

外加氮源强化石油降解菌降解性能

王 鑫, 王学江, 卜云洁, 赵建夫

(同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 试验采用从天津、大连和上海附近海域筛选出的石油降解菌 T4、R4 和 D3, 研究了外加氮源对单一菌株和混合菌株降解柴油的影响。试验结果表明, 外加氮源有效地促进了微生物对柴油的降解并增强了微生物细胞表面疏水性, R4 和 D3 的最优氮源为 NaNO_3 , T4 的最优氮源为 NH_4NO_3 , 最优碳氮比均为 20:1; 细胞表面疏水性 with 柴油降解率具有良好的相关性。分析微生物代谢产物发现其具有明显的脂肽结构且添加氮源后疏水基团含量明显增加。外加氮源可以使混合菌的柴油降解率大幅提高, 其中复合菌 T4/R4、T4/D3、T4/R4/D3 表现出了高于理论值的协同降解作用。

关键词: 石油降解菌; 氮源; 降解率; 混合菌

中图分类号: X55

文献标志码: A

Enhanced Biodegradation Characteristics of Oil Degrading Strains Supplemented with Nitrogen Source

WANG Xin, WANG Xuejiang, BU Yunjie, ZHAO Jianfu

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The paper studies the effects of adding nitrogen source on single strains and mixed strains isolated from seawater of Tianjin, Dalian and Shanghai. The results show that adding nitrogen source promotes the biodegradation of diesel oil and enhances the cell-surface hydrophobicity. NH_4NO_3 is the optimal nitrogen source to T4 while NaNO_3 the optimal to D3 and R4 as well as the optimal $\rho(\text{C})/\rho(\text{N})$ to the three strains is 20:1. There is a close relationship between biodegradation and cell-surface hydrophobicity. It is found that there is a lipopeptide structure in the metabolin of petroleum degrading bacteria and the hydrophobic group increases significantly with the addition of nitrogen source. Adding nitrogen source improves biodegradation rate of microbial consortium greatly, in the meantime, T4/R4, T4/D3, T4/R4/D3 show the synergistic degradation.

Key words: oil degrading strains; nitrogen source; degradation rate; mixed strains

近年来, 溢油事故的频发使得海洋环境面临巨大的威胁。常规的理化除油方法可在溢油初期控制污染蔓延, 但具有除油不彻底、容易引起二次污染的缺点。微生物修复技术以其廉价、可原位修复等优点已经成为石油污染修复的核心技术^[1-2]。

微生物在其生长代谢过程中对于主要营养物质如碳源、氮源等具有不同的需求。溢油事故发生后, 大量的石油烃进入环境, 而海水中的营养匮乏, 氮、磷元素成为限制石油烃微生物降解的主要因素^[3]。对于氮源对石油烃生物降解影响的研究, 以往的文献大都建立在外加营养盐与生物量的相关性方面^[4-6], 属微生物生长的部分, 对于微生物代谢方面涉及较少, 而微生物分泌胞外聚合物对于石油烃降解也起着重要的作用^[7]。本研究采用从海洋环境中分离出的石油烃降解菌, 分析外加氮源对于单一菌株和混合菌株的影响, 以及外加氮源对微生物代谢产物的影响, 更全面地探讨氮源对石油污染修复的强化作用, 以为海洋溢油污染的修复技术提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: ET1200 水中油份浓度分析仪、ET3200B 自动萃取仪(上海欧陆科仪有限公司)、FE20 实验室 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)、HVE-50 高压灭菌锅(日本 HIRAYAMA 公司)、Nicolet5700 智能傅里叶红外光谱仪(RT-IR, 美国尼高力公司)、Agilent5975C 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS, 美国安捷伦公司)。

收稿日期: 2013-07-18

基金项目: 国家自然科学基金(51179127; 21277097)

第一作者: 王 鑫(1987—), 男, 博士生, 主要研究方向为石油污染微生物修复技术。E-mail: wangxin_0927@126.com

通讯作者: 王学江(1974—), 男, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为水污染控制技术与资源化。E-mail: wangxj@tongji.edu.cn

主要化学试剂: NH_4Cl 、 NaNO_3 、 NH_4NO_3 、 NaOH 、 HCl 、 Na_2SO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 KBr 均为 AR 级(分析纯), CCl_4 为环保专用(上海国药集团化学试剂有限公司), 0 号柴油(中国石油集团), 海盐(上海合轻化工有限公司)。

菌株与菌悬液: 本实验采用的菌种来自大连、天津和上海附近海水中的微生物以柴油为唯一碳源筛选出的石油降解菌 T4、R4 和 D3。将分离出的纯种菌落用接种环接种至 LB(肉汤)培养基中, 3 种石油菌在 1~1.5 d 后进入对数期, 3~3.5 d 时进入稳定期, 取富集培养 4 d 稳定中期的菌液, 在 8 000 g 条件下离心 5 min, 用 0.05M 磷酸缓冲液清洗 3 次, 制成浓度均一菌液(以吸光度 OD_{600} 表示), 4℃ 下保存备用。

人工海水培养基: 35 g 海盐, 1 000 mL 蒸馏水, pH 为 7.0~7.2。

葡萄糖培养基: 葡萄糖, 3 g; NaCl , 5 g; 酵母提取物, 3 g; 蛋白胨, 3 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2.7 g; 蒸馏水, 1 000 mL; pH 为 7.2。

1.2 试验方法

1.2.1 不同氮源对几种石油降解菌降解性能的影响

在 50 mL 已灭菌的人工海水培养基中按体积分数 0.2% 的浓度加入 100 μL 的柴油(柴油质量浓度 1 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 并按体积分数 2% 的接种量加入 1 mL 菌液, 采用 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 和 NaNO_3 为外加氮源, 外加氮源浓度按与柴油浓度 20:1 的比例投加(即质量浓度 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 以氮元素计), 在 25℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温振荡培养箱中培养, 考察 T4、R4 和 D3 在不同外加氮源的条件培养基中微生物浓度变化以及对柴油的 6 d 降解率, 以不加氮源作为空白, 比较得出强化微生物降解的最优氮源。选取每种微生物的最优氮源, 按上述试验条件, 考察碳氮比(柴油质量浓度: 外加氮源质量浓度)为 5:1、10:1、15:1 和 20:1 的条件下对柴油的 6 d 降解率, 以不加氮源作为空白, 确定每种微生物的最优碳氮比。以 D3 为试验菌株, 采用 GC-MS, 按上述培养条件考察不加菌液和营养盐(空白油样)、只投加 1 mL 菌液和投加菌液及氮源条件下柴油各组分的变化, 上述柴油降解率试验, 每组做 3 个平行, 取平均值。

1.2.2 不同氮源对几种石油降解菌细胞表面疏水性的影响

采用 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 和 NaNO_3 为外加氮源,

按碳氮比 20:1 加入到 50 mL 葡萄糖培养基中, 按体积分数 2% 的接种量加入 1 mL 菌液, 在 25℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中培养 6 d, 采用 MATH 法测定细胞表面疏水性。

1.2.3 外加氮源对微生物降解柴油代谢产物分析

在 50 mL 已灭菌的人工海水培养基中按体积分数 0.2% 的浓度加入 100 μL 的柴油(柴油质量浓度 1 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 并按体积分数 2% 的接种量加入 1 mL 菌液, 采用 3 种菌株的最优氮源, 按碳氮比(20:1)的比例于 25℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温振荡培养箱中培养 6 d, 以未加氮源的菌株作为空白。取 6 d 后的培养基过滤, 滤液置于 50 mL 离心管中, 于 8 000 g 下离心 5 min, 取离心后上层乳化层溶液 1 mL 加入培养皿中于 -20℃ 的条件下冷冻干燥, 采用傅里叶红外光谱仪分析外加氮源前后代谢产物的表面官能团的变化。

1.2.4 外加氮源对混合菌降解性能的影响

在 50 mL 人工海水培养基, 加入 NaNO_3 至含氮 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按体积分数 2% 的接种量加入 1 mL 菌液(混合菌液组成见表 1)、体积分数 0.2% 的比例加入 100 μL 柴油于 25℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的振荡培养箱中培养 6 d, 测定柴油浓度, 计算在外加氮源条件下混合菌的理论降解率和实际降解率与未加氮源的混合菌进行对比, 试验每组做 3 个平行, 取平均值。

混合菌液理论降解率计算方法:

$$\eta_{\text{tw}} = (X_1 + X_2) / 2$$

$$\eta_{\text{th}} = (X_1 + X_2 + X_3) / 3$$

式中: η_{tw} 为二元混合菌理论降解率; η_{th} 为三元混合菌理论降解率; X_1 、 X_2 、 X_3 分别为混合菌中所含菌株 1、2、3 在单菌试验中的降解率。

表 1 混合菌的组成

Tab.1 Constituents of mixed strains				
复合菌	体积/mL			
	T4	R4	D3	
二元混合(1:1)	T4/R4	0.5	0.5	
	T4/D3	0.5		0.5
	R4/D3		0.5	0.5
三元混合(1:1:1)	T4/R4/D3	0.33	0.33	0.33

2 结果与讨论

2.1 不同氮源对几种石油降解菌降解性能的影响

三种氮源对微生物降解柴油的强化作用如图 1 所示。从图中可以看出, R4 和 D3 的最优氮源为 NaNO_3 , NaNO_3 的添加使得这两种菌株柴油降解率

得到了大幅提高, R4 由 48% 提高至 77%, D3 由 44% 提高至 88%; 可见硝态氮更利于这两种菌株的吸收利用, 而对于这方面的研究, 何良菊等^[8]对混合菌株的营养平衡进行研究发现无机氮源要优于有机氮源, 其中硝态氮要优于氨态氮; 赵晴等^[9]在对不同氮源研究方面也得出相似的结论. 而对于 T4 而言其最优氮源为 NH_4NO_3 , NH_4NO_3 的添加使得 T4 对柴油的降解率从 42% 提高至 59%; 这表明铵态氮

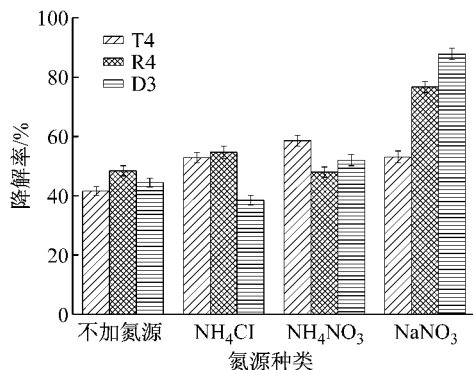


图 1 不同外加氮源种类下微生物对柴油的 6 d 降解率

Fig.1 Six-day diesel oil biodegradation rates with different nitrogen sources

基于上述 3 种菌株的最优氮源, 在不同碳氮比 (质量浓度之比) 下的柴油降解结果如图 3 所示.

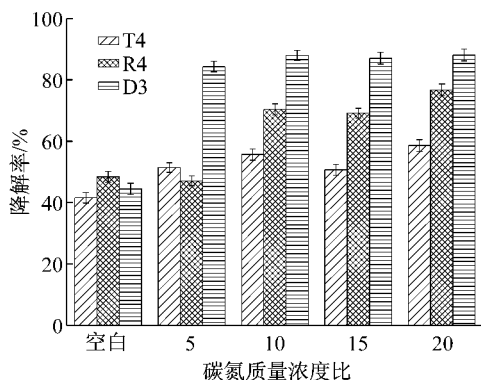


图 3 不同碳氮比下微生物对柴油的 6 d 降解率

Fig.3 Six-day diesel oil biodegradation rates with different carbon-nitrogen ratios

XIA 等^[11]模拟海岸线附近的石油降解得出在 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 降解 1 mg 柴油需要消耗 $0.197 \text{ mgNO}_3\text{-N}$; $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降解 1 mg 柴油需要消耗 $0.371 \text{ mg NO}_3\text{-N}$, 具体的最优碳氮比与投加菌体的种类以及所处的环境有关. 从图 3 中可以看出, 在试验的 $\rho_{\text{C}}/\rho_{\text{N}}$ (碳元素与氮元素的质量浓度比) 条件下, 外加氮源基本上都能够促进柴油的生物降解. 对于 D3 而言, 在碳氮比为 5:1 的时候就能达到 84% 的降解率, 而随着碳氮

可能在 T4 降解柴油过程中起到了一定作用. 在试验的过程中, 添加氮源后培养基的浊度明显提高, 图 2 为三种微生物在最优氮源添加下培养基 OD600 的变化, 从图中可以看出氮源的添加能够促进微生物的生长, 在培养 2 d 后生物量迅速增长, 而未加氮源的培养基生物量增加缓慢, 这也是外加氮源能够促进柴油降解的重要原因之一^[10].

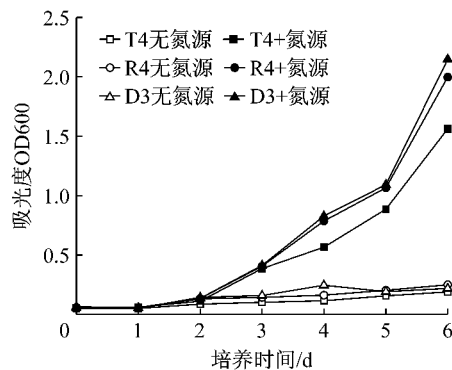


图 2 最优氮源添加下微生物的生长特征

Fig.2 Growth properties of petroleum bacterium with the addition of optimal nitrogen sources

比的降低柴油降解率变化不大; T4 在试验范围内随碳氮比的变化降解率变化也不大, 但氮源的促进效果没有 D3 显著; 而 R4 则随着碳氮比的降低柴油降解率呈现逐步升高的趋势, 当碳氮比小于 20:1 时, 随着含氮浓度的增加微生物对柴油的降解反而受到了抑制, 这是因为过高的氮浓度会影响细胞外源蛋白的表达和积累, 从而影响微生物对石油烃的吸收. 综上考虑三种菌株的最优碳氮比均为 20:1.

以 D3 作为受试菌株, 不含菌的柴油样品作为空白, 考察只投加菌剂, 同时投加菌剂和氮源条件下柴油降解 6 d 后各组分的变化, 试验结果如图 4 所示.

从图 4 中可以看出, 对比石油降解菌剂加氮源和只投加石油降解菌剂的强化方法, 二者对柴油降解的强化效果为, 菌剂加氮源大于菌剂单独作用; 投加高效石油降解菌之后, 柴油各组分的丰度均发生了下降, 而在菌剂和氮源的共同作用下, 柴油各组分的丰度进一步下降, 这与前面试验中柴油浓度的结果相一致. 外加氮源使得 $\text{C}_{13} \sim \text{C}_{19}$ (出峰时间在 20~25 min) 的组分几乎全部降解, 而有机大分子物质 (26~32 min) 也得到了不同程度的降解, 这部分物质可能是柴油中大分子的芳香烃以及石油添加剂, 这类物质结构复杂且化学稳定性好, 比较难于生物降解.

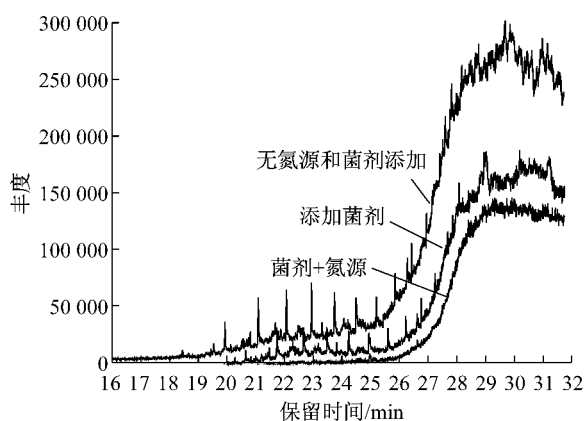


图4 强化微生物降解柴油的 GC-MS 图

Fig.4 GC-MS analysis of diesel oil biodegradation with different enhancement measures

2.2 不同氮源对几种石油降解菌细胞表面疏水性的影响

氮元素添加可以改变细胞表面疏水性从而会影响微生物对石油污染物的降解. 基于上述外加氮源条件下的柴油降解效果, 3 种不同氮源对微生物细胞表面疏水性的影响结果如图 5 所示.

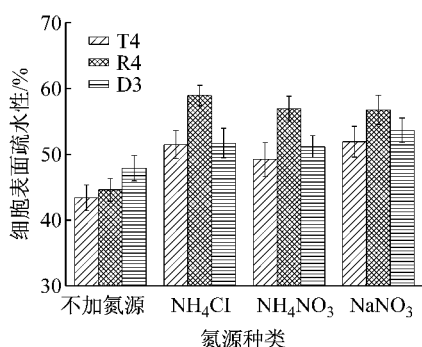


图5 不同外加氮源种类对细菌细胞表面疏水性的影响

Fig.5 Effects of different kinds of nitrogen source on cell-surface hydrophobicity

从图 5 可以看出, 氮源的添加使得微生物细胞表面疏水性提高, 这使得微生物对石油烃的直接粘附作用更强, 更有利于其对石油烃的摄取. 对于外加氮源之后柴油降解能力突出的 D3 菌株, 其石油烃降解的最优氮源—— NaNO_3 也是使其细胞疏水性增强的最优氮源. 疏水性变化的试验结果与降解率变化的试验结果之间表现出了良好的相关性. 对于 T4 菌株而言, NH_4Cl 和 NaNO_3 对表面疏水性的作用效果相当, 高于 NH_4NO_3 的疏水效果, 但 NH_4NO_3 添加时柴油降解效果最好, 这可能是由于 T4 在代谢的过程中同时需要 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3\text{-N}$, 单一形态的氮源虽然能够提高表面疏水性有利于石油烃的吸收, 但在代谢过程中需要进行氮形态的转换, 这不利

于石油烃的降解. 综合考虑, 微生物代谢起着更为主导的作用, 因此复合型氮源—— NH_4NO_3 更有利于 T4 对柴油的降解. 对于 R4 而言, 虽然 NH_4Cl 对细胞表面疏水性的提高更明显, 但 NaNO_3 的添加既能保证较高的疏水率, 又能满足微生物代谢需求, 是 R4 强化生物降解的最优氮源.

2.3 外加氮源对微生物降解柴油代谢产物分析

外加氮源一方面使得生物量得到提高, 另一方面也影响着微生物的新陈代谢. 由于微生物大都处于水相难于与石油烃进行直接接触, 这使得其对石油烃的吸收主要依靠其代谢产物的吸附及乳化等作用完成, 外加氮源是否对微生物代谢产物(如生物表面活性剂等)产生影响, 这在以往的文献中并未进行深入讨论. 本试验基于上述得出的最优氮源, 对代谢产物的表面官能团的分析结果如图 6 所示. 图中, 纵坐标仅作定性分析, 不设数值刻度.

从图 6 中可以看出, 石油降解菌的胞外代谢产物的红外吸收主要集中在 $3\ 407$ 、 $1\ 638$ 、 $1\ 400$ 和 $1\ 130\ \text{cm}^{-1}$ 附近. $3\ 407\ \text{cm}^{-1}$ 附近的强吸收峰为 N-H 键及 O-H 键; $1\ 638\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为 CO-N 形式的官能团, 同时 $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 附近也是伯酰胺 II 在缔合态下的特征吸收; $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 附近是羧酸中羰基($-\text{COOH}$ 中 C=O)的吸收峰; $1\ 130\ \text{cm}^{-1}$ 为 C-O-C 的吸收峰^[12-13]. 由上述的红外吸收官能团分析可知, 石油降解菌的代谢产物是一种脂肽类的物质, 这与微生物所分泌的表面活性剂的结构极为相似. 石油降解菌的代谢产物与其石油降解紧密相关, 一般微生物分泌的脂肽是具有亲水基团(氨基酸或肽)和疏水基团(脂肪酸)的两亲性物质. 观察 T4、R4、D3 在外加氮源前后胞外代谢产物的基团的变化可以发现, 外加氮源之后产物在 $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰明显增强, 其强度超过了 $1\ 638\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 130\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰, 这说明代谢产物中脂肪酸的含量明显升高, 而脂肪酸是一种疏水性的基团, 其含量的增高将有利于石油烃的吸收, 这在一定程度上促进了微生物对石油烃的降解.

2.4 外加氮源对混合菌降解性能的影响

以 NaNO_3 为氮源, NaNO_3 质量浓度 $80\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按碳氮质量浓度比 $20:1$ 的比例投加至含有混合菌的培养基中, 试验结果如图 7 所示.

从图 7a 中可以看出, 对于 T4/R4 而言, 在未加氮源时, 混合菌的实际降解效果仅比 T4、R4 单独作用效果的加和略有升高. 而在添加了氮源之后, 混合菌的降解优势开始体现, T4/R4 的实际降解率达到

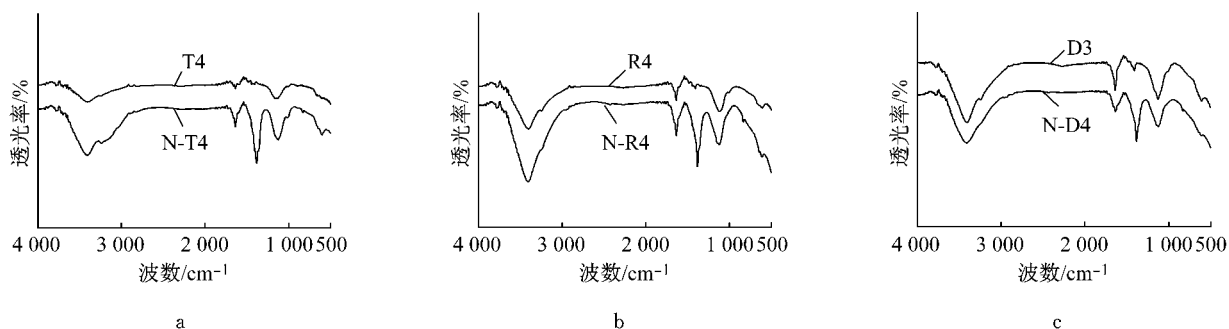


图 6 外加氮源前后微生物代谢产物傅里叶红外光谱图

Fig.6 FT-IR analysis of metabolin with the addition of nitrogen source

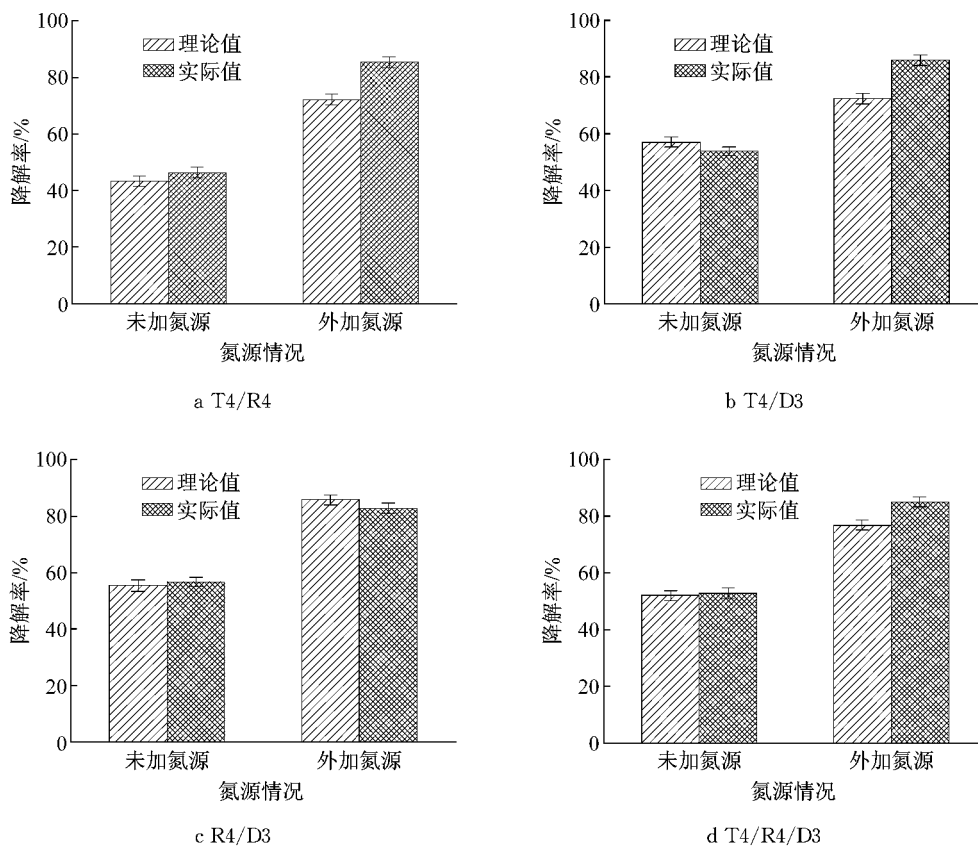


图 7 混合菌在添加氮源前后对柴油的 6 d 降解率

Fig.7 Six-day diesel oil biodegradation rates of mixed strains with the addition of nitrogen source

了 85.5%，比添加氮源条件下的理论值提高了 13.2%，比未加氮源条件下的理论值提高了 42%。

从图 7b 中可以看出，对于 T4/D3 而言，在未加氮源时，混合菌的实际降解效果甚至比理论值还略低，但外加氮源使得混合菌的降解优势得以发挥，混合菌的实际降解率达到 85.8%，比外加氮源下的理论值高出了 13.4%，比未加氮源下的理论值高出了 28.7%。

从图 7c 中可以看出，对于 R4/D3 而言，在未加氮源时，混合菌的实际降解效果与理论值并未有太大变化。而外加氮源之后，微生物的降解效果得到了

提升，但并未体现出混合菌的优越性。R4/D3 的实际值为 82.7%，低于理论值的 85.7%，但高于未加氮源条件下的理论值和实际值。

从图 7d 中可以看出，对于 T4/R4/D3 而言，在未加氮源时，T4/R4/D3 柴油降解率的实际值与理论值差别不大。混合菌并未体现出相互之间的协同或拮抗作用。在添加氮源之后，混合菌的降解优势逐步体现，T4/R4/D3 的实际降解率为 84.9%，比理论降解率高 8.1%，比未加氮源时的理论降解率高 32.9%。

可以看出，外加氮源不仅促进了单一菌株的降

解能力,同时可以影响混合菌株之间的共代谢,使之产生协同或拮抗作用,且比未加氮源时更加明显。

3 结论

(1) 通过外加氮源可以起到强化微生物对柴油的降解,其中 R4 和 D3 的最优氮源是 NaNO_3 , T4 的最优氮源是 NH_4NO_3 , 最优碳氮比均为 20:1。

(2) 外加氮源能够使石油降解菌的细胞表面疏水性得到提高,其中使 D3 降解率显著提高的最优氮源—— NaNO_3 同样是使其表面疏水性显著提高的最优氮源。微生物降解与细胞表面疏水性表现出良好的相关性。

(3) 石油降解菌的代谢产物中含有明显的脂肽结构,具有两亲性。氮源的添加使得代谢产物中的疏水基团——脂肪酸的含量明显提高。这在一定程度上促进了微生物对柴油的摄取利用。

(4) 氮源的添加有助于混合菌对柴油的降解,降解率得到大幅提高,其中外加氮源使得 T4/R4、T4/D3、T4/R4/D3 表现出了高于理论值的协同降解作用。

参考文献:

- [1] YANG Sizhong, JIN Huijun, WEI Zhi, et al. Bioremediation of oil spills in cold environments: a review [J]. *Pedosphere*, 2009, 19(3):371.
- [2] Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat I M. 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.
- [3] HUANG Lei, MA Ting, LI Dan, et al. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis* [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 56:1714.
- [4] Mukherji S, Jagadevan S, Mohapatra G, et al. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field [J]. *Bioresource Technology*, 2004, 95:281.
- [5] Lin T C, Pan P T, Cheng S S. Ex-situ bioremediation of oil-contaminated soil [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176:27.
- [6] Lee S H, Oh B I, Kim J. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99:2578.
- [7] Whang L M, Liu P W G, Ma C C, et al. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation—effects of pH and ammonium addition [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164:1045.
- [8] 何良菊,李培杰,魏德洲,等.石油烃微生物降解的营养平衡及降解机理 [J]. *环境科学*, 2004(1):91.
HE Liangju, LI Peijie, WEI Dezhou, et al. Nutrient balance and mechanism of biological degradation of oil [J]. *Environmental Science*, 2004(1):91.
- [9] 赵晴,于鲁冀,张甲耀.疏水性石油烃降解菌的PCR测序及营养平衡研究 [J]. *环境科学与技术*, 2009, 32(1):19.
ZHAO Qing, YU Luji, ZHANG Jiayao. PCR sequencing and nutrient balance of hydrophobic hydrocarbon degrading bacteria [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 32(1):19.
- [10] 何云馨,石晓勇,杨仕美,等.溢油污染海岸线生物修复措施现场应用效果评价 [J]. *环境科学与技术*, 2011(3):41.
HE Yunxin, SHI Xiaoyong, YANG Shimei, et al. Evaluation on in-situ bioremediation of a shoreline polluted by oil spill [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011(3):41.
- [11] XIA Wenxiang, LI Jincheng, SONG Zhiwen, et al. Effects of nitrate concentration in interstitial water on the bioremediation of simulated oil-polluted shorelines [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19:1491.
- [12] Lotfabad T B, Shourian M, Roostaazad R, et al. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 69(2):183.
- [13] Ismail W, Al-Rowaihi I S, Al-Humam A A, et al. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15 [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 71(6):50.