

研究报告

河南省白龟山水库下游水体氨化细菌分离鉴定及其降解有机氮条件

郭端强 方改霞 段敬霞 曾建 王曼 万亚涛 单林娜*

(河南城建学院 生命科学与工程学院 河南 平顶山 467036)

摘要:【目的】从河南省白龟山水库下游水体中分离筛选氨化细菌,并研究其降解有机氮的条件。【方法】利用选择性培养基从微污染源水中筛选氨化细菌,进一步比较了不同氨化细菌降解有机氮的效果;采用单因子法研究菌株 N24 降解有机氮的条件;通过形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析对菌株 N24 进行鉴定。【结果】从微污染源水中分离筛选到 4 株氨化细菌,其中菌株 N24 培养 48 h 后氨氮浓度较高,达到 138.926 mg/L。菌株 N24 降解有机氮最适温度为 30–35 °C,最适初始 pH 值为 6.0,500 mL 摇瓶最适装液量 75 mL。菌株 N24 被鉴定为弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*, GenBank 登录号: JX291240.1),其 16S rRNA 基因序列与基因库中芽孢杆菌属菌株的 16S rRNA 基因序列有 99%–100% 的相似性,与弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus* IFO15717^T, GenBank 登录号: NR024691.1)的遗传距离最近。【结论】菌株 N24 是一株高效降解有机氮的弯曲芽孢杆菌;本研究丰富了降解有机氮菌种资源,可为该菌在环境工程领域的实际应用提供理论基础。

关键词: 氨化细菌, 弯曲芽孢杆菌, 有机氮, 降解条件, 系统发育分析

Isolation and identification of ammonifying bacteria in the downstream waters of Baiguishan Reservoir in Henan Province and conditions of degrading organic nitrogen

GUO Duan-Qiang FANG Gai-Xia DUAN Jing-Xia ZENG Jian WANG Man
WAN Ya-Tao SHAN Lin-Na*

(College of Life Science and Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan, Henan 467036, China)

Abstract: [Objective] The aims of the present study were to isolate and screen ammonifying bacteria, and to examine the conditions for their degradation of organic nitrogen. [Methods] Ammonifying bacteria were isolated from the micro-polluted raw water collected from the

基金项目: 河南省科技攻关重点项目(No. 092102310069); 河南城建学院校级项目(No. 2010JYB010)

*通讯作者: Tel: 86-375-2089072; E-mail: lnshan@hncj.edu.cn

收稿日期: 2013-03-22; 接受日期: 2013-05-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

downstream water bodies of the Baiguishan Reservoir in Henan Province. The obtained nitrifying bacteria were studied for their capabilities to degrade organic nitrogen; The conditions for strain N24 to remove organic nitrogen were assessed by using single factor method. Strain N24 was identified by morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene-base phylogenetic analyses. **[Results]** Four ammonifying bacterial strains were isolated from the collected water samples, The $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration reached 138.926 mg/L after 40 hours' fermentation of strain N24. The optimal conditions for strain N24 to remove organic nitrogen were about 30–35 °C, initial pH 6.0, and medium volume 75 mL. Strain N24 was identified as *Bacillus flexus* (GenBank accession number: JX291240.1). Its 16S rRNA gene sequence had 99%–100% similarity with those of *Bacillus* sp. deposited in GenBank, and showed closest relatedness to *Bacillus flexus* IFO15717^T (GenBank accession number: NR024691.1). **[Conclusion]** N24 is an efficient organic nitrogen-degrading *Bacillus flexus*; The present study enriched the microbial resources for organic nitrogen removal and provided a theoretical framework for the practical use of strain N24 in environmental engineering.

Keywords: Ammonifying bacteria, *Bacillus flexus*, Organic nitrogen, Degrading conditions, Phylogenetic analysis

随着工业化和城市化进程的加快,我国含氮废水进入水体引发的水质恶化及富营养化问题日益严重^[1],氮素污染亟待解决。采用物理法、化学法、生物法等^[2-6]方法降解氨氮、亚硝酸氮等无机氮,已进行了大量的相关研究。到目前为止,有关有机氮的氨化过程研究相对较少。这是由于水体中的有机氮成分复杂,缺乏测定含氮有机物氨化的直接方法,只能间接测定^[7-8],采用产生氨的总量作为有机氮去除的指标。因此,开展该类氨化细菌生物学特性的研究具有重要的理论价值和实践意义。

本实验从河南省平顶山市白龟山水库大坝下游水体分离得到4株氨化菌株,并对菌株N24进行了形态、生理生化鉴定和16S rRNA基因系统进化分析。对N24的氨化能力及影响因素温度、pH和摇瓶装液量进行了初步探讨,旨在丰富有机氮去除菌种资源的同时,为氨化细菌用于生物脱氮的工程实践提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

氨化细菌富集培养基(g/L): 蛋白胨 5, NaCl 0.25, KCl 0.3, K_2HPO_4 0.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 超纯水 1 000 mL, pH 7.2,

1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

氨化细菌分离培养基(g/L): 蛋白胨 5, NaCl 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 20, 超纯水 1 000 mL, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。以 2% (质量分数)的琼脂糖作平板分离支持物。

1.2 菌种的富集及分离培养

1.2.1 菌种来源: 菌种分离样品采自河南省平顶山市白龟山水库大坝下游水体。

1.2.2 氨化细菌的富集培养: 取 50 mL 泥水混合物置于装有玻璃珠的锥形瓶中, 30 °C、120 r/min 的空气浴摇床中振荡 30 min, 使泥水充分混匀, 破碎后的泥水按 10%的比例接种至装有氨化细菌富集培养基的锥形瓶中。富集培养过程中, 用纳氏试剂检验培养液中 NH_4^+ 的产生情况, 根据是否变黄和黄色的深浅可以指示是否有 NH_4^+ 生成和生成的量, 如呈现黄色, 说明生成 NH_4^+ , 此种细菌可将有机氮降解为 NH_4^+ , 可判断为氨化细菌。吸取富集液至装有新鲜氨化培养液的锥形瓶中继续富集培养, 不断淘汰杂菌, 富集培养过程中设空白对照。

1.2.3 氨化细菌的分离培养: 选取显黄色深的富集培养液, 利用氨化细菌分离培养基, 采用平板划线

法分离菌种。将划线后平板放于 30 °C 恒温箱中倒置培养,观察记录菌落的形态、颜色等生长情况,待长出针尖大小的菌落后,挑取单菌落至新的分离平板,经过多次平板划线纯化,直至得到相对优势的氨化细菌菌株。分离培养过程中设空白对照。

1.3 分离菌株的氨化效果检测

将筛选菌株于 30 °C、120 r/min 摇床振荡培养 18 h,此时 OD_{560} 值为 0.8 左右。按 10%的接种量接种到装有 100 mL 氨化细菌分离培养基的 500 mL 三角瓶中,30 °C、120 r/min 摇床振荡培养,每隔 4 h 取样一次,每次取样 3 瓶,先测定细菌光密度 OD_{560} ,以吸光度为纵坐标,时间为横坐标绘制生长曲线。然后经 6 000 r/min 离心,取上清液采用纳氏试剂光度法^[9]测定 NH_4^+-N 浓度。以未接种的氨化细菌分离培养基作为空白对照,实验设 3 个重复。

1.4 温度、pH、摇瓶装液量对菌株氨化效果的影响

实验菌株经纯培养 18 h 后,按 10%的添加量接种到 100 mL 氨化细菌分离培养基中,通过调节温度、pH 值、摇瓶装液量,120 r/min 恒温摇床培养 40 h 后,测定培养液中的 NH_4^+-N 浓度。考察条件变化对氨化效果的影响。除不同温度实验外,其余均 30 °C 培养,实验设 3 个重复。

1.5 形态学鉴定与生理生化鉴定

菌株的形态学鉴定通过革兰氏染色后用光学显微镜油镜观察;生理生化鉴定根据《常见细菌系统鉴定手册》^[10-11]进行。

1.6 16S rRNA 序列测定和系统发育分析

用于 16S rRNA 基因 PCR 反应的引物为通用引物,PF:5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3';PR:5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA-3';大连宝生物公司合成。PCR 反应体系(50 μ L):10 \times PCR 缓冲液 5 μ L,MgCl₂(25 mmol/L) 3.5 μ L,模板 DNA 0.5 μ L,PF 和 PR (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L,dNTPs (20 mmol/L) 2 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)

1 μ L,超纯水 37 μ L。PCR 扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 60 s,50 °C 60 s,72 °C 90 s,共 30 个循环;72 °C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,通过和 Marker (DL2000)比较片段大小确定是否为目的片段。含有目的片段的 PCR 产物用 TIANGEN DNA 胶回收试剂盒进行片段回收。回收产物送往宝生物工程有限公司测序。

将所测序列与 GenBank 核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行比对分析,从中挑选部分相似性高且是有效发表的典型菌株,利用 CustalX 2.1 进行多序列比对^[12],系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算^[13],用 MEGA 5.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件包采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树^[14]。重复取样 1 000 次进行靴值(Bootstrap value)分析以评估系统进化树的拓扑结构稳定性^[15]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选

经过富集培养,划线分离得到 11 株氨化菌株,通过进一步测定比较其氨化能力,筛选到 4 株氨化能力较强的菌株。

2.2 氨化细菌的生长曲线

由图 1 看出,N13 在 8–16 h 为对数期,16–28 h 为稳定期,28 h 后进入衰亡期;NP13 在 8–12 h 为对数期,12–24 h 为稳定期,24 h 后进入衰亡期;

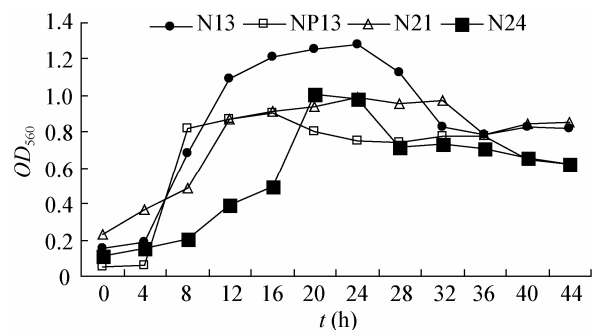


图 1 氨化细菌生长曲线

Figure 1 The growth curves of ammonibacterium

N21 在 8–16 h 为对数期, 16–36 h 为稳定期, 36 h 后进入衰亡期; N24 在 12–24 h 为对数期, 24–28 h 为稳定期, 28 h 后进入衰亡期。

2.3 氨化菌株的氨化效果检测

由图 2 看出, 接种氨化细菌后, 随着培养液中菌体的生长氨氮浓度逐渐增加。菌株 N13 发酵液在 32 h 氨氮浓度达到 68.44 mg/L; 菌株 NP13 发酵液在 36 h 氨氮浓度达到 76.91 mg/L; 菌株 N21 发酵液在 28 h 氨氮浓度达到 80.21 mg/L; 菌株 N24 发酵液在 36 h 氨氮浓度达到 138.41 mg/L。表明 4 株氨化细菌对有机氮有明显的去除效果。

2.4 温度、pH、摇瓶装液量对氨化效果的影响

2.4.1 温度对菌株 N24 氨化性能的影响: 图 3 实验结果表明, 温度对菌株 N24 的氨化作用影响明显。在 30–35 °C 温度范围内都能够较好的去除有机氮。

2.4.2 pH 对菌株 N24 氨化性能的影响: 图 4 实验结果表明, pH 值对菌株 N24 的氨化能力影响显著。

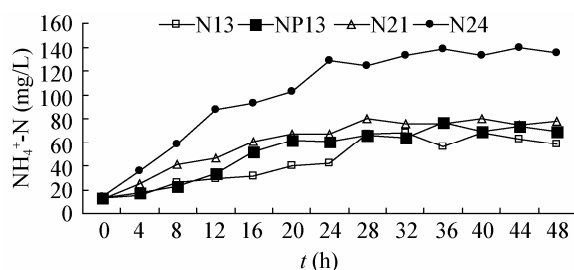


图 2 氨化细菌的氨化作用

Figure 2 Ammonification of ammonibacterium

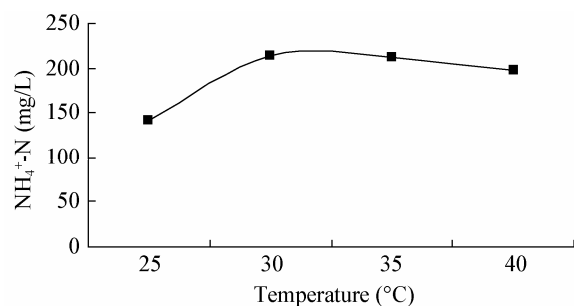


图 3 温度对菌株 N24 氨化作用的影响

Figure 3 Effect of temperature on ammonification of strain N24

pH 为 6 时培养液中氨氮浓度达到 228.09 mg/L, 去除有机氮效果最好。由此可知, 菌株 N24 的氨化作用最适宜的 pH 为 6。

2.4.3 摇瓶装液量对菌株 N24 氨化性能的影响:

图 5 实验结果表明, 摇瓶装液量对菌株 N24 的氨化能力有一定影响。摇瓶装液量为 75 mL 时, 培养液中氨氮浓度可达到 221.49 mg/L, 去除有机氮效果最好。由上可知, 菌株 N24 的氨化作用最适宜的摇瓶装液量为 75 mL。

2.5 菌株的形态与生理生化鉴定

菌株 N24 在氨化细菌固体培养基上培养 24 h, 菌落边缘整齐、圆形扁平状、表面光滑、呈乳白色、不透明, 菌落直径约 1.1 mm。培养 48 h 后显微镜油镜照片(图 6)显示, 菌株 N24 为杆状, 革兰氏染色阳性, 有芽孢。生理生化鉴定结果如表 1 所示。

2.6 16S rRNA 基因序列测定和系统发育分析

获得菌株 N24 的 16S rRNA 基因序列 (1 492 bp), 在 GenBank 序列登录号为 JX291240.1。在

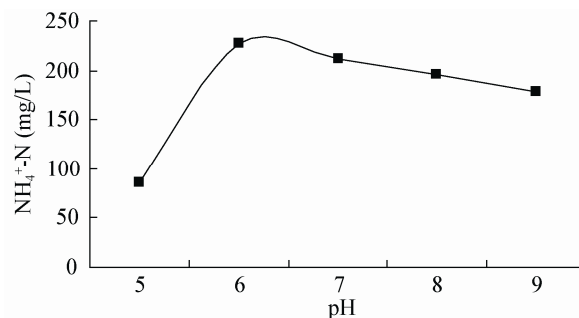


图 4 pH 对菌株 N24 氨化作用的影响

Figure 4 Effect of pH on ammonification of strain N24

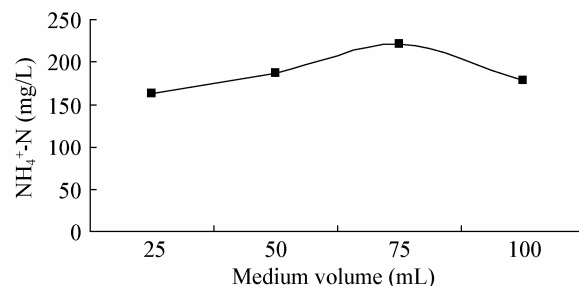


图 5 摇瓶装液量对菌株 N24 氨化作用的影响

Figure 5 Effect of medium volume on ammonification of strain N24

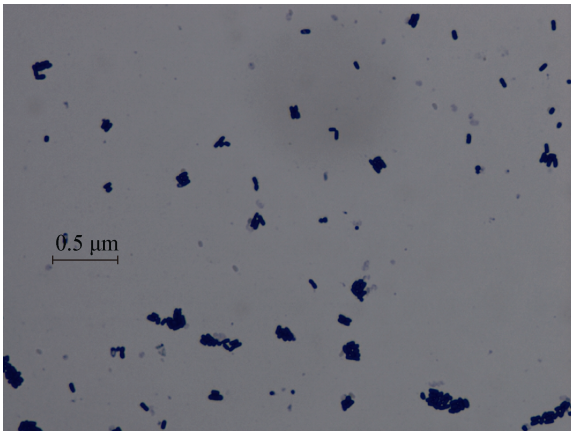


图6 菌株 N24的显微镜照片
Figure 6 Micrograph of strain N24

GenBank 数据库中通过 BLAST 方法比对，结果表明，菌株 N24 与多株 *Bacillus* sp.的相似性达 99%–100%。采用 MEGA 5.1 软件用 N-J 法构建进化树，确定其进化地位，结果如图 7 所示。从图 7 可知，N24 与弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)的遗传距离最近，与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)

的遗传距离较近，而与尼氏芽孢杆菌(*Bacillus nealsonii*)的遗传距离最远，推测 N24 为弯曲芽孢杆菌 *Bacillus flexus*。

表 1 菌株 N24 部分生理生化特征 Table 1 Partly biochemical and physiological characteristics of strain N24	
实验项目 Item	结果 Results
革兰氏染色 Gram staining	G ⁺
芽孢染色 Endospore staining	+
葡萄糖 Glucose	+
蔗糖 Sucrose	+
乳糖 Lactose	-
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
甲基红试验 M. R. test	-
吲哚试验 Indole test	+
穿刺接种试验 Puncture test of semi-solid media	+

注：+：阳性；-：阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

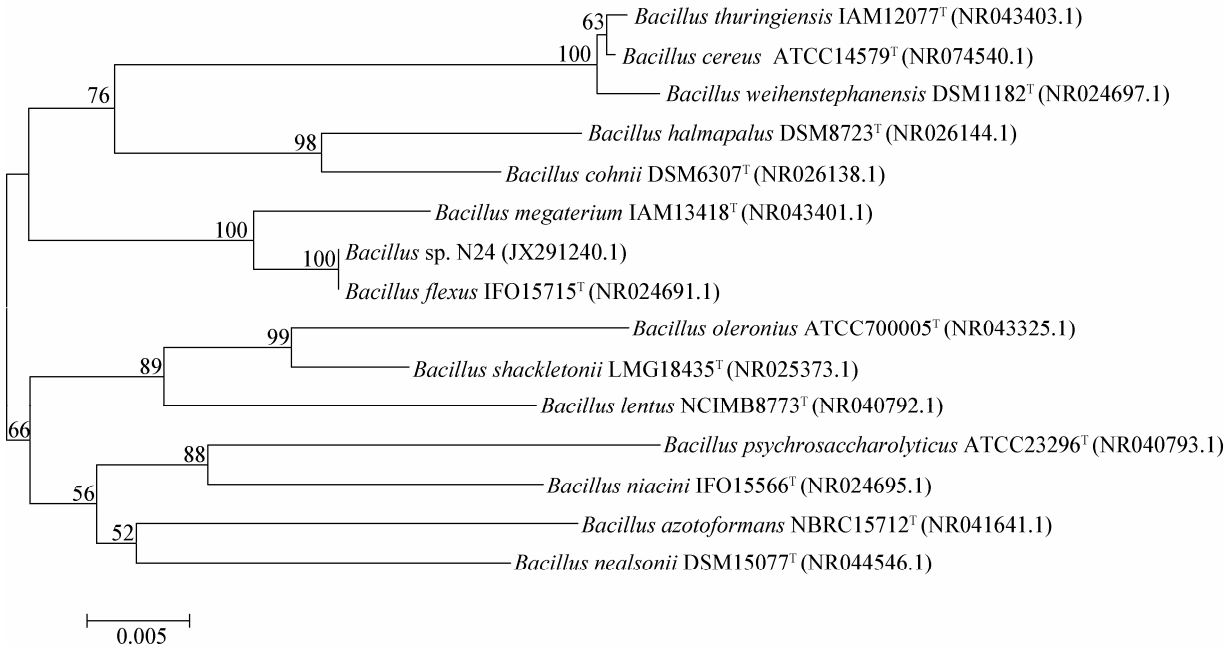


图 7 根据 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树
Figure 7 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

Note: Bar: 5‰ sequence divergence. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (>50%) based on Neighbour-Joining analyses of 1 000 resampled data sets. Numbers in parentheses represent the sequences accession numbers in GenBank.

3 讨论

本研究从河南省平顶山市白龟山水库大坝下游水体样品中筛选得到 4 株氨化细菌, 比较了 4 株菌的生长曲线和氨化效果, 细菌处于生长曲线的对数期时, 发酵液中氨氮浓度增加最快, 细菌生长进入稳定期后, 发酵液中氨氮浓度缓慢增加, 在衰亡期, 发酵液中氨氮浓度达到最高值。选取降解有机氮效果最好的菌株 N24 进行进一步研究。

对菌株 N24 氨化特性研究表明, 菌株生长和降解有机氮是同步进行的, 氨化作用主要发生在对数生长期, 随着菌体的快速增殖, 水体中氨氮浓度会迅速上升, 而且可以在较长时间内发挥降解作用, 说明该菌株可作为造纸、食品和发酵等工业有机废水降解有机氮的有益候选菌株。实验结果与李辉等^[16]研究结果相符。

影响微生物生长繁殖的外界因素很多, 除营养条件外, 主要有温度、pH、溶解氧等^[17]。本实验重点对这 3 种因素进行了研究。结果表明, 水温在 30–35 °C 时, 该菌可以正常生长, 并保持较高的降解有机氮活性。这可能与该菌生长及脱氨基酶的耐热机制有关, 需要进一步研究。pH 5 时, N24 降解有机氮效果不好, 在 pH 6–8 的条件下有较高的有机氮去除率, 可在较宽的 pH 范围内保持正常生长及降解有机氮性能的稳定发挥。摇瓶装液量实验表明, 溶解氧对菌株 N24 降解有机氮有一定影响。在装液量 75–100 mL 的范围内随着装液量的减少菌株 N24 去除有机氮效果逐渐提高, 在摇瓶装液量 75 mL 的条件下去除有机氮效果最好, 装液量继续减少, 去除有机氮效果逐渐下降。说明在降解有机氮过程中溶解氧可能存在一个阈值, 这个阈值根据微生物种类、底物及环境条件的变化而不同, 这一现象与李卫芬等^[18]、张苗等^[19]的报道中溶解氧对好氧反硝化细菌的影响相似。

多相分类法是当前细菌系统分类研究中最有效的方法。本文通过形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析对 N24 进行了初步鉴定。菌株 N24 具有与 *Bacillus* sp. 相同的一系列表型特征, 例

如革兰氏染色阳性、杆状、有芽孢、能利用葡萄糖等碳水化合物产酸, 系统发育分析显示, N24 与弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)的亲缘关系最近, 初步鉴定菌株 N24 为弯曲芽孢杆菌 *Bacillus flexus*。当然, 要进一步确定其分类地位的正确性, 还需结合 (G+C)mol% 值的测定、DNA-DNA 分子杂交等其他现代分类学方法。

绝大多数异养型微生物, 包括细菌、真菌、放线菌, 都有不同的蛋白质分解能力。试验证明本文筛选到的弯曲芽孢杆菌 *Bacillus flexus* N24 能有效降低水体中有机氮含量, 但要将其应用到环境工程实践中, 还需对其降解机理、生物安全性及使用方法等多方面内容进行进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国环境保护部. 2011 年中国环境状况公报[R]. 北京: 中华人民共和国环境保护部公报编辑部, 2012.
- [2] 段金明, 林锦美, 方宏达, 等. 改性钢渣吸附氨氮和磷的特性研究[J]. 环境工程学报, 2012, 6(1): 201-205.
- [3] 张登宇, 刘方, 陈思琳, 等. 生物质炭对垃圾渗滤液中氨氮去除效果的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(14): 264-268.
- [4] 陈少华, 汪家权, 夏雪兰, 等. 双室微生物燃料电池同时去除废水中的苯酚和硝酸盐[J]. 环境工程学报, 2012, 6(3): 891-895.
- [5] 王会聪, 曹海鹏, 何珊, 等. 一株养殖水体中亚硝酸盐去除菌的鉴定及其去除条件[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 154-161.
- [6] 郭端强, 刘海龙, 万亚涛, 等. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 生物技术通报, 2012(10): 205-209.
- [7] 黎文, 白英臣, 王立英, 等. 淡水湖泊水体中溶解有机氮测定方法的对比[J]. 湖泊科学, 2006, 18(1): 63-68.
- [8] Sharp JH, Rinker KR, Savidge KB, et al. A preliminary methods comparison for measurement of dissolved organic nitrogen in seawater[J]. Marine Chemistry, 2002, 78: 171-184.
- [9] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 230-290.
- [10] 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: 188-189.
- [11] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 28-33, 116-123.
- [12] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X

- windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24(4): 876-488.
- [13] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111-120.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4: 406-425.
- [15] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [16] 李辉, 徐新阳, 李培军, 等. 人工湿地中氨化细菌去除有机氮的效果[J]. 环境工程学报, 2008, 2(8): 1044-1047.
- [17] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011: 160-165.
- [18] 李卫芬, 傅罗琴, 邓斌, 等. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 环境科学, 2011, 32(8): 2403-2408.
- [19] 张苗, 黄少斌. 高温好氧反硝化菌的分离鉴定及其反硝化性能研究[J]. 环境科学, 2011, 32(1): 259-265.

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、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <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”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

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 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

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。我刊的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:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华珞等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2014-00-00; 接受日期: 2014-00-00

(下转 p.250)