

研究报告

近海柴油降解菌群的构建及其对柴油的降解特性

周楚莹^{1,2} 吴秉奇^{1,3*} 刘淑杰^{1,3} 陈福明^{1,3} 杨小龙^{1,3} 刘国光²

(1. 深圳清华大学研究院 深圳环境微生物资源开发与应用工程实验室 广东 深圳 518057)

(2. 广东工业大学 环境科学与工程学院 广东 广州 330063)

(3. 深圳市清研环境科技有限公司 广东 深圳 518057)

摘要:【目的】实施近海柴油污染的生物治理。【方法】以柴油为唯一碳源,从深圳港口海域富集筛选柴油降解菌;采用复配、正交试验等方式构建混合菌群;通过单因素试验研究环境因素对菌群降解柴油的影响;使用气相色谱-氢火焰检测器(GC-FID)分析降解前后柴油各组分的变化;通过生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定。【结果】获得了 16 株柴油降解菌,7 d 内对柴油的降解率最高达 40.8%;选择菌株 C1-8、C2-10、C3-13 构建了混合菌群 CQ1,投加量分别为 0.5%、2.0%和 1.0%,CQ1 对柴油去除率比单菌提高了 10%以上;CQ1 的最适环境条件为:温度 30 °C、pH 7.6、摇床转速 220 r/min、柴油浓度 20 g/L,优化后 9 d 内对柴油去除率达 60%以上;GC-FID 结果显示,菌群 CQ1 可降解大部分 C11–C27 的正构烷烃,对 C21–C27 的烷烃降解可达 100%。经鉴定,菌株 C1-8、C2-10 和 C3-13 分别为微杆菌(*Microbacterium* sp.)、剑菌(*Ensifer* sp.)和变异棒杆菌(*Corynebacterium variabile*)。【结论】CQ1 在近海柴油污染的生物修复中具有良好的应用前景。

关键词: 柴油降解菌, 菌群, 降解率, 环境因素, 鉴定

Construction of diesel fuel-degrading bacterial consortium from coastal waters and its characteristics on degradation of diesel fuel

ZHOU Chu-Ying^{1,2} WU Bing-Qi^{1,3*} LIU Shu-Jie^{1,3} CHEN Fu-Ming^{1,3}
YANG Xiao-Long^{1,3} LIU Guo-Guang²

(1. Research Institute of Tsinghua University in Shenzhen, Shenzhen Environmental Microbiology Resources Development and Application Engineering Laboratory, Shenzhen, Guangdong 518057, China)

(2. School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 330063, China)

(3. Shenzhen Qing Yan Environment Technology Company Limited, Shenzhen, Guangdong 518057, China)

Abstract: [Objective] For the purpose of control marine diesel pollution by biological treatment technology. [Methods] Diesel act as sole carbon source, using enrichment and screening methods to select diesel fuel-degrading bacteria from Shenzhen harbor area; bacterial consortium is constructed by

基金项目: 深圳市科技计划项目(No. JCYJ20120817102941279)

*通讯作者: Tel: 86-755-26556300; ✉: wubingqi@163.com

收稿日期: 2015-02-06; 接受日期: 2015-06-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-26

mixing and orthogonal experiments; single-factor experimental is used to study the effect of environmental factors on diesel biodegradation by the consortium; using chromatography-flame ionization detection (GC-FID) to analyze the changes of diesel components before and after degradation, physiological, biochemical experiment and 16S rRNA gene sequence analysis are used to identify the strains. **[Results]** Sixteen diesel fuel-degrading bacteria were isolated and the highest degrading rates were up to 40.8% in 7 days. Bacteria consortium CQ1 was composed of C1-8, C2-10 and C3-13 strains, and the dosage was 0.5%, 2.0% and 1.0% respectively. Compared to the single strain, the degrading rate of CQ1 was increased by more than 10%. The best degrading effects would be up to 60% in 9 days under the optimum conditions that 30 °C, pH 7.6, shaking speed 220 r/min and diesel concentration 20 g/L. The result of GC-FID showed that most n-alkanes C11–C27 can be degraded by bacteria consortium CQ1 and the degradation rate of C21–C27 were up to 100%. In addition, the results showed that C1-8 belonged to *Microbacterium* sp., C2-10 belonged to *Ensifer* sp., C3-13 belonged to *Corynebacterium variabile*. **[Conclusion]** CQ1 has bright application prospects of bioremediation for offshore diesel pollution.

Keywords: Diesel fuel-degrading bacteria, Bacteria consortium, Degradation rate, Environment factor, Identification

柴油是一种轻质石油产品,是各类轮船主要的燃料油,在海洋运输业中发挥着重要的作用。近年来,由于柴油用量的不断加大以及含油废水的排放,导致近岸海域的柴油污染问题日益突出^[1]。石油类污染物不仅会导致多种珍贵海洋动物的死亡,给养殖业、旅游业等带来巨大的经济损失,石油类污染物中一些致癌、致畸等物质还可在生物体内大量富集,对海洋生态系统和人类的健康产生严重的威胁^[2]。近岸海域包括一些生态敏感区(养殖区、旅游区等)以及潮滩、港口等,其柴油污染问题的治理更是亟需加强。

相比于传统的物理、化学等油污治理方法,生物降解修复法因具有成本低廉、处理彻底、易于管理、无二次污染等显著优点受到人们广泛的关注,其中高效的降解微生物是生物修复的关键因素之一^[3-4]。目前已发现海洋环境中约有 200 多个属、500 多种微生物能够参与石油烃类的降解,其中有 79 个属的细菌可以以烃类作为唯一碳源和能源生长^[5-6]。有研究表明,单一菌株大多只能降解一种或是几种烃类,石油制品成分的复杂性决定了其降解需要不同菌株的共同参与^[7]。利用菌株间的共生、协同等作用构建复合菌群可集合多种降解菌的酶促活性,扩大其对石油类污染物的利用范围和效率,进而实现对石油类污染物的高效降解。目前,

已有研究通过不同方式构建了海洋环境下的柴油降解菌群,如:直接富集分离自阿拉伯海的菌群 ESI^[8],由不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、短杆菌(*Brevibacterium* sp.)、食烷菌(*Alcanivorax* sp.)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、红球菌(*Rhodococcus* sp.)和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)等 6 株细菌构建的菌群^[9]等,它们对柴油的降解率分别可达 42%和 54.8%。然而,目前对海洋柴油降解菌群的研究大多停留在简单的复配阶段,菌群构建的过程尚缺乏规律性,同时对菌群中各菌株的降解特性以及环境因素的作用等也缺少深入的研究。

近岸海域与人类的关系较为密切,该区域内的降解菌较远洋中很可能存在较大的差别。本研究即是以柴油为唯一碳源,从深圳港口海域中筛选高效的柴油降解菌,采用复配、正交试验等方式构建柴油降解混合菌群,通过 GC-FID 分析菌株对柴油各组分的降解情况,同时研究了 pH、温度等环境因素对柴油去除效果的影响,旨在为近海柴油污染的生物修复以及工业化菌剂的开发奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 海水及柴油样品

从深圳市蛇口港取表层海水样品 3 个,取样点

为 113.9°E、22.4°N，从盐田港取表层海水样品 2 个，取样点为 114.2°E、22.5°N。柴油为市售 0# 柴油，密度为 0.8 g/mL。

1.2 培养基

MMC 培养基^[10](g/L): NaCl 24.0, MgSO₄·7H₂O 7.0, NH₄NO₃ 1.0, KCl 0.7, KH₂PO₄ 2.0, Na₂HPO₄ 3.0, pH 7.4, 1.0×10⁵ Pa 灭菌 30 min。补加微量元素混合液(g/L): CaCl₂ 0.020, FeCl₃·6H₂O 0.500, CuSO₄ 0.005, MnCl₂·4H₂O 0.005, ZnSO₄·7H₂O 0.100。

柴油培养基，用于柴油降解菌的富集、柴油降解率的测定实验：MMC 培养基中加入 1.0 g 柴油作为唯一碳源，柴油经 0.22 μm 滤膜过滤。

2216E 培养基(g/L)，用于菌株分离、纯化及种子液的制备：蛋白胨 5.00，酵母膏 1.00，柠檬酸铁 0.100，NaCl 19.450，MgCl₂ 5.980，CaCl₂ 3.240，KCl 0.550，Na₂CO₃ 0.160，KBr 0.080，SrCl₂·6H₂O 0.034，H₃BO₃ 0.022，Na₂SiO₃·9H₂O 0.004 0，NaF 0.002 4，NaNO₃ 0.001 6，Na₂HPO₄ 0.008，pH 7.4–7.8。固体培养基另加琼脂 15–20。

兔血平板培养基：用于表面活性剂的定性检测：固体 2216E 培养基融化后冷却至 50 °C，加入 2–3 滴无菌兔血摇匀后倒平板。

1.3 菌株筛选及生物学特性分析

1.3.1 柴油降解菌的富集与分离：取 5 mL 海水样品加入 100 mL 柴油培养基中，30 °C、180 r/min 培养 7 d，取 5 mL 培养液转接至新鲜的柴油培养基，重复以上步骤，连续转接富集培养 4 次，培养基中柴油量依次提升至 1.0、1.5、2.0 g。将柴油乳化现象明显的富集液梯度稀释，取 0.1 mL 涂布于 2216E 平板，30 °C 培养 3–5 d，待长出菌落后，挑取不同形态和颜色的单菌落，多次划线纯化分离单菌。

1.3.2 柴油降解率的测定：柴油浓度的测定采用紫外法，标准曲线的制作参照孙敏^[11]的方法，略有改动。分别在 50 mL 容量瓶中加入一定量的柴油母液（浓度为 1.2 g/L），用二氯甲烷定容，260 nm 处测定

吸光度。以柴油浓度为横坐标、吸光度为纵坐标制作柴油标准曲线。

待测菌株接至 2216E 液体培养基中培养至对数期，5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体，用无菌 MMC 洗涤 2 次并调节活菌数约 10⁸ CFU/mL，以 5% 的比例(体积比)接种至柴油培养基中，30 °C、180 r/min 培养，以未接菌的培养基作为对照。培养 7 d 后向各样品中加入 50 mL 二氯甲烷，200 r/min 振荡 20 min，再于 40 °C 下超声 15 min 萃取其中的残余油污，吸取二氯甲烷相，离心去除菌体碎片，待测。

吸取 1 mL 待测液定容于 50 mL 容量瓶，260 nm 处测定吸光度，根据标准曲线计算样品中残余的柴油浓度，每样品 3 个重复，下同。降解率=(C₁-C₂)/C₁×100%，C₁ 为对照中柴油浓度，C₂ 为样品中柴油浓度。为保证结果准确，对建立方法的加标回收率控制在 95%–105%之间。

1.3.3 生物学特性分析：将各菌株用无菌牙签依次挑至兔血平板培养基上，30 °C 培养 2–3 d，根据菌落周围透明圈的大小判断所产表面活性剂的浓度^[12]。

菌株细胞亲油性的测定参照文献[13-14]，用 MATH 值(0–1)表示菌株细胞亲油性的大小，数值越趋向于 1，表示亲油性越好。

将活化后的柴油降解菌以 5% 的比例接种到柴油培养基中，以不接菌的培养基作为空白对照，30 °C、180 r/min 培养 5 d。采用铂金环式表面张力测定仪测定培养液的表面张力。

1.4 柴油降解混合菌群的构建

选择柴油降解效果最好的 5 株细菌分别接种至 2216E 中培养至对数末期，种子液离心、洗涤后用无菌 MMC 培养基调节至相同的浓度(10⁸ CFU/mL)。各菌以等比例随机配伍的方式构建菌群并以 5% (体积比)的比例接至含油 MMC 中，30 °C、180 r/min 培养 7 d 后测定柴油的降解率。根据测定结果，选择柴油去除效果最好的 1 个组合，通过 3 水平(0.5%、1.0%和 2.0%)的正交试验确定各菌株最佳接种量及菌群的总接种量。

1.5 环境因素和培养时间对柴油降解的影响

以最佳投加量向柴油培养基中接种混合菌液, 摇床培养 7 d, 分析以下环境因素对柴油降解的影响: (1) 培养温度分别为 22、26、30、34、38 °C; (2) 培养基初始 pH 分别为 6.4、7.0、7.6、8.2、8.8; (3) 通气量, 设置摇床转速分别为 160、180、200、220、240 r/min; (4) 初始柴油浓度分别为 1.0、5.0、10.0、20.0、40.0 g/L。测定方法同 1.3.2。

将各因素均设置为最佳条件, 测定柴油随菌群培养时间的变化而产生的降解情况, 同时采用平板计数法^[15]对培养液中各菌株进行菌落计数。

1.6 残油组分 GC-FID 定量分析

将各单菌以 5%的接种量、混合菌群以正交优化后的接种量分别接入柴油培养基, 柴油浓度为 1 g/L, 30 °C、180 r/min 条件下培养 7 d。培养液前处理同 1.3.2, 取待测液用干燥无水 Na₂SO₄脱水, 再经 0.22 μm 耐有机溶剂滤膜过滤, 氮气吹干后用正己烷重新溶解。GC-FID 运行条件: 色谱柱为 CD-WA (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 柱温 40 °C, 恒温 3 min, 5 min 内升至 240 °C, 停留 25 min; 进样口温度和检测器温度均为 300 °C; 载气为 N₂, 流速为 1.03 mL/min; 进样量 1 μL。数据采集和处理用岛津 2014 GC 工作站。

1.7 菌株的鉴定

菌株的形态观察及生理生化试验参照东秀珠等^[16]的方法。提取菌株的基因组 DNA, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')扩增其 16S rRNA 基因序列。PCR 反应体系(50 μL): *Taq* 酶 (5 U/μL) 1 μL, 10×Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 引物(20 μmol/L)各 1 μL, 模板 (20 mg/L) 1 μL, DEPC 水 37 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 50 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物由上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果提交 GenBank 获取登录号, 并利用 MEGA 软件构建系统发育树。

1.8 数据统计及分析

采用 SPSS 18.0 和 Origin 8.6 软件对数据进行计算、整理; 采用新复极差法, 在 0.05 水平上分析差异显著性($P < 0.05$)。菌株 16S rRNA 基因序列通过 DNAMAN 7.02 拼接后进行 BLAST 分析, 利用 MEGA 6.0 程序的 Neighbor-Joining 算法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 柴油降解菌的筛选

对 5 个取样点的生物样品进行驯化、分离, 共获得 31 株柴油降解菌。经紫外法测定, 16 株细菌对柴油具有较好的降解能力(表 1), 7 d 内柴油的降解率在 26.4%–40.8%之间。为进一步确定菌株对柴油的降解特性, 选择产表面活性剂、细胞亲油性和降低培养液表面张力等 3 项指标对菌株的生物学特性加以分析, 结果见表 1。表 1 显示, 包括 C1-8 在内 5 株细菌在兔血平板上可产生较为明显的透明圈, 并且培养液表面张力相比于对照大幅度的降低(对照为 59.6 mN/m), 最高可达 41.6%, 初步推断这 5 株细菌能够通过产生表面活性剂促进柴油的乳化、分散, 提高细胞对柴油的摄取能力。此外, C2-10、C2-16、C3-13 等 3 株菌虽不产生表面活性剂, 但细胞的亲油性仍较好, 可直接与油滴接触并对其进行摄取和降解。

2.2 柴油降解菌群的构建

由于不同菌株对柴油的降解特性不同, 混合接种可能提高对柴油的降解效果。根据 2.1 的结果, 选择对柴油降解效果最好的 5 株细菌 C1-8、C2-10、C2-16、C2-22 和 C3-13, 通过不同的配伍方式构建柴油降解菌群(等比例接种), 共计 25 种组合。柴油降解试验表明, 大部分混合菌群的柴油降解率均显著高于单菌(结果略), 当混合菌群同时包含 C2-10 和 C3-13 时降解效果尤为明显。其中, 由 C1-8、C2-10、C3-13 等 3 株细菌构成的菌群降解效果最好, 7 d 内柴油降解率可达 49.6%。设计 3 因素 3 水平的正交试验对该菌群中 3 株菌的接种量加以优化, 试

表 1 菌株对柴油的降解能力及生物学特性
Table 1 The ability of the screened strains to degrade diesel fuel and its biological characteristics

菌株编号 Strain No.	柴油降解率 Degradation rate of diesel fuel (%)	表面活性剂 Surfactant	表面张力 Surface tension (mN/m)	亲油性 Lipophilicity (MATH)
C1-5	34.48±2.22	+	34.90±2.25	0.68±0.06
C1-7	30.97±1.69	+	37.95±2.00	0.64±0.02
C1-8	39.70±2.95	+	34.90±3.22	0.70±0.01
C2-3	26.38±2.66	-	48.54±3.90	0.31±0.03
C2-7	26.72±1.55	-	42.97±4.03	0.25±0.04
C2-10	38.19±3.38	-	39.39±5.11	0.64±0.03
C2-15	28.52±5.80	+	37.04±2.14	0.78±0.03
C2-16	40.78±3.30	-	44.43±3.72	0.72±0.02
C2-18	31.26±2.24	-	42.33±3.61	0.17±0.02
C2-21	26.72±1.40	-	47.84±2.19	0.29±0.30
C2-22	40.29±3.24	+	36.62±2.97	0.75±0.05
C2-24R	22.03±0.90	-	48.71±2.97	0.41±0.03
C2-24Y	25.40±0.74	-	45.76±3.35	0.35±0.01
C3-9	29.31±1.61	-	44.04±3.32	0.37±0.04
C3-10	24.23±1.47	-	50.42±1.92	0.27±0.09
C3-13	40.78±3.68	-	46.45±1.32	0.59±0.02

注: +: 兔血平板上菌株周围溶血圈阳性; -: 阴性.

Note: +: Hemolysis positive, which surrounding the strain on blood-plates; -: Negative.

验设计及柴油降解情况见表 2。

表 2 中 R 值反映各菌株接种量对菌群降解柴油影响力的大小,可以看出,在接种量的重要性方面, $C1-8 > C3-13 > C2-10$ 。 K 值反应菌株投加量变化与柴油去除率之间的关系,当菌株 $C1-8$ 取 0.5% 水平 ($K1 > K2 > K3$), $C2-10$ 取 2.0% 水平 ($K3 > K1 > K2$), $C3-13$ 取 1.0% 水平时 ($K2 > K3 > K1$) 时,各自的 K 值最高。按此接种量制备的混合菌液 7 d 内对柴油降解率达到 51.0%, 高于正交试验中的任何一种组合。因此,菌株 $C1-8$ 、 $C2-10$ 和 $C3-13$ 的接种量分取 0.5%、2.0% 和 1.0%, 该菌群的总接种量即为 3.5%, 将此菌群

命名为 CQ1。

2.3 环境因素对菌群 CQ1 降解柴油的影响

2.3.1 温度对柴油降解的影响:

温度可以影响柴油烃类的物理、化学状态, 并可以影响细菌的代谢活性, 从而影响柴油的降解^[17]。如图 1 所示, 菌群 CQ1 在 26–34 °C 范围内对柴油均有良好的降解效果, 降解率达到 45% 以上, 30 °C 是 CQ1 柴油的最适温度, 柴油的去除率达 52.2%。当温度过低或过高时对菌群降解柴油均会产生负面影响, 22 °C 和 38 °C 时柴油的降解率仅为 39.0% 和 43.0%。因此, 在后续研究中将 CQ1 的培养温度控制在 30 °C。

表 2 3 株细菌的接种量正交试验结果
Table 2 Result of orthogonal experiment on the inoculum dose of the three strains

编号 No.	各菌株的接种量 Inoculating of each strain (%)			降解率 Degradation rates (%)
	C1-8	C2-10	C3-13	
1	0.5	0.5	0.5	40.77±3.45ab
2	0.5	1.0	1.0	45.74±1.80ab
3	0.5	2.0	2.0	46.78±2.64b
4	1.0	0.5	1.0	44.54±4.62ab
5	1.0	2.0	0.5	43.00±4.29ab
6	1.0	1.0	2.0	39.17±5.39a
7	2.0	0.5	2.0	40.61±2.80ab
8	2.0	1.0	0.5	38.63±3.52a
9	2.0	2.0	1.0	39.32±4.66a
K1	133.29	125.92	122.40	
K2	126.71	123.54	129.60	
K3	118.56	129.10	126.56	
k1	44.43	41.97	40.80	
k2	42.24	41.18	43.20	
k3	39.52	43.03	42.19	
R	14.73	5.56	7.20	

注: 同列不含相同字母代表结果差异显著($P < 0.05$); K1: 菌株接种量为 0.5% 时柴油降解率之和; K2: 接种量为 1.0% 时降解率之和; K3: 接种量为 2.0% 时降解率之和; k : 对应的 K 值的平均值; R : $K1$ 、 $K2$ 、 $K3$ 值的极差。

Note: The different letters in same column indicated significant difference ($P < 0.05$); K1: Sum of the degradation rates under the 0.5% inoculating quantity by the same strain; K2: Sum of the degradation rates under the 1.0% inoculating quantity by the same strain; K3: Sum of the degradation rates under the 2.0% inoculating quantity by the same strain; k : The average value of K ; R : The range between $K1$, $K2$ and $K3$.

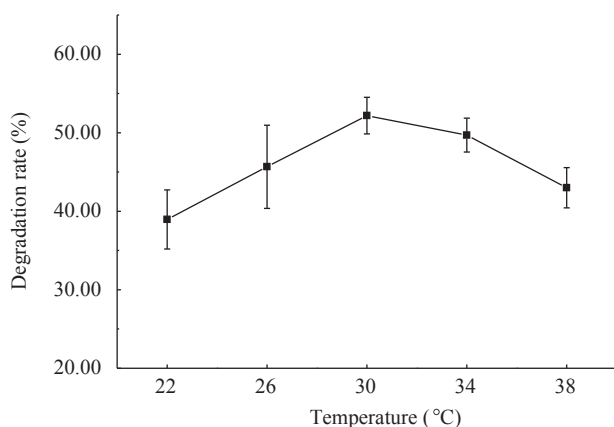


图 1 温度对柴油降解率的影响

Figure 1 The effect of temperature on degradation rate of diesel fuel

2.3.2 初始 pH 对柴油降解的影响: pH 对微生物的生长代谢具有重要作用, 能够影响微生物细胞内的酶活性及代谢产物的生物活性。因此, 确定菌群降解柴油时的最适 pH 是必要的。调节培养基初始 pH 为 6.4–8.8, 接种菌群 CQ1, 7 d 后柴油的降解情况见图 2。图 2 显示, CQ1 在 pH 为 7.0–8.8 的范围内对柴油均有较高的降解率(>40%), 当 pH 为 7.6 时, 菌群 CQ1 对柴油的降解效果要明显好于在其他 pH 条件, 降解率达到 59.3%。因此, 后续试验中选择 7.6 作为 CQ1 降解柴油的最佳 pH。

2.3.3 转速对柴油降解的影响: 不同微生物对氧气的的需求量是不同的, 摇床实验中转速决定着通气量

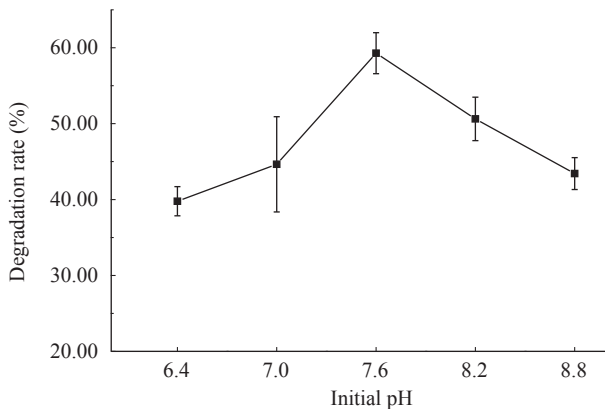


图2 初始 pH 对柴油降解率的影响

Figure 2 The effect of initial pH on degradation rate of diesel fuel

和反应体系中的溶氧情况。由图 3 可见, 在 160–220 r/min 范围内, 随转速的加快 CQ1 对柴油的降解率逐渐升高, 当转速为 220 r/min 时柴油的降解率可达 53.1%, 当转速升至 240 r/min 时, 柴油的降解率反而有所下降, 这说明 220 r/min 的速率最适于菌群 CQ1 的生长的, 有利于发挥柴油降解作用。

2.3.4 柴油浓度对柴油降解的影响: 在降解实验中, 柴油作为唯一碳源对微生物的生长会起到一定的影响。考察菌群 CQ1 在不同柴油浓度下对柴油的降解情况(图 4)。图 4 显示, 柴油浓度变化对菌群降解柴油效率的影响十分显著, 当培养基中柴油浓度在 1 g/L 时, 由于碳源不足导致柴油降解效果较差, 仅为 16.0%; 随着柴油浓度的提升, 菌群 CQ1 对柴油的降解率也逐渐升高, 20 g/L 时 CQ1 对柴油的降解率可达 60.1%; 但当柴油的浓度进一步升高至 40 g/L 时, 菌群 CQ1 降解柴油的能力大幅度降低, 这说明过高浓度的柴油同样会抑制菌群的生长。

2.4 培养时间对柴油降解的影响

根据 2.3 的结果, 将温度、pH、转速和柴油浓度分别调节至 30 °C、pH 7.6、220 r/min 和 20 g/L, 在不同时间取样测定柴油降解情况和培养液中 3 种细菌的生长状况, 结果见图 5。图 5 显示, CQ1 对柴油的降解在 3–9 d 内增幅较为明显, 培养 9 d 时降解率即达到 60% 以上, 此后柴油的降解率仍有小

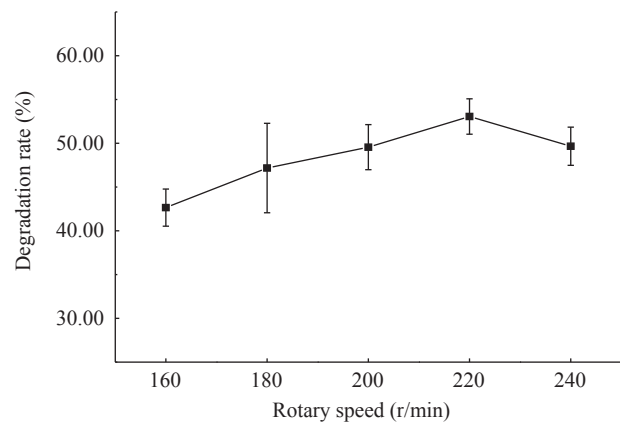


图3 转速对柴油降解率的影响

Figure 3 The effect of rotary speed on degradation rate of diesel fuel

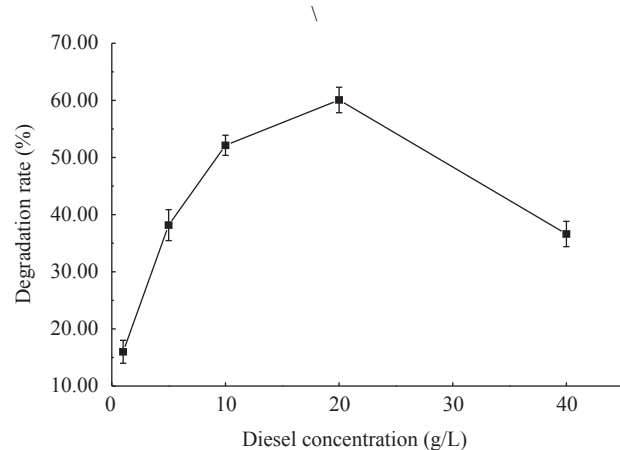


图4 柴油浓度对降解率的影响

Figure 4 The effect of diesel concentration on degradation rate

幅增长, 但变化不大。CQ1 中 3 种细菌生长状况差异较大, C1-8 在培养初期(1–5 d)即大量生长, 此后细胞数呈不断下降的趋势; C2-10 和 C3-13 的生长变化情况基本一致, 在培养 5–11 d 时细胞数激增, 培养 15 d 时平板菌落计数仍能达到 9×10^8 CFU/mL 以上, 表现出持续的柴油降解能力。

2.5 生物降解后柴油烷烃组分分析

采用 GC-FID 法对柴油降解后的残留组分定量分析。结果显示(图 6), 菌株 C1-8、C2-10、C3-13 和菌群 CQ1 对柴油总烷烃的去除率分别为 73.1%、70.0%、73.3% 和 86.6%。3 株细菌和菌群 CQ1 都能

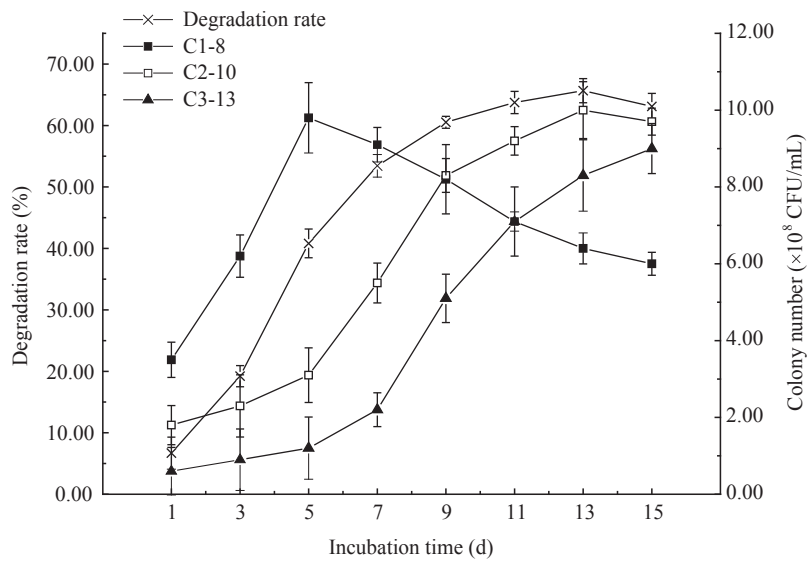


图5 培养时间对菌群降解柴油的影响

Figure 5 The effect of incubation time on the degradation of diesel fuel by the consortium

够降解 C11–C27 之间的正构烷烃,其中对 C21–C27 等中链烷烃降解率可以达到 100%,对 C11–C13、C16、C17、C20 等烷烃的降解率也都在 75%以上。除生物标志物姥鲛烷(Pr)外,菌群 CQ1 对各烷烃组分的去除情况显著好于单一细菌,表现出明显的协同作用。

2.6 柴油降解菌的鉴定

将 C1-8、C2-10 和 C3-13 三株细菌在 2216 平板上培养 48–72 h,观察其菌落及显微形态。C1-8 呈规则不透明的黄色菌落,直径<1 mm,表面光滑、湿润;镜检(1 000×) G⁺,菌体呈短杆状,(0.4–0.8) μm×(1.0–4.0) μm,单生或簇生。C2-10 为乳白色圆形菌落,直径 2–4 mm,表面光滑、突起,有粘液,边缘整齐;镜检 G⁻,菌体呈杆状,(0.5–0.9) μm×(1.2–3.0) μm。C3-13 呈不透明白色圆形菌落,直径 0.5–2.0 mm,凸起,边缘整齐;镜检 G⁺,菌体呈棒状,(0.5–0.8) μm×(1.0–5.0) μm,单生或对生。细菌的生理生化实验结果见表 3。

采用通用引物分别扩增 3 株细菌的 16S rRNA 基因序列,得到大小约为 1 400 bp 的片段,测序后

提交 GenBank,获得登录号分别为:C1-8 (KP114210)、C2-10 (KP114211)和 C3-13 (KP114214)。将序列与 GenBank 中近缘模式种进行 BLAST 分析,并采用邻接法构建系统发育树,选择 *Methanococcus vannielii* 作为外群,结果见图 7。

由图 7 可知,C1-8 与微杆菌属(*Microbacterium*)下几种细菌的模式株位于进化树的同一类群,经比对发现,C1-8 与菌株 *Microbacterium paraoxydans* CF36^T (AJ491806)和 *Microbacterium oxydans* (Y17227)的相似度均为 99%。C2-10 与粘着剑菌(*Ensifer adhaerens*) LC04^T (EU928872)、美洲中华根瘤菌(*Sinorhizobium americanum*) CFNE1156^T (AF506513)、费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) LMG6217^T (X67231)的相似度均为 97%。C3-13 与棒杆菌属(*Corynebacterium*)下几种细菌的模式株位于进化树的同一类群,且与变异棒杆(*Corynebacterium variabile*) DSM 44702^T (NR102874)的相似度达到 99%。结合生理生化实验结果,将 C1-8 鉴定为微杆菌,C2-10 为剑菌,C3-13 为变异棒杆菌。

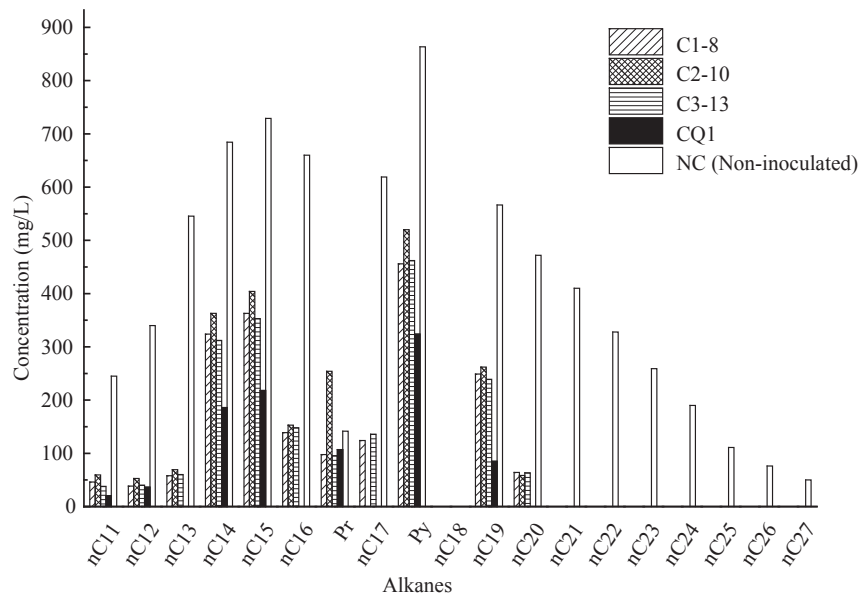


图 6 生物降解后柴油中烷烃含量
Figure 6 The content of alkanes after biodegradation

表 3 菌株的生理生化特征
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of the strains

指标 Index	菌株 Strains			指标 Index	菌株 Strains		
	C1-8	C2-10	C3-13		C1-8	C2-10	C3-13
产芽孢 Spore production	-	-	-	D-木糖产酸 D-xylose acid-producing	-	-	-
接触酶 Catalase	+	+	+	L-阿拉伯糖发酵 L-arabinose fermentation	-	+	-
氧化酶 Oxidase	-	+	-	D-甘露醇产酸 D-mannitol acid-producing	-	-	+
产 H ₂ S H ₂ S production	+	-	-	蔗糖产酸 Sucrose acid-producing	+	-	+
甲基红测定 M.R test	-	-	-	葡萄糖产气 Glucose gas-producing	-	-	-
V-P 测定 V-P test	-	-	ND	酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	ND	+	ND
柠檬酸盐 Citrate	-	-	-	淀粉水解 Amylolysis	-	-	-
硝酸盐 Nitrate	-	+	+	明胶液化 Gelatin hydrolysis	-	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	-	+	7% NaCl 生长 Growth in 7% NaCl	+	-	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	ND	+	-	生长温度 Growth temperature (°C)	15-40	15-40	10-45
葡萄糖产酸 Glucose acid-producing	-	+	-	吲哚产生 Indole production	-	ND	-

注：+：阳性反应；-：阴性反应；ND：未测定或不确定。
Note: +: Positive; -: Negative; ND: Not determined or uncertain.

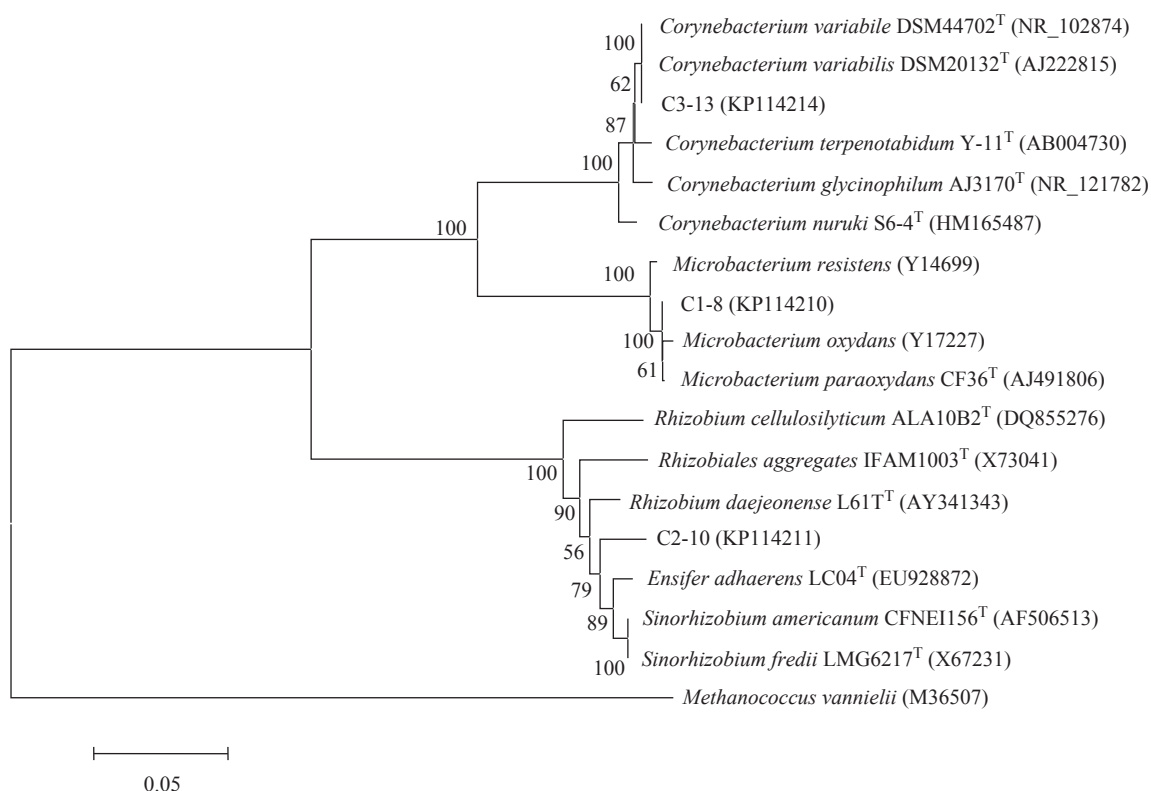


图 7 基于 16S rRNA 基因的菌株系统发育树

Figure 7 Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences

3 结论

高效的降解菌株是生物修复柴油污染的关键, 目前已报道海洋环境中存在多种细菌能够参与石油烃类的降解, 如: 食烷菌属、解环菌属 (*Cycloclasticus*)、深海弯菌属 (*Thalassolituus*)、海杆菌属 (*Marinobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、短杆菌属、红球菌属和不动杆菌属等^[9,18-19]。本研究从深圳港口海域分离到 16 株柴油降解菌, 对柴油的去除率最高可达 40.78%, 分布于微杆菌属、假单胞菌属、棒杆菌属、苍白杆菌 (*Ochrobactrum*) 及剑菌属等, 本文是首次发现剑菌属细菌的柴油降解作用。研究表明, 一些菌株能够产生表面活性剂, 提高对石油烃的摄取效率, 如: Hassanshahiand 等^[20]分离到的柴油食烷菌 (*Alcanivorax dieselolei*) PG-12 对原油的降解率可达 71%, 该菌株即是通过产表面活性剂降低了培养液

表面的张力、促进了石油的乳化作用。本文中, 假单胞菌 C2-22 及微杆菌 C1-5、C1-7、C1-8、C2-15 等 5 株细菌在兔血平板上菌落周围可见明显的透明圈, 细胞亲油性明显高于其他菌株, 培养液的表面张力也显著低于对照, 推测其能够分泌表面活性剂。据报道, 假单胞菌所产表面活性剂的类型主要为脂肽类和糖脂类^[21], 由于实验条件的限制, 本研究仅采用沉降法^[22]初步判定了假单胞菌 C2-22 所产表面活性剂的类型(过程略), 由于 C2-22 上清液经冷藏过夜后无沉淀产生, 其所含表面活性剂类型为糖脂类的可能性较大; 有关微杆菌产表面活性剂的研究目前仅有 1 篇相关报道^[23], 该研究发现微杆菌 MC3B-10 能够分泌糖-蛋白聚合类型的表面活性物质, 故 C1-8 等 4 株微杆菌的表面活性剂类型尚无法确定。本研究通过对培养液表面张力的测定间接评估了表面活性剂的产量, 相比于不接菌的处理,

表面张力的降低幅度在 36.3%–41.6%之间, 表现较为稳定。由于培养基营养成分、底物浓度、发酵条件等因素均会影响到表面活性剂的类型和产量^[21], 本文中 5 株细菌产表面活性剂的具体情况还需通过红外法、薄层层析法等手段做进一步分析。此外, 菌株 C2-16、C3-13 虽然也具有较好的亲油性和柴油去除效果, 但并未发现能够产生表面活性剂, 这可能与其细胞自身的特性有关, 也可能是由于其他代谢产物的作用。

混合菌群对石油烃的降解效果往往好于单一菌株, 构建过程中, 各菌株所处的生长阶段及接种量等因素均会影响到构建结果。本研究首先选择 5 株高效降解菌 C1-8、C2-10、C2-16、C2-22 和 C3-13 随机配伍, 将各菌培养至对数末期(此时是细菌浓度最高、活性较强的时期)并调节为一致的浓度, 优选出降解率最高的 1 种组合, 再通过正交试验优化各菌的接种量, 最终构建了由微杆菌 C1-8、剑菌 C2-10 和变异棒杆菌 C3-13 组成的菌群 CQ1, 实验室条件下对柴油的 7 d 去除率达到 51.0%, 相比于单菌提高了 10%以上, GC-FID 结果也表明该菌群对柴油的去除率要好于单一菌株。研究中发现, 3 株细菌对柴油各烷烃组分的降解情况较为相似, 可见它们并不是通过功能“互补”的方式强化降解效果, 而是存在着明显的协同效应, 这可能是由于菌株 C1-8 能够产生表面活性剂, 一定程度上提高了非表面活性剂产生菌 C2-10 和 C3-13 对各种碳源的利用, 也有可能是 3 种细菌在代谢途径上存在互补性^[24-25]。与已报道的海洋柴油降解菌群相比, CQ1 的柴油降解率(51.0%)略高于 Mukherji 等^[8]通过直接富集的方式得到的菌群 ESI (42%), 低于王鑫等^[26]将 6 株细菌等比例混合所构建的菌群(80%)。与之相比, 本文通过正交优化了 CQ1 中各菌株的接种比例, 明确了菌群结构; 降解特性方面, CQ1 对 C21–C27 范围内烷烃的降解率可达 100%, 而上述报道的菌群则对 C13–C19 范围内的烷烃有着最高的降解率^[26], 这可能是由于菌群的组成不同造成的, 也可

为今后构建更为高效的复合菌系提供数据参考。此外, CQ1 中剑菌 C2-10 是值得深入研究的新的柴油降解菌。

环境因素对微生物降解柴油具有较大的影响, 温度会影响到石油烃的物理状态、化学组成和微生物本身的代谢活性; pH 对微生物的代谢及细胞内的酶活性具有一定影响; 通气量(摇床转速)决定了反应体系中的溶氧水平; 柴油为微生物的生长提供了碳源和能源, 但浓度过高也会对微生物产生毒性作用^[17,27-28]。本文对菌群 CQ1 的环境适应性进行了探讨, 总体来看, CQ1 的环境适应范围较广, 尤其适于在中等温度、偏弱碱性和含油量较高的条件下发挥作用, 影响 CQ1 降解柴油的主要因素是温度、pH 和柴油浓度。最适条件下, CQ1 对柴油去除率达到 60%以上, 对总烷烃的降解率高达 86.6%, 实际应用中也可考虑将 CQ1 与多环芳烃降解菌相互配合, 进一步提高柴油的总体去除率。此外, 组成菌群 CQ1 的 3 株细菌均分离自近岸海域, 可能对含有复杂陆源污染物的近海环境适应能力较强, 具有良好的应用潜力。

从菌群 CQ1 中 3 种细菌的生长差异来看, 培养初期(1–5 d)发挥降解作用的主要是微杆菌 C1-8, 5 d 后剑菌 C2-10 和变异棒杆菌 C3-13 开始大量繁殖, 这对维持体系的平衡、持续降解柴油起到重要的作用。目前已有关于微杆菌和棒杆菌在降解石油烃方面的报道^[29-30], 但对剑菌属细菌生物修复的研究主要集中在乙草胺、尼古丁等污染物^[31-32], 本文首次研究了其在柴油降解方面的作用。剑菌又名中华根瘤菌, 主要来源于土壤^[33], 因此剑菌 C2-10 也很可能是来自陆源环境, 但该菌株在人工海水培养基中可以良好生长, 且能够与另外 2 种细菌构成菌群并产生协同效应, 因此该菌株的环境适应能力较强, 在柴油污染生物修复中应用价值极大。近海污染的生物修复往往受到气候、陆源环境等多种因素的制约, 菌群 CQ1 对柴油的去除效果还有待现场试验加以证实。

参考文献

- [1] Sun M, Shen XR, Hou DY, et al. Isolation, identification of alkane-degrading bacteria strain *Acinetobacter* sp. W3 and alkane hydroxylase genes analysis[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(6): 159-165 (in Chinese)
孙敏, 沈先荣, 侯登勇, 等. 高效柴油降解菌 *Acinetobacter* sp. W3 分离鉴定及降解酶基因扩增分析[J]. 生物技术通报, 2012(6): 159-165
- [2] Gallego JLR, Loredó J, Llamas JF, et al. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation[J]. Biodegradation, 2001, 12(5): 325-335
- [3] Mukherjee AK, Bordoloi NK. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011, 18(3): 471-478
- [4] Wu FS, Wang L, Huang ZY, et al. Screening and identification of oil-degrading marine bacteria and analysis of their functional genes[J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(9): 58-65 (in Chinese)
吴福顺, 王龙, 黄泽瑜, 等. 海洋石油降解菌的筛选鉴定及其功能基因研究[J]. 中国海洋大学学报, 2014, 44(9): 58-65
- [5] Ollivier B, Magot M. Petroleum Microbiology[M]. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2005
- [6] Zhang HL, Yang Q, Zhao M. Research on the construction of oil-degrading bacteria colony[J]. Environmental Protection of Oil & Gas Fields, 2013, 23(3): 19-21 (in Chinese)
张海玲, 杨琴, 赵敏. 石油降解菌群构建的研究[J]. 油气田环境保护, 2013, 23(3): 19-21
- [7] He LY, Dang Z, Tang X, et al. Biodegradation characteristics of crude oil by mixed bacterial strains[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(6): 1220-1227 (in Chinese)
何丽媛, 党志, 唐霞, 等. 混合菌对原油的降解及其降解性能的研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30(6): 1220-1227
- [8] Mukherji S, Jagadevan S, Mohapatra G, et al. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field[J]. Bioresource Technology, 2004, 95(3): 281-286
- [9] Tan TF, Shao ZZ. Construction of marine oil biodegradation Bacterial consortium and its dynamic change in the process of oil consumption[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2006, 45(S1): 262-266 (in Chinese)
谭田丰, 邵宗泽. 海洋石油降解菌群构建及其在降解过程中的动态分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(增刊): 262-266
- [10] Liu CL, Shao ZZ. Isolation and characterization of oil-degrading marine micro-organisms[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 27(4): 114-120 (in Chinese)
刘陈立, 邵宗泽. 海洋石油降解微生物的分离鉴定[J]. 海洋学报, 2005, 27(4): 114-120
- [11] Sun M. Isolation and identification of marine diesel oil degrading bacterium and analysis of its alkane hydroxylase genes[D]. Shanghai: Master's Thesis of The Second Military Medical University, 2012 (in Chinese)
孙敏. 海港柴油降解菌分离鉴定及其降解酶基因分析[D]. 上海: 第二军医大学硕士学位论文, 2012
- [12] Najafi AR, Rahimpour MR, Jahanmiri AH, et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology[J]. Chemical Engineering Journal, 2010, 163(3): 188-194
- [13] Chandran P, Das N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil[J]. International Journal of Engineering Science and Technology, 2010, 2(12): 6942-6953
- [14] Bruheim P, Bredholt H, Eimhjellen K. Bacterial degradation of emulsified crude oil and the effect of various surfactants[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(1): 17-22
- [15] Kirk JL, Klironomos JN, Lee H, et al. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil[J]. Environmental Pollution, 2005, 133(3): 455-465
- [16] Dong XZ, Cai MY. Manual of Systematic Determination General Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 353-387 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-387
- [17] Margesin R, Schinner F. Effect of temperature on oil degradation by a psychrotrophic yeast in liquid culture and in soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 24(3): 243-249
- [18] Adebuseye SA, Ilori MO, Amund OO, et al. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(8): 1149-1159
- [19] Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN, et al. Obligate oil-degrading marine bacteria[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(3): 257-266
- [20] Hassanshahiand M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(1): 7-12
- [21] Souza EC, Vessoni-Penna TC, de Souza Oliveira RP. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2014, 89: 88-94
- [22] Leng KL, Chu XM, Zhang HZ, et al. Study on analytical methods of microbial metabolites and degradation to petroleum hydrocarbon[J]. Marine Fisheries Research, 2001, 22(2): 57-61 (in Chinese)
冷凯良, 楚晓珉, 张辉珍, 等. 微生物对石油烃降解代谢产物的分析方法研究[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(2): 57-61
- [23] Ortega-Morales BO, Santiago-Garcia JL, Chan-Bacab MJ, et al. Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(1): 254-264
- [24] Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(1): 156-164
- [25] Cui ZS, Zheng L, Yang BJ, et al. Synergic effect of marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria in oil biodegradation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 350-359 (in Chinese)
崔志松, 郑立, 杨佰娟, 等. 两种海洋专性解烃菌降解石油的协同效应[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 350-359
- [26] Wang X, Wang XJ, Liu M, et al. Construction of high-effective microbial consortium and characteristics of oil biodegrading[J]. Marine Environmental Science, 2014, 33(4): 576-579 (in Chinese)
王鑫, 王学江, 刘免, 等. 高效石油降解菌群构建及降解性能[J]. 海洋环境科学, 2014, 33(4): 576-579
- [27] Ayotamuno MJ, Kogbara RB, Ogaji SOT, et al. Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria[J]. Applied Energy, 2006, 83(11): 1249-1257
- [28] He YH, Hu LF, Shen DS, et al. Progress in contaminated environment bioremediation[J]. Bulletin of Science and Technology, 2007, 23(2): 271-276 (in Chinese)

- 贺永华, 胡立芳, 沈东升, 等. 污染环境生物修复技术研究进展[J]. 科技通报, 2007, 23(2): 271-276
- [29] Bao MT, Chen QG, Fan XN, et al. Isolation of hydrocarbon degradation bacteria and optimization of degradation condition[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(6): 115-120 (in Chinese)
- 包木太, 陈庆国, 范晓宁, 等. 海洋石油降解微生物的筛选及降解条件优化[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(6): 115-120
- [30] Hassanshahian M, Zeynalipour MS, Musa FH. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance)[J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 82(1/2): 39-44
- [31] Dong B, Wang FH, Lin AJ, et al. Isolation and degradation characteristics of acetochlor-degrading strain A-3[J]. Environmental Science, 2011, 32(2): 542-547 (in Chinese)
- 董滨, 王凤花, 林爱军, 等. 乙草胺降解菌 A-3的筛选及其降解特性[J]. 环境科学, 2011, 32(2): 542-547
- [32] Lei LP, Zhang W, Wei HL, et al. Characterization of a novel nicotine-degrading *Ensifer* sp. strain N7 isolated from tobacco rhizosphere[J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(2): 247-252
- [33] Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. The genus name *Sinorhizobium* Chen et al. 1988 is a later synonym of *Ensifer casida* 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name '*Sinorhizobium adhaerens*' is not validly published. Opinion 84[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 1973

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出, 多于3人时列出前3人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377

Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)

王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17

Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)

沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87

Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)

刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.2474)