

两株真菌的分离及其在石油污染土壤修复中的作用

秦 晓¹, 唐景春², 张清敏², 高 晶¹, 李德生¹

(1.天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300384; 2.南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘 要:从石油污染的盐碱土壤中分离获得 2 株真菌,并对其生理生化性质进行初步研究。将 2 株菌扩大培养,制成混合菌剂,通过盆栽试验,以石油烃降解率、脱氢酶活性和土壤的微生物多样性等为指标,研究了不同剂量的混合菌剂对石油污染土壤修复的作用。结果表明,添加菌剂各处理的石油烃降解率、脱氢酶活性和微生物多样性明显高于对照;石油烃降解率随菌剂加入剂量的增大而提高,加入 8% 的菌剂,70 d 石油烃降解率可达 63%,是对照组的 1.44 倍。

关键词:石油降解真菌;石油污染土壤;石油烃降解率;脱氢酶活性;微生物多样性

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)10-1999-06

Isolation of Two Strains of Fungi and Their Effect on Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil

QIN Xiao¹, TANG Jing-chun², ZHANG Qing-min², GAO Jing¹, LI De-sheng¹

(1.College of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; 2.College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract:Two strains of fungi were isolated from petroleum-contaminated saline soil and their physiological characteristics were investigated. The bioremediation of petroleum-contaminated soil was studied using the mixed cultures of the isolated strains. The biodegradation efficiency, dehydrogenase activity and microbial diversity of the studied soil were monitored for different treatments in pot experiments. The results showed that compared with the control(CK), addition of mixed microbes notably improved the biodegradation efficiency and dehydrogenase activity and stimulated both the abundance and diversity of the soil microbe. The biodegradation rate increased with higher inoculation amount of microbial consortium. With addition of 8% microbial mixture, the total concentration of petroleum hydrocarbon decreased by 63% after 70 days of incubation, which was 1.44 times higher than that of CK.

Keywords:petroleum degradation fungi; petroleum-contaminated soil; degradation efficiency ; dehydrogenase activity; microbial diversity

石油勘探、开采、加工及运输等生产过程和意外事故会导致数量不等的石油和含油固体废弃物排放到周围土壤中,使土壤生态系统受到不同程度破坏^[1-3],对石油污染土壤的修复已成为环境修复的重要课题。生物修复是通过投加或刺激土壤中的生物来降解污染物,并不破坏植物生长所需的土壤环境,具有环境友好、不产生二次污染的特点^[4]。绝大多数微生物生长的 pH 值范围介于 6~8 之间,中性最为适宜,但是在

实际的土壤环境中,偏酸性或偏碱性的情况并不少见^[5],尤其油田区更为突出,因其土壤含盐量高、碱度大,影响微生物修复效果。

基于以上问题,本文直接从石油污染盐碱土中分离降解石油的真菌,制备成真菌菌剂,加入土壤生态系统后,具有适应性强、竞争力强的特点。通过实验室内盆栽,模拟修复石油污染盐碱土,以修复过程中的石油烃降解率、土壤脱氢酶的活性和土壤生态微生物多样性为指标,检验、检查了两株真菌修复石油污染的作用。对于利用真菌和真菌-植物联合修复石油污染盐碱土生态具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤:取自天津大港油田,多点取样,表层

收稿日期:2010-05-20

基金项目:环境污染过程与基准教育部重点实验室开放基金;国家高新技术研究发展计划项目(863)(2007AA061201);中国科学院知识创新工程项目(kzcx1-yw-06-03)

作者简介:秦 晓(1984—),女,山东青岛人,硕士研究生,主要研究方向为环境生物学。E-mail:jodyqin@163.com

通讯作者:李德生 E-mail:deshli@tjut.edu.cn

0~20 cm 石油污染盐碱土,自然风干,过 100 目筛,混合均匀备用。其总石油烃含量 $21\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,基本理化性质参照国家标准^[6]测定,如表 1 所示。

表 1 土壤基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil

指标	水解氮/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	有效磷/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	有效钾/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	有机质/ %	pH	含盐量/ %
测定值	0.42	0.03	49.83	2.09	8.68	2.9

主要培养基:PDA(马铃薯)培养基;马丁孟加拉红-链霉素培养基。

有机肥:诺沃肥(胰岛素生产的发酵残渣)。

土壤营养调理剂:磷酸二氢铵-钙粉(1:1)。

1.2 试验方法

1.2.1 耐盐碱石油降解真菌筛选

石油降解真菌的富集、分离、纯化:取 5 g 石油污染土样接入装有 100 mL PDA 培养基的 250 mL 三角瓶中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下,摇床培养 5 d;待培养液浑浊后,吸取 5 mL 培养液重新转接至新鲜 PDA 培养基中,与上述培养条件相同,连续转接重复富集培养 4 次。用无菌枪头取富集培养液 0.5 mL 于马丁孟加拉红-链霉素固体培养基平板上涂布, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48~56 h;用接种环挑取单菌落,划线纯化,经过显微镜检查,确定得到单一的纯菌落,将纯菌株转接于 PDA 斜面上, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存菌种。

石油降解真菌的复筛:取装有 2 mL 无菌水的试管,将试验菌接入其内,摇匀,制成菌悬液;取孟加拉红-链霉素固体培养基平板 3 个,分别吸取 1 mL 石油(用石油醚稀释, $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 超滤膜过滤除菌)放入其内,用无菌玻璃涂布棒将石油均匀涂布整个平板(平板变成黑褐色);用无菌镊子夹取小片无菌滤纸,放入上述已涂石油的平板上,然后将约 0.1 mL 菌悬液滴在小滤纸片上, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48~56 h,观察滤纸片周围颜色变化,变淡者,即为石油降解菌真菌,滤纸片周围变淡的圈越大,降解石油的效率就越高。

1.2.2 微生物生理生化测定

(1)形态特征

采用稀释平板法。将每株真菌用无菌蒸馏水稀释 10 倍后,取 0.2 mL 用无菌玻璃涂布棒均匀涂布于 PDA 平板上, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48~56 h,对菌落形态进行观察并记录。

(2)碳源利用试验^[7]

被测碳源为葡萄糖、果糖、乳糖、麦芽糖、山梨醇和可溶性淀粉。挑取供试菌种 1 环接入无菌水中,摇匀制成菌悬液;然后吸取 1 mL 菌悬液放到无菌培养皿内,将冷至 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的无碳源基础培养基约 15 mL 倒入培养皿内,摇匀并静置冷却;同法,每株菌制平板 2 个;待表面干燥后,在上述平皿底分成 7 个小区,1 个小区为对照,其余 6 个小区标注试验用碳源,将米粒大小碳源按标记加到带菌平板上,先正放 4 h,然后 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下倒置培养 48 h,观察结果。

(3)氮源利用试验^[7]

被测氮源为硝酸钾、硫酸铵、尿素。培养基为无氮源基础培养基,方法同碳源利用试验。

(4)过氧化氢酶试验^[7]

斜面挑取 1 环待试菌置于洁净试管内,滴加 3% 过氧化氢溶液 2 mL,于 0.5 min 内观察,产生气泡为阳性。

(5)脱氢酶试验^[7]

挑取斜面菌种 1 环待置于洁净离心管内,加入 $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TTC(氯化三苯基四氮唑)溶液 3 mL,密封离心管盖,置于暗处 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h;同时设置对照,不接菌株。以 $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TTC 溶液为参比,485 nm 比较空白和样品的 OD 值,样品 OD 值大,则脱氢酶活性高。

(6)产脂试验^[7]

取装有 20 mL 产脂培养基的 50 mL 三角瓶,向其内接供试菌, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d。嗅觉检查。

(7)产酸试验^[7]

将供试菌株划线接种于生酸培养平板上, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温培养 10 d,菌落周围形成透明圈的为阳性。

1.2.3 菌剂的制备

混合菌剂的培养采用三级扩大培养法。在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振摇条件下,将两种菌先分别培养,第三级时混合培养,都是 PDA 培养基。经显微镜检查菌落数达到一定浓度之后,以腐植酸粉末为载体将混合菌液吸附于载体上(载体与菌液的质量比为 4:1)制备成菌剂,密封于聚乙烯塑料袋内,室温保存。

1.2.4 土壤盐碱改良及模拟原位修复处理

土壤盐碱改良:取 4 kg 浇 3 次透水(即花盆底部有水渗出)后自然风干的土样,加入 3% 土壤营养调理剂充分混合均匀。

模拟原位修复处理:将改良后的土壤装入花盆,每盆 300 g,按照 0%(质量百分数,下同)、2%、4%、8% 的比例加入真菌混合菌剂,分别记为 CK、1、2、3,混合均匀后于室温下培养,隔日浇水 50 mL。每个处

理设置 3 个平行。分别于第 3、7、14、21、28、35、70 d 测定石油烃降解率、脱氢酶活性。各处理的第 70 d 土壤样品提取总 DNA, 进行聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)和变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)分析土壤微生物的多样性。

1.2.5 分析方法

土壤中总石油烃含量(Total petroleum hydrocarbons content, TPH)采用重量法^[8]测定。用索式提取法提取土壤总石油烃, 计算每克干土中总石油烃含量, 从而可计算石油烃降解率。

$$\text{石油烃降解率} = \frac{(M_1 - M_i) \times 100\%}{M_1}$$

式中: M_1 为第 1 d 土壤中总石油烃含量; M_i 为第 i d 土壤中总石油烃含量。

脱氢酶活性测定采用改进的 TTC-脱氢酶活性测定方法^[9], 将 1 h 产生 1 μg TF(三苯基甲臜)的量定义为一个酶活力单位。

土壤中真菌多样性的分子生物学分析: 对处理第 70 d 不同土壤样品进行总 DNA 提取, 然后进行 PCR-DGGE (PCR 仪和 Dcode 突变检测分析系统, Bio-Rad 公司)分析。土壤样品总 DNA 的提取和纯化使用试剂盒(ZR Soil Microbe DNA Kit™ D6001, USA)。将纯化所得总 DNA 作为模板, 使用 26S rDNA 中 D1/D2 区特异性引物^[10], 进行两轮扩增。第一轮 PCR: 上游引物 NL-1(5'-GCATATCAATAAGCGGA GGAAAAG-3')和下游引物 NL-4(5'-GGTCCGTGT TTCAAGACGG-3')。第二轮 PCR: 上游引物 NL1-GC(5'-CGCCCGCC GCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG-3')和下游引物 LS2(5'-ATTCCC AAACAACCTCGACTC-3')扩增目的片段。每 50 μL 反应体系中上游与下游引物各 1 μL , dNTPs 1 μL , Taq 酶 1 μL , 模板 4 μL , 缓冲溶液 5 μL , 双蒸水 37 μL 。并设置阴性对照和阳性对照。94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 预变性; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 以后每个循环温度降低 1 $^{\circ}\text{C}$, 直至退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 延伸, 并且在 55 $^{\circ}\text{C}$ 进行 20 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 10 min。扩增产物用琼脂糖检验。扩增产物进行 DGGE 分析。电泳所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 30%~60%。使用电泳缓冲溶液为 1 $\times$ TAE。电泳条件: 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温, 160 V 电泳 3 h, 然后用 EB 染色 30 min, 紫外凝胶成像系统照相, 用 Quantity-One 软件分析电泳条带。

2 结果与分析

2.1 真菌分离结果

为了取得高效、彻底的生物修复效果, 分离和筛选污染物的高效降解菌种是生物修复的必然要求^[11]。本试验经过富集培养、分离、纯化以及选择性培养基复筛试验的验证, 从大港油田石油污染盐碱土壤中分离得到 2 株可以以石油作为碳源的石油降解真菌。根据菌株的菌体形态及菌落特征初步判断为酵母菌和霉菌, 分别编号为 DF-3 和 DF-M。将各菌株转接于斜面培养基, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。菌株有待进一步鉴别。

2.2 真菌初步鉴定结果

采用常规方法对菌株 DF-3 和 DF-M 进行了菌落和菌体形态观察, 并进行拍照, 见图 1、图 2。菌株 DF-3 和 DF-M 菌落光滑, 粘稠, 均无色, DF-3 菌体较小, DF-M 菌体较大。生化鉴定结果见表 2。

2.3 各处理石油烃降解率

各处理不同时期的石油烃降解率如图 3 所示。各处理的石油烃降解率随着培养时间的增加而不断增

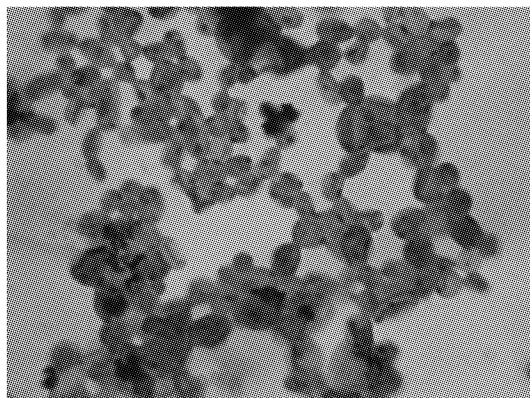


图 1 菌株 DF-3 的菌体形态照片

Figure 1 The cell form and structure of Strain DF-3

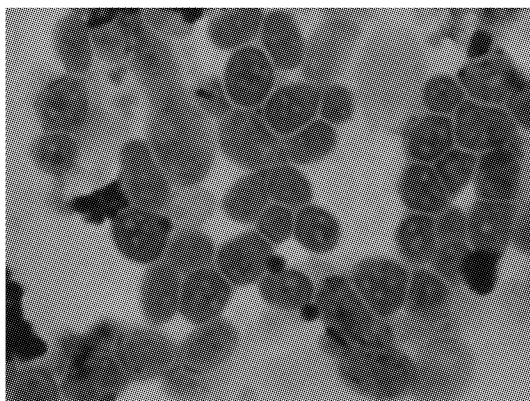


图 2 菌株 DF-M 的菌体形态照片

Figure 2 The cell form and structure of Strain DF-M

表 2 菌株生化鉴定结果

Table 2 Identification results of biochemical characteristics of fungi

	碳源利用						氮源利用			过氧化氢酶	脱氢酶	产脂	产酸
	葡萄糖	果糖	乳糖	麦芽糖	山梨醇	水溶性淀粉	硝酸钾	硫酸铵	尿素				
DF-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	多	-
DF-M	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	微	-

加,35 d 后变化速率开始减慢并趋于平缓。与 CK 处理相比,添加菌的处理在 3 d 后即开始表现出较强的降解能力,表明菌剂能快速适应环境。但是前 3 d 各处理石油烃降解率差异不大,这可能与菌剂处于生长适应期有关。有研究表明,添加复合菌剂需保证足够的菌体适应期,一般可在 10 d 后达到高效降解周期^[12]。CK 处理中虽然没有加入菌剂,但是通过洗盐和加入土壤营养调理剂等改良了土壤环境,刺激了土著微生物的生长,使得石油烃降解率在 70 d 后达到了 43.48%。而 2%、4% 和 8% 处理第 70 d 石油烃降解率分别为 53.07%、57.20%、63.03%,分别是 CK 的 1.22、1.31、1.44 倍。各处理后期石油烃降解率趋于平稳,原因可能是易被菌剂利用的石油烃减少,而有害代谢产物积累,同时加入的真菌在周围环境影响下也逐渐发生变异,降解石油烃的效率只能保持在一定水平上。

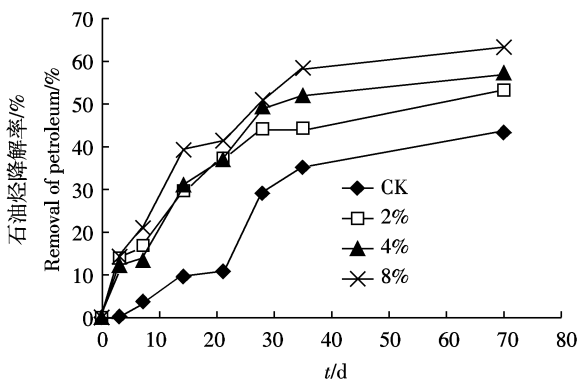


图 3 石油烃降解率随时间的变化

Figure 3 Degradation rate of total petroleum hydrocarbons with time

2.4 各处理脱氢酶变化

生物体中绝大多数氧化还原反应都是在脱氢酶及氧化酶的催化下进行。石油烃经脱氢酶催化氧化,最后通过电子传递链而被氧化,此时通过氧化磷酸化作用生成腺苷三磷酸(ATP),是异养生物体取得能量的主要途径。微生物降解石油烃的过程中,石油烃通过脱氢酶活化氢原子并传递给特定的受氢体,实现石油烃的氧化和转化^[13]。生物体的脱氢酶活性在很大程

度上反映了微生物的活性,而且能直接表示微生物细胞对基质降解能力的强弱^[14]。如图 4 所示,随着培养时间的增加脱氢酶活性逐渐增大,说明修复过程中微生物的活性逐渐增强,这也与石油烃降解率变化趋势基本相同。但在 36 d 后,各处理的脱氢酶活性的变化速率逐渐减小,4% 和 8% 处理的脱氢酶活性在末期甚至有所降低,2% 处理的脱氢酶活性仍缓慢增大,这可能是由于在修复后期易降解污染物减少,难降解物质积累以及有毒代谢产物增加,导致微生物活性降低,而不同处理的微生物活性降低程度不同,造成了脱氢酶活性变化的差异。

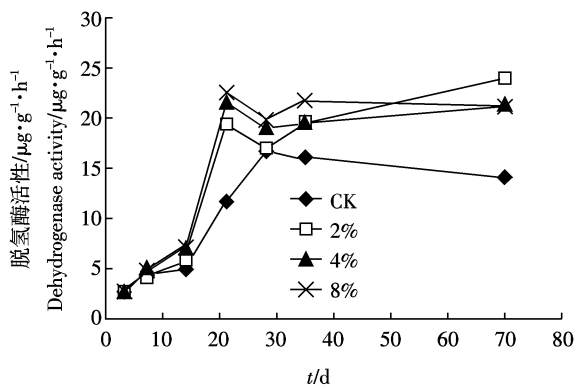


图 4 脱氢酶随时间的变化

Figure 4 Changes in dehydrogenase activity with time

2.5 土壤微生物多样性的变化

以各处理第 70 d 的土壤样品总 DNA 为模板,使用 26S rDNA 中 D1/D2 区的通用引物进行巢式扩增,最终获得长约为 300 bp 的 26S rRNA 基因 D1/D2 区扩增产物,以扩增产物进行 DGGE 分析,进一步分析各处理中真菌种群的分布情况,结果如图 5 所示。图 5(a)中条带的多少反映出土壤中真菌种群多样性,条带的粗细则反映了种群密度的差异。由图 5(b)可以看出,各处理中真菌群落多样性明显不同,各种群密度也存在差异。泳道 1(菌剂)仅有 2 条带,代表加入的两种真菌,而且其他各处理中都有这 2 条带;泳道 2 (CK)有 4 条带,其中有 2 条与菌剂中的 2 条相同,说明菌剂中的真菌源于对照土样;泳道 5(8% 处理)有 9

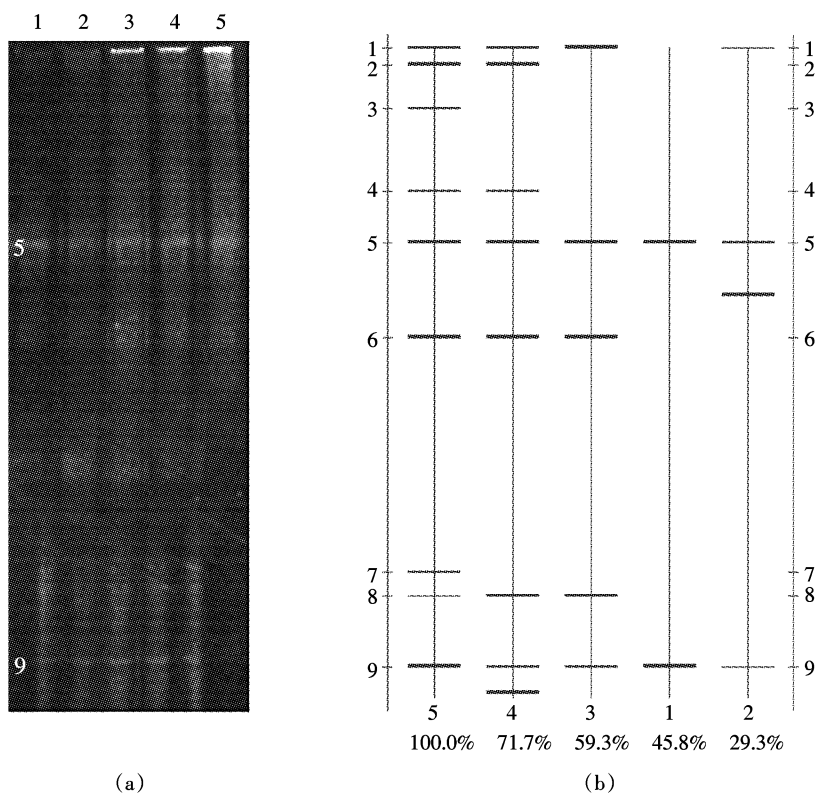


图 5 菌剂及各处理土样第 70 d DGGE 图及 Quantity-One 处理泳道条带结果

Figure 5 DGGE profile(a) and Quantity-One analysis result(b) of mixed microbes and each sample after 70 days of incubation.

条带,说明 8%处理后增加了真菌的多样性,而泳道 3 (2%处理)和泳道 4(4%处理)分别有 5 条和 8 条泳带,虽然也增加了条带,但不及 8%处理增加条带多。这可以解释为什么加入的菌剂相对多,降解石油污染的效果相对好。添加菌剂的各处理中都有菌剂的 2 条带,表明分离得到的两株真菌在各处理土样中都能存活并保持一定生物量(条带的粗细基本相同)和活性,再一次证实从石油污染盐碱土中分离得到降油真菌能较好地适应原污染环境并能充分发挥其降油、修复污染土壤生态的作用。

3 结论

通过 2 株耐盐碱石油降解真菌对石油污染土壤的修复作用研究,可初步得出以下结论。

(1)经过分离得到 2 株耐盐碱真菌,能适应盐碱石油污染土壤,确有降解石油烃的作用。

(2)经过 70 d 的修复,土壤中各处理总石油烃含量都有明显下降,CK、2%、4%和 8%处理石油烃降解率分别达到 43.48%、53.07%、57.20%、63.03%;各处理的土壤脱氢酶活性随着培养时间的增加逐渐增强,

其中添加菌剂处理的脱氢酶活性要远高于 CK。

(3)对比各处理,随着菌剂加入剂量的增加,石油烃的降解率也明显提高,土壤生态也得到不同程度的修复,表现为微生物的多样性增加。但是,为了降低修复土壤生态的成本,加入 5%~6%的真菌菌剂是适当的。用于实际土壤生态修复工程,还要考虑真菌-细菌、真菌-细菌-植物联合修复,以达到低成本、高效、快速修复石油污染土壤生态系统的目的。

参考文献:

- [1] 丁克强, 骆永明, 孙铁珩, 等. 通气对石油污染土壤生物修复的影响[J]. 土壤, 2001, 33(4): 185-188.
DING Ke-qiang, LUO Yong-ming, SUN Tie-heng, et al. The effect of ventilation on bioremediation for petroleum-contaminated soil[J]. *Soils*, 2001, 33(4): 185-188.
- [2] 韩慧龙, 汤晶, 江皓, 等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究[J]. 环境科学, 2008, 29(1): 189-195.
HAN Hui-long, TANG Jing, JIANG Hao, et al. Synergy between fungi and bacteria in fungi-bacteria augmented remediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(1): 189-195.
- [3] 姚德明, 许华夏, 张海荣, 等. 石油污染土壤生物修复过程中微生物生态研究[J]. 生态学杂志, 2002, 21(1): 26-28.

- YAO De-ming, XU Hua-xia, ZHANG Hai-rong, et al. Microbiological ecology during bioremediation for oil contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2002, 21(1):26-28.
- [4] 刘五星, 骆永明, 滕 应, 等. 石油污染土壤的生物修复研究进展[J]. 土壤, 2006, 38(5):634-639.
- LIU Wu-xing, LUO Yong-ming, TENG Ying, et al. Advances in bioremediation of petroleum contaminated soil[J]. *Soils*, 2006, 38(5): 634-639.
- [5] 张宝良. 油田土壤石油污染与原位生物修复技术研究[D]. 黑龙江: 大庆石油学院, 2006.
- ZHANG Bao-liang. Research on in-situ bioremediation for oil-contaminated soil in oilfields[D]. Heilongjiang: Daqing Petroleum Institute, 2006.
- [6] 刘光崧. 土壤理化分析与剖面描述[M]. 北京: 中国标准出版社, 1996:121-265.
- LIU Guang-song. Soil physical and chemical analysis & description of soil profiles[M]. Beijing: China Standard Press, 1996:121-265.
- [7] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005:165-168.
- DU Lian-xiang, LU Fu-ping. Experimental technique of microbiology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005:165-168.
- [8] 奚旦立, 孙裕生, 刘秀英. 环境监测[M]. 修订版. 北京: 高等教育出版社, 1995:404-405.
- XI Dan-li, SUN Yu-sheng, LIU Xiu-ying. Environmental monitoring [M]. Revision. Beijing: Higher Education Press, 1995:404-405.
- [9] 张清敏. 环境生物学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 130-131.
- ZHANG Qing-min. Experimental technique of environmental biology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:130-131.
- [10] Cheunjit J, Prakitchaiwattana, Graham H Fleet, Gillian M. Heard application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes[J]. *FEMS Yeast Res*, 2004, 4(8):865-877.
- [11] 徐金兰, 黄廷林, 唐智新, 等. 高效石油降解菌的筛选及石油污染土壤生物修复特性的研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(4):622-628.
- XU Jin-lan, HUANG Ting-lin, TANG Zhi-xin, et al. Isolation of petroleum degradation bacteria and its application to bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(4):622-628.
- [12] 陈荣灿, 卞卫国, 王林霞. 石油降解复合菌对含油污泥的降解特性[J]. 干旱区研究, 2007, 11(24):850-853.
- CHEN Rong-can, BIAN Wei-guo, WANG Lin-xia. Study on biodegradation of oily sludge treated with complex bacteria[J]. *Arid Zone Research*, 2007, 11(24):850-853.
- [13] Neilson A H. Organic chemicals: An environmental perspective [M]. New York: Lewis Publishers, 2000.
- [14] 解 军, 祁 峰, 裴海燕, 等. 脱氢酶活性检测方法及其在环境监测中的应用[J]. 中国环境监测, 2006, 22(5):13-18.
- XIE Jun, QI Feng, PEI Hai-yan. Determining method of dehydrogenase activity and its application in environmental monitoring[J]. *Environmental Monitoring in China*, 2006, 22(5):13-18.