

裂褶菌 cfcc7252 菌株对孔雀石绿染料的高效降解

郑红叶 薛雅蓉 刘常宏*

(南京大学生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室 江苏 南京 210023)

摘要: 【目的】评价裂褶菌 cfcc7252 菌株降解孔雀石绿(Malachite Green, MG)的能力及其潜在的应用价值。【方法】采用单因子液体培养实验,研究了通气、pH、温度、碳源和氮源种类及浓度、金属离子、盐度、染料浓度对该菌降解效果的影响;采用平皿培养实验,利用植物种子萌发和微生物抑菌实验对降解产物进行毒性测试。【结果】研究表明,裂褶菌 cfcc7252 菌株在好氧和厌氧条件下均能高效降解 MG。该菌在 10.0 g/L 葡萄糖, 5.0 g/L 酵母浸粉, 0.01 mmol/L Zn²⁺, pH 为 4.0 的液体培养基中培养 36 h, 对 350 mg/L 的 MG 降解率达 67.8%; 连续降解 7 次后, 其降解率还能保持在 95.4% 以上。此外, 该菌在盐度低于 10.20% 时, 其对 MG 的降解率均达到 98% 以上。对植物、微生物的毒性测试结果表明, MG 降解产物对红豆、豌豆等植物、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞杆菌等微生物基本没有毒性。【结论】裂褶菌 cfcc7252 菌株在处理以 MG 为主的染料废水时具有很强的应用潜力。

关键词: 裂褶菌 cfcc7252 菌株, 孔雀石绿, 降解, 毒性检测

Degradation of malachite green dye by *Schizophyllum commune* cfcc7252

ZHENG Hong-Ye XUE Ya-Rong LIU Chang-Hong*

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the ability of *Schizophyllum commune* cfcc7252 in degrading Malachite Green (MG) dye. [Methods] Effect of oxygen demand, initial pH value, temperature, carbon source, nitrogen source, salinity and initial dye concentration on MG biodegradation by *S. commune* cfcc7252 was studied in flasks containing liquid cultures based on single factor experiment design. The toxicity of the biodegraded products of MG on plant seed germination and microbial growth was determined in petri dishes. [Results] *Schizophyllum commune* cfcc7252 could degrade MG under both aerobic and anaerobic conditions; 67.8% MG (initial concentration: 350 mg/L) was degraded under the culture condition of 10.0 g/L glucose, 5.0 g/L yeast extract, 0.01 mmol/L Zn²⁺ and pH 4.0 for 36 h.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31272081, 31471810); Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20130091110036)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-25-89685469; E-mail: chliu@nju.edu.cn

Received: January 31, 2016; Accepted: April 13, 2016; Published online (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31272081, 31471810); 高等学校博士学科点专项科研项目(No. 20130091110036)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-25-89685469; E-mail: chliu@nju.edu.cn

收稿日期: 2016-01-31; 接受日期: 2016-04-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-04

After continuous bleaching for 7 rounds, the degradation rate still reached over 95.4%. In addition, the degradation rate of *S. commune* cfcc7252 on MG was as high as 98% if the salinity of the culture was less than 10.20%. Toxicity test showed that the biodegraded products of MG were rarely toxic to plants of *Vigna umbellata* and *Vigna unguiculata* and microorganisms of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*. **[Conclusion]** *Schizophyllum commune* cfcc7252 has strong potential to treat MG contaminated wastewater.

Keywords: *Schizophyllum commune* cfcc7252, Malachite Green, Degradation, Toxicity

合成染料广泛应用于纺织、塑料、印刷、化妆品、皮革、医药和快餐等行业,每年全世界合成染料约 80–90 万 t,至少有 10%–15%的合成染料通过废水排放到水体中,合成染料已成为世界最大的水体污染源之一^[1-2]。孔雀石绿(Malachite green, MG)是一种广泛应用于棉、木、丝、革等行业的三苯甲烷类染料,同时由于其具有抗寄生虫、真菌和细菌等功能,被广泛应用在水产养殖中^[3]。然而, MG 对水生和陆生动物有广泛毒性,在环境中高残留会对动物的肝脏、鳃、肾、肠、性腺和垂体促性腺等细胞组织产生不利影响,其衍生物对人类具有潜在的致癌性。因此,包括美国、加拿大、欧洲联盟成员国等国家已经禁止在水产养殖中使用 MG^[3-4]。目前用于 MG 废水处理方法主要有物理、化学的方法,例如吸附法、超声法、化学催化法^[5-10]。但这些方法存在成本高、效率低、通用性差、干扰性强的缺点^[11],因而发展有效的生物处理染料废水的方法具有重要意义^[11-12]。生物处理染料废水的方法主要是指微生物对染料废水的处理,该处理方法具有经济、环境友好等优点,包括白腐真菌脱色、细菌脱色等,它可以将染料分子进行降解或转化成无色、低毒甚至无毒的化合物,受到了学者们的极大关注^[13-16]。白腐真菌属于担子菌纲(Basidiomycetes),腐生在树木或木材上,因引起木质白色腐烂而得此名,如黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、毛栓菌(*Trametes trogii*)、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)和烟管菌(*Bjerkandera adusta*)等。白腐真菌因其能够产胞外、无底物特异性和立体选择性的还原酶和木质素降解酶系[包括 NADH-DCIP 还原酶、漆酶(Laccase,

Lac)、锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)和木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)等],对多种污染物表现出广谱降解特性^[17-18],受到越来越多的研究者关注。据我们所知,革孔菌(*Corioloopsis* sp.)^[17]、污叉丝孔菌(*Dichomitus squalens*)^[19]、灵芝(*Ganoderma lucidum*)^[20]等虽然能够降解 MG,但有降解效率低、耗时长、菌株耐受性差、需要添加诱导因子等缺点。本文报道一株具有降解 MG 能力的裂褶菌 cfcc7252 菌株,并希望通过研究该菌对 MG 的降解能力、降解条件以及降解产物的毒性,开发出一种经济、高效和环境友好型的生物降解菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 裂褶菌(*Schizophyllum commune*) cfcc7252 菌株,购自中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所。

1.1.2 主要仪器和试剂: 恒温摇床,上海智城分析仪器制造公司; UV-2550 分光光度计, SHIMADZU; GNO 型隔水式恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司; CAV 电子天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司制造; MG ($C_{23}H_{25}C_1N_2$, 分子量 364.92, $\lambda_{max}=618$)及其它试剂均为分析纯。MG 母液(10 g/L)于 4 °C 保存备用。

1.1.3 培养基: 固体培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母浸粉 2.5, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0; 液体培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母浸粉 2.5, 葡萄糖 20.0。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养: 裂褶菌 cfcc7252 菌株接种于固

体培养基上, 30 °C 培养 5 d 备用。

1.2.2 接种体的制备: 取 200 mL 液体培养基分装于 500 mL 锥形瓶中, 接种 10 个直径 1 cm 的菌饼, 于 30 °C、200 r/min 振荡培养 4 d, 形成大小均一的菌球。以 1.5% (体积比) 接种于 500 mL 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 振荡培养, 作为染料降解过程中的接种体。

1.2.3 降解 MG 条件优化: 将 100 mL MG-液体培养基(MG 终浓度为 100 mg/L) 装入 250 mL 培养瓶中, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 冷却后, 以 8% (体积比) 的接种量加入接种体, 30 °C、150 r/min 培养。所有试验均设置 3 个重复。以液体培养基为基础, 采用单因子实验设计, 依次优化裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的条件。优化条件涉及: 通气[厌氧条件: 充高纯氮(99.99%) 30 min, 以排尽瓶内空气, 使培养体系处于厌氧状态^[21]; 好氧条件: 培养体系不充高纯氮]、初始 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0)、温度(15、22、30、37 和 45 °C)、不同碳源(蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖、D-果糖、麦芽糊精、半乳糖、麦芽糖、甘露糖)及其浓度、不同氮源(酵母浸粉、鱼粉、菜籽饼粉、黄豆饼粉、牛脑心浸粉、蛋白胨和 1:1、2.5:1、5:1 的蛋白胨和酵母浸粉)及其浓度。在最适 pH、温度、碳源、氮源条件下, 研究了金属离子(Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ag^+)及其浓度、盐度和 MG 浓度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解能力的影响。

1.2.4 连续降解能力测试: 优化后的培养基于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 待其冷却后, 以 8% (体积比) 接入接种体至 100 mL MG 染料-液体培养基(MG 终浓度为 100 mg/L) 的 250 mL 培养瓶中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 48 h 后测定降解率。同时取出菌体, 转接于新的 100 mL 含 MG (100 mg/L) 的培养基中, 继续降解 48 h, 重复 10 次, 探究裂褶菌 cfcc7252 菌株连续降解 MG 的能力。

1.2.5 分析方法: 采用比色法, 以加入 MG 的时刻

为起点, 每 12 h 取样 1 mL, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 所得上清液于 618 nm 下测定其吸光度 A_1 , 以不加接种物的 MG 染料-液体培养基的吸光度 A_0 为对照, 其降解率用下列公式计算:

$$\text{降解率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100.$$

1.2.6 生物毒性测试: 毒性测试以纯水为对照, 探究 100 mg/L 的 MG 染料与经裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 36 h 后的降解产物对植物和微生物的毒性, MG 和降解产物均用 0.22 μ m 微孔滤膜除菌。

植物毒性测试以红豆和豇豆为材料, 种子使用前于 30 °C 纯水中浸泡 24 h, 选取膨胀的种子用于测试。将 3 层滤纸铺在培养皿底部, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 待其冷却后, 将 10 粒种子均匀置于培养皿的滤纸上, 每天喷洒 3 mL 相应溶液一次, 以保持种子萌发所需要的湿度。种子置于 30 °C 萌发, 6 d 后测定每个培养皿中种子的萌发率, 胚根、胚轴和胚芽的长度以及湿重。每一个含有 10 粒种子的培养皿是一个重复, 每个处理设 5 个重复。

微生物毒性测试以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌和枯草芽孢杆菌为受试菌种, 采用圆纸片法^[22]。所用细菌在 37 °C 培养 24 h 后测定抑菌圈的直径, 每个处理设置 5 个重复。

1.2.7 数据分析方法: 用 GraphPad Prism 6.0 软件, 对实验数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 通气对 MG 降解的影响

通气对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响结果显示: 无论在好氧还是厌氧条件下, 裂褶菌 cfcc7252 菌株 24 h 均能够高效降解 MG, 降解率分别为 96.82% 和 95.89%。Ren 等^[23]研究嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 降解 MG 等三苯甲烷类染料时发现, 在摇动和微需氧条件下其均能降解染料; 然而降解体系经过厌氧处理(充氮气 10 min)后, 嗜水气单胞菌对 MG 基本没有降解效果, 认为三苯甲烷类染料的降解可能要依赖于 NADH/NADPH 加

氧酶, 摇动和微需氧可以增加染料溶液的溶氧量, 进而提高了加氧酶的酶活, 从而促进了染料的降解。Chen 等^[17]对革孔菌 *Corioloropsis* sp. 降解 MG 的研究结果显示: 厌氧条件下的降解率(14 d: 78%)显著高于好氧条件(9 d: 52%), 其原因可能是在氧气存在的条件下, 氧气和染料分子争夺电子载体, 进而影响相关降解酶的活性^[24-26]。而本文研究却发现: 好氧条件和厌氧条件的降解效果无明显差异, 这可能是由于裂褶菌 cfcc7252 菌株对 MG 具有不同的降解机制。

2.2 pH 对降解的影响

pH 是微生物降解染料的重要环境影响因素之一, 实验结果显示(图 1): 裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 有很宽的 pH 适应性, 在 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 下, 24 h 的降解率均高于 93%, 在 pH 为 4.0 时, 其降解率最大, 为 99.39%。后续实验的初始 pH 值设定为 4.0。大多数白腐菌快速生长及染料分解的最适环境是酸性环境, 但现实生活中的染料废水大多为碱性, 这不利于一般真菌的脱色^[27]。然而, Chen 等^[28]研究发现 *Pandoraea pulmonicola* YC32 在略偏碱的溶液中对 MG 降解效果更好, 何兴兵等^[29]报道烟管菌 XX-2 在中性培养基中对 MG 染料降解效果较好。而本实验所用的裂褶菌 cfcc7252 菌株在酸性及碱性条件下均可以高效降解 MG, 这些优良特性十分利于实际应用。

2.3 温度对降解的影响

降解体系在不同温度下培养 24 h, 探索温度对降解过程的影响, 实验结果如图 2 所示。结果表明: 在 15-30 °C 范围内, 降解率随温度的升高而增大, 在 30 °C 时降解率最大, 达到 99.45%, 这与吴茵等^[30]利用刺芹侧耳 *Pleurotus eryngii* 降解 MG 的最适温度一致。在 30-45 °C 的范围内, 降解率随温度的升高而降低, 45 °C 时最低, 为 40.25%。关于温度对降解率的影响, Jasińska 等^[31]、Kalpana 等^[31]、韩国民等^[32]在利用真菌 *Myrothecium roridum*、*Irpex lacteus*、*Trichaptum abietinum* 1302BG 对相应染料进行降解实验时, 也得出了与之相一致的结果。

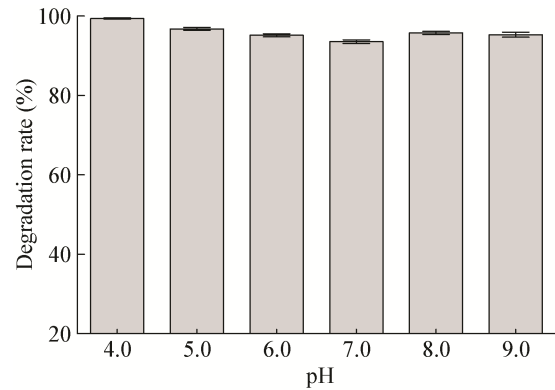


图 1 pH 对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响

Figure 1 Effect of pH on degradation of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252

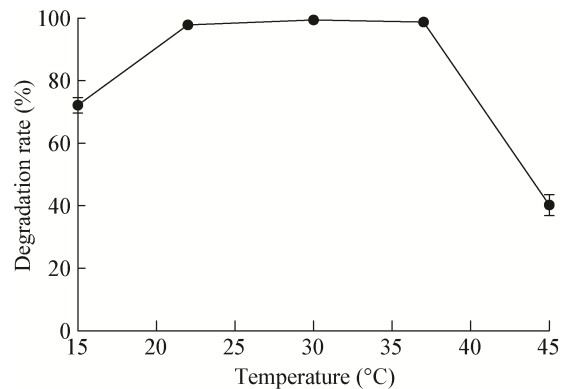


图 2 培养温度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响

Figure 2 Effect of temperature on degradation of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252

2.4 不同种类碳源及浓度对降解的影响

碳源是微生物生长的重要营养元素之一, 本研究在裂褶菌 cfcc7252 菌株对 MG 降解的体系中, 分别使用终浓度为 20 g/L 的蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖、D-果糖、麦芽糊精、半乳糖、麦芽糖、甘露糖, 探索不同碳源对降解过程的影响, 实验结果如图 3A 所示。不同碳源对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 能力有显著影响($P < 0.05$)。当以葡萄糖为碳源时, 降解效果最好, 24 h 的降解率为 96.16%, 麦芽糊精和麦芽糖次之, 降解率分别为 80.57% 和 74.39%, 蔗糖、可溶性淀粉、乳糖、果糖、半乳糖和甘露糖的影响较小。这一结果和已有的一些研究报道相一致, Raghukumar 等^[33]研究结果显示: 白

腐真菌 *Flavodon flavus* 可以高效利用葡萄糖降解染料废水；林永慧等^[34]研究表明毛霉菌 *Mucoromycotina* sp.在以葡萄糖为碳源的 Kirk 培养基中脱色效果最好；梁红昌等^[35]也报道泡盛曲霉 *Aspergillus awamori* 以葡萄糖为碳源的查氏培养基脱色效果最好。

为了进一步探究碳源浓度对降解过程的影响，在降解体系中分别加入终浓度为 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 和 40.0 g/L 的葡萄糖，实验结果如图 3B 所示，其降解率的趋势与当前的一些研究结果相一致，例如 Özsoy 等^[36]发现真菌 *Fulani trogon* ATCC 200800 降解染料 Drimarene Blue X3LR 和 Remazol Brilliant Blue R 时，降解率随着葡萄糖浓度的增大而降低；林永慧等^[34]利用毛霉菌 *Mucoromycotina* sp.降解苯胺蓝染料时发现葡萄糖浓度为 1.0 g/L 时降解率最高，9.0 g/L 时降解率明显偏低。这可能是因为低浓度碳源被迅速耗尽后，微生物开始利用染料作为碳源和能源，从而有助于染料降解^[37]。在本文研究中，当葡萄糖浓度为 1.0–10.0 g/L 时，降解率随着浓度的增大而升高，10.0 g/L 时降解率为 98.90%；随后逐渐降低。基于降解效果，后续实验以 10.0 g/L 的葡萄糖作为碳源。

2.5 不同种类氮源及浓度对降解的影响

利用裂褶菌 cfcc7252 菌株对 MG 进行降解，分别加入终浓度为 7.0 g/L 的酵母浸粉、鱼粉、菜籽饼粉、黄豆饼粉、牛脑心浸粉、蛋白胨等单一氮源，以及 1:1、2.5:1、5:1 的蛋白胨和酵母浸粉的混合氮源，探究不同氮源的影响，实验结果如图 4A 所示。7 种不同的氮源均能促进裂褶菌 cfcc7252 菌株对 MG 的降解且均有较好的降解效果，当以酵母浸粉为氮源时，降解效果最好，其染料降解率为 99.39%；其次为鱼粉及 1:2.5 的酵母粉与蛋白胨的混合物，降解率分别为 97.38%、97.04%；以菜籽饼粉为氮源时的降解率最低，但降解率依然达到 92.77%。Revankar 等^[38]利用灵芝 *Ganoderma* sp. WR-1 降解苋菜红时，发现以酵母浸粉为氮源时降解率最大。

为了进一步探究氮源浓度对降解过程的影响，在降解体系中分别加入终浓度为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 和 14.0 g/L 的酵母浸粉。实验结果如图 4B 所示，当酵母浸粉的浓度在 0.0–5.0 g/L 时，降解率随着浓度的增加而增大，5.0 g/L 时，降解率最大，为 97.94%；进一步提高酵母浸粉浓度，并不能显著提高该菌对 MG 的降解率。因此，后续实验采用 5.0 g/L 酵母浸粉作为氮源。

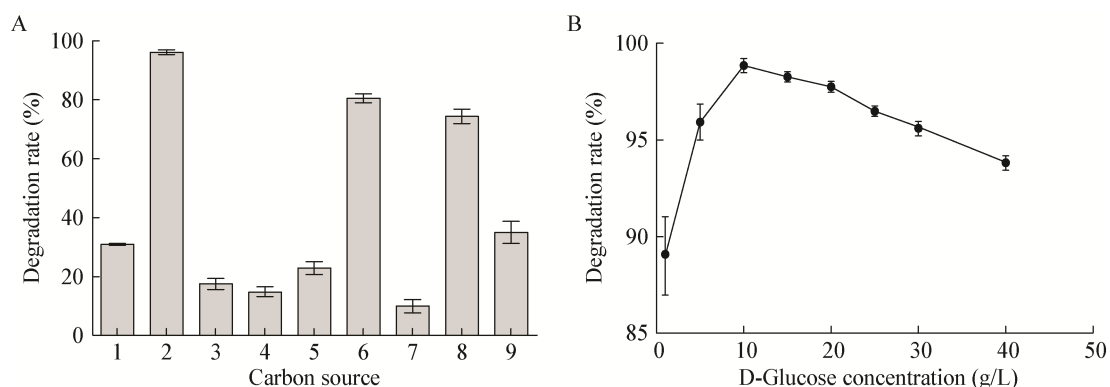


图3 不同种类碳源及浓度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响

Figure 3 Effect of carbon sources and glucose concentration on degradation of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252

注：1：蔗糖；2：葡萄糖；3：可溶性淀粉；4：乳糖；5：D-果糖；6：麦芽糖糊精；7：半乳糖；8：麦芽糖；9：甘露糖。

Note: 1: Sucrose; 2: Glucose; 3: Soluble starch; 4: Lactose; 5: D-Fructose; 6: Maltodextrin; 7: Galactose; 8: Maltose; 9: Mannose.

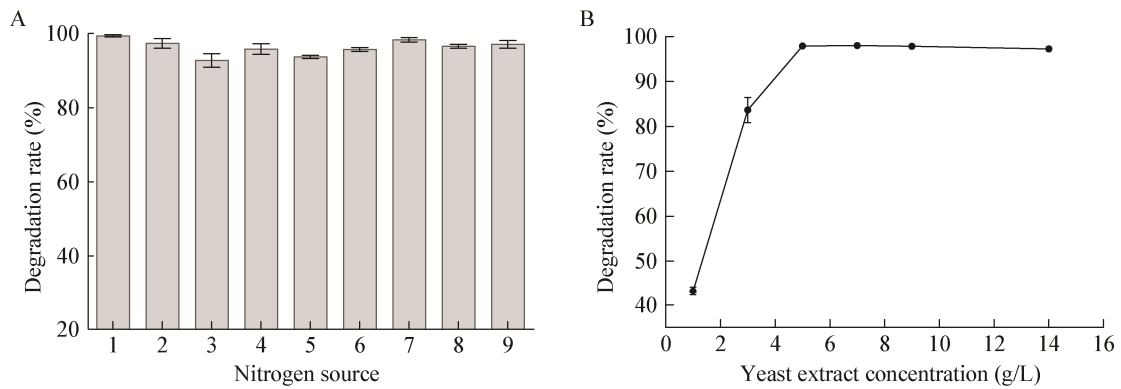


图4 不同种类氮源及浓度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响

Figure 4 Effect of nitrogen sources and yeast extract concentration on degradation of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252

注: 1: 酵母浸粉; 2: 鱼粉; 3: 菜籽饼粉; 4: 黄豆饼粉; 5: 牛脑心浸粉; 6: 胰蛋白胨; 7: 酵母浸粉:胰蛋白胨(1:1); 8: 酵母浸粉:胰蛋白胨(1:2.5); 9: 酵母浸粉:胰蛋白胨(1:5).

Note: 1: Yeast extract; 2: Fish powder; 3: Rapeseed meal; 4: Soybean powder; 5: Bovine brain extract; 6: Tryptone; 7: Yeast:Tryptone (1:1); 8: Yeast:Tryptone (1:2.5); 9: Yeast:Tryptone (1:5).

2.6 不同金属离子及浓度对降解的影响

金属离子在真菌降解染料的过程中具有重要的作用,同时大多数染料废水中含有各种各样的金属离子。因此,本文研究了终浓度为 0.1 mmol/L 的 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ag^{+} 对 MG 降解的影响,实验结果如图 5A 所示。金属离子对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 能力具有显著影响($P<0.05$)。其中,在 Zn^{2+} 存在的环境下,降解效果最好,24 h 降解率为 98.84%,其次分别是 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} ,降解率分别为 97.26%、97.11%;然而在 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 存在的条件下,该菌的降解率显著降低。金剑等^[39]、田启建等^[40]的研究表明: Zn^{2+} 能够促进染料降解,这可能是由于 Zn^{2+} 能够提高木质素过氧化物酶的活性引起的。Du 等^[41]研究表明 Mn^{2+} 能够显著促进假单胞菌 *Pseudomonas* sp. strain DY1 降解 MG。值得注意的是:裂褶菌 cfcc7252 菌株在重金属 Hg^{2+} 和 Ag^{+} 存在下,对 MG 的降解率仍高达 97.11%、90.81%,这说明该菌株不仅在该环境条件下仍具有较强的 MG 降解活性,而且对这些重金属离子有较强的耐受性,这与其他有关染料降解的研究有所不同^[33]。

为了进一步探究 Zn^{2+} 浓度对降解过程的影响,在降解体系中分别加入终浓度为 0.01、0.10、0.30、

0.50、0.70、1.00、1.20、1.50 和 2.00 mmol/L 的 Zn^{2+} ,实验结果如图 5B 所示。 Zn^{2+} 浓度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解能力具有显著影响($P<0.05$)。当浓度在 0.01–0.50 mmol/L 之间,降解率维持在 99.25%–96.11%。随着 Zn^{2+} 浓度的进一步增高,MG 的降解率逐渐下降,2 mmol/L 时降解率仅为 22.00%。因此,后续实验采用 0.01 mmol/L 的 Zn^{2+} 。

2.7 盐度对降解的影响

染料行业在生产过程中往往会产生大量的含盐废水,高的含盐量会影响微生物细胞的渗透压,从而使微生物降低或丧失脱色染料的能力^[42]。本文探究了盐度为 4.08%的人工海水条件下,盐度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 能力的影响,实验结果如图 6 所示。裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 有一临界盐度 10.20%,低于该盐度时,降解率在 99.30%–98.60%之间,高于该盐度,降解率显著降低;当盐度达到 20.40%时,该菌仍有一定的降解能力,但降解率仅为 21.47%。何兴兵等^[29]报道:在盐度(NaCl)低于 16 g/L 时,烟管菌 XX-2 对 MG 的降解率维持在 88%左右;当盐度为 128 g/L 时,却仅为 8.59%。与之相比,裂褶菌 cfcc7252 菌株则具有较高的盐度耐受力,在降解高盐度染料废水中相对有一定的优势。田启建等^[40]、田存萍等^[43]、郭建博等^[44]也报道了有关耐

盐菌株在染料降解中的作用。

2.8 MG 浓度对降解的影响

MG 浓度对裂褶菌 cfcc7252 菌株的降解率有显著影响($P < 0.05$, 图 7), 浓度为 50–200 mg/L 时, 降解率高达 95% 以上。虽然随着 MG 浓度的继续升高, 该菌对 MG 的降解率有所下降, 但在浓度为 350 mg/L 时, 降解率仍高达 62.5%。而现有研究发现: 微生物在高浓度的 MG 废水环境中, 其染料降解率会大大降低^[17,25,45-46]。因而, 作为一种生物降解菌种资源, 在处理高浓度工业废水染料中, 裂褶菌 cfcc7252 菌株具有很强的开发潜力。

2.9 连续降解能力测试

菌株的连续降解能力是检验其应用能力的一个重要指标^[29]。在生物降解资源的开发中, 很多

菌株皆具有连续降解的能力。例如 Daneshvar 等^[47]利用藻类 *Chlorella* sp. 对 MG 进行连续脱色, 显示在 5 个循环内脱色率不变; 司静等^[48]研究绒毛柱孔菌连续脱色时发现在第 2 个循环时脱色率为 36.48%, 第 3 个循环却仅为 9.74%; 张昊等^[49]报道黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 在降解染料时在第 3 个循环脱色率为 30%; Cui 等^[50]以 *Escherichia coli* 为受试菌研究其对偶氮染料脱色显示 4 个循环后脱色率基本不变。而在本研究中发现: 在第 1–7 个降解周期中, 其降解率维持在 98.07% 左右; 第 8 个降解周期降解率开始下降, 为 89.19%; 到第 10 个降解周期时仍有一定降解能力, 降解率达 40.69% (图 8)。相对于其它真菌, 裂褶菌 cfcc7252 菌株具有很强的连续降解能力, 应用潜力巨大。

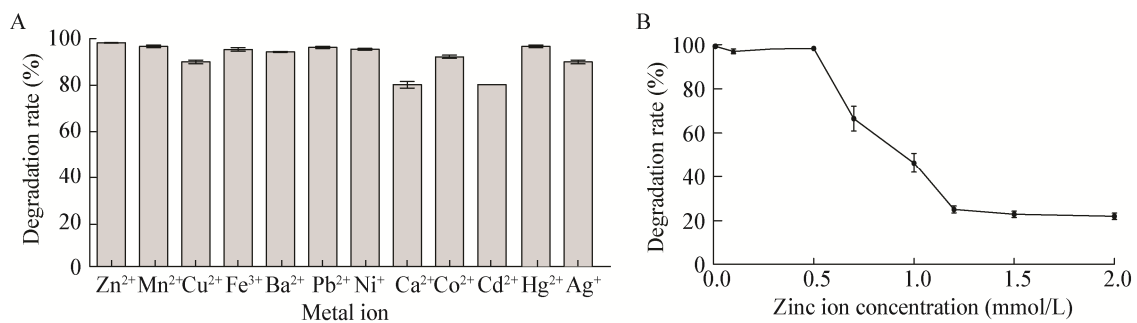


图 5 不同金属离子及锌离子浓度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响

Figure 5 Effect of metal ion and zinc ion concentration on degradation of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252

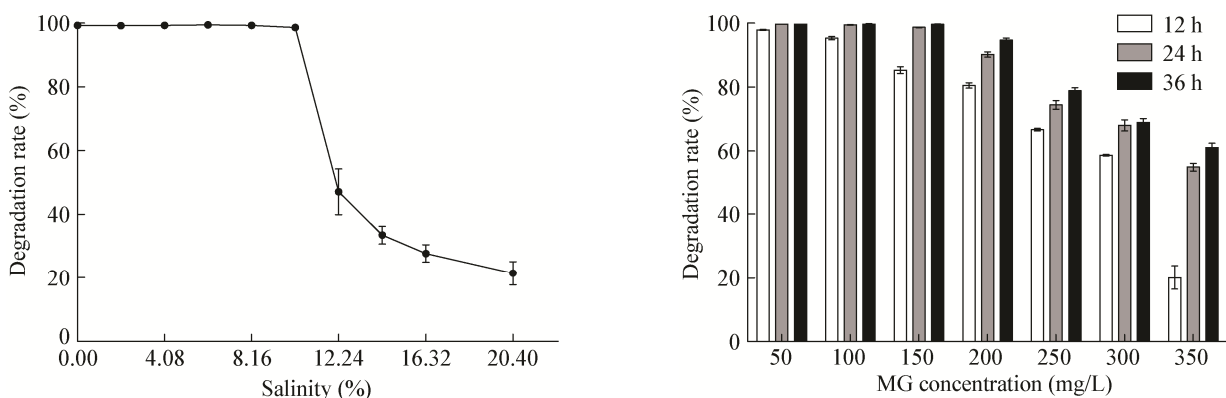


图 6 盐度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响

Figure 6 Effect of salinity on degradation of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252

图 7 初始染料浓度对裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的影响

Figure 7 Effect of initial dye concentration on degradation of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252

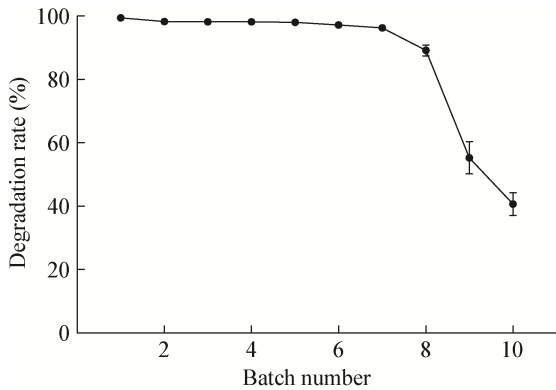


图 8 裂褶菌 cfcc7252 在不同降解周期对 MG 的降解率
Figure 8 Degradation rate of MG by *Schizophyllum commune* cfcc7252 at various degrading periods

2.10 降解前后毒性测试

2.10.1 植物毒性测试: 植物毒性测试方法是常用的检测染料及其降解产物毒性的方法, 通过检测种子发芽率、胚轴、胚根和胚芽等生长情况来反映染料的降解效果^[51]。该研究植物毒性测试结果如表 1 所示。对红豆萌发率、胚根、胚芽、胚轴的长度及湿重进行 LSD (Least significant difference) 检验, 结

果表明: 降解产物溶液、MG 溶液和纯水对红豆和豇豆种子喷洒后, 种子萌发率具有显著差异, 降解产物处理、纯水处理 2 种种子的萌发率均为 100%, 但用 MG 溶液处理萌发率仅为 70%, 说明未降解的 MG 溶液对种子的萌发有一定的抑制作用, 而降解产物毒性明显下降, 对萌发率无明显影响。3 种溶液喷洒种子萌发后的胚根、胚轴、胚芽的长度(cm) 和湿重(g) 也有明显的区别, 与纯水处理相比, 未降解的 MG 溶液明显抑制了红豆和豇豆的胚根、胚轴、胚芽的生长, 湿重也有明显差异; 而 MG 降解产物处理的种子各部分长度及湿重均明显高于 MG 溶液处理, 且与纯水处理结果相近, 表明裂褶菌 cfcc7252 菌株对 MG 具有一定的脱毒作用。这与许多有关染料降解的报道相一致^[1,51]。

2.10.2 微生物毒性测试: 以金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞杆菌为受试微生物的抑菌试验结果显示: 经 MG 溶液处理的滤纸片周围均有明显的透明圈, 金黄色葡萄球菌透明圈直径为 15.80 mm±0.49 mm, 枯草芽孢杆菌为

参数 Parameters	红豆 <i>V. umbellate</i>			豇豆 <i>V. unguiculata</i>		
	纯水 Water	MG 溶液 MG solution	降解产物 Biodegradation products	纯水 Water	MG 溶液 MG solution	降解产物 Biodegradation products
发芽率 Germination (%)	100	70	100	100	70	100
胚根 Embryonic root (cm)	8.44±0.27	3.50±0.23***	7.66±0.28 ^{SSS}	3.24±0.19	2.38±0.12**	3.70±0.16 ^{SSS}
胚轴 Embryonic axis (cm)	3.52±0.29	2.28±0.23**	3.24±0.28 ^S	3.80±0.10	2.86±0.17**	4.04±0.18 ^{SS}
胚芽 Embryonic bud (cm)	0.82±0.09	0.58±0.04*	0.83±0.09 ^S	1.92±0.12	1.30±0.07**	1.97±0.11 ^{SSS}
湿重 Fresh weight (g)	5.47±0.13	4.49±0.13***	5.46±0.10 ^{SSS}	7.49±0.12	6.17±0.14**	7.27±0.11 ^{SSS}

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 表示在 MG 溶液中发芽的种子与在纯水中发芽的种子具有显著差异; ^S $P<0.05$, ^{SS} $P<0.01$, ^{SSS} $P<0.001$ 表示在降解产物中发芽的种子与在 MG 溶液中发芽的种子具有显著差异。

Note: Seeds germinated in MG solution are significantly different from the seeds germinated in water at * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ and the seeds germinated in degradation products are significantly different from the seeds germinated in MG solution at ^S $P<0.05$, ^{SS} $P<0.01$, ^{SSS} $P<0.001$.

16.70 mm±0.51 mm, 铜绿假单胞杆菌为 11.60 mm±0.43 mm; 而在纯水和经裂褶菌 cfcc7252 菌株降解产物处理的滤纸片周围均未发现抑菌圈, 表明 MG 降解产物对供试微生物无抑制作用。Jasińska 等^[3]和 Lü 等^[52]在研究丝状真菌 *Myrothecium roridum* 及 *Deinococcus radiodurans* R1 降解 MG 时也得出类似的结论, 降解产物对大肠杆菌、铜绿假单胞杆菌和金黄色葡萄球菌等微生物及 L-929 细胞的抑制作用很低。

3 结论

裂褶菌 cfcc7252 菌株降解 MG 的单因子优化条件为: 碳源为 10.0 g/L 葡萄糖, 氮源为 5.0 g/L 酵母浸粉, pH 为 4.0, 培养温度为 30 °C, 金属离子为 0.01 mmol/L Zn²⁺。该菌株具有很强的适应能力, 能在好氧与厌氧、酸性与碱性条件下高效降解 MG。而且在 Hg²⁺、Ag⁺、Ba²⁺、Pb²⁺、Cu²⁺等重金属离子存在以及高盐浓度下均有较高的降解效率。连续降解能力测试表明, 该菌能够多次(至少 8 次)重复降解 MG。另外, MG 降解前后毒性测试结果表明, 经该菌株降解后的 MG 降解产物对红豆、豇豆及金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞杆菌等植物、微生物生长基本没有毒性。表明裂褶菌 cfcc7252 是一株环境友好的、可用于 MG 处理的微生物菌种资源, 在染料废水处理中具有极大的应用潜力。

参考文献

- [1] Jin XC, Ning Y. Laccase production optimization by response surface methodology with *Aspergillus fumigatus* AF1 in unique inexpensive medium and decolorization of different dyes with the crude enzyme or fungal pellets[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 262: 870-877
- [2] Babu PEJ, Kumar V, Visvanathan R. Equilibrium and kinetic study for the removal of malachite green using activated carbon prepared from *Borassus flabellifer* male flower[J]. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering, 2010, 5(3): 465-472
- [3] Jasińska A, Paraszkiwicz K, Sip A, et al. Malachite green decolorization by the filamentous fungus *Myrothecium roridum* - Mechanistic study and process optimization[J]. Bioresource Technology, 2015, 194: 43-48
- [4] Hameed BH, El-Khaiary MI. Batch removal of malachite green from aqueous solutions by adsorption on oil palm trunk fibre: equilibrium isotherms and kinetic studies[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 154(1/3): 237-244
- [5] Farhadian M, Kazemzad M. Photocatalytic degradation of malachite green by magnetic photocatalyst[J]. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, 2016, 46(3): 458-463
- [6] Fu JW, Xin QQ, Wu XC, et al. Selective adsorption and separation of organic dyes from aqueous solution on polydopamine microspheres[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2016, 461: 292-304
- [7] Ghaedi M, Rahimi MR, Ghaedi AM, et al. Application of least squares support vector regression and linear multiple regression for modeling removal of methyl orange onto tin oxide nanoparticles loaded on activated carbon and activated carbon prepared from *Pistacia atlantica* wood[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2015, 461: 425-434
- [8] Qiao H, Zhou YM, Yu F, et al. Effective removal of cationic dyes using carboxylate-functionalized cellulose nanocrystals[J]. Chemosphere, 2015, 141: 297-303
- [9] Wu Y, Zeng SL, Wang FF, et al. Heterogeneous Fenton-like oxidation of malachite green by iron-based nanoparticles synthesized by tea extract as a catalyst[J]. Separation and Purification Technology, 2015, 154: 161-167
- [10] Merouani S, Hamdaoui O, Boutamine Z, et al. Experimental and numerical investigation of the effect of liquid temperature on the sonochemical degradation of some organic dyes in water[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 28: 382-392
- [11] Shah MP. Microbe-mediated degradation of synthetic dyes in wastewater[A]//Singh SN. Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters[M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2015: 205-241
- [12] Sarayu K, Sandhya S. Current technologies for biological treatment of textile wastewater—a review[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(3): 645-661
- [13] Khan R, Bhawana P, Fulekar MH. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2013, 12(1): 75-97
- [14] Husain Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2006, 26(4): 201-221
- [15] Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, et al. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2011, 42(1): 138-157
- [16] Kaushik P, Malik A. Fungal dye decolorization: recent advances and future potential[J]. Environment International, 2009, 35(1): 127-141
- [17] Chen SH, Ting ASY. Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Corioloopsis* sp. isolated from compost[J]. Journal of Environmental Management, 2015, 150: 274-280
- [18] Shi LL, Yu HB, Dong TB, et al. Biochemical and molecular characterization of a novel laccase from selective lignin-degrading white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(7): 1097-1106
- [19] Eichlerová I, Homolka L, Nerud F. Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(16): 2153-2159
- [20] Murugesan K, Yang IH, Kim YM, et al. Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(2): 341-350

- [21] Cao JX, Wei M, Chen MC, et al. Effects of temperature on soil nitrogen mineralization in different pH paddy soils under anaerobic condition[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(10): 1182-1189 (in Chinese)
曹竞雄, 韦梦, 陈孟次, 等. 温度对厌氧条件下不同 pH 水稻土氮素矿化的影响[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(10): 1182-1189
- [22] Li AR, Zhu Y, He XB, et al. Evaluation of antimicrobial activity of certain Chinese plants used in folkloric medicine[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(4): 569-572
- [23] Ren SZ, Guo J, Zeng GQ, et al. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(6): 1316-1321
- [24] Jadhav JP, Govindwar SP. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463[J]. Yeast, 2006, 23(4): 315-323
- [25] Parshetti G, Kalme S, Saratale G, et al. Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532[J]. Acta Chimica Slovenica, 2006, 53(4): 492-498
- [26] Rauf MA, Ashraf SS. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 209: 520-530
- [27] Fu YZ, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review[J]. Bioresource Technology, 2001, 79(3): 251-262
- [28] Chen CY, Kuo JT, Cheng CY, et al. Biological decolorization of dye solution containing malachite green by *Pandora pulmonicola* YC32 using a batch and continuous system[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 172(2/3): 1439-1445
- [29] He XB, Lin YH, Han GM, et al. Efficient degradation of malachite green dye by *Bjerkandera adusta* XX-2 strain in an air-opening system[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1163-1174 (in Chinese)
何兴兵, 林永慧, 韩国民, 等. 开放条件下烟管菌 XX-2 对孔雀石绿染料的高效降解[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1163-1174
- [30] Wu Y, Chen M, Liu J. Biodecolorization and biodegradation of malachite green by *Pleurotus eryngii* and degradation products analysis[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(8): 2844-2851 (in Chinese)
吴茵, 陈敏, 刘洁. 刺芹侧耳对孔雀石绿的脱色降解及其产物分析[J]. 环境科学学报, 2016, 36(8): 2844-2851
- [31] Kalpana D, Velmurugan N, Shim JH, et al. Biodecolorization and biodegradation of reactive Levafix Blue E-RA granulate dye by the white rot fungus *Irpex lacteus*[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 111: 142-149
- [32] Han GM, He XB, Zhang P, et al. Efficient degradation of polyporus fungus *Trichaptum abietinum* 1302BG on the synthetic dyes Congo red and fuchsin acid under non-sterile condition[J]. Microbiology China, 2011, 38(4): 603-614 (in Chinese)
韩国民, 何兴兵, 张鹏, 等. 多孔菌 *Trichaptum abietinum* 1302BG 自然条件下对合成染料刚果红和酸性品红的高效降解[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4): 603-614
- [33] Raghukumar C, Rivonkar G. Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a Marine habitat[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(4): 510-514
- [34] Lin YH, Chen L, He XB, et al. Biodegradation of aniline blue dye by a fungus *Mucoromycotina* sp. HS-3[J]. Microbiology China, 2010, 37(12): 1727-1733 (in Chinese)
林永慧, 陈亮, 何兴兵, 等. *Mucoromycotina* sp. HS-3 对苯胺蓝染料的降解[J]. 微生物学通报, 2010, 37(12): 1727-1733
- [35] Liang HC, Qian YH, Zhang QH, et al. Preliminary discuss on identification and characterization of one decolorizing fungus[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 956-961 (in Chinese)
梁红昌, 千英花, 张庆华, 等. 一株脱色真菌的鉴定及脱色特性的初步探讨[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 956-961
- [36] Özsoy HD, Ünyayar A, Mazmancı MA. Decolourisation of reactive textile dyes Drimarene Blue X3LR and Remazol Brilliant Blue R by *Funalia trogii* ATCC 200800[J]. Biodegradation, 2005, 16(3): 195-204
- [37] Oranusi NA, Mbah AN. Utilisation of azo and triphenylmethane dyes as sole source of carbon, energy and nitrogen by *Bacillus* sp.[J]. African Journal of Applied Zoology and Environmental Biology, 2005, 7(1): 87-94
- [38] Revankar MS, Lele SS. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 775-780
- [39] Jin J, Kang WL, Sheng JP, et al. Enzymological characteristics of Lignin Peroxidase (LiP) from *Coriolus versicolor*[J]. Food Science, 2010, 31(17): 224-227 (in Chinese)
金剑, 康文丽, 生吉萍, 等. 云芝(*Coriolus versicolor*)木质素过氧化物酶(LiP)酶学性质分析[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 224-227
- [40] Tian QJ, Lin YH, He XB, et al. Toxicity test and decolorization of simulated Orange G dye wastewater by *Ceriporia lacerata* P2 with a high-salinity tolerance[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(6): 876-882 (in Chinese)
田启建, 林永慧, 何兴兵, 等. 耐高盐撕裂蜡孔菌 P2 对模拟橙黄 G 染料废水的脱色及废水脱色前后的毒性测试[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 876-882
- [41] Du LN, Wang S, Li G, et al. Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition: characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity[J]. Ecotoxicology, 2011, 20(2): 438-446
- [42] Khalid A, Arshad M, Crowley DE. Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp. under saline conditions[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2008, 79(6): 1053-1059
- [43] Tian CP, Zhou JT, Guo JB, et al. De-colorization of azo dye K-2BP by salt-tolerant cultures at mixed hypo-saline concentration[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 29(6): 82-83 (in Chinese)
田存萍, 周集体, 郭建博, 等. 耐盐菌在复合高盐条件下对偶氮染料 K-2BP 的脱色研究[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(6): 82-83
- [44] Guo JB, Zhou JT, Wang D, et al. Decolorization of dye wastewater with high salt concentration by acclimatized salt-tolerant cultures[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2005, 6(12): 31-36 (in Chinese)
郭建博, 周集体, 王栋, 等. 耐盐菌群对高含盐染料模拟废水的脱色实验研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, 6(12): 31-36
- [45] Chen SH, Ting ASY. Biosorption and biodegradation potential of triphenylmethane dyes by newly discovered *Penicillium simplicissimum* isolated from indoor wastewater sample[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 103: 1-7
- [46] Zhang XY, Yan KL, Wang HX, et al. Study on the biodegradation mechanisms of triphenylmethane dyes by the white rot fungus in rice straw medium[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(8): 1284-1289 (in Chinese)
张晓昱, 颜克亮, 王宏勋, 等. 稻草基质中白腐菌降解三苯甲

- 烷类染料机制探讨[J]. 环境科学学报, 2006, 26(8): 1284-1289
- [47] Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard MH, et al. Biodegradation of dye solution containing malachite green: optimization of effective parameters using Taguchi method[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 143(1/2): 214-219
- [48] Si J, Yan ZH, Cui BK, et al. Decolorization of azo dye congo red by *Trametes pubescens* pellets without addition of nutrition[J]. Microbiology China, 2014, 41(2): 218-228 (in Chinese)
司静, 闫志辉, 崔宝凯, 等. 绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下对偶氮染料刚果红的脱色作用[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 218-228
- [49] Zhang H, Wang HT, Zhang LL, et al. Study on selection of adsorptive carrier and decolorization of dyes by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2010, 4(12): 2755-2760 (in Chinese)
张昊, 王洪涛, 张利兰, 等. *Phanerochaete chrysosporium* 吸附载体的选择及染料降解研究[J]. 环境工程学报, 2010, 4(12): 2755-2760
- [50] Cui DZ, Li GF, Zhao D, et al. Effect of quinoid redox mediators on the aerobic decolorization of azo dyes by cells and cell extracts from *Escherichia coli*[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(6): 4621-4630
- [51] Kurade MB, Waghmode TR, Kagalkar AN, et al. Decolorization of textile industry effluent containing disperse dye Scarlet RR by a newly developed bacterial-yeast consortium BL-GG[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 184: 33-41
- [52] Lü GY, Cheng JH, Chen XY, et al. Biological decolorization of malachite green by *Deinococcus radiodurans* R1[J]. Bioresource Technology, 2013, 144: 275-280

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、微生物蛋白质组学、微生物功能基因组、生物工程与药物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、专栏等。

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:

- [1] 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
- [2] 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
- [3] 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
- [4] 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-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.58)