

新疆于田盐池放线菌群落结构

关统伟¹ 赵珂^{1,2} 夏占峰¹ 孙红专¹ 张利莉^{1*}

(1. 塔里木大学 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)

(2. 四川农业大学资源环境学院 四川 雅安 625000)

摘要: 应用免培养技术和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对新疆于田盐池土壤放线菌群落结构进行研究。结果表明, 41 个克隆序列属于 26 个 OTUs, 分别分布于放线菌门放线菌亚纲 (Actinobacteridae) 的 7 个亚目和酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae), 其中链孢囊菌亚目 (Streptosporangineae) 中放线菌组成丰富, 占到了全部挑选克隆的 42.3%, 是于田盐池放线菌群落中的优势菌, 而链霉菌不是高盐环境放线菌的优势菌群。在这些克隆序列中有 71.8% 的克隆序列同已知序列的相似性低于 97%, 属于放线菌的新类群, 这些可能的类群中有 15.3% 的克隆序列与已知菌株的相似性小于 85%, 这些克隆序列的分类地位都在科一级的分类单元上, 有的可能分类地位更高。这些研究结果说明于田盐池中存在有较为丰富的放线菌系统发育多样性, 并且潜藏着新类型的放线菌资源。另外, 由于微生态效应的存在, 不同高盐环境之间放线菌群落也存在明显差异。

关键词: 于田盐池, 系统发育, 放线菌群落, 免培养方法

Actinobacterial Community Structure of a Soil Sample from Yutian Pit in Xinjiang Revealed by Culture-independent Method

GUAN Tong-Wei¹ ZHAO Ke^{1,2} XIA Zhan-Feng¹ SUN Hong-Zhuan¹ ZHANG Li-Li^{1*}

(1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

(2. Faculty of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625000, China)

Abstract: Actinobacterial community structure in a soil sample from Yutian pit in Xinjiang was investigated by using Culture-independent method and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. The result showed 41 clones distribute in 26 OTUs, which exist in *Acidimicrobidae* and 7 suborders of *Actinobacteridae* respectively, especially the dominant community of Yutian pit was streptosporangineae instead of streptomycete, which accounting for 42.3% of sequenced clones. The similarity between 71.8% of 41 detected sequences and published clone sequences were less than 97%, which represented a new community and 15.3% of the clone sequences which identified with GenBank clone sequences were under 85%, which

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30660005); 教育部科学技术研究重点项目(No. 209145); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题(No. BR0803); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-06-0917); 新疆高校科研计划创新研究群体基金项目(No. XJEDU2005G07)

* 通讯作者: Tel: 86-997-4681612; E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-10-20; 接受日期: 2009-02-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

may represent some new families or suborders. The results indicated that abundant actinobacterial community and new actinobacterial resources existed in Yutian pit. In addition, actinomycete community which exist in different high salt concentration environment have distinct differences for microecological effect.

Keywords: Yutian pit, Phylogenetic analysis, Actinobacterial community structure, Culture-independent method

微生物支撑着整个地球上的物质循环和生命的延续,其多样性被用于监视和预测环境变化,也是新基因资源的重要来源。然而,长期以来由于缺乏再现活的不可培养微生物原生态环境的条件和培养基质,而造成许多未知微生物难以用标准实验室方法复苏和培养,因此严重地限制了我们对微生物的认识,使得微生物的多样性资源难以得到全面的开发和利用。一些免培养技术的发展与应用克服了传统纯培养技术的不足,提供了一条探知微生物多样性的新途径。极端环境微生物(Extremophiles)是一类极具开发潜力的微生物资源。近30年来,各国学者对盐环境微生物进行了大量的研究,应用免培养分析(Culture-independent method)揭示出盐环境中存在大量的至今尚未培养微生物(As-yet uncultured microorganism)^[1-4]。笔者的于田盐池免培养实验结果也充分证明了这个结论。

于田县位于新疆维吾尔自治区南部,塔克拉玛干沙漠南缘,昆仑山脉北麓,气候干旱少雨、温差大。于田盐池的制盐历史已经近百年,在长期的蒸发、盐析作用条件下形成了稳定的高盐生态环境。那么盐池环境中的放线菌群落组成是什么情况,它们同普通环境中的放线菌群落有什么异同呢?虽然少数国内学者研究了盐湖沉积物样品和盐矿土壤的未培养放线菌多样性^[5,6],那么盐池环境同盐湖和盐矿的土壤样品中的放线菌群落有什么差异,这些异同又是什么原因造成的都不是很清楚,这也说明仍有大部分的高盐生态环境微生物有待探索。笔者选

择新疆于田盐池这个极端特殊的生态环境中的土壤为对象,探索了其放线菌群落结构,结合前期对新疆的硝尔库勒盐湖和云南的江城和黑井盐矿的放线菌组成的研究发现链霉菌不是高盐环境中放线菌的优势类群,这同普通环境中的放线菌群落组成差异较大,并且不同高盐环境中的放线菌在群落组成上存在明显的微生态效应。这些研究结果对于揭示盐环境中放线菌的群落、系统保护和有效利用极端环境微生物物种和基因资源、探索微生物基因多样性演化机制具有重要意义和参考价值。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和处理

2007年11月,从新疆于田县盐池(81°40'E, 36°43'N)采集约30 cm深的浅层土壤(图1),样品采集后装于灭菌的50 mL螺口离心管中,置于便携式冰箱4°C保存,运抵实验室后立即进行土壤总DNA的提取。

1.2 土样总DNA的提取

称取新鲜沉积物样品5 g加入12 mL提取缓冲液(0.1 mol/L Na₂HPO₄, 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris base, 1.5 mol/L NaCl)和500 μL的溶菌酶(50 mg/mL), 37°C振荡30 min,然后加入70 μL(20 μg/mL)的proteinase K及1.5 mL 20%的CTAB,振荡混匀后,再加入1.5 mL 20%的SDS, 65°C水浴加热2 h(每隔15 min轻轻摇动1次)。将上述样品处理液加入等体积的酚氯仿(酚:氯仿:异戊醇, 25:24:1, V/V/V),重

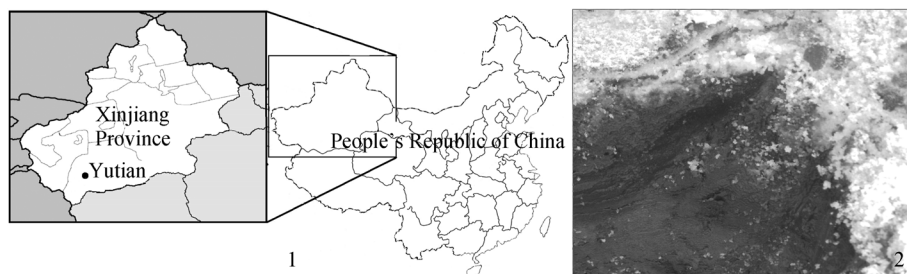


图1 中国西北部新疆于田县盐池样品采集地

Fig. 1 Locations of samples of Yutian pit in Xinjiang of northwest China

Note: The collection site on the map 1. Images of local environment of soil collected on the map 2.

复抽提 2 次(12000 r/min, 15 min)。在上清液中加入 0.6 倍体积异丙醇, 4°C 沉淀过夜, 弃上清液后加入 100 μL TE 缓冲液溶解沉淀, 得到总 DNA 的粗提液。

1.3 PCR 反应

应用放线菌的特异性引物^[7](S-20: 5'-CGCG GCCTATCAGCTTGTTG-3', A-19: 5'-CCGTACTCC CCAGGCGGGG-3')对土壤总DNA进行PCR扩增。PCR反应条件参照Stach等^[7]的方法。扩增体系 50 μL, 扩增片段大小约 640 bp。

50 μL反应体系: *Ex Taq* (5 U/μL) 0.25 μL, 10× Buffer (Mg²⁺ plus) 5 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL, 模板 DNA 1 μL, 正反向引物(40 μmol/L)各 0.25 μL, 然后加无菌超纯水补足至 50 μL。

1.4 克隆文库构建及序列分析

将 PCR 扩增的目的条带按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明对 PCR 产物进行纯化处理。纯化产物通过 T4 DNA 连接酶与载体 pMD 18-T 进行连接, 并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。挑取阳性克隆子送到上海生物工程有限公司进行测序, 并构建样点的 16S rRNA 克隆文库。为了减少测序的数量, 笔者先用核酸内切酶 *Hae* 对文库进行 ARDRA(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)分型。根据分型的结果, 选代表克隆去测序^[8-10]。采用Shanno Index、Simpson Index、Species Richness、Estimated sample coverage等相关指数进行样点克隆文库的微生物多样性评价分析。依据测序结果, 从 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 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进行多序列比对^[11], 系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算^[12], 用 MEGA 4.0(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件采用邻接法(Neighbor-joining)聚类分析, 并构建出系统进化树^[13]。同时, 重复取样 1000 次进行自展值

(Bootstrap value)分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性^[14]。定义克隆子 16S rRNA 序列相似性低于 99% 作为不同的分类单元, 克隆序列的相似性大于 99% 的归于同一个 OUT 为标准^[15]来计算。

1.5 GenBank 序列登录号

从 GenBank 获得的克隆基因片段的序列登录号为: FJ214060-FJ214097、FJ358534-FJ358537。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因文库构建及多样性分析

土壤基因组 DNA 的 PCR 结果通过胶回收, 连接与转化, 对阳性克隆测序并构建了于田盐池沉积物样品的克隆文库。由于实验操作中使用的是混合模板, 而且这些模板之间序列的相似性很高, 所以基因组总 DNA 在 16S rDNA 扩增时容易出现错误, 产生一些在环境中原本并不存在的“16S rDNA”序列, 其中 Chimera(嵌合体)对文库的构建影响较大^[16-18], 会使我们过高估计环境中微生物的多样性。为此, 我们对随机挑选的 132 个克隆先通过 *Hae* 酶切, 根据 ARDRA 的分析结果, 选出 42 个克隆测序, 测序结果应用 RDP (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/html/>) 中的 Chimera Check 程序检查所获得的序列, 结果发现 3 个 Chimera 并给予去除。使用 SPADE [species prediction and diversity estimation (<http://chao.stat.nthu.edu.tw/>)] 分析软件对于于田盐池的 26 个 OTU 进行放线菌多样性指数分析, 结果如表 1。在可信区间为 95% 的情况下, 其样品覆盖率(C)估计为 90.0%, 样点的物种丰度(Species richness)为 76.6, Shannon index 为 2.54; Simpson index 为 0.17。然后用 Analytic Rarefaction 软件 (<http://www.uga.edu/~strata/software/Software.html>) 绘制克隆文库的 Rarefaction curve(见图 2)。

表 1 克隆文库多样性指数
Table 1 Diversity index of the clone library

Diversity estimate								
Sample	No. of OTUs	C	Species richness		Shanno index		Simpson index	
			FSR	95% CIs	Chao & Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
Yutian pit	26	0.90	76.6	(38.9, 224.5)	2.54	(2.01, 3.00)	0.17	(0.08, 0.27)

Note: CIs: Confidence interval; MLE: Maximum likelihood estimator; Chao & Shen: Based on Horvitz-Thompson estimator and sample coverage method; FSR: Estimation of species richness; C: Estimated sample coverage.

从Rarefaction curve 图来看稀释曲线仍没有达到平台期, 但该曲线已经趋向平缓。根据Kemp^[19]的研究, 只有穷尽样品中微生物的多样性才能达到稳定, 否则永远都是增函数, 这一结果说明几乎没有哪一个文库能够穷尽样品中微生物的多样性, Coverage (C)也不可能达到 100%。Coverage表示 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物的种类(OTU)占样品中全部微生物的种类的比例。我们的研究中 Coverage为 90.0%, Rarefaction curve 趋于平缓。因此可以认为库容(Library size)已经足够, 并且基本涵盖了该样点的绝大多数物种(90.0%), 能够较好的反映该样点放线菌的生物多样性。

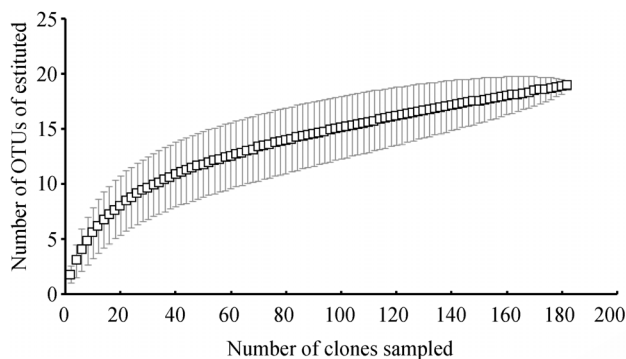


图2 硝尔库勒湖样点放线菌稀释度曲线
Fig. 2 Rarefaction curve for Yutian salt pit sample ()
OTUs of 16S rDNA gene clones
Note: Error bars are standard deviations.

2.2 于田盐池放线菌群落分析

基于低于 99.0%相似性划分为一个 OUT 的标准来分析序列信息, 得到于田盐池样点 26 个 OTUs, 然后同 GenBank 数据库中已知序列进行比对, 共同构建系统发育树, 结果如图 3。

从图 3 可以看出这些序列分属于整个放线菌门 (Actinobacteria), 其中在放线菌亚纲 (Actinobacteridae) 有较为广泛的分布, 在酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae) 中有少量分布, 在红色杆菌亚纲 (Rubrobacteridae) 和红螬菌亚纲 (Coriobacteridae) 中没有发现亲缘关系较近的类群, 这同笔者前期研究的云南江城和黑井的盐矿土壤以及新疆的硝尔库勒盐湖沉积物中放线菌的分布相一致。据实验统计, 在测得的 26 个 OTUs 中, 有 97.3% 属于放线菌亚纲 (Actinobacteridae) 内, 2.7% 属于酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae), 而对硝尔库勒盐湖免培养的结果表明有 35.3% 属于放线菌亚纲 (Actinobacteridae) 内, 17.6% 属于酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae), 另外 47.1% 的 OTUs 在放线

菌门内形成一个独立的大分支, 这从一定程度上说明即使同处于高盐环境, 但由于微生态的差异, 其放线菌群落组成差异也很大。同时, 大量的免培养的结果表明放线菌亚纲 (Actinobacteridae) 和酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae) 是高盐环境中放线菌的主要群体。

根据测序的系统发育结果可知, 于田盐池土壤中放线菌群落主要位于链孢囊菌亚目 (Streptosporangineae)、链霉菌亚目 (Streptomycineae)、丙酸杆菌亚目 (Propionibacterineae)、棒杆菌亚目 (Corynebacterineae)、小单孢菌亚目 (Micromonosporineae)、微球菌亚目 (Micrococccineae) 和酸微菌亚目 (Acidimicrobiaceae) 等 7 个亚目中, 其中在链孢囊菌亚目 (Streptosporangineae) 中放线菌组成丰富, 占到了全部挑选克隆的 42.3%, 且有 18.1% 的克隆在链孢囊菌亚目 (Streptosporangineae) 中形成了一个独立的分支, 可能在这个亚目中的一些新类群。其次是棒杆菌亚目 (Corynebacterineae) 和微球菌亚目 (Micrococccineae), 分别占全部克隆的 20.6% 和 17.9%, 有趣的是在普通环境中占有绝大多数的链霉菌, 在于田盐池这个高盐环境中占到 3.7%, 在硝尔库勒盐湖沉积物中仅为 2.8%, 在云南黑井的盐矿中也不到 5%, 这些结果为链霉菌不是高盐环境优势菌群提供了主要证据, 同时我们对于田等高盐环境中放线菌纯培养结果也有力的支持了这一结论 (该数据另文发表)。

对 26 个 OTUs 测序结果在 NCBI 上进行在线 Blast 搜索, 结果发现有 28.2% 的 OTUs 同有效发表菌种的相似性在 97% 以上, 那么根据定义 16S rRNA 序列相似性低于 97% 作为不同的分类单元^[20]来估算, 在于田盐池土壤样品中有 71.8% 的放线菌新类群存在。其中, 有 15.3% 的克隆序列与已鉴定的菌株相似性小于 85%, 这些预示着新类群的克隆序列的分类地位都在科一级的分类单元上, 有的可能分类地位更高 (见图 3)。这也表明高盐环境中不仅存在有丰富的放线菌物种多样性, 也是发现放线菌新类群或高级分类单元的理想之地。

3 讨论

3.1 同是高盐环境, 那么在微生物群落组成上是否存在微生态效应

带着这样的疑问笔者近期研究了于田盐池的放

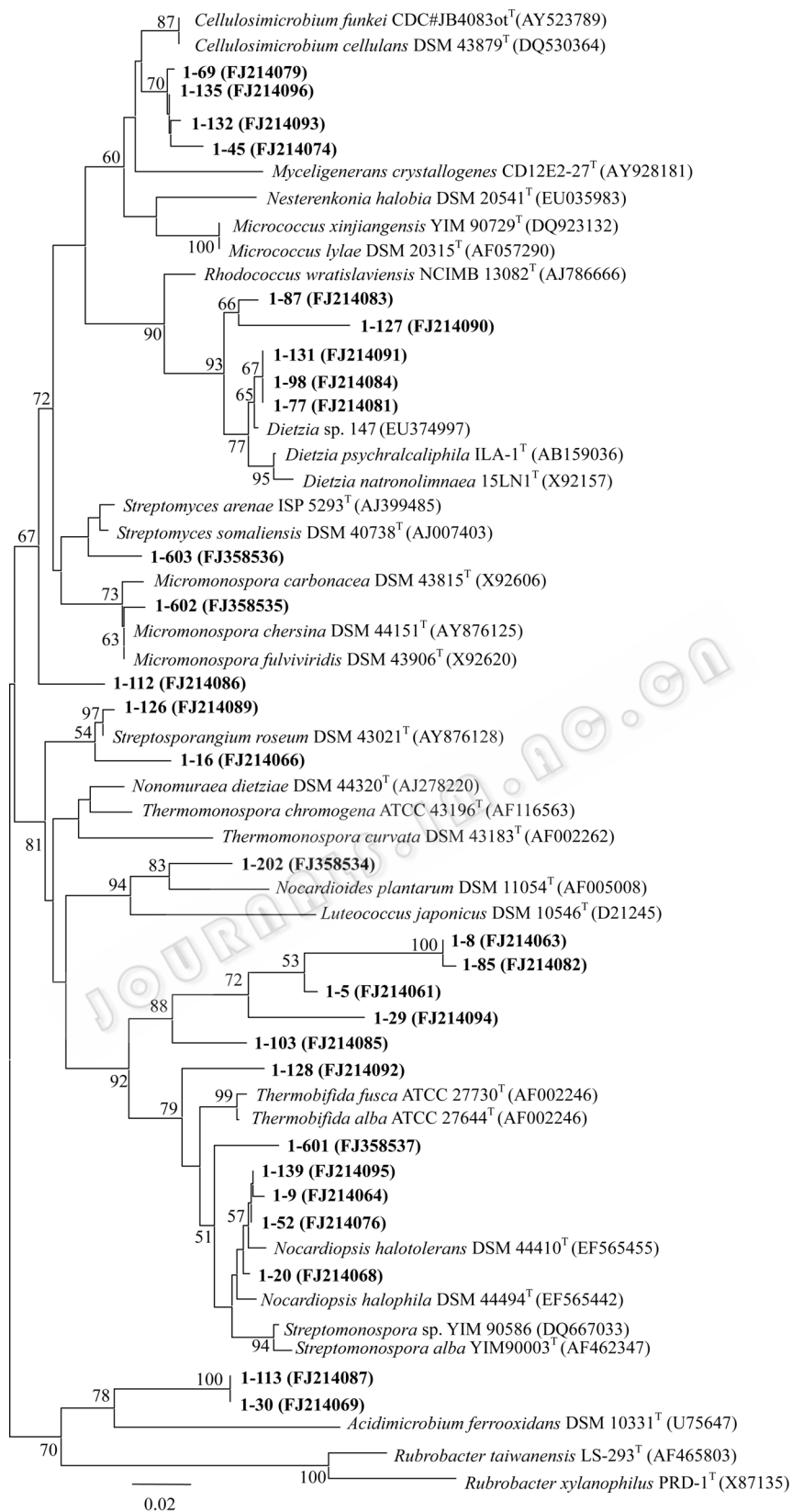


图 3 新疆于田盐池土壤样品中部分克隆序列与放线菌相关种构建的以 16S rRNA 基因序列为基础的系统发育树
 Fig. 3 Neighbour-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among acinobacterial 16S rRNA gene sequences (partial clone sequences, 640 bp) obtained from the soil sample of Yutian pit and their closely related sequences downloaded from GenBank

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses. All of bootstrap values over 50 are shown based on neighbour-joining analyses of 1000 resamples data sets. Bar: 2% sequence substitution.

线菌群落,同时结合前期对新疆硝尔库勒盐湖沉积物和云南的江城与黑井盐矿土壤样品利用相同的放线菌引物做了放线菌群落结构的比较研究。实验结果表明高盐环境中的放线菌群落仅存在于放线菌亚纲(Actinobacteridae)和酸微菌亚纲(Acidimicrobiae)中,那么这是否预示着在红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae)和红螯菌亚纲(Coriobacteridae)根本不存在于高盐环境中呢?这一点还需要更多的证据来验证,但有一点值得强调的是至今在红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae)和红螯菌亚纲(Coriobacteridae)中还没有分离到真正的嗜盐放线菌。另外,虽然同是高盐环境,但在放线菌群落组成上仍然存在明显的微生态效应,在不同生态地区的盐环境土壤中放线菌群落组成差异较大。比如:存在于黑井盐矿中 Pseudonocardineae 科,在江城盐矿中就没有发现;存在于硝尔库勒盐湖沉积物中的 Frankineae 科,在于田盐池中也没有检测到。

3.2 链霉菌是普通环境中放线菌的优势类群,那么高盐环境中是否也一样

纯培养(数据另文发表)和免培养的结果表明链霉菌不是高盐生态环境中放线菌的优势类群,数量很少,这预示着在高盐环境中可能更容易发现放线菌的稀有类群,当然前提是必须建立在分离方法有所突破的基础上。当前有效发表的众多链霉菌中还没有发现嗜盐的链霉菌,我们在高盐环境纯培养的结果中也没有发现嗜盐的链霉菌。为什么这些在普通环境中大量生存的链霉菌在高盐环境中成了稀有类群?那些不多的链霉菌又是怎样耐受这么高的盐浓度的呢?为什么它们没有在长期的进化和自然选择中在高盐环境中占据优势?高盐环境中的放线菌还有很多疑问值得去深入探索和研究。

3.3 高盐环境是发现未知放线菌的理想之地

我们实验中利用纯培养技术分离的糖霉菌科(Glycomycetaceae)的一个新属 *Haloglycomyces*(文章已经被IJSEM接收)、拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)的一个新种以及纤维单孢菌属(*Cellulomonas*)的一个新种都分离自新疆的高盐环境土壤(数据在本文中未列出)。我们免培养的结果也表明在高盐环境中 有 50%~80%的放线菌未被分离得到。这说明高盐环境中 有大量未知微生物等待发掘和利用。新疆具有类群齐全,生态多样的高盐环境,尤其以盐湖和盐碱地较多^[21],是寻找和发现未知微生物的一块宝

地。这些极端环境下的微生物是特殊酶或活性物质的产生者,可惜的是,相应微生物的纯培养难以获得限制了开发利用极端微生物的深度和广度。因此,加强和改善在极端环境中微生物的分离技术,通过对高盐环境微生物的不断探索,我们有理由相信将会有更多的放线菌新类群被发现。

参 考 文 献

- [1] 任培根,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. 微生物学报, 2003, 43(3): 427-431.
- [2] Vorigas C, Antranikian G. Extremophiles: pH, temperature, and salinity. In: Bull TA ed. Microbial Diversity and Bioprospecting. Washington, DC: ASM Press, American Society for Microbiology, 2004, pp.146-153.
- [3] Stackebrandt E, Embley TM. Diversity of uncultured microorganisms in the environment. In: Colwell RR and Grimes DJ, ed. Nonculturable Microorganisms in the Environment. Washington, DC: ASM Press, 2000, pp.57-75.
- [4] Jiang HC, Dong HL, Zhan GX, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in northwestern China, *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(6): 3832-3845.
- [5] 关统伟,吴晋元,张利莉,等. 硝尔库勒湖沉积物中非培养放线菌多样性. 微生物学报, 2008, 48(7): 851-856.
- [6] 吴晋元,李岩,关统伟,等. 云南江城和黑井盐矿沉积物未培养放线菌多样性比较. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1-6.
- [7] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, et al. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol*, 2003, 5: 828-841.
- [8] Etchebehere C, Errazquin MI, Dabert P, et al. Community analysis of a denitrifying reactor treating landfill leachate. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 40: 97-106.
- [9] Fernandez A, Seston J, Hickey C, et al. How stable is stable? Function versus community composition. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3697-3704.
- [10] Friedrich. High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library. *Environ Microbiol*, 2002, 4: 721-734.
- [11] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(4): 876-882.
- [12] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of

- nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, **16**: 111–120.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406–425.
- [14] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**: 783–791.
- [15] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, *et al.* Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 6189–6200.
- [16] Qiu XL, Wu H, Huang P. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 880–887.
- [17] Von Wintzingerode F, Gobel B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, **21**: 213–229.
- [18] Wang GC. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4645–4650.
- [19] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **47**: 161–177.
- [20] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**: 846–849.
- [21] 郑喜玉, 张明刚, 徐 昶, 等. 中国盐湖志. 北京: 科学出版社, 2002.

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高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、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/wswxtbcn>, 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、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。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 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 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)。

3.3 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。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 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 *nsp14* 基因的克隆和表达. *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 Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

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

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

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.592)