

doi:10.3969/j.issn.1672-5425.2018.02.007

韩金鑫,唐源.一株采集自白云岩表面的优势菌株菌种鉴定[J].化学与生物工程,2018,35(2):38-42.

HAN J X,TANG Y. Identification of a superior strain from surface of dolomite[J]. Chemistry & Bioengineering,2018,35(2):38-42.

# 一株采集自白云岩表面的优势菌株菌种鉴定

韩金鑫<sup>1</sup>,唐源<sup>2</sup>

(1.天津冶金职业技术学院,天津 300400;2.中国科学院地球化学研究所  
环境地球化学国家重点实验室,贵州 贵阳 550081)

**摘要:**从白云岩表面分离纯化得到一株优势菌株,通过生理生化实验,初步判断其为蜡样芽孢杆菌;通过 DNA 测序分析,确定其为蜡样芽孢杆菌。为研究蜡样芽孢杆菌对碳酸盐岩的风化、表面形貌及周边环境的影响提供了重要依据。

**关键词:**白云岩;生理生化实验;菌种鉴定;DNA 测序;蜡样芽孢杆菌

中图分类号:Q93

文献标识码:A

文章编号:1672-5425(2018)02-0038-05

## Identification of A Superior Strain from Surface of Dolomite

HAN Jin-xin<sup>1</sup>, TANG Yuan<sup>2</sup>

(1. Tianjin Metallurgical Vocation-Technology Institute, Tianjin 300400, China;  
2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry,  
Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, China)

**Abstract:** We screened and purified a superior strain from the surface of dolomite. The superior strain was preliminarily identified as *Bacillus cereus* by physiological and biochemical experiments, which was confirmed by DNA sequencing analysis. The study provides an important basis for investigating the effects of *Bacillus cereus* on the weathering, surface morphology, and the surroundings of carbonate rocks.

**Keywords:** dolomite; physiological and biochemical experiments; strain identification; DNA sequencing; *Bacillus cereus*

碳酸盐岩广泛分布在自然界中,其表面具有丰富的微生物<sup>[1-2]</sup>,微生物的生长繁殖及新陈代谢对碳酸盐岩的风化、表面形貌及周边环境都有重要影响<sup>[3-4]</sup>,不仅可以加速岩石矿物的风化,还可以促进或诱导矿物的合成<sup>[5-7]</sup>。白云岩作为典型的碳酸盐岩,其表面分布着多种重要的微生物<sup>[8-9]</sup>。

近年来,随着分子生物技术在微生物生态学研究中的广泛应用<sup>[10-11]</sup>,依赖于 DNA 的系统发育的多样性研究已经成为微生物多样性研究的重要代表<sup>[12]</sup>。微生物种类繁多,具有各自独特的酶系统,因而对底物的分解能力不同,其代谢产物也不同。通过代谢产物

的生理生化反应可鉴定微生物的种类<sup>[13-14]</sup>。

作者选用分离自白云岩表面的一株优势菌株作为实验菌株,对其进行生理生化实验和测序以鉴定其菌种归属。

## 1 实验

### 1.1 材料

白云岩样品采集自贵州省贵阳市云岩区阿哈水库旁。选择表面微生物丰富的白云岩样品,以地质锤凿取岩石矿物,除去污染物后保存在无菌袋中。

基金项目:贵州省科技支撑计划项目(黔科合[2015]3001-1)

收稿日期:2017-11-10

作者简介:韩金鑫(1986—),女,天津人,助教,主要从事环境污染治理研究,E-mail:hanjinxin\_cugb@126.com。

## 1.2 优势菌株

用无菌水清洗岩石矿物数次,刮取表面微生物,于牛肉膏蛋白胨固体培养基中培养数天,挑取生长旺盛的单菌落,经过数次纯化培养得到优势菌株 DCB1。

## 1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨固体培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 15~20 g,蒸馏水 1 L,pH 值 6.5~7.5。

淀粉琼脂培养基:蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,牛肉膏 5 g,可溶性淀粉 10 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 L。

Hugh-Leifeon 软琼脂培养基:蛋白胨 2 g, $K_2HPO_4$  0.3 g,NaCl 5 g,葡萄糖 10 g,1%溴麝香草酚蓝溶液 3 mL,琼脂 6 g,蒸馏水 1 L。

蛋白胨水培养基:蛋白胨 10~20 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 L。

葡萄糖蛋白胨水培养基:蛋白胨 7 g,葡萄糖 5 g, $K_2HPO_4$  5 g,蒸馏水 1 L。

西蒙斯柠檬酸盐培养基: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, $NH_4H_2PO_4$  1 g, $K_2HPO_4$  1 g,柠檬酸钠 5 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,1%溴麝香草酚蓝溶液 10 mL,蒸馏水 1 L。

蛋白胨胱氨酸培养基:蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,牛肉膏 10 g,半胱氨酸 0.5 g,蒸馏水 1 L,pH 值 7.0~7.4。

硝酸盐还原培养基:蛋白胨 1 g,硝酸钾 0.1 g,蒸馏水 1 L。

## 1.4 生理生化实验

根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[15]</sup>、《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>、一般细菌常用鉴定方法及《环境微生物实验技术》<sup>[17]</sup>等,对 DCB1 菌株进行生理生化实验。

### 1.4.1 氧化酶实验

有些细菌能产生氧化酶,氧化酶在有分子氧及细胞色素 C 存在时可氧化盐酸对氨基二甲基苯胺,使之呈玫瑰红至暗紫红。

无菌挑取 DCB1 菌株斜面培养物少许,接种在淀粉琼脂培养基平板上,35 °C 培养 18~24 h。再在干净平板上放一张滤纸,滴上 1% 盐酸对氨基二甲基苯胺水溶液,仅使滤纸湿润即可,不要过湿。用细玻璃棒刮取 DCB1 菌株平板培养物,涂抹在湿润的滤纸上。以 10 s 内菌苔或其边缘呈红色者为阳性,10~30 s 呈红色者为迟缓阳性,不呈或 30 s 以后呈红色者为阴性。

### 1.4.2 过氧化氢酶实验

有些细菌能产生过氧化氢酶,过氧化氢酶能催化  $H_2O_2$  分解成  $H_2O$  和  $O_2$ 。

取 DCB1 菌苔涂于干净的载玻片上,向菌苔上滴

1 滴 3%  $H_2O_2$ 。有气泡产生者为过氧化氢酶阳性,否则为阴性。

### 1.4.3 淀粉水解实验

淀粉是一种多糖,不能渗透到细菌细胞内。有些细菌能产生淀粉酶,将淀粉水解成麦芽糖后进入细胞内,淀粉遇碘呈蓝色。

在淀粉琼脂培养基平板上点种 DCB1 菌株,30 °C 培养 24 h。待菌苔明显生长后,滴加碘液,观察菌苔周围是否有透明圈。有透明圈者为阳性,否则为阴性。

### 1.4.4 吲哚实验

有些细菌能分解蛋白胨中的色氨酸产生吲哚,吲哚与 Kovac 试剂中的对二甲基氨基苯甲醛作用,形成红色的玫瑰吲哚。

将 DCB1 菌株接种在装有蛋白胨水培养基的试管中,30~37 °C 恒温培养 24 h。取出培养物,沿管壁缓缓加入 Kovac 试剂,使在培养液表面厚 3~5 mm。在两液体界面或界面以上呈红色者为阳性。若呈色不明显,可加 4~5 滴乙醚并摇匀,使乙醚分散于培养液中,然后静置片刻,待乙醚浮至液面后,再沿管壁缓缓加入 Kovac 试剂,观察是否呈红色。

### 1.4.5 甲基红实验

有些细菌在降解葡萄糖过程中会产生丙酮酸,丙酮酸进而分解产生甲酸、乙酸和乳酸等多种有机酸,使 pH 值显著下降,可降至 4.2 以下,滴加甲基红指示剂后培养液由黄色转变为红色。

将 DCB1 菌株接种在装有葡萄糖蛋白胨水培养基的试管中,37 °C 恒温培养 2~7 d。取培养液 0.5 mL 于比色瓷盘中,加 1 滴甲基红指示剂,呈红色者为阳性,否则为阴性。

### 1.4.6 乙酰甲基甲醇实验(V-P 实验)

有些细菌能降解糖代谢过程中产生的丙酮酸脱羧形成乙酰甲基甲醇,乙酰甲基甲醇在碱性条件下被空气中的氧氧化为二乙酰,二乙酰与肌酸或胍基化合物作用生成红色化合物,加入少量  $\alpha$ -萘酚可使反应加速,呈色明显。

将 DCB1 菌株接种在装有葡萄糖蛋白胨水培养基的试管中,37 °C 恒温培养 2~7 d。取 1 mL 培养液于试管中,加 0.6 mL  $\alpha$ -萘酚、0.2 mL KOH 溶液,用力振荡,室温或温箱内静置 30 min,培养液呈红色或粉红色者为阳性,否则为阴性。

### 1.4.7 利用柠檬酸盐实验

有些细菌能利用柠檬酸钠作为碳源,柠檬酸钠分解后产生碱性化合物,使培养基呈碱性,培养基中的溴麝香草酚蓝指示剂由绿色变成深蓝色。

用接种环挑取 DCB1 菌株,划线接种于西蒙斯柠檬酸盐培养基斜面上并穿刺,30~37 °C 培养 2~7 d, DCB1 菌株在斜面上或沿穿刺线生长,培养基变为深蓝色者为阳性,仍为绿色者为阴性。

#### 1.4.8 产 H<sub>2</sub>S 实验

许多细菌能分解有机硫化物产生 H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S 遇铅盐(或铁盐)形成黑色硫化铅(或硫化亚铁)沉淀物。

将 DCB1 菌株接种于蛋白胨胱氨酸培养基上,用无菌镊子夹取一条醋酸铅滤纸,借助棉塞悬于培养基上方,不接触液面,室温培养 3 d,以滤纸条变黑者为阳性,不变黑者为阴性。

#### 1.4.9 硝酸盐还原实验

有些细菌能将硝酸盐还原为亚硝酸盐、氨或氮气。加入格里斯试剂 A 液后,亚硝酸与对氨基苯磺酸作用生成对重氮苯磺酸,对重氮苯磺酸与  $\alpha$ -萘胺(格里斯试剂 B 液)反应生成红色 N- $\alpha$ -萘胺偶氮苯磺酸。亚硝酸盐继续分解生成 NH<sub>3</sub> 或 N<sub>2</sub>。故用格里斯试剂检查无 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 存在,不一定无硝酸盐还原作用,须进一步检验。若有 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 存在,滴加二苯胺试剂后,培养液即呈蓝色;若不呈蓝色,则表示硝酸盐和新生成的亚硝酸盐都已还原成 NH<sub>3</sub> 或 N<sub>2</sub>。

将 DCB1 菌株接种于硝酸盐还原培养基中,室温培养 1 d、3 d、5 d。取培养液约 0.5 mL 于比色皿中,滴加格里斯试剂 A 液、B 液各 1 滴,若产生红色、橙色、棕色等沉淀,表示有亚硝酸盐存在,为硝酸盐还原阳性。若颜色不变,再加 1~2 滴二苯胺试剂,若呈蓝色,表示培养液中仍有硝酸盐,又无亚硝酸盐反应,为硝酸盐还原阴性;若不呈蓝色,检查有无气体产生。

#### 1.4.10 葡萄糖氧化发酵实验

有些细菌能以氧化或发酵方式利用葡萄糖,糖代谢的结果有酸产生(有的还产生气体)。氧化方式产酸少且慢,发酵方式产酸多且快。利用含低有机氮的培养基,通过指示剂的颜色变化可鉴别细菌利用糖类是氧化产酸还是发酵产酸。通过软琼脂柱中有无气泡产生可判断是否产气。

用接种针以无菌操作取少许 DCB1 菌苔,接种于装有 Hugh-Leifson 软琼脂培养基的试管中并穿刺,注意接种针不碰到试管底,30~37 °C 培养 12~18 h。若培养基变色自上向下扩散,属氧化产酸;培养基变色自下往上扩散,则属发酵产酸。若 24 h 已全部变黄,即使从上部开始,也可能是发酵,这时应用封油管检查:用灭菌凡士林油封盖(在培养基上加油 1 cm 左右),为闭管;其余管不封油,为开管。30~37 °C 恒温培养 1 d、3 d、7 d,仅开管的培养基变黄为氧化产酸;开管和

闭管的培养基都变黄为发酵产酸;软琼脂柱内产生气泡为产气。

### 1.5 DNA 测序

#### 1.5.1 DNA 提取

参照《精编分子生物学实验指南》<sup>[18]</sup>,提取基因组 DNA。详细过程如下:(1)取样品约 0.5~1.0 g 于 2 mL Bead Solution Tubes,在旋涡振荡器上混匀;(2)检查 Solution S1,若有沉淀,则放入 60 °C 水浴锅中使其溶解;(3)加入 60  $\mu$ L Solution S1 并混匀;(4)加入 200  $\mu$ L Solution IRS;(5)在旋涡振荡器上混匀 10 min,并确保 Bead Solution Tubes 水平;(6)10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 s;(7)取 450  $\mu$ L 上清液转入新的离心管;(8)加入 250  $\mu$ L Solution S2 并混匀 5 s,4 °C 放置 5 min;(9)10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min;(10)将上清液转入新的离心管;(11)加入 900  $\mu$ L Solution S3 并混匀 5 s;(12)取 700  $\mu$ L 放入 Spin Filter,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min,去下液,将剩下的加入柱子,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min;(13)加入 300  $\mu$ L Solution S4,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 s;(14)去下液,10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min;(15)将柱子放入一个新的离心管,加入 50  $\mu$ L Solution S5 至柱子中膜的中央;(16)10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 s,去掉柱子,DNA 于 -20 °C 保存。

#### 1.5.2 16S rDNA 的 PCR 扩增反应

引物:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')、T7 promoter(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')、SP6 promoter(5'-ACGATTTAGGTGACACTAT-AG-3')。

PCR 反应体系:10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol·L<sup>-1</sup>) 4  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, dNTP mixture(各 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 4  $\mu$ L, 27F(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L, 1492R(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, 用灭菌双蒸水补足至 50  $\mu$ L。

PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,52 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。

取 PCR 产物 5.0  $\mu$ L 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像系统观察结果。

#### 1.5.3 DNA 测序

DNA 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

## 2 结果与讨论

2.1 生理生化实验结果(表1)

表1 生理生化实验结果

Tab.1 Results of physiological and biochemical experiments

实验	结果	实验	结果
氧化酶实验	-	乙酰甲基甲醇实验(V-P实验)	-
过氧化氢酶实验	+	利用柠檬酸盐实验	-
淀粉水解实验	+	产H <sub>2</sub> S实验	-
吲哚实验	+	硝酸盐还原实验	+
甲基红实验	+	葡萄糖氧化发酵实验	氧化型

注:“-”为阴性;“+”为阳性。

由表1可知,氧化酶实验中菌苔不呈红色,结果为阴性;过氧化氢酶实验中滴加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>有气泡产生,结果

为阳性;淀粉水解实验中菌苔周围有透明圈,结果为阳性;吲哚实验中溶液呈红色,结果为阳性;甲基红实验中培养液呈红色,结果为阳性;乙酰甲基甲醇实验(V-P实验)中培养液不呈红色,结果为阴性;利用柠檬酸盐实验中培养基颜色仍为绿色,结果为阴性;产H<sub>2</sub>S实验中滤纸条不变黑,结果为阴性;硝酸盐还原实验中加入格里斯试剂后有红棕色沉淀生成,结果为阳性;葡萄糖氧化发酵实验中培养基变色自上向下扩散,属氧化型。通过以上生理生化实验结果并对照蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生理生化特性,初步判断DCB1菌株为蜡样芽孢杆菌。

2.2 DNA测序结果(图1)

```
GGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAC
GCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTG
AAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGSTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGC
CATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGAC
CGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC
GCCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTAT
```

图1 DNA测序结果

Fig.1 DNA sequencing result

由DNA测序结果可以确定DCB1菌株为蜡样芽孢杆菌,GenBank登陆序列号为JN650544。

SEM照片如图2所示。

3 结论

从白云岩表面分离纯化得到一株优势菌株,对其进行氧化酶实验、过氧化氢酶实验、淀粉水解实验、吲哚实验、甲基红实验、乙酰甲基甲醇实验(V-P实验)、利用柠檬酸盐实验、产H<sub>2</sub>S实验、硝酸盐还原实验、葡萄糖氧化发酵实验,初步判断该菌株为蜡样芽孢杆菌;对其进行DNA测序,确定该菌株为蜡样芽孢杆菌。

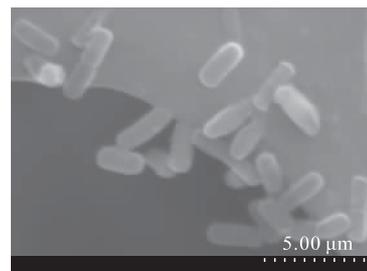


图2 DCB1菌株的SEM照片

Fig.2 SEM image of strain DCB1

参考文献:

[1] 田春杰,陈家宽,钟扬.微生物系统发育多样性及其保护生物学意

- 义[J]. 应用生态学报, 2003, 14(4): 609-612.
- TIAN C J, CHEN J K, ZHONG Y. Phylogenetic diversity of microbes and its perspectives in conservation biology[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(4): 609-612.
- [2] TANG Y, LIAN B, DONG H L, et al. Endolithic bacterial communities in dolomite and limestone rocks from the Nanjiang Canyon in Guizhou karst area (China) [J]. Geomicrobiology Journal, 2012, 29(3): 213-225.
- [3] 连宾. 碳酸盐岩风化成土过程中的微生物作用[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2010, 29(1): 52-56.
- LIAN B. Microbial roles in the genesis of soil from carbonate rock weathering[J]. Bulletin of Mineralogy Petrology and Geochemistry, 2010, 29(1): 52-56.
- [4] 连宾, 陈焯, 朱立军, 等. 微生物对碳酸盐岩的风化作用[J]. 地学前缘, 2008, 15(6): 90-99.
- LIAN B, CHEN Y, ZHU L J, et al. Progress in the study of the weathering of carbonate rock by microbes[J]. Earth Science Frontiers, 2008, 15(6): 90-99.
- [5] 李辉, 连宾, 龚国洪, 等. 碳酸盐颗粒的细菌诱导形成[J]. 高校地质学报, 2011, 17(1): 89-94.
- LI H, LIAN B, GONG G H, et al. The formation of calcium carbonate particles induced by bacteria[J]. Geological Journal of China Universities, 2011, 17(1): 89-94.
- [6] HAN J X, LIAN B, LING H W. Induction of calcium carbonate by *Bacillus cereus* [J]. Geomicrobiology Journal, 2013, 30: 682-689.
- [7] 韩金鑫, 连宾, 唐源, 等. 恶臭假单胞菌对碳酸钙的诱导矿化作用[J]. 南京大学学报(自然科学版), 2013, 49(6): 681-688.
- HAN J X, LIAN B, TANG Y, et al. Induced mineralization of calcium carbonate by *Pseudomonas putida* [J]. Journal of Nanjing University: Nat Sci Ed, 2013, 49(6): 681-688.
- [8] HOU W G, LIAN B, ZHANG X Q. CO<sub>2</sub> mineralization induced by fungal nitrate assimilation[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1562-1566.
- [9] LIAN B, CHEN Y, TANG Y. Microbes on carbonate rocks and pedogenesis in karst regions[J]. Journal of Earth Science, 2010, 21: 293-296.
- [10] 华蔚颖. 应用 454 测序技术分析菌群结构的方法学研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2010.
- HUA W Y. The method study of the application of 454 pyrosequencing on microbial community analysis[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2010.
- [11] 徐晓宇, 刘和. 454 测序法在环境微生物生态研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(1): 73-77.
- XU X Y, LIU H. Application of 454 sequencing in environmental microbial ecology[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(1): 73-77.
- [12] 唐源. 碳酸盐岩表生微生物多样性研究[D]. 贵阳: 中国科学院地球化学研究所, 2012.
- TANG Y. Study of microbial diversity on carbonate rocks[D]. Guiyang: Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, 2012.
- [13] 周雪莹, 杜叶, 连宾. 不同培养条件对胶质芽孢杆菌诱导碳酸钙晶体形成的影响[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 955-961.
- ZHOU X Y, DU Y, LIAN B. Effect of different culture conditions on carbonic anhydrase from *Bacillus mucilaginosus* inducing calcium carbonate crystal formation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(7): 955-961.
- [14] 连宾, 袁道先, 刘再华. 岩溶生态系统中微生物对岩溶作用影响的认识[J]. 科学通报, 2011, 56(26): 2158-2161.
- LIAN B, YUAN D X, LIU Z H. Effect of microorganism on karstification in karst ecosystem [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(26): 2158-2161.
- [15] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. (第八版, 中译本). 北京: 科学出版社, 1984: 274-797.
- BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. 8th Ed. Chinese, Beijing: Science Press, 1984: 274-797.
- [16] 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.
- DONG X Z, CAI M Y. Identification Manual of Common Bacterial System [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [17] 肖琳, 杨柳燕, 尹大强, 等. 环境微生物实验技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 49-59.
- XIAO L, YANG L Y, YIN D Q, et al. Protocols of Environmental Microbiology [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2004: 49-59.
- [18] F. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, J. G. 塞德曼, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 39-40.
- AUSUBLE F, KINGSTON R E, SEIDMAN J G, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 1999: 39-40.