第19卷 第6期 海 洋 学 报 Vol. 19, No. 6
1997-11 ACTA OCEANOLOGICA SINICA November, 1997

海洋丝状真菌降解原油研究*

Ⅰ.石油烃降解的实验室模拟

林凤翱 于占国 李 洪 贺 杰 张 映 冯志权

（国家海洋环境监测中心，大连）

摘 要 本文报道了分离自近岸海洋环境中的4株降解石油烃丝状真菌的实验室模拟研究. 结果表明，受试海洋丝状真菌与海洋细菌相比，其降解速率高；适应油种、油量和油组分的范围广；并且在降解石油烃时不需要增加溶解氧和氮、磷营养盐等附加条件. 这些证明，应用海洋丝状真菌清除海上油污更具开发前景.

关键词 丝状真菌 石油烃 降解

前 言

在海洋各种污染物中，石油污染是最普遍且较严重的一种. 随着全球对石油作为能源的需求增大和各种石油化工产品的深入开发，海洋油污染将仍是一个令人关注的世界性环境问题. 国际上从本世纪40年代就开始了微生物降解海上油污的调查研究[1]，较全面的研究是在几次较大型溢油事件后的60年代末和70年代初[2~5]. 国内则开始于70年代末和80年代初[6~8].

然而现有的研究结果表明[9~11]，分离自海洋环境中的降解石油烃细菌和酵母大都在小油滴中生长，而那里的溶解氧和氮、磷营养盐含量往往限制它们生长繁殖和降解石油烃能力. 故要应用它们清除海上油污，需额外给它们以能利用的方式提供氧和营养盐. 这在现实的海洋环境中是较难操作且有争议的. 微生物降解海面溢油和清除海滩油污的现场应用，多年来一直作为一个难题困绕着人们，同时它又是一个亟待研究予以突破的现实环境问题.

根据这一现实环境问题的需要，我们开展了海洋丝状真菌降解石油烃实验研究. 其目的是力求分离和筛选出不受环境因素干挠或干挠较小的高效降解石油烃菌株，以便探讨它们现场去除海上油污的应用价值. 此外，开展丝状真菌降解石油烃研究主要还有以下两方面原因：(1) 海洋细菌对石油烃降解的较深入研究国内外已有很多报道[9~10,12~15]，而海洋丝状真菌的研究，尤其对它们清除油污的应用前景探讨，国内尚属空白，国际上这方面的工作也较少；

本文于1996-02-28收到，修改稿于1997-01-08收到.

* 本文为国家“八五”科技攻关专题部分研究内容（编号：85-903-08-05-06）.

(2) 根据现有的较少资料分析，海洋丝状真菌与细菌不同，它们以簇或丛的形式在油滴或油膜表面生长繁殖，故不应该像细菌在小油滴中生长繁殖那样，受溶解氧和营养盐限制，其相对应用于海上油污清除的可能性就大. 现将实验室模拟研究结果报告如下.

1 材料与方法

1.1 样品采集和菌株的分离纯化

在大连选择了两个相对油污海区(石油七厂消防船坞、凌水桥修船厂入海口)和一个相对清洁海区(棒棰岛海滨)，分夏、秋两季，按《海洋监测规范》[16]要求采取了表层海水和表层砂砾样品. 采集后的样品，进行耐油污丝状真菌(以石油烃为唯一碳源生长繁殖并且在油琼脂平板培养基上出现菌落数较多的丝状真菌) 菌株的分离、筛选和纯化(图1).

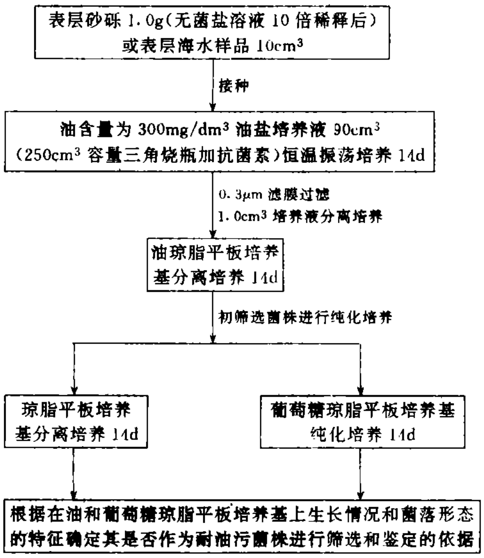

图1 耐油污丝状真菌的分离纯化方法

1.2 培养基成分

1.2.1 油盐培养液

KNO_3(2.0g), K_2HPO_4(1.0g), $MgSO_4$ (1.0g), NaCl (30.0g), CaCl (痕量), $FePO_4$ (痕量), 原油 (300、200或100mg/dm^3), 蒸馏水 (1 000cm^3), 链霉素、土霉素、复方新诺明 (各50mg/dm^3).

1.2.2 无氮、磷油盐培养液

上述油盐培养液中去除 KNO_3、K_2HPO_4和 $FePO_4$3种营养盐即可.

1.2.3 油琼脂培养基

NH_4NO_3 (1.0g), K_2HPO_4 (1.0g), $MgSO_4$ (0.1g), CaCl (痕量), $FePO_4$ (痕量), 纯琼脂 (20.0g), 陈海水 (1 000cm^3), 原油1) (1.0%).

1.2.4 葡萄糖琼脂培养基

葡萄糖 (2.0g), 蛋白胨 (5.0g), 酵母浸出液 (1.0g), 纯琼脂 (20.0g), 陈海水 (1 000 cm^3).

1.3 石油烃测试

1.3.1 培养液中石油烃的萃取

经菌株降解后的残留石油烃培养液转移至250cm^3分液漏斗中，取10.0cm^3正已烷分两次

1) 原油经高速组织捣碎机处理3min 后，再与其他成分混合，避免原油在培养基中漂浮分布不均匀.

淋洗培养瓶，然后将正已烷淋洗液倒入分液漏斗中，振摇2min，静止分层，将水相放入原培养瓶内，用滤纸吸干漏斗柄下端，将正已烷萃取液收集于10cm³比色管中，摇匀待上机测定(如有乳化现象出现，在离心机上离心).

1.3.2 无菌对照液中石油烃的萃取

模拟实验各油种和油浓度相同时设置了不接种菌株的无菌油对照实验液，对照实验液中的石油烃按上述方法同时萃取．并且以它的残留石油烃作为菌株降解的起点，以避免将石油烃的蒸发、光氧化等理化作用误作为生物降解作用．本文所述“降解率”系与无菌油对照实验液相比的菌株降解率.

1.3.3 仪器设备及分析条件

日立163型气相色谱仪带FID氢火焰离子化检测器．使用0.25mm×34mOV-101弹性石英玻璃毛细管柱．鉴定器温度300℃，柱温280℃，初始温度80℃，升温速率为7.5℃/min．氢气11.8×10⁴Pa，空气16.6×10⁴Pa，氮气柱前压17.6×10⁴Pa，尾吹2.9×10⁴Pa，分流比1∶1.

2 结果与讨论

2.1 不同油浓度、油种类条件下的降解

国内一些实验研究表明，油浓度（或称油量）对石油烃降解细菌的降解能力有明显影响．刘期松等人报道[8]，当用轻柴油和混合细菌菌株进行降解实验时，油浓度由0.5%增至1.0%，其降解率由36.44%下降为30.58%．形成生物量亦下降．于占国等[17]报道，当渤海原油油浓度在227mg/dm³以下时，随油浓度增加黄杆菌（*Flavobacterium* sp.）的生长繁殖速度、单细胞分解石油烃速率和石油烃降解值均随之增高；但当油浓度超过227mg/dm³时，黄杆菌的生长繁殖速度随油浓度的增加而急剧下降，石油烃降解值也降低．为了检验耐油污丝状真菌对油浓度的响应，我们用辽河原油对其进行了不同油浓度的降解模拟实验，并选取同时分离筛选出的耐油污细菌单一菌株——鳗弧菌（*Vibrio anguillarum*）(B01）和混合菌株（B-混合）作为细菌对照实验，结果如图2、图3、图4所示.

图2、3、4结果表明，单一耐油污细菌——鳗弧菌（B01）菌株对石油烃浓度较敏感，在辽河原油浓度达300mg/dm³时，该菌株对石油烃降解甚微，在200mg/dm³时对正构烷烃各碳组分的降解也明显低于100mg/dm³．由3株耐油污细菌（B07-短小杆菌 *Crutobacterium* sp.，B08-短杆菌 *Brevibaterium* sp.，B09-葡萄球菌 *Staphyloccus* sp.）组成的B-混合菌株对石油烃浓度的响应也比较明显，随辽河原油浓度的增加其石油烃降解率有逐渐下降的趋势．然而，与耐油污细菌的实验结果不同，耐油污丝状真菌对辽河原油的油浓度适应范围较广．由3株丝状真菌（Fs-1，曲霉 *Aspergillius* sp.；Fs-2，青霉 *Penicillium* sp.；Fs-3，镰刀菌 *Fusarium* sp.）组成的F-混合菌株，在辽河原油浓度100～300mg/dm³范围内均能对正构烷烃产生明显降解．并且与细菌比较，它们明显有降解较大碳组分的趋势．上述结果表明，海洋耐油污丝状真菌具有比细菌耐受高石油烃浓度的优良性状（受试丝状真菌菌株来源，鉴定和检出率如表1所示).

图5给出了受试丝状真菌Fs-1、Fs-2、Fs-3各单一菌株和这3株菌混合菌株（F-h），对辽

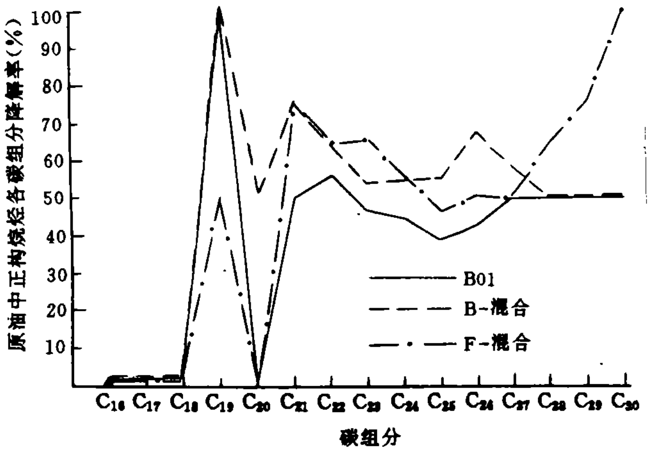

图2　辽河原油（100mg/dm³，接种量：1.0cm³）各碳组分降解

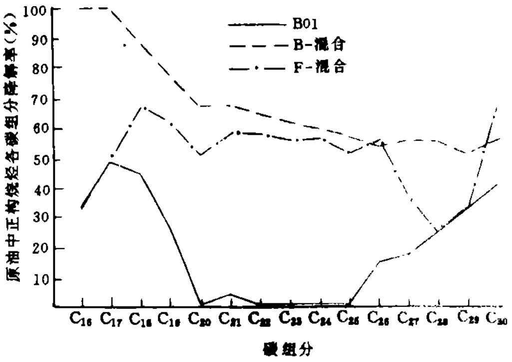

图3　辽河原油（200mg/dm³）各碳组分降解

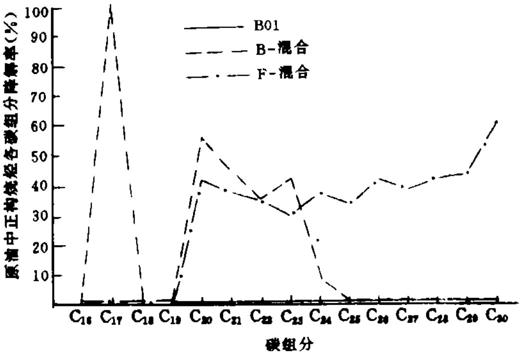

图4　辽河原油（300mg/dm³）各碳组分降解

河原油、大庆原油、大港原油和胜利原油正构烷烃的降解结果．由图中可见，受试丝状真菌除 Fs-3菌株外，对4种原油正构烷烃均有明显降解；而细菌对大港、大庆两种原油降解甚微．受试菌株对4种原油正构烷烃降解率的结果（见表2）亦证明了这一点．即丝状真菌除 Fs-3菌株平均降解率低于细菌外，其余3株丝状真菌的平均降解率（49%～58%）为细菌（25.8%～32.8%）的1.57～2.25倍．表2中十六烷至二十六烷的降解结果还表明，细菌对短碳链的十六烷降解率较高，而随着碳链加长其降解率随之降低，这是细菌单一菌株和混合菌株的共同趋势．相反，丝状真菌降解短碳链的十六烷能力相对较弱，但对二十烷、二十四烷、二十六烷的降解明显高于细菌（Fs-3菌株除外）．从中可见，丝状真菌 Fs-1、Fs-2和 Fs-4菌株比细菌更具有降解长碳链组分的能力．

表3列出了静止培养条件下（并不额外添加氮、磷营养盐），3株丝状真菌对7种芳香烃化合物组成的混合芳烃的降解实验结果．结果表明，3株丝状真菌对萘和芘均不产生降解；但 Fs-2和 Fs-4菌株能不同程度地降解其余5种芳烃化合物；Fs-1菌株则能降解芴、萤蒽和苯并（a）芘3种芳烃．尤其需要指出，丝状真菌对苯并（a）芘的高比率降解，体现了它们能对石油烃中有毒组分进行大比率降解的优良性状．

表1 耐油污丝状真菌菌株及来源*

菌株号	菌 名	检出率**（%）	来 源
Fs 1	曲霉 *Aspergillius* sp.	40	分离自大连石油七场船坞夏、秋两季表层水样的油盐培养液（300mg/dm³辽河原油），接种水样10m³.
Fs 2	青霉 *Penicillium* sp.	14	同上
Fs 3	镰刀 *Fusarium* sp.	6	分离自棒棰岛海滨浴场夏季表层水样，其他同上.
Fs 4	青霉 *Penicillium* sp.	40	分离自大连凌水桥修船厂水道入海口海滨夏季的表层水和表层砂砾样的油盐培养液（300mg/dm³辽河原油），接种水样10m³，砂砾样1.0g

* 采样水温：20～26℃；培养时间和温度：14d，23±1℃；培养方式：摇瓶机（120r·min⁻¹）振荡.

** 共分离鉴定菌株100株.

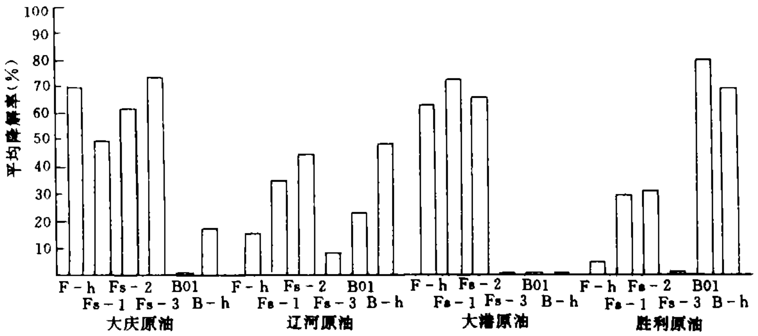

图5 原油中正构烷烃的微生物降解（F-h：Fs-1、Fs-2、Fs-3混合，B-h：B-07、B-08、B-09混合）

表2 耐油污菌株对烷烃的降解率（%）*

菌株编号	4种原油正构烷烃平均降解（200mg/dm³）	烃类			
		十六烷（24.5μg）	二十烷（61.8μg）	二十四烷（21.2μg）	二十六烷（23.0μg）
B01	25.8	63.4	—	—	10.5
B 07 08 09	32.8	73.2	10.5	10.5	15.8
Fs-1	49.0	41.5	57.9	47.6	31.6
Fs-2	50.5	36.6	63.2	52.4	63.2
Fs-3	20.5	22.0	15.8	28.6	15.8
Fs 4	58.0	56.1	68.6	71.4	73.7
Fs 1 2 3 4	51.6	24.4	57.9	71.4	63.2
平均	41.2	45.3	39.1	40.3	39.1

* 恒温（20±1℃）振荡（120r·min⁻¹）培养336h（14d），添加氮、磷营养盐.

表3　耐油污丝状真菌对芳烃的降解*（%）

菌　株	芳烃						
	萘 (22.46μg)	芴 (20.23μg)	萤蒽 (47.19μg)	芘 (20.18μg)	䓛 (20.79μg)	苯并（a）蒽 (20.75μg)	苯并（a）芘 (20.88μg)
Fs 1	—	60	57.1	—	—	—	33.5
Fs 2	—	60	61.9	—	12.9	14.6	100
Fs-4	—	20	28.6	—	12.9	12.2	67

* 各种芳烃添加量为100cm³培养液中总量，培养温度：18℃±1℃；培养时间：168h（7d），静止，不添加营养盐.

2.2　降解石油烃速率

衡量菌株降解能力，不仅要分析其对油种、油浓度和油组分的适应范围，还需要对其另一个重要指标-降解石油烃速率进行检验．海洋微生物降解石油烃速率，系指单位时间内（h）、单一微生物细胞降解石油烃的量（mg）．也有人用单位海面（m^2）、单位时间（a）内石油烃减少量（g）来估算天然海洋微生物种群对石油烃的降解速率.

美国海洋微生物学家ZoBell[5]1964年曾最先用原油和润滑油（1.0g/100cm³）进行了海洋细菌降解石油烃速率研究．结果表明，在添加氮、磷营养盐条件下降解速率为：4.00×10^{-13}～3.18×10^{-11}mg/（cell·h）．日本学者村上昭彦（1976）等人用黄杆菌和柄细菌降解混合烷烃（十三烷—十六烷）的实验结果表明，细菌最大降解速率为：3.3×10^{-12}～2.0×10^{-11}mg/（cell·h）；村上昭彦（1985）等人用假单胞菌降解5种原油获得了最大降解速率［6.00×10^{-12}～1.56×10^{-10}mg/（cell·h）］．国内于占国等人[17]也曾报道，黄杆菌降解渤海原油的速率为：3.07×10^{-13}～1.62×10^{-12}mg/（cell·h）.

表4列出了受试菌株降解4种原油速率的结果．从中可见，单一细菌（鳗弧菌）菌株降解速率为：5.47×10^{-12}mg/（cell·h）；3株细菌混合菌株降解速率为：3.19～4.24×10^{-11}mg/（cell·h）．这些受试细菌降解石油烃速率在上述国内外研究结果的范围内．表4的实验结果还表明，受试的4株丝状真菌普遍具有比细菌大得多的降解速率．其中，Fs-3降解速率（2.00×10^{-9}）最小，但仍比最大降解速率的细菌[19]高约10倍；Fs-1和Fs-2的降解速率分别为1.1～3.0×10^{-8}mg/（cell·h）和2.43×10^{-9}～1.12×10^{-8}mg/（cell·h），这比最大降解速率的细菌高近百倍，比同时受试的细菌高近千倍．Fs-4菌株是受试丝状真菌中降解速率最大的菌株，其降解速率［3.30×10^{-8}～1.70×10^{-7}mg/（cell·h）］，几乎是同时受试细菌的近万倍.

上述结果说明，受试丝状真菌具有比细菌高十至上万倍的降解石油烃速率．据此可以认为有希望从海洋丝状真菌中筛选出具有较高应用价值的高效降解石油烃菌株．国内这方面的研究尚属空白，相信通过进一步深入探讨会使海上油污生物治理有新的进展.

2.3　营养盐、氧、温度和接种菌量的影响

大量的国内外研究结果表明[17、7、18、19、11、20、21]，营养盐、氧、温度等是限制海洋细菌降解石油烃的重要环境因素，亦是阻碍微生物在海上油污清除中应用的主要原因．海洋丝状真菌降解石油烃时是否也受上述因素显著影响，则尚未见实验研究的报道．为此我们分别对受试丝状真菌进行了两种不同温度、振荡与静止培养、不同接种菌量和添加与不添加营养盐的比较

表4 耐油菌株降解石油烃速率*

菌 株	菌 数 (个/cm³)	降解石油烃速率 [mg/(cell·h)]	4种原油正构烷烃平均降解率 (%)
鳗弧菌 (B01)	4.09×10^{9}	5.47×10^{-12}	25.8
3株混合细菌 (B07、08、09)	$1.0\times10^{8}\sim4.0\times10^{8}$	$3.19\times10^{-11}\sim4.24\times10^{-11}$	32.8
Fs-1	5.0×10^{5}	$1.10\times10^{-8}\sim3.00\times10^{-8}$	49.0
Fs-2	$1.8\times10^{6}\sim2.5\times10^{6}$	$2.43\times10^{-9}\sim1.12\times10^{-8}$	50.5
Fs-3	1.0×10^{7}	2.00×10^{-9}	20.5
Fs-4	7.5×10^{5}	$3.30\times10^{-8}\sim1.70\times10^{-7}$	58.0
3株混合真菌 (Fs-1、-2、-3)	1.0×10^{6}	1.05×10^{-8}	37.50

* 实验油浓度为：200mg/dm³，培养方式为：恒温（20℃±1℃）、振荡培养（336h.14d），培养液中加N.（10^{-2}M）、P.（3.5×10^{-4}M）营养盐.

实验．并同时用细菌菌株进行了实验对照．

如图6所示，当额外添加氮（1×10^{-2}m）和磷（3.5×10^{-4}m）营养盐，培养温度为20℃±1℃时，鳗弧菌（B01）、混合细菌（B-混合）和混合丝状真菌（F-混合）均能在14d培养期内降解辽河原油（200mg/dm³）正构烷烃的70%或更多些；但当不添加上述营养盐同样振荡培养14d后，B01和B-混合对石油烃降解甚微，而混合丝状真菌则不同，仍保持70%的降解率．该结果表明，受试丝状真菌降解石油烃不需要像细菌那样额外添加氮、磷营养盐．这是否由于丝状真菌以簇或丛的形式在油滴、油膜表面生成繁殖（而细菌则是在小油滴中生长繁殖）有关．

图7为不同接种菌量（即不同初始菌密度）对解除石油烃的影响结果．实验温度为20℃±1℃，培养时间为14d．从中可见，无论是细菌还是丝状真菌，初始接种菌量对其降解石油烃均影响显著．当接种菌量10cm³/100cm³（丝状真菌初始菌密度为$1\times10\sim1\times10^{2}$cell/cm³，细菌为$1\times10^{5}$cell/cm³）时，菌株降解辽河原油正构烷烃均在70%以上；而接种量为1.0cm³/100cm³时，细菌的降解率仅15%左右，丝状真菌的降解率为34%．这说明要想保持较高的石油烃降解率，丝状真菌的初始菌密度应保证在1×10^{2}cell/cm³，细菌的初始菌密度应以1×10^{5}cell/cm³以上为佳．

图8给出了振荡培养（恒温摇瓶机振幅为10cm，转速为120r/min）与静止培养和中、高温度（18℃、25℃）条件下，石油烃降解实验的结果．图8表明，振荡培养（增加培养液中溶解氧含量）与静止培养条件下，受试丝状真菌降解石油烃比率几乎相同．这说明受试丝状真菌降解石油烃的能力不受溶解氧限制．而且由图8还可看出，无论振荡培养还是静止培养，额外添加氮（1×10^{-2}m）和磷（3.5×10^{-4}m）营养盐均没有不添加营养盐实验组的降解率高．这不仅进一步证实了图6的结果，即受试丝状真菌降解石油烃时不受氮磷营养盐限制，而且不加营养盐反比加营养盐促进了丝状真菌对石油烃的降解．这是否由于受试丝状真菌能直接利用原油中有机氮和磷所致，尚有待进一步深入探讨．

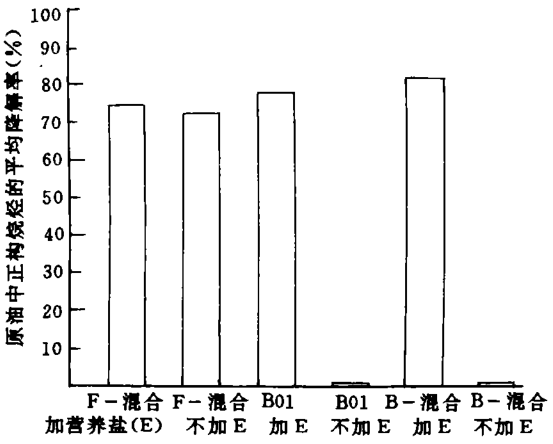

图6　添加N、P营养盐对微生物降解原油的影响
（辽河原油200mg/dm³）

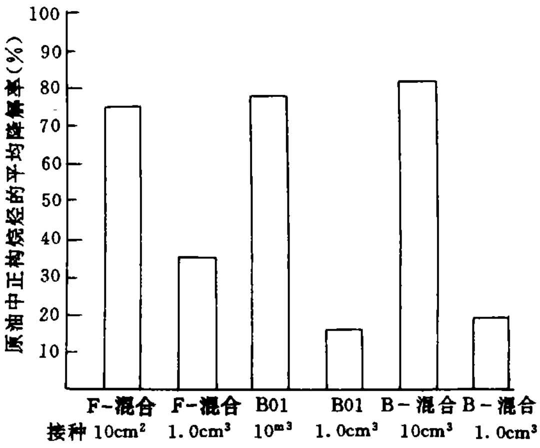

图7　接种菌液量对微生物降解原油的影响
（辽河原油200mg/dm³）

图8的结果还表明，温度对受试丝状真菌降解原油有较明显的影响．当高温（25℃）培养14d后，其降解辽河原油（200mg/dm³）正构烷烃的降解率为80%左右；而中温（18℃）培养14d后，其降解率为60%左右，两者降解率相差20%．该结果说明，在18～25℃培养条件下受试丝状真菌均能生长繁殖并降解石油烃．但在该温度范围内，温度高其生长繁殖速度快、代谢旺盛、降解率高；温度低相对生长繁殖速度减缓，降解率低．

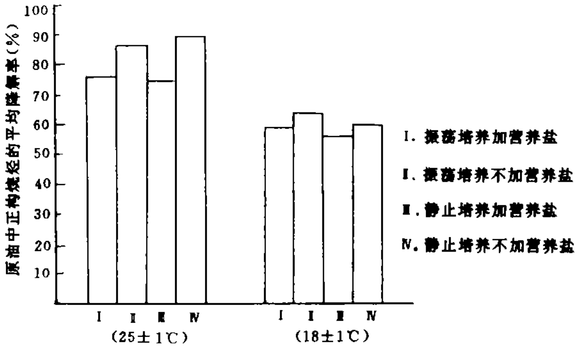

图8　振荡培养和温度对降解原油的影响（受试菌株 Fs-1）

3　结论

（1）从大连沿岸相对油污海区分离和筛选出来的海洋丝状真菌菌株 Fs-1、Fs-2、Fs-4分别为：曲霉（*Aspergillius* sp.）和青霉（*Penicillium* sp.）；从相对清洁海区分离和筛选出来的菌株 Fs-3为：镰刀菌（*Fusarium* sp.）．

（2）海洋丝状真菌菌株 Fs-1、Fs-2和 Fs-4具有应用油种多、油浓度高，又能降解较长碳链石油烃组分等优良性状．而且它们对苯并（a）芘等石油烃中有毒芳烃组分亦有较高降解率．

（3）受试海洋丝状真菌降解石油烃的速率为：2.00×10^{-9}～1.70×10^{-7}mg/（cell·h），这

比同时受试的海细菌降解速率高数百乃至数万倍.

（4）受试海洋丝状真菌菌株在不添加氮、磷营养盐并静止培养条件下，降解石油烃比值还略高于添加氮、磷营养盐振荡培养实验组，这说明氮、磷营养盐和溶解氧不是受试丝状真菌降解石油烃的限制因素. 亦表明应用它们清除海上油污的开发前景很大.

（5）培养温度和初始接种菌量对受试丝状真菌降解石油烃的影响明显. 中温（18℃）培养比高温（25℃）培养时，降解率低四分之一；初始接种菌量为50～100cell/cm^{3}时，石油烃降解率为75%～83%，这是初始接种菌量3～8cell/cm^{3}时降解率（34%）的2～2.5倍.

参考文献

1 ZoBell C E. Action of microorganism on hydrocarbons. Bacteriol. Rev., 1946, (10): 1～49

2 Altas R M, R Bartha Degradation and mineralization of petroleum in seawater. Biotechnol. Bioeng., 1972, (14): 309～317

3 Altas R M, R Bartha Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophific fertilizers. Environ. Sci. Technol., 1973, (7): 538～541

4 Atlas R M. Effects of temperature and composition on petroleum biodegradation. Appl. Microbiol., 1975, **3**(2): 396～403

5 ZoBell C E. The occurrence effects and fate oil polluting the sea. warter Res., 1975, (9): 1 075～1 078

6 丁美丽. 海洋细菌对石油烃类的降解. 海洋科学, 1978, (2): 48～52

7 王文兴等. 渤海石油降解微生物某些生态学特征的调查研究. 海洋环境科学, 1983, **2**(4): 11～24

8 刘期松等. 石油污水灌区的微生物生态及其降解石油的研究. 环境科学, 1981, **2**(3): 360～365

9 倪纯治等. 海洋油污染微生物降解的研究 III. 海洋微生物对石油烃的降解作用. 海洋学报, 1984, **6**(4): 479～504

10 Zuwaka A, D G Khirsagar Emulsitication and oil degradation by marine bacteria, Indian J. Mar. Scl., 1991, **20**(1): 78～79

11 Li Jindao, Ding Meili, Chen Dehui, Gong Xiangzhong. Experimemt of microbial degradation in marine oil slicks enhanced by a slow release fertilizer. Journal of Ocean University of Qingdao, 1990, **20**(3): 84～90

12 孙修勤等. 渤海微生物自然混合菌群降解20号重柴油正烷烃研究. 海洋与湖沼, 1988, **19**(6): 518～524

13 岳贵春. 海湾与河流中石油烃降解的模拟研究. 海洋科学, 1990, (6): 42～44

14 周宗澄等. 海洋油污染微生物降解的研究 I. 烃氧化细菌对烃化合物降解的初步探讨. 海洋学报, 1983, **5**(6): 777～782

15 Sorkhon, N A, R. H. Alhason, M Khanater, S S Radwan. Establlshment of oil-degrading bacteria associated with Cyanobacteria in oil-poluted soil. J. Appl. Bacteriol., 1995, **78**(2): 194～199

16 国家海洋局编. 海洋监测规范. 北京: 海洋出版社, 1991, 695～696

17 于占国等. 黄杆菌降解渤海原油的实验室模拟. 海洋环境科学, 1989, **8**(1): 1～6

18 Oudot J. Rates of microbial degradation of petroleum components as determined by computerized capillary gas chromatography and computerized mass spectrometry. Mar. Environ. Res., 1984, **13**(4): 277～302

19 Leahy J G. R R Colwell. Microbiol degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev., 1990, **54**(3): 305～315

20 Lizarraga Parida M L F B Inquierdo-Vicuna, I Wong-Chang. Marine bacteria on the Campeche Bank oil field. Mar. Pollut. Bull., 1991, **22**(8): 401～405

21 Walker J Q, R R Colwell. Longchain n-alkanes occurring during microbial degradation of petroleum. Canadia J. Microbia., 1976, **22**(6): 886～891