

学校编码：10384
学号：21620111152312

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦门大学

硕士 学位 论文

深海弯曲菌 (*Thalassolituus* spp.) 低温烷烃
降解机制的研究及其在海洋环境中多样性
分析

The cold adaption mechanism and biodiversity of
psychrotolerant alkane-degrading bacteria of the genus
Thalassolituus in marine environments

陈昕

指导教师姓名：邵宗泽 教授
专业名称：生物化学与分子生物学
论文提交日期：2014 年 05 月
论文答辩时间：2014 年 05 月
学位授予日期：2014 年 月

答辩委员会主席：黄邦钦 教授

评 阅 人：_____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- () 2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）：

年 月

目录

摘要	1
Abstract	3
1. 前言	6
1.1 海洋石油污染的现状与危害	6
1.2 低温海洋环境中石油降解菌研究现状	7
1.3 深海弯曲菌 <i>Thalassolituus</i> 的研究概况	10
1.4 课题研究意义和内容	14
2. 材料和方法	16
2.1 材料	16
2.1.1 样品及菌株来源	16
2.1.2 菌株与载体	19
2.1.3 主要试剂和药品	19
2.1.4 主要仪器	20
2.1.5 常用培养基和溶液	20
2.1.6 分析软件	22
2.2 基本实验方法	23
2.2.1 细菌单菌 DNA 的提取	23
2.2.2 菌群 DNA 的提取	24
2.2.3 PCR 反应体系	25
2.2.4 PCR 扩增程序	25
2.2.5 菌落 PCR	26
2.2.6 PCR 产物纯化	26
2.2.7 变性梯度凝胶电泳(DGGE)	27
2.2.8 DGGE 条带回收、分析	28
2.2.9 TA 克隆	28
2.3 烷烃降解理化性质的研究方法	29
2.3.1 <i>Thalassolituus</i> 属菌株分离	29

2.3.2 透射电镜（TEM）细胞形态观察	30
2.3.3 生长曲线测定.....	30
2.3.4 表面张力测定.....	31
2.3.5 细胞表面疏水性测定.....	31
2.3.6 细胞脂肪酸测定.....	32
2.3.7 碳源利用范围测定.....	33
2.3.8 石油烃利用范围测定.....	33
2.3.9 深海弯曲菌与其它菌群和单菌的竞争性培养实验.....	33
2.4 R6-15 烷烃降解基因分析	34
2.4.1 基因组测序方法.....	34
2.4.2 烃降解和冷适应相关基因分析方法.....	35
2.5 深海弯曲菌可培养菌株分离	35
2.5.1 样品富集.....	35
2.5.2 降解单菌分离.....	35
3. 结果与讨论	36
3.1 深海弯曲菌的烷烃降解特性	36
3.1.1 深海弯曲菌的分离.....	36
3.1.2 透射电镜观察.....	37
3.1.3 生长曲线测定.....	39
3.1.4 表面张力测定.....	42
3.1.5 细胞表面疏水性测定.....	43
3.1.6 脂肪酸测定.....	44
3.1.7 碳源利用范围测定.....	45
3.1.8 石油烃利用范围测定.....	47
3.1.9 深海弯曲菌与其它菌群和单菌的竞争性培养.....	51
3.2 深海弯曲菌 R6-15 全基因组测序分析	67
3.2.1 基因组测序概况及统计	67
3.2.2 烃降解及冷适应相关基因分析.....	70
3.3 深海弯曲菌可培养菌分离及多样性分析	79

3.3.1 西太平洋表层海水中可培养石油烃降解菌分离.....	79
3.3.2 厦门近海表层海水中可培养石油烃降解菌分离.....	83
3.4 讨论	85
3.4.1 深海弯曲菌的分离培养及多样性分析.....	85
3.4.2 深海弯曲菌低温下烃类降解机制.....	86
3.4.3 深海弯曲菌低温下占优势的原因.....	88
4. 小结与展望	91
4.1 小结	91
4.2 展望	93
参考文献	94
致谢	102
附录	103

Catalog

Chinese abstract	1
English abstract	3
1.Introduction	6
1.1 The introduction of oil pollution in the marine environment.....	6
1.2 Description of petroleum-degrading microorganisms in the cold marine environment	7
1.3 The introduction of <i>Thalassolituus</i>	10
1.4 Purpose and significance of this study	14
2.Materials and methods	16
2.1 Materials	16
2.1.1 Samples and strains.....	16
2.1.2 Strains and plasmid.....	19
2.1.3 Reagents	19
2.1.4 Instruments.....	20
2.1.5 Medium and solutions.....	20
2.1.6 Biological software	22
2.2 Basic methods	23
2.2.1 Extraction of bacterial DNA	23
2.2.2 Extraction of DNA from consortium	24
2.2.3 PCR reaction system.....	25
2.2.4 PCR reaction program.....	25
2.2.5 PCR with bacterial colony	26
2.2.6 Purification of PCR product.....	26
2.2.7 Process of DGGE	27
2.2.8 Collection and analysis of DGGE band	28
2.2.9 TA cloning.....	28
2.3 Mehods of physicochemical characteristic growing on alkane	29
2.3.1 Isolation of strains belong to <i>Thalassolituus</i>	29

2.3.2 Cellular morphology using TEM	30
2.3.3 Growth curves	30
2.3.4 Surface tension.....	31
2.3.5 Hydrophobicity of cell surface.....	31
2.3.6 Fatty acid analysis	32
2.3.7 Spectrum of carbon substrates	33
2.3.8 Spectrum of hydrocarbon substrates	33
2.3.9 Competitive cultures	33
2.4 Analysis of functional gene.....	34
2.4.1 Genome sequencing.....	34
2.4.2 The method of analysis of gene related to alkane degrading and cold adaption.....	35
2.5 Isolation of <i>Thalassolituus</i>	35
2.5.1 Enrichment of samples.....	35
2.5.2 Isolation and identification	35
3. Results and discussion	36
3.1 Physicochemical characteristic of <i>Thalassolituus</i> growing on alkane... <td>36</td>	36
3.1.1 Isolation of <i>Thalassolituus</i>	36
3.1.2 Cellular morphology of <i>Thalassolituus</i>	37
3.1.3 Results of growth curves.....	39
3.1.4 Results of surface tension	42
3.1.5 Results of hydrophobicity of cell surface	43
3.1.6 Results of Fatty acid analysis	44
3.1.7 Results of spectrum of carbon substrates.....	45
3.1.8 Results of spectrum of hydrocarbon substrates	47
3.1.9 Results of Competitive cultures	51
3.2 Genomic analysis of <i>Thalassolituus</i> R6-15	67
3.2.1 Genome sequencing information	67
3.2.2 Analysis of gene related to alkane degrading and cold adaption	70
3.3 Isolation and diversity of culturable strains belong to <i>Thalassolituus</i> ... <td>79</td>	79

3.3.1 Isolation and identification of consortium collected from the surface seawater from the Western Pacific Ocean	79
3.3.2 Isolation and identification of surface seawater community retrieved from Xiamen coastal sea.....	83
3.4 Dicussion.....	85
3.4.1 Isolation and diversity analysis of <i>Thalassolituus</i>	85
3.4.2 Mechanism of alkane-degrading of <i>Thalassolituus</i>	86
3.4.3 The reasons that <i>Thalassolituus</i> become dominant at low temperature	88
4. Conclusion and prospect	91
4.1 Conclusion	91
4.2 Prospect.....	93
References	94
Acknowledgements	102
Appendix	103

摘要

海洋石油污染问题广受关注，烷烃是原油中的重要成分。在南北极和其他低温地区人类活动的增加，研究低温地区的石油烃降解具有重要意义。前期研究表明，深海弯曲菌（*Thalassolituus*）在北冰洋表层海水的石油富集菌群中常常以绝对优势菌出现在石油降解菌群，但是原因不明。为此，本文以已经获得深海弯曲菌菌株R6-15为出发菌，以食烷菌（*Alcanivorax*）模式菌株*A. borkumensis* SK2、*A. dieselolei* B-5和*A. jadensis* T9为参比菌株，研究它们烷烃低温降解的优势机制。为进一步验证实验结果，本文又重新从北极低温富集菌群中分离获得了另外一株降解菌*Thalassolituus* sp. 4BN06-13与R6-15平行开展比较分析。本文以正十四烷为代表性烷烃底物，对比分析了它们在低温（15℃）和常温（25℃）下降解烷烃的特性。通过基因组测序分析了烷烃降解机制。同时，本文还对西太平洋表层海水等其他环境中的深海弯曲菌进行了分离鉴定和多样性分析。

生理生化结果表明，菌株*Thalassolituus* sp. R6-15和4BN06-13均仅能利用少量的碳源，如Tween-40、Tween-80和乙酸，以及碳链长度为C8-C36的饱和烷烃。生长曲线测定表明，以十四烷为唯一碳源培养时，两株深海弯曲菌在15℃时，生长情况优于食烷菌SK2和B-5；利用十四烷为唯一碳源生长时，两株深海弯曲菌在15℃的生长情况好于25℃；但是，在利用乙酸钠为唯一碳源时，在25℃时生长更快。表明它们为耐冷菌。细胞表面疏水性分析表明，无论烷烃存在与否，也无论15℃还是25℃，菌株R6-15细胞表面疏水性优于食烷菌SK2，而比食烷菌B-5低。表面张力测定结果表明，在有烷烃诱导时，菌株R6-15在25℃能够将培养物的表面张力由59.43 mN/m降低至49.09 mN/m，但在15℃下不能降低培养物的表面张力值；在无烷烃诱导时，菌株R6-15不能降低培养物的表面张力值。细胞脂肪酸测定结果表明，菌株R6-15细胞中的主要脂肪酸组成为C14:0、C16:0和16:1 w6c / 16:1 w7c；并且，无论有无烷烃诱导，不饱和脂肪酸（16:1 w6c / 16:1 w7c）的含量在15℃培养时明显高于25℃处理。

为了验证深海弯曲菌在低温下是否能够保持竞争优势，进行了竞争性生长实验。即，把菌株R6-15和4BN06-13分别与厦门表层海水的土著微生物或食烷菌放在以正十四烷为唯一碳源的培养基中，分别在15℃和25℃共培养，观察

的竞争性生长情况。结果表明, 菌株 R6-15 与厦门表层海水菌群培养过程中, 均为 25 ℃ 混合培养中占优势菌, 并且, 在 15 ℃ 的优势更为突出; 而菌株 4BN06-13 在 25 ℃ 共培养菌群中, 一直保持优势。在与 *A. jadensis* T9 共培养过程中, 深海弯曲菌是优势菌株。

菌株 R6-15 全基因组测序结果表明, 该菌株仅包含一个环状染色体, 大小为 3,764,053bp, GC 含量为 46.6%, 与模式菌株 *Thalassolituus oleivorans* MIL-1(T) 在全基因组序列水平上的相似性为 96.92%, 因此菌株 R6-15 属于 *Thalassolituus oleivorans*。对基因组初步分析后发现, 其基因组中包含两个烷烃羟化酶基因(*alkB*) 和两个黄素单加氧酶基因 (*almA*), 且它们与模式菌株 MIL-1 中对应基因在氨基酸序列水平上的同源性大于 99%。*alkB* 和 *almA* 基因系统发育分析表明, 来源于深海弯曲菌的这两类基因均各自形成一个独立的分支, 暗示了它们进化的独立性。此外, 在 R6-15 基因组中还发现了一系列可能与菌株冷适应性相关的基因, 如冷休克蛋白 (*Csp*)、与低温生长相关蛋白质折叠系统包括分子伴侣 *DnaK–DnaJ–GrpE*、*GroESL*、*ClpB* 和 *SecB*, 及冷休克 *Dead-box* 蛋白 A (*csdA*) 等基因。这些基因的存在, 可能暗示着菌株 R6-15 中存在支持其在低温下生长的蛋白质折叠系统。

为了获得更多深海弯曲菌属的可培养菌株资源, 本文还分别从西太平洋表层海水石油烃富集菌群和厦门近海表层海水中分离获得了 3 株该属的菌株, 16S rRNA 基因系统进化结果表明, 其中两株分离自西太平洋的菌株, 与模式菌株 *Thalassolituus marinus* IMCC1826 相似度分别为 96.74% 和 96.80%, 可能是该属的新种, 它们低温下对烷烃的降解能力还有待验证。

综上所述, 本文首次对深海弯曲菌在低温和常温下利用烷烃的生长特性, 并对它们烷烃降解及低温适应性机制进行了初步研究, 研究结果将有助于理解深海弯曲菌在低温海洋环境石油烃降解菌群中保持优势的原因, 为其在低温石油污染海洋环境的应用提供理论支撑。

关键词: 深海弯曲菌; 烷烃; 生物降解; 低温; 降解机制; 冷适应性; 生物多样性

Abstract

Marine crude oil pollution is a worldwide problem, alkane is an important content in the crude oil. As the activities of human in polar area and other cold environments have increased, it's important to study the petroleum degrading in the cold areas. Previous study indicated that *Thalassolituus* is usually dominant in oil-degrading consortia from surface seawater of the Arctic Ocean and the reason haven't been found yet. This thesis mainly focused on the alkane-degrading and cold adaption mechanism of genus *Thalassolituus* at low temperature. Two *Thalassolituus* strains named R6-15 and 4BN06-13 and three reference strains belonging to genus *Alcanivorax* (named *A. borkumensis* SK2, *A. dieselolei* B-5 and *A. jadensis* T9) were used in this study. The alkane degradation mechanism of these strains were contrastively studied with the tetradecane as the representative alkane substrate at 15 °C and 25 °C. This thesis analyzed the mechanism of alkane-degrading through genomic sequencing. Meanwhile, the biodiversity of cultivable *Thalassolituus* strains was performed in the surface seawater from the western Pacific Ocean and the coastal sea of Ximen Bay.

At physiological and biochemical levels, strain R6-15 and 4BN06-13 were able to utilize very restricted spectrum of carbon substrates for growth, including sodium acetate, Tween-40, Tween-80 and C8-C36 aliphatic hydrocarbons. When used tetradecane as sole carbon source at 15 °C, the growth of strain R6-15 and 4BN06-13 was better than 25 °C, and also better than strains *Alcanivorax* SK2 and B-5. Compared to 25 °C, two *Thalassolituus* strains grew faster when used sodium acetate as the sole carbon source at 25 °C, indicated that *Thalassolituus* is psychrotolerant . Either at 15 °C and 25 °C, the ability of hydrophobicity of cell surface of *Thalassolituus* strains was better than SK2, but worse than B-5, when they served with tetradecane or not. When strain R6-15 was induced by alkanes, it could decrease the surface tension of the cultures from 59.43 to 49.09 mN/m at 25 °C, but it failed to decease these values at 15 °C. In contrast, strain R6-15 couldn't decrease the surface tension when the alkane substrates were absent. The major cell fatty acids of strain R6-15 were C14:0, C16:0 and 16:1 w6c / 16:1 w7c. Meanwhile, whether exist alkanes or not, the proportion of unsaturated fatty acids (16:1 w6c / 16:1 w7c) of strain R6-15 will significantly increase both at 15 °C, compared with 25 °C.

In order to see if *Thalassolituus* would be dominant at low temperature, we carried on competitive culture experiments, using tetradecane as sole carbon source at 15 °C and 25 °C. The results of competitive culture experiments indicated that strain R6-15 became to be the predominant bacteria in the co-cultures, which was inoculated with strain R6-15 and the in situ community of surface seawater from the Xiamen coastal sea. For strain 4BN06-13, it dominated in the 25 °C co-cultures. When cultured *Thalassolituus* strains with *Alcanivorax jadensis* T9 at 15 °C and 25 °C, *Thalassolituus* was the dominant member in these co-cultures obtained from two temperatures.

In order to better understand the alkane-degrading mechanism, the genome of strain R6-15 was sequenced. The whole genome was 3,764,053bp with a G+C content of 46.6%. The similarity between strain R6-15 and the type strain *Thalassolituus oleivorans* MIL-1(T) was 96.92% at the whole genome sequence level. Two alkane hydroxylase genes (*alkB*) and two flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) were found in its genome, respectively. These two kinds of gene showed more than 99% similarity at amino acid residues with their counterparts in type strain *T. oleivorans* MIL-1. Phylogenetic analysis results showed that the *alkB* and *almA* genes originated from genus *Thalassolituus* separately clustered into the independent branches, which indicated that they may evolve independently. In addition to the alkane-degrading genes, many cold adaption genes were also found in its genome, such as cold shock protein gene (*Csp*), a dedicated protein-folding system using *DnaK–DnaJ–GrpE*, *GroESL*, *ClpB* and *SecB*, and cold shock dead-box protein A gene (*csdA*). The existence of these genes indicated that strain R6-15 may own the protein fold system which will support it grow at low temperature.

In addition to the above results, the biodiversity of the cultivable strains of genus *Thalassolituus* was also surveyed. Three isolates were obtained from the oil-enriched surface seawater of the Western Pacific Ocean during the DY-27 cruise, and from the surface seawater of Xiamen coastal sea. Phylogenetic analysis results of 16S rRNA genes indicated that two of these three strains were candidate new species of genus *Thalassolituus*.

To sum up, this thesis is the first time to study the characteristics of *Thalassolituus* strains which utilized alkanes to grow and their cold adaption mechanism at low temperature. The results will help us understand the reason why *Thalassolituus* strains

always dominated in the oil-degrading consortia at cold marine environments, and will provide reference to their application for crude oil polluted cold marine environments.

Keyword: *Thalassolituus*; alkane; biodegradation; low temperature; degradation mechanism; cold adaption; biodiversity.

厦门大学博硕士论文摘要库

1. 前言

1.1 海洋石油污染的现状与危害

石油又称作原油，它是包含着许多不同的碳氢化合物的混合物。石油的主要成分是烷烃，另外，石油中还含有硫、氮、氧、磷、钒等元素。目前石油开采后，主要用途（88%）是用作燃油和汽油，燃油和汽油是目前世界上重要的能源。同时，石油中提炼的其他物质还能用作许多化工业产品的重要原料，如塑料、杀虫剂、化肥和溶液等。石油作为一种不可再生原料，因此很多人担心石油用尽之后会给人类带来严重的后果。因为石油用途广泛经济价值巨大，人们称其为黑金。同时，石油也是海洋中重要的有机污染物，人类活动及海上突发溢油事件往往对海洋环境和海岸生态系统造成长期而恶劣的影响^[1]。在油轮事故之后，泄漏的石油，即原油或提炼过的油，对许多地区脆弱的海岸生态系统造成了严重的破坏，如加拉帕戈斯群岛、阿拉斯加、西班牙等地区。艾克森石油公司 1989 年在阿拉斯加的事故多年后，在这个地区的沙滩上仍然能发现石油^[2]。

根据石油输入的类型，海洋石油污染可以被分为两类：一、突发性输入，二、慢性长期输入^[3]。关于突发性输入，主要包括由于海上油轮事故流入海中的油，以及海上石油开采造成的泄漏与井喷带来的油，而慢性长期输入指港口和油船的作业如油污水排放、海底天然的渗漏、勘探和生产海底石油的过程中产生的石油、海岸的排油、含油的沉积岩被侵蚀后渗出的油、含油的工业与民用废水的排放、大气中石油烃的沉降等^[3, 4]。

石油污染会对自然生态系统造成严重的影响，对海洋的危害主要有：(1)影响海气交换：覆盖在海面上的油膜，阻断了氧气、二氧化碳等气体的交换，从而破坏了海洋中溶解气体的循环平衡。(2)影响光合作用：破坏了海洋中氧气、二氧化碳的平衡由于油对阳光射入海洋造成的阻碍而被破坏，导致光合作用的客观条件被破坏。同时，藻类是光合作用的主体，分散的油和乳化油进入海洋植物体内，对它们造成破坏。(3)使海水中的溶解氧不足：石油的降解需要消耗水体中大量的氧气，同时油膜会对大气溶氧途径造成阻碍，导致海水中缺氧。(4)对生物的毒化作用：石油中含有稠环芳香烃，对生物体有剧毒作用，会使海洋生物中毒甚至死亡。并且，经过生物富集和食物链传递后，烃类的危害会进一步加剧，

并且通过食物链，烃类最终可能会进入人体，从而对人类健康造成危害^[5]。(5)全球温室效应：大洋是大气中二氧化碳的汇集地，石油污染必将加剧温室效应，从而间接加重“全球问题”。(6)破坏滨海湿地：石油开发等人为活动使滨海湿地丧失严重^[3]。

1.2 低温海洋环境中石油降解菌研究现状

在南北极和其他低温地区人类活动的增加，使得研究关注低温地区的石油烃降解。在被未污染的环境中，石油烃降解微生物在微生物群体中只占不到 1%，相反的，在受到石油污染的生态系统中，石油烃降解微生物达到 100%^[6]。环境温度是影响微生物活力的重要因素^[7]。在低温下，油的粘度增加，有毒的短链烷烃的挥发减少，并且水溶解性增加，使生物降解过程延迟开始^[8, 9]。在南北极地区的油污染可能会随着海水洋流影响到到无冰海岸。即使在-15 ℃ 下，石油也能在冰中扩散开^[10]。从冰中释放出来的水溶性烃也许会通过海水通道运输^[11]。油污染在低温下会持续很长一段时间，阿拉斯加溢油事件发生近 20 年后，在油污染地点的石油烃降解者的量仍然明显高于未污染区^[12]。

低温微生物是指具有对低温条件的适应生长能力的全部微生物，它们在地球上的低温环境中广泛分布，包括深海海区、高山区域、两极地区、淡水湖泊区域、冰川地区和冷冻食品^[13]。根据最适生长温度和生长上限温度的不同，低温微生物一般被分为两大类：嗜冷型菌（psychrophilic）和耐冷型菌（psychrotrophic 或 psychrotolerant）。其中，嗜冷菌通常是指最适生长温度不高于 15℃，生长上限温度小于 20℃ 的菌株；耐冷菌则是指在 0℃ 左右能够生长良好、但最适生长温度大于 20℃ 的微生物^[14]。低温中被检测到的细菌中，最常见报道的微生物是革兰氏阴性菌，α-、β- 和 γ- 变形菌门（*Pseudomonas* spp.^[15] 和 *Vibrio* spp.^[16]）和噬细胞菌属-黄杆菌属-拟杆菌门^[17]。革兰氏阳性菌种中最常被发现的是棒状杆菌属、节细菌属^[18] (*Arthrobacter* sp.) 和微球菌属^[19] (*Micrococcus* sp.)。细菌通常在数量和多样性上超过古生菌，尽管在一些地区如深海，发现它们在数量上相等，同时产甲烷菌和产甲烷球菌是最常被引用的属。在已鉴定出的蓝藻细菌^[20]、颤藻菌^[21]、席藻菌^[22] 和念珠藻菌^[23] 菌群在大部分的南极生境是占优势^[24]。

低温条件下烃降解菌大多从陆地环境分离出^[25-27]，但在极地的石油烃泄漏的调查表明，烃降解细菌分布广泛，并且它们的数量在烃泄漏后会显著增加^[28]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文全文摘要库