

黄河三角洲滨海湿地非培养放线菌多样性

冯鸽 许姗姗 王超 严立恩 张璇 李静*

(中国海洋大学 海洋生命学院 微生物实验室 山东 青岛 266003)

摘要: 【目的】利用免培养技术对黄河三角洲滨海湿地土壤中放线菌多样性进行分析。

【方法】提取样品总 DNA, 利用放线菌门特异引物扩增放线菌 16S rRNA 基因序列, 构建放线菌 16S rRNA 基因克隆文库, 文库经 RFLP 分析后挑选代表序列测序并进行多样性指数分析和系统发育分析。【结果】构建的放线菌 16S rRNA 基因克隆文库覆盖率(C)为 96.3%, 116 个测序序列可化分为 46 个 OTUs, 58.7% 的 OTUs (27 个) 存在于放线菌亚纲 (Actinobacteridae) 放线菌目 (Actinomycetales) 的 7 个亚目中, 分布于 10 个科中, 其中弗兰克氏菌亚目 (Frankineae) 最多, 共 7 个 OTUs, 有 30.4% 的 OTUs (14 个) 存在于酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae) 醋微菌亚目 (Acidimicrobineae) 中, 没有发现与红色杆菌亚纲 (Rubrobacteridae) 和科里氏杆菌亚纲 (Coriobacteridae) 亲缘关系较近的序列。有 10.9% 的 OTUs 序列与有效发表的所有类群无亲缘关系, 在进化树上成为一个独立的进化分支, 有可能代表新亚目或更高级分类单元的类群。【结论】黄河三角洲滨海湿地蕴含着丰富的放线菌物种多样性及潜在的放线菌新类群, 具有深一步研究的价值。

关键词: 黄河三角洲湿地, 放线菌, 免培养, 多样性

基金项目: 山东省自然科学基金项目(No. ZR2010CM042); 青岛市应用基础研究计划项目[(No. 12-1-4-1-(22)-jch)]

*通讯作者: Tel: 86-532-82032266; 信箱: lijing313@ouc.edu.cn

收稿日期: 2012-12-30; 接受日期: 2013-04-09

Actinobacterial diversity in a coastal wetland of the Yellow River Delta revealed by culture-independent approach

FENG Ge XU Shan-Shan WANG Chao YAN Li-En ZHANG Xuan LI Jing*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: [Objective] Using culture-independent method to analyze the diversity of actinomycetes from Yellow River Delta coastal wetland. [Methods] Actinobacterium-specific 16S rRNA gene clone library was constructed. Representative clones selected based on the RFLP analysis were sequenced and placed into operational taxonomic unit (OTU) groups according to the 16S rRNA sequence similarity. Diversity statistics were analyzed using SPADE analysis software. [Results] 324 sequences were placed into 46 OTUs. 58.7% of the OTUs belonged to Actinobacteridae and 7 suborders of Actinomycetales. The dominant actinobacteria was Frankineae, which accounted for 7 OTUs. 30.4% of the OTUs belonged to subclass Acidimicrobiales and suborder Acidimicrobiales. 10.9% of the OTUs shared no close relationship with published sequences. Some sequences which formed a distinct clade in phylogenetic tree may represent new taxonomical groups of actinomycetes. [Conclusion] Yellow River Delta coastal wetland harbors abundant and diverse actinomycetes. The result also implied that there may be large numbers of unknown actinobacterial groups.

Keywords: Yellow River Delta wetland, Actinomycetes, Culture-independent, Diversity

放线菌作为微生物中的一大特殊类群, 广泛分布在各种生境当中, 可以产生胞外酶分解多样蛋白质和脂类, 参与有机物质的分解和异养营养循环。放线菌也是抗生素和其他类药物的主要来源, 特殊生境中的放线菌在长期适应过程中可调整其次级代谢过程, 可以产生结构新颖、活性独特的次级代谢产物, 是重要的微生物资源之一。黄河三角洲是我国暖温带保存最完整、最广阔、最年轻的湿地生态系统, 是一个典型的滨海河口湿地^[1], 生物资源多样性高、种群数量大^[2], 特殊的地理位置导致滨海湿地地表蒸发加快, 海水入侵、黄河断流更是直接影响了湿地生态系统淡水水源的补给, 破坏了滨海湿地土壤中水盐的平衡, 使土壤含盐量

上升, 加剧了土壤盐碱化程度^[3-4]。在滨海湿地中海陆交互、物质梯度变化的特殊环境中, 可能具有与陆地和海洋不同的放线菌群落、生态分布以及功能基因资源。16S rRNA 基因文库技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性, 目前广泛应用于放线菌群落遗传多样性和动态分析中^[5,7]。因此, 本研究利用 16S rRNA 基因文库技术及系统发育分析对黄河三角洲滨海湿地土壤中放线菌物种多样性和系统发育多样性进行分析, 了解滨海湿地的放线菌多样性及群落结构, 为后续放线菌的纯培养提供信息指导, 为我国北部滨海湿地放线菌资源的开发和有效利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:在黄河三角洲国家湿地保护区采集土壤样品,采样点编号 BZ10, 盐生植物柽柳浅层根土,地理坐标为 38°26'N, 117°86'E。DY14, 盐碱地深层泥样,地理坐标为 37°87'N, 119°09'E。DY40, 海滩泥样,地理坐标为 37°45'N, 经度: 118°92'E。样品采集后放于无菌袋中 4 °C 保存, 运回实验室后于-20 °C 保存。

1.1.2 主要的试剂和仪器:Gel Extraction Kit (QIAGEN), 胶回收试剂盒(OMEGA), pMD19-T Vector (TaKaRa), 蛋白酶 K (Proteinase K, MD bio inc), 溶菌酶(Lysozyme, MD bio inc), PCR Mix (TAGEN), DNA Marker (TAGEN), 其他生化试剂均为国产分析纯。凝胶成像仪、电泳仪、PCR 扩增仪(Bio-Rad)。

1.2 样品可溶性总盐和 pH 的测定

样品的可溶性总盐采用残渣烘干法^[8], pH 的测定采用电位法^[9]。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 土样总 DNA 的提取:采用 SDS-CTAB-溶菌酶法^[10-11]提取土壤总 DNA。

1.3.2 PCR 扩增:应用放线菌特异性引物对土壤总 DNA 进行 PCR 扩增, 引物序列为 S-C-Act-235-a-S-20: 5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3' 和 S-C-Act-878-a-A-19: 5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3', PCR 反应条件参照 Stach 等^[12]方法进行, 扩增体系为 50 μ L, 扩增片段大小约 640 bp。然后将目的条带按照 OMEGA 胶回收试剂盒的说明对 PCR 产物进行纯化处理。

1.4 克隆文库构建及系统发育分析

1.4.1 克隆文库的构建:纯化 DNA 产物通过 T4 连接酶与 pMD19-T 载体连接, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。将转化产物涂布在含有氨苄

青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上, 随机挑取白色克隆子培养, 用 M13 载体引物进行阳性验证, 并构建克隆文库。PCR 扩增出插入的放线菌 16S rRNA 基因片段后 *Hha* I 和 *Hae* III 双酶切 3 h, 选取酶切带型不同的重组子送到上海博尚生物有限公司进行测序。

1.4.2 系统发育分析:根据测序结果, 用 BLAST 搜索程序从 GenBank 等公共数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 ClustalX^[13]进行多序列比对, 系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件^[14]采用邻接法(Neighbor-Joining)聚类分析, 并构建出系统进化树。定义克隆子同序列相似性小于 99% 的归为不同的分类单元, 克隆序列的相似性大于 99%的归类为同一个 OTU 为标准^[15], 用稀有度统计方法分析所构建的部分 16S rRNA 基因文库的稀有度曲线。

2 结果与分析

2.1 样品可溶性总盐和 pH 的测定

测定样品的可溶性总盐含量, 位点 DY14 的含量为 71.48 g/kg, 位点 DY40 的可溶性总盐含量为 20.47 g/kg, BZ10 为 14.64 g/kg。3 个位点土壤的 pH 值都呈弱碱性, DY40 的 pH 值为 8.50, BZ10 的 pH 值为 8.15, DY14 的 pH 值为 8.35。

2.2 克隆文库的构建和检验

用 SDS-CTAB-溶菌酶法提取样品总 DNA, 图 1A、B 显示, 该方法提取效果很好, 总 DNA 约在 20 kb 以上, 浓度较高。应用放线菌特异性引物扩增可获得约 640 bp 的目的条带(图 1C)。纯化 DNA 产物通过 T4 连接酶与 pMD19-T 载体连接, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。得到 180 个白色克隆, DY14 和 DY40 样品分别得到 152 和 175 个白色克隆。应用 M13 引物进行菌落

PCR, 扩增克隆子的插入序列, 排除假阳性克隆, 3 个样品分别获得 161、119 和 158 个放线菌阳性克隆。通过比较 *Hha* I 和 *Hae* III 双酶切图谱(图 2), 根据酶切带型 3 个文库共挑选 138 个克隆子进行测序。测序结果进行分析比对, 去除非放线菌序列, 共获得 324 个放线菌克隆序列, 分别归于 46 个不同的 OTU。

2.3 16S rRNA 基因文库多样性指数分析

用稀有度统计方法分析黄河三角洲滨海湿地宏基因组部分 16S rRNA 基因克隆文库的多样

性, Kemp 等^[16]的研究结果表明, 随着库容 (Library size) 的增大, OTUs 的数目总是在增加, 几乎没有哪一个文库能够穷尽样品中微生物的多样性。因此, 用稀有度曲线分析 16S rRNA 基因克隆文库, Coverage *C* 不可能达到 100%, 当稀有度曲线趋于平缓或者趋于平台期时也就可以认为库容已经足够。从得到的稀有度曲线(图 3)可以看出, 我们构建的文库曲线基本趋于平台期, 库容 (Library size) 已经足够, 涵盖了该样点的绝大多数物种。

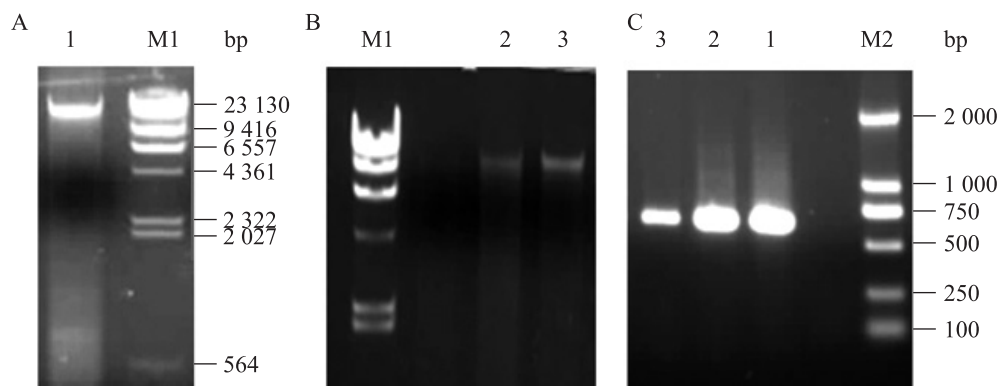


图 1 提取的总 DNA 及放线菌门特异引物扩增产物

Fig. 1 Genome DNA and Actinobacterium-specific 16S rDNA gene PCR

注: A, B: 提取的粗 DNA; C: 放线菌门特异引物 PCR 扩增产物. M1: λ DNA/*Hind* III 单切 DNA 分子量标准; M2: DNA 分子量标准 DL2000; 1–3: 样品 BZ10, DY14 和 DY40.

Note: A, B: Crude genomic DNA; C: Actinobacterial-specific PCR product. M1: λ DNA/*Hind* III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1–3: Samples BZ10, DY14 and DY40.

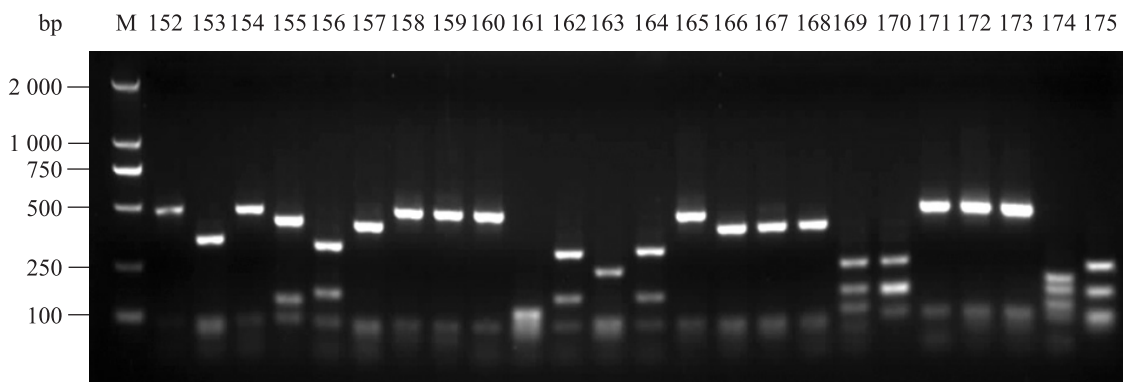


图 2 部分克隆插入片段的 RFLP 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of insert segment of clones RFLP analysis

注: M: DNA 分子量标准 DL2000; 152–175: 克隆子编号.

Note: M: DNA marker DL2000; 152–175: Number of clones.

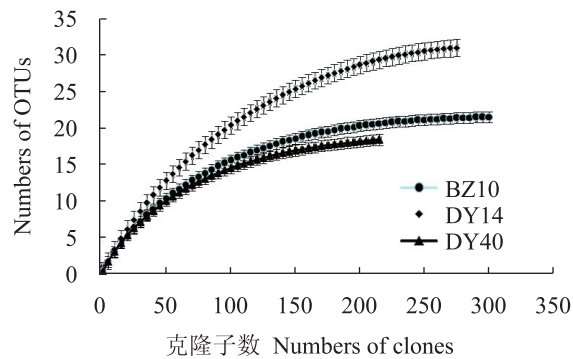


图3 黄河三角洲滨海湿地土壤放线菌克隆文库稀有度曲线

Fig. 3 Rarefaction curve for Yellow River Delta coastal wetland sediment sample

使用 SPADE (<http://Hchao.stat.nthu.edu.tw>)分析软件对文库多样性指数进行分析。结果如表 1, 在可信区间为 95%的情况下, 样品 BZ10 覆盖率(C)为 96.3%, DY14 为 91.2%、DY40 为 93.6%。样品 BZ10、DY14 和 DY40 的物种丰度(Species richness)分别为 27.7、36.3 和 21.8, 香农指数(Shannon index)分别为 2.314、2.943 和 1.847, 辛普森指数为(Simpson index)分别为 0.188 59、0.109 31 和 0.239 14。从实验结果中可以看出, 样品 DY14 所含的放线菌物种最丰富, 香农指数和辛普森指数也显示样品 DY14 的放线菌物种多样性最高。

2.4 16S rRNA 基因序列分析

对 BZ10 样品克隆序列进行同源比对分析表明, 这些序列代表的菌株大部分分布于放线菌门

的放线菌亚纲(Actinobacteridae)和酸微菌亚纲(Acidimicrobidae)。161 个克隆的分布情况见图 4, 放线菌亚纲中的 148 个克隆分布于弗兰克氏菌亚目(Frankineae)、棒杆菌亚目(Corynebacterineae)、假诺卡氏菌亚目(Pseudonocardineae)、动孢菌亚目(Kineosporineae)、链霉菌亚目(Streptomyceae)、微单孢亚目(Micromonosporineae)、丙酸杆菌亚目(Propionibacterineae) 和 微 球 菌 亚 目(Micrococcineae)等 8 个亚目中, 其中 28.3%的克隆位于微球菌亚目(Micrococcineae), 是该环境放线菌的优势菌; 其次是丙酸杆菌亚目(Propionibacterineae) 和 弗 兰 克 氏 菌 亚 目(Frankineae), 分别占到总克隆数的 19.7%和 16.5%, 是该环境中的中等数量类群; 动孢菌亚目(Kineosporiineae)最少, 仅 1 个克隆。有 7.9%的克隆分布于酸微菌亚纲(Acidimicrobidae)酸微菌亚目(Acidimicrobineae)中。

DY14 样品中, 酸微菌亚纲中酸微菌目有 47 个克隆, 占总克隆的 39.5%, 是该位点的优势菌群; 72 个克隆分布于放线菌亚纲中的 8 个亚目中, 其中丙酸杆菌亚目(Propionibacterineae)克隆数目最多, 占到总克隆数的 21.0%, 是该环境中的中等数量类群; 其次是微球菌亚目(Micrococcineae), 占总克隆数的 11.0%, 链霉菌亚目 (Streptomyceae) 、 微 单 孢 亚 目 (Micromonosporineae) 、 放 线 菌 亚 目 (Actinomycineae)克隆数目最少, 均只有 3 个克隆。

表 1 克隆文库放线菌多样性指数							
Table 1 Diversity index of the actinobacterial clone library							
Sample	Number of OTUs	Species richness		Shannon index		Simpson index	
		ACE-1	95% CIs	Chao&Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
BZ10	23	27.7	(21.5, 44.6)	2.314	(2.057, 3.140)	0.188 59	(0.122 14, 0.258 35)
DY14	34	36.3	(31.1, 52.6)	2.943	(2.241, 2.740)	0.109 31	(0.068 36, 0.219 54)
DY40	17	21.8	(16.5, 38.1)	1.847	(1.246, 2.530)	0.239 14	(0.041 06, 0.116 12)

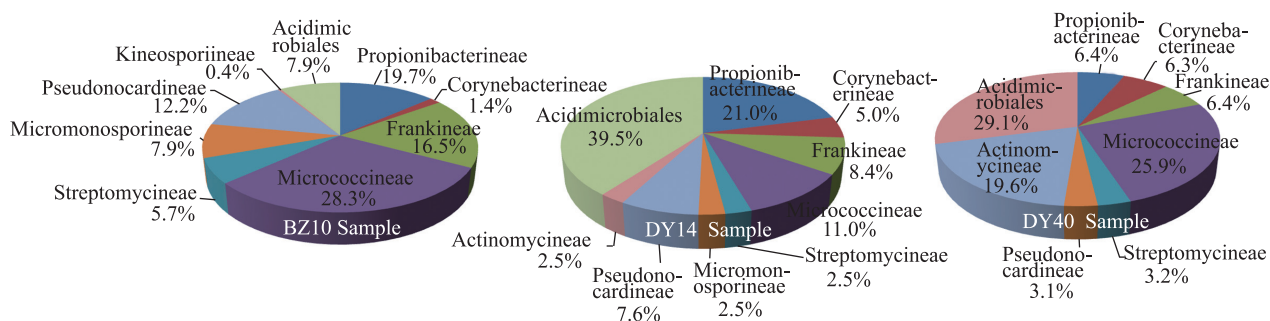


图 4 3 个样品的放线菌克隆序列分布比例

Fig. 4 Actinobacterial clones distribution of three samples

在 DY40 样品中, 酸微菌亚纲中的酸微菌目有 46 个克隆, 占到总克隆数的 29.1%, 是该位点的优势菌群; 112 个克隆分布于放线菌亚纲中的 7 个亚目中, 其中 25.9% 的克隆位于微球菌亚目(Micrococccineae), 是该环境中的中等数量类群; 其次是放线菌亚目(Actinomycineae), 占到总克隆数的 19.6%, 假诺卡氏菌亚目(Pseudonocardineae)数目最少, 仅 1 个克隆。3 个位点中均没有发现与红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae)和科里氏杆菌亚纲(Coriobacteridae)亲缘关系较近的序列。

3 个样品的克隆序列可归为 46 个不同的 OTUs, 将每个 OTU 选取一条代表序列与 GenBank 数据库和 EzBioCloud 数据库中已知放线菌类群的有效序列进行比对, 构建系统发育树(图 5)。有 58.7% 的 OTUs (27 个)存在于放线菌亚纲(Actinobacteridae)放线菌目(Actinomycetales)中, 分属于弗兰克氏菌亚目(Frankineae)、棒杆菌亚目(Corynebacterineae)、假诺卡氏菌亚目(Pseudonocardineae)、链霉菌亚目(Streptomycineae)、微单孢亚目(Micromonosporineae)、丙酸杆菌亚目(Propionibacterineae)和微球菌亚目(Micrococccineae)等 7 个亚目中, 共包括地嗜皮菌科(Geodermatophilus)、假诺卡氏菌菌科

(Pseudonocardineae)、动孢囊菌科(Kineosporiaceae)、链霉菌科(Streptomycetaceae)、微单孢菌科(Micromonosporaceae)、拟诺卡氏菌科(Nocardioipsaceae)、微球菌科(Micrococccaceae)、棒杆菌科(Corynebacteriaceae)和微杆菌科(Microbacteriaceae)等 10 个科, 其中弗兰克氏菌亚目和微球菌亚目包含的 OTUs 最多, 分别是 7 和 6 个 OTUs。有 30.4% 的 OTUs (14 个)存在于酸微菌亚纲(Acidimicrobiales)酸微菌亚目(Acidimicrobineae)中, 没有发现与红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae)和科里氏杆菌亚纲(Coriobacteridae)亲缘关系较近的序列。有 10.9% 的 OTUs 序列与有效发表的所有类群无亲缘关系, 在进化树上成为一个独立的进化分支, 有可能代表新亚目或更高级分类单元的类群。46 个 OTUs 序列的同源性分析结果表明, 黄河三角洲滨海湿地土壤中有着丰富的放线菌种群多样性, 亟待研究者去开发和利用。

3 讨论

特殊环境中的放线菌在长期的适应过程中, 会产生特殊的代谢机制和环境适应模式, 有可能产生丰富的物种多样性和独特的活性次级代谢产物, 因此成为重要的微生物资源。目前针对海洋(深海)^[17]、南北极^[18]或盐碱环境^[19-20]中

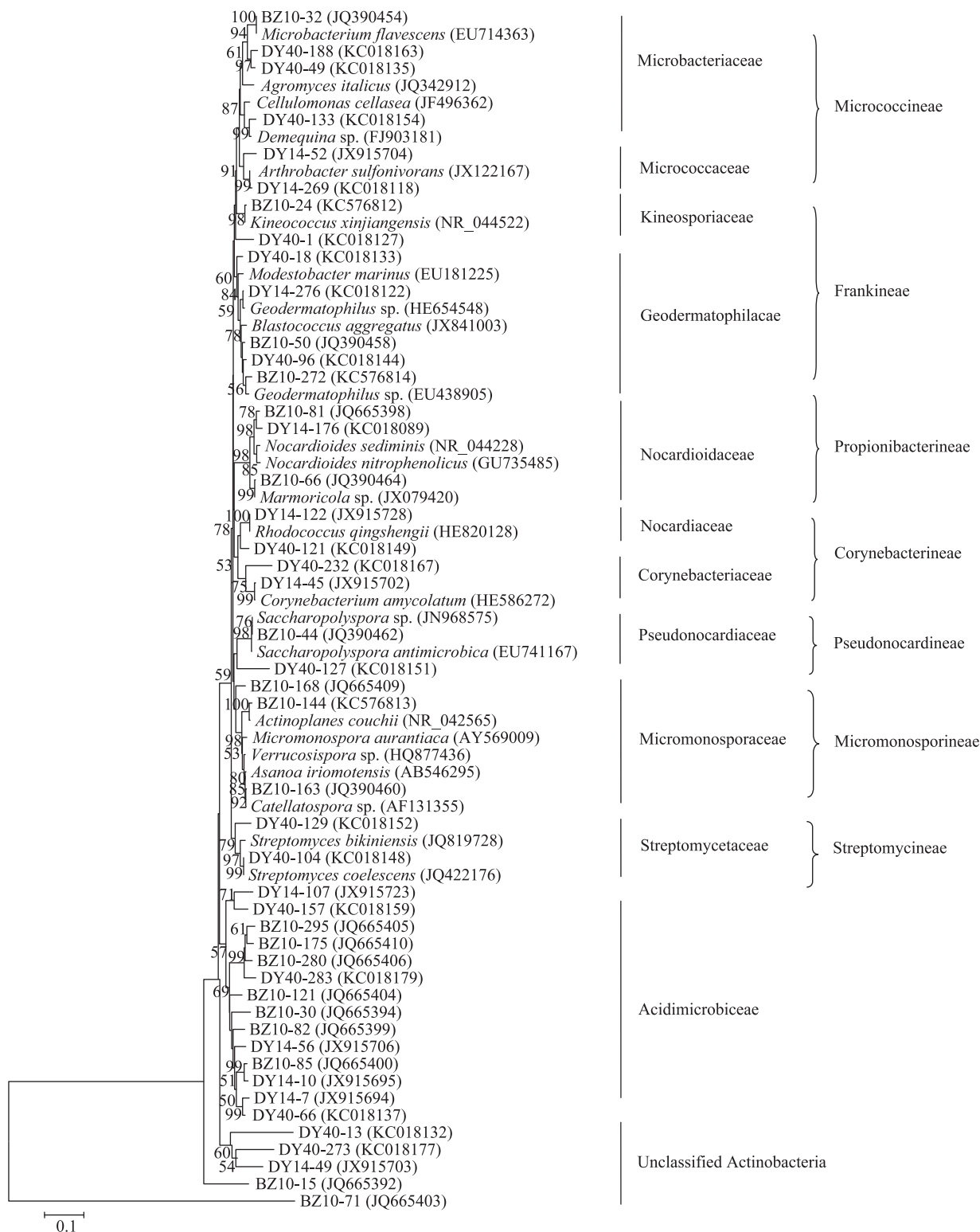


图 5 BZ10 黄河三角洲滨海湿地中放线菌类群的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 5 16S rDNA phylogenetic tree based on the partial clone sequences (640 bp) obtained from the sediment sample BZ10 and their closely related sequences downloaded from GenBank

Note: All of bootstrap values over 50 are shown based on Neighbour-Joining analyses of 1 000 resamples data sets.

放线菌资源的研究方兴未艾, 位于我国南部的红树林湿地环境中的放线菌多样性和生物地理分布特征研究也多有报道^[21]。黄河滨海湿地是我国北部最大的滨海湿地, 蕴含着丰富的微生物资源^[22], 在已报道的关于微生物群落结构和分布的研究中, 也发现放线菌的广泛分布^[23-25]。但目前尚未见从纯培养或免培养角度对放线菌在黄河三角洲湿地土壤中的生态分布、种群多样性和遗传多样性的研究报道。本研究利用 16S rRNA 基因文库技术首次对黄河三角洲湿地土壤中放线菌的分布和多样性进行了初步分析, 有 58.7% 的 OTUs 存在于放线菌目(Actinomycetales)中的弗兰克氏菌亚目(Frankineae)和微球菌亚目(Micrococcineae)等 7 个亚目中, 共包括 10 个科, 其中弗兰克氏菌亚目最多, 共 7 个 OTUs。有 30.4% 的 OTUs (14 个)存在于酸微菌亚纲(Acidimicrobiae)酸微菌亚目(Acidimicrobinae)中, 没有发现与红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae)和科里氏杆菌亚纲(Coriobacteridae)亲缘关系较近的序列。

本研究的结果显示, 黄河三角洲滨海湿地不同的地理位置, 放线菌物种多样性表现出较大的差异。有研究发现放线菌亚纲是盐环境放线菌的主要类群, 在酸微菌亚纲也有少量分布^[19,26], 本实验中的 BZ10 样品采自盐生植物的浅层根土, 放线菌克隆序列也多数分布在放线菌亚纲中, 少量分布在酸微菌亚纲中, 而且优势菌也分布于微球菌亚目, 与上述几个盐环境的研究结果一致, 但放线菌的多样性更加丰富, 在放线菌亚纲的 10 个科中都有分布, 研究人员在硝尔库勒盐湖沉积物中发现有 52.9% 的克隆序列分布于放线菌亚纲的 5 个亚目的 7 个科中^[26], 在艾丁湖沉积物中放线菌分布于放线菌亚纲的 7 个亚目^[19]。DY14 样品为盐碱地深层泥样,

是 3 个样品中可溶性总盐含量最高的, 与 BZ10 样品明显不同的是, 该位点的优势菌群为酸微菌目, 占总克隆的 39.5%; 放线菌亚纲中, 丙酸杆菌亚目(Propionibacterineae)克隆数目最多, 占到总克隆数的 21.0%。DY10 样品采自海滩潮间带, 是 3 个样品中 pH 值最高的, 可溶性总盐含量比 BZ10 稍高, 该位点的优势菌群与 DY14 样品相同, 也是酸微菌目, 但比例稍低, 占总克隆的 29.1%, 放线菌亚纲中, 25.9% 的克隆位于微球菌亚目(Micrococcineae), 是该环境中的中等数量类群。这两个地点的放线菌类群分布与已有报道的盐湖或盐场环境中的分布有很大不同, 此外, 与典型盐湖环境的研究不同的是, 在这 3 个代表样品中均没有发现发现与红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae)和科里氏杆菌亚纲(Coriobacteridae)亲缘关系较近的序列。上述研究结果显示, 黄河三角洲滨海湿地蕴含着独特的放线菌群落结构。我们初步推断, 黄河滨海湿地不同地理位置的放线菌类群多样性差异与可溶性总盐的含量有一定关系, 由于本研究仅测定了样品中可溶性总盐的含量, 样品中几种主要离子成分钠离子、镁离子、钾离子以及氯离子和硫酸根离子等的比例没有测定, 放线菌类群多样性(包括纯培养的结果)差异的主要原因有待于课题组后面进行更深入的研究和分析。

黄河三角洲滨海湿地是我国暖温带最广阔、最年轻的滨海湿地, 原生性保持最好, 且该区域土壤盐渍化严重, 土壤含盐量较高, 再加上受到海陆共同作用的影响, 发展成为一个独特的生态环境, 其中蕴含的微生物资源远未被开发, 我们的研究结果表明黄河三角洲滨海湿地蕴含着丰富的放线菌系统发育多样性及新的放线菌类群, 有重要的研究价值, 本研究利用 16S rRNA 基因文库技术得到的反映黄河三角洲滨海湿地

原位菌群组成的客观信息,可为后期放线菌的选择性分离提供一定的科学指导,研究对于有效开发利用黄河三角洲滨海湿地特殊环境放线菌资源有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 张晓龙,李培英,李萍,等. 中国滨海湿地研究现状与展望[J]. 海洋科学进展, 2005, 23(1): 87-95.
- [2] 张晓龙,李培英,刘月良,等. 黄河三角洲湿地研究进展[J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 81-85.
- [3] 陈为峰,周维芝,史衍玺. 黄河三角洲湿地面临的问题及其保护[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(4): 499-502.
- [4] Cui BS, He Q, Zhao XS. Ecological thresholds of *Suaeda salsa* to the environmental gradients of water table depth and soil salinity[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(4): 1408-1418.
- [5] 夏占峰,关统伟,阮继生,等. 艾丁湖沉积物放线菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(8): 1023-1031.
- [6] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 6189-6200.
- [7] Song ZQ, Zhi XY, Li WJ, et al. Actinobacterial diversity in hot springs in Tengchong (China), Kamchatka (Russia), and Nevada (USA)[J]. Geomicrobiology Journal, 2009, 26(4): 256-263.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 31-37.
- [9] 朱华,来航线,傅艳萍,等. 青海渔水河嗜盐耐盐放线菌的初步研究[J]. 干旱地区农业研究, 2009, 27(1): 233-236.
- [10] Zhou JZ, Mary AB, James MT. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [11] Colin RJ, Jenneifer PH, Dache W, et al. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples[J]. Applied Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4993-4995.
- [12] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, et al. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(10): 828-841.
- [13] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [15] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(10): 6189-6200.
- [16] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rRNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177.
- [17] 田新朋,张偲,李文均. 海洋放线菌研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 161-169.
- [18] 王毓舒,曾倩,俞勇,等. 北极海洋放线菌 R-527F 的抗菌活性筛选、鉴定及其抗菌物质合成条件研究[J]. 极地研究, 2012, 24(1): 8-14.
- [19] 夏占峰,关统伟,阮继生,等. 艾丁湖沉积物放线菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(8): 1023-1031.
- [20] 张永光,唐蜀昆,李文均,等. 嗜碱放线菌生理学特性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 30-35.

- [21] Hong K, Gao AH, Xie QY. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. *Marine Drugs*, 2009, 7(1): 24–44.
- [22] 刘芳, 叶思源, 汤岳琴, 等. 黄河三角洲湿地土壤微生物群落结构分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(5): 691–696.
- [23] 陈为峰, 史衍玺. 黄河三角洲新生湿地不同植被类型土壤的微生物分布特征[J]. *草地学报*, 2010, 18(6): 859–864.
- [24] 田家怡, 李甲亮, 陈印平, 等. 黄河三角洲外来入侵物种米草对底泥微生物群落的影响[J]. *海洋湖沼通报*, 2009(4): 157–162.
- [25] 王震宇, 辛远征, 李锋民, 等. 黄河三角洲退化湿地微生物特性的研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(5): 1005–1012.
- [26] 关统伟, 吴晋元, 职晓阳, 等. 硝尔库勒湖沉积物中非培养放线菌多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(7): 851–856.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc(x)格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *ns*p14 基因的克隆和表达[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2013-00-00; 接受日期: 2013-00-00

(下转 p.1598)