

中国主要矿区油页岩可培养细菌的分离与鉴定

蒋绍妍¹ 王文星² 薛向欣^{1*} 严世宁²

(1. 东北大学 材料与冶金学院 辽宁 沈阳 110819)

(2. 东北大学 生命科学与健康学院 辽宁 沈阳 110819)

摘要:【目的】研究油页岩本源环境中可培养细菌多样性,对于发掘利用尚未开发的油页岩细菌资源具有重要意义。【方法】以野外采集的吉林桦甸、广东茂名和辽宁抚顺 3 个中国主要矿区的油页岩作为研究对象,采用稀释平板培养法,以营养琼脂培养基对油页岩中的细菌进行分离纯化,并对分离菌株进行基于 16S rRNA 基因的序列测定和系统发育分析。【结果】3 个矿区共鉴定出 10 属,其中抚顺矿的 9 个操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)属于 *Pantoea*、*Brevibacillus*、*Paenibacillus*、*Microbacterium*、*Arthrobacter*、*Pseudomonas* 和 *Bacillus* 菌属;茂名矿的 5 个 OTUs 属于 *Bacillus* 和 *Sinomona* 菌属,桦甸矿的 5 个 OTUs 属于 *Staphylococcus*、*Acinetobacter*、*Bacillus* 和 *Arthrobacter* 菌属。【结论】3 个矿区可培养细菌群落组成均较简单,且在门的分类层次上相似,即均具有厚壁菌门和放线菌门,抚顺矿和桦甸矿还存在部分变形菌门细菌。在属的分类层次上,各矿区差异较大。

关键词: 油页岩, 可培养细菌, 微生物多样性, 16S rRNA 基因, 系统发育分析

Isolation and identification of cultivable bacteria in the major oil shale mines in China

JIANG Shao-Yan¹ WANG Wen-Xing² XUE Xiang-Xin^{1*} YAN Shi-Ning²

(1. School of Materials and Metallurgy, Northeastern University, Shenyang, Liaoning 110819, China)

(2. School of Life and Health Sciences, Northeastern University, Shenyang, Liaoning 110819, China)

Abstract: [Objective] Survey of cultivable bacterial diversity in the oil shale deposits is important to use untapped bacterial resources in the oil shale mines. [Methods] We isolated and purified bacteria in the three major oil shale mines (Fushun mine in Liaoning, Huadian mine in Jilin, and Maoning mine in Guangdong) in China on the nutrient agar medium by the dilution plate culture method. Then we determined 16S rRNA gene sequence and did phylogenetic analysis of the isolated bacteria. [Results] Ten genus were identified in the three mines, including nine OTUs (belonging to *Pantoea*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* and *Bacillus*) in Fushun mine, five OTUs (belonging to *Bacillus* and *Sinomona*) in Maoming mine, and five OTUs (belonging to *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Arthrobacter*) in Huadian mine. [Conclusion] The

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51204055); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. N130420002); 中国博士后科学基金项目(No. 20100481205)

*通讯作者: Tel: 86-24-83687306; 邮箱: xuexx@mail.neu.edu.cn

收稿日期: 2014-04-01; 接受日期: 2014-05-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-26

compositions of cultivable bacterial communities in the three mines were simple and similar at the phylum level, mainly including Firmicutes and Actinobacteria. Some Proteobacteria existed in Fushun mine and Huadian mine. However, their compositions in the three mines had quite differences at the genera level.

Keywords: Oil shale, Cultivable bacteria, Microbial diversity, 16S rRNA gene, Phylogenetic analysis

油页岩是一种高灰分含可燃有机质的沉积岩,属于非常规油气资源,我国已探明总储量约329.89 亿 t,居世界第四位。在当今石油、天然气和煤炭资源日益枯竭的形势下,合理开发利用油页岩来代替部分常规油气资源具有重要的现实意义^[1]。微生物是重要的生物资源和基因资源。早在 1947 年, Colmer 和 Hinkle^[2]就从矿山酸性矿水中分离鉴定出氧化亚铁硫杆菌,并证实了其在浸出矿石中的生物化学作用。迄今已经有 20 多个国家的学者展开了微生物在贫矿、废矿、表外矿及难采矿、难选矿、难冶矿的堆浸和就地浸出研究^[3-7]。将微生物转化技术应用于油页岩的研究始于 1974 年^[8],但至今仍处于刚刚起步阶段,主要是利用生物催化作用浸提油页岩中的矿物组分^[9-11],或利用生物表面活性剂驱提页岩油^[12]。目前仅有关于黑页岩、原油和天然沥青等沉积岩本源细菌的相关报道^[13-17],人类尚无对油页岩细菌群落的认知。纯培养方法可以获得菌体细胞及菌落形态、营养及培养条件等指标,分离得到的菌株也可以较容易认识其功能特性并直接用来进行诱变等基因改造,因此在研究应用中具有独特的优势和作用。中国有 80 多个油页岩含矿区,适合集中开采的有辽宁抚顺、吉林桦甸和广

东茂名矿等。本研究首次对三大矿区油页岩细菌进行分离鉴定,揭示了油页岩中可培养细菌的主要类群,共鉴定出 3 个菌门 10 个菌属,为后续从中分离功能菌株、改造功能基因提供清晰的生态背景信息。

1 材料与方法

1.1 供试样品

油页岩样品采自广东茂名、辽宁抚顺和吉林桦甸 3 个油页岩矿区。采样时间为 2012 年 5-7 月。茂名矿(21°41'N, 110°58'E)和抚顺矿(41°50'N, 123°57'E)为露天开采矿,采样深度分别约 25 m 和 40 m;桦甸矿(43°00'N, 126°47'E)为地下开采矿,采样深度约 200 m。每一采样矿区内设置 3 个大小为 20 m×20 m、间隔约 500-1 000 m 的重复取样地,每个重复取样地内按十点取样法取样。取样时铲去表面页岩以防空气及页岩表面细菌混入样品,并且佩戴无菌手套,使用铁锤就地粉碎待采样品,充分混匀后过 4 mm 筛子,四分法取适量放于 50 mL 无菌离心管,与冰袋一起装入保温盒带回实验室 4 ℃ 保存。采样用的铁锤、小铲子、筛子、报纸及离心管等工具均经高压蒸汽灭菌后烘干。矿区特征和样品元素性质列于表 1。

表 1 矿区特征和油页岩样品元素组成									
Table 1 Mine characteristics and elemental composition of oil shale samples									
油页岩 矿区 Oil shale mines	沉积环境 Depositional environment	年气温 Average annual temperature (°C)	年降水量 Average annual precipitation (mm)	岩性特征 Lithological character	样品的主要元素组成 Major elemental composition of samples (wt%)				
					SiO ₂	CO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO
茂名 Maoming	半深湖-深湖，淡水	16.5–22.8	1 500–1 800	灰色油页岩夹褐煤、炭质页岩	30.3	41.4	18.3	4.1	0.4
抚顺 Fushun	浅湖，半咸水	6.0–7.1	740–760	砂岩、泥岩及油页岩互层	43.9	28.4	17.1	5.4	0.7
桦甸 Huadian	浅湖，半咸水	3.9–4.5	760–790	泥灰岩、泥岩及油页岩互层	40.6	33.7	12.8	3.5	3.1

1.2 细菌的分离与鉴定

将样品加入无菌 PBS (0.05 mol/L, pH 7.3±0.1) 中 180 r/min 振荡后涂布于营养琼脂培养基(杭州天和微生物试剂有限公司), 灭菌处理的油页岩作为对照, 37 °C 培养 48 h, 10^{-1} – 10^{-5} 每稀释度各 3 次重复且每次 3 个平行以排除偶然因素。每个样品挑取 50 个单菌落(包括所有形态有差异的菌落)纯化 5 代以上, 直至平板内菌体经镜检完全一致。采用北京百泰克(BioTeke)的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取单克隆菌落 DNA, 并以 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 扩增 1 500 bp 左右的 16S rRNA 基因^[18]。PCR 体系(50 μ L): 2×Master Mix (Bioteke, 中国) 25 μ L, 模板 DNA 50 ng, 上下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 灭菌高纯水补至 50 μ L。PCR 条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司。引物合成和测序均由上海生工生物工程有限公司完成。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行两两比对, 序列相似度大于 97% 的菌株视为一个 OTU^[19], 将每个 OTU 与 GenBank 和 EZTaxon 数据库中近似菌株进行同源性比对, 用 ClustalX 和 MEGA 4 软件以邻位连接 (Neighbour-Joining) 算法和 Kimura 2-parameter 模型构建系统发育树。利用 Jaccard 相似性系数原理进行群落的相似性比较: 相似性系数 $EJ=a/(b+c-a)$, 式中 a 为待分析两矿区共有的种属数; b 、 c 分别为待分析两矿区的种属数。两群落的共有种属越多, 其相似性就越大或者关系越亲近, 否则相反。当 EJ 为 0–0.25 时为极不相似, 当 EJ 为 0.25–0.50 时为中等不相似, 当 EJ 为 0.50–0.75 时为中等相似, 当 EJ 为 0.75–1.00 时为极相似。

将分离菌株的核酸序列提交至 GenBank, 获得登录号 KJ504153–KJ504171。

2 结果与讨论

从各矿区样品中共分离出 150 株菌, 鉴定出 10 属, 将序列相似度大于 97% 的菌株划为一个 OTU, 其中桦甸矿 5 个 OTUs (jxk1-6、jxk1-9、jxk1-11、

jxk2-1 和 jxk2-10), 茂名矿 5 个 OTUs (gx3、gx11、gx13、gx16 和 gx17), 抚顺矿 9 个 OTUs (Y-fx2、Y-fx3、Y-fx4、Y-fx6、Y-fx8、Y114-fz1、Y114-fz2、Fzx24-H 和 Fzx15)。基于已建立的微生物 16S rRNA 基因数据库, 通过比对能够确定细菌的系统发育关系, 从而达到对分离菌株的识别。除 gx17 与 *Bacillus badius* (AB681502) 序列相似度为 98% 外, 其余菌株与 GenBank 数据库中相关近似菌株的序列相似度均在 99% 以上, 通常认为相似度 97% 以上即为同种微生物。图 1 的系统发育树表征了分离菌株与模式菌株的遗传进化关系, 其分支是根据亲缘远近来划分的, 同一个分支上的分离物代表它们亲缘关系较近, 不同分支则同源性相对较低。

研究表明, 油页岩中分布着厚壁菌门、放线菌门和变形菌门的代表菌属。在门的分类层次上, 矿区差异较小(图 1), 多样性均较简单, 厚壁菌门和放线菌门是三矿区的共有菌门, 并且抚顺矿和桦甸矿还存在一些变形菌门细菌。这表明微生物门类主要是由本源环境决定的, 与油页岩中有机质的结构和性质有关, 而受外界环境影响较小。沉积岩中微生物的营养和能量来源是被困在这些岩体中的古代沉积有机质^[20], 微生物依附于页岩表面, 代谢页岩中由脂族、芳香族和杂原子(主要是 O、N、S)构成的、以复杂三维网状结构干酪根形式存在的有机成分, 相似的营养源决定了各群落具有相似的组成门类。而有机质结构和量的差异可能导致群落细菌数量和种属分布的不均一性。在属的分类层次上, 各矿区差异明显。抚顺矿多样性相对较丰富, 涵盖 3 个菌门共 7 个菌属; 桦甸矿涵盖 3 个菌门共 4 个菌属; 而茂名矿仅涵盖 2 个菌门共 2 个菌属。茂名矿油页岩碳元素含量远高于抚顺矿和吉林矿(表 1), 其中部分游离态碳溶解在雨水里形成碳酸溶液, 酸性潮湿的环境条件限制了细菌的多样性。利用 Jaccard 公式计算得出群落的相似性系数(图 2), 可以看出, 3 个系数均低于 0.25, 这表明各矿区之间的可培养细菌组成属于极不相似水平, 相对而言, 抚顺矿与桦甸矿相似性较高($EJ=0.22$), 桦甸矿与茂名矿相似性居中($EJ=0.20$), 抚顺矿与茂

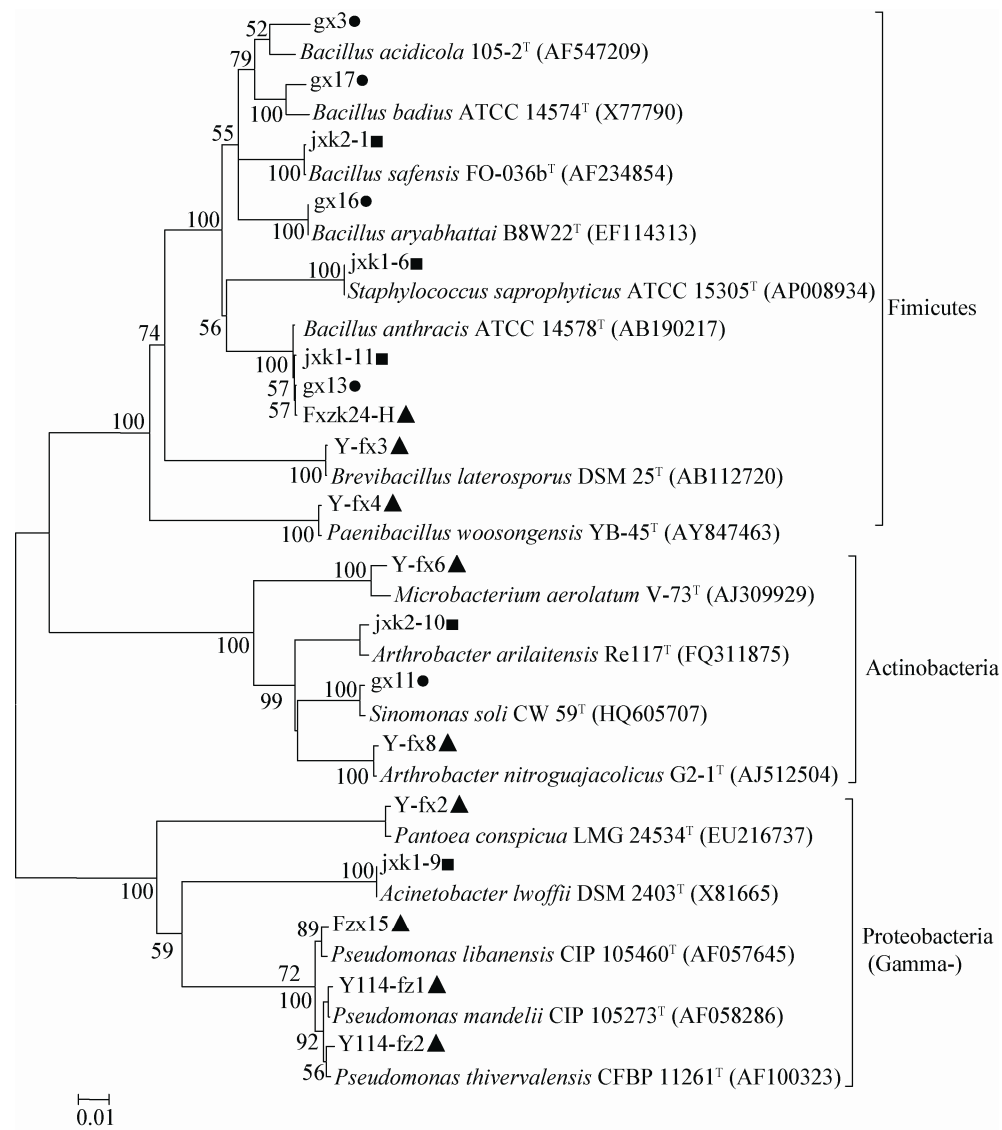


图 1 根据分离菌株 16S rRNA 基因构建的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree of the isolated bacteria based on 16S rRNA gene sequences

注: ●: 茂名矿; ■: 桦甸矿; ▲: 抚顺矿。自展检验重复 1 000 次; 百分比超过 50% 的值在树上显示; 参考序列以模式菌株 GenBank 检索号表示。

Note: ●: Maoming mine; ■: Huadian mine; ▲: Fushun mine. Bootstrap percentages over 50% from 1 000 bootstrap replicates are shown. Reference sequences were from the type strains of the species retrieved from GenBank under the accession numbers indicated.

名矿相似性较低($EJ=0.13$)。一般说来, 自然群落中的微生物都是在最适合自己的条件下生长发育的, 其本源环境条件最能代表本身的物种特征。从图 1 的系统发育树可以看出, 即使是局部生态条件相对较接近(表 1)的抚顺矿和桦甸矿, 两者的差异菌属也远远多于共有菌属, 表明可培养细菌种类与地带之间没有明显的相关性, 微生物种类可能受到多种复杂因素的综合影响, 这种复杂性至少包括: (1) 各

种自然气候条件, 如开采方式、所处纬度、微地形、气候和季候特征等; (2) 矿体性质, 如盆地类型、形成环境、古气候和水体性质, 有机质的来源和组成等; (3) 样品本身属性, 如元素组分等。

油页岩与石油和煤在结构组成上具有一定的同源性, 即它们的形成有着相同的原始动植物有机物质。油页岩低温干馏时有机质热分解转化为页岩油, 包括液态碳、氢, 以及少量含氧、氮和硫的化

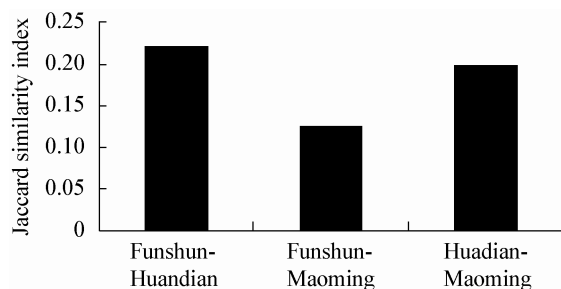


图2 抚顺矿、桦甸矿和茂名矿细菌群落相似性指数柱状图

Figure 2 The similarity indexes histogram of bacterial communities in the Fushun mine, the Huadian mine and the Maoming mine

合物,它与天然石油的不同之处在于其不饱和烃及非烃化合物含量较高。而油页岩与煤的主要区别在于油页岩的灰分在 40%以上。芽孢杆菌属在许多油藏环境中被广泛发现,有研究指出它们可以通过自身代谢产生生物表面活性剂,帮助细胞黏附于烃类物质表面进行解烃代谢^[21]。变形菌门细菌被证实可以有效降解石油烃类物质^[22],并且在煤炭^[23]、黑页岩^[24]、天然沥青^[25]、深海沉积物^[26]、沙地^[27]等许多极端环境中被广泛报道,其中假单胞菌属分泌到胞外的生物酶对低价阶煤具有很强的降解转化作用,能对 C-S 和 C-C 键的芳香结构基团进行攻击,使芳香结构中大分子物质的支链、侧链断裂,变成羧基类、烃基类和醇类等小分子易溶于水的物质。Kilbane II 等曾利用 *Pseudomonas ayucida* 处理页岩油,最终 68%的喹啉被降解^[28]。Truu 等利用 *Pseudomonas* sp.降解油页岩废渣中酚等化学物质,在一年半的时间内,酚类物质含量降低了 35%,油类物质含量减少了 2/3^[29]。而变形菌门不动杆菌属可以降解烷烃、脱硫和脱氮等,它和假单胞菌属都是主要的微生物采油菌。

虽然通常认为待比对菌株与数据库中相关近似菌株的序列相似度在 97%以上即为同种微生物,但是由于本研究仅通过菌落形态观察以及 16S rRNA 基因比对分析方法对菌株进行鉴定,并未对待鉴定菌株进行深入的生理生化功能检测,故以“种”级进行多样性分析较困难;并且通常 16S rRNA 基因序列分析方法在属的水平上效果是比较好的^[30],因而本研究对细菌群落作“属”级物种多

样性研究,该结果不能反应出属内不同种间的差异,带有一定的局限性,但是基本明确了可培养细菌群落在中国三大油页岩矿区的物种分布特点,为开展菌种的调查奠定基础,也为进一步挖掘本源微生物在油页岩生物转化方面的利用潜力提供一条研究思路。

3 结论

油页岩中分布着厚壁菌门、放线菌门和变形菌门细菌。3个矿区的门类组成相似,有机质以干酪根的形式存在可能是决定细菌门类构成的主要因素;自然气候条件、矿体性质和样品本身属性等复杂因素对群落门类的构成影响不大,但是,对种属的构成可能有较大影响。

分离菌株与数据库中相关近似菌株的序列相似度均在 98%以上。三矿区共鉴定 10 属,分别是 *Pantoea*、*Paenibacillus*、*Pseudomonas*、*Brevibacillus*、*Microbacterium*、*Arthrobacter*、*Acinetobacter*、*Bacillus*、*Sinomonas* 和 *Staphylococcus*。其中抚顺矿的 9 个 OTUs 属于 *Pantoea*、*Brevibacillus*、*Paenibacillus*、*Microbacterium*、*Arthrobacter*、*Pseudomonas* 和 *Bacillus* 菌属;茂名矿的 5 个 OTUs 属于 *Bacillus* 和 *Sinomonas*,桦甸矿的 5 个 OTUs 属于 *Staphylococcus*、*Acinetobacter*、*Bacillus* 和 *Arthrobacter* 菌属。

3 个矿区可培养细菌群落组成均较简单,且各矿区群落之间的差异种属远多于共有种属。相对而言,抚顺矿细菌生物多样性较高,茂名矿多样性最低,多样性的分布不具有明显的环境梯度格局。因此,群落构成可能与各矿区复杂因素的综合影响相关性较为密切,这种复杂性有待进一步研究。

参考文献

- [1] James WB, Peter MC, Harry RJ. Is oil shale America's answer to peak-oil challenge?[J]. Oil Gas Journal, 2004, 8: 16-24.
- [2] Colmer AR, Hinkle ME. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report[J]. Science, 1947, 106(2751): 253-256.
- [3] Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63(3): 249-257.

- [4] Brierley JA, Brierley CL. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59(2/3): 233-239.
- [5] Sorokin DY, Lysenko AM, Mityushina L, et al. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., novel and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(2): 565-580.
- [6] Mahmood Q, Zheng P, Hu B, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas stutzeri* QZ1 from an anoxic sulfide-oxidizing bioreactor[J]. Anaerobe, 2009, 15(4): 108-115.
- [7] Willscher S, Bosecker K. Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump[J]. Hydrometallurgy, 2003, 71(1/2): 257-264.
- [8] Findley J, Appleman MD, Yen TF. Degradation of oil shale by sulfur-oxidizing bacteria[J]. Applied Microbiology, 1974, 28(3): 460-464.
- [9] Djordjević V, Vrvic MM, Cvetković O. Bacterial depyritization of oil shale by *Thiobacillus ferrooxidans*: the effect of initial pH value[J]. Organic Geochemistry, 1997, 62(4): 343-348.
- [10] Beškoski VP, Milić J, Mandić B, et al. Removal of organically bound sulfur from oil shale by iron(III)-ion generated-regenerated from pyrite by the action of *Acidithiobacillus ferrooxidans*—Research on a model system[J]. Hydrometallurgy, 2008, 94(1/4): 8-13.
- [11] Cvetković O, Curiale JA, Djordjević V, et al. Evidence of stability of sedimentary organic matter during bacterial desilicification of an oil shale[J]. Organic Geochemistry, 2001, 66(2): 95-99.
- [12] Haddadin MSY, Arqoub AAA, Reesh IA, et al. Kinetics of hydrocarbon extraction from oil shale using biosurfactant producing bacteria[J]. Energy Conversion and Management, 2009, 50(4): 983-990.
- [13] Matlakowska R, Narkiewicz W, Skłodowska A. Biotransformation of organic-rich copper-bearing black shale by indigenous microorganisms isolated from Lubin copper mine (Poland)[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 44(7): 2433-2440.
- [14] Matlakowska R, Skłodowska A. Biodegradation of kupferschiefer black shale organic matter (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by indigenous microorganisms[J]. Chemosphere, 2011, 83(9): 1255-1261.
- [15] Matlakowska R, Skłodowska A. The culturable bacteria isolated from organic-rich black shale potentially useful in biometallurgical procedures[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 858-866.
- [16] Matlakowska R, Skłodowska A, Nejbert K. Bioweathering of kupferschiefer black shale (fore-sudetic monocline, SW Poland) by indigenous bacteria: implication for dissolution and precipitation of minerals in deep underground mine[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 81(1): 99-110.
- [17] Permanyer A, Gallego JLR, Caja MA, et al. Crude oil biodegradation and environmental factors at the Riutort oil shale mine, SE Pyrenees[J]. Journal of Petroleum Geology, 2010, 33(2): 123-139.
- [18] Barathi S, Vasudevan N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil[J]. Environment International, 2001, 26(5/6): 413-416.
- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [20] Krumholz LR, McKinley JP, Ulrich GA, et al. Confined subsurface microbial communities in Cretaceous rock[J]. Nature, 1997, 386: 64-66.
- [21] Maletić S, Dalmacija B, Rončević S, et al. Degradation kinetics of an aged hydrocarbon-contaminated soil[J]. Water, Air, and Soil Poll, 2009, 202(1/4): 149-159.
- [22] Zrafi-Nouira I, Guermazi S, Chouari R, et al. Molecular diversity analysis and bacterial population dynamics of an adapted seawater microbiota during the degradation of Tunisian zarzatine oil[J]. Biodegradation, 2009, 20(4): 467-486.
- [23] 马翠卿, 佟明友, 于波, 等. 一株红球菌脱硫菌株脱硫特性的研究[J]. 化学学报, 2004, 62(19): 1883-1888.
- [24] Petsch ST, Edwards KJ, Eglinton TI. Microbial transformations of organic matter in black shales and implications for global biogeochemical cycles[J]. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 2005, 219(1/2): 157-170.
- [25] Kim JS, Crowley DE. Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea Tar Pits[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4579-4591.
- [26] Jamieson RE, Heywood JL, Rogers AD, et al. Bacterial biodiversity in deep-sea sediments from two regions of contrasting surface water productivity near the Crozet Islands, Southern Ocean[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2013, 75: 67-77.
- [27] Zhang Y, Cao C, Han X, et al. Soil nutrient and microbiological property recoveries via native shrub and semi-shrub plantations on moving sand dunes in Northeast China[J]. Ecological Engineering, 2013, 53: 1-5.
- [28] Kilbane II JJ, Ranganathan R, Cleveland L, et al. Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTV9m[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 688-693.
- [29] Truu J, Talpsep E, Vedler E, et al. Enhanced biodegradation of oil shale chemical industry solid wastes by phytoremediation and bioaugmentation[J]. Oil Shale, 2003, 20(3): 421-428.
- [30] Fuller NJ, Marie D, Partensky F, et al. Clade-Specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine synechococcus clade throughout a stratified water column in the red sea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2430-2443.