

珠江口海岸带沉积物氨氧化细菌和古菌组成及定量研究

陈金全^{1,2}, 郑燕平², 姜丽晶¹, 王风平^{3*} (1. 厦门大学海洋与环境学院, 福建厦门 361005; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建厦门 361005; 3. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要 [目的]对珠江口海岸带沉积物中的氨氧化细菌和古菌的组成进行分析,并进行定量研究。[方法]用构建克隆文库和 Q-PCR 定量的方法对珠江口沉积物中氨氧化细菌和古菌 *amoA* 基因的含量和多样性特征进行研究。[结果]在 2 个沉积物表层,氨氧化古菌的含量是细菌的 9 和 22 倍,揭示氨氧化古菌在珠江口的氨氧化过程中起主导作用;系统发育分析表明大多数古菌和细菌的 *amoA* 基因序列与不可培养的源于河口区和污染区域的环境克隆子序列有较高的同源性;细菌 *amoA* 序列可分成 5 个类群(Cluster A、B、C、D 和 E),均属于 Nitrosomonas 类群,其中 Cluster A 是主要类群(72.1%);古菌 *amoA* 序列分析表明来自于表层的序列有 52.2% 属于“水/沉积物”簇,47.8% 属于“土壤/沉积物”簇,而沉积物底层厌氧区检测到的古菌 *amoA* 基因 93.3% 属于“土壤/沉积物”簇,6.7% 属于“水/沉积物”簇,且 *amoA* 基因数量略高于表层。[结论]该研究有助于了解珠江口区域氮的循环过程,为氮的富营养化处理提供重要的理论依据。

关键词 珠江口沉积物;氨氧化;*amoA* 基因;Q-PCR

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2012)22-11382-04

The Communities of Ammonia-oxidizing Organisms in Pearl River Estuary Sediments

CHEN Jin-quan et al (College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract [Objective] This study aimed to investigate the abundance and composition of ammonia-oxidizing organism in Pearl River Estuary sediment. [Method] Based on *amoA* genes, we detected the abundance and composition of ammonia-oxidizing organism in Pearl River Estuary sediment by using quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR), cloning and sequencing approaches. [Result] The results of Q-PCR presented that ammonia-oxidizing archaea were more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in the top of sediment cores, with AOA to AOB ratios 8.96 (site Q5) and 3.69 (site Q7). It suggested that ammonia-oxidizing archaea maybe play more important roles than ammonia-oxidizing bacteria in the process of ammonia oxidation in the Pearl River Estuary sediment. In the top sediment layer of Q7, bacterial *amoA*-like gene sequences were dominated by Nitrosomonas-like sequence types, which could be classified into five groups (clusters A, B, C, D, and E). Interestingly, archaeal *amoA*-like gene was successfully amplified while bacterial *amoA*-like gene failed to be detected. These archaeal *amoA*-like genes fell into two groups “water column/sediment” cluster and “soil/sediment” cluster. Most of the sequences (93.3%) in the bottom sediment layer of Q7 fell into “soil/sediment” cluster. [Conclusion] This study helps to realize the cycle of nitrogen in Pearl River Estuary region, and thus to provide theoretical support for the treatment of nitrogen eutrophication.

Key words Pearl River Estuary sediment; Ammonia oxidation; *amoA* gene; Q-PCR

氮是所有生物生存所必需的营养元素。氮循环是海洋生态系统中物质循环的重要组成部分,分为 4 个主要过程,即固氮作用、硝化作用、反硝化作用和氨化作用。氨氧化作用是全球氮循环的中心环节之一,主要由氨氧化细菌 β 和 γ -proteobacterial 完成^[1]。近来研究证实一类温泉古菌具有氨氧化能力,其分布比氨氧化细菌更多样,可能在氨氧化过程中有重要作用,从而掀起了对氨氧化过程研究的热潮^[2]。珠江三角洲是全球经济发展最为迅速的区域,而高速的经济发展也导致了珠江污染加剧,水体富营养化严重等问题。珠江口区域可溶性无机氮(DIN)的主要输入者是珠江,由于大量农业、工业和城市生活污水的排放导致珠江中可溶性无机氮含量增高^[3]。因此珠江口水体中的氮转化过程受到广泛关注。该研究从微生物分子生态学的角度研究珠江口地区氨氧化过程,以揭示珠江口环境的氨氧化微生物类群。该研究在国内尚属首次报道,其有助于了解珠江口区域氮的循环过程,为氮的富营养化处理提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品 该研究所用沉积物样品采于于珠江口淇澳岛周围的海岸带,采样位置为 Q7 (N22027'21.4", E113038'7.3") 和 Q5 (N22026'40.4", E113039'09.4")。采样地点盐度为 2.6‰,温度为 21.5℃,水深为 0.5 m。采用重力柱子的方式采集沉积物样品,现场分装,带回实验室后保存于 -20℃ 备用。

1.2 沉积物样品中总 DNA 的提取 选取 Q7 和 Q5 的表层 (0~6 cm) 和 Q7 的底层 (16~32 cm) 沉积物提取总 DNA。方法参照文献[4] 具体步骤:选取沉积物样品 5 g,加入 13.5 ml DNA 抽提缓冲液,剧烈振荡 5 min;加入 1.5 ml 20% SDS,于 65℃ 温浴 2 h,室温下 8 000 g 离心 20 min,上清转移至 50 ml 离心管中;然后沉淀再加入 4.5 ml 抽提缓冲液,0.5 ml 20% SDS 漩涡振荡 30 s,65℃ 温浴 10 min,室温下 8 000 g 离心 20 min,上清转移至 50 ml 离心管中。合并 2 次上清与等体积酚-氯仿-异戊醇混匀(25:24:1, V/V/V);将上层水相移入新的离心管,加入 0.6 倍体积异丙醇,于常温下沉淀 1 h;然后 16 000 g 离心 20 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇洗一次,再溶解于 100 μ l 无菌水,于 -20℃ 保存。

1.3 PCR 扩增 用提取的沉积物样品总 DNA 进行 PCR 扩增,氨氧化细菌的 *amoA* 基因片段采用特异引物 *amoA*-1F (GGGGTTTCTACTGCTGGT) 和 *amoA*-2R (CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC) 扩增;氨氧化古菌的 *amoA* 基因片段采用引物

基金项目 国家 973 前期项目(2006CB708200);国家自然科学基金重点项目(40532011)。

作者简介 陈金全(1979-),男,云南昆明人,博士研究生,研究方向:环境微生物学, E-mail: powercj@ gmail.com。* 通讯作者,教授,博士生导师,从事微生物学方面的研究, E-mail: fengpingw@ yahoo.cn。

收稿日期 2012-04-06

Arch-amoAF (STAATGGTCTGGCTTAGACG) 和 Arch-amoAR (GCGGCCATCCATCTGTATGT) [5]。PCR 扩增体系为 50 μ l, 包含 10 \times PCR buffer 5 μ l, 200 μ mol/dm³ dNTPs, 引物各 10 pmol, 1.5 mmol/dm³ MgCl₂, Taq 酶 5 U, 模板 10 ~ 100 ng。PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 53 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4 amoA 基因文库的构建 amoA 基因文库的构建首先采用上海生物工程技术服务有限公司的柱式 PCR 产物回收试剂盒, 回收纯化扩增出来的 PCR 产物, 然后用 TaKaRa 公司生产的 pMD18-T TA 克隆试剂盒, 按试剂盒说明书将纯化的 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体上, 并转化到 XL-Blue 感受态细胞中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h, 经菌落 PCR 鉴定筛选出含插入片段的阳性克隆。

1.5 序列测定与分析 随机挑选阳性克隆子, 送上海生物工程技术服务有限公司测序, 所得序列在 NCBI 中利用 Blast 搜索 GenBank 中的序列, 找出同源序列, 再利用 clustal、Mega [6] 软件进行系统发育分析。该研究将当 amoA 基因序同源序不小于 95% 时, 定义为一种 OTU (Operation taxonomic units) 取其中一个序列作为代表序列, 进行相关系统发育分析。通过软件 PAST (http://folk.uio.no/ohammer/past/) 分析 amoA 基因片段克隆文库的覆盖率 (C)、Shannon 指数 (H)、Simpson 指数 (D) 和 Buzas-Gibson Evenness 值 [7]。

1.6 荧光定量 PCR (Q-PCR) 采用 Q-PCR 定量分析古菌和细菌 amoA 基因在沉积物中的含量。首先选用 amoA 克隆文库中得到的质粒为模板构建标准品, 标准品的有效检测范围是 10² ~ 10⁸。amoA 定量引物与 amoA 基因克隆文库构建所用引物相同。Q-PCR 反应体系为 25 μ l: MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, 引物 100 nmol/L, 探针 50 nmol/L, Taq 酶 0.5 U, ROX 荧光染料 (50 \times) 0.5 μ l, 模板 300 ~ 1 000 ng, 并设置阴性对照和阳性对照。实时荧光 PCR 反应在 ABI 公司 Prime7900HT 定量 PCR 仪上进行, 反应参数为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s; 40 个循环。

1.7 NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 浓度的测定 无机氮以 2.0 mol/L NaCl 溶液提取测定; 总氮是先将沉积物用 H₂SO₄-H₂O₂ 消化, 然后采用半微量凯氏定氮法测定; NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 浓度用 Skalar 水质自动分析仪分析。有机氮含量即为总氮含量减去无机氮总量。

2 结果与分析

2.1 沉积物化学参数测定 通常无污染的河口 NH₄⁺ 浓度在 22 ~ 45 μ mol/L 之间, 由表 1 可知, 珠江口海岸带沉积物表层 NH₄⁺ 浓度水平比未被污染的河口区高, 其中位点 Q5 表层沉积物的 NH₄⁺、NO₃⁻ 和无机氮浓度都比位点 Q7 略高; 而位点 Q7 底层沉积物的 NH₄⁺、无机氮和有机氮浓度略高于上层。

2.2 古菌和细菌 amoA 定量分析 分别提取珠江口淇澳岛 2 位点沉积物柱的表层和底层总 DNA。Q5 和 Q7 2 位点表层沉积物都通过 PCR 方法检测到细菌 amoA 及古菌 amoA, 而

Q7 的底层沉积物只检测到古菌 amoA 基因片段, 未能发现细菌 amoA 片段。定量结果 (表 2) 表明, 位点 Q7 表层古菌 amoA 基因拷贝数达 3.80 $\times 10^5$ /g, 而位点 Q5 表层沉积物中古菌 amoA 基因拷贝数达 8.33 $\times 10^5$ /g; 位点 Q7 的底层沉积物中古菌 amoA 基因的数量高达 5.80 $\times 10^5$ 拷贝/g, 比表层沉积物略高; 位点 Q5 表层沉积物中细菌 amoA 基因拷贝数为 9.30 $\times 10^4$ /g, 远高于位点 Q7 表层细菌 amoA 基因的拷贝数 (1.03 $\times 10^4$ /g)。

表 1 珠江口海岸带沉积物化学参数测定结果

样品	pH	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	有机氮	无机氮
		μ mol/L	μ mol/L	mg/g	mg/g
Q5 (0 ~ 6 cm)	7.29	64.03	290.6	7.53	0.32
Q7 (0 ~ 6 cm)	7.43	54.43	175.0	7.70	0.18
Q7 (16 ~ 32 cm)	7.37	41.78	621.4	8.78	0.45

表 2 珠江口海岸带沉积物中的 amoA 基因定量分析

样品号	AOA-amoA	AOB-amoA	AOA/AOB
	拷贝数/g	拷贝数/g	
Q5 (0 ~ 6 cm)	8.33 $\times 10^5$	9.30 $\times 10^4$	22
Q7 (0 ~ 6 cm)	3.80 $\times 10^5$	1.03 $\times 10^4$	9
Q7 (16 ~ 32 cm)	5.80 $\times 10^5$	没检测到	

目前分离的氨氧化古菌每个细胞包含 1 个 amoA 基因, 而细菌每个细胞包含 2 ~ 3 个氨氧化基因。如果古菌以每个细胞包含 1 个氨氧化基因, 细菌以每个细胞包含 2.5 个 amoA 基因计算, 2 位点沉积物中氨氧化古菌与氨氧化细菌的数量比分别约为 22 和 9。定量分析揭示了珠江口海岸带沉积物中, 氨氧化古菌与氨氧化细菌相比有数量上的优势。

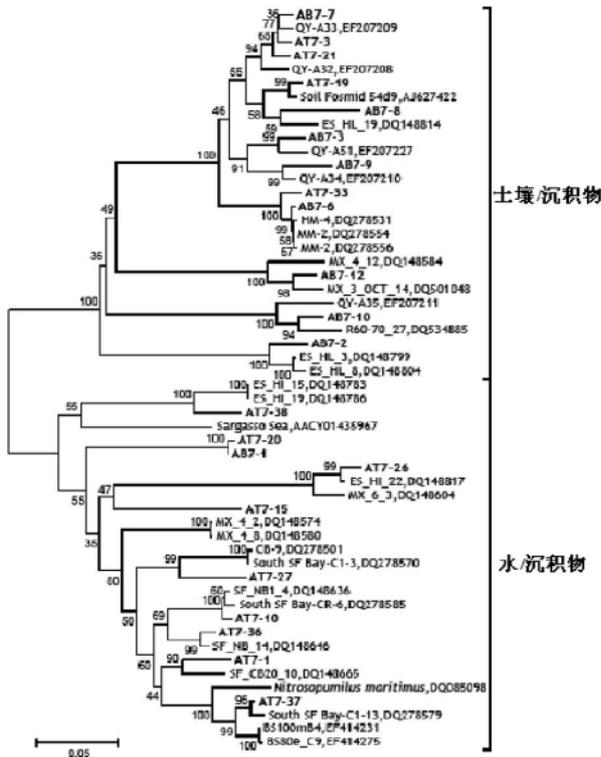
2.3 氨氧化古菌和细菌 amoA 基因序列分析 对珠江口淇澳岛海岸带沉积物 Q7 位点表层 (0 ~ 4 cm) 和底层 (16 ~ 30 cm) 构建古菌 amoA 基因克隆子库, 从表层和底层文库分别随机挑取 30 和 41 个阳性克隆测序, 以 95% 同源性划分 OTU, 分别得到 9 和 12 个 OTU。由于底层未检测到细菌 amoA 基因, 所以只构建 Q7 位点沉积物柱的表层 (0 ~ 4 cm) 细菌 amoA 基因文库, 从文库中随机挑取 41 个阳性克隆测序, 得到 12 个 OTU。由表 3 可知, 文库的覆盖率均超过 70%, 说明文库结果能真实反映原位环境的 amoA 多样性; Simpson's 指数和 Shannon-Wiener 指数分析结果表明 Q7 表层和底层的古菌种群丰富多样。

表 3 珠江口沉积物中 amoA 克隆文库的多样性分析

样品	C//%	H	1/D	Evenness
16 ~ 32 cm (古菌 amoA)	70	1.791	0.780 0	0.665 9
0 ~ 6 cm (古菌 amoA)	76	1.904	0.788 3	0.610 2
0 ~ 6 cm (细菌 amoA)	71	1.828	0.728 1	0.518 2

2.4 氨氧化古菌 amoA 基因序列分析 古菌 amoA 基因序列的系统发育分析 (图 1) 表明, 来自于表层的序列中有 52.2% 归入“水/沉积物”簇, 47.8% 归入“土壤/沉积物”簇; 而来自于底层的多数古菌 amoA 基因 (93.3%) 归入“土壤/沉积物”簇, 只有 2 个序列 (6.7%) 归入“水/沉积物”簇。

blast 分析表明多数古菌 *amoA* 基因序列与不可培养的环境克隆子序列有较高的同源性 (91% ~ 99%)。这些环境包括旧金山海湾、蜂雀岛、墨西哥河口区和污水处理反应器。克隆 AB-3(11)、AB-6 [14]、AB-7(7)、AB-8(4)、AT7-3(14)、AT7-19 [14]、AT7-21(3) 和 A7-33(3) 与来自于德国土壤 54d9 中的 *amoA* 基因有较高的同源性,为 92% ~ 98%。克隆子 A7-1(4)、A7-36(3) 和 A7-37 [14] 与 *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* 同源性最高 (90% ~ 93%)。*Candidatus Nitrosopumilus maritimus* 是世界上第 1 株分离到的氨氧化古菌,该菌能以氨为唯一能源进行自养生长^[7]。



注: AT 和 AB 为试验获得的克隆子,AT 代表克隆子来自于上层,AB 为来自于下层沉积物。

图 1 古菌 *amoA* 基因的系统发育树(邻接法构建; Bootstrap: 1 000)

2.5 细菌 *amoA* 多样性分析 构建所获得的细菌 *amoA* 基因序列系统发育树(图 2) 结果表明获得的细菌 *amoA* 序列均属于 Nitrosomonas 类群,可分为 5 个类群,即 Cluster A、B、C、D 和 E,分别占文库的 72.1%、4.7%、11.6%、9.3% 和 2.3% 且大多数序列与不可培养的环境克隆子有最高相似性。Cluster A 类群是最为主要的类群,其同源序列(88% ~ 96%) 主要来自于河口地区如墨西哥亚热带河口。Cluster D 类群在进化树上形成一个新的分支,该簇克隆子序列与不可培养的环境克隆子最高同源性为 79% ~ 83%。

3 讨论

3.1 AOA 和 AOB 的丰度分析 目前的研究结果表明氨氧化古菌广泛分布于海洋和土壤生态系统中,分布范围比氨氧化细菌更广,数量比氨氧化细菌更多,在氨氧化过程起主要作用^[8]。该研究中对氨氧化功能基因 *amoA* 的定量结果分析

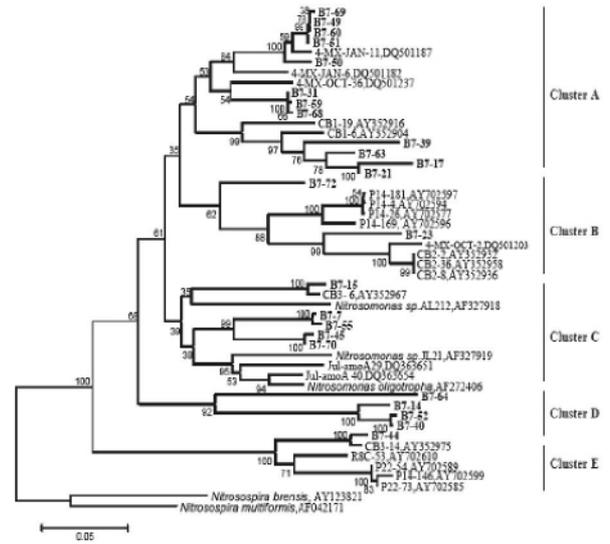


图 2 细菌 *amoA* 克隆文库的系统发育树(邻接法构建; Bootstrap: 1 000)

表明 珠江口海岸带沉积物中氨氧化古菌在数量上占优势,并且在珠江口沉积物底层也检测出数量和表层接近的氨氧化古菌,说明氨氧化古菌的数量在河口沉积物的氨氧化微生物中占据优势,揭示氨氧化古菌在珠江口的氨氧化过程中起主导作用。

3.2 底层氨氧化古菌分析 采用非培养手段研究珠江沉积物 Q7 底层无氧环境 *amoA* 基因发现 Q7 底层(16 ~ 32 cm) 检测到古菌 *amoA* 基因,未发现细菌 *amoA* 基因,且种群结构与表层不同,大部分序列(93.3%) 属于“土壤/沉积物”簇。定量分析发现 Q7 底层的 *amoA* 基因拷贝数比表层沉积物略高。这些结果证明在珠江口海岸带沉积物底层中真实存在古菌 *amoA* 基因。目前对氨氧化的研究主要集中在水样或沉积物表层的有氧环境,对 *amoA* 基因在无氧条件下的情况目前未见报道。因为已证明氨氧化细菌在厌氧条件下可利用硝酸盐等作为电子受体,笔者推测这些古菌可能在珠江口厌氧环境下进行氨氧化过程。

3.3 AOA 和 AOB 的种群分布与环境的的关系 基于 *amoA* 基因,笔者对珠江口海岸带沉积物中的氨氧化细菌和古菌进行了分子生态学调查,发现获得的大多数细菌和古菌 *amoA* 基因与来源于长时间维持低氧水平的废水处理器、富营养化河口区中不可培养的克隆子序列有较高的同源性。由于相似的环境中可能存在相似功能的微生物,因此从分子生态学角度反映了这一地区可能受到了污染。

近年来,由于氨氧化古菌的发现,国内外兴起了对氨氧化研究的热潮。该研究从微生物分子生态的角度研究珠江口地区负责氨氧化的微生物,定量研究发现珠江口海岸带沉积物中古菌 *amoA* 基因与氨氧化细菌相比在数量上占优势,推测可能珠江口沉积物中氨氧化过程主要由古菌负责。同时首次对 *amoA* 基因在无氧条件下的情况进行分析,结果表明珠江口海岸带沉积物的厌氧层存在 *amoA* 基因,无细菌 *amoA* 基因,说明氨氧化古菌比氨氧化细菌有更好的环境适应性,而对其是否参与氨氧化过程还有待进一步验证。

参考文献

- [1] KOWALCHUK G A, STEPHEN J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology [J]. Annual Review of Microbiology 2001, 55:485 - 529.
- [2] FRANCIS C A, ROBERTS K J, BEMAN J M et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005, 102:14683 - 14688.
- [3] 胡敦欣, 韩舞鹰, 章申. 长江、珠江口及邻近海域陆海相互作用 [M]. 北京: 海洋出版社, 2001.
- [4] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microbiol 1996, 62:316 - 322.
- [5] SHEN J P Z, ZHANG L M, ZHU Y G et al. Abundance and composition of

- ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam [J]. Environmental Microbiology 2008, 10(6):1601 - 1611.
- [6] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution 2007, 24(8):1596 - 1599.
- [7] KONNEKE M, BERNHARD A E, DE LA TORRE J R et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. Nature 2005, 437(7058):543 - 546.
- [8] HERNDL G J, REINTHALER T, TEIRA E et al. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic ocean [J]. Applied and Environmental Microbiology 2005, 71(5):2303 - 2309.

(上接第 11370 页)

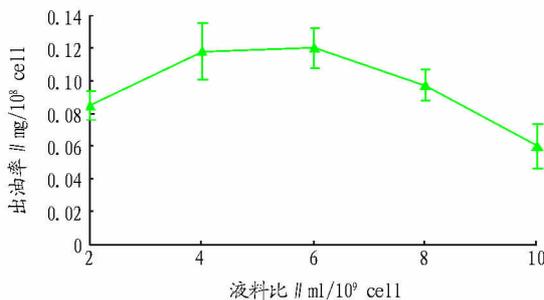


图 1 液料比对微藻油脂提取效率的影响

4 h 左右达到最大值, 之后随时间的变化不明显, 甚至有所下降。这是由于微藻油脂在原料与提取溶剂之间的浓度差, 推动其扩散至原料固体表面并溶解进入溶剂。在提取初始, 两相间浓度差较大, 促进了油脂快速溶解并扩散至提取溶剂, 但随着时间的推移, 其在溶剂中的浓度不断增大, 浓度差逐渐变小, 扩散速度变慢, 提取一定时间后, 两相间浓度达到平衡, 提取过程基本完成, 这时继续延长提取时间也不能提高提取率, 反而会由于提取时间过长而造成油脂的损失、杂质的溶出和溶剂的挥发。因此, 选择提取时间在 4 h 为较优的工艺条件。

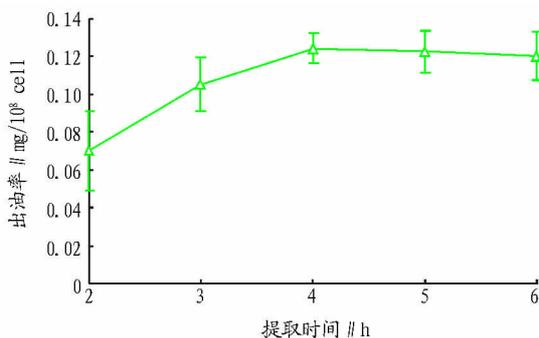


图 2 提取时间对微藻油脂提取效率的影响

2.3 提取温度对微藻油脂提取效率的影响 提取温度越高, 分子热运动越剧烈, 传质速率越大, 溶剂更易扩散至原料组织内部, 且油脂在溶剂中的溶解度也会随着温度的升高而增加。但温度越高, 能耗就越大。因此, 笔者在前期试验的基础上, 比较了以 80、85、90、95 和 100 °C 为提取温度时的提取效率, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 随着温度的升高, 提取率逐渐增大, 95 °C 时提取率最高, 而更高的温度条件下, 提取率又有所下降。这主要是由于当达到一定温度后, 随着温

度的升高, 溶剂的选择性变差, 微藻中除油脂外的一些其他杂质被提取出来; 同时, 温度越高, 提取溶剂的挥发也越快, 造成了提取率的下降。因此, 在实际生产中, 选择 95 °C 为提取温度, 能够使提取率最大化。

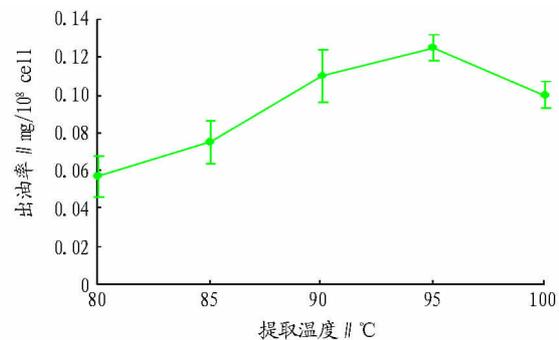


图 3 提取温度对微藻油脂提取效率的影响

3 结论

笔者以微藻(聚球藻)为原料, 采用索氏抽提法提取其油脂, 通过单因素试验, 初步优化其提取工艺条件为液料比为 6 ml/10⁹ cell, 提取时间为 4 h, 提取温度为 95 °C。在此工艺条件下, 所得油脂含量为 0.125 mg/10⁸ cell。该结果为进一步优化微藻油脂提取工艺奠定了基础。

参考文献

- [1] 李臣. 微藻生物柴油研究进展 [J]. 安徽农业科学 2010, 38(27):15208 - 15210.
- [2] GUO J Q, YANG Z G. Existing problems in energy exploitation and environment sustainable development and their countermeasures in Northern Shaanxi [J]. Meteorological and Environmental Research, 2011, 2(4): 76 - 78.
- [3] CERÓN GARCÍA M, FERNÁNDEZ SEVILLA J M, ACIÉN FERNÁNDEZ F G et al. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth and fatty acid profile [J]. J Appl Phycol 2000, 12(3/5):239 - 248.
- [4] 郑洪立, 高振, 黄和, 等. 响应面法优化自养小球藻产生物柴油油脂 [J]. 中国生物工程杂志 2010, 30(8):106 - 111.
- [5] 高春芳, 余世实, 吴庆余. 微藻生物柴油的发展 [J]. 生物学通报 2011, 46(6):1 - 5.
- [6] 李植峰, 张玲, 沈晓京, 等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究 [J]. 微生物学通报 2001, 86(2):72 - 75.
- [7] 郭子耕, 李丽华, 张金生. 索氏法萃取黄瓜籽油 [J]. 辽宁石油化工大学学报 2009, 29(4):27 - 29.
- [8] STANIER R Y, KUNISAWA R, MANDEL M et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) [J]. Bacteriol Rev 1971, 35:171 - 205.
- [9] HE R, LIU J H, WANG S A et al. Screening of the gene for chlorella identification and identification of oil-producing microalgae [J]. Agricultural Science & Technology 2011, 12(6):795 - 798.