

## 西南印度洋中脊深海沉积物砷抗性菌的富集分离与多样性分析

陈双喜, 邵宗泽\*

(国家海洋局第三海洋研究所, 国家海洋局海洋生物遗传重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:** 【目的】为了筛选深海砷抗性菌, 了解印度洋中脊深海沉积物砷抗性菌的多样性情况。【方法】通过砷富集培养, 筛选出砷抗性菌; 通过变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析与构建 16S rDNA 克隆文库法两种手段分析了富集物中砷抗性菌的多样性。利用兼并引物 PCR, 从抗性菌株中克隆与砷抗性相关的基因。【结果】共筛选到 8 株砷抗性菌, 分别属于 *γ-proteobacteria* 的 5 个不同的属。其中, 菌株 AS-I1-3 的抗性最高, 可以在  $26 \times 10^{-3}$  mol/L 三价砷存在的情况下生长, 该菌株的 16S rDNA 序列与菌株 *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM 同源性最高 (100%)。DGGE 分析显示, 该菌是富集物中的最优势菌, 其次是盐单胞菌 (*Halomonas*) 和海杆菌 (*Marinobacter*)。16S rDNA 克隆文库分析结果进一步证明, 与菌株 AS-I1-3 序列相同的克隆子占整个克隆文库的 72.5%; 而与菌株 AS-I1-5 (*Halomonas meridiana*, 100%) 和菌株 Mn-I1-6 (*Marinobacter vinifirmus*, 99%) 序列相同的克隆子分别占 10% 和 7.5%。然而, 利用兼并引物 PCR, 仅能从 2 株非优势菌中克隆到了与砷抗性相关的基因, 表明菌群中的优势抗性菌可能有其他的抗性机制。【结论】在深海环境中存在着多种砷抗性菌, 其中 *Pseudoalteromonas* 属的菌株是该富集条件下的砷抗性优势菌。这些砷抗性菌在大洋环境砷元素的生物地球化学循环中的作用有待进一步研究。

**关键词:** 印度洋; 深海沉积物; 砷抗性菌; 生物多样性

**中图分类号:** Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1351-05

砷元素在元素周期表中位于第 33 位, 是一种类金属, 广泛存在于岩石圈、水圈和生物圈<sup>[1]</sup>, 它是一种有毒元素, 长期饮用高砷水会导致慢性砷中毒和癌症等疾病<sup>[2]</sup>。2001 年, 世界卫生组织建议将饮用水中砷的最高限度由原来的 50  $\mu\text{g/L}$  降为 10  $\mu\text{g/L}$ 。越来越多的证据表明, 细菌对砷的氧化还原作用在砷迁移过程中起着关键作用<sup>[3]</sup>, 微生物在砷的生物地球化学循环中的作用得到了地球化学家、微生物学家和环境科学家等的广泛关注。

越来越多的与砷代谢有关的微生物被不断从环境中分离出来。目前报道的砷抗性菌主要有 *Bacillus arsenoxydans*<sup>[4]</sup>, *Pseudomonas arsenoxydans*, *Xanthomonas*

*arsenoxydans*, *Achromobacter arsenoxydans*<sup>[5-8]</sup>, *Alcaligenes faecalis*<sup>[9]</sup>, *Zoogloea* sp. ULPAs1<sup>[10]</sup>, *Agrobacterium* sp. NT-25、NT-26<sup>[11]</sup>, *Hydrogenophaga* sp. YED6-4、YED6-21 和 YED1-18<sup>[12]</sup>。这些菌对三价砷的抗性一般在  $10 \times 10^{-3}$  mol/L 以下, 而报道的最高抗性可达到  $100 \times 10^{-3}$  mol/L。它们主要来源于砷污染水<sup>[10]</sup>, 牛羊圈<sup>[4-8]</sup>, 各种矿场<sup>[11]</sup>和热泉<sup>[12]</sup>。但对深海沉积物中的砷抗性菌多样性研究没有报道。

本研究综合运用富集筛选、PCR-DGGE 和构建克隆文库多种手段对西南印度洋中脊沉积物样品中砷抗性菌的多样性进行了分析。获得多株砷抗性菌, 并对它们的砷抗性范围及抗性基因作了初步分析。

基金项目: 中国大洋协会项目(DYXM115-02-2-05); 国家自然资源平台项目(2005DKA21209); 国家“973 项目”(2004CB719601, 2006CB708200)

\*通讯作者。Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介: 陈双喜(1982-), 女, 福建人, 硕士研究生, 主要从事海洋环境微生物的研究。E-mail: waly\_happy@163.com

收稿日期: 2008-04-23; 修回日期: 2008-06-05

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料:** 印度洋中脊沉积物: 2005 年“大洋一号”DY105-17A 航次采集。站点 IR-TVG1: 49.6469° (E), 37.7719° (N), 深度为 2851 m。该站点为热液活动的未知区, 附近有活动热液口。本实验使用的样品为深海表层沉积物, 样品采集后置于灭过菌的封闭的采样杯中, 于 4℃ 保存。

**1.1.2 培养基:** 抗砷富集培养基: 每升天然海水中含 2.0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 2.0 g 无水乙酸钠, 0.5 g 酵母提取物, 1.0 g 胰蛋白胨, 0.2 g 葡萄糖, pH 7.5。灭菌后加入无菌  $\text{NaAsO}_2$  至终浓度  $2 \times 10^{-3}$  mol/L。制备固体培养基时加入 15.0 g 琼脂。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**  $\text{NaAsO}_2$ , 分析纯, 德国默克 (Merck); PCR 相关试剂由 TaKaRa 提供; 恒温摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司); 生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); 超净工作台 (上海智诚分析仪器制造有限公司); Alpha Innotech 凝胶成像仪 (San Leandro, California); PCR 扩增仪 (Eppendorf); Decode System 电泳仪 (Bio-Rad 公司)。

### 1.2 砷抗性菌的富集和筛选

取深海底泥样品 1 g 于抗砷富集培养基中 (含  $2 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{NaAsO}_2$ ), 28℃、200 r/min 摇床培养 7 d, 取 1 mL 富集液转接到新的抗砷富集培养基中, 转接两次, 将 3 次转接的富集液各取 2 mL 提混合总 DNA 用, 同时将第 3 次转接的富集物梯度稀释后涂布于含  $2 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{NaAsO}_2$  的富集培养基平板上, 28℃ 温箱培养 7 d 后划线分离至纯培养。

### 1.3 细菌 DNA 提取及系统进化分析

纯培养菌株的 DNA 提取方法参照文献[13], 16S rDNA 的扩增及测序参考文献[14], 由上海英骏公司完成测序。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析。

菌群总 DNA 的提取: 充分摇匀每次转接的富集菌群培养物, 在无菌超净台取出 1 mL 富集菌群培养物, 离心回收菌体。菌群总 DNA 的提取方法同上。

### 1.4 16S rDNA PCR-DGGE

PCR 扩增及产物浓缩参考文献[15], 将浓缩后的沉淀溶解于 20  $\mu\text{L}$  无菌水, DGGE 电泳分离。DGGE 胶浓度, 电泳缓冲液, 电泳条件及染色参考文献[15]。染色后进行拍照。亮带进行 DNA 切胶回收测序, 方法参考文献[15]。

为了了解富集物中的优势菌及菌群结构变化情况, 以 3 次转接的混合菌群的总 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 基因 V3 区的通用引物进行 PCR 扩增、DGGE 分析; 为了了解富集样品中的亮带是否都有筛选出的纯培养菌株与之对应, 将筛选出的所有纯培养菌株的 16S rDNA PCR-DGGE 产物和混合菌群的 PCR-DGGE 产物同时在一块胶上样, 作 DGGE 分析。

### 1.5 16S rDNA 文库的构建

以第 3 次转接所获得的混合菌群的总 DNA 为模板, 扩增 16S rDNA<sup>[8]</sup>, 纯化 PCR 产物, 与 pMD19-T 载体连接, 转化到感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。涂板, 37℃ 培养 12 h 后, 根据蓝白筛选, 挑取阳性克隆子。用限制性内切酶 *Hae*III 酶切分型, 挑取不同带型的代表克隆子进行测序 (上海英骏公司), 用 DNAMAN 软件对测序结果进行编辑、分析, 并把编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 检索。

将序列比对结果相同的克隆子定义为一个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。统计各个 OTU 的数目并计算其在文库中所占的比例。

### 1.6 砷抗性能力的测定

测定方法如下: 将所筛选到的纯培养菌株接种到含  $\text{NaAsO}_2$  的液体抗砷富集培养基中,  $\text{NaAsO}_2$  浓度以  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 为梯度递增。用 2 mol/L 的 HCl 调 pH 至 7.4, 28℃、200 r/min 培养 3 d, 观察生长情况。每次测定均设置 3 个平行样。

对于最优势菌, 测定其抗性范围后, 将  $\text{NaAsO}_2$  浓度梯度缩小为  $1 \times 10^{-3}$  mol/L, 测定其 MIC 值 (最低的生长完全抑制浓度)。

### 1.7 ACR3 基因的扩增

引物序列参考文献[16]: ACR3R (5'-TGATCTGGTTCATGATCTTCCCVATGMTGVT-3'); ACR3F (5'-CGGCCACGGCCAGYTCRAARAARTT-3')。

以 50 ng 纯培养菌株的 DNA 为模板, 25  $\mu\text{L}$  体系 PCR 反应条件如下: 94℃ 5 min; 然后在 94℃ 45 s, 57℃ 45 s, 72℃ 30 s, 每个循环退火温度降低 0.5℃, 循环 10 次, 然后在 94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 30 s, 循环 25 次; 72℃ 7 min。

扩增的目的片段为 750 bp, 将扩增到的 PCR 产物纯化, 由上海英骏公司完成测序。测序引物为 ACR3(s): 5'-TGATCTGGGTTCATGATCT-3'。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析。

## 2 结果

### 2.1 砷抗性菌的分离

经过含  $2 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{NaAsO}_2$  液体选择性培养基富集、同样浓度的抗性平板筛选, 根据菌落形态挑选出 42

株, 并进行 16S rRNA 基因测序分析, 最后共得到 8 株序列不同的纯培养菌株。在 NCBI 进行 BLAST 分析发现这 8 株抗砷菌全部属于  $\gamma$ proteobacteria, 其中有两株属于 *Pseudoalteromonas* 属。比对结果及菌落特征见表 1。

表 1 分离自西南印度洋中脊深海沉积物中的砷抗性菌  
Table 1 Arsenite-resistant bacteria isolated from deep sea sediments of southwest Indian Ridge

MCCC accession number*	Original number	Closest relatives in GenBank database	Similarity	GenBank accession number
1A03025	CK-II-1	Idiomarina seosinensis CL-SP19	722/738 (97%)	EU770414
1A03026	CK-II-2	Pseudoalteromonas tetraodonis IAM	739/740 (99%)	EU770415
1A03027	CK-II-6	Pseudomonas alcalophila AL15-21	710/710(100%)	EU770416
1A03028	CK-II-7	Halomonas meridiana Slthf1	739/740(99%)	EU770417
1A03029	CK-II-10	Marinobacter vinifirmus FB1	589/590(99%)	EU770418
1A03031	AS-II-3	Pseudoalteromonas tetraodonis IAM	720/720(100%)	EU770412
1A03032	AS-II-5	Halomonas meridian Slthf1	730/730(100%)	EU770413
1A03033	Mn-II-6	Marinobacter vinifirmus FB1	727/730 (99%)	EU770419

\*MCCC: Marine Culture Collection of China.

### 2.2 沉积物中砷抗性菌的多样性分析

为了了解富集物中的优势菌及菌群结构情况, 以前面 3 次转接的富集培养物的菌群总 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 基因 V3 区的通用引物进行 PCR 扩增、DGGE 分析(图 1)。结果显示沉积物样品富集物中优势菌明显, 3 次转接都有一条共同的亮带, 另外有两条逐渐变亮的条带。

为了确定每条带代表的细菌, 将样品所有分离株与菌群的第 3 次转接的 DGGE 的 PCR 产物一起上样, 进行分析比对, 并对亮带进行 DNA 切胶回收测序验证。结果显示, 3 次转接中, 菌群中主要有两条亮带, 在 DGGE 图中分别编号 1 号和 2 号; 另外有几条弱带, 其中一条编号为 3 号(图 1)。经测序及 DGGE 分析, 亮带 1 序列与纯培养菌株 AS-II-3 的相应区域序列

相同, 并且条带位置上与之对应。同样, 2 号带证明是 *Halomonas*, 但是仅凭序列和 DGGE 不能确定是菌株 CK-II-7 还是 AS-II-5。根据菌落形态判断 AS-II-5 在平板上成优势, 可能是 2 带的主要贡献者。弱带 3 号未能测序, 但它在 DGGE 图上与 Mn-II-6 (*M. vinifirmus*, 99%) 对应。其他弱带既未能与所有的分离株对应, 也未能进行测序。从图 1 中可以看出, AS-II-3 (*P. tetraodonis*, 100%) 是富集物中最优势的抗性菌。

### 2.3 砷抗性能的测定

经验证, 8 株纯培养菌株都能在含  $10 \times 10^{-3}$  mol/L 砷的抗砷富集培养基中生长。其中, CK-II-1, CK-II-2, CK-II-7 的抗砷浓度介于  $10 \times 10^{-3}$  mol/L 与  $15 \times 10^{-3}$  mol/L 之间, 而 CK-II-6, CK-II-10, Mn-II-6, AS-II-5 的抗砷浓度介于  $20 \times 10^{-3}$  mol/L 与  $25 \times 10^{-3}$  mol/L 之间, 优势菌 AS-II-3 的 MIC 值为  $26 \times 10^{-3}$  mol/L。

### 2.4 16S rDNA 文库的分析结果

随随机挑取 64 个阳性克隆采用限制性内切酶 *Hae* III 酶切, 共得 5 个酶切类型, 每个酶切类型挑取 1 个代表克隆子进行测序, 测序长度为 1.6 Kb。测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 比对结果显示共得到 3 个 OTUs, 克隆文库中优势克隆子是 *Pseudoalteromonas tetraodonis* (100%), *Halomonas meridiana* (100%) 和 *Marinobacter vinifirmus* (99%), 它们分别占库容总量的 72.5%, 10% 和 7.5%, 序列分别同菌株 AS-II-3、AS-II-5 和 Mn-II-6 的序列对应相同。

### 2.5 ACR3 基因的扩增

对 8 株纯培养菌株进行 ACR3 基因的扩增, 从

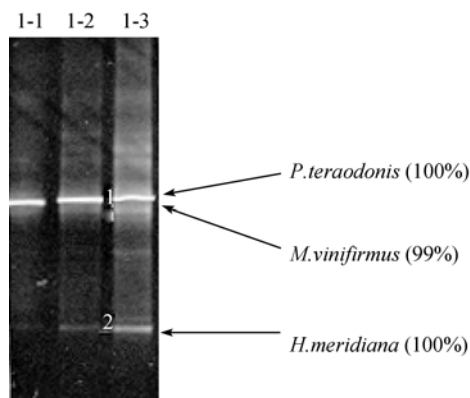


图 1 3 次转接后的砷抗性菌群的菌群结构变化

Fig. 1 The structure changes of arsenite-resistant community after different transfers. Lane 1 to 3, the first to the third transfer.

CK-II-6 (*P. alcaliphila*, 100%) 和 CK-II-10 (*M. vinifirmus*, 99%) 中各获得一个预期大小的基因片段 (750bp), 用其中的一条 PCR 引物作测序引物, 获得一个测序反应的序列。序列比对结果显示, 它们分别为 putative arsenite efflux pump (CP000514.1) (466/609, 76%) 与 arsenical-resistance protein (AM406670.1) (600/673, 89%)。但是未能从 DGGE 检测到的优势菌中克隆到 ACR3 基因。

### 3 讨论

本研究通过富集筛选、DGGE 菌群分析和 16S rDNA 建库, 研究了印度洋深海沉积物中三价砷抗性菌的多样性。DGGE 菌群分析和 16S rDNA 建库分析结果都显示, 富集物中的砷抗性优势菌是假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*), 其次是盐单胞菌 (*Halomonas*) 和海杆菌 (*Marinobacter*)。通过平板筛选, 分离和 16S rDNA 测序得到 8 株抗性菌, 可以在含 2 mmol/L 的三价砷的平板上生长。抗砷验证发现, 所有纯培养菌株都可以在含有  $10 \times 10^{-3}$  mol/L 的三价砷的液体抗砷培养基上生长, 其中 AS-II-3 抗性最高, 可以生长的最高浓度为  $26 \times 10^{-3}$  mol/L。

*Pseudoalteromonas* 属细菌在很多深海样品中都有分离到, 具有多种抗性, 如抗 Hg<sup>[17]</sup> 抗 Se 和 Te<sup>[18]</sup>, 但在有关抗砷的菌目前还未见报道。而本文提及的另外 2 株次优势菌的砷抗性研究, 亦未见公开报道。但是 *Marinobacter aquaeolei* VT8 的基因组全序列中有假设 ArsA ATPase 编码基因。本实验检测到的这 3 株优势菌, 在印度洋的其他站点 (IR-TVG2 和 IR-RVG3) 也有分离到, 但不属于优势菌 (未发表)。总之, 对于抗砷菌群的分析文章比较少, 尤其是深海环境中的抗砷菌群的分析, 目前仍未见报道。

关于细菌砷抗性机制研究最多的是 *ars operon* 系统, 该系统有两个固定组分, As(V)还原酶 (Ars C) 及 As(III) 流出泵 (Ars B 或 ACR3)。我们用 ACR3 引物对 8 株纯培养菌株进行了扩增, 仅从其中的 2 株中得到了两个目的基因片段, 测序结果证明分别与一个推测的砷泵出泵和砷抗性蛋白有一定同源性。但是从抗性优势菌中却没有克隆到类似基因。这暗示着它们可能有其他的抗性机制。

本文的研究结果对于了解深海沉积物中重金属抗性微生物的多样性和砷在大洋环境中的生物地球化学循环过程有参考价值。

### 参 考 文 献

- [1] Cullen WR, Reimer KJ. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev*, 1989, 89(4): 713–764.
- [2] Ng JC, Wang J, Shraim A. A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, 2003, 52(9): 1353–1359.
- [3] Oremland RS, Stolz JF. The Ecology of Arsenic. *Science*, 2003, 300: 939–944.
- [4] Green HH. Description of a bacterium that oxidizes arsenite to arsenate, and one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. *S African J Sci*, 1918, 14: 465–467.
- [5] Turner AW. Bacterial oxidation of arsenite. *Nature*, 1949, 164: 76–77.
- [6] Turner AW. Bacterial oxidation of arsenite. I. Description of bacteria isolated from arsenical cattle dipping fluids. *Aust J Biol Sci*, 1954, 7(4): 452–476.
- [7] Legge JW, Turner AW. Bacterial oxidation of arsenite. III. Cell-free arsenite dehydrogenase. *Aust J Biol Sci*, 1954, 7(4): 496–503.
- [8] Legge JW. Bacterial oxidation of arsenite. IV. Some properties of bacterial cytochromes. *Aust J Biol Sci*, 1954, 7(4): 504–514.
- [9] Phillips SE, Taylor ML. Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl Environ Microb*, 1976, 32(3): 392–399.
- [10] Weeger W, Lievreumont D, Perret M, *et al.* Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *BioMetals*, 1999, 12(2): 141–149.
- [11] Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, *et al.* A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microb*, 2000, 66(1): 92–97.
- [12] Salmassi TM, Walker JJ, Newman DK, *et al.* Community and cultivation analysis of arsenite oxidizing biofilms at Hot Creek. *Environ Microbiol*, 2006, 8(1): 50–59.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998, pp13–50.
- [14] Murray AE, Hollibaugh JT, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterio-plankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16SrDNA fragments. *Appl Environ Microb*, 1996, 62 (7): 2676–2680.
- [15] 刘真, 邵宗泽. 南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性初步分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(5): 869–873.
- [16] Achour AR, Bauda P, Billard P. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol*, 2007, 158(2), 128–137.
- [17] Iohara K, Iiyama R, Silver S, *et al.* The mer operon of a mer-

cury-resistant *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain isolated from Minamata Bay, Japan. *Appl Microbiol Biot*, 2004, 56: 736–741.

[18] Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, *et al.* Isolation of tel-

urite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microb*, 2002, 68(9): 4613–4622.

## Enrichment and diversity analysis of arsenite-resistant bacteria in deep sea sediment samples from southwest Indian Ocean ridge

Shuangxi Chen, Zongze Shao\*

(Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract: [Objective]** The aim of this study was to assess the diversity of arsenite-resistant bacteria in deep sea sediment of the southwest Indian Ocean Ridge. **[Method]** Arsenite-resistant bacteria in the deep-sea sediment were enriched with  $2 \times 10^{-3}$  mol/L NaAsO<sub>2</sub> and isolated on plates. Their diversity was further examined by Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 16S rDNA library analysis. Furthermore, the gene encoding putative arsenite efflux pump was detected with degenerate primers among these isolates. **[Result]** Eight arsenite-resistant isolates were obtained; they belonged to five different genera of  $\gamma$ -proteobacteria. One isolate named As-II-3 can grow in presence of  $26 \times 10^{-3}$  mol/L NaAsO<sub>2</sub>, showed highest similarity to *Pseudoalteromonas tetradonis* IAM (100%). DGGE result showed that As-II-3 was dominant in arsenite enriched community, followed by isolate As-II-5 (*Halomonas meridiana*, 100%) and Mn-II-6 (*Marinobacter vinifirmus*, 99%). 16S rDNA library analysis reconfirmed the result of DGGE, which showed that the three bacteria occupied 72.5%, 10% and 7.5% of the total OTUs (operational taxonomic units), respectively. However, only from other two isolates which were not dominant, the gene encoding a putative arsenite efflux pump was obtained. **[Conclusion]** Different bacteria of arsenite-resistance inhabited in deep sea environment, among which *P. tetradonis* (100%) showed highest resistance; they might play a certain role in the geobiocycling of arsenic element in marine environments.

**Keywords:** Indian Ocean; deep-sea sediment; arsenite-resistant bacteria; diversity

Supported by the COMERA program (DYXM115-02-2-05), the National Infrastructure of National Resources for Science and Technology Program of China (2005KDA21209) and the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601; 2006CB708200)

\*Corresponding author. Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

Received: 23 April 2008/ Revised: 5 June 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于审稿

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 我们的承诺是争取在 2 个月之内给予答复, 5~7 个月之内刊出。

- (1) 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的), 作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问: 如我的投稿没有被贵刊录用, 是否告知退稿原因? 对退稿有异议怎么办?

答: 本着对每一篇投稿负责的原则, 本刊一贯遵循三审制的制度, 即: 编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿, 都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- (1) 对于每一篇退稿, 我们都会详细写明退稿原因, 为您进一步修改论文提供帮助。
- (2) 如您对退稿意见有异议, 可以给我们写信表明看法, 本刊将请专家予以复审。

问: 我可否指定审稿人, 或言明请某审稿人回避?

答: 您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单, 或请予回避的审稿人名单, 供编辑部参考, 但编辑部是否采纳将视具体情况而定。