

PLFA 法研究稻草固态发酵中的微生物群落结构变化

喻曼, 曾光明*, 陈耀宁, 郁红艳, 黄丹莲, 陈芙蓉

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082)

摘要: 在稻草固态发酵体系中同时接种土壤微生物和黄孢原毛平革菌, 用磷脂脂肪酸(PLFA)谱图分析法研究发酵过程的微生物群落和生物量变化, 同时监测木质纤维素降解率的变化. 结果表明, 发酵后木质纤维素的降解率可达 44%. 根据标记性脂肪酸的变化, 在发酵第 6 d, 革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌的含量都达到了最高值, 其中, 革兰氏阳性菌的含量较低; 真菌和细菌的脂肪酸含量比值变化范围为 0.2~0.5, 说明真菌是降解木质纤维素的主要群落. 主成分分析结果显示, 发酵后期以 18 碳不饱和脂肪酸为主, 与标记性脂肪酸分析结果一致, 同时跟木质纤维素降解率的变化趋势对应, 因此 PLFA 分析法可以较好地反映稻草固态发酵过程中的微生物群落结构和生物量的变化.

关键词: 稻草; 固态发酵; 群落结构; PLFA

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)11-2603-06

Microbial Community Changes During the Degradation of Straw Using Phospholipid Fatty Acid Analysis

YU Man, ZENG Guang-ming, CHEN Yao-ning, YU Hong-yan, HUANG Dan-lian, CHEN Fu-rong

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract Solid-state fermentation system of rice straw was established with the inoculation of soil microorganism and *Phanerochaete chrysosporium*. Microbial biomass and community structure were investigated using the phospholipid fatty acid (PLFA) technique, and the changes of lignocellulose's degradation rate were also detected during the process. The experimental results show that lignocellulose degradation rate reaches 44% after fermentation. When the total amount of phospholipid fatty acid is separated into indicator phospholipid fatty acids for different groups of microorganisms, these groups show different patterns during the process. Contents of PLFA in gram-positive bacteria, gram-negative and fungi reach their peak value on the sixth day. Gram-positive bacteria have lower contents. The PLFA content ratio of fungi and bacteria is 0.2~0.5, so fungi are the main community decomposing lignocellulose. Principal component analysis of the PLFA data show that 18 carbon unsaturated fatty acids are the major fatty acids at the end of the process, which is consistent with the results of indicator phospholipid fatty acids and lignocellulose's degradation rates, so PLFA technique is able to fairly well detect the changes of microbial biomass and community structure in solid-state fermentation system of rice straw.

Key words: rice straw; solid-state fermentation; microbial community structure; PLFA

稻草是我国农业废物的主要来源, 其木质纤维素含量丰富, 降解难, 生物降解近年来得到广泛关注. 目前研究主要集中在分离纯化单一菌株的培养^[1~3], 但是, 在自然界中, 木质纤维素的完全降解是真菌、细菌及相应微生物群落共同作用的结果, 由于大部分环境微生物都处于存活不可培养状态^[4], 使得了解微生物实际群落变化比较困难. 近年来 PLFA(Phospholipid fatty acid)谱图分析法^[5~11]、Biolog 法^[12,13] 和分子生物学方法^[14~16] 都力图克服这一难点, 但是 Biolog 法不适于分析整个微生物群落结构, 分子生物学方法易受环境微生物生理状态影响, 而 PLFA 法可以较完整地检测到样品中微生物群落变化, 如真菌、放线菌、革兰阳性菌、革兰阴性菌, 且受微生物生理影响不大. 它的主要原理是不同的微生物具有不同的 PLFA 种类和数量. 1979 年 White 等^[17] 最先提取 PLFA 研究了河口沉积物中微生物生

物量的变化, 随后 PLFA 法在堆肥样品、海河沉积物和土壤微生物研究中得到广泛应用^[5~11], 但目前用于稻草固态发酵的研究鲜见报道. 本试验采用 PLFA 谱图分析法研究了接种土壤微生物和木质素降解模式菌黄孢原毛平革菌的稻草固态发酵体系中的微生物群落变化, 以期为更好地调控稻草发酵、提高稻草生物降解效率提供依据.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

收稿日期: 2006-12-25; 修订日期: 2007-03-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2005CB72403); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2004AA649370); 国家杰出青年科学基金项目(50225926); 2000 年度高等学校优秀青年教学科研奖励计划项目; 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20020532017)

作者简介: 喻曼(1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为固体废物治理与资源化微生物技术, E-mail: yuman20030703@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: zgming@hnu.cn

实验选用土壤微生物悬液和黄孢原毛平革菌的孢子悬液作为接种物.土壤取自岳麓山林间表层土,悬液提取方法参照文献[18];黄孢原毛平革菌(BKMF-1767)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,先将菌种接种在马铃薯(PDA)琼脂培养基上,待培养 5~7 d 长满孢子后,刮取孢子制成浓度为 2.0×10^6 个/mL 的孢子悬液.

1.2 培养基和培养方法

将稻草烘干后用 DWF700 型电动植物粉碎机粉碎,备用.称取 50 g 干稻草粉为固体基质,装于相应的锥形瓶中,加入一定量液体基质^[3,19,20]配成固态培养基,不灭菌,pH 自然;接入制好的土壤微生物悬液和黄孢原毛平革菌孢子悬液到上述固态培养基中,添加量都为 1 mL,使得接种量为 0.5%,然后置于 37℃ 培养箱中恒温培养 30 d,做 2 个平行样.分别于第 0、3、6、12、21、30 d 取样测定 PLFA 含量,每 6 d 测定半纤维素、纤维素、木质素含量.

1.3 参数测定

1.3.1 PLFA 的测定

PLFA 的提取主要参考文献[21,22]等,称取 1.00 g 样品(干重)于带聚四氟乙烯盖子的玻璃管中,分别加入二氯甲烷、甲醇、磷酸盐缓冲溶液 5 mL、10 mL、5 mL,超声匀化 10 min 后,在 4℃ 下避光静置过夜;再加入二氯甲烷和纯水,使得二氯甲烷:甲醇:缓冲液 = 1:1:0.9,静置 24 h;去水相,有机相用 4 号纤维滤膜过滤;取滤液用 N_2 干燥后加正己烷溶解(溶解效果不好可以加一滴二氯甲烷),过硅胶柱(1 g, 100~200 目),依次用正己烷、氯仿、丙酮、甲醇洗涤柱子;收集甲醇洗涤液, N_2 干燥;用 0.5 mL 甲醇-甲苯(1:1, 体积比, 含内标物 19:0)溶解吹干的脂类物质,加入 0.5 mL 2.0 mol/L KOH, 37℃ 水浴加热 15 min;冷却至室温,加入 5 mL 0.2 mol/L 醋酸,摇匀后加 2 mL 氯仿,去水相,加去离子水洗涤后,取底部有机物进行 GC-MS 测试.

GC-MS 条件: GC-MS 仪器型号 TRACE2000, Palaris Q, 毛细管柱 CP-Sil 5CB Low Bleed/MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m). 不分流进样, 进样口温度 250℃, 检测器温度 200℃. 升温程序, 初始温度 60℃, 以 5℃/min 升至 230℃, 保持 20 min. 氦气作载气, 流量为 1.00 mL/min. PLFA 的定性根据质谱标准图和相关报道, 以 PLFA 19:0 做内标物进行定量计算.

真菌的生物量用 18:2 ω 6,9 的含量估算, 细菌的生物量通过以下 PLFA 的总含量估算: i15:0、a15:0、

i16:0、16:1 ω 9、16:1 ω 7t、i17:0、a17:0、17:0 和 18:1 ω 7. 革兰氏阳性菌的生物量通过以下 PLFA 的总含量估算: 10Me16:0、10Me17:0、10Me18:0、i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、a17:0, 革兰氏阴性菌的生物量通过以下 PLFA 的总含量估算: 16:1 ω 5、16:1 ω 7t、16:1 ω 9、cy17:0、18:1 ω 5、18:1 ω 7、cy19:0^[23,24].

1.3.2 半纤维素, 纤维素, 木质素的测定

木质纤维素的测定^[25]使用半纤维素测定仪器(FOSS Fibertec 2010), 木质纤维素的降解率计算公式如下:

$$R_n = \frac{m_0 - m_n}{m_0} \times 100\%$$

式中, R_n 为第 n 次取样时的降解率, %; m_0 为木质纤维素的初始含量, g; m_n 为第 n 次取样测定并计算得到的木质纤维素的含量, g.

2 结果与讨论

2.1 PLFA 含量的变化

在稻草发酵过程中总共检测到 43 种 PLFA, 其中 39 种已经鉴定. 通过对 PLFA 数据进行聚类分析, PLFA 的变化趋势可以分为 4 类(如图 1、2). 由图 1 可以看出, cy17:0 和 cy19:0 的浓度变化具有阶段性, cy17:0 的浓度在 0~3 d 内急剧增长, 于第 3 d 达到最高值; cy19:0 浓度上升较缓慢, 到 12 d 才达到峰值. 16:1 ω 7c 在发酵初期浓度很低, 整个过程呈上升趋势. 大部分 PLFA 的变化形式跟 18:1 ω 10(图 2) 类似, 第 6 d 达到浓度最高值. 变化与之类似的磷脂脂肪酸有 20:1 和 22:1, 还包括指示真菌的 18:2 ω 6, 9、18:1 ω 9、18:2; 指示革兰氏阴性菌的 16:1 ω 7、18:1 ω 5、16:1 ω 5; 指示革兰氏阳性菌的 10Me15:0、10Me17:0、a16:0.

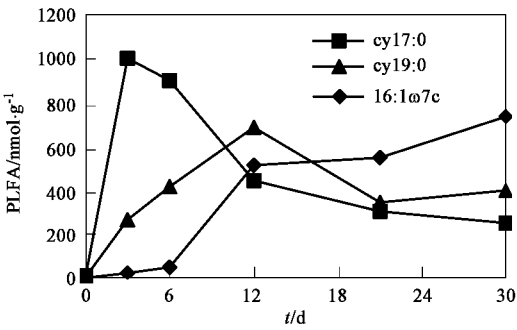


图 1 特征脂肪酸含量变化曲线

Fig. 1 Changes in concentrations of typical fatty acids

PLFA 形式的变化可能是发酵过程中种群结构

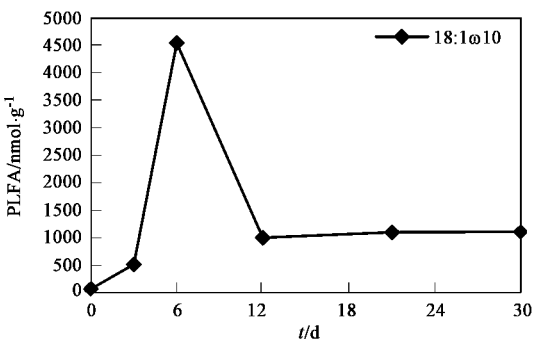


图 2 18:1ω10 含量变化曲线
Fig.2 Changes in concentrations of 18:1ω10

发生了变化,也有可能是同一种群随温度变化发生的改变.本次试验是恒温培养,因此脂肪酸的变化是种群或生物体的改变引起的.一种脂肪酸的增加肯定与含有该种脂肪酸的种群增加有关.但是,一种脂肪酸的减少可能有 2 种原因.第一,生物体死亡;第

二,生物体没有死亡,但其脂肪酸因不能适应环境而自动降解,以至没有在分析之列,哪种脂肪酸在环境样品中会自动降解是未知的,因此以脂肪酸的减少来表征种群的衰亡往往高于该种群的实际死亡率.在 Klamer 等^[26]的研究中提出了一个快速转换比,即脂肪酸含量与其所指示微生物生物量的比值是一定的,根据这个转换比可以推算微生物的半衰期.在本研究结果中,PLFA 18:1ω10(真菌中常见)的含量在第 6 d 增至 4 500 nmol/g,3 d 后降至 1 000 nmol/g,所以 18:1ω10 所指示种群的半衰期是 1d 左右,跟 Klamer 估算的结果类似. cy19:0 在 9 d 内从最高值 700 nmol/g 降到 350 nmol/g,它所指示种群的半衰期为 4.5 d,与 Kristin 等^[27]研究中分析一致.因此,利用脂肪酸的减少能很好地反映不同种群的衰亡率.

2.2 微生物群落结构的变化

微生物群落结构的主要变化由标记性脂肪酸确定^[26],结果如图 3 所示.

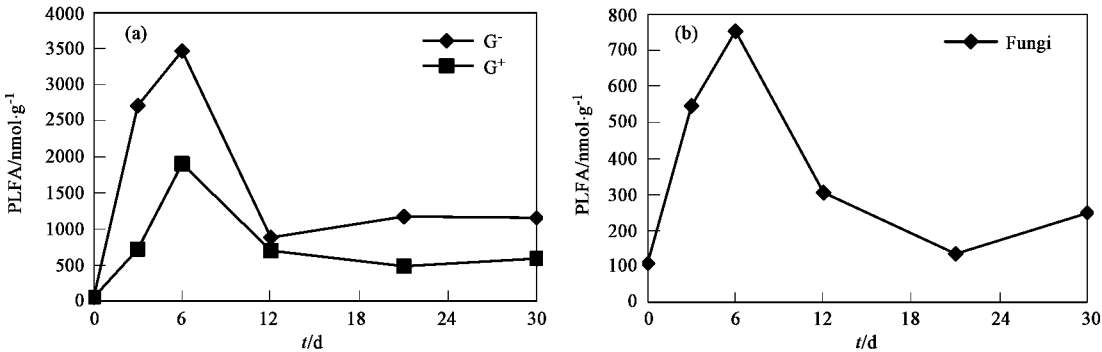


图 3 微生物群落结构变化
Fig.3 Changes of microbial community

如图 3(a)指示革兰氏阴性菌和阳性菌的 PLFA 浓度均于第 6 d 达到峰值,分别是 3 465.68 nmol/g 和 1 905.933 nmol/g,在整个发酵过程中指示革兰氏阳性菌的 PLFA 含量低于革兰氏阴性菌的,这表明革兰氏阳性菌在该发酵体系中繁殖较慢,活性较低.指示真菌的 PLFA 含量(18:2ω6,9)变化如图 3(b),初始值为 100 nmol/g,第 6 d 达到峰值 750 nmol/g,之后呈下降趋势,但 21 d 后开始回升,这说明在发酵后期真菌生物量有增长.主导群落通过观察真菌和细菌的 PLFA 含量比值变化获得,在有机质含量较低农业土壤中该比值 0.02 ~ 0.04,森林土壤中是 0.3 ~ 0.5,后者是真菌占主导^[22].在本研究中,真菌与细菌的 PLFA 含量比值大于或等于已知的不同土壤的相应比值,其比值在 0.2 ~ 0.5 间变化,最大值出现

在第 6 d,所以真菌是本次发酵过程的主要微生物群落.放线菌(根据 PLFA 10Me18:0 的含量判断)在整个过程中含量非常低,几乎没有,这可能跟培养条件有关,放线菌一般在高温阶段开始降解木质纤维^[28],本次试验中培养温度是 37℃,条件设置偏向于真菌的生长条件,不适合放线菌生长,所以其含量很低.

从 PLFA 组成的变化判断微生物的种群变化表征的并不是种群绝对生物量的变化,目前还没有不同种群实际生物量及其脂肪酸含量之间计算的转换因子.另外就是稻草本身对 PLFA 含量的贡献,实验检测到稻草中的主要脂肪酸是 16:0 和 18:1ω5,这些不是标记性分子,其它的脂肪酸也被分到不同的微生物种群里除放线菌外,因此这种误差较小,随着稻

草的降解这种误差会越来越小。

有研究发现用熏蒸技术提取计算的微生物生物量与用总 PLFA 指示的生物量有很好的相关性^[29,30]。本试验用总 PLFA 指示总微生物生物量变化,如图 4 所示,总 PLFA 的初始值为 4 780 nmol/g,第 6 d 升到最高值 29 444 nmol/g,然后逐渐减少。说明在 6 d 后生物量逐渐下降,这可能是初期一些新鲜基质被迅速利用,当易降解物质耗尽的时候微生物量随之减少。

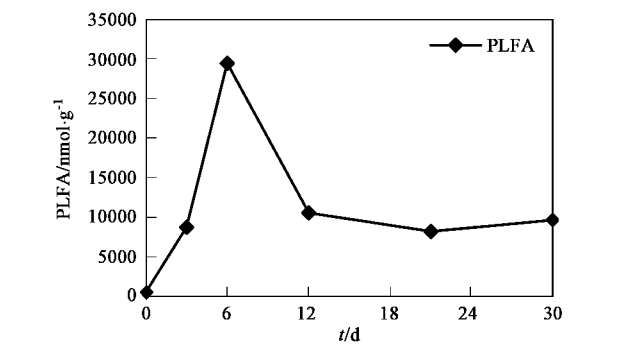


图 4 总的 PLFA 含量变化曲线
Fig.4 Changes in concentration of total PLFA

对 PLFA 数据进行 PCA 分析能显示 PLFA 在不同时期的分布,如图 5 是单体 PLFA 在主成分上的载荷值。

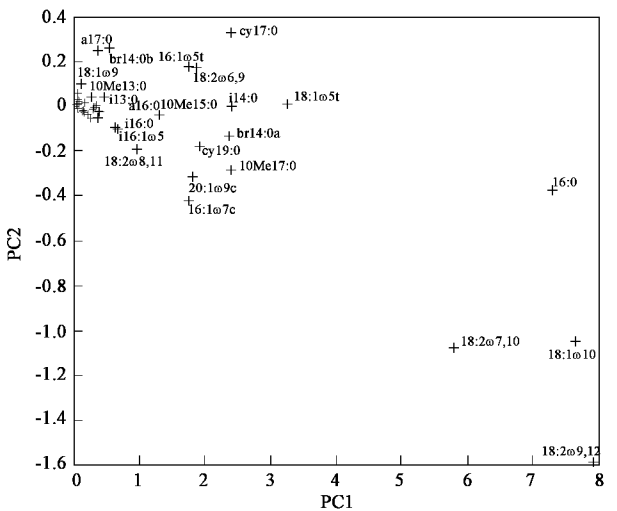


图 5 PCA 分析显示样品的脂肪酸随时间的变化分布
Fig.5 PCA of fatty acid profiles of samples in different age

从图 5 可以看出大部分 PLFA 都集中在 PC1 值较小的区域,大部分 PLFA 含量变化不明显,说明在发酵后期微生物群落结构变化不大,跟已有研究^[31]类似。发酵初期 cy17:0 含量变化较大,发酵后期

18:2ω9,12 含量变化较明显,16:1ω7c、20:1ω9c、10Me17:0 在整个发酵过程中含量变化较小;a17:0 和 br14:0b 的变化类似,是发酵初期的主要 PLFA,后期以 18 碳不饱和脂肪酸为主,这跟前面得出的主导群落为真菌的结论相应。PCA 分析显示结果与标志性脂肪酸分析的变化一致,表明以 PLFA 为标记物来估计稻草固态发酵中微生物群落结构变化是可行的。

2.3 木质纤维素含量变化

由图 6 可见,稻草固态发酵 30 d 后半纤维素,纤维素,木质素的总降解率比较接近,都在 44% 左右。通过折线斜率可以看出 3 组分不同阶段的降解速率有很大差别,半纤维素降解率每个阶段都有上升,变化比较平缓;纤维素的降解率于第 6 d 开始大幅上升;木质素的降解率前期变化很小,18 d 后迅速升高。

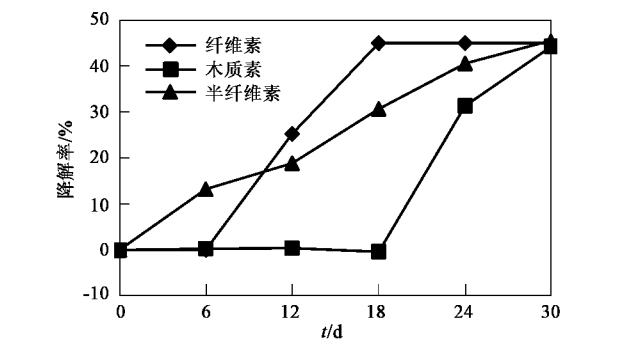


图 6 木质纤维素降解率变化曲线
Fig.6 Degradation rate changes of lignocellulose components

比较 3 组曲线的变化,可以发现前 6 d 半纤维素的降解占主导,木质素、纤维素几乎没有降解;第 6~18 d 主要是纤维素的降解,半纤维素的降解速率略有下降,木质素降解率没有太大变化;18~30 d 是木质素降解的主要时期,因为这一阶段纤维素降解率几乎没有变化,半纤维素的降解速率明显低于木质素的降解速率。结合 PLFA 含量的变化,PCA 分析显示后期以 18 碳不饱和脂肪酸为主,这是真菌中常见的脂肪酸,真菌中的木腐菌对木质素的降解起着至关重要的作用^[32],木质素的降解发生在固态发酵的后期是合理的。在本次稻草固态发酵体系中的微生物对木质纤维素的降解表现出明显的阶段性,即首先利用最易降解的半纤维素,在生长稳定后开始降解纤维素,一定程度的降解后又开始木质素的代谢,这种表现与白腐真菌的代谢机制一致^[33]。

3 结论

(1) PLFA 分析法能够用来分析稻草发酵过程中微生物群落结构的变化,表征反应体系的生物量. 单体脂肪酸的减少可以用来估计种群的衰亡率. 真菌和细菌的脂肪酸含量比值显示真菌是降解木质纤维素的主要群落. PCA 分析结果说明了不同微生物群落随时间变化的分布,反映了 PLFA 法监测群落结构变异的灵敏性. 木质纤维素降解率的变化也从微生物可利用营养物质的角度证明了 PLFA 法的可行性.

(2) PLFA 法在一定程度上克服了传统的培养方法的不全面性,但是,在实际的计算中并不能完全等于不同种群的绝对生物量,因此,结合传统方法寻求实际生物量与其脂肪酸含量之间计算的转换因子,有待作进一步研究.

参考文献:

- [1] 郁红艳,曾光明,黄国和,等. 简青霉 *Penicillium simplicissimum* 木质素降解能力[J]. 环境科学, 2005, **26** (2):167 ~ 171.
- [2] Song R, Deng X. Study on biodegradated ability of thirteen fungi to straw [J]. Journal of Forestry Research, 2004, **15** (3):223 ~ 226.
- [3] Stepanova E V, Koroleva O V, Vasilchenko L G, *et al.* Fungal decomposition of oat straw during liquid and solid-state fermentation [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2003, **39** (1):65 ~ 74.
- [4] 张洪勋,王晓谊,齐鸿雁,等. 微生物生态学研究方法进展[J]. 生态学报, 2003, **23** (5):988 ~ 995.
- [5] Medeiros P M, Fernandes M F, Dick R P, *et al.* Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil[J]. Chemosphere, 2006, **65** (5):832 ~ 839.
- [6] Hackl E, Pfeffer M, Donat C, *et al.* Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005, **37** (4):661 ~ 671.
- [7] Puglisi E, Nicelli M, Capri E, *et al.* A soil alteration index based on phospholipid fatty acid[J]. Chemosphere, 2005, **6** (11):1548 ~ 1557.
- [8] Calderón F J, Jackson L E, Scow K M, *et al.* Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, **32** (11):1547 ~ 1559.
- [9] CórdovaKrelyos A L, Cao Y, Green P G, *et al.* Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, **72** (5):3357 ~ 3366.
- [10] Syakti A D, Mazzella N, Nerini D, *et al.* Phospholipid fatty acid of a marine sedimentary microbial community in a laboratory microcosm: response to petroleum hydrocarbon contamination[J]. Organic Geochemistry, 2006, **37** (11):1617 ~ 1628.
- [11] VanderGheynst J S, Lei F. Microbial community structure dynamics during aerated and mixed composting[J]. Transactions of the ASAE, 2003, **46** (2):577 ~ 584.

- [12] Mondini C, Insam H. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach[J]. European Journal of Soil Biology, 2003, **39** (3):141 ~ 148.
- [13] Fang M, Wong J W C. Changes in thermophilic bacteria population and diversity during composting of coal fly ash and sewage sludge [J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2000, **124** (3):333 ~ 343.
- [14] Green S J, Michel Jr F C, Hadar Y, *et al.* Similarity of bacterial communities in sawdust-and straw-amend cow manure composts[J]. FEMS Microbiology letters, 2004, **233** (1):115 ~ 123.
- [15] Cahyani V R, Matsuya K, Asakawa S, *et al.* Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis[J]. Biol Fertil Soils, 2004, **40** (5):334 ~ 344.
- [16] Sabine P, Stefanie K, Frank S, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphis-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, **66** (3):930 ~ 936.
- [17] White D C, Davis W M, Nickels J S, *et al.* Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. Oecologia, 1979, **40** :51 ~ 62.
- [18] 向万胜,吴金水,肖和艾,等. 土壤微生物的分离、提取与纯化研究进展[J]. 应用生态学报, 2003, **14** (3):453 ~ 456.
- [19] Dosoretz C G, Chen H G, Grethlein H E. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, **56** (2):395 ~ 400.
- [20] Gill P K, Arora D S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi [J]. Microbiol Biotechnol, 2003, **30** (1):28 ~ 33.
- [21] Fang J, Findlay R H. The use of a classic lipid extraction method for simultaneous recovery of organic pollutants and microbial lipids from sediments[J]. Journal of Microbiological Method, 1996, **27** (1):63 ~ 71.
- [22] Fang J, Barcelona M J, Alvarez P J. A direct comparison between fatty acid and intact phospholipid profiling for microbial identification [J]. Organic Geochemistry, 2000, **31** (9):881 ~ 887.
- [23] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. Biol Fertil Soils, 1996, **22** (1):59 ~ 65.
- [24] Wilkinson S G. Gram-negative bacteria[A]. In: Ratledge C, Wilkinson S G. Microbial lipids[C]. London: Academic Press, 1988. 299 ~ 408.
- [25] Liu J, Yuan X, Zeng G, *et al.* Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation [J]. Process Biochemistry, 2006, **41** (11):2347 ~ 2351.
- [26] Klammer M, Bååth E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, **27** (1):9 ~ 20.
- [27] Kristin S, Åsa J, Sven S, *et al.* Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, **55** (2):371 ~ 382.

[28]

Godden B, Ball A S, Helvenstein P, *et al*. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes[J]. *Gen Microbiol*, 1992, **138** :2441 ~ 2448.

[29]

Hellmann B, Zelles L, Palojärvi A, *et al*. Emission of climate - relevant trace gases and succession of microbial communities during open-window composting[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (3): 1011 ~ 1018.

[30]

Zelles L, Bai Q Y, Rackwitz R, *et al*. Determination of phospholipid- and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structures in soils[J]. *Biol Fertil Soils*, 1995, **19** (2):115 ~ 123.

[31]

张建栋,王梦亮,刘滇生. PLFA 方法在堆肥化过程中微生物群落结构变化的影响[J]. *安徽农业科学*, 2006, **34** (3):534 ~ 534.

[32]

席北斗,刘鸿亮,白庆中,等.堆肥中纤维素和木质素的生物降解研究现状[J]. *环境污染治理技术及设备*, 2002, **3** (3): 19 ~ 23.

[33]

曾光明,黄国和,袁兴中,等.堆肥环境生物与控制[M].北京:科学出版社, 2006. 131 ~ 132.

关于反对个别作者一稿两投行为的联合声明

为保证所发表论文的首创性和学术严谨性,《环境科学》、《中国环境科学》、《环境科学学报》编辑部和《Journal of Environmental Sciences》编辑部特发表如下联合声明.

我们明确反对个别作者的一稿两投或变相一稿两投行为.自 2006 年 5 月 1 日起,我们各刊在接受作者投稿时,要求论文全体作者就所投稿件作出以下承诺(附在投稿上):

1) 来稿所报道的研究成果均系全体作者的原创性研究成果,文中报道的研究成果(含图、表中数据的全部或部分)未曾发表亦未曾投其它科技期刊.

2) 在接到所投期刊编辑部关于稿件处理结果之前,所投稿件的全部或部分内容不再投其它科技期刊.

我们将认真对待作者所作的上述承诺,并建立信息共享机制,对违背上述承诺的作者(包括在文中署名的全体作者)采取联合行动.

净化学术环境、促进学术繁荣是学术期刊作者和编者的共同责任.我们诚恳地希望广大作者能够了解我们的上述立场和做法,并积极宣传和配合.

《环境科学》编辑部

《中国环境科学》编辑部

《环境科学学报》编辑部

《Journal of Environmental Sciences》编辑部