

林学政, 沈继红, 杜宁, 等. 2009 北极海洋沉积物石油降解菌的筛选及系统发育分析 [J]. 环境科学学报, 29(3): 536– 541
Lin X Z, Shen JH, Du N, *et al*. 2009 Screening and phylogenetic analysis of petroleum-degrading bacteria in sediments from the Arctic Ocean[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(3): 536– 541

北极海洋沉积物石油降解菌的筛选及系统发育分析

林学政^{1, 2, 3*}, 沈继红^{1, 2, 3}, 杜宁^{1, 2, 3}, 王能飞^{1, 2, 3}, 高爱国¹

1 国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266061
2 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室, 青岛 266061
3 青岛天然产物研究与开发重点实验室, 青岛 266061
收稿日期: 2008-05-07 修回日期: 2008-06-17 录用日期: 2009-01-12

摘要: 从中国第二次北极科学考察采集的海洋沉积物中经富集培养、分离筛选得到了 26 株石油降解菌. 研究表明, 分离到的石油降解菌均可在以石油为唯一碳源和能源的无机营养盐培养基中生长, 其中菌株 P18、P28 和 P29 生长最佳. 当培养基中石油含量为 2 g L⁻¹ 时, 于 5℃ 下振荡培养 14 d, 3 株菌株的石油降解率可分别达到 30.96%、34.83% 和 51.28%. 分离到的石油降解菌绝大部分 (25/26) 能分泌胞外脂肪酶, 表明其石油降解能力与产脂肪酶能力有着较强的相关性. 分子鉴定与系统发育分析表明, 分离到的石油降解菌除 P31 和 P32 属于细菌域 (Bacteria) 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的黄杆菌纲 (Flavobacteria) 外, 其余均属于细菌域 (Bacteria) 变形杆菌门 (Proteobacteria) 的 γ-变形杆菌纲 (γ-Proteobacteria), 其中包括交替单胞菌目 (Alteromonadales) 的假交替单胞菌属 (*Pseudalteromonas*)、科尔韦氏菌属 (*Colevella*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、弧菌目 (Vibrionales) 的发光杆菌属 (*Photobacterium*)、假单胞菌目 (Pseudomonadales) 的假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和海螺菌目 (Oceanospirillales) 的盐单胞菌属 (*Halomonas*). 分离到的石油降解菌以假交替单胞菌属为优势菌群, 其比例可达 42%.

关键词: 北极; 海洋沉积物; 石油降解菌; 系统发育分析

文章编号: 0253-2468(2009)03-536-06 中图分类号: X171 文献标识码: A

Screening and phylogenetic analysis of petroleum-degrading bacteria in sediments from the Arctic Ocean

LN Xuezheng^{1, 2, 3*}, SHEN Jihong^{1, 2, 3}, DU Ning^{1, 2, 3}, WANG Nengfei^{1, 2, 3}, GAO Aiguo¹

1 First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061
2 Key Lab of Marine Bioactive Substances, SOA, Qingdao 266061
3 Marine Natural Products R&D Laboratory, Qingdao 266061

Received 7 May 2008 received in revised form 17 June 2008; accepted 12 January 2009

Abstract Twenty-six species of petroleum-degrading bacteria were isolated by enrichment and screening from marine sediments collected during the 2nd Chinese Arctic Scientific Expedition. These strains were able to grow on petroleum as sole carbon and energy source. Strains P18, P28 and P29 had the highest growth rates. When strains P18, P28 and P29 were cultured at 5℃ in mineral medium containing 2 g L⁻¹ petroleum, the petroleum degradation rates after 14 days were up to 30.96%, 34.83% and 51.28%, respectively. Most of the isolated petroleum-degrading bacteria secreted extracellular lipase which indicated a relationship between the ability to produce lipase and petroleum degradation. Molecular identification and phylogenetic analysis indicated that all the strains were members of the γ subgroup of the Proteobacteria branch of the Bacteria (γ-Proteobacteria) except strains P31 and P32 which belonged to Flavobacter of Bacteroidetes. The isolates belonging to the γ-Proteobacteria included *Pseudalteromonas*, *Colevella* and *Shewanella*, from the order Alteromonadales in addition to *Photobacterium*, *Pseudomonas* and *Halomonas* which are from the orders Vibrionales, Pseudomonadales and Oceanospirillales respectively. *Pseudalteromonas* were the major species accounting for 42% of the total isolates.

Keywords Arctic marine sediment; petroleum-degrading bacteria; phylogenetic analysis

1 引言 (Introduction)

石油在开采、运输、贮存、加工过程中, 由于意外事故或管理不当, 均可能使环境遭受污染和破坏. 石油进入环境后, 一些短链成分可直接挥发而进入空气; 一小部分表面的石油受紫外线作用可发

生光化学分解, 但速度很慢; 绝大部分石油要通过微生物的降解作用而得到净化(姚德明等, 2002; 齐永强等, 2002)。

目前石油污染的治理措施一般有物理、化学和生物方法。其中, 自 20 世纪 90 年代发展起来的生物处理方法具有费用低、操作简单、效果好、无二次污染的特点, 已成为石油污染治理研究的热点(李培军等, 2002)。石油污染生物修复的限制因素有环境因子、土壤理化性质、污染时效和污染物性质等(Rowland 2000)。由于生物修复降解活动的主体是生物, 所以其降解效率不可避免地很大程度上要受环境因子的制约; 其中温度、营养盐和通风的影响最为显著, 尤其在高纬度地区温度严重影响着石油生物降解的速率及其物理性质和化学组成(Coulon *et al.*, 2005)。季节变化对生物降解过程亦有影响; 冻土层的存在对生物降解过程有很强的限制作用(齐永强等, 2002)。一般生物修复都是利用中温菌在常温下进行处理, 而在我国的广大北方地区, 温度会随季节大幅度的变化, 在寒冷而漫长的冬季, 低温会强烈地抑制降油微生物对石油的降解效果。如何加快寒冷季节石油污染生物修复的速度, 是一个亟需解决的问题。

近年来, 国内外的科研人员已对低温微生物在环保领域的应用进行了有益的探索, 为环境污染的防治开拓了新的研究领域, 并大大丰富了生物修复的理论(陈熹兮等, 2002)。由于极地独特的地理环境和气候特征, 造就了独特的微生物生态系统。国外已有研究者对来自各种低温环境, 如对南极、北极海水和土壤等, 具有石油污染降解能力的微生物进行了菌株的筛选以及降解效率的研究(Delille *et al.*, 2002; Erkksson *et al.*, 2001; Garret *et al.*, 2003; Aislabe *et al.*, 2006), 但在国内该领域的研究较少(Ma *et al.*, 2006)。如何利用极地微生物低温条件下快速生长的特点, 为我国广大北方地区寒冷季节各种污染的生物修复工作服务, 这具有重要的意义。

本研究对中国第二次北极科考采集的深海沉积物样品中的石油降解菌进行筛选与分离, 并对其降解效率、产脂肪酶能力以及系统发育分析进行研究, 以期为其在石油污染低温生物修复中的应用打下一定的基础。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 材料

北极海洋沉积物样品采集于 2003 年中国第二次北极科学考察。采样站位如下: P11 位于 $169^{\circ}59'37''W$ 、 $75^{\circ}00'24''N$, 水深 263m, 采样时间为 2003-08-10 样品为青灰色软泥; S11 位于 $159^{\circ}00'00''W$ 、 $72^{\circ}29'24''N$, 水深 50m, 采样时间为 2003-08-17, 样品为灰色硬泥。样品于 $4^{\circ}C$ 低温无菌保存, 回实验室进行石油降解菌的分离纯化。

2.2 筛选培养基 (无机营养盐培养基, mineral medium)

石油培养基 ($g \cdot L^{-1}$): $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025, NH_4NO_3 0.2, NaH_2PO_4 , 0.5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 混合油 (柴油: 原油 = 4:1 (质量比)) 2

2.3 石油降解菌的分离与筛选

将适量北极深海沉积物样品 (中国第二次北极科考获得) 加入筛选培养基中, 于 $5^{\circ}C$ 下振荡培养 14d 取培养液 1mL 接种于新鲜石油培养基, 相同条件下培养 14d 如此连续培养 3 代。培养液经系列稀释后涂布于筛选培养基平板进行分离纯化。根据菌落出现的时间、形态、大小和颜色等挑选不同的细菌菌株。

2.4 降解率的测定 (重量法)

将石油降解菌活化后以 2% 的接种量接种于含 50mL 筛选培养基的 100mL 三角瓶中, 于 $5^{\circ}C$ 下振荡 ($150r \cdot min^{-1}$) 培养 14d 培养液用 10mL 正己烷萃取 2 次, 收集合并上层有机相, 经旋转蒸发和 $50^{\circ}C$ 烘干, 置于干燥器中冷却至恒重, 称重。以不接菌的培养基经上述步骤处理为对照。除油率按式 (1) 计算:

$$\eta = ((M_0 - M) - (M_{c0} - M_c)) / M_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中, M_0 为处理样的接菌前石油的质量 (g); M 为处理样经接菌处理后残油的质量 (g); M_{c0} 为对照处理前石油的质量 (g); M_c 为对照样经振荡 14d 后的残油质量 (g)。

2.5 石油降解菌株产脂肪酶活性测定

对分离到的石油降解菌利用 Tween80 法进行解脂酶活性测定, 以晕圈与菌落直径的比例来表示胞外脂肪酶活性的高低(Lin *et al.*, 2003)。

2.6 分子鉴定与系统发育分析

石油降解菌的分子鉴定与系统发育分析中 DNA 模板的制备、16S rDNA 的 PCR 扩增与序列测定以及系统进化关系的分析均按照文献(林学政

等, 2006)进行.

3 结果 (Results)

3 1 石油降解菌的筛选与分离

从第二次北极科学考察获得的海洋沉积物 (P11和 S11)中经 3次富集培养及在筛选培养基平板上分离纯化后, 根据其菌落形态学特征 (菌落形态、大小、颜色、出现的时间等), 共分离得到 26株细菌, 均可在以石油为唯一碳源的培养基中生存与繁殖, 具有一定的石油降解能力.

3 2 石油降解菌的生长及降解效率

石油降解菌在无机营养盐培养基中于低温振荡培养箱中 (5℃, 150 r·min⁻¹)培养 14d 培养液用

10mL正己烷萃取 2次, 合并有机相. 下层水相用分光光度计于 550nm 处测定 OD 值, 上层有机相采用重量法计算石油降解率 (部分生长较好的菌株), 结果分别见表 1和表 2 由表可以看出, 筛选到的菌株均可在以石油为唯一碳源的培养基中在低温条件下生长, 具有一定的石油降解能力, 其中, 菌株 P18、P28和 P29 生长较好, 培养液的 OD 值分别为 0. 565、0. 558和 0. 872. 石油降解率可分别达到 30. 96%、34. 85%和 51. 28%. 对培养液观察发现, 筛选到的石油降解菌大多具有使石油乳化, 分散在整个培养液中的能力, 在培养液表面形不成油膜; 而对照此时可在培养液表面形成一层明显的油膜.

表 1 原油降解菌利用无机培养基生长的情况 (OD 值) (n = 3)
Table 1 Growth status of petroleum degrading bacteria isolated in inorganic media

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
0. 185	0. 271	0. 223	0. 290	0. 194	0. 213	0. 224	0. 448	0. 220
P11	P12	P14	P15	P16	P18	P19	P20	P21
0. 260	0. 282	0. 337	0. 219	0. 256	0. 565	0. 241	0. 282	0. 186
P22	P23	P24	P28	P29	P30	P31	P32	
0. 386	0. 280	0. 230	0. 558	0. 872	0. 381	0. 336	0. 280	

表 2 部分菌株的降油效率 (n = 3)
Table 2 Petroleum degradation rates of selected strains

P2	P4	P8	P18	P20	P22	P23	P28	P29
21. 34%	18. 86%	28. 98%	30. 96%	26. 35%	27. 89%	28. 83%	34. 83%	51. 28%

3 3 极地石油降解菌产脂肪酶能力分析

筛选到的 26株极地石油降解微生物产脂肪酶能力分析结果如表 3所示 (产脂肪酶菌株筛选方法采用 Tween 80法, 在菌落周围出现模糊的晕圈者为阳性), 以晕圈与菌落直径之比代表产脂肪酶能力

的高低. 由表 3可以看出, 筛选到的 26株极地石油降解微生物除菌株 P32外, 其余均能产生脂肪酶. 以上结果说明微生物对石油的降解能力与脂肪酶产生情况有着良好的相关性.

表 3 石油降解菌的产脂肪酶能力分析 (n = 3)
Table 3 Average on lipase production ability of petroleum degrading bacteria (n = 3)

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
2. 26	5. 08	2. 96	3. 07	3. 53	4. 01	2. 26	4. 71	1. 89
P11	P12	P14	P15	P16	P18	P19	P20	P21
2. 36	2. 5	3. 08	3. 11	3. 63	2. 34	2. 29	2. 93	3. 79
P22	P23	P24	P28	P29	P30	P31	P32	
2. 74	2. 87	2. 53	2. 59	1. 66	2. 66	2. 34	未出现	

3 4 极地石油降解菌的分子鉴定和系统发育分析

将筛选到的极地石油降解菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化

后, 连接到 pMD-18T (载体), 对经验证的阳性克隆子进行测序, 获得长度约为 1. 5kb 的 16S rDNA 序列; 并将其提交 GenBank 数据库, 获得 26个基因序列注册号, 分别为 EF627987 ~ EF628012 (详见表

4). 将这些序列与 GenBank 数据库进行 Blast 比对分析, 与所分离的石油降解菌株 16S rDNA 序列同源性最高的菌株及其注册号如表 4 所示.

由表 4 可见, 本研究中分离的极地石油降解菌株大多数与庞大的 GenBank 数据库中已有菌株的 16S rDNA 序列均存在着很高的相似性, 相似性绝大多数在 99% 以上, 如菌株 P1、P2、P4 和 P6 与已注册的菌株的 16S rDNA 序列相似性最高可达 99.93%. 菌株 P11 与现有的 GenBank 数据库已有菌株 16S rDNA 序列相似性均较低, 即使与相似性最高的菌株 uncultured bacterium clone FS140-74B-02 (EF627996) 相比较, 相似性也只有 96.93%, 这表明该菌株极有可能为一新的菌株, 其具体的菌种鉴定工作正在进行中.

对从站位 P11 和 S11 海洋沉积物中分离到的石油降解菌株的 16S rDNA 序列采用 Bioedit 软件进行

序列比对, 采用 Mega3.0 软件的邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树, 结果如图 1 所示. 由图可以看出, 从站位 P11 和 S11 分离到的极地原油降解菌主要包括细菌域 (Bacteria) 的变形杆菌门 (Proteobacteria) 的 γ -变形杆菌纲 (γ -Proteobacteria) 和细菌域的拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的黄杆菌纲 (Flavobacteria), 二者分别占 92.3% 和 7.7%. γ -变形杆菌纲包括假交替单胞菌属 (*Pseudomonas*)、发光杆菌属 (*Photobacterium*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、科尔韦氏菌属 (*Cobwellia*)、单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和盐单胞菌属 (*Halomonas*), 其中假交替单胞菌属细菌数量最多, 可占整个 γ -变形杆菌纲的 42%. 分离到的 26 株石油降解菌分别属于细菌域 5 个目中的 7 个属, 这表明, 原油降解菌株不仅是广泛存在的, 而且种类也多种多样.

表 4 北极海洋沉积物原油降解菌 16S rDNA 序列同源性比较结果				
Table 4 Homology comparison of 16S rDNA sequences of themanganese bacteria isolated from Arctic ocean sediment				
菌株 strain	注册号 accession number	相似性最高菌株 Closest match similarity	注册号 accession number	门 Phylum
P1	EF627987	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20237 (99.93%)	EF437163	γ -Proteobacteria
P2	EF627988	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20238 (99.93%)	EF437164	γ -Proteobacteria
P3	EF627989	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20237 (99.80%)	EF437163	γ -Proteobacteria
P4	EF627990	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20237 (99.93%)	EF437163	γ -Proteobacteria
P5	EF627991	uncultured bacterium clone FS140-74B-02 (99.80%)	DQ513017	γ -Proteobacteria
P6	EF627992	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20238 (99.93%)	EF437164	γ -Proteobacteria
P7	EF627993	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20244 (99.73%)	EF437165	γ -Proteobacteria
P8	EF627994	<i>Halomonas</i> sp. Bs20424 (99.53%)	EF382720	γ -Proteobacteria
P9	EF627995	Antarctic seawater bacterium BSw 10155B (99.80%)	DQ064636	γ -Proteobacteria
P11	EF627996	uncultured bacterium clone FS140-74B-02 (96.93%)	DQ513017	γ -Proteobacteria
P12	EF627997	uncultured bacterium clone FS140-74B-02 (99.46%)	DQ513017	γ -Proteobacteria
P14	EF627998	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> strain 0802 (99.53%)	AF494091	γ -Proteobacteria
P15	EF627999	<i>Halomonas</i> sp. Bs20424 (99.33%)	EF382720	γ -Proteobacteria
P16	EF628000	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> strain 0802 (99.47%)	AF494091	γ -Proteobacteria
P18	EF628001	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20237 (99.87%)	EF437163	γ -Proteobacteria
P19	EF628002	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20244 (99.87%)	EF437165	γ -Proteobacteria
P20	EF628003	<i>Shewanella</i> sp. 86 (99.67%)	DQ325520	γ -Proteobacteria
P21	EF628004	<i>Photobacterium indicum</i> clone SE4 (99.87%)	AY771742	γ -Proteobacteria
P22	EF628005	<i>Shewanella</i> sp. 86 (99.80%)	DQ325520	γ -Proteobacteria
P23	EF628006	Arctic seawater bacterium BSw 20359 (99.80%)	DQ064614	γ -Proteobacteria
P24	EF628007	<i>Halomonas</i> sp. Bs20424 (99.40%)	EF382720	γ -Proteobacteria
P28	EF628008	uncultured bacterium clone FS140-74B-02 (99.40%)	DQ513017	γ -Proteobacteria
P29	EF628009	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20237 (99.67%)	EF437163	γ -Proteobacteria
P30	EF628010	<i>Pseudomonas</i> sp. BSw 20237 (99.80%)	EF437163	γ -Proteobacteria
P31	EF628011	<i>Flavobacterium frigidis</i> clone SE22 (99.04%)	AY771752	Flavobacteria
P32	EF628012	<i>Flavobacterium frigidis</i> (98.97%)	AJ557887	Flavobacteria

4 讨论 (Discussion)

当石油泄漏到海水中后, 要经历扩散、蒸发、溶解、乳化、海气直接交换、化学更换、沥青块形成和沉积、生物降解等一系列消散过程, 其中几个过程受海水温度的影响, 在低温环境下降解受石油性质如蜡含量和粘度的影响 (袁峻峰等, 2001; Brakstad *et al.*, 2006). 沸点低的烃类组分, 数日后可直接挥发进入大气, 其它组分的化合物随海水运动而分散转移和分解, 除一部分被浮游生物所摄取、代谢和分解外, 大部分被海洋微生物降解. 石油的生物降解已见诸于各种不同的陆地及海洋冷环境中, 包括北极、高山和南极的土壤, 阿拉斯加的地面水和南极海水等 (陈熹兮等, 2002).

对极区石油污染区域的调查表明, 石油降解

菌, 特别是细菌在极区的土壤广泛存在, 其数量由于油污染而增加, 主要包括 α -变形杆菌纲, γ -变形杆菌纲和放线菌纲; 其降解活性受各种条件制约, 如低温、湿度、营养盐、pH 和抑制性碳氢化合物等 (A isabie *et al.*, 2006; Brakstad *et al.*, 2006). 本研究中对北极海洋沉积物石油降解微生物的研究结果也表明, 石油降解菌存在的普遍性和多样性, 如从 P11 和 S11 两个站位采集的海洋沉积物中根据菌落形态学特征分离得到的 26 株石油降解菌, 包含了细菌域变形杆菌门的 γ -变形杆菌纲和细菌域的拟杆菌门的黄杆菌纲 2 大类, 其中 γ -变形杆菌纲占绝大多数 (92.3%). γ -变形杆菌纲包括假交替单胞菌属、发光杆菌属、希瓦氏菌属、科尔韦氏菌属、单胞菌属和盐单胞菌属共 6 个属的原油降解菌.

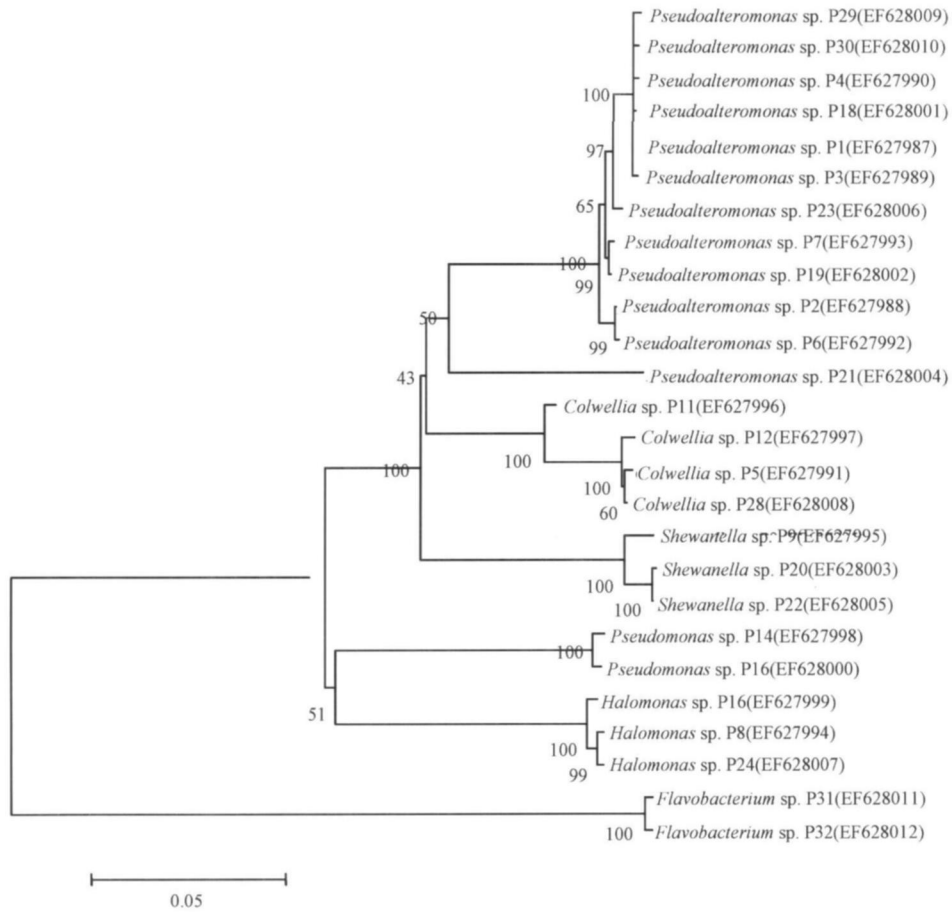


图 1 石油降解菌株的系统发育分析
Fig. 1 Phylogenetic analysis of the isolated petroleum degrading bacteria

本研究中分离到的 26 株极地石油降解菌中有 25 株具有胞外脂肪酶产生能力, 表明微生物的石油降解能力与产脂肪酶之间存在着良好的相关性, 这

与已有的研究结果相一致. 如刘期松等 (1981) 从石油污灌区分离到 126 株细菌 (60% 菌株有解脂酶活性) 和真菌 71 株 (89% 菌株有解脂酶活性). 姚德明

等(2002)从石油污染土壤处理系统中分离到的各类优势微生物均具有解脂酶活性, 有解脂酶活性的菌株, 就有降解石油烃的能力。

本研究中分离到的菌株均可在以石油为唯一碳源的培养基中在低温条件(5℃)下生长, 具有一定的石油降解能力, 其中菌株 P18、P28和 P29生长较好, 石油降解能力较强。当培养基中石油含量为 2g L^{-1} 时, 于 5℃下振荡培养 14d, 3株菌株的石油降解率可分别达到 30.96%、34.85% 和 51.28%, 这说明其在低温条件下具有较强的石油降解能力, 从而为其在石油污染低温生物修复中的应用打下一定的基础。

5 结论 (Conclusions)

1) 通过富集培养和分离纯化从站位 P11和 S11采集的北极海洋沉积物中根据菌落形态学特征共分离到 26株石油降解菌, 其均能在以石油为唯一碳源和能源的无机营养盐培养基中生长。当培养基中石油含量为 2g L^{-1} 时, 菌株 P18、P28和 P29在 5℃下振荡培养 14d, 石油降解率可分别达到 30.96%、34.85% 和 51.28%。

2) 分离到的 26株石油降解菌有 25株具有胞外脂肪酶活性, 表明石油降解与产脂肪酶之间具有良好的相关性。

3) 分离到的石油降解菌包括 γ -变形杆菌纲和黄杆菌纲 2大类, γ -变形杆菌纲包括假交替单胞菌属、发光杆菌属、希瓦氏菌属、科尔韦氏氏菌属、单胞菌属和盐单胞菌属, 其中以假交替单胞菌属的数量最多。

参考文献 (References):

Aislabie J, Saul D J, Foght J M. 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils [J]. *Extremophiles*, 10: 171—179

Brakstad O G, Bonaunet K. 2006. Biodegradation of petroleum hydrocarbon in seawater at low temperatures (0~5℃) and bacterial communities associated with degradation [J]. *Biodegradation*, 17: 71—82

陈熹兮, 李莹宝, 李道棠. 2002. 低温微生物及其在生物修复领域中的应用 [J]. *自然杂志*, 23(3): 163—167

Chen X X, Li K B, Li D T. 2002. Application prospects in the study on bioremediation by cold-adapted microorganisms [J]. *Chinese Journal of Nature*, 23(3): 163—167 (in Chinese)

Coubon F, Pelletier E, Gourhant L, et al. 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbon in contaminated sub-Antarctic soil [J]. *Chemosphere*, 58: 1439—1448

Delille A, Pelletier E. 2002. Natural attenuation of diesel-oil contamination in subantarctic soil (Crozet Island) [J]. *Polar Biol*, 25: 682—687

Erksson M, Ka J-O, Mohn W W. 2001. Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in Arctic tundra soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 67: 5107—5112

Garret R M, Rothenburger S J, Prince R. 2003. Biodegradation of fuel oil under laboratory and Arctic marine conditions [J]. *Spill Sci & Technol Bull*, 8: 297—302

李培军, 郭书海, 孙铁珩, 等. 2002. 不同类型石油污染土壤生物修复技术研究 [J]. *应用生态学报*, 13(1): 1455—1483

Li P J, Guo S H, Sun T H, et al. 2002. Bioremediation techniques of crude oil contaminated soil [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 13(1): 1455—1483 (in Chinese)

林学政, 陈靠山, 何培青, 等. 2006. 种植盐地碱蓬改良滨海盐渍土对土壤微生物区系的影响 [J]. *生态学报*, 26(3): 801—807

Lin X Z, Chen K S, He P Q, et al. 2006. The effects of *Suaeda salsa* L. planting on the soil microflora in coastal saline soil [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 26(3): 801—807 (in Chinese)

Lin X Z, Yang X X, Bian J, et al. 2003. Study on low-temperature lipase of psychrophilic bacterium 2-5-10-1 isolated from deep sea of Southern Ocean [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 22(4): 643—650

刘期松, 齐恩山, 张春桂, 等. 1981. 石油污水灌区的微生物生态及其降解石油的研究 [J]. *环境科学*, 2(3): 1—6

Liu Q S, Qi E S, Zhang C G, et al. 1981. Study on the microbial ecology and petroleum-degradation in the petroleum wastewater irrigation area [J]. *Environmental Science*, 2(3): 1—6 (in Chinese)

Ma Y F, Wang L, Shao Z Z. 2006. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal transfer [J]. *Environmental Microbiology*, 8(3): 455—465

齐永强, 王红旗. 2002. 微生物处理土壤石油污染的研究进展 [J]. *上海环境科学*, 21(3): 177—180

Qi Y Q, Wang H Q. 2002. Study progress on bioremediation of soil oil pollution [J]. *Shanghai Environmental Science*, 21(3): 177—180 (in Chinese)

Rowland A P. 2000. Effects of beach sand properties, temperature and rainfall on the degradation rates of oil/beach sand mixtures [J]. *Environ Pollut*, 109(1): 109—118

姚德明, 许华夏, 张海棠, 等. 2002. 石油污染土壤微生物修复过程中微生物生态研究 [J]. *生态学杂志*, 21(1): 26—28

Yao D M, Xu H X, Zhang H R, et al. 2002. Microbiological ecology during bioremediation for oil contaminated soil [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 21(1): 26—28 (in Chinese)

袁峻峰, 李永祺, 陈浩文, 等. 2001. 南极石油烃污染的自然消除过程研究 [J]. *首都师范大学学报 (自然科学版)*, 22(3): 44—47

Yuan J F, Li Y Q, Chen H W, et al. 2001. The degradation of oil in the Antarctic sea [J]. *Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)*, 22(3): 44—47 (in Chinese)