

两种包装市售冷却牛肉中微生物多样性的比较分析

李正堂 李柏林 赵勇 欧杰*

(上海海洋大学食品学院 上海 200090)

摘要: 本文比较分析了相同销售条件下的未包装冷却牛肉与保鲜膜包装冷却牛肉中的微生物群落结构。采用 16S rDNA 的 V3 区片段进行 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳), 同时利用 16S rDNA 全长序列, 通过克隆文库技术对两个样品的微生物群落结构进行研究。研究发现: 微生物群落结构表现出较大的差异。保鲜膜包装冷却牛肉共有 6 个 OTU (Operational Taxonomic Unit), 主要为 *Lactococcus*(乳球菌属, 28%), *Lactobacillus*(乳杆菌属, 26%), *Carnobacterium*(肉品杆菌属, 18%)和 *Brochothrix*(索丝菌属, 10%); 未包装冷却牛肉则共得到 18 个 OTU, 主要是 *Lactococcus*(乳球菌属, 28%), *Brochothrix*(索丝菌属, 18%)和 *Acinetobacter*(不动杆菌属, 11%)。结果表明, 保鲜膜包装对于葡萄球菌属以及冷杆菌属等一些细菌都起到了一定的抑制作用。本研究为肉类加工生产中微生物的控制提供一定的理论依据。

关键词: 冷却牛肉, 16S rDNA 克隆文库法, PCR-DGGE, 微生物群落结构

The Comparative Analysis of Microorganism Diversity in Two Kinds of Packaged Chilled Beef on Sale

LI Zheng-Tang LI Bai-Lin ZHAO Yong OU Jie*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: This research is for the purpose of comparative analysis of the microbial flora structure in the chilled beef with no packing and cling film, which under the same terms of sale. It was used the V3 area fragment of 16S rDNA to carry on PCR-DGGE, Meanwhile used the 16S rDNA sequence to analysis the microbial flora structure of the two samples, according to the technology of clone. The research discovered that the flora structure displays a biggish difference; there was 6 OTU in the chilled beef with cling film, mainly was that *Lactococcus*(28%), *Lactobacillus* (26%), *Carnobacterium*(18%) and *Brochothrix* (10%); but there was 18 OTU in the chilled beef with no packing, mainly was that *Lactococcus*(28%), *Brchothrix*(18%), *Acinetobacter* (11%). The result indicates that cling film played a certain inhibitory action regarding the *Staphylococcus* as well as the cold pole bacteria and such bacterium. And it can provide a certain theory basis for the meat processing in the department of microorganism's control.

Keywords: Chilled beef, 16S rDNA clone library analysis, PCR-DGGE, Microbial flora structure

肉类食品作为人类膳食获取营养成分的主要来源之一,其安全性和稳定性至关重要,冷却肉作为未来生鲜肉消费的主流,含有丰富的营养成分,但是却容易在加工贮藏、运输及销售过程中受微生物污染而导致其腐败变质,虽然大多数微生物在低温冷藏过程生长被抑制,但仍有大量嗜冷菌在此环境中生长繁殖^[1,2]。另外采用不同的包装方式也将对冷却肉中微生物的构成有着重要影响,因此弄明白冷却肉中菌群的构成具有重要的意义。国外已有不少冷却肉中腐败微生物的分析报道^[3,4],国内对于冷却牛肉中微生物的菌相构成,报道则很少,罗欣等^[5]曾报道过冷却牛肉中假单胞菌为优势菌种,并不同程度的存在乳酸菌和酵母菌等,但是这些研究多停留在纯培养的方法上。

本研究的主要目的在于利用分子生态学的方法初步了解超市销售环节中的未包装冷却牛肉和保鲜膜包装的冷却牛肉中主要的微生物菌群分布情况,从而进一步为微生物风险评估诸如预测预报模型的开发、群体感应效应的研究、肉类加工生产中危害点的确定等提供一定的理论依据,最终达到对产品质量的控制,促进其健康发展。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2007年11月购自上海某大型超市某品牌未包装冷却牛肉和保鲜膜包装冷却牛肉。

1.2 主要试剂和仪器

用于PCR扩增的全套试剂及扩增引物均购于上海生工生物工程技术服务有限公司; Biospin 细菌基因组DNA提取盒和回收盒均购于 Biospin; pGEM-T Easy 载体; DH5 α 感受态细胞等连接转化所用全套试剂购自 Promega 公司; Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR 仪。

1.3 DNA 的提取

参照文献^[6]的方法选用 Biospin 细菌基因组DNA提取盒直接提取样品中细菌的宏基因组DNA。

1.4 变性梯度凝胶电泳分析

1.4.1 PCR-DGGE 的 V3 可变区 PCR 扩增: 选取细菌 16S rDNA 的 V3 可变区引物 V3-2: 5'-ATTA CCGCGGCTGCTGG-3'和 V3-3: 5'-CGCCCGCCGC GCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCC TACGGGAGGCAGCAG-3'进行扩增。其中 25 μ L 反

应体系为: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTP 2 μ L, 引物 27f 和引物 1492r 各 1 μ L, 模板 1 μ L, Taq 酶(1000U, 5 U/mL) 0.3 μ L, 重蒸水 15.2 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳电泳检测,并用凝胶图像分析仪进行照相。

1.4.2 变性梯度凝胶电泳: 选择变性梯度范围为 35%~55%将 V3 区段的扩增产物进行 DGGE 分析^[7]。DNA 扩增产物上样量为 10 μ L。采用 Dcode DGGE 系统(Bio Rad)进行电泳,电泳缓冲液为 1 \times TAE 缓冲液,120 V 电泳 4 h 左右,电泳完毕后用 SYB green I (1 \times TAE, 1:10000)染色 60 min,弃去浸泡液,再在 ddH₂O 中浸泡冲洗 5 min,通过 UVP 成像系统进行紫外照相。

1.5 16S rDNA 克隆文库分析

1.5.1 16S rDNA 的 PCR 扩增: 以提取的基因组 DNA 为模板,选用细菌 16S 通用引物正向引物 27f: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物 1492r 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'进行 PCR 反应。反应体系及反应条件与上述 V3 区段序列扩增相同。选择上海生工生物工程技术服务有限公司 DNA 柱式抽提试剂盒进行 PCR 产物的纯化。

1.5.2 克隆文库构建^[8]: 将回收的 16S rDNA 片段与 pGEM-T Easy 载体连接,连接产物用 CaCl₂ 方法导入大肠杆菌 DH5 α ,在含有 X-gal(40 μ g/mL)、IPTG(40 μ g/mL)、Ap(50 μ g/mL)的 LA 平板上检测含有重组子的白色大肠杆菌菌落,然后使用“煮菌法”^[9]利用引物 SP6 和 T7 进行 PCR 扩增“白色”克隆的插入片段,并用琼脂糖电泳检查插入片段的大小是否正确。这样挑选到的阳性克隆构成克隆文库。

1.6 克隆序列测定及比对

将培养出的克隆菌液,送上海生工生物工程有限公司进行测序。获得菌株部分长度 16S rDNA(约 1500 bp)序列,将该序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行对比(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>),根据序列相似性大于或等于 90%以上的归为一个操作分类单元(OTU, Operational Taxonomic Unit)使用 Bioedit 和 MEGA4 软件,构建系统进化树进行分析。

1.7 文库库容的评价

克隆建库目的是为了反映样品中微生物的菌相构成,所以构建完成 16S rDNA 克隆文库后应通过

相应的方法进行库容(Library Size)的评价,反映该文库是否足以代表样品中微生物的多样性。本文采用 Good^[10]等提出的 Coverage C 来阐明这个问题。Coverage C 理论上表示 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物的种类占样品中全部微生物的种类的比例,计算公式如下:

$$\text{Coverage } C = [1 - (n/N)] \times 100 \quad (1)$$

其中, n 代表具有不重复序列的克隆数, N 代表所分析的克隆数。Coverage C 如果越高则构建的文库的库容量越大。

2 结果

2.1 样品 DNA 的提取

将从冷却牛肉样品中提取的总 DNA 进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,在 23 kb 左右出现条带(图 1),表明已获得较为完整的微生物的宏基因组的 DNA。图 1~图 4 电泳结果图谱中,1、2 均分别代表未包装冷却牛肉和保鲜膜包装冷却牛肉样品。

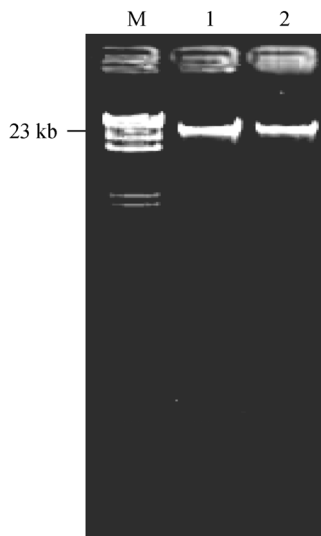


图 1 两种牛肉样品总 DNA 电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis analysis of total DNA from the two samples

2.2 16S rDNA 和 V3 可变区 PCR 扩增

引物 27f 和 1492r 对样品宏基因组进行 PCR,均能得到有重复性好且稳定、清晰的特异条带,片段大约 1500 bp(图 2)。同时 16S rDNA 的 V3 可变区引物(带 GC 夹子)进行 PCR 扩增,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,均获得 200 bp 左右的特异性扩增片段,从图 3 中可以看出,PCR 扩增好,适合用于接下来的 DGGE 电泳分析。

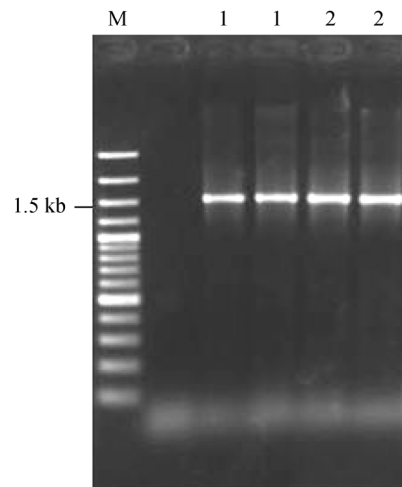


图 2 两种牛肉样品的 16S rDNA 电泳图谱
Fig. 2 PCR amplification of 16S rDNA derived from the two samples

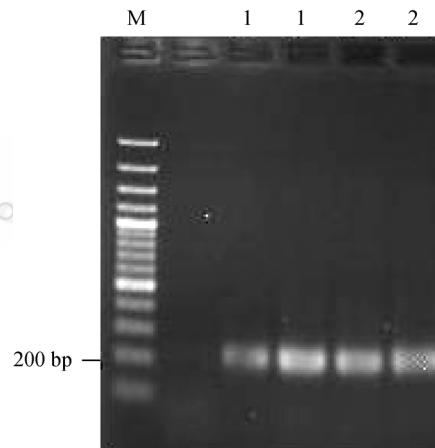


图 3 两种牛肉样品 V3 可变区 PCR 扩增结果
Fig. 3 PCR amplification products of V3 region from the two samples

2.3 PCR-DGGE 结果

根据 DGGE 能分离长度相同而序列不同 DNA 的原理,每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位相对应, DGGE 电泳图谱条带数越多,说明生物多样性越丰富,条带染色后的荧光强度则表示该种属的丰富度。从 DGGE 图谱中(图 4)可知两样品经过 DGGE 后都可以分离出数目不等的电泳条带,且条带的强度也不相同,未包装冷却牛肉共得到 15 条条带,保鲜膜包装的冷却牛肉总共得到 13 条条带,两者具有相同迁移率的条带共有 5 条,如图 4 中的 a、b、c、d 和 e 条带。通过软件对 DGGE 指纹图谱进行数量分析,1 个峰代表 1 个条带,峰高为相对含量。图 5 结果显示,未包装冷却牛肉的

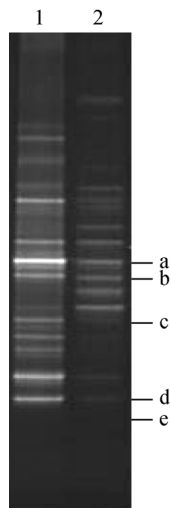


图4 两种牛肉样品变性梯度凝胶电泳图谱
Fig. 4 DGGE profile of the two samples

DGGE 图谱中条带丰富, 多样性最好, 两样品的 DGGE 图谱, 大部分分布在凝胶浓度 41%~49%, 凝胶浓度在 45%左右的条带强度最强。共有条带的荧光强度通过 bandscan 软件分析得出, a、b、d、e 条带在保鲜膜包装中明显减弱, 说明该条带代表的菌群数量有所减少, 保鲜膜包装起到了一定的抑制作用。而 c 条带在保鲜膜包装中较未包装强度得到了

增强, 说明该条带代表的菌群数量有所增加。

2.4 未包装冷却牛肉与保鲜膜包装冷却牛肉的微生物群落结构特征

从未包装冷却牛肉样品中筛选出 100 个阳性克隆, 保鲜膜包装的冷却牛肉样品中筛选出 100 个阳性克隆送上海生工测序, 根据序列 Blast 相似性大于或等于 97%以上的归为一个操作分类单元(OTU)。本实验中未包装冷却牛肉样品克隆文库(定义为 M 文库)可分为 18 个 OTU, 序列编号为 OTUM1 至 OTUM18, 而保鲜膜包装冷却牛肉样品克隆文库(定义为 N 文库)可分为 6 个 OTU, 序列编号为 OTUN1 至 OTUN6。按照 Good 的库容量的计算方法, 计算得出 M 文库的库容量 Coverage C 达到 82%, N 文库的库容量 Coverage C 则达到 88%, 较为完整的反映样品中微生物的构成。

将 OTU 经 NCBI 数据库网上 Blast 后, 可以得出该操作单元在克隆子中的分布(图 6)。从图中可以看出, 未包装冷却牛肉的微生物群落具有较高的多样性。主要是乳球菌属(*Lactococcus*, 11%), 索丝菌属(*Brochothrix*, 18%), 不动杆菌属(*Acinetobacter*, 9%), 假单胞菌属(*Pseudomonas*, 8%), 另外也存在一定量的肉品杆菌属(*Carnobacterium*), 乳酸杆菌属(*Lactobacillus*), 希瓦氏菌属(*Shewanella*), 葡萄球菌

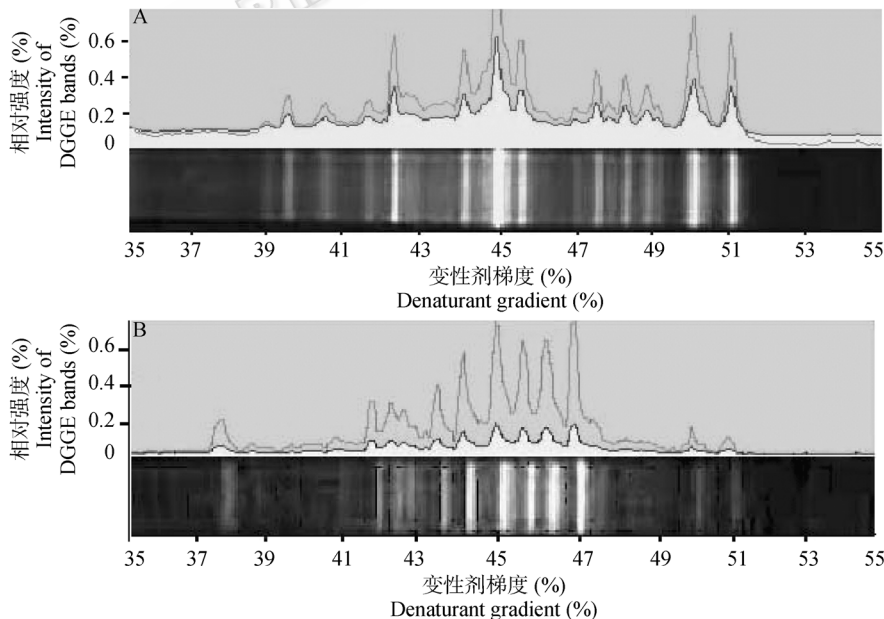


图5 两种牛肉样品群落多样性分析

Fig. 5 Community diversity of the two samples

注: A: 未包装冷却牛肉; B: 保鲜膜包装冷却牛肉。

Note: A: Chilled beef with no packing; B: Chilled beef with cling film.

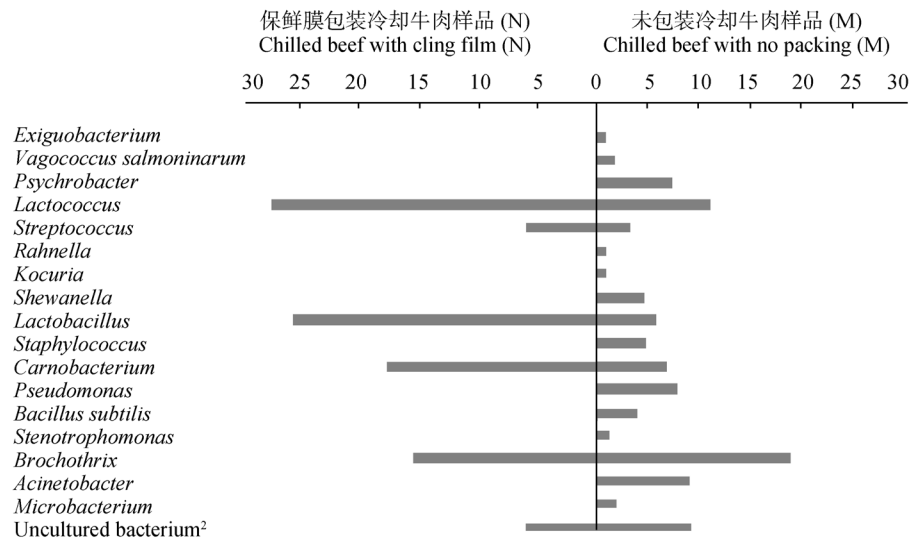


图6 两种牛肉样品克隆的整体分布

Fig. 6 Percentage of clones in the two samples and their relationship to different genera

属(*Staphylococcus*), 拉恩氏菌属(*Rahnella*), 库克菌属(*Kocuria*), 枯草杆菌属(*Bacillus subtilis*), 冷杆菌属(*Psychrobacter*), 微小杆菌(*Microbacterium*), 寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*), 无乳链球菌属(*Streptococcus*)以及漫游球菌属(*Vagococcus salmoninarum*)等。而在保鲜膜包装冷却牛肉中的微生物构成则较为简单, 主要为乳球菌属(*Lactococcus*, 28%), 乳酸杆菌属(*Lactobacillus*, 26%), 肉品杆菌属(*Carnobacterium*, 18%), 索丝菌属(*Brochothrix*, 16%), 同时也存在一定的无乳链球菌属(*Streptococcus*)等。乳球菌属(*Lactococcus*), 索丝菌属(*Brochothrix*), 肉品杆菌属(*Carnobacterium*), 无乳链球菌属(*Streptococcus*)以及乳酸杆菌(*Lactobacillus*)是两者共有的主要微生物, 也是肉类中常见的微生物^[12]。本实验中可以看出乳球菌属(*Lactococcus*), 乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)和索丝菌属(*Brochothrix*), 一直都是比较优势的细菌, 这些优势菌的存在和所处的环境有着密切的关系^[11]。

2.5 系统发育分析

OTU 经 NCBI 数据库网上 Blast 后, 获得它们的系统发育信息(表 1), 并将测序结果提交 NCBI 获得 GenBank 数据库中的登录号, M 文库为 :EU826652-EU826669。N 文库为 :EU826670-EU826675。从表 1 中可以看出 M 文库 BLAST 结果的菌属水平较高, 只有 OTUM6、OTUM7、OTUM11、OTUM14、OTUM18 可以到种。而 N 文库则 BLAST 到细菌种

的水平较高; OTUN1 与沙克乳杆菌(*Lactobacillus sakei*), OTUN2 与无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*), OTUN6 与热死环丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)的相似性较高。

3 讨论

从冷却牛肉中比对出的疑似 *Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Streptococcus* 和 *Carnobacterium* 都被广义的称为乳酸菌, 而本实验中此类细菌占绝对优势, 此类细菌能够在肉类的表面上生长, 形成菌苔而发粘, 同时伴随具有酸味的挥发性有机酸的产生^[12]。热死环丝菌也是冷却肉中一类重要的腐败菌, 由于其具有微需氧的特性, 往往在真空包装的肉制品中占有较高的比例。但有研究证明, 在真空包装的冷却肉中, 随着乳酸菌类优势地位的加强, 索丝菌属(*Brochothrix*)将受到抑制, 其细菌总数甚至可能下降。

其中也存在一些常见的腐败菌, 比如假单胞菌属(*Pseudomonas*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*), 这类细菌容易导致正常肉变粘, 并代谢产生过氧化物或硫化氢, 使正常肉由鲜红色变为绿色、褐色或灰色; 希瓦氏菌属通常存在于水和土壤中, 活性较强, 能产生 H₂S、不良气味产物和还原 TMAO 等, 冷藏过程较其他低温细菌生长速率快, 同时希瓦氏菌属(*Shewanella*)是冷链流通中高水分蛋白食品的特定腐败菌 SSO(Specific Spoilage Organisms)^[3], 另外葡

表 1 未包装冷却牛肉和保鲜膜包装冷却牛肉 16S rDNA 文库 OTU 的系统发育分析
Table 1 Information of 16S rDNA clone library constructed from chilled beef with cling film and no packing

Type of OTU	Number of Clone	Accession No.	Most closest sequences	Accession number of most closest sequence	Similarity (%)
OTUM1	9	EU826652	Uncultured bacterium	AY958853	99
OTUM2	2	EU826653	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	Y18097	99
OTUM3	9	EU826654	<i>Acinetobacter</i> sp.	AB365066	99
OTUM4	18	EU826655	<i>Brochothrix</i> sp.	AM 409367	99
OTUM5	7	EU826656	<i>Psychrobacter</i>	EU196312	99
OTUM6	4	EU826657	<i>Bacillus subtilis</i>	EF032688	99
OTUM7	8	EU826658	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AF094730	99
OTUM8	7	EU826659	Carnobacterium	AY543016	99
OTUM9	5	EU826660	<i>Staphylococcus</i> sp.	AB167054	99
OTUM10	5	EU826661	<i>Shewanella</i> sp.	AF140016	98
OTUM11	6	EU826662	<i>Lactobacillus sake</i>	AB362606	99
OTUM12	1	EU826663	Exiguobacterium	DQ351341	99
OTUM13	1	EU826664	<i>Rahnella</i> sp.	AJ415576	99
OTUM14	3	EU826665	<i>Streptococcus agalactiae</i>	AE014210	92
OTUM15	11	EU826666	<i>Lactococcus</i> sp.	AY762111	99
OTUM16	1	EU826667	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM403589	99
OTUM17	2	EU826668	Microbacterium	EU086800	99
OTUM18	1	EU826669	<i>Kocuria rosea</i>	EF522129	95
OTUN1	26	EU826670	<i>Lactobacillus sakei</i>	AB362609	99
OTUN2	6	EU826671	<i>Streptococcus agalactiae</i>	AE014207	92
OTUN3	28	EU826672	<i>Lactococcus</i> sp.	AY762105	99
OTUN4	18	EU826673	Carnobacterium	EU304249	93
OTUN5	6	EU826674	Uncultured bacterium	EU024337	95
OTUN6	16	EU826675	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	AY543027	100

萄球菌属(*Staphylococcus*), 嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)以及微杆菌属(*Microbacterium*)在冷却肉中都有比较明显的分布^[13]。通常认为健康动物的内部组织是无菌的, 它对微生物的入侵有完善的防御机制, 而这些细菌的侵入主要是与外界环境的接触导致的污染, 如水、土壤、污物等有关。不同学者研究结果的差异, 可能是肉品来源和所处的环境不同所致^[14]。本实验中保鲜膜包装对于希瓦氏菌属(*Shewanella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)等表现出较为明显的抑制作用, 这些细菌只存在于未包装的牛肉样品中, 在保鲜膜包装的牛肉样品中没有出现, 这也许与包装方式造成细菌生长的环境有关^[10]。由于本实验条件有限没有能够彻底排清牛肉中微生物的来源, 这也为以后的研究指明了方向。

4 结论





- 1) 超市新鲜冷却牛肉微生物的菌相构成较保鲜膜包装的冷却牛肉要复杂得多, 保鲜膜包装能起到一定的抑菌作用。
- 2) 超市新鲜冷却牛肉与保鲜膜包装的冷却牛肉中的优势菌都为乳酸菌这一大类细菌。其中新鲜冷却牛肉中的优势菌为 *Lactococcus*、*Brochothrix*、*Acinetobacter*、*Psychrobacter* 和 *Pseudomonas*, 而保鲜膜包装中的优势菌顺序为 *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Carnobacterium* 和 *Brochothrix*。
- 3) 超市新鲜冷却牛肉与保鲜膜包装的冷却牛肉中都存在一定的 *Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Carnobacterium*、*Streptococcus* 和 *Brochothrix*。

参 考 文 献

- [1] 刘 红. 冷却肉的特点及发展前景. 上海畜牧兽医通讯, 2002, 4: 29.
- [2] 孙承锋, 戴瑞彤, 曲富春. 微生物与肉类食品的腐败. 肉类研究, 2001, 1: 32-36.
- [3] Gill CO. Extending the storage life of meats. *Meat Science*, 1996, 43(1): 99-109.
- [4] Gill CO, McGinnis, M. Badoni. Use of total or *Escherichia coli* counts to assess the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 31(1): 181-196.
- [5] 罗 欣, 朱 燕. 乳酸钠在牛肉冷却肉保鲜中的应用研究. 食品与发酵工业, 2000, 26(3): 1-5.
- [6] 赵 勇, 周志华, 李 武, 等. 土壤微生物分子生态学中总 DNA 的提取. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 854-860.
- [7] Gerard. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current of Opinion Microbiology*, 1999, 2(3), 317-322.
- [8] 洪 璇, 刘彬彬, 张晓君, 等. 喹啉与吡啶驯化的反硝化反应器的微生物群落结构分析比较. 微生物学报, 2008, 48(4): 503-507.
- [9] Chun-Lin Huang, Jiang-Yong Hu. Denaturing gradient gel electrophoresis polymorphism for rapid 16S rDNA clone screening and microbial diversity study. *Journal of Bio-science and Bioengineering*, 2002, 93(1): 101-103.
- [10] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40(1-3): 237-264.
- [11] 李苗云, 周光宏, 徐幸莲, 等. 不同屠宰工艺(剥皮和烫毛)对猪胴体表面微生物的多样性影响及关键点的控制研究. 食品科学, 2006, 27(4): 170-173.
- [12] 李宗军, 江汉湖. 肉品微生态系统与肉类发酵剂研究. 食品与发酵工业, 2002, 28(5): 54-59.
- [13] 南庆贤. 肉类工业手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2003, pp.170-175.
- [14] Elisabeth Borch, Marie-Louise. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33(1), 103-120.

征 订 启 事

2009 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量