

自生物絮团养殖池分离具有亚硝酸盐去除功能的细菌及其鉴定和特性*

王志杰^{1,2} 胡修贵^{1,2} 刘旭雅^{1,2} 宋晓玲^{2,3} 马 甦¹ 黄 捷^{2,3①}

(1. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 从凡纳滨对虾生物絮团养殖池排水渠中分离出一株对亚硝酸盐具有高效去除能力的菌株(201107290102), 16S rRNA 序列分析结果显示, 该菌株与美丽盐单胞菌(*Halomonas venusta*)的相似度高达99%, 初步鉴定为美丽盐单胞菌。其去除亚硝酸盐最适条件为碳氮比(C/N)=15、温度37℃、初始pH 10.0、盐度40, 最高去除率达91.7%。研究表明, 该菌株能高效利用亚硝酸盐, 可改良生物絮团养殖环境。

关键词 亚硝酸盐; 去除; 盐单胞菌; 生物絮团

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0100-06

养殖水体中亚硝酸盐超标是引起鱼、虾发病甚至死亡的重要因素(杨世平等, 2006; 李波等, 2009; 王会聪等, 2012), 近年来对虾“偷死病”的发生也与亚硝酸盐的积累相关(刘民等, 2008)。生物法因其成本低、无毒副作用等优点而成为优于物理法和化学法而最具发展前景的改善环境的方法(廖国礼, 2006; 刘德生等, 2009)。异养型硝化细菌因生长繁殖快和较强的环境适应能力而成为当前降解亚硝酸盐的热点材料(潘丹等, 2011; 王李宝等, 2006; 李焱生等, 2010; 李秋芬等, 2013)。芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)和假单胞菌(*Pseudomonadaceae* sp.)等均对亚硝酸盐展示了良好的去除效果(张莹等, 2011; 熊焰等, 2010; 王昌禄等, 2008; 刘法佳等, 2012; 陈瑞芳等, 2011), 但这些细菌多适应淡水或半咸水的养殖条件。适应海水养殖条件的硝化细菌报道和应用较少。

本研究从对虾生物絮团养殖池排水渠中分离筛选出一株能高效利用亚硝酸盐的菌株, 并对其生长条件及对亚硝酸盐的去除效果进行了探讨, 为该菌株在

对虾生物絮团养殖中的实际应用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验水样于2012年5月25日采自山东青岛某对虾养殖场凡纳滨对虾生物絮团养殖池的排水渠。

1.2 细菌的富集培养与筛选

1.2.1 细菌的富集培养 取10 ml上述水样加入到装有200 ml富集培养基(过滤的1000 ml陈海水中含有NaNO₂ 1g、CH₃COONa 4.8g、K₂HPO₄·3H₂O 1.2g、Fe₃PO₄·4H₂O 0.01g, pH 8.0)的500 ml锥形瓶中, 并于37℃、180 r/min摇床中振荡培养。

1.2.2 菌株培养 取适量富集培养48 h的培养液梯度稀释(10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶), 涂布于硝化细菌固体培养基(1000 ml含NaNO₂ 0.5g、CH₃COONa 3.4g、MgSO₄·7H₂O 0.01g、K₂HPO₄·3H₂O 1g、Fe₃PO₄·4H₂O 0.01g、NaCl 30g、琼脂 16g, pH

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、山东省泰山学者建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。王志杰, E-mail: wangzhijie2007@126.com

① 通讯作者: 黄 捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-27, 收修改稿日期: 2014-07-14

8.0)。37℃培养箱中培养 48 h 后, 分别挑取形态大小不同的单菌落, 再次划线培养。经 4 次继代培养后得到纯菌株。

将初筛得到的菌株接种于硝化细菌液体培养基(200 ml 含 NaNO_2 0.1 g、 CH_3COONa 0.68 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、 $\text{Fe}_3\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g、 NaCl 6 g, pH 8.0), 37℃培养 48 h。

1.3 细菌形态观察

将筛选出的菌株采用划线平板接种法在 2216E 固体培养基上接种, 37℃培养, 待长出清晰单菌落后, 用光学显微镜(D-80i, Nikon)及电子显微镜(JEM-1200EX)观察菌落的大小、形状、透明度、颜色以及是否具有鞭毛等特征, 同时进行革兰氏染色观察。

1.4 细菌鉴定

亚硝酸盐去除菌的 16S rRNA 测序及系统发育树分析。以筛选的亚硝酸盐去除菌的基因组 DNA 为模板, 对其 16S rRNA 进行 PCR 扩增, 引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492R: 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (Sattler *et al.*, 2009)。PCR 扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。所得 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司纯化测序。将测得序列在 NCBI 网站上与 GenBank 基因库中已知的 16S rRNA 序列进行同源性比对, 选取同源性最高的序列进行多重序列比较, 并以邻接法构建系统发育树。

1.5 细菌在不同条件下对亚硝态氮的利用

本试验设定了温度、碳氮比(C/N)、pH、盐度等 4 个亚硝酸盐利用的试验条件。按 5%的接种量将浓度约为 5.0×10^7 CFU/ml 的菌液接种到 200 ml 硝化细菌液体培养基中, 180 r/min 振荡培养。

1.5.1 温度 温度设定为 22、27、32、37 和 42℃, 每个温度设 3 个平行; 每隔 12 h 取菌液, 用全波长扫描式多功能读数仪(Varioskan Flash, Thermo)测定菌液在 600 nm 波长下的吸光值, 绘制菌生长曲线; 将所取菌液离心, 取上清液采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定培养基中亚硝酸盐剩余量, 再利用“亚硝酸盐氮剩余量/初始量”换算出菌株对亚硝酸盐的去除率(胡修贵等, 2013)。

1.5.2 C/N 接种菌液和亚硝酸盐测量方法同上, 37℃、180 r/min 振荡培养, C/N 设定为 0、5、10、15、20, 每个 C/N 比设 3 个平行。固定亚硝酸盐的添加量不变, 通过改变乙酸钠的添加量来确定 C/N。

1.5.3 pH 接种培养和亚硝酸盐测量方法同上。pH 设定为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 每个初始 pH 设 3 个平行。

1.5.4 盐度 接种培养和亚硝酸盐测量方法同上。盐度设定为 0、10、20、30、40, 每个盐度设 3 个平行。

2 结果

2.1 菌株的筛选与鉴定

本研究经富集筛选后得到了 5 株能利用亚硝酸盐的菌株, 选取其中对亚硝酸盐利用率最高的一株菌并将其编号为 201107290102。该菌株在电子显微镜下呈短杆状, 无鞭毛(图 1), 在 2216E 培养基上形成中央隆起、边缘整齐、形状规则、直径小于 0.5 mm 的圆形菌落, 培养 24 h 后菌落呈白色半透明, 培养 48 h 后菌落米白色不透明, 革兰氏染色阴性。通过对菌株 201107290102 的 16S rRNA 进行 PCR 扩增, 获得了长度约为 1.4 kb 的扩增产物。菌株 201107290102 根据同源性比对, 与美丽盐单胞菌(*Halomonas venusta*)同源性高达 99%。多重序列比对后采取邻接法构建的系统发育树见图 2, 菌株 201107290102 与登录号分别为

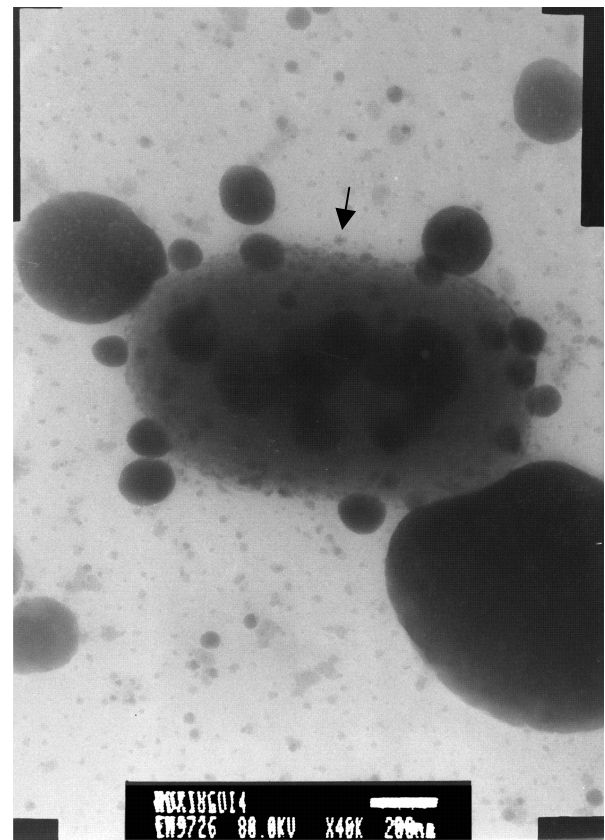


图 1 透射电镜下菌株 201107290102 的形态(标尺 200 nm)
Fig.1 The morphological character of strain 201107290102 under transmission electron microscopy (Scale bar: 200 nm)

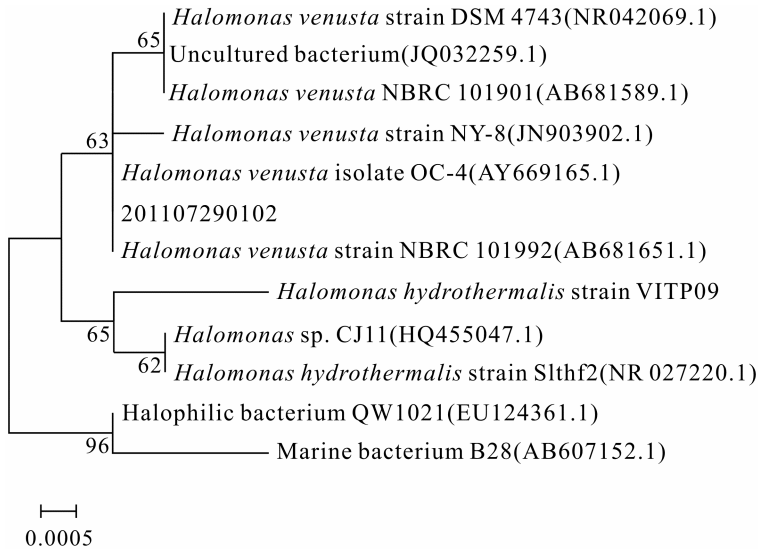


图2 菌株 201107290102 及相关菌株 16S rRNA 序列的系统发育树
Fig.2 The phylogenetic tree of strain 201107290102 and other related strains based on their 16S rRNA sequences

AY669165.1 和 AB681651.1 的 *Halomonas venusta* OC-4 和 NBRC 的亲缘关系最近。

2.2 不同 C/N 对菌株生长及亚硝酸氮去除效果的影响

图3为菌株 201107290102 的生长曲线。在实验 C/N 范围内, 菌株生长最适 C/N 为 20。该菌株在无碳源的培养基中几乎不生长; 当 C/N 低于 20, 该菌株生长量随 C/N 升高而升高。该菌 12 h 后便进入对数生长期, C/N 为 5 的条件下, 对数期相对较短, 仅为 12 h。C/N 为 10-20 条件下, 对数期较长(24 h), 36 h 后进入稳定期。

菌株 201107290102 去除亚硝酸氮最适 C/N 为 15 (图 4)。各生长阶段对亚硝酸氮的去除率整体上与其生长曲线相一致。其对亚硝酸氮的去除主要发生在对数生长期。在 0-24 h, C/N 在 5-20 范围内对亚硝酸

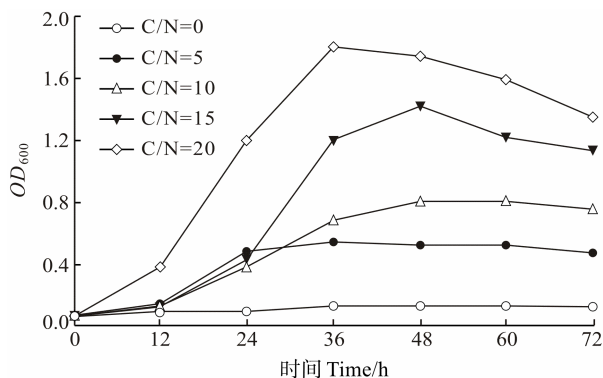


图3 不同 C/N 条件下菌株 201107290102 的生长曲线
Fig.3 The growth of strain 201107290102 under different C/N ratios

氮去除率呈先下降后升高的趋势, C/N 为 20 时去除效果最佳。在 36-72 h 内, 该菌对亚硝酸氮的去除率随 C/N 升高呈先升高后下降的趋势, C/N 为 15 时对 100 mg/L 亚硝酸氮去除率最高, 达(91.69±1.06)%。

2.3 不同温度对菌株生长及亚硝酸氮去除效果的影响

在实验温度范围内, 菌株 201107290102 的最适生长温度为 37°C (图 5)。在(22-42)°C 范围内, 菌株 201107290102 的生长随温度升高呈先升高后降低。22°C 的较低温度和 42°C 的较高温度对菌株的生长均不利。

37°C 的温度条件下, 该菌株对亚硝酸氮的去除效率最佳(图 6), 对亚硝酸氮最高去除率达(71.04±1.85)%。在前 36 h, 该菌株在 28、32 和 37°C 3 个温度条件下对亚硝酸氮的去除率无显著差异($P>0.05$), 48 h 后该菌株在 37°C 条件下对亚硝酸氮的去除效率显著高于其他各组($P<0.05$)。

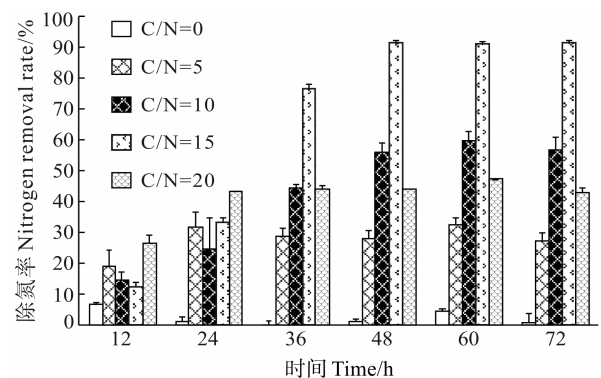


图4 不同 C/N 对菌株 201107290102 去除亚硝酸盐效果的影响

Fig.4 The effects of C/N ratio on the nitrogen removal by strain 201107290102

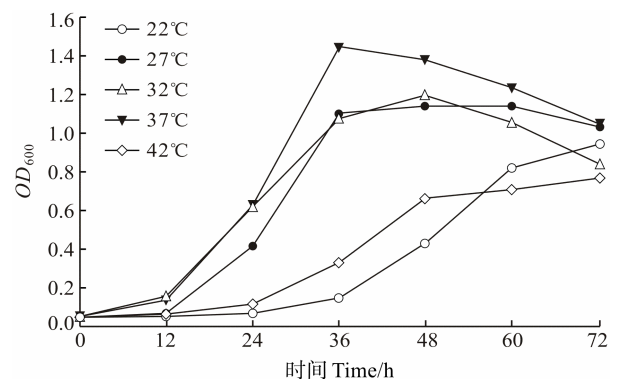


图5 不同温度条件下菌株 201107290102 的生长曲线
Fig.5 The growth of strain 201107290102 at different temperatures

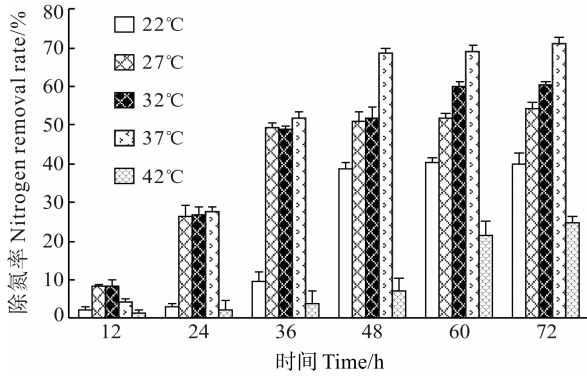


图 6 不同温度对菌株 201107290102 去除亚硝酸盐效果的影响

Fig.6 The effects of temperature on the nitrogen removal by strain 201107290102

2.4 不同盐度对菌株生长及亚硝酸盐去除效果的影响

实验结果显示,随盐度的增大,菌株 201107290102 的菌液浓度先升高后下降,其最适生长盐度为 30(图 7)。在盐度为 0 的条件下,几乎不生长;在盐度为 10 以下的条件下,生长非常缓慢;在盐度为 20-40 条件下,该菌株在 12 h 后进入对数生长期;在盐度为 40 的条件下,对亚硝酸盐的去除率最高(图 8)。在前 24 h,该菌株对亚硝酸盐的去除率随盐度的升高表现出先升高后降低的趋势,盐度为 30 的条件下对亚硝酸盐去除率最高。在盐度高于 36 后,其对亚硝酸盐的去除率随盐度的升高而明显升高,盐度 40 时亚硝酸盐去除率最高,达 (68.00±3.58)%。

2.5 不同初始 pH 对菌株生长及亚硝酸盐去除效果的影响

实验结果显示,初始 pH 在 8.0-9.0 范围内,菌株 201107290102 生长状况最好(图 9),各组培养结束后 pH 维持在 8.3-9.0 之间。在初始 pH 低于 7.0 的条件下,生长缓慢甚至不生长。当初始 pH 为 8.0-10.0 时,

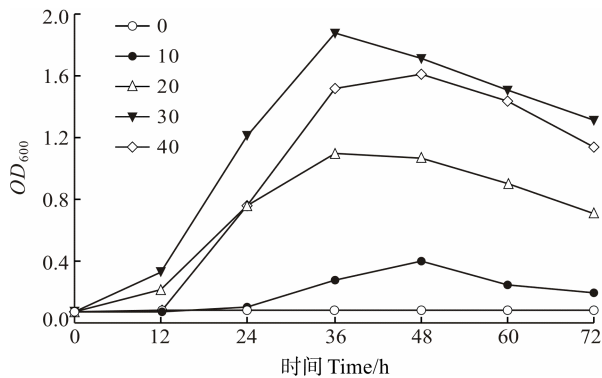


图 7 不同盐度条件下菌株 201107290102 的生长曲线 Fig.7 The growth of strain 201107290102 at different salinities

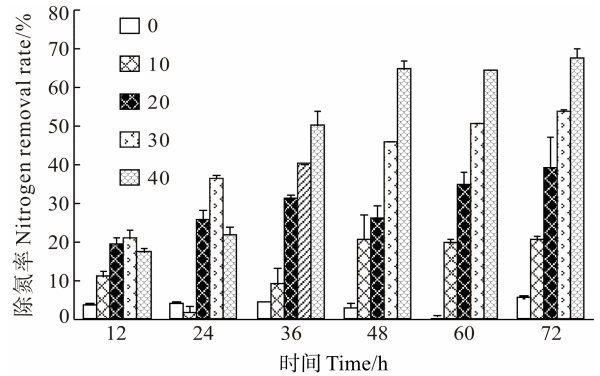


图 8 不同盐度对菌株 201107290102 去除亚硝酸盐效果的影响

Fig.8 The effects of salinity on the nitrogen removal by strain 201107290102

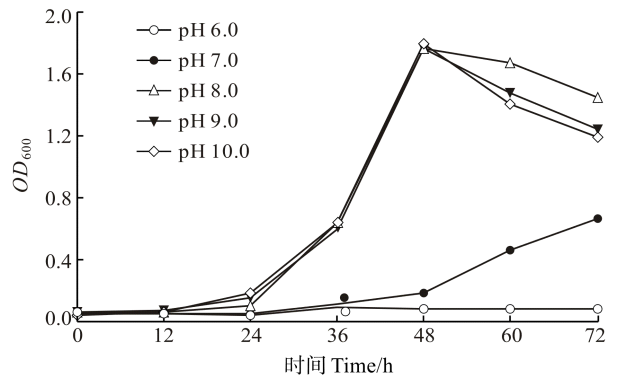


图 9 不同初始 pH 条件下菌株 201107290102 的生长曲线 Fig.9 The growth of strain 201107290102 at different initial pH

该菌株 24 h 后便进入 12 h 的对数增长期。在 pH 为 7.0 的条件下 48 h 才进入对数增长期。

对亚硝酸盐去除效率的结果表明,在初始 pH 范围内,该菌各生长阶段对亚硝酸盐的去除率均随初始 pH 的升高而增大(图 10),最高去除率达(78.08±3.11)%。

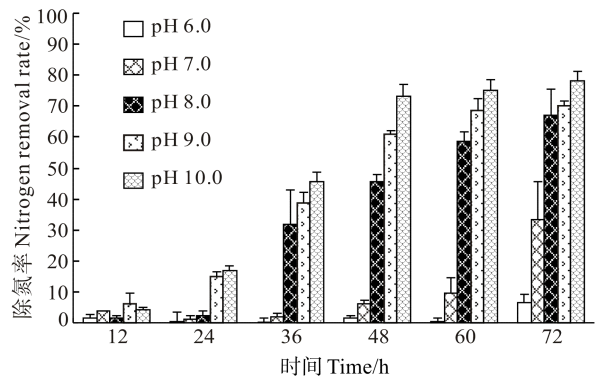


图 10 不同初始 pH 对菌株 201107290102 去除亚硝酸盐效果的影响

Fig.10 The effects of initial pH on the nitrogen removal by strain 201107290102

3 讨论

近年来利用微生物降解养殖水体中由于残饵、粪便等积累的亚硝酸盐,已被广泛认可为最具效果的方法之一(吴美仙等, 2008; 陈薇等, 2012; 王加鹏等, 2014)。异养型硝化细菌具有生长繁殖快、较强的环境适应能力等特点,使其成为降解养殖水体中有害亚硝酸盐的主要菌群(李焱生等, 2010; 潘丹等, 2011)。本研究筛选出一株能有效降解亚硝酸氮的菌株 201107290102, 该菌株可以在以亚硝酸盐为唯一氮源的培养基中生长, 根据菌株细胞及菌落形态以及 16S rRNA 序列分析结果初步鉴定为美丽盐单胞菌。

C/N 是异养微生物生长繁殖的重要影响因素, 细菌细胞中的 C/N 为 5 (Tupas *et al*, 1990)。本研究中美丽盐单胞菌在 C/N 为 15-20 条件下生长最好, 这与 Avinimelech (1999) 的 C/N 要达到 10 以上的观点相一致。本研究表明, C/N 同样是影响细菌对亚硝酸盐的去除效果的重要因素。另有研究表明, 巨大芽孢杆菌和假单胞菌分别在氮源和碳源一定的条件下, 对亚硝酸盐的降解率均随 C/N 升高而升高(熊焰等, 2010; 陈薇等, 2011)。而本研究显示, 美丽盐单胞菌对亚硝酸盐的最适去除 C/N 为 15, 去除效率随 C/N 升高呈先升高后下降的趋势。

养殖水环境的温度对水中微生物的生长和代谢起至关重要的作用。王昌禄等(2008)研究显示, 串珠菌 W53 在 30℃ 和 37℃ 条件下亚硝酸盐去除效果最佳, 温度过低会影响其去除效率。而温度过高或过低均不利于亚硝酸盐的去除(李焱生等, 2010; 熊焰等, 2010; 陈薇等, 2011)。温度主要影响微生物体内各种酶的活性, 从而影响其生长与代谢(李焱生等, 2010)。Vadivelu 等(2007)认为, 在整个硝化过程中亚硝酸氧化还原酶对亚硝酸盐的转化起关键作用, 而酶的活性在温度高于或低于最适温度均会受到抑制。本研究中, 美丽盐单胞菌 201107290102 在 37℃ 时呈现出最高的生长和去除亚硝酸盐能力。

pH 和盐度是异养微生物降解亚硝酸盐的重要影响因素(王昌禄等, 2008; 孙雪梅等, 2012)。有研究表明, 沼泽红假单胞菌在 pH 7.0 的条件下对亚硝酸盐降解效率最高(陈燕红等, 2010); 而刘法佳等(2012)的研究发现, 3 株乳酸菌降解亚硝酸盐的最适 pH 为 5.5, pH 升高, 降解亚硝酸盐效率受到抑制。本研究筛选出的盐单胞菌更适合养殖水体的中性和偏碱性环境。刘法佳等(2012)的研究表明, 3 株乳酸菌在低盐度条件下对亚硝酸盐的降解没有显著差异, 而高盐度可抑制其降解亚硝酸盐活性。陈燕红等(2010)的研

究也表明, 较高的盐度会抑制沼泽红假单胞菌对亚硝酸盐的降解活性。而本研究表明, 盐度过低会大大削弱美丽盐单胞菌 201107290102 的亚硝酸盐降解率, 其在 NaCl 浓度为 0 的培养基中不能降解亚硝酸盐, 这可能是在过低或无盐的环境中, 该菌株细胞壁容易破裂所致(张培玉等, 2009)。

本研究筛选出的盐单胞菌 201107290102 耐盐、耐碱, 对凡纳滨对虾生物絮团养殖池中的亚硝酸盐有良好的去除效果, 其最适条件为 C/N=15、温度 37℃、初始 pH 10.0、盐度 40。在该条件下, 亚硝酸盐最高去除率可达 91.7%。

参 考 文 献

- 王会聪, 曹海鹏, 何珊, 等. 一株养殖水体中亚硝酸盐去除菌的鉴定及其去除条件. 微生物学通报, 2012, 39(2): 154-161
- 王李宝, 万夕和, 徐献明, 等. 四株异养硝化细菌的鉴定及硝化能力的初步研究. 水产养殖, 2006, 27(2): 7-10
- 王昌禄, 隋志文, 武晋海, 等. 亚硝酸盐降解菌的分离及其降解特性. 中国酿造, 2008(9): 33-36
- 王加鹏, 崔正国, 周强, 等. 人工湿地净化海水养殖外排水效果与微生物群落分析. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 1-9
- 刘民, 王贺勤, 王百威. 鱼虾 NO₂-N 中毒的综合治疗. 河北渔业, 2008(4): 36
- 刘法佳, 吴燕燕, 李来好, 等. 降解咸鱼中亚硝酸盐的乳酸菌降解特性研究. 广东农业科学, 2012(1): 94-97
- 孙雪梅, 李秋芬, 张艳, 等. 一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性. 微生物学报, 2012, 52(6): 687-695
- 刘德生, 史彩华, 李志新. 降解养殖水体亚硝酸盐的研究进展和前景分析. 现代农业科学, 2009, 16(4): 14-15
- 李波, 樊启学, 张磊, 等. 不同溶氧水平下氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的急性毒性研究. 淡水渔业, 2009, 39(3): 31-35
- 李焱生, 卫民, 张艾晓, 等. 一株异养型亚硝酸盐氧化细菌的分离及其降解特性的研究. 生物技术通报, 2010(5): 196-202
- 李秋芬, 孙雪梅, 张艳, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌株 X3 的环境适应性. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 120-125
- 陈燕红, 杨子红, 喻国辉, 等. 光照、氧气、pH 和盐度对沼泽红假单胞菌 2-8 菌株生长和亚硝酸盐消除的影响. 南方水产, 2010, 6(4): 1-5
- 陈瑞芳, 徐长安, 刘丽梅, 等. 一株假单胞菌的亚硝酸盐降解特性及其对鱼池底泥的净化作用. 海洋科学, 2011, 35(6): 30-34
- 陈薇, 丁祥力, 贺月林, 等. 亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性. 环境科学与技术, 2011, 34(12H): 37-41
- 陈薇, 刘清术, 许丽娟, 等. 两株以亚硝态氮为氮源的异养硝化细菌的分离及鉴定. 生命科学研究, 2012, 16(6): 489-495
- 杨世平, 邱德全. 对虾高密度养殖过程中水质的周期变化与分析. 水产科学, 2006, 25(9): 459-462
- 吴美仙, 李科, 张萍华. 反硝化细菌及其在水产养殖中的应用.

- 浙江师范大学学报(自然科学版), 2008, 31(4): 467-471
- 张莹, 刘萍, 孙君, 等. 巨大芽孢杆菌发酵降解亚硝酸盐动力学研究. 中国酿造, 2011(10): 24-28
- 张培玉, 郭艳丽, 丁德爽, 等. 一株轻度嗜盐反硝化细菌的分离鉴定和反硝化特性初探. 微生物学通报, 2009, 36(4): 581-586
- 胡修贵, 赵培, 李玉宏. 生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 97-103
- 廖国礼. 养殖水体亚硝酸盐的危害与应对措施. 海洋与渔业, 2006(11): 32-33
- 熊焰, 刘力源, 罗睿, 等. 1株亚硝酸盐降解菌的筛选、鉴定、降解条件及效果. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1264-1271
- 潘丹, 黄巧云, 陈雯莉. 两株异养硝化细菌的分离鉴定及其脱氮特性. 微生物学报, 2011, 51(10): 1382-1389
- Avinimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 1999, 176: 227-235
- Sattler KJ, Herrmann J, Yün S, *et al.* High high-density lipoprotein-cholesterol reduces risk and extent of percutaneous coronary intervention-related myocardial infarction and improves long-term outcome in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. Eur Heart J, 2009, 30(15): 1894-1902
- Tupas L, Koike I. Aminoacid and ammonium utilization by heterotrophic marine bacteria grown in enriched seawater. Limnol Oceanogr, 1990, 35(5): 1145-1155
- Vadivelu VM, Keller J, Yuan Z. Effect of free ammonia on the respiration and growth processes of an enriched Nitrobacter culture. Water Research, 2007, 41(4): 826-834

(编辑 冯小花)

The Isolation, Identification and Analysis of a Nitrogen-Removing Bacterium Strain from Shrimp Farming Pond Using Bio-Floc Technology

WANG Zhijie^{1,2}, HU Xiugui^{1,2}, LIU Xuya^{1,2}, SONG Xiaoling^{2,3}, MA Shen¹, HUANG Jie^{2,3}^①

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract In a high density farming pond, the concentration of nitrite is often much higher than standard due to the excessive release of waste from feeding, breeding, and water pollutions. High nitrite is a prominent harmful factor in aquaculture. It can facilitate the growth of pathogenic bacteria, increase the stress for fishes and shrimp, render them prone to bacterial infection, and consequently lead to disease breakout. Nitrogen-removing has been widely recognized as an effective method to degrade nitrite in the water which comes from food residual and feces. An efficient nitrogen-removing bacterium strain, 201107290102, was isolated from the bio-floc in a shrimp farming pond. It was preliminarily identified as *Halomonas venusta* because 16S rRNA sequence analysis revealed that it shared 99% similarity in sequence with *H. venusta*. We next studied factors that determined the nitrogen-removing efficiency of this strain, including C/N ratio, temperature, initial pH and salinity. The optimal conditions were: C/N ratio 15, temperature 37 °C, salinity 40, initial pH 10.0. Under the optimal conditions, the nitrogen-removing efficiency could be up to 91.7%. These results suggested that the strain 201107290102 could effectively degrade the nitrite. Our study provided a new tool for improving the bio-floc in shrimp culture.

Key words Nitrite; Removal; *Halomonas* sp.; Bio-floc

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn