

近海养虾场底泥中产芽孢细菌的生态特征*

王亚南^{1,2} 王保军² 戴欣² 焦念志³ 彭志英¹ 刘双江^{2**}

(¹华南理工大学食品科学系 广州 510640)

(²中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(³厦门大学海洋环境科学系 福建厦门 361005)

摘要 通过对近海养虾场底泥中的细菌数量和类群的调查,发现有超过50%的细菌生物量是产芽孢细菌,因此对底泥中的产芽孢细菌进行了分离和纯化,通过对细胞形态、生理生化等特征的研究和对部分菌株的16S rRNA基因的ARDRA分型、序列分析等,鉴定了67株产芽孢细菌,其中62株属于芽孢杆菌属,5株属于短芽孢杆菌属。进一步对62株芽孢杆菌属的细菌在底泥不同深度的分布进行研究,结果表明,巨大芽孢杆菌主要分布在底泥深度0~6 cm左右的区域,海洋芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌主要分布于底泥6 cm以下的区域,与坚强芽孢杆菌性状相近的菌分布在底泥2~8 cm深度;与耐碱芽孢杆菌性状相近的芽孢菌广泛分布在0~12 cm区域。讨论认为,应用这些产芽孢细菌资源在修复海洋环境和开发海水养殖微生态制剂方面具有一定可能性。图3表3参15

关键词 产芽孢细菌;芽孢杆菌;生态特征;海水养虾场底泥

CLC Q939.108 1 S954.21

ECOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BACILLI IN SEDIMENT FROM A NEAR-SHORE MARINE HORTICULTURAL REGION*

WANG Yanan^{1,2}, WANG Baojun², DAI Xin², JIAO Nianzhi³, PENG Zhiying¹ & LIU Shuangjiang^{2**}

(¹Southern China Science and Technology University, Guangzhou 510640, China)

(²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(³Department of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract A survey on microbial populations in the sediment from a near-shore mariculture region revealed that over 50% (by cells) of the biomass was spore-producing bacteria. Totally 67 strains of spore-producing bacteria were obtained and were identified by their cellular morphology, physiological and biochemical features. 12 of the 67 strains were further characterized by cloning their 16S rRNA genes. Results indicate that 62 out of the 67 spore-producing bacterial strains belong to the genus *Bacillus* and 5 strains belong to *Brevibacillus*. Among the 62 strains of *Bacillus*, *B. megaterium*, *B. marinus*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. thuringensis*, *B. sphaericus* and *B. firmus* were identified, while other 28 strains could not be taxonomically identified and need further studies. The strains of *B. megaterium* mainly distributed in the zone above 6 cm of the sediments, and *B. pumilus* and *B. cereus* were dominant species in the sediment under depth of 6 cm. The unidentified bacilli distributed through out the entire zone (0~12 cm) of the sediment. The possibility of applying these bacilli for bioremediation of the polluted marine environments or for developing ecological preparations for horticultural is discussed. Fig 3, Tab 3, Ref 15

Keywords spore-producing bacterium; *Bacillus*; ecosystem; mariculture

CLC Q939.108 1 S954.21

在环境条件恶劣情况下,产芽孢细菌形成抵抗逆境的内生孢子(芽孢),提高其在环境中的生存能力。产芽孢细菌在土壤^[1]、水体^[2]、和海洋^[3]等环境中分布广泛,对这些环境中的C、N和P等物质元素的循环起着非常重要的作用。一些芽孢杆菌作为益生菌或者饲料添加剂被广泛使用^[3,4],在水产养殖中使用也有报道^[5]。近海养殖场是受人类活动影响较大的海洋环境,研究该环境的微生物生态区系,有助于了解近海微生物的种群和数量,揭示人类活动(如益生菌的使用)对自然生态环境中微生物区系的影响。

已有从养虾池分离微生物并作为虾池环境的生物修复菌种的研究报道^[6],但目前尚未见对这些细菌进行分类鉴定研究,而针对近海生态环境中产芽孢细菌的系统研究也未见报道。本项研究首先对福建东山某近海养虾场底泥中的细菌数量进行了分析,发现底泥中芽孢数量占细菌生物量的50%以上,进一步对产芽孢细菌的种群和在底泥中分布进行了研究。研究结果对于了解我国近海养殖场底泥微生物生态区系,以及开发利用近海微生物资源具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌种的分离、培养及鉴定

1.1.1 样品来源及菌种 样品采自福建东山某近海养虾场的底泥,在虾池中心点,以纵向方式采集,依深度(δ /cm)分为0~2、2~4、4~6、6~8、8~10、10~12共6个样品(依次编号为

收稿日期:2003-06-30 接受日期:2003-09-01

* 中国科学院知识创新工程项目(KZCX1-SW-12 II)和百人计划支持项目 Supported by the Knowledge Innovation Program (Project No. KZCX1-SW-12 II) and the "100 Distinguished Young Scientists" (2001) of the Chinese Academy of Sciences.

** 通讯作者 Corresponding author (Fax: 010-61652317; E-mail: biotech@sun.im.ac.cn)

No. 1、2、3、4、5 和 6)。样品经逐级稀释后, 用人工海水琼脂培养基分离单菌落, 进一步纯化转接 3 代或更多代, 直至获得纯菌株。对纯菌株应用芽孢培养基培养, 革兰氏染色和芽孢染色后, 显微镜镜检确定产芽孢细菌菌株。

1.1.2 培养基 试验所用人工海水培养基根据 Eguchi 等人^[7]配方修改而成, 组成如下($\rho/g L^{-1}$): 蛋白胨 10; 牛肉膏 5; NaCl 24; Na_2SO_4 4; KCl 0.68; KBr 0.1; H_3BO_3 0.025; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.8; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.5; $NaHCO_3$ 0.2; Na_2HPO_4 0.04; NH_4Cl 0.5, 加 H_2O 至 1 L, pH 8.0。 $\theta = 115^\circ C$, $t = 30$ min 灭菌。固体培养基中加入 $15 g L^{-1}$ 琼脂粉。计数芽孢的固体培养基参照文献^[8]。鉴于细菌来自海洋环境, 鉴定用的生理生化培养基是在人工海水培养基的基础上进行了修改, 其中硝酸盐还原鉴别实验培养基中加入 $\rho(KNO_3) = 1 g L^{-1}$; 吲哚鉴别实验培养基中除去蛋白胨和牛肉膏, 加入 $\rho(\text{胰蛋白胨}) = 10 g L^{-1}$; NaCl 梯度实验培养基是调整 NaCl 浓度($\rho/g L^{-1}$) 分别为 0、50、100、150、200; pH 生长实验培养基用 HCl ($2 mol L^{-1}$) 或者 NaOH ($2 mol L^{-1}$) 调整培养基的 pH 值分别为 2、4、6、8、10。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌和芽孢的计数方法^[8] 样品中细菌总数采用 MPN 法和 CFU 法测定; 厌氧细菌计数采用 MPN 法; 细菌芽孢计数时, 稀释样品经 $\theta = 80^\circ C$, $t = 20$ min 的预处理。

1.2.2 分离纯化 从每个样品稀释后涂布生长的分离培养基平板上, 挑取形态上有区别的菌落, 在人工海水培养基斜面上培养 18 h 后划线分离纯化; 从划线分离的平板上, 挑取单菌落接于斜面培养 18 h 后, 再次划线分离, 反复操作直至划线所得的菌落形态完全一致, 编号并保存各菌株。

1.2.3 细菌染色、形态观察 参照文献^[9]进行。

1.2.4 生理生化鉴定实验 氧化酶、接触酶、葡萄糖氧化发酵、运动性、淀粉水解、硝酸盐还原、柠檬酸盐利用、明胶液化、V-P 和甲基红、吲哚产生、 $\theta = 65^\circ C$ 生长、NaCl 浓度生长范围和 pH 生长范围等指标的测定参照文献^[9]。

1.2.5 16S rDNA 序列扩增 细菌基因组 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》^[11]。16S rDNA 片段采用 PCR 扩增, 扩增引物为 Pf(8~27) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, Pr(1495~1514) ACGGCTACCTTGTTACGACT; 扩增产物为 1500 bp 的近似全长 16S rRNA 基因。

1.2.6 ARDRA 分析^[12,13] 选择识别 4 个碱基的限制性内切酶 *Afa* I、*Msp* I 和 *Hae* III, 用于 16S rDNA 扩增产物的酶切分型。酶切条件参照供应商的产品说明。DNA 的酶切产物通过 2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 电泳后由 Bio-Rad 公司的 Gel Doc 2000TM 凝胶成像系统和 Quantity One 软件进行 16S rDNA 酶切图谱的分类和分型。

2 结果与讨论

2.1 底泥中好氧细菌、厌氧细菌及细菌芽孢的数量和分布

分析底泥 0~12 cm 深度范围内, 6 个样品中好氧细菌及厌氧细菌数量 (n/g^{-1} , 以干泥重量计) 表明(图 1), 从表层开始, 随着深度的增加, 好氧细菌的数量除了在 6~8 cm 样品

中稍低外, 其他样品中好氧细菌的数量基本相同, 都在 10^6 这个数量级。厌氧细菌数量沿底泥纵向分布随着深度增加略呈增高趋势, 且最底层(10~12 cm) 较表面高一个数量级。图 1 对底泥中芽孢数量的初步统计表明, 在各个样品中芽孢数量占细菌总量的 50% 以上。芽孢是产芽孢细菌在恶劣条件下形成的一种抵抗不良环境条件的休眠体, 存在如此数量众多的芽孢, 说明产芽孢菌是底泥中微生物区系中的重要一员。总体来看, 细菌数量纵向分布差别不大, 这与底泥采样深度比较浅有关。

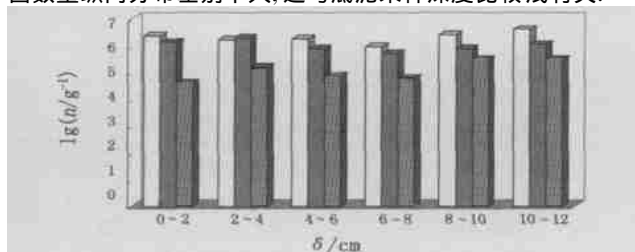


图 1 底泥不同深度各种细菌计数结果

Fig. 1 Bacterial populations at different depths of sediment

2.2 底泥中产芽孢细菌的分离和鉴定

2.2.1 产芽孢细菌的生理生化分类鉴定结果 目前已知好氧或微好氧的产芽孢细菌共有 9 个属, 分别是芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、硫芽孢杆菌属 (*Sulfidobacillus*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、脂环酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、硫氮素芽孢杆菌属 (*Aneurinibacillus*)、盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*)、双芽孢杆菌属 (*Amphibacillus*)、芽孢杆菌属 (*Sporodactobacillus*)^[1]。在本项研究中采用稀释涂平板培养技术, 从底泥样品中共分离出 106 株细菌, 对这 106 株细菌进行芽孢培养和芽孢染色, 鉴定出 67 株芽孢菌, 根据菌落形态、细胞特征和生理生化等鉴定结果(表 1), 参照已有产芽孢细菌有关属和种的特征和鉴定指标, 初步把这 67 株芽孢菌分别归在芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属, 其中芽孢杆菌属 61 株, 短芽孢杆菌属 6 株。

表 1 依据形态和生理生化特征对 67 株产芽孢细菌鉴定的结果

Table 1 Identification and grouping of 67 spore-forming bacterial strains from mariculture pond sediment

属、种或类群 Genus, species & group	菌株 Strains
短芽孢杆菌属 (<i>Brevibacillus</i> spp.)	1-6, 3-11, 6-1, 6-4, 6-9
芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)	
蜡状芽孢杆菌 (<i>B. cereus</i>)	1-1, 5-2, 6-3, 4-3
短小芽孢杆菌 (<i>B. pumilus</i>)	2-14, 4-16, 4-17, 5-1, 5-7, 5-15, 6-11
巨大芽孢杆菌 (<i>B. megaterium</i>)	1-2, 2-8, 3-4
苏云金芽孢杆菌 (<i>B. thuringiensis</i>)	1-10, 2-15, 5-14
海洋芽孢杆菌 (<i>B. marinus</i>)	5-4, 5-9
球形芽孢杆菌 (<i>B. spæricus</i>)	2-12, 3-10, 4-22, 6-6
2-1, 2-5, 2-13, 4-1, 4-2,	
坚强芽孢杆菌 (<i>B. firmus</i>)	4-4, 4-6, 4-11, 4-12, 4-24, 6-2
1-3, 1-4, 1-7, 1-11, 1-13,	
2-3, 2-6, 3-1, 3-2, 3-6, 3-7,	
3-9, 3-13, 3-14, 4-5, 4-8,	
4-13, 4-18, 4-19, 5-3, 5-18,	
6-8	
2-10, 2-11, 2-17, 5-5, 5-13,	
6-10	
<i>Bacillus</i> sp. group 1*	
<i>Bacillus</i> sp. group 2*	

* Group 1 和 group 2 菌株的性状与耐碱芽孢杆菌相似, 但也存在相当的差别, 因此, 其确切的分类地位还有待进一步研究。Further work is needed to identify the members of group 1 and group 2, although they were phenotypically similar to *B. alcalophilus*.

2.2.2 产芽孢细菌 16S rDNA 分析 从 67 株芽孢菌中选取 12 株, 扩增其 16S rDNA 序列, 扩增产物用限制性内切酶 (*Afa* I、*Msp* I、*Hae* III) 酶切分型(图 2)。结合对菌株的形态特征、生理生化特性等研究, 可以看出, 对分离的芽孢菌采用 ARDRA 技术的分型结果与生理生化分类结果基本上一致。例如, *Hae* III 酶切把 12 株芽孢菌分为 5 种类型, 两株蜡状芽孢杆菌(5-2, 6-3)(图 2-*Hae* III 泳道 3 和 4) 和 5 株短小芽孢杆菌分别

被归在各自的类群中(图 2-*Hae* III 泳道 7 至 11), 虽然菌株 4-13 的 *Hae* III 酶切带型与短小芽孢杆菌相同, 但经过 *Msp* I 酶切, 它们之间的差异显而易见(图 2-*Msp* I, 泳道 12)。另外, ARDRA 技术可以提供比传统生理生化分类更加精细的信息, 如同属于巨大芽孢杆菌的菌株 2-8、1-2 和菌株 3-4, 其酶切带型稍有不同(图 2-*Hae* III 泳道 5 与泳道 1 和 6), 表明存在于亚种或者菌株上的差异。

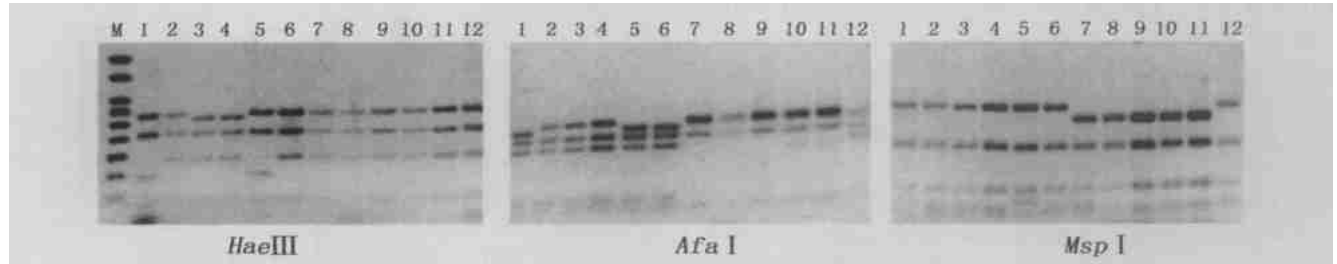


图 2 芽孢菌 12 株代表的 16S rDNA 片段的 ARDRA 类型

Fig. 2 ARDRA patterns of 16S rDNA fragments of 12 spore-forming bacterial strains

M: 分子量标准(Marker); 泳道及菌株分别如下(lane: strain): 1: 2-8; 2: 4-19; 3: 5-2; 4: 6-3; 5: 1-2; 6: 3-4; 7: 5-7; 8: 5-15; 9: 6-11; 10: 4-16; 11: 4-17; 12: 4-13

2.2.3 序列测定结果 从表 1 中选取了几株芽孢菌进行了 16S rDNA 测序, 结果表明, 菌株 1-1 与蜡状芽孢杆菌亲缘关系最近(99%, 16S rDNA 序列相似性, 以下相同); 菌株 2-8 与巨大芽孢杆菌亲缘关系最近(99%); 菌株 6-2 与坚强芽孢杆菌亲缘关系最近(98.4%), 基本上可以归属为同一物种。这些结果与前

述的生理生化分类结果和 ARDRA 分型结果一致。用限制性内切酶酶切分型的结果与选择的内切酶的类型密切相关, 我们认为一套适宜的酶切系统有可能对环境样品进行菌群的划分, 能够简捷、快速地从环境中得到菌群结构和菌种类型的准确信息。

2.3 芽孢杆菌在底泥中的纵向分布的生态特征

表 2 不同种芽孢杆菌菌株在底泥中的纵向分布
Table 2 Distribution of *Bacillus* strains at each sample

属、种或类群 Genus, species & group	底泥深度 Depth of sediments(δ/cm)					
	0~ 2	2~ 4	4~ 6	6~ 8	8~ 10	10~ 12
好氧细菌菌株总数 (Total number of aerobic strains)	19	17	15	22	17	17
芽孢杆菌菌株总数 (Total number of <i>Bacillus</i>)	9	12	10	16	11	9
芽孢杆菌菌种类型 (Types of <i>Bacillus</i>)	5	7	4	5	6	7
芽孢杆菌属分布 (<i>Bacillus</i>) *						
蜡状芽孢杆菌(<i>B. cereus</i>)	1	0	0	1	1	1
短小芽孢杆菌(<i>B. pumilus</i>)	0	1	0	2	3	1
巨大芽孢杆菌(<i>B. megaterium</i>)	1	1	1	0	0	0
苏云金芽孢杆菌(<i>B. thuringiensis</i>)	1	1	0	0	1	0
海洋芽孢杆菌(<i>B. marinus</i>)	0	0	0	0	2	0
球形芽孢杆菌(<i>B. spæricus</i>)	0	1	1	1	0	1
坚强芽孢杆菌(<i>B. firmus</i>)	0	3	0	7	0	1
<i>Bacillus</i> sp. group 1	5	2	7	5	2	1
<i>Bacillus</i> sp. group 2	0	3	0	0	2	1
短芽孢杆菌属分布(<i>Brevibacillus</i>) *	1	0	1	0	0	3

* 数字为不同类型产芽孢细菌在底泥各深度的菌株数目 Numbers in the T able show the amounts of each species or groups at the specified sample.

2.3.1 芽孢杆菌不同种在底泥中的纵向分布特征 结合以上对菌株的鉴定和分析菌株的来源, 可以确定各种芽孢菌在底泥中的分布(表 2)。从表 2 中可以看出, 各种芽孢杆菌在底泥中的分布具有一定的区域性, 例如巨大芽孢杆菌主要分布在底泥深度 0~ 6 cm 左右的区域, 由于巨大芽孢杆菌常常被用做益生菌或者饲料添加剂使用, 该菌种有可能是人为投加到环境中

去的, 反映了人类行为对养殖环境底泥生态存在一定影响。海洋芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌主要分布于底泥 6 cm 以下的区域。坚强芽孢杆菌分布在底泥 2~ 8 cm 深度, *Bacillus* sp. group 1 和 *Bacillus* sp. group 2 是与耐碱芽孢杆菌性状相近的芽孢菌广泛分布在 0~ 12 cm 区域, 它们也是数量最丰富的类群(各个菌株的分类地位还有待进一步研究才能确定)。

表 3 底泥不同深度产芽孢细菌各菌株的主要生理特性*
Table 3 Physiological and biochemical properties of spore forming bacterial strains at each sample*

深度 Depth (δ /cm)	0~2				2~4				4~6				6~8				8~10				10~12			
菌号 No. of strain	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
2	+	+	-	-			U		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
3	+	+	-	+	+	+	-	+			U		+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
4	+	+	-	+			U		+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
5			U		+	+	+	+			U		+	+	-	+	+	+	-	+			U	
6	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-				U		-	+	+	+
7	+	+	-	-			U		+	+	-	+			U		+	+	+	-			U	
8			U		+	+	-	-			U		+	+	-	+				U	+	+	-	+
9			U				U		+	+	-	-			U		-	+	-	+	-	-	+	+
10	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+			U				U		+	-	-	+
11	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+				U		-	+	-	+
12			U		-	+	+	+			U		+	+	+	+				U				U
13	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+				U
14			U		-	+	-	+	+	+	-	+			U		+	+	+	+				U
15			U		+	+	+	-			U				U		-	+	-	+				U
16			U				U				No		-	+	-	+				U				U
17			U		+	+	+	-			No		-	+	-	+				U				U
18			U				U				No		+	+	-	-	+	+	-	-				No
19			U				No				No		+	+	-	+				U				No
20			U				No				No				U					No				No
21			No				No				No		+	+	-	+				No				No
22			No				No				No		+	+	-	+				No				No
23			No				No				No				U					No				No
24			No				No				No		+	+	+	-				No				No

* A: 淀粉水解; B: 蛋白质分解; C: 硝酸盐还原; D: pH>10 生长; U: 表示该编号菌株为非芽孢细菌; No: 表示没有该编号的菌株

A: Starch hydrolysis; B: Proteolysis; C: Nitrate reduction; D: Growth above pH 10; U: Not spore-forming; No: None

2.3.2 产芽孢细菌主要生理特征与底泥深度的关系 虾池底质状况决定了芽孢杆菌的分布和生态特征。传统的养虾方法以人工投饵方式进行, 所投饵料多是合成饵料, 后期辅以鲜活饵料蓝蛤、泥螺等, 沉积池底的有机污染物以残饵为主, 加上动物排泄物和死亡动植物残体等成分复杂的混合物^[6]。其中含有大量的蛋白质、淀粉以及内源性或者外源性 NO_3^- , 表 3 给出了底泥各样品中芽孢菌的相关生理特性, 图 3 显示了具有这些生理特征(代谢能力)的菌株在底泥不同深度的分布, 从中可以直观地看出, 所研究的虾池底泥环境中表层附近主要为具有较强的水解淀粉能力的芽孢杆菌, 这与残存饵料组成成分相关; 底泥 6 cm 以下逐渐增多具有一定硝酸盐还原能力的芽孢杆菌, 这与天然海洋沉积环境中缺少硝酸盐和亚硝酸盐还原菌有所区别^[14]; 从在高 pH 能生长的细菌菌株数随底泥深度的增加而增多可以看出, 底泥的碱环境在表层略有下降, 由表层开始的 pH 值降低的现象有可能对养殖产生影响。最近 Towatana 的研究结果认为, 养虾池环境 pH 值降低是由于微生物降解有机 S、P 元素产生的酸性物质造成, 并认为 pH 值降低可能是不利于虾生长的重要因素之一^[15]。

通过本项研究, 获得了一批芽孢杆菌菌种资源, 进一步对这些芽孢杆菌的特性例如对有机物的分解、对环境的净化能力和对病原微生物的拮抗作用等进行研究, 可以为开发海洋环境的生物修复技术和研制海水养殖的微生态制剂打下理论基础。

致谢 本项研究在细菌分类过程中得到了中国科学院微生物研究所菌种保藏中心周宇光主任的指导。

◆ 淀粉水解 Starch hydrolysis ■ 蛋白质分解 Proteolysis
◆ 硝酸盐还原 Nitrate reduction ◆ pH>10 生长 Growth above pH10

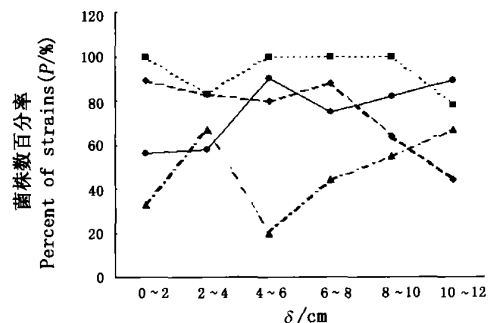


图 3 不同生理特征菌株的纵向分布情况

Fig. 3 Physiological and biochemical properties of spore-forming bacterial strains at each sample

References

- Zhang HY (张华勇), Li ZG (李振高). 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用. *Soils (土壤)*, 2001, (2): 92~97
- Qu JH (瞿建宏), Liu SB (刘韶斌). The growth of *Bacillus* sp. and *Microcystis aeruginosa* and their competition for resources. *J Zhanjiang Ocean Univ (湛江海洋大学学报)*, 2002, 22(3): 13~18
- Tian L (田黎), Li GY (李光友). Culture condition of marine *Bacillus* spp. and effect on produced antagonistic peptin. *Acta Ocean Sin (海洋学报)*, 2001, 23(4): 87~92
- Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J Exper Biol*, 2001, 39: 939~942
- Wang XM (王旭明), Chen ZZ (陈宗泽), Zhang MD (张鸣镝). Probi-

- otics and its application on animal husbandry. *J Jilin Agri Sci* (吉林农业科学), 2000, **25**(3): 48~ 52
- 6 Li QF(李秋芬), Qu KM(曲克明), Xin FY(辛福言), Yuan YX(袁有宪). Isolation and selection of functional bacteria for bioremediation of shrimp culture environment. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2001, **7**(3): 281~ 285
- 7 Eguchi M, Nishikawa T, Macdonald K. Responses to stress and nutrient availability by the marine *Ultramicrobacterium sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(4): 1287~ 1294
- 8 许光辉等. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986. 2
- 9 东秀珠, 蔡妙英等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- 10 Wang LC(王立超), Lian Y(连岩), Zhang ZX(张志新). Effect on Relation of temperature, light & pH to growth of PSB. *Mar Sci* (海洋科学), 1997(3): 23~ 24
- 11 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, Vol. 2. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 2001
- 12 Heyndrickx M, Vauterin L, Vandamme P, Kersters K, De Vos P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J Microbiol Meth*, 1996, **26**: 247~ 259
- 13 Brunel B, Givaudan A, Lanois A, Akhurst RJ, Boemare N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(2): 574~ 580
- 14 薛廷耀. 海洋细菌学. 北京: 科学出版社, 1962
- 15 Towatana P, Voradaj C, Panapitukkul N. Changes in soil properties of abandoned shrimp ponds in southern Thailand. *Environ Monit Assess*, 2002, **74**(1): 45~ 65

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(双月刊)

刊号: $\frac{\text{ISSN } 1006-687X}{\text{CN } 51-1482/Q}$ 邮发代号: 62-15

本刊是中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术科技期刊(学报级),是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物.主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评.读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部.本刊获中国科学院科学出版基金资助.

本刊是中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊、《中文核心期刊要目总览》收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊,也为《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中国科技期刊数据库以及美国《CA》(化学文摘)、俄罗斯《PЖ》(文摘杂志)、英国《Europa Publications》等中外数据库收录.本刊曾获中国期刊方阵双效期刊、四川省第二届优秀期刊、四川省一级学术期刊.

《应用与环境生物学报》为双月刊(1999年由季刊改为双月刊),全铜版纸印刷,双月25日出版,每期128页.定价为每期11.00元,年定价66.00元.全国各地邮局(所)均可订阅.新订户可向本刊编辑部补购1995至2003年以来各卷,以及1999年增刊(环境微生物学研究).编辑部地址:成都市人民南路4段9号,中国科学院成都生物研究所学报编辑部.邮编:610041;电话:(028)85229903,85237341(联系人:刘东渝);E-mail:biojab@cib.ac.cn;http://www.cibj.com