

高效石油烃降解酵母菌的筛选鉴定及其降油特性优化研究

韩宇星¹, 周飞¹, 孙先锋^{1*}, 杨琴², 蒋帅¹, 虎沛¹
(1. 西安工程大学环境与化学工程学院, 陕西 西安 710048;
2. 中国石油长庆油田分公司油气工艺研究院, 陕西 西安 710048)

摘要:从长庆油田安塞地区的含油土壤中筛选得到1株高效石油烃降解酵母菌, 对其进行了生理、生化以及 ITS 序列分析, 并研究了其降解特性和对原油四组分的降解情况。结果表明, 筛选得到的目标酵母菌 Y4 为水生假丝酵母(*Candida aquatextoris*), 通过对降解条件进行响应面优化研究, 得到该菌最佳降解条件为: pH 为 7.2、温度为 30℃、接种量为 6.25%, 在该条件下, 酵母菌 Y4 具有较好的石油烃降解能力, 在石油污染修复领域具有巨大的应用潜力。

关键词:石油烃降解; 微生物修复; 酵母菌; 原油四组分; 响应面分析

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2022)01-0111-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2022.01.023

Screening and identification of high-efficient yeast for degrading petroleum hydrocarbon and optimization of its degrading characteristics

HAN Yu-xing¹, ZHOU Fei¹, SUN Xian-feng^{1*}, YANG Qin², JIANG Shuai¹, HU Pei¹

(1. School of Environmental and Chemical Engineering, Xi'an Polytechnic University, Xi'an 710048, China;
2. Changqing Oil and Gas Technology Institute, PetroChina Changqing Oilfield Company, Xi'an 710048, China)

Abstract: A high-efficient yeast strain for degrading petroleum hydrocarbon is screened out from the oil-bearing soil in Ansai area of Changqing Oilfield. Its physiological characteristics, biochemical characteristics and ITS sequence are analyzed, and its degradation characteristics and its degradation performance against four components of crude oil are studied. It is shown that the target yeast Y4 is *Candida aquatextoris*. Through response surface optimization to the degradation conditions, the optimal degradation conditions are obtained as follows: pH = 7.2, temperature is at 30°C and inoculum amount is 6.25%. Under these conditions, the yeast Y4 has a good ability to degrade petroleum hydrocarbons and has great potential in the field of petroleum pollution remediation.

Key words: degradation of petroleum hydrocarbon; microbial remediation; yeast; four components of crude oil; response surface analysis

石油作为我国的重要能源,其造成的污染目前还无法杜绝^[1],近年来,土壤碳氢化合物污染被认为是全球关注的主要问题^[2]。消除这些物质是减少其对生态系统和人类健康负面影响的必要条件^[3]。从环境友好的角度来看,生物修复具有成本效益、多功能性和环境安全性。从技术上讲,该方法是基于微生物降解或解毒有机污染物的能力^[4-5]。

石油污染的土壤氧气含量低、营养物质匮乏,大部分微生物难以生存,细菌因其普遍性和广泛性而被认为是降解石油烃最重要的微生物^[6],目前相关研究主要集中在细菌上,但是真菌因在难降解长链

或多环芳烃方面的良好降解能力而受到了极大关注^[7-9],酵母菌作为兼性厌氧菌,需氧量小,对营养物质要求低,能承受高污染负荷且耐高渗透压,可成为修复含油土壤的优势真菌^[10]。倪娜等^[11]从胜利油田石油污染的土壤中筛选分离得到降解柴油的假丝酵母,发现其对直链烷烃有很好的降解效果。邓超等^[12]对萘降解酵母菌进行了研究,发现其 15 d 对萘降解率可达 63%。笔者从被原油污染的土壤中分离到 1 株能够利用石油烃的酵母菌,并对其降解条件以及对原油四组分的降解情况进行研究,为酵母菌在环境修复中的实际应用提供依据。

收稿日期: 2021-08-31; 修回日期: 2021-11-05

基金项目: 中国石油股份公司重大专项: 低碳与清洁发展关键技术研究及应用(2016E-1204); 长庆油田油气当量 5 000 万 t 持续稳产关键技术研究与应用(1602-1)

作者简介: 韩宇星(1996-),女,硕士研究生,主要从事环境污染的生物与化学防治研究,17729506790@163.com;孙先锋(1973-),男,博士,副教授,主要从事环境污染的生物与化学防治研究,通讯联系人,511673600@qq.com。

1 材料与方法

1.1 实验样品

原油采自长庆油田安塞地区某采油井场储油池;含油土壤取自长庆油田安塞地区某采油井场内被原油污染的土壤。

1.2 培养基

马丁氏培养基: KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、1% 的孟加拉红水溶液 3.3 mL、蒸馏水 1 000 mL、自然 pH, 灭菌后的培养基中加入链霉素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

酵母培养基 (YPD): 酵母浸粉 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 L, 自然 pH, (固体培养基需加入 15~20 g 琼脂粉)。

无机盐培养基: K_2HPO_4 1 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 NH_4NO_3 1 g、 CaCl_2 0.02 g、 NaCl 5 g、蒸馏水 1 L、pH 7.0。

1.3 实验方法

1.3.1 酵母菌分离筛选及纯化

取 10.0 g 含油土壤, 加入 100 mL 灭菌马丁氏培养基中 (含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素), 置于 28℃、140 r/min 摇床中培养 2 d 后, 取 1 mL 培养液于 100 mL 灭菌马丁氏培养基中, 相同条件继续富集培养 2 d。然后用稀释涂布法进行分离纯化, 将分离出的单菌分别在 YPD 液体培养基中培养, 并将其培养的种子液按照体积比 3% 接种到原油质量分数为 1% 的无机盐培养基中, 在 30℃、140 r/min 下进行降解反应, 7 d 后, 测定菌株对石油烃的降解率, 选出目标菌株。

1.3.2 菌株鉴定

生理生化实验: 参照周德庆《微生物学实验手册》和金卫根等^[14]、李德宇^[15]的生理生化实验方法。

分子鉴定: 将目标菌株送至陕西中科羽瞳生物科技有限公司进行 ITS 分子鉴定, 并用 MEGA 软件构建系统发育树。

1.3.3 石油烃降解率的测定

采用重量法测定, 参考吴曼莉等^[13]的实验方法。

1.3.4 生长曲线测定

挑取酵母菌接到 100 mL 液体 YPD 培养基中, 28℃、140 r/min 摇床培养, 当 $OD_{600} = 1.0$ 时, 取 5 mL 培养液到 100 mL 液体 YPD 培养基中, 继续摇床培养, 每隔 2 h 取样测定 OD_{600} 值, 不加菌培养基为参比, 绘制生长曲线。

1.3.5 降解菌降解特性研究

取上述对总石油烃降解率最高的菌株为目标菌株, 对其降解特性进行研究。

(1) 单因素实验

固定初始 pH 为 7.0、温度为 30℃、摇床转速为 140 r/min、菌剂接种量为 3%, 考察初始 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)、温度 (15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃)、菌种接种量 (1%、3%、5%、7%、9%、11%) 对菌株 7 d 的降解特性的影响。

(2) 响应面优化

在单因素试验的基础上, 对 3 个因素的较佳水平进行响应面试验设计。以石油降解率为响应值, 用 Design Expert 8.0.6 软件处理试验数据, 构建数学回归模型, 获得目标菌株的最佳降解条件, 且得到 3 个因素之间的交互影响。响应面试验因素水平如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素水平表

水平	因素		
	pH	温度/℃	接种量/%
-1	6	25	3
0	7	30	5
1	8	35	7

1.3.6 降解菌对石油四组分的降解

参考李红^[16]和国家标准《石油烃沥青四组分测定法》^[17]中所述的方法。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌筛选结果

通过对含油土壤中微生物进行分离筛选, 得到 Y1、Y2、Y3、Y4 等 4 株酵母菌, 各菌株对总石油烃的降解效果如表 2 所示。

表 2 4 株酵母菌对石油烃的降解效果

菌株	Y1	Y2	Y3	Y4
降解率/%	40.16	43.03	62.02	69.84

由表 2 可知, 4 株酵母菌均具有一定的降解石油烃能力, 其中 Y4 的降解率最高, 达到了 69.84%, 降解效果良好, 后续实验以菌株 Y4 作为目标菌株。

2.2 菌株 Y4 的鉴定

2.2.1 菌株的形态学特征

Y4 在 YPD 培养基上的菌落形态和细胞形态如图 1 所示。由图 1(a) 中可以看出, 菌落形态呈乳白

色,不透明,表面光滑,黏稠,边缘齐整。由图 1(b)中可以看出,细胞呈椭圆形半透明状,直径约 15 μm。

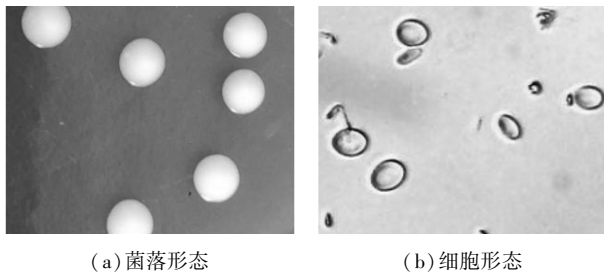


图 1 菌株 Y4 菌落形态

2.2.2 生理生化结果

Y4 生理生化结果如表 3 所示。

表 3 菌株 Y4 生理生化结果

糖发酵							
葡萄糖	乳糖	蔗糖	麦芽糖				
+	+	+	+				
糖同化							
葡萄糖	乳糖	蔗糖	麦芽糖	蜜二糖	鼠李糖		
+	+	+	+	+	-		
其他							
VP	甲基红实验	过氧化氢	硫化氢实验	尿素实验	明胶液化	淀粉水解	柠檬酸盐
-	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

2.2.3 分子鉴定结果

Y4 的 ITS 序列经 Blast 比对,鉴定 Y4 为假丝酵母菌属,且与水生假丝酵母 (*Candida aquatextoris*) 的同源性达到 99.78%,结合生理生化试验结果,确定 Y4 为水生假丝酵母 (*Candida aquatextoris*),用 MEGA 软件构建其相关种属的系统发育树,如图 2 所示。

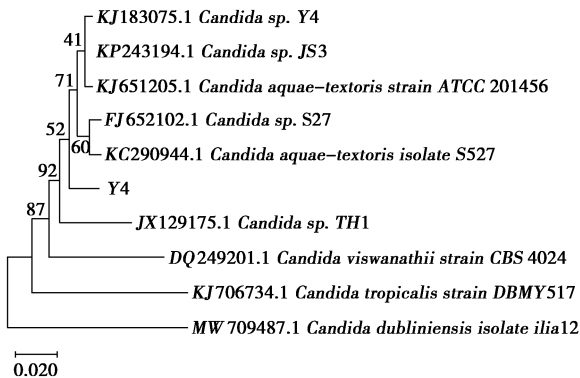


图 2 基于 16S rRNA 序列构建的菌株 Y4 系统发育树

2.3 酵母菌 Y4 生长特性研究

目标菌株 Y4 具有最高石油烃降解率,其生长规律如图 3 所示。

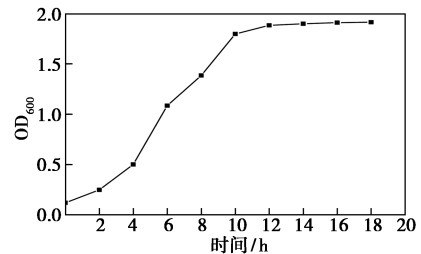
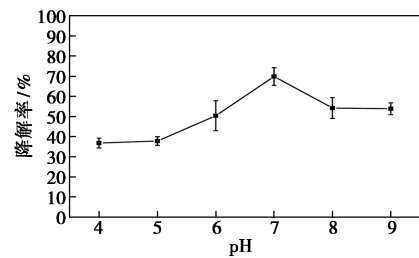


图 3 菌株 Y4 的生长曲线

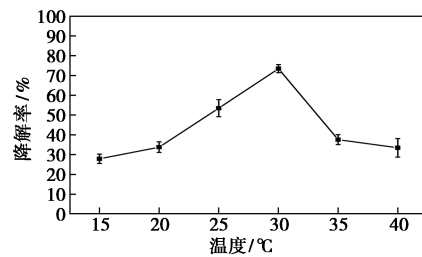
由图 3 可知,Y4 的对数生长期为 2~12 h,稳定期为 12~18 h,原油降解实验中,接入的菌要数量较多而且活性较高,故选择培养到 8~10 h 的菌进行实验。

2.4 菌株 Y4 降解条件优化结果

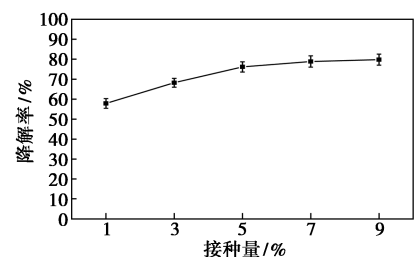
对影响微生物降解石油烃的环境条件进行研究,结果如图 4 所示。



(a) pH



(b) 温度



(c) 接种量

图 4 不同因素对菌株 Y4 降解效果的影响

pH 的变化会影响环境中微生物对营养物质的可利用性^[18],影响硝化作用、氮的转化以及酶的活

性。由图 4(a)可知,在 pH 为 4.0~7.0 时降解率逐渐增加,pH 为 7.0 时,降解率达到 70%左右;pH 高于 7.0,降解率开始下降。故最佳降解 pH 为 7.0。

温度会影响微生物的生长代谢,温度太高和太低都会影响其活性。由图 4(b)可知,菌株 Y4 在 30℃ 时对石油烃降解效果最好,降解率为 73.45%。

由图 4(c)可知,接种量在 5%~9%时,降解率曲线呈平缓趋势;当接种量从 5%提升到 9%时,降解率仅提升了 3.63%。考虑到成本以及操作的方便性,最佳接种量取 5%。

2.5 响应面试验结果

响应面优化试验方案及结果如表 4 所示。利用软件对 17 个实验点和相应的降解率进行多元回归拟合,得到的回归模型方差分析结果如表 5 所示。

表 4 响应面实验方案与结果

序号	pH(A)	温度(B)/℃	接种量(C)/%	降解率/%
1	-1	-1	0	64.36
2	1	-1	0	66.23
3	-1	1	0	57.78
4	1	1	0	60.76
5	0	0	0	77.58
6	0	0	0	76.33
7	-1	0	1	78.26
8	1	0	1	80.33
9	0	-1	-1	58.88
10	0	1	-1	40.79
11	0	-1	1	70.57
12	0	1	1	67.67
13	0	0	0	76.13
14	-1	0	-1	52.34
15	1	0	-1	57.3
16	0	0	0	75.49
17	0	0	0	76.51

表 5 回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1655.36	9	183.93	669.69	<0.0001	**
A	10.35	1	10.35	37.69	0.0005	*
B	200.40	1	200.40	729.66	<0.0001	**
C	679.70	1	679.70	2474.81	<0.0001	**
AB	1.11	1	1.11	4.05	0.0840	不显著
AC	2.77	1	2.77	10.09	0.0156	*
BC	12.92	1	12.92	47.06	0.0002	**

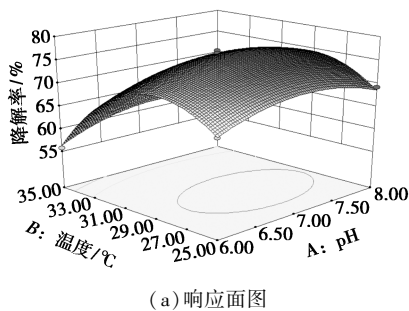
A^2	56.72	1	56.72	206.52	<0.0001	**
B^2	404.81	1	404.81	1473.94	<0.0001	**
C^2	219.81	1	219.81	800.33	<0.0001	**
残差	1.92	7	0.27			
失拟项	1.42	3	0.47	3.77	0.1161	不显著
纯误差	0.50	4	0.13			
总变异	1657.28	16				

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

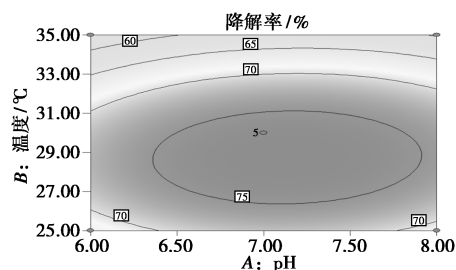
对表 4 中的数据进行多元非线性回归拟合,得到二次回归方程为:

$$R = 76.51 + 1.14A - 5.01B + 9.22C + 0.53AB + 0.83AC + 1.8BC - 3.67A^2 - 9.81B^2 - 7.23C^2$$

由表 5 可知, $P < 0.0001$, 该模型项显著性极高,且该模型失拟项 $P = 0.1161 > 0.05$, 差异性不显著,说明该建模可行。A、B、 A^2 、 B^2 、 C^2 对应的响应值 < 0.0001 , 影响极显著,交互项 AC、BC 影响显著。多元回归方程式对应的响应曲面图和等高线图分别如图 5、图 6、图 7 所示。对此进行分析和评价,以确定最佳混合菌配比。以 P 值来判断菌株之间交互影响大小顺序是: $BC > AC > AB$ 。



(a) 响应面图



(b) 等高线图

图 5 pH 和温度的相互作用对降解率的影响

由主要因素的 F 值可以得知,3 种因素对石油烃降解率的影响顺序为: $pH > 温度 > 接种量$ 。根据分析得出的最佳降解条件为: pH 为 7.21、温度为 29.04℃、接种量为 6.25%,此时,降解率为 80.00%。

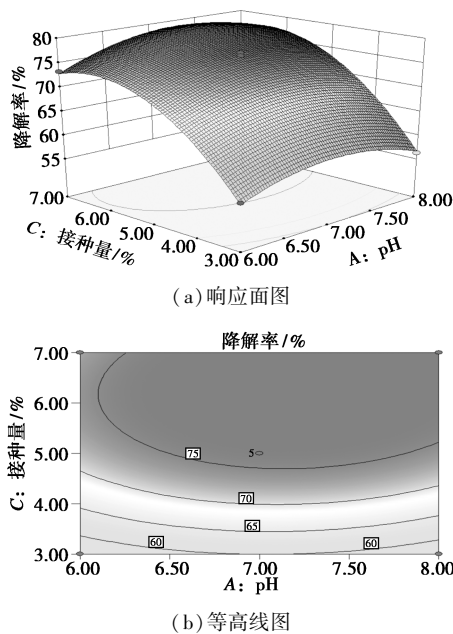


图 6 pH 和接种量的相互作用对降解率影响

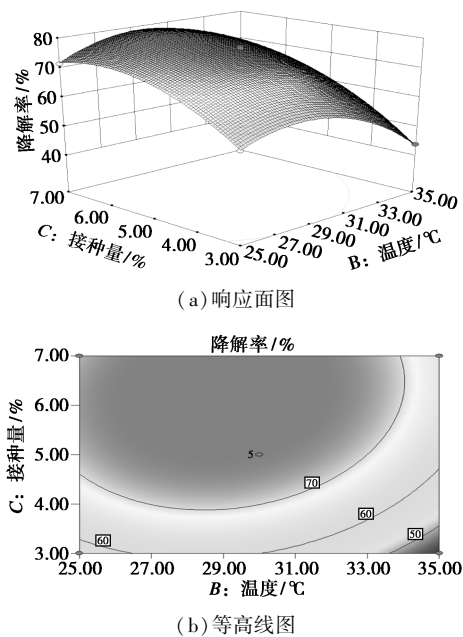


图 7 温度和接种量的相互作用对降解率影响

通过验证试验对软件分析结果进行验证,根据实际操作情况的可行性,调整 pH 为 7.2、温度为 30℃、接种量为 6.25% 下进行实验。最终得到 Y4 的最佳降解率为 81.65%,与预测值基本一致,说明该模型基本准确。因此,菌株 Y4 的最佳降解条件为:pH 为 7.2、温度为 30℃、接种量为 6.25%。

2.6 原油四组分分析

石油烃成分复杂,含油数百中化合物^[19],其成分包括烷烃、芳烃、胶质、沥青质,但其主要成分是烷烃(质量分数>50%)^[20]。原油四组分的质量分数

及其 7 d 石油烃降解情况如表 6 所示。

表 6 原油的四组分分析结果

组分	烷烃	芳烃	胶质	沥青质
质量分数/%	76.02	8.37	3.20	4.44
降解率/%	83.65	43.07	28.57	18.64

由表 6 可知,Y4 对烷烃降解效果最好,在 7 d 内,降解率达到 83.65%,对难降解的芳烃、胶质、沥青质也有一定的降解效果,降解率分别为 43.07%、28.57%和 18.64%,如何提升对难降解物质的降解效果是下一步要重点研究的问题。

3 结论

(1)从安塞油田石油污染土壤中筛选出高效石油烃降解酵母菌 Y4,7 d 对石油烃的降解率为 69.84%,通过生理生化实验以及 ITS 序列分析,鉴定 Y4 为水生假丝酵母(*Candida aquatextoris*)。

(2)通过单因素实验以及响应面试验,得到 Y4 的最佳降解条件为:pH 为 7.2、温度为 30℃、接种量为 6.25%,此时,降解率可达 81.65%。且 3 种因素对石油烃降解率的影响顺序为:pH>温度>接种量。

(3)对 Y4 降解后的残油进行烷烃、芳烃、胶质、沥青质等原油四组分分析,结果 Y4 对烷烃有较好的降解特性。

(4)Y4 能很好地适应陕北黄土塬区油田污染土壤高含油、偏碱性酸碱度和夏季温度在 25~35℃ 之间等特殊环境条件,表明降解陕北地区油田污染土壤方面具有较高的实用价值。

参考文献

- [1] Perera Madushika, Chinthaka S D M, Wijayarathna C D, et al. Reduction of lag in crude oil degradation by *Aspergillus* when it is in synergy with *Bacillus* in biofilm mode [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02534-6>.
- [2] Mardans, Gitipours, Aliabdolm. Pollution control caused by high levels of petroleum hydrocarbons in contaminated soils [J]. *Petroleum Science and Technology*, 2018, 36(11):1-7.
- [3] Rabodonirina S, Rasolomampianinac B R, Krieder F, et al. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites [J]. *Journal Environmental Management*, 2019, (232):1-7.
- [4] 曾军, 吴宇澄, 林先贵. 多环芳烃污染土壤微生物修复研究进展 [J]. *微生物学报*, 2020, 60(12):2804-2815.

(下转第 120 页)

- [3] 郝吉明. 大气二次有机气溶胶污染特征及模拟研究[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [4] 唐孝炎, 张远航, 邵敏. 大气环境化学. 第 2 版[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [5] 吴碧君, 刘晓勤. 挥发性有机物污染控制技术研究进展[J]. 电力环境保护, 2005, (4): 39-42.
- [6] 孙铁珩, 周启星. 污染生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 郑承煜. VOC 治理技术分析[C]. 第 14 届环保车用涂料与涂装技术研讨会暨 2016 年汽车涂料专委会年会, 2016.
- [8] 梁文俊, 郑锋, 李坚, 等. 多电极介质阻挡放电降解甲苯的实验研究[J]. 北京工业大学学报, 2012, 38(6): 916-921.
- [9] 汪晓熙. 脉冲放电等离子体处理甲苯废气的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [10] 聂勇, 李伟, 施耀, 等. 等离子体反应器的改进及其与脉冲电源间的匹配[J]. 电工电能新技术, 2004, (2): 64-68.
- [11] Gennequin C, Siffert S, Cousin R, *et al.* Co-Mg-Al hydrotalcite precursors for catalytic total oxidation of volatile organic compounds[J]. Topics in Catalysis, 2009, 52(5): 482-491.
- [12] 谭明侠, 王国军, 谢建川. VOC 催化燃烧技术[C]. 第三届全国工业催化技术及应用年会论文集, 2006.
- [13] Dae-Chul, Kim, Son-Ki, *et al.* Application of spinel-type cobalt chromite as a novel catalyst for combustion of chlorinated organic pollutants[J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35(1): 222-226.
- [14] Stoyanova M, Konova P, Nikolov P, *et al.* Alumina-supported nickel oxide for ozone decomposition and catalytic ozonation of CO and VOCs[J]. Chemical Engineering Journal, 2006, 122(1-2): 41-46.
- [15] 徐保明, 许庆博, 唐强, 等. 钴盐催化甲苯液相选择氧化反应研究进展[J]. 应用化工, 2017, 46(12): 2451-2454.
- [16] Yang H, Deng J, Liu Y, *et al.* Pt/Co₃O₄/3DOM Al₂O₃: Highly effective catalysts for toluene combustion[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2016, 37(6): 934-946.
- [17] 王艳杰, 刘瑞, 吕广明, 等. 纳米 CeO₂ 的催化基础及应用研究进展[J]. 中国稀土学报, 2014, 32(3): 257-269.
- [18] Raciulete M, Afanasiev P. Manganese-containing VOC oxidation catalysts prepared in molten salts[J]. Applied Catalysis A General, 2009, 368(1): 79-86.
- [19] Sager S M, Kondarides D I, Verykios X E. Catalytic oxidation of toluene over binary mixtures of copper, manganese and cerium oxides supported on gamma-Al₂O₃ [J]. Applied Catalysis B Environmental, 2011, 103(3-4): 275-286.
- [20] 唐军旺, 张涛. 微波辅助催化净化汽车尾气[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 2001, (2): 197-198.
- [21] 胡旭睿. 微波催化燃烧 VOCs 催化剂制备及性能研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2016.
- [22] 张林, 陈欢林, 柴红. 挥发性有机物废气的膜法处理工艺研究进展[J]. 化工环保, 2002, (2): 75-80.
- [23] 张浩. 复合载体负载型催化剂制备及其微波辅助催化氧化甲苯的性能试验研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2013.
- [24] 廖建波. 挥发性有机物微波辅助催化氧化性能试验研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2011.
- [25] 王晓晖, 卜龙利, 刘海楠, 等. 碳化硅协同分子筛负载型催化剂微波辅助催化氧化甲苯性[J]. 环境科学, 2013, 34(6): 2107-2115. ■

(上接第 115 页)

- [5] Chigusa K, Hasegawa T, Yamamoto N, *et al.* Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeasts[J]. Wat Sci Tech, 1996, 34(11): 51-58.
- [6] Singh C, Lin J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa[J]. Biotechnology, 2008, 7(12): 1927-1932.
- [7] Acevedo F, Pizzul L, Castillo M P, *et al.* Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthrachophyllum discolor* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185: 212-219.
- [8] Aranda E. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 38: 1-8.
- [9] Deshmukh R, Khardenavis A A, Purohit H J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation[J]. Indian Journal of Microbiology, 2016, 56: 247-264.
- [10] Xia M Q, Fu D F, Chakraborty R, *et al.* Enhanced crude oil depletion by constructed bacterial consortium comprising bioemulsifier producer and petroleum hydrocarbon degraders[J]. Bioresource Technology, 2019, 282: 456-463.
- [11] 倪娜, 姚淑敏, 徐朝阳, 等. 降解柴油的耐盐酵母菌的鉴定及性质研究[J]. 科学技术与工程, 2011, 11(15): 1671-1815.
- [12] 邓超, 周振宇, 张家傲, 等. 1 株苾降解酵母菌 HXY-5 的筛选鉴定及对苾的降解研究[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(1): 83-89.
- [13] 吴曼莉, 李可欣, 侯爽爽, 等. 贫养分低有机质黄绵土中石油烃的生物去除特性及菌群结构变化[J]. 环境科学研究, 2021, <https://doi.org/10.13198/j.issn.1001-6929.2021.04.13>.
- [14] 金卫根, 陈传红, 周亚平, 等. 两株多环芳烃降解菌的筛选与生化鉴定[J]. 土壤肥料, 2015, 17: 86-89.
- [15] 李德宇. 石油烃降解复合菌群的构建及降解动力学研究[D]. 济南: 山东交通大学, 2018.
- [16] 李红. 耐盐石油烃降解菌群的构建及其降解性能研究[D]. 西安: 西安石油大学, 2020.
- [17] 国家能源局. NB/SH/T 0509—2010 石油沥青四组分测定法[S]. 北京: 中国石化出版社, 2010-10-01.
- [18] 李国丽, 曾小英, 翟立翔, 等. 一株石油降解菌 *Lysinibacillus fusiformis* 23-1 的筛选鉴定及原油降解特性[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(7): 1229-1236.
- [19] 李茵, 梁承红, 张勇. 海参中有毒有害物质的分析研究进展[J]. 化学研究与应用, 2014, 26(1): 1-5.
- [20] Asemoloye M D, Jonathan S G, Jayeola A A, *et al.* Mediation influence of spent mushroom compost on phytoremediation of black-oil hydrocarbon polluted soil and response of *Megathyrus maximus* Jacq[J]. Journal of Environmental Management, 2017, 200: 253-262. ■