

# 云南会泽铅锌矿渣中节杆菌的生理特征 和系统发育

张汉波\* 程立忠

(云南大学生命科学学院生物学系 云南 昆明 650091)

**摘要:** 对分离自铅锌矿渣中一种具有奶油色不扩散菌落形态的优势细菌进行了系统发育和部分生理特征研究。在可培养的细菌类型中, 该种菌落的出现频率在 50%左右。利用 60 个菌株 16S rRNA 基因约 500 bp 的序列和其相关种构建的系统树表明, 这些菌落属于节杆菌属内多个系统发育地位有差异的类群。各类群代表菌株 BS11、BS20 和 AS19 约 1440 bp 左右的 16S rRNA 基因序列分析的结果表明, BS11 菌株同 *Arthrobacter histidinovorans* 和 *Arthrobacter nicotinovorans* 关系密切, BS20 菌株同 *Arthrobacter chlorophenolicus* 关系密切, 而 AS19 同 *Arthrobacter aurescens* 和 *Arthrobacter ilicis* 关系密切。在考察的 39 个碳源中, 3 个代表菌株都能利用其中的 15 个, 不能利用其中的 12 个, 而对另外 12 个的利用存在差异。此外, 它们对  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  等 5 种重金属的抗性水平都较高, 但对链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素和利福平 4 种抗生素较敏感。它们是潜在的新物种。  
**关键词:** 铅锌矿渣, 节杆菌, 生理特征, 系统发育分析

## Phylogenetic and Physiological Characteristics of Three *Arthrobacter* spp. from Huize Lead-zinc Mine Tailings in Yunnan Province

ZHANG Han-Bo\* CHENG Li-Zhong

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

**Abstract:** Some numerically dominant colonies, with creamy and nondiffusionable morphology, were isolated from lead-zinc tailings and their phylogenetic and physiological characteristics were determined. This type of colony represented approximate 50% of cultivable bacteria of tailings. Phylogenetic tree constructed from about 500 bp of 16S rRNA gene of 60 isolates and their relatives indicated that, these strains belonged to the member of *Arthrobacter* genus and were divided into several phylogenetically distinct groups. Three representatives from each group, BS11, BS20 and AS19, respectively, were sequenced approximate 1440 bp of 16S rRNA gene and their phylogenetic positions were further determined. Strain BS11 was phylogenetically close to *A. histidinovorans* and *A. nicotinovorans*, BS20 close to *A. chlorophenolicus*, and AS19, to *A. aurescens* and *A. ilicis*. Among 39 carbon sources tested, three strains could

基金项目: 云南省科技厅项目(No. 2007PY01-24); 云南省自然科学基金项目(No. 2002C0001Q)

\* 通讯作者: Tel: 86-871-5034282; E: zhhb@ynu.edu.cn, zhbdm@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2009-12-23; 接受日期: 2010-04-10

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

strongly utilize 15 and weakly utilize 12 carbon sources. All of three strains showed high resistance to  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  and  $\text{CoCl}_2$ , but relatively sensitive to ampicillin, streptomycin, kanamycin and rifampicin. Our data suggested these strains may be potential novel species.

**Keywords:** Lead-zinc tailings, *Arthrobacter*, Physiological characteristics, Phylogenetic analysis

重金属作为一种蛋白质变性剂,对生物有极大的毒性<sup>[1]</sup>,因此,重金属污染土壤被认为是一种人为因素形成的极端环境<sup>[2]</sup>。矿渣因有极高含量的重金属<sup>[3]</sup>,可以被看作一种极端的重金属污染环境。在以前的报道中我们描述了云南省会泽县境内3个堆积时间在10年、20年和80年以上的铅锌矿渣的化学性质以及其中的微生物数量<sup>[4-5]</sup>。尽管这些矿渣中可溶性Pb的含量高达300  $\mu\text{g/g}$ ,但其中的可培养化能异养菌(Chemoorganotrophs, COT)数量仍然近 $1 \times 10^6$  个/g矿渣。在这些细菌中,有一种奶油色不扩散类型的菌落(Creamy and nondiffusionable, CND)占了绝对优势,推测它们可能具有某些特殊生理特性,从而对矿渣环境比较适应。因此进一步对它们进行了分离、纯化和保存,并通过16S rRNA基因序列测定和其他特征研究来初步确定了它们的系统发育地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

分离自铅锌矿渣堆<sup>[4]</sup>,保存在改良的TY固体斜面培养基上(牛肉膏3 g,蛋白胨5 g,胰蛋白胨3 g,琼脂15 g,去离子水1000 mL, pH 7.2-7.4)<sup>[5]</sup>。

### 1.2 16S rRNA 基因扩增和序列测定

斜面保藏菌种经TY平板划线获得单菌落,然后在液体TY培养基中30℃摇瓶16-18 h。取1 mL菌液用试剂盒(WATSON Bacteria Genomic DNA Isolation Mini Kit)提取基因组DNA。16S rRNA基因用两个引物(前引物为:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';后引物为:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')来扩增<sup>[6]</sup>。扩增体系含有1  $\mu\text{L}$  DNA模板(大约20-100 ng DNA);5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR缓冲溶液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; 500 mmol/L KCl; 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ), 4  $\mu\text{L}$  dNTPs混合物(每个dNTPs浓度为2.5 mmol/L) (TaKaRa), 1.25 U *Taq* 酶(TaKaRa), 两个引物各1  $\mu\text{L}$  (终浓度为0.4  $\mu\text{mol/L}$ ), 补足无菌去离子水50  $\mu\text{L}$ 。PCR扩增仪器为GeneAmp PCR system, 扩增程序为: 95℃ 4 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 32个循环; 72℃ 10 min。

PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,然后用手术刀切出1500 bp大小的片段,用胶回收试剂盒(WATSON Gel Extraction Mini Kit)回收并纯化目的片段。纯化的目的片段进行商业测序。

### 1.3 系统发育树构建

测得的DNA序列经NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST引擎搜索后获取相关种属的16S rRNA基因序列,用Clustal X 1.8软件进行排列。系统发育分析时排除碱基缺失位点,用邻接法(Neighbor-joining analysis)构建系统发育树。距离矩阵按照Kimura's 双参数模型进行计算<sup>[7]</sup>, Bootstrap 检验进行1000次取样。

### 1.4 细胞形态和生理学鉴定

每个系统发育关系密切的类群取一个菌株进行细胞形态和生理学分析。常规革兰氏染色、抗酸染色、鞭毛染色和接触酶检测,需氧性用穿刺培养法测定<sup>[8]</sup>。测定碳源利用情况的基本盐培养基为:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g, 1000 mL 蒸馏水,测试碳源的含量为0.5%。测试时取1 mL培养了24 h的细胞悬液离心,细胞用0.85% (W/V) NaCl洗涤2次,再用1 mL悬浮。取0.01 mL该细胞悬液转接入10 mL上述添加有碳源物质的基本培养基,以不加碳源的基本培养基接种后作为对照。30℃摇瓶培养72 h后在波长600 nm测量光密度值,同对照比较光密度值有明显增加,表明可利用该碳源。细胞形态的球杆循环参照文献[9]进行。

菌株对重金属和抗生素的抗性按以下方法测定。先配制1 mol/L  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  和  $\text{CoCl}_2$  4种重金属以及浓度为1 g/L的链霉素(Streptomycin),利福平(Rifampicin),卡那霉素(Kanamycin)和氨苄青霉素(Ampicillin)储液。重金属储液用高压蒸汽灭菌,抗生素储液经过滤除菌且现配现用。然后,加一定量的重金属或抗生素进入TY液体培养基,制成重金属浓度变化在0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、16.0、32.0 mmol/L的一系列试管,抗生素浓度变化为0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、16.0、32.0、64.0、128.0 mg/L的一

序列试管。这些试管接种上述菌悬液后, 30℃ 摇瓶培养 3 d (检查抗生素抗性)或 15 d (检查重金属抗性), 确定最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)。由于添加一定浓度的重金属后可见明显沉淀, 在测量光密度值时都以同浓度但不接种试管作为对照。

### 1.5 G + C mol%分析

参考有关方法大量提取菌株 DNA<sup>[10]</sup>, 采用熔点法( $T_m$  值法)测定菌株 G + C mol%<sup>[8]</sup>。大肠杆菌 (*E. coli* JM105)作为参照菌株, 实验仪器为日本岛津 UV-1601 分光光度计。根据公式  $G + C \text{ mol\%} = 2.08T_m - 106.4$  计算 G + C mol%。

## 2 结果

### 2.1 优势菌株的分离频率

3 个矿渣总体来看, 可培养细菌中奶油色不扩散菌落类型(CND)占了绝对优势。在观察的 1450 个矿渣菌落数中, 这类菌落有 798 个, 出现频率约为 55.0%。但 3 个矿渣之间的出现频率并没有显著差异 (表 1)。

表 1 奶油色不扩散菌落的出现频率  
Table 1 Isolation frequencies of creamy and nondiffusionable (CND) colonies

样品 Samples	观察的菌落数 Observed colonies	奶油色 不扩散菌落 CND colonies	百分比(%) Percent (%)
A	871	483	55.5
B	438	267	61.0
C	141	48	34.0
总数 Total	1450	798	
统计显著分析 Statistical significance			NS

注: 字母 A、B 和 C 代表 10a、20a 和 80a 的矿渣。统计分析采用 One-way ANOVA。NS 代表不显著 ( $P > 0.05$ )。

Note: Letter A, B and C represent 10-year, 20-year and 100-year tailings, respectively. Significance level is determined by One-way ANOVA. NS: Not significant,  $P > 0.05$ .

### 2.2 优势菌落的系统发育分析

随机测定了 60 个菌落约 500 bp 的 16S rRNA 基因片段, 经 NCBI 的 BLAST 搜索引擎进行序列比对后, 发现它们同节杆菌属 (*Arthrobacter*) 的细菌有较高序列同源性。将它们同 25 个已经描述过的节杆菌菌株和其他相关属的 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析, 表明 60 个矿渣菌株可分为 3 个类群。最大的 G1 类群包括了 48 个菌株, G2 和 G3 两个类群

分别包含了 9 个和 3 个菌株(未显示结果)。因用于构建系统发育树的 DNA 序列较多, 每个序列的碱基数又相对较少, 因此构建的系统发育树在很多节的支持率都低于 50%, 尚不能很好地确定这 3 个类群在节杆菌属中的系统发育地位。接下来在 G1、G2 和 G3 类群中分别选取一个菌株作为类群代表, 对其 16S rRNA 基因序列进行近全长测定, 获得的碱基数在 1440 左右。将它们同系统发育关系密切的节杆菌种以及关系较近的几个属的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树见图 1。

结果显示, G1 类群的代表菌株 BS11 同两个节杆菌种 *A. histidinolorans* 和 *A. nicotinovorans* 关系密切, 树节的支持率也较高, 达到 88%; 而 G2 类群的代表菌株 BS20 同 *A. chlorophenolicus* 关系较为密切, 树节的支持率为 60%; G3 类群的代表菌株 AS19 同 *A. aurescens* 和 *A. ilicis* 密切相关, 树节支持率为 51%。

### 2.3 菌株的形态学和生理学特征

同系统发育相近的节杆菌种部分特征比较, 3 个菌株都为严格好氧、不抗酸、不运动、接触酶阳性、不需要生物素生长等特征, 同相关种有一定差异, 且 G1 和 G2 类群代表菌株的 G + C mol% 都比相关种高(表 2)。此外, 在 TY 固体培养基上培养 24 h, 所有菌株都表现为  $G^+$  反应不规则球杆菌, 细胞大小为  $(0.5-0.6) \mu\text{m} \times (1.6-4.0) \mu\text{m}$ , 72 h 后细胞变为近球形, 大小为  $(0.5-0.6) \mu\text{m} \times (0.6-0.8) \mu\text{m}$ , 因此有明显的球杆周期变化(图 2)。

考察的 39 个碳源包括了糖醇、有机酸、氨基酸和碱基等物质。3 个菌株都不能利用其中的 15 个碳源, 它们分别是 D-阿拉伯糖、糖原、七叶苷、胸腺嘧啶、尿素、L-亮氨酸、L-丝氨酸、4-OH-L-脯氨酸、衣康酸、癸二酸、甲酸、乙酸、正丙酸、苯丙氨酸和土温 80。而 3 个菌株都能利用其中的 12 个碳源, 它们分别是蔗糖、葡萄糖、糊精、麦芽糖、甘露糖、棉子糖、D-果糖、菌糖、甘露醇、水杨素、纤维二糖和丙三醇(未显示数据)。另外 12 个碳源的利用在 3 个菌株间有一定的差异, 相对来说菌株 BS20 显示了较弱的碳源利用能力(表 3)。

由于这些菌株分离自矿渣, 因此检查了它们对几种重金属和抗生素的抗性特征(表 3)。结果显示它们对  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  几种重金属的抗性水平都较高, 但对抗生素比较敏感。

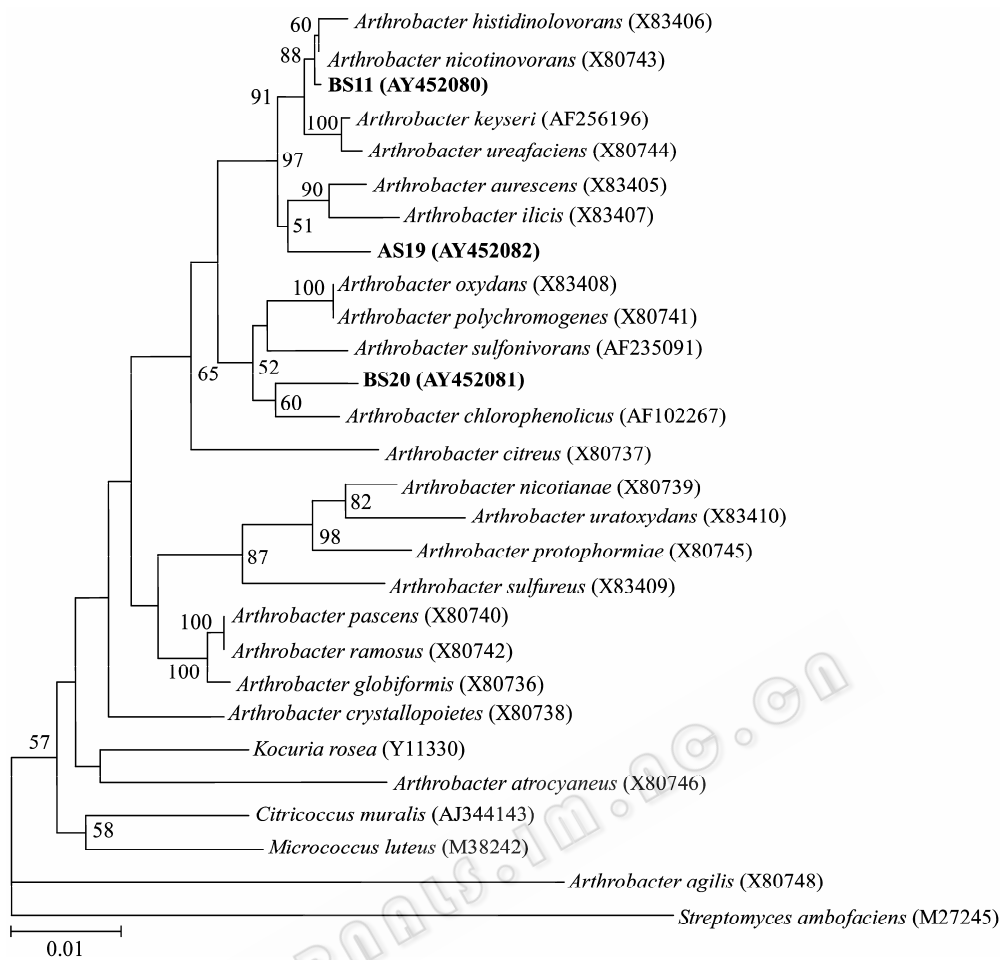


图 1 根据菌株 BS11、BS20 及 AS19 及其近缘种的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

**Fig. 1** Phylogenetic tree constructed from the 16S rRNA sequences of *Arthrobacter* BS11, BS20, AS19 and its closest relatives  
注: *Streptomyces ambifaciens* 被用作外群, 在树节上的数字代表 1000 取样的百分比, 仅显示大于等于 50% 的情况. 括号中为代表菌株的 GenBank 登录号. 比例尺代表 1% 的序列差异.

Note: *Streptomyces ambifacies* is used as an outgroup. The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1000 bootstrapped trees, only values that are 50% or greater are shown. The GenBank accession number (in parentheses) is indicated for each previously described strain, and 3 tailing strains are registered in Genbank as from AY452080 to AY452082. The scale bar represents 1% sequence difference.

表 2 3 个菌株同相关节杆菌种的部分特征比较  
Table 2 Some characteristics of three phylogenetically distinct groups and closely related *Arthrobacter* spp.

特点 Characteristics	BS11	<i>A. histidinovorans</i>	<i>A. nicotinovorans</i>	BS20	<i>A. chlorophenolicus</i>	AS19	<i>A. aureescens</i>	<i>A. ilicis</i>
运动性 Mobility	—	—	NR	—	+	—	—	+
球-杆细胞循环 Rod-sphere cycle	+	NR	NR	+	+	+	+	+
生物素依赖 Biotin	—	+	NR	—	—	—	+	+
过氧化物酶 Catalase	+	+	NR	+	+	+	+	+
抗酸染色 Acid-fast	—	NR	NR	—	—	—	—	—
G + C mol%	65.4	61.3–62.2	61.7	66.6	65.1	ND	61.5	61.5

注: 数据来自参考文献 11–13. NR: 未见报道; ND: 未检测.  
Note: Data from references 11-13. NR: Not reported; ND: Not detected.

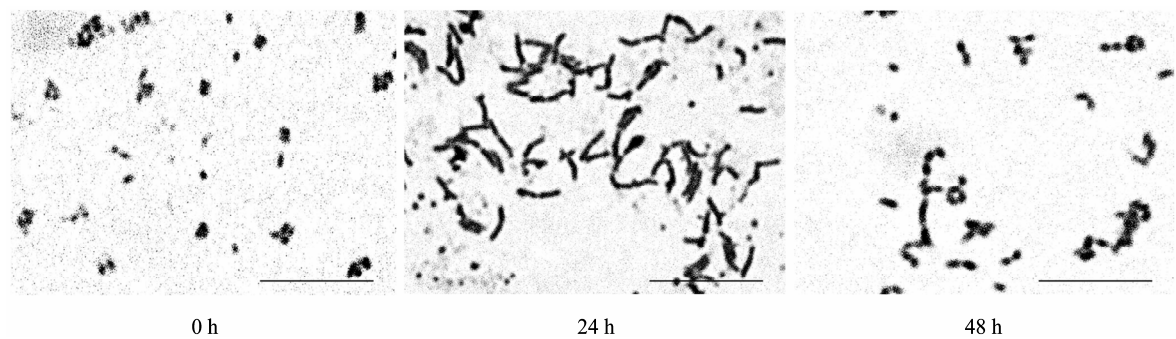


图 2 细胞球杆变化周期

Fig. 2 Cell sphere-rod cycles of *Arthrobacter*

注: 分别显示培养 0、24 和 48 h 的细胞形态变化, 标尺长度为 10 μm.

Note: The morphology of cells being cultured 0, 24 and 48 hours, respectively. Scale bar represents 10 μm.

表 3 3 个菌株的碳源利用, 重金属和抗生素抗性特征  
Table 3 Utilization of carbon sources and resistances to heavy metals and antibiotics of three strains

Strains 菌株	BS11	BS20	AS19
Melezitose	+	+	W
Melibiose	+	—	+
Inulin	+	W	W
Inosine	+	—	+
Sorbitol	—	W	+
Succinic acid	+	W	+
γ-Aminobutanoic acid	+	W	+
Citric acid	+	W	+
Glucosamine hydrochloride	+	W	+
L-Aspartic acid	+	W	+
L-Histidine	+	W	+
L-Tyrosine	+	W	—
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	8	8	4
ZnSO <sub>4</sub>	32	16	16
CdCl <sub>2</sub>	2	1	2
CuSO <sub>4</sub>	8	16	8
CoCl <sub>2</sub>	4	4	4
Ampicillin	2	8	1
Streptomycin	4	4	4
Rifampicin	16	2	2
Kanamycin	16	16	16

注: +: 能利用; —: 不能利用; W: 弱利用. 使用最低抑菌浓度 MIC (Minimum inhibitory concentration) 来评价菌株对重金属 (mmol/L) 和抗生素(mg/L)的抗性.

Note: +, — and W represent utilization, non-utilization and weak utilization, respectively. The numbers mean the minimum inhibitory concentration (MIC) of heavy metal (mmol/L) and antibiotics (mg/L).

### 3 讨论

节杆菌(*Arthrobacter*)是一种广泛分布于土壤中的 G<sup>+</sup>细菌。有研究者对沉积土 172.9 m–217.7 m 深度的化能异养菌进行研究时发现, 从冲积沙(Fluvial sands)到古土壤(Palesol)上部不同深度的样品中, 节杆菌出现频率分别为 21%、40%和 83%<sup>[9,14]</sup>。在本研究中, 这些不同年代产生的矿渣中都含有大量的节杆菌, 出现频率平均为 50% (表 1), 表明它们在这些人为的极端环境中仍然是可培养的优势细菌类群。有趣的是系统发育分析的结果表明不只一个种的节杆菌出现(图 1), 暗示该属在矿渣中可能具有某种生存竞争优势, 这可能与它们具有较强的重金属抗性特征有关(表 3)。一般来说对重金属有较高抗性的微生物多数是一些 G<sup>—</sup>细菌<sup>[15–16]</sup>, 我们的数据表明了 G<sup>+</sup>细菌也具备抗重金属的潜在能力。但这种高度耐受重金属毒性的特征在未来的环境修复中有何实际应用价值还有待研究。

尽管这些菌株是否可以作为节杆菌属的 3 个新种发表还需要通过 DNA 杂交实验以及细胞壁成分分析等工作来确定, 总的结果表明矿渣这样的特殊环境可能选择或生存着很多至今尚未被描述的种类, 因此可以作为一类人们寻找新的、具有特殊生理功能细菌种类的新环境。

### 参考文献

[1] 郁建栓. 浅谈重金属对生物毒性效应的分子机理. 环境污染与防治, 1996, 18(4): 28–31.  
[2] Konopka A, Zakharova T, Bischoff M, *et al.* Microbial

- biomass and activity in Pb-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, 1999(65): 2256–2259.
- [3] Dudka S, Adriano DC. Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review. *J Environ Qual*, 1997(26): 590–602.
- [4] 张汉波, 段昌群, 胡斌, 等. 不同年代废弃的铅锌矿渣堆中重金属的动态变化. *农业环境科学学报*, 2003, 22(1): 67–69.
- [5] 张汉波, 于春蓓, 施雯, 等. 不同时空铅锌矿渣中耐受重金属细菌群体的变化. *农村生态环境*, 2004, 20(1): 44–47.
- [6] Edwards U, Rogall T, Blöcker H, *et al.* Isolation and direct sequencing of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 1989(17): 7843–7853.
- [7] 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.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 267–294.
- [9] Crocker FH, Fredrickson KJ, White DC, *et al.* Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. *Microbiology*, 2000(146): 1295–1310.
- [10] Orsini M, Romano Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Lett Appl Microbiol*, 2001(35): 17–20.
- [11] Westerberg K, Elvang AM, Stackebrandt E, *et al.* *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(6): 2083–2092.
- [12] Koch C, Schumann P, Stackebrandt E. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(4): 837–839.
- [13] Kiedde RM, Collins MD, Jones D. Genus *Arthrobacter* Conn and Dimmick 1947, 300.//Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, *et al.* (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. New York: Springer, 1986: 1288–1301.
- [14] van Waasbergen LG, Balkwill DL, Crocker FH, *et al.* Genetic diversity among *Arthrobacter* species collected across a heterogeneous series of terrestrial deep-subsurface sediments as determined on the basis of 16S rRNA and recA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*, 2000(66): 3454–3463.
- [15] Anton A, Große C, Reißmann J, *et al.* CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol*, 1999(181): 6876–6881.
- [16] Große C, Grass G, Anton A, *et al.* Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, 1999(181): 2385–2393.

## 编辑部公告

### 关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自2008年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式:请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表;填写好之后,以E-mail附件的形式发送到编辑部邮箱: [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn), 请在邮件主题中注明“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部,联系方式: 邮箱 [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn) 或电话 010-64807511。