

石油降解细菌的表型特性和系统发育分析

韩如旻¹ 闵航¹ 程志强² 柳良好³

(1 浙江大学生命科学学院, 杭州 310029) (2 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

(3 杭州娃哈哈集团有限公司, 杭州 310020)

摘要: 从3种不同土壤中分离和纯化得到10个石油降解细菌菌株。分离菌株均为好氧菌、革兰氏阴性菌、不形成芽孢的杆菌。10个菌株均能利用中等链长的烷烃、柴油和原油作为碳源,而不能以单环芳烃和多环芳烃为碳源。根据其生理生化性状和16S rDNA序列分析结果表明,分离菌株EVA5、EVA6、EVA7、EVA8和EVA9为假单胞菌(*Pseudomonas* spp.), EVA10、EVA11、EVA12、EVA13和EVA14为不动杆菌(*Acinetobacter* spp.),均属于Proteobacteria的 γ 亚群。

关键词: 石油降解细菌, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, 16S rDNA序列, 系统发育

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1005-0094(2002)02-0202-06

Phenotypic characteristics and phylogenetic analysis of crude oil degrading bacteria

HAN Ru-Yang¹, MIN Hang¹, CHENG Zhi-Qiang², LIU Liang-Hao³

1 College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029

2 Institute of Biotechnology Research, Zhejiang University, Hangzhou 310029

3 Hangzhou Wahaha Group Ltd., Hangzhou 310020

Abstract: Ten strains of crude oil degrading bacteria were isolated from three soil samples. The isolates were Gram-negative, aerobic, non-spore-forming rods. All of the ten isolates were able to grow on *n*-alkanes with medium length, diesel fuel and crude oil, but not polycyclic aromatic hydrocarbon. Based on phenotypic characteristics and 16S rDNA sequence analysis, ten isolates were identified as *Pseudomonas* spp. (strain EVA5, EVA6, EVA7, EVA8, EVA9) and *Acinetobacter* spp. (strain EVA10, EVA11, EVA12, EVA13, EVA14), respectively.

Key words: crude oil-degrading bacteria, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, 16S rDNA sequence, phylogenetic analysis

造成环境污染的石油烃主要来源于自然界蕴藏石油的天然渗出和石油生产、转运和储存过程中的泄漏。近年来,地下储油罐和输油管的石油泄漏时有发生,而海洋溢油事故亦已成为海洋和海岸污染的主要来源。大规模的原油泄漏对海洋和陆生生物具有长期危害,因而已引起人们的高度重视(Balba *et al.*, 1998)。在自然状态下,多种微生物具有降解和转化原油组分的能力。生物修复是利用自然界中的生物活性以减少和降低各种化学物质浓度和毒性的过程(Korda *et al.*, 1997)。微生物的石油降解

能力是对石油污染进行生物修复的生物学基础,直接决定生物修复的效率。本文从3种不同土壤中分离和纯化得到10个石油降解细菌菌株,并根据其生理生化性状和部分长度的16S rDNA序列确定了分离菌株的分类学和系统发育地位。

1 材料与方法

1.1 分离源

本研究中的石油降解菌株分别从3种不同土壤

样品中分离和纯化得到。3 种土壤分别是:桑园土(采自浙江大学华家池校区桑园,采集时间为 2000 年 8 月 11 日),油田土壤(采自安徽省天长市苏北油田,采集时间为 2000 年 7 月 25 日),油污土壤(采自浙江大学华家池校区汽车修配厂,采集时间为 2000 年 5 月 18 日)。

1.2 培养基

本实验分别用 7 种不同的培养基富集和分离石油降解细菌:F1 和 F2 培养基(Kästner *et al.*, 1994),F3 培养基(Zarilla & Perry, 1984),F4 培养基(Alley & Brown, 2000),F5 培养基(Foght *et al.*, 1990),F6 培养基(Klug & Markovetz, 1967),F7 培养基(Chang *et al.*, 2000)。少量原油和柴油预先置于 50 mL 厌氧瓶中,121℃ 湿热灭菌 30 min。灭菌后用无菌玻棒或细竹棒挑取少量原油(以油膜覆盖整个培养基表面为宜)或用无菌微量注射器吸取柴油(0.2%)和单一烃类加入培养基中作为碳源。

用于菌株分离和保存的培养基为含有 0.1% 酵母粉、0.1% 蛋白胨和 2% 琼脂的基础培养基,制成平板或 3 mL 分装于试管,制成菌种保存斜面;含 2% 琼脂的固体培养基分装于试管中,每管 10 mL,灭菌后加入原油,漩涡混匀后,制成石油平板,用于菌株分离。

1.3 分离和纯化方法

将少量土壤样品加入 100 mL 原油培养基中,30℃、100 rpm 摇床培养 48~72 h。菌液混浊后,吸取 1 mL 培养液转接至新鲜培养基。连续转接 4 次。将培养液系列稀释,用涂抹法将 0.1 mL 稀释菌液涂布于石油平板,培养 48~72 h;待平板长出菌落后,选择不同形态的菌落,重新转接至石油液体培养基中,摇床培养 48~72 h;培养液变混后,用酵母粉蛋白胨平板划线分离出单菌落。用石油平板和石油液培交替培养纯化数次,最后将分离菌株保存于酵母粉蛋白胨斜面。

1.4 生理生化特性

本研究使用 GNI(Gram-Negative Identification)革兰氏阴性细菌鉴定卡,利用 BioMerieux Vitek 自动化鉴定系统获得 31 个生理生化性状指标。

1.5 16S rDNA 的 PCR 和测序

从酵母粉蛋白胨平板中直接挑取一环菌体,加入至 100 μL 重蒸水中,漩涡混匀后,沸水浴 2 分钟,12 000 rpm 离心 5 min,上清液直接用于 PCR 反应。

用于 16S rDNA 的 PCR 反应的引物为一对通用引物(<http://silk.uic.ac.be/primer/database.html>)。正向引物 BSF8/20 5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3';反向引物 BSR1541/20 5'-AAGGA GGTGA TC-CAG CCGCA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系(50 μL)(Devereux & Willis, 1995)为:10 × PCR 缓冲液 5 μL, MgCl₂ (25 mM) 4 μL, dNTP (5 mM) 2 μL, 引物 BSF8/20 (100 μg/mL) 和引物 BSR1541/20 (100 μg/mL) 各

表 1 用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的细菌名称、菌株编号和 EMBL 序列登录号

Table 1 Names, strain number, and EMBL accession number of sequences of strains and their related bacteria used in the construction of unrooted phylogenetic tree

细菌名称 Names of bacteria	菌株编号 Strain number	登录号 Accession number
<i>Acinetobacter</i> sp.	EVA10	AJ410286
<i>Acinetobacter</i> sp.	EVA11	AJ410287
<i>Acinetobacter</i> sp.	EVA12	AJ410288
<i>Acinetobacter</i> sp.	EVA13	AJ410289
<i>Acinetobacter</i> sp.	EVA14	AJ410290
<i>Pseudomonas</i> sp.	EVA5	AJ410281
<i>Pseudomonas</i> sp.	EVA6	AJ410282
<i>Pseudomonas</i> sp.	EVA7	AJ410283
<i>Pseudomonas</i> sp.	EVA8	AJ410284
<i>Pseudomonas</i> sp.	EVA9	AJ410285
<i>Acinetobacter anitratus</i>	ATCC 15308	U10874
<i>Acinetobacter baumannii</i>	DSM 30007T	X81660
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055T	Z93434
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DSM 30006	X81661
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DSM 30009	X81668
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	ATCC 17906T	Z93437
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	ATCC 17909T	Z93440
<i>Acinetobacter junii</i>	ATCC 17908T	Z93438
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATCC 17925	Z93441
<i>Acinetobacter radiorestrictus</i>	M 17694T	Z93445
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 1242T	Z76651
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	IAM 12411	D84006
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAM 12022	D84013
<i>Pseudomonas halophila</i>	DSM 3050T	AB021383
<i>Pseudomonas mendocina</i>	ATCC 25413	AJ006109
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	IAM1439	D84021
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	IAM 1508	D84018
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 17522	D85995
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	ATCC 14235T	AB021373
<i>Pseudomonas syringae</i>		AF105390
<i>Marinobacter aquaeolei</i>		AJ000726
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	ATCC 27132T	AB021372

注: EVA5-EVA14 菌株及其 16S rDNA 序列为本项研究的结果,其他菌株的序列从 GenBank 中获取

16S rDNA sequences of strain EVA5-EVA14 were results of this project and other sequences were retrieved from GenBank

1 μL 模板 DNA 1 μL ,Taq 酶 (10 000 U/mL) 0.5 μL ,重蒸水 35.5 μL 。 PCR 程序如下(Devereux & Willis ,1995 ;Damiani *et al.* ,1996) : 1) 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min ; 2) 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min ,56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min ,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 3) 第 2 步循环 29 次 4) 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 5) 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 6) 室温放置。 PCR 产物用 QIAGene 公司的 DNA 纯化试剂盒纯化。测序由上海申友生物技术有限责任公司完成 ,测序用引物为引物 BSF8/20。

1.6 系统发育分析

获得 10 个石油降解菌株部分长度的 16S rDNA 序列(约 650 bp) ,菌株的 EMBL 序列登录号见表 1。将所测序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)(Altschul *et al.* ,1997) ,并利用序列比对软件 ClustalX1.8 (Thompson *et al.* ,1997) ,系统发育分析软件 PHYLIP3.6(Felsenstein & Churchill) ,进化树生成软件 Treeview 构建进化树。用于系统发育树构建的相关菌株见表 1。

2 结果

2.1 分离菌株的特性

本研究得到的 10 个石油降解菌株均为革兰氏染色反应阴性的杆菌或短杆菌。菌株编号、分离源、培养基和分离用碳源见表 2。

菌株 EVA5 ,EVA6 ,EVA7 ,EVA8 和 EVA9 均为长杆菌(图 1) ,菌落边缘不规则 ,呈泡状突起 ,中央区强烈皱缩 ,菌苔易扩散。在酵母蛋白胨培养基和烃类培养基中生长时均产生水溶性色素 ,色素颜色深浅不一 ,EVA5 和 EVA6 为浅蓝色 ,而 EVA9 为深蓝色。菌株 EVA10 , EVA11 ,EVA12 ,EVA13 和 EVA14 为短杆菌 ,多数菌体接近于球状(图 2) ,菌落形态呈煎鸡蛋形 ,生长过程中不产色素。其中 EVA13 菌落较小 ,易扩散。

烃类利用实验结果表明 ,分离菌株仅能利用 C₁₂ 烷、C₁₄ 烷、C₁₆ 烷等中等长度的烷烃、柴油和原油为碳源生长 ,不能利用单环芳烃和多环芳烃。另外 ,EVA10、EVA11、EVA12 和 EVA13 能利用苯甲酸钠 ,但是仅 EVA13 能利用水杨酸。

本实验利用 BioMerieux Vitek 微生物鉴定系统得出 31 个生理生化性状如表 3 所示。EVA5 , EVA6 ,EVA7 ,EVA8 和 EVA9 的生理生化性状大致相同 ,但 EVA9 的甘露醇氧化为阴性 ,而其他菌株均为阳性。EVA10 ,EVA11 ,EVA12 ,EVA13 和 EVA14

的性状大致相同。但 EVA10、EVA13 和 EVA14 脲酶阳性 ,而 EVA11 和 EVA12 均为阴性。EVA13 和 EVA14 柠檬酸利用阳性 ,而 EVA10 ,EVA11 和 EVA12 均为阴性。EVA14 有多个性状不同于 EVA10 ,EVA11 ,EVA12 和 EVA13。



图 1 以十四烷为碳源培养的 EVA5 菌体的相差照片
Fig.1 Phase-contrast photomicrographs of EVA5 cells grown on *n*-tetradecane (1200 \times)



图 2 以十四烷为碳源培养的 EVA13 菌体的相差照片
Fig.2 Phase-contrast photomicrographs of EVA13 cells grown on *n*-tetradecane (1200 \times)

2.2 16S rDNA 的序列分析

从系统进化树可看出(图 3) ,10 个石油降解菌株分别与 *Pseudomonas* spp. 和 *Acinetobacter* spp. 归于同一簇群 ,二者与 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 27132T , *Marinobacter aquaeolei* (Huu *et al.* ,1999) 为代表的嗜盐的烃类降解菌差异较大。菌株 EVA5 ,EVA6 ,EVA7 ,EVA8 ,EVA9 均最接近于 *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242T。该菌株的在系统发育地位上属于细菌域(Bacteria) ,变形细菌门(Proteobacteria) , γ 亚门(Gamma subdivision) ,假单胞菌科(Pseudomonaceae) ,假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

表 2 分离菌株的分离源和分离用的培养基和碳源

Table 2 Source of isolates and media and carbon sources used for isolation

菌株编号 Strain number	分离源 Source of isolates	分离用培养基 Media for isolation	富集和分离用的碳源 Carbon sources for enrichment and isolation
EVA5	油田土壤 Oil-contaminated soils from oil field	F2	原油 Crude oil
EVA6	油田土壤 Oil-contaminated soils from oil field	F1	原油 Crude oil
EVA7	油田土壤 Oil-contaminated soils from oil field	F4	原油 Crude oil
EVA8	桑园土壤 Uncontaminated soils from mulberry field	F5	原油 Crude oil
EVA9	桑园土壤 Uncontaminated soils from mulberry field	F6	原油 Crude oil
EVA10	桑园土壤 Uncontaminated soils from mulberry field	F1	原油 Crude oil
EVA11	油田土壤 Oil-contaminated soils from oil field	F6	原油 Crude oil
EVA12	汽配厂油污土壤 Oil-contaminated soils from automobile repair factory	F4	柴油 Diesel
EVA13	汽配厂油污土壤 Oil-contaminated soils from automobile repair factory	F4	柴油 Diesel
EVA14	实验室环境中的未知分离源 Unknown source from lab environment	F7	十四烷 tetradecane

表 3 BioMerieux Vitek 系统得出的分离菌株的生理生化特性

Table 3 Physiological characteristics of isolates by BioMerieux Vitek Identification System

生理生化性状 Physiological characteristics	#EVA5-8	EVA9	EVA10	EVA11	EVA12	EVA13	EVA14
存在 2,4,6-三氯-2-羟二苯醚时的葡萄糖发酵 Glucose fermentation in the presence of the 2,4,6-trichloro-2-hydroxy-diphenylether	+	+	-	-	-	-	-
葡萄糖氧化 Glucose oxidation	+	+	+	+	+	+	+
生长对照 Growth control	+	+	+	+	+	+	+
乙酰胺利用 Utilization of Acetamide	+	+	-	-	-	-	-
七叶甙水解 Hydrolysis of Esculin	-	-	-	-	-	-	-
β -羟基吲哚-D-葡萄糖苷分解 Degradation of Indoxyl- β -D-Glucoside	-	-	-	-	-	-	-
脲酶 Urease	-	-	+	-	-	+	+
柠檬酸利用 Utilization of Citrate	+	+	-	-	-	+	+
丙二酸利用 Utilization of Malonate	+	+	+	+	+	+	+
色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-	-	-
耐多粘菌素 B (0.03 g/L) Growth in the presence of Polymyxin B	-	-	-	-	-	-	-
1% 乳糖氧化 1% Lactose oxidation	-	-	+	+	+	+	-
麦芽糖氧化 Maltose oxidation	-	-	-	-	-	-	-
甘露醇氧化 Mannitol oxidation	+	-	-	-	-	-	-
木糖氧化 Xylose oxidation	+	+	-	-	-	-	+
棉子糖利用 Utilization of Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
山梨糖利用 Utilization of Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖利用 Utilization of Sucrose	-	-	-	-	-	-	-
肌醇利用 Utilization of Inositol	-	-	-	-	-	-	-
核糖醇利用 Utilization of Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
存在 ρ -香豆酸(对-羟苯丙烯酸)时的葡萄糖发酵 Glucose fermentation in the presence of ρ -coumaric	-	-	-	-	-	-	-
产生硫化氢 Production of Hydrogen sulfide	-	-	-	-	-	-	-
α -硝基酚- β -D-吡喃型半乳糖苷水解 Hydrolysis of ONPG	-	-	-	-	-	-	-
鼠李糖利用 Utilization of Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖利用 Utilization of L-Arabinose	-	-	+	+	+	+	+
葡萄糖利用 Utilization of Glucose	-	-	-	-	-	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dehydrolase	+	+	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-
* 细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase	+	+	-	-	-	-	-
10% 乳糖氧化 10% Lactose oxidation	-	-	+	+	+	+	-

表中“+”号表示该性状反应结果为阳性；“-”号表示该性状反应结果为阴性；*号为系统鉴定前的外加实验。#表示 EVA5, EVA6, EVA7 和 EVA8 性状完全相同

“+” indicate positive reaction; “-” indicate negative reaction; * indicate strain EVA5, EVA6, EVA7 and EVA8 show same characteristics

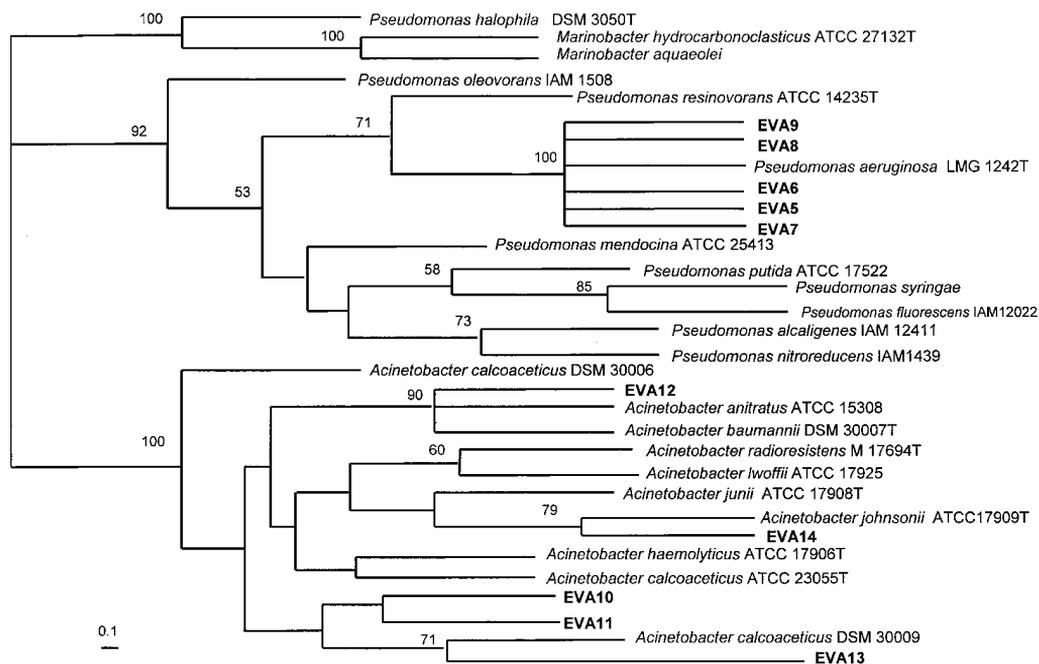


图3 基于10个石油降解菌株和亲缘关系相近的菌株(分别属于 *Pseudomonas*、*Acinetobacter* 和 *Marinobacter* 属)的16S rDNA序列的无根的系统发育树,黑线表示进化距离

Fig. 3 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of ten isolates and sequences of related species belong to *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Marinobacter*. Scale bar indicates evolutionary distance

菌株 EVA10、EVA11 和 EVA13 与 *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30009 归于一组。EVA12 和 *Acinetobacter anitratus* ATCC 15308 归于一组。菌株 EVA14 则接近于 *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909T。在系统发育地位上属于:细菌域(Bacteria),变形细菌门(Proteobacteria), γ 亚门(Gamma subdivision),莫拉氏菌科(Moraxellaceae),不动杆菌属(*Acinetobacter*)。

利用 Blast 的序列比对结果表明,菌株 EVA5, EVA6, EVA7, EVA8 和 EVA9 序列与多个与有机污染物降解有关的 *Pseudomonas aeruginosa* 菌株序列的相似性均为 99%,其中一个能利用氯乙烯的 *Pseudomonas aeruginosa* 菌株(Verce *et al.*, 2000),一个能降解天然橡胶和顺-1,4-聚异戊二烯的 *Pseudomonas aeruginosa* AL98 菌株(Linos *et al.*, 2000)等。菌株 EVA10, EVA11, EVA12 和 EVA13 则最接近于一株苯酚降解菌 *Acinetobacter calcoaceticus*(徐玉泉等 2000),相似性分别为 97%, 99%, 100% 和 96%。

3 结论

常见的石油降解微生物属包括 *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*,

Bacillus, *Candida*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Fusarium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Mucor*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodoterula*, *Sporobolomyces* 等(Balba *et al.*, 1998)。但是本研究用 7 种不同培养基,从三种不同土壤(桑园土壤,油田土壤和油污土壤),以原油和柴油为碳源富集,分离和纯化得到的 10 个石油降解菌株仅分别属于 *Acinetobacter* 和 *Pseudomonas*。这两个属亲缘关系较为接近,均为 γ -Proteobacteria。尽管石油中含有烷烃、芳香烃、树脂、沥青,但是利用石油培养基分离的菌株仅为烷烃降解菌,这可能是由于烷烃为石油的主要组分,而芳香烃、树脂、沥青等均为少量基质,因此分离过程中优先富集得到烷烃降解菌。原先希望得到的芳烃降解菌尚未分离得到。因此分离菌株可能只是最适于实验室的种,并非自然条件下主要的降解微生物,无法代表整个石油降解微生物区系。不可培养微生物的研究和从分子水平重建石油降解微生物区系是一个重要的研究方向,已有越来越多的研究者用 DGGE 等方法研究原油降解过程中的微生物种群的变化(MacNaughton *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000)。

分离得到的 *Acinetobacter* 属菌株在生理生化水

平和 16S rDNA 序列上均显示差异,而 *Pseudomonas* 属分离菌株的 16S rDNA 序列差异较小。如 EVA5 和 EVA6 的 16S rDNA 序列相似性达 100%,但菌落形态表现出差异,前者菌落中央区强烈皱缩,后者平坦。由于 16S rDNA 序列高度保守,所以有时仅仅从 16S rDNA 序列水平分析则无法解析亲缘关系较接近的菌株之间的差异。因此,利用其他分子手段阐明菌株之间的差异是非常必要的,如 Guasp 等(2000)利用 16S-23S rDNA 间隔序列(ITS)分析 *Pseudomonas stutzeri* 和其他 *Pseudomonas* spp. 的差异。

Acinetobacter 属的分离菌株在基质利用上表现出多样性。菌株 EVA13 不能利用萘、菲和芴等芳烃,但能利用苯甲酸钠和水杨酸,二者均为芳烃降解的中间代谢产物,由此可推测该菌株可能参与自然条件下芳烃降解过程和原油等烷烃芳烃混合物中依赖于烷烃的芳烃共代谢降解过程(Kanally *et al.*, 1997)。研究 EVA13 与芳烃降解菌株的混培物对烷烃和芳烃混合物的降解对于阐明某一生境中有机物降解代谢多样性具有非常重要的意义。

参考文献

Alley J F, L R Brown, 2000. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 439 ~ 442

Altschul S F, T L Madden, A A Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller and D J Lipman, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389 ~ 3402

Balba M T, N Al-Awadhi and R Al-Daher, 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, **32**: 155 ~ 164

Chang Y J, J R Stephen, A P Richter, A D Venosa, J Bruggemann, S J Macnaughton, G A Kowalchuk, J R Haines, E Kline and D C White, 2000. Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *Journal of Microbiological Methods*, **40**: 19 ~ 31

Damiani G, P Amedeo, C Bandi, R Fani, D Bellizzi and V Sgaramea, 1996. Microbial genome methods. In: *Bacteria Identification by PCR-Based Techniques* (Chapter 10), CRC Press. Inc, 167 ~ 177

Devereux R and S G Willis, 1995. Amplification of ribosomal RNA sequences. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Netherland, 3.3.1: 1 ~ 11

Felsenstein J and G A Churchill, 1996. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **13**: 93 ~ 104

Foght J M, P M Fedorak and D W S Westlake, 1990. Mineralization of [¹⁴C] hexadecane and [¹⁴C] phenanthrene in

crude oil: specificity among bacterial isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, **36**: 169 ~ 175

Guasp C, E R B Moore, J Lalucat and A Bennasar, 2000. Utility of internally transcribed 16S-23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 1629 ~ 1639

Huu N B, E B M Denner, T C H Dang, G Wanner and H Stan-Lotter, 1999. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**: 367 ~ 375

Kanally R, R Bartha, S Fogel and M Findlay, 1997. Biodegradation of [¹⁴C] benzo[a]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4511 ~ 4515

Kästner M, M Breuer-Jammali and B Mahro, 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**: 267 ~ 273

Klug M L, Markovetz A J, 1967. Thermophilic bacterium isolated on *n*-Tetradecane. *Nature*, **215**: 1082 ~ 1083

Korda A, P Santas, A Tenente and R Santas, 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sample and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **48**: 677 ~ 686

Leahy J G and R R Colwell, 1990. Microbia degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology Review*, **54**: 305 ~ 315

Linos A, R Reichelt, U Keller and A Steinbuchel, 2000. A gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic *cis*-1, 4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters*, **182** (1): 155 ~ 161

MacNaughton S J, J R Stephen, A D Venosa, G A Davis, Y-J Chang and D C White, 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 3566 ~ 3574

Maidak B L, J R Cole, T G Lilburn, C T Parker, Jr P R Saxman, R J Farris, G M Garrity, G J Olsen, T M Schmidt and J M Tiedje, 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, **29**(1): 173 ~ 174

Thompson J D, T J Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin and D G Higgins, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4876 ~ 4882

Verce M F, R L Ulrich and D L Freedman, 2000. Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 3535 ~ 3542

Zarilla K A and J J Perry, 1984. *Thermoleophilum album* gen. nov. and sp. nov., a bacterium obligate for thermophily and *n*-alkane substrates. *Archive of Microbiology*, **137**: 286 ~ 29