3 pH值对菌株生长能力的影响
Fig. 3 Effect of pH on the growth of strain

2.3 菌株产生物乳化剂乳化活性的稳定性研究

2.3.1 温度对乳化活性稳定性的影响

温度对分离菌产生物乳化剂的生物乳化活性的影响不大,3株分离菌产生的生物乳化剂在37—50℃温度下均表现了良好的乳化活性,结果如图4所示。从图中可以看出,生物乳化剂(XS1)在50℃时乳化活性最佳,达到60%,但随着温度的升高,乳化活性开始降低,当温度达到100℃时,乳化活性降至9%。生物乳化剂(XS2、XS3)在37—100℃温度下乳化活性变化不显著,均在60℃时乳化活性最佳,分别达到61%、55%,且生物乳化剂(XS2)在100℃高温下,仍然有很好的乳化活性,为52%,说明该株菌产生物乳化剂在高温仍具有极强的生物乳化活性。

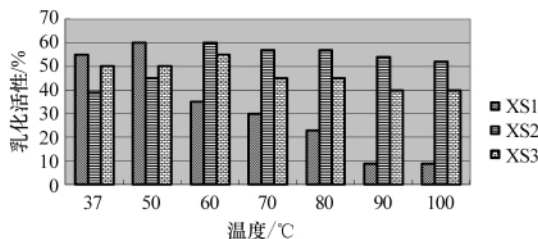


图4 温度对生物乳化剂乳化活性的影响
Fig. 4 Effect of temperature on emulsification activity

2.3.2 pH值对乳化活性稳定性的影响

pH值对菌株生物乳化活性的影响十分明显,结果如图5所示。结果表明,生物乳化剂(XS1)在pH值为2—9时,乳化活性较低,在pH=2时,乳化活性只有9%,当在pH值为10—12时,乳化活性较高,可达60%。生物乳化剂(XS2、XS3)在pH值为6—12时,乳化活性不断提高,在pH=12时乳化活性最高,均可达到60%。阴离子乳化剂与碱复配时,通过增强其亲水端的电离能力提高了其界面活性,往往表现出更好的界

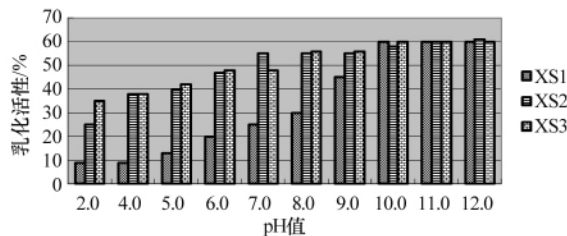


图5 pH对值生物乳化剂乳化活性的影响
Fig. 5 Effect of pH on emulsification activity

面活性^[7],说明3株分离菌产生的生物乳化活性物质为阴离子型生物乳化剂。

2.3.3 NaCl浓度对乳化活性稳定性的影响

NaCl浓度对分离菌的生物乳化活性的影响不大,结果如图6所示。结果表明,生物乳化剂(XS1)在1%—3%盐浓度范围内,乳化活性很好,达40%,当高于此浓度时,乳化活性明显降低,在5%盐浓度下,乳化活性降至9%;生物乳化剂(XS2)在1%—30%盐浓度范围内,均表现较好的乳化活性,在20%的盐浓度下乳化活性仍可达到50%。菌株XS3产生物乳化剂的乳化活性与菌株XS2相似。目前大多数油藏环境都处于高盐浓度下,菌株XS2和XS3产生物乳化剂可耐受高盐浓度,而且其乳化活性在高盐浓度下仍然很高,在以后的油藏开采中具有广阔的应用前景。

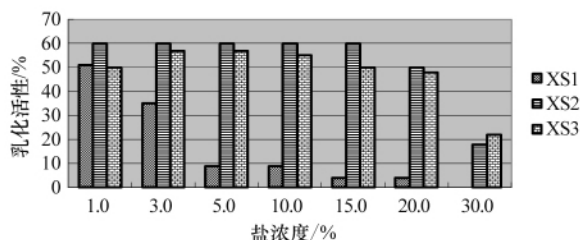


图6 盐浓度对生物乳化剂乳化活性的影响
Fig. 6 Effect of salinity on emulsification activity

本实验筛选出的3株高温驱油菌株虽不能很好地降低表面张力,但都具有较好的乳化活性^[12],故推测3株分离菌产生的生物乳化活性物质为生物乳化剂,其中菌株XS2产生物乳化剂在100℃,pH=12,NaCl浓度为20%的条件下也表现出很好的乳化活性稳定性。

2.4 分离菌株对原油的降解作用

许多微生物在以烃为碳源的培养基中生长时可诱导细胞产生活性物质,这些活性物质有助于培养基中烃基质的乳化,并能刺激微生物对烃的摄取,促进菌体细胞生长,继而提高烷烃的降解率^[13]。本实验分别将菌株XS1、XS2和XS3的发酵液加入原油培养基中,研究分离菌株对原油的乳化效果。结果表明,振荡培养3d后,3株菌株均可在原油培养基中生长繁殖,在原油降解过程中,出现了原油乳化为小油滴的现象,如图7所示,其中图7(a)为空白组,图7(b)—7(d)分别为菌株XS1、XS2、XS3在原油中的生长情况,说明菌株产生的生物乳化活性物质增大油水界面面积,吸附在石油烃表面,从而促进对石油烃的摄取利用。

3株分离菌在以5%原油为碳源的培养基中发酵培养,发酵液进行离心处理,取出上层原油进行气相色谱分析,对上层油相的烃组分进行气相色谱-质谱分析如图8所示。结果表明,3株分离菌作用后,油相的主峰碳发生了明显的转移,说明3株分离菌均有降解原油中正构烷烃组分的作用。表3数据显示,Pr/nC₁₇和Ph/nC₁₈比值均<1,说明研究区域原油形

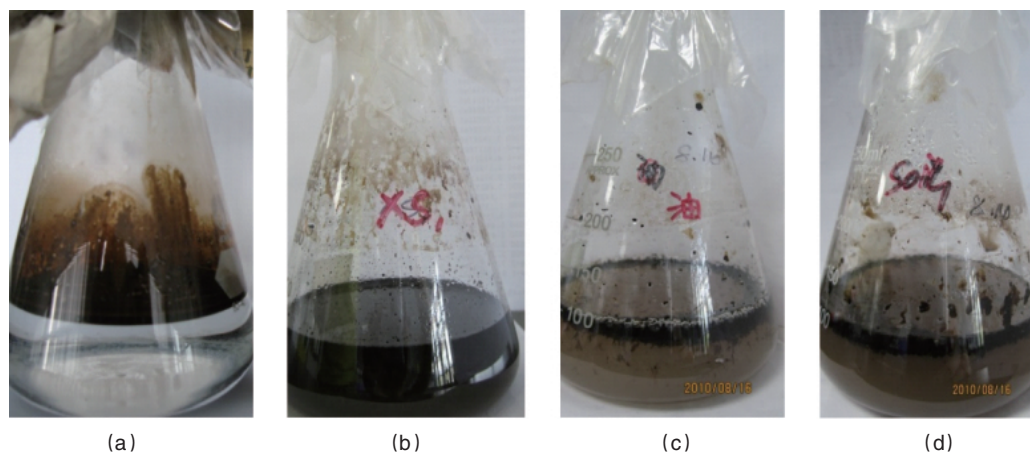


图 7 菌株 XS1,XS2,XS3 在以原油为碳源的培养基中生长

Fig. 7 Strains XS1, XS2, XS3 grow on culture medium supplement with crude oil as carbon source

成环境为弱氧化还原环境；在整个生物降解过程中, Pr/nC_{17} 和 Ph/nC_{18} 没有明显的变化特征,表明分离菌对 nC_{17} , nC_{18} 组分未发生显著的降解作用。在正构烷烃参数中, $nC_{(21+22)}/nC_{(28+29)}$ 值为描述油气运移的参数,在这个生物降解过程中,菌株 XS2 作用后, $nC_{(21+22)}/nC_{(28+29)}$ 数值从 3.48% 升至 3.53%, $nC_{(21+22)}/nC_{(28+29)}$ 值增加,表明菌种作用后原油的轻组分增加,重质组分减少,重质组分中长链烷烃降解为短链烷烃,另外,通过对分离菌 XS2 降解 nC_{35+} 以上碳链的降解效率分析,从 $nC_{(35-45)}$ 数值变化可以看出,菌株 XS2 对 nC_{35+} 以上碳链降解率 43%,更进一步说明

分离菌株 XS2 作用于原油后,原油中高碳数 (nC_{35+} 以上) 长链正构烷烃被显著降解,原油品质得到大大改善。Whytel 等^[14]分离到的 *Rhodococcus* sp. Q15 降解柴油中的 $C_{10}-C_{21}$ 烷烃周期长,对 C_{28} 、 C_{32} 烷烃降解也不完全。曹微寰等^[15]分离到 1 株诺卡氏菌 C-14-1,对低质量浓度 (2mg/L) 的正构烷烃降解效果较好,但对高质量浓度正构烷烃降解效率却较低。本文筛选出的分离菌可在短时间内对原油中的正构烷烃具有较强的降解效果,降解比较完全,与目前已报道^[14-15]的烷烃降解菌相比降解效果很好,具有提高原油采收率的应用前景。

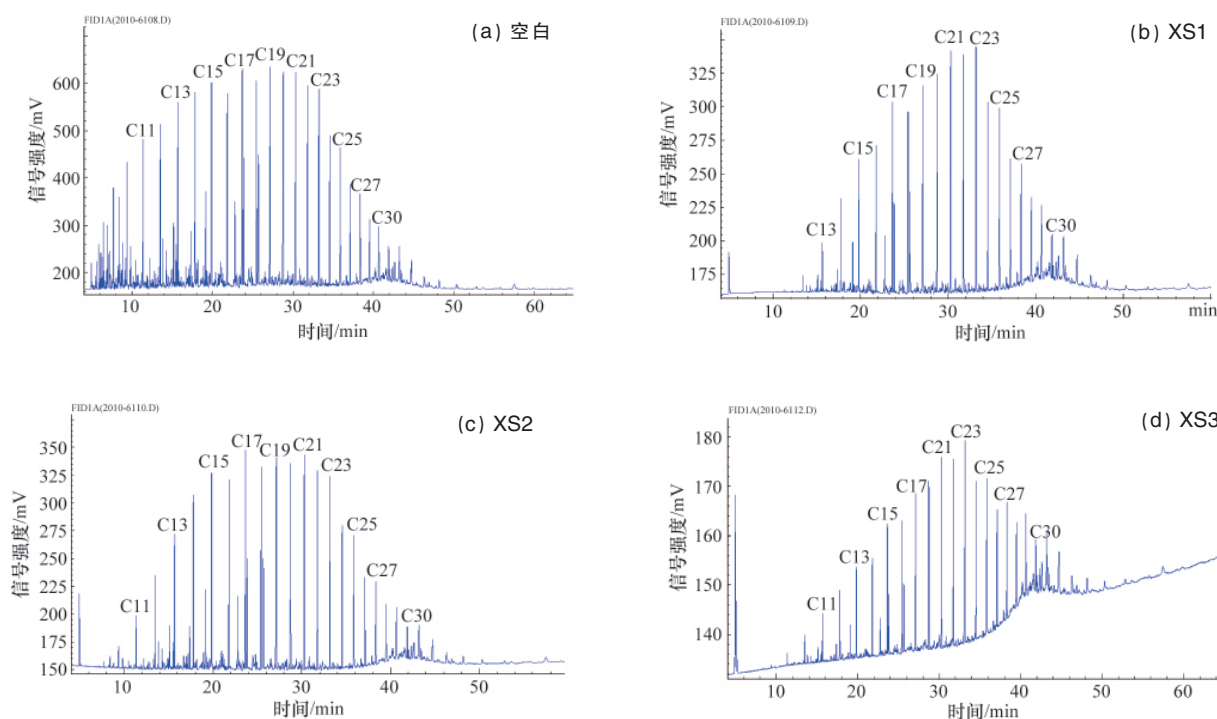


图 8 生物降解实验过程中原油样品色谱特征的变化

Fig. 8 Chromatogram characteristic changes of crude oil during biodegradation process

表 3 原油链烷烃组分含量的变化
Table 3 Alkanets component changes of crude oil

项目	初始(空白)	XS1	XS2	XS3
MAX-PEAK	C19	C23	C17	C23
nC_{21}/nC_{22+}	1.74	0.9	1.51	0.66
$nC_{(21+22)}/nC_{(28+29)}$	3.48	2.87	3.53	1.81
Pr/nC_{17}	0.52	0.52	0.53	0.53
Ph/nC_{18}	0.61	0.62	0.63	0.61
$nC_{(8-18)}/nC_{(19-34)}$	0.77	0.33	0.63	0.27
$nC_{(35-45)}/nC_{(19-34)}$	0.022	0.012	0.011	0.027

3 结论

本研究主要对 3 株高温菌株进行了详细分析,3 株菌株均对 pH 有良好的适应性,并能很好地乳化原油,增强其流动性。经鉴定菌株 XS1 为波茨坦短芽孢杆菌(*Brevibacillus borstelensis*),菌株 XS2,XS3 为白色土芽孢杆菌(*Geobacillus pallidus*)。3 株菌株虽不能很好地降低表面张力,但均具有较好的乳化活性,故分析认为 3 株菌株产生的表面活性物质是生物乳化剂,其中菌株 XS2,XS3 产生的生物乳化剂乳化活性均较好,在高温,高盐环境下,两株分离菌乳化活性均可达到 60%。通过气相色谱-质谱分析,结果表明其中菌株 XS2 能很有效地降解烷烃中重质组分,增加支链烷烃数量,使原油流动性增强,改善原油品质,为具有潜在驱油能力的嗜热菌株,为在高温油藏中应用微生物采油技术奠定了基础。

参考文献 (References)

[1] 上海社科院《2004 中国国际地位报告》课题组. 中国的石油安全问题[J]. 石油化工技术经济, 2004, 20(3): 7-11.
Project Team of Report on 2004 China's International Status Shanghai Social and Scientific Institute. *Techno-Economics in Petrochemicals*, 2004, 20(3): 7-11.

[2] Suthar H, Hingurao K, Desai A, *et al.* Evaluation of bioemulsifier mediated microbial enhanced oil recovery using sand pack column[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75(2): 225-230.

[3] 薛娇. 石油微生物研究领域的重大突破——记 2007 年度“中国高校十大科技进展”项目“一株重要采油微生物的全基因组破译和重油降解分子机制的研究”[J]. 中国高校科技与产业化, 2008(4): 50-51.
Xue Jiao. *Chinese Science and Technology University and Industrial Production*, 2008(4): 50-51.

[4] 王岚. 微生物采油及其作用机理[J]. 地球科学, 2002, 21(2): 138-141.
Wang Lan. *Earth Sciences*, 2002, 21(2): 138-141.

[5] 景贵成, 郭尚平, 俞理. 一株 *Pseudomonas* sp. 菌局部富集提高原油采收率机理[J]. 石油与天然气化工, 2004, 33(4): 270-274.
Jing Guicheng, Guo Shangping, Yu Li. *Chemical Engineering of Oil and Gas*, 2004, 33(4): 270-274.

[6] Zhang Z Z, Wei X F, Luo Y J, *et al.* The selection and breeding of a novel microorganism strain I and investigation of core model experiment for MEOR[J]. *Petroleum Science*, 2005, 2(2): 95-102.

[7] 张国印, 刘庆梅, 李凌云, 等. 表面活性剂复配在三次采油中的应用[J]. 中外能源, 2010(15): 58-64.
Zhang Guoying, Liu Qingmei, Li Lingyun, *et al.* *Sino-Global Energy*, 2010(15): 58-64.

[8] 余跃惠, 李兴丽, 张忠智. 两株高效原油降解混合菌的性能分析[J]. 中国石油大学学报: 自然科学版, 2008, 32(2): 132-134.
She Yuehui, Li Xingli, Zhang Zhongzhi. *Journal of China University of Petroeum: Edition of Natural Science*, 2008, 32(2): 132-134.

[9] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999.
Qian Cunrou, Huang Yixiu. *Microbiology experiment course* [M]. Beijing: Peking University Press, 1999.

[10] Tamburini E, León A G, Perito B, *et al.* Characterization of bacterial pectinolytic strains involved in the water retting process [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(9): 730-736.

[11] Dang H Y, Lovell C R. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (2): 467-475.

[12] 赵敏, 马宏瑞. 石油降解菌的降解特性研究 [J]. 油气田环境保护, 2007, 17(2): 201-211.
Zhao Min, Ma Hongrui. *Environmental Protection of Oil and Gas Fields*, 2007, 17(2): 201-211.

[13] 王霞, 潘成松, 范舟, 等. 微生物采油技术的发展现状[J]. 石油地质与工程, 2007, 21(5): 65-68.
Wang Xia, Pan Chengsong, Fan Zhou, *et al.* *Petroleum Geology and Engineering*, 2007, 21(5): 65-68.

[14] Whytel G, Hawar I J, Zhou E. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2578-2584.

[15] 曹微寰, 徐德强, 张亚雷. 烷烃降解菌的筛选及其降解能力 [J]. 中国环境科学, 2003, 23(1) : 25-29.
Cao Weihuan, Xu Deqiang, Zhang Yalei. *China Environmental Science*, 2003, 23(1): 25-29.

(责任编辑 刘志远)