

OsmC 基因在豌豆根瘤菌抗氧化和共生中的功能

程国军, 彭 杨, 殷 杰, 田梦洋

(中南民族大学 生命科学学院, 武汉 430074)

摘 要 为研究 *OsmC* 基因在豌豆根瘤菌抗氧化和共生固氮中的功能,以豌豆根瘤菌 RL3841 的 *OsmC* 基因为研究对象,通过同源重组获得了 *OsmC* 基因突变株 RLOsmC。结果表明:*OsmC* 基因突变不影响豌豆根瘤菌的自生生长能力,但对无机氧化物 H_2O_2 和低浓度有机氧化物氢过氧化枯烯(CuOOH)都十分敏感。突变株 RLOsmC 感染豌豆宿主能形成红色有效根瘤,但是其固氮酶活降低了 18.3%。*OsmC* 基因的表达不受 H_2O_2 的诱导,但在 7 d 根瘤类菌体中表达量显著上调。表明根瘤菌 *OsmC* 基因在共生和抗氧化功能中发挥了重要的作用。

关键词 豌豆根瘤菌; *OsmC* 基因; 抗氧化功能; 共生功能; 实时荧光定量 RT-PCR

中图分类号 Q935 **文献标识码** A **文章编号** 1672-4321(2017)02-0025-05

Antioxidative and Symbiosis Function of *OsmC* gene in *Rhizobium leguminosarum*

Cheng Guojun, Peng Yang, Yin Jie, Tian Mengyang

(College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract To study the antioxidative and symbiosis nitrogen fixation function of *OsmC* gene in *Rhizobium leguminosarum*, *OsmC* mutant RLOsmC was constructed by homologous recombination. The results indicated that mutation of *OsmC* gene had no effect on the self-growth ability of *Rhizobium leguminosarum*, but it was significantly sensitive to both H_2O_2 and cumene hydroperoxyde (CuOOH) with low concentration. Red effective nodules could be formed when mutant strains RLOsmC infected host peas, but the capacity of nitrogenase was reduced by 18.3%. *OsmC* gene expression could not be induced by H_2O_2 , while its expression was markedly increased in 7 d nodule bacteroids. Overall, it was revealed that rhizobial *OsmC* gene played an important role in symbiotic and antioxidative function.

Keywords *Rhizobium leguminosarum*; *OsmC* gene; antioxidative function; symbiosis function; real-time RT-PCR

根瘤菌与豆类植物能形成共生固氮体系。侵染过程中形成的带有根瘤菌的类菌体是 N_2 固定及合成被植物利用的含氮物质所不可缺少的;在共生过程中植物也会提供根瘤菌在固氮过程中所需的营养物质^[1]。这种共生系统对于不能通过自身合成氮源的农作物有极其重要的意义。

植物、细菌和真菌的新陈代谢过程中都会产生有机过氧化物(ROOH)。作用于有机过氧化物的酶均属于过氧化物酶家族和 *OsmC*/*Ohr* 家族。*OsmC*/*Ohr* 家族为细菌独有的^[2],基因编码的 *Ohr* 只能被有机过氧化物诱导,此外 *ohr* 基因的破坏会引起细菌对有机过氧化物的超敏反应^[3],*OsmC* 基因缺失会

对 H_2O_2 和有机氧化物表现敏感^[4]。

目前,国内外学者对抗氧化系统的研究日益重视,Hop H T 等^[5]将 *Brucella abortus* 中编码有机过氧化物抗性蛋白的 *ohr* 基因克隆至老鼠中,具有重组 *Ohr*(*rOhr*) 的实验组克隆老鼠与对照组克隆麦芽糖结合蛋白的小鼠相比,实验组避免剧毒 *B. abortus* 的感染的能力显著增高。Chuchue T 等^[6]证明了 *ohrR* 和 *ohr* 是感应和保护根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 免受有机过氧化物的氧化损伤的主要系统。Klomsiri C 等^[7]研究了植物病原菌在对脂质过氧化物(LOOH)的抗氧化中,烷基过氧化氢复原酶(AhpC)和有机过氧化物抗性酶(*Ohr*)起关键的

收稿日期 2016-07-13

作者简介 程国军(1976-),教授,博士,研究方向:环境微生物学,E-mail: chengguojun@mail.scuec.edu.cn

基金项目 湖北省自然科学基金资助项目(2014CFB914);中央高校基本科研业务费专项(CZW15112)

作用. 田梦洋等^[8]研究表明有机过氧化物抗性基因 *ohrB* 虽对豌豆根瘤菌的自生生长、共生固氮、根圈定殖无影响, 但可在抗氧化及竞争结瘤中发挥重要作用. Caswell C C 等^[9]发现有机过氧化物抗性蛋白 Ohr 在体外条件下保护 *B. abortus* 2308 免受有机过氧化物的毒害. 周艳琳等^[10]研究发现 *katG* 突变体本身不受外源 H_2O_2 的诱导, 但对 *OhrB* 和 *grxC* 等抗氧化基因的表达有调节作用, 进而在抗氧化和共生中起作用. 目前主要集中在对 *ohr* 基因的研究, 而对 *OsmC* 基因的研究较少. 因此, 本研究构建了豌豆根瘤菌 *OsmC* 基因突变株, 通过自生和豌豆盆栽共生实验, 研究 *OsmC* 基因的抗氧化性能和共生固氮功能.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

限制性内切酶(*Xba* I、*Bam*H I、*Hind* III 等)、 T_4 DNA 连接酶、RNAiso Plus(TaKaRa 公司)、*Taq* DNA 聚合酶、phusion 高保真酶(Thermo Scientific)、PCR 产物回收试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒(博大泰克公司)、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa) 抗生素(Sigma) .

725 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器) , PCR 仪(Biometra) , TGL-16G-B 台式高速离心机(湖南星科科学仪器) , 荧光定量 PCR 仪(Applid

Biosystems) , 气相色谱仪(北分瑞利仪器) .

1.2 菌株、质粒和培养基

菌株主要为豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*) RL3841 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) RLOsmC 为本实验中构建的 RL3841 的突变体. 克隆质粒 pk19mob 和表达质粒 pRK415 均来源于牛津大学 Philip S Poole 教授. 植物盆栽实验中所用的甜豌豆为实验室保存. 所用的培养基主要为 LB 培养基(37℃ 培养大肠杆菌) , TY 培养基和 AMS 培养基(30℃ 培养豌豆根瘤菌) . 培养根瘤菌的抗生素为: 500 μ g/mL 链霉素(Str) 80 μ g/mL 新霉素(Neo) 2 μ g/mL 四环素(Tc) . 培养大肠杆菌的抗生素为: 5 μ g/mL 四环素(Tc) 20 μ g/mL 卡那霉素(Km) .

1.3 豌豆根瘤菌 *OsmC* 基因突变菌的构建

突变菌的构建主要依照周艳琳等^[10]的方法进行, 以豌豆根瘤菌 RL3841 总 DNA 为模板, *OsmC* 的上游和下游引物进行 PCR 扩增, 扩增得到的目的片段和 pk19mob 分别用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 进行两次单酶切, 酶切产物经 T_4 DNA 连接酶连接过夜, 再转化进入大肠杆菌 DH5 α 转化子经酶切和测序验证后, 获得阳性转化子 pRKOsmC. 然后以根瘤菌 RL3841 为受体菌, 大肠杆菌 pRKOsmC 为供体菌, 含 pRK2013 质粒的大肠杆菌为辅助菌进行三亲本杂交, 经抗生素筛选及 PCR 验证, 获得 RLOsmC 突变株. 实验过程中所用的引物列于表 1.

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>OsmC</i>	TTT <u>TCT AGA</u> TCG TCG TTT GCG CTT TCA TA*	TTT <u>GGA TCC</u> CCT GGG CTG GGC TGT ACT GC
<i>MOsmC</i>	GGT ATC TCC ATC GTC TTC GTC GTT	GCG AGC GGG GAG AAG CTG GC
<i>pK19</i>	ATC AGA TCT TGA TCC CCT GC	GCA CGA GGG AGC TTC CAG GG
<i>M13</i>	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC
<i>QOsmC</i>	TGA CCG TTC CCA AGG AGC TC	TCT GCT GGC CCG CGA CAA AT
<i>gyrB1</i>	GGC ATC ACC AAA AGG GAA AA	GCG AGG AGA ATT TCG GAT CA

* 下划线为限制性酶切位点

1.4 无氧化物胁迫条件下的菌株的生长情况

接种突变株 RLOsmC 和野生株 RL3841 于 TY 斜面 2 d 后用 AMS 液体培养基洗脱, 接种菌液至 AMS 液体培养基中, 使初始浓度 $D(600\text{ nm})$ 值为 0.01, 每种菌 3 个重复, 置于 30℃ 200 r/min 的恒温振荡器中培养, 每隔 6 h 取一次样测 $D(600\text{ nm})$ 值.

1.5 抗氧化实验

将活化的突变株 RLOsmC 和野生株 RL3841 接种到含相应抗生素的 TY 斜面, 30℃ 恒温培养箱培养 2 d, 用无菌水洗脱, 并稀释菌液至 $D(600\text{ nm})$ 值为 1, 取 100 μ L 菌液涂布 AMS 琼脂平板, 待平板上

菌液吹干后, 将浸有不同浓度的 H_2O_2 和 $CuOOH$ 的圆形滤纸片分别放置于平板正中央, 每个平板放置一张滤纸片. 于 30℃ 培养箱正置培养 24 h 后测量抑菌圈直径. 每组实验均设 3 个重复.

1.6 根瘤固氮酶活的测定

采用无菌蛭石^[12]种植甜豌豆. 蛭石经清洗、晾干后, 装至塑料烧杯中, 加入适量的无氮的豌豆营养液, 用保鲜膜封口, 121℃ 灭菌 1 h. 将豌豆种子经 95% 的酒精和 2% 的次氯酸钠消毒. 消毒后的豌豆分别接种突变菌株 RLOsmC 和野生型菌株 RL3841 菌液, 并播种于灭菌的蛭石烧杯, 每颗豌豆上接种 1

mL 菌液, 每种菌重复 3 次. 在光照培养箱中培养 3 周后, 统计根瘤数量, 并用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活^[13].

1.7 qRT-PCR 检测基因的表达量

将活化的野生型菌株 RL3841 接种到 50 mL AMS 液体培养基中, 每种菌 3 个重复, 置于 30 °C、200 r/min 的摇床中培养至对数期 [$D(600\text{ nm}) = 0.3 \sim 0.6$], 离心收集菌体并用无菌水清洗后, 用 0.5 mmol/L H_2O_2 处理 1 h, 以生理盐水处理 1 h 的 RL3841 菌株作为对照组, 总 RNA 的提取采用 Trizol 法, 再利用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR. 相关抗氧化基因引物见表 1 *gyrB1* 为内参基因.

将野生型 RL3841 菌株接种豌豆植株, 分别于接种 10 d 和 25 d 后采集豌豆根瘤. 根瘤经液氮速冻后研磨成粉末状, 类菌体 RNA 的提取以及 cDNA 的制备方法与细菌 RNA 制备方法相同. 进行类菌体中相关抗氧化基因表达分析时, 以 AMS 培养的对数期野生型菌株为对照.

2 结果与分析

2.1 豌豆根瘤菌 *OsmC* 基因突变株的构建

按照突变体构建的方法, 在添加有 Str、Neo 的平板上筛选出来的单菌落, 用 *MOsmC/OsmC* 上游引物成功扩增出约 650 bp 的目标片段, 获得 *OsmC* 基因突变株 RLOsmC.

表 2 不同浓度 H_2O_2 对突变株 RLOsmC 和野生株 RL3841 的抑菌能力的比较

Tab. 2 Bacteriostatic ability comparison of RL3841 and RLOsmC under H_2O_2 with different concentrations

菌株	不同浓度 H_2O_2 下的抑菌圈直径 d/cm		
	20 mmol/L	100 mmol/L	500 mmol/L
RL3841	1.73 ± 0.01	2.67 ± 0.12	4.67 ± 0.14
RLOsmC	2.40 ± 0.01*	3.80 ± 0.04*	5.93 ± 0.18*

注: * 与野生株 RL3841 相比 $p < 0.05$

2.2.3 *OsmC* 基因突变对菌株抗有机过氧化物的影响

有机过氧化物 CuOOH 对 RL3841 和 RLOsmC 的抑菌能力结果如表 3 所示. 表 3 中当 CuOOH 浓度在较低的 5、20 mmol/L 时, 突变株 RLOsmC 的抑菌圈直径分别为 1.87、2.30 cm, 显著大于野生型菌株 RL3841 的

表 3 不同浓度有机过氧化物 CuOOH 对 RL3841 和 RLOsmC 的抑菌能力的比较

Tab. 3 Bacteriostatic ability comparison of RL3841 and RLOsmC under CuOOH with different concentrations

菌株	不同浓度 CuOOH 下的抑菌圈直径 d/cm			
	5 mmol/L	20 mmol/L	100 mmol/L	500 mmol/L
RL3841	1.33 ± 0.02	2.00 ± 0.09	3.00 ± 0.14	4.50 ± 0.07
RLOsmC	1.87 ± 0.03*	2.30 ± 0.01*	3.13 ± 0.02	4.73 ± 0.04

注: * 与野生株 RL3841 相比 $p < 0.05$

2.2 *OsmC* 基因突变对菌株生长的影响

2.2.1 *OsmC* 基因突变对菌株正常生长的影响

将突变菌株 RLOsmC 和野生型菌株 RL3841 按终浓度 $D(600\text{ nm})$ 为 0.01 接种于 AMS 液体培养基中, 摇床培养, 每隔 6 h 取样测 $D(600\text{ nm})$ 值, 并绘制生长曲线见图 1. 由图 1 可知: 突变株 RLOsmC 与野生型菌株 RL3841 的生长状况无很大差异, 表明 *OsmC* 基因突变不影响豌豆根瘤菌的正常生长.

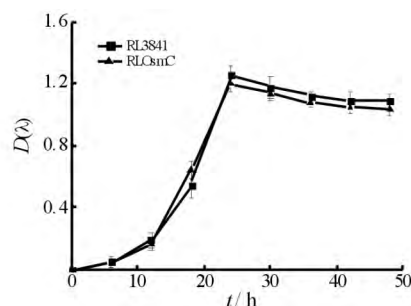


图 1 自生条件下 RL3841 和 RLOsmC 的生长情况

Fig. 1 Growth conditions of RL3841 and RLOsmC in free-living condition

2.2.2 *OsmC* 基因突变对菌株抗无机氧化物 H_2O_2 的影响

抑菌圈实验研究了不同浓度 H_2O_2 对突变株 RLOsmC 和野生株 RL3841 的抑菌能力, 结果见表 2. 如表 2 所示: 当 H_2O_2 浓度分别为 20、100、500 mmol/L 时, RLOsmC 菌株的抑菌圈直径分别为 2.40、3.8、5.93 cm, 均显著大于野生型的抑菌圈直径, 说明 *OsmC* 基因突变会严重影响豌豆根瘤菌抗无机氧化物 H_2O_2 的能力.

抑菌圈直径; 而当 CuOOH 浓度在较高的 100、500 mmol/L 时, 突变株 RLOsmC 和野生型菌株 RL3841 的抑菌圈直径无显著性差异, 说明 *OsmC* 基因突变会影响豌豆根瘤菌抗低浓度有机氧化物 CuOOH 的能力, 但对高浓度有机氧化物 CuOOH 的抗性无影响.

2.3 突变菌株 RLOsmC 接种根瘤的固氮酶活

盆栽3周后,突变株 RLOsmC 接种豌豆植株形成红色有效根瘤,而且与野生型 RL3841 相比,突变株形成根瘤数无显著差异,结果见表4。进一步利用乙炔还原法测定固氮酶活,结果表明:与野生型菌株 RL3841 相比,突变株 RLOsmC 形成根瘤的固氮酶活降低了18.3%。

表4 突变株 RLOsmC 和野生株 RL3841 的共生性能的比较

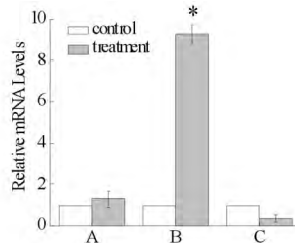
Tab.4 Comparison of symbiotic performance between RLOsmC and RL3841

菌株	根瘤数	$n(\text{乙炔}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1})^*$
RL3841	111.0 ± 18.6	2.84 ± 0.26
RLOsmC	107.7 ± 13.3	2.32 ± 0.13*

注: * 与野生株 RL3841 相比 $p < 0.05$

2.4 荧光定量 RT-PCR 分析 *OsmC* 基因的表达

将清洗后的野生型 RL3841 经 0.5 mM H_2O_2 处理 1 h,以生理盐水处理 1 h 作对照,提取菌体 RNA,反转录成 cDNA 后,进行荧光定量 PCR,结果见图2。经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,发现用 0.5 mM H_2O_2 处理 1 h 的野生菌 RL3841 中 *OsmC* 基因的表达量为未处理的表达量的 (1.27 ± 0.36) 倍,尚未达到 2 倍的显著差异水平。*OsmC* 基因在接种 25 d 根瘤类菌体中表达量为在自生条件下的 (0.32 ± 0.13) 倍,表达量显著降低。*OsmC* 基因在形成 7 d 根瘤类菌体中的表达已有相关报道,其表达量为在自生条件下的 (9.25 ± 0.01) 倍^[14],表明 *OsmC* 基因在根瘤形成早期表达显著上调。



* $p < 0.05$ control: 对数期 RL3841 中 *OsmC* 基因的表达量;

A) 0.5 mmol/L H_2O_2 ; B) 7 d 类菌体; C) 25 d 类菌体

图2 *OsmC* 基因在 H_2O_2 胁迫条件下与在类菌体中的相对表达量

Fig.2 Relative expression of *OsmC* under the stress of H_2O_2 and in the bacteroid growth

3 讨论

根瘤菌与豆科植物共生期间,根瘤菌会感染并在豆科植物体内繁殖。豌豆植株在生长过程中会产生 ROS,ROS 包括 O_2^- 和 H_2O_2 ^[9],它们是机体抵抗外界入侵产生的防御机制,这些分子同时也会通过参与 Fenton 化学反应造成细菌的 DNA 损伤,最终导致细菌死亡^[3,4]。在固氮过程中,固氮酶的活性需要低氧环境,保证其不会遇氧失活。*OsmC* 基因在抗氧化过程中发挥

重要作用,为了研究其在抗氧化和在共生固氮中的功能,本文构建了 *RLOsmC* 基因突变体。

本研究证实了 *OsmC* 基因突变对根瘤菌 RL3841 的自生生长无影响,但当 H_2O_2 浓度为 20, 100, 500 mmol/L 时, *OsmC* 基因突变株的抗氧化能力均显著低于野生菌 RL3841,说明 *OsmC* 基因突变会严重影响豌豆根瘤菌抗无机氧化物 H_2O_2 的能力;且 *OsmC* 基因突变会影响豌豆根瘤菌抗低浓度有机氧化物 CuOOH 的能力。Lesniak 等^[4]发现 *E. coli* 的渗透诱导蛋白 *OsmC* 对无机氧化物和有机氧化物都具有过氧化物酶活性,且与有机过氧化物还原酶一样, *OsmC* 也是直接通过半胱氨酸的巯基反应使氢过氧化物还原。

盆栽实验表明,与野生型 RL3841 相比,突变菌株 RLOsmC 虽未影响豌豆宿主的结瘤数量,但会显著降低植株根瘤的固氮酶活。定量 RT-PCR 进一步发现 *OsmC* 基因在接种 7 d 的根瘤表达显著上调。根瘤菌 *OsmC* 基因缺失对固氮酶活的影响尚未见报道,但 *OsmC* 有机过氧化物酶和 *Ohr* 是结构和功能同源的蛋白^[15],田梦洋等^[8]研究发现豌豆根瘤菌 *ohrB* 基因突变会降低菌株的竞争结瘤能力,在接种 7 d 的根瘤类菌体中 *ohrB* 基因的表达量为自由生长的 (5.59 ± 0.04) 倍,说明 *OsmC* 与 *Ohr* 一样,在根瘤形成阶段发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Udvardi M, Poole P S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64(1): 781-805.
- [2] Fontenelle C, Blanco C, Arrieta M, et al. Resistance to organic hydroperoxides requires *ohr* and *ohrR* genes in *Sinorhizobium meliloti* [J]. *BMC Microbiol*, 2011, 11(1): 100.
- [3] Atichartpongkul S, Loprasert S, Vattanaviboon P, et al. Bacterial *Ohr* and *OsmC* paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression [J]. *Microbiolog* 2001, 147(Pt 7): 1775-1782.
- [4] Lesniak J, Barton WA, Nikolov D B. Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein *OsmC* [J]. *Protein Sci*, 2003, 12(12): 2838-2843.
- [5] Hop H T, Reyes A W, Simborio H L, et al. Immunization of mice with recombinant *Brucella abortus* organic hydroperoxide resistance (*Ohr*) protein protects against a virulent *Brucella abortus* 544 infection [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(1): 190-196.
- [6] Chuchue T, Tanboon W, Prapagdee B, et al. *ohrR* and *ohr* are the primary sensor/regulator and protective genes against

- organic hydroperoxide stress in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *J Bacteriol* 2006 ,188(3) : 842-851.
- [7] Klomsiri C Panmanee W Dharmstithi S et al. Novel roles of *ohrR-ohr* in *Xanthomonas* sensing , metabolism , and physiological adaptive response to lipid hydroperoxide [J]. *J Bacteriol* 2005 ,187(9) : 3277-3281.
- [8] 田梦洋 何冬兰 李晓华 等. 豌豆根瘤菌 *ohrB* 基因的抗氧化和共生固氮表型[J]. 华中农业大学学报 2016(3) : 54-60.
- [9] Caswell C C Baumgartner J E Martin D W. Characterization of the organic hydroperoxide resistance system of *Brucella abortus* 2308 [J]. *J Bacteriol* 2012 ,194(18) :5065-5072.
- [10] 周艳琳 何冬兰 李晓华 等. *katG* 基因在豌豆根瘤菌抗氧化中的功能[J]. 微生物学报 ,2015 ,55(7) : 843-850.
- [11] Poole P S Blyth A Reid C J et al. Myo-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* [J]. *Microbiology* ,1994 ,140(10) : 2787-2795.
- [12] Karunakaran R Ramachandran V K Seaman J C et al. Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca* [J]. *Bacteriol* , 2009 , 191 (12) : 4002-4014.
- [13] 程国军 周俊初 李友国. 华癸中生根瘤菌脂多糖突变株的共生能力[J]. 中南民族大学学报(自然科学版) 2008 27(2) :11-13.
- [14] Si M Wang J Xiao X et al. *Ohr* protects *Corynebacterium glutamicum* against organic hydroperoxide induced oxidative stress. [J]. *Plos One* 2015 ,10(6) : e0131634 .
- [15] Domingos R M Meireles D D A Neto J F D S ,et al. Structural and biochemical comparative analysis among Cys-Based *Ohr/OsmC* protein family: insights on their high reactivity towards hydroperoxides [J]. *Free Radical Bio Med* 2014 76: S156 – S157.

(上接第 20 页)

(3) 拓宽畜禽粪便资源化利用渠道. 由于清江流域地处山区, 可以通过建立一些小型沼气工程, 将畜禽粪便通过厌氧发酵生产沼气, 沼气作为燃料利用, 沼渣、沼液可用作有机肥料或掺入饲料喂猪、养鱼.

(4) 制定相关优惠政策. 畜禽养殖行业相对来说是一个微利行业, 在防治畜禽污染的过程中, 应制定一些政策给予适当的补贴; 对建立标准化治理设施和利用沼气技术处理畜禽粪便的养殖场, 给予适当的资金支持. 制定鼓励生产、使用有机肥的优惠政策.

参 考 文 献

- [1] 阎波杰 赵春江 潘瑜春 等. 大兴区农用地畜禽粪便氮负荷估算及污染风险评价[J]. 环境科学 2010 ,32(2) : 437-443.
- [2] 王海英 周启霞 宋雅琪 等. 猪粪废水用于三角褐指藻培养的研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版) , 2014 22(4) : 39-41
- [3] 宋大平 庄大方 陈 巍. 安徽省畜禽粪便污染耕地、水体现状及其风险评价[J]. 环境科学 2012 ,33(1) : 110-115.
- [4] 张绪美 董元华 王 辉 等. 中国畜禽养殖结构及其粪便 N 污染负荷特征分析[J]. 环境科学 2007 ,28(6) : 1311-1318.
- [5] 冯 倩 刘聚涛 付莎莎 等. 江西省畜禽粪便污染物产生量及其耕地负荷分析[J]. 安全与环境学报 , 2014 ,14(6) : 316-319
- [6] 冯爱萍 王雪蕾 刘 忠 等. 东北三省畜禽养殖环境风险时空特征[J]. 环境科学研究 2015 ,28(6) : 967-974.
- [7] 杨 飞 杨世琦 诸云强 等. 中国近 30 年畜禽养殖量及其耕地氮污染负荷分析[J]. 农业工程学报 2013 , 29(5) : 1-5
- [8] 国家环境保护总局自然生态保护司. 全国规模化畜禽养殖业污染情况调查及防治对策[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 14-103.
- [9] 朱建春 张增强 樊志民 等. 中国畜禽粪便的能源潜力与氮磷耕地负荷及总量控制[J]. 农业环境科学学报 2014 ,33(3) : 435-445
- [10] 易发钊. 梅江流域畜禽养殖排放污染物潜在负荷估算及其空间分布[D]. 南昌: 江西师范大学, 2013: 24-25.
- [11] 刘培芳 陈振楼 许世远 等. 长江三角洲城郊畜禽粪便的污染负荷及其防治对策[J]. 长江流域资源与环境 2002 ,11(5) : 456-460.
- [12] 侯世忠 张淑二 战汪涛 等. 山东畜禽粪便产生量估算及其环境效应研究[J]. 中国人口·资源与环境 , 2013 23(11) : 78-81
- [13] 张景书 梁伟鹏 万云兵 等. 南海区畜禽养殖污染现状及防治对策[J]. 环境科学与技术 2006 ,29(1) : 108-110.
- [14] 王 军. 潍坊市畜禽养殖污染生态防治研究[D]. 青岛: 中国海洋大学 2012: 18-49.