

一株纤维素降解真菌的筛选及鉴定

许玉林^{1,2} 郑月霞^{1,2} 叶冰莹^{1,2} 张积森^{1,2} 陈由强^{1,2*}

(1. 福建师范大学 生命科学学院 福建 福州 350108)

(2. 农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室 福建 福州 350108)

摘要: 【目的】分离筛选高效降解纤维素的真菌菌株, 并研究其产酶能力。【方法】利用刚果红染色法从甘蔗地土壤中分离纤维素降解真菌, 再通过测定滤纸的降解率及发酵酶活复筛。【结果】综合考虑水解圈, 水解圈和菌株直径的比值(HC 值), 滤纸的降解率和复筛酶活, 对试验真菌降解纤维素的能力进行综合评价, 筛选到具有较强纤维素降解能力的真菌菌株 SJ1, 经形态学观察及分子生物学鉴定, 该菌属于草酸青霉。其滤纸酶活、内切葡聚糖酶酶活(CMC 酶活)、 β -葡聚糖苷酶酶活和外切葡聚糖酶酶活(CBH 酶活)分别为 25.15、740.42、58.03 和 2.442 U/mL。【结论】菌株 SJ1 是一株十分具有研究开发潜力的纤维素酶生产菌株。

关键词: 纤维素降解真菌, 内切葡聚糖酶活, 草酸青霉

Isolation and identification of a cellulose degrading fungi

XU Yu-Lin^{1,2} ZHENG Yue-Xia^{1,2} YE Bing-Ying^{1,2}

ZHANG Ji-Sen^{1,2} CHEN You-Qiang^{1,2*}

(1. College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. Key Laboratory of Fujian Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen efficient cellulose degrading strains and to investigate their cellulase-producing conditions. **[Methods]** The fungus were screened

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. CARS-20-4-4)

*通讯作者: ✉: yqchen@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2012-03-28; 接受日期: 2012-06-05

from sugarcane soil by using the Congo red dye test, then measured the degradation rate of filter paper and the enzyme activity for second-screening. [Results] The hydrolyzation zone, clearing zone ratios (clearing zone diameter/colony diameter), the degradation rate of filter paper and cellulose activity were taken as evaluating selection criteria. We isolated one fungi with cellulose degrading ability, of which SJ1 was identified as *Penicillium oxalicum* by morphological and molecular technology. The results showed that the filter paper activity (FPA), endoglucanase activity (CMCase activity), β -glucosidase activity and exoglucanase activity (CBH activity) of SJ1 were 25.15 U/mL, 740.42 U/mL, 58.03 U/mL and 2.442 U/mL, respectively. [Conclusion] Strain SJ1 was a cellulase-producing strain with broad development potential.

Keywords: Cellulose degrading fungi, CMCase activity, *Penicillium oxalicum*

纤维素是一种由葡萄糖首尾相连而成的高分子化合物,是自然界中含量最丰富、分布最广的可再生资源,但是大部分的纤维素物质都没有得到充分有效的利用,随着各国对能源危机的重视,人们开始寻求能够改善能源资源紧张的方法。纤维素酶是降解纤维素所需的一组酶的总称,它包括内切型葡聚糖水解酶、外切型葡聚糖水解酶和 β -葡萄糖苷酶等组分^[1],纤维物质可在这三类酶的协同作用下最终水解为葡萄糖,再通过酵母发酵生成乙醇。作为一种生物能源,乙醇有望取代日益减少的化石燃料(如石油和煤炭)^[2],从而改善能源资源危机及环境污染等问题。近年来,国内外的研究重点主要是从土壤中分离得到高产纤维素细菌、真菌或对实验室已有的菌株进行突变处理及产酶条件的优化,以寻找产纤维素酶能力强的菌株^[3-4]。但是当前的纤维素产生菌的酶活力都普遍偏低,因此,筛选纤维素酶高产菌株已成为当前研究的重要工作之一。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 采自福建农林大学和福建师范大学的甘蔗基地,4 °C 保存。

1.1.2 培养基: 初筛培养基(g/L): CMC-Na 10, (NH₄)₂SO₄ 4, KH₂PO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.5 蛋白胨 1, 琼脂 16。

YPD 培养基(g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 琼脂 20。

种子培养基(g/L): CMC-Na 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母膏 10.0, KH₂PO₄ 2.0, (NH₄)₂SO₄ 1.5。

液体发酵培养基(g/L): 麸皮 7.5, 玉米芯 7.5, MnSO₄ 0.4, K₂HPO₄ 0.4, 蛋白胨 3, 酵母粉 3。

1.1.3 滤纸的处理: 使用前将其用 1% 的醋酸溶液浸泡一昼夜以除去淀粉,用碘液检验,再用 2% 的 NaHCO₃ 溶液洗至中性,晒干。

1.2 菌种的筛选

1.2.1 菌株的分离和纯化: 将采集到的土样用无菌水稀释制成不同浓度的土壤悬浊液后,分别涂布于初筛培养基上[倒平板前在 100 mL 培养基中加入链霉素(10 g/L) 30 μ L, 2% 的去氧胆酸钠 200 μ L], 于 28 °C 培养箱中培养,待长出菌落后,挑取单一菌落于初筛培养基上再次培养,直到得到纯的单一菌落。将得到的单一菌落用刚果红染液染色 20 min, 1 mol/L 的 NaCl 溶液脱色 15 min 后,根据透明圈的大小选择高产酶菌株。

1.2.2 滤纸的降解情况及失重率: 将分离纯化得

到的菌株,置于 250 mL 装满 50 mL 的种子培养基中 28 °C、150 r/min 的摇床中培养 2 d 制成种子液。将滤纸烘干、称重,记录每张滤纸的初重量,然后将每张滤纸剪成 1 cm×6 cm,分别装入 250 mL 装有 50 mL 赫奇逊氏无机盐培养基的锥形瓶中,灭菌。接入 3 mL 种子液,于 28 °C、80 r/min 摇床中培养,每菌做 3 个平行,每日观察滤纸条的崩溃情况,72 h 后用滤纸过滤发酵液,用稀盐酸和硝酸的混合液冲洗去除菌体^[5],反复缓慢冲洗过滤纸条,然后 80 °C 烘干称重,根据滤纸条的断裂程度判断滤纸崩溃情况:

(+)为滤纸边缘膨胀;

(++)为滤纸整齐膨胀并弯曲;

(+++为滤纸不定行,基本成糊状;

(++++为成糊状。

培养终止后计算滤纸的失重率。

滤纸的失重率=

$$\frac{\text{滤纸失重前的重量}-\text{滤纸失重后的重量}}{\text{滤纸失重前的重量}} \times 100\%$$

1.2.3 菌种的复筛:将种子液按 5%的量接种于 250 mL 装有 50 mL 产酶培养基的锥形瓶中于 150 r/min 摇床中培养 4 d,每菌接 3 瓶,做 3 个平行,将所得样液 10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液即为粗酶液,用于酶活的测定。

1.2.4 酶活力的测定:(1) 滤纸酶活力(FPA)的测定^[6]。在试管(一支空白管,3 支样品管)中加入 1.5 mL 0.05 mol/L pH 4.5 的柠檬酸缓冲液,加入滤纸条 50 mg,置于 50 °C 水浴中预热 5 min,再加入 0.5 mL 稀释好的酶液(空白管不加),50 °C 水浴中保温 1 h 后取出,立即向各管加入 1.5 mL 的 DNS 试剂,再于空白管中加入稀释的酶液 0.5 mL,摇匀,将 4 支试管同时放入沸水中加热 10 min 后取出,迅速冷却至室温,定容至 10 mL。于 520 nm 波长下测 OD 值。

(2) 内切葡聚糖酶(CMC)活力的测定^[7]。在试

管中加入 1.5 mL 1% CMC 柠檬酸缓冲液,预热 5 min 后,加入 0.5 mL 稀释好的酶液,50 °C 水浴中保温 30 min 后取出,显色过程及对照如滤纸酶活测定。于 520 nm 波长下测 OD 值。

(3) β -葡聚糖苷酶酶活力的测定^[8]。在试管中加入 1.5 mL 0.5% 水杨苷柠檬酸缓冲液,预热 5 min 后,加入 0.5 mL 稀释好的酶液,50 °C 水浴中保温 30 min 后取出,显色过程及对照如滤纸酶活测定。于 520 nm 波长下测 OD 值。

(4) 外切葡聚糖酶(CBH)活力的测定^[9]。在试管中加入 1.5 mL 0.05 mol/L pH 5.0 的柠檬酸缓冲液,加入脱脂棉 50 mg,置于 45 °C 水浴中预热 5 min,再加入 0.5 mL 稀释好的酶液,45 °C 水浴中保温 24 h 后取出,显色过程及对照如滤纸酶活测定。于 520 nm 波长下测 OD 值。

以上酶活力单位(U/mL)定义为:在测定条件下,1 mL 酶液每分钟水解底物生成 1 μ g 葡萄糖所需的酶量。

$$\text{酶活力}=(S \cdot D \cdot 1\ 000)/V \cdot T$$

其中,S:由样品的平均吸光值在标准曲线上相对应的葡萄糖含量(mg);D:粗酶液稀释的倍数;1 000:mg 与 μ g 之间的换算系数;V:参与反应的粗酶液体积(mL);T:反应时间(min)。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 菌株的形态特征:根据《真菌鉴定手册》^[10],采用改良后的制片法培养真菌。在培养皿中放入盖玻片,然后将灭好菌的 CMC-Na 培养基倒入培养皿中,以没过盖玻片 1 mm 为宜,等培养基凝固后用另一片盖玻片将凝有固体培养基的盖玻片切下放在培养皿中,然后将菌体点样在培养基上,封口放于 28 °C 恒温箱中培养。培养 48 h 后用无菌镊子取出已经长好菌丝体(菌体大小直径为 1 cm 左右)的盖玻片,放于载玻片上,用棉兰染液染色 1 min 后,吸干染液,然后用另一盖玻片覆盖住菌丝体,放于显微镜下观察。

1.3.2 分子生物学鉴定: 采用 rDNA ITS 基因序列分析^[11], 以分离得到的菌株 DNA 为模板, PCR 扩增其 ITS 序列。扩增的引物为真菌的通用引物: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT-3')和 ITS4 (5'-T CCTCCGCTTATTGATATGC-3'), PCR 反应体系为 50 μ L, 包括: 10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTPs 4 μ L, 上游引物 2 μ L, 下游引物 2 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 模板 5 μ L, 蒸馏水补足至 50 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

PCR 扩增产物经电泳、胶回收、连接及转化后, 用 TaKaRa 质粒抽提试剂盒提取质粒后送去测序, 将所得序列于 NCBI 中进行 BLAST, 并借助软件 ClustalX 1.83 及 BioEdit 进行序列之间的比对, 而后采用 MEGA (Version 4.0)软件包中的 Kimura two-parameter 矩阵模型和 Neighbor-Joining 法^[12]构建进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株的初筛及滤纸的降解

采集到的样品, 经 CMC 平板初筛和刚果红染色、NaCl 脱色后得到有清晰透明圈的真菌菌株 17 株, 挑选透明圈大且滤纸降解率大于 5%的菌

株 6 株进行酶活的复筛, 其透明圈直径与菌落直径的比值(HC 值)及滤纸的降解如表 1 所示。

2.2 菌株的复筛

对初筛获得的能产生透明水解圈且对降解滤纸较好的真菌菌株进行发酵培养, 根据绘制的葡萄糖标准曲线计算粗酶液的滤纸酶活力、CMC 酶活力、 β -葡聚糖苷酶酶活力和 CBH 酶活力进行复筛, 其结果如表 2 所示。

由表 1 和表 2 可以看出, 各菌都具有一定的产纤维素酶能力, 菌株 C3-5、SJ1 对天然滤纸有较强的降解能力, 通过 SPSS 数据处理软件对各菌酶活的显著性分析(表 2), 可以看出: (1) 菌 SJ1 的滤纸酶活高于其他 5 种菌, 但与 C3-5 和 I9-3 的差异不显著, 而与菌 I9-4、K11-1 和 M13-1 差异极显著; (2) SJ1 的 CMC 酶活与其他 5 种菌差异极显著, 明显高于其他 5 种菌; (3) 菌 SJ1 的 β -葡萄糖苷酶活与其他菌差异极显著, 高于菌 C3-5、I9-3、I9-4、M13-1, 但低于菌 K11-1; (4) 菌 SJ1 的 CBH 酶活低于菌 I9-3, 差异极显著, 但高于其他 4 种菌。综合分析, 菌株 SJ1 的产酶能力较强, 酶活均相对高于其他菌株, 是一株优势菌株, 所以选其作为目的菌株, 对其进行下一步的研究。

表 1 各菌株的 HC 值及滤纸降解
Table 1 The clearing zone ratios and degradation of filter paper

菌株编号 The number of strains	HC 值 The clearing zone ratios	滤纸的崩溃程度 The collapse degree of filter paper (3 d)	滤纸的降解率 The degradation rate of filter paper (%)
C3-5	2.02 \pm 0.05	++++	28.26
I9-3	1.32 \pm 0.03	++	8.45
I9-4	1.16 \pm 0.01	+	7.10
K11-1	1.04 \pm 0.02	+	7.33
M13-1	1.43 \pm 0.01	++	8.54
SJ1	1.40 \pm 0.03	+++++	32.95

注: +: 崩溃程度; +越多, 滤纸降解程度越高。

Note: +: Collapse degree. The more "+" are, the higher degradation of the filter paper.

表 2 纤维素酶活力
Table 2 Enzyme activity of strains

菌株编号 The number of strains	酶活 Enzyme activity (U/mL)			
	滤纸酶活 Filter paper activity	CMC 酶活 Endoglucanase activity	β -葡萄糖苷酶活 β -Glucosidase activity	CBH 酶活 Exoglucanase activity
	C3-5	21.18 \pm 8.12 AaBb	319.12 \pm 46.63 Ee	31.45 \pm 5.15 Cc
I9-3	22.87 \pm 2.60 AaB	481.06 \pm 44.27 CcD	26.15 \pm 1.74 Cc	4.056 \pm 0.13 Aa
I9-4	10.42 \pm 1.17 CcD	415.67 \pm 33.73 Dd	30.37 \pm 2.88 Cc	1.895 \pm 0.23 CcDd
K11-1	3.81 \pm 0.34 Dd	148.13 \pm 17.34 Ff	100.85 \pm 4.33 Aa	0.804 \pm 0.11 Ee
M13-1	16.05 \pm 1.41 BbCc	637.98 \pm 3.22 Bb	30.61 \pm 2.46 Cc	2.285 \pm 0.01 BbCc
SJ1	25.15 \pm 1.87 Aa	740.42 \pm 6.99 Aa	58.03 \pm 5.50 Bb	2.442 \pm 0.06 BbC

注: 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: The capital letter indicates utmost significantly different and the different lowercase letter indicates significantly different.

2.3 菌株的鉴定

2.3.1 形态学观察: 菌落在 CMC 培养基上生长较快, 菌丝初始为白色绒状并呈辐射生长, 然后长出青绿色的孢子, 随着培养时间的延长, 孢子变成暗绿色, 菌落边缘整齐, 中间突起, 具横隔, 背面暗绿色。在显微镜下观察, 如图 1 所示, 菌丝体上长出“帚状”的分生孢子梗, 最末端长出成串的分生孢子, 分生孢子椭圆形。经真菌形态学手册形态特征描述, 初步判断该菌株属于青霉菌属 (*Penicillium*)。

2.3.2 分子生物学鉴定: 以纤维素高效菌株 SJ1 的 DNA 为模板, 进行 ITS 序列扩增, 然后用 1%

的琼脂糖凝胶电泳检测 SJ1 的 PCR 产物, 结果如图 2 所示, 扩增的 DNA 目的片段清晰且无杂带, 大小在 590 bp 左右。

将 SJ1 的 PCR 产物经胶回收试剂盒回收、pMD19-T Vector 载体连接和转化后送至 TaKaRa 公司测序, 所得的序列长度为 590 bp (图 3)。

将测序结果与 NCBI 的数据库进行 BLAST 同源性比对, 选取同源性较高的菌株进行系统发育树的分析, 并借助软件 ClustalX 1.83 及 BioEdit 进行序列之间的比对, 而后采用 MEGA

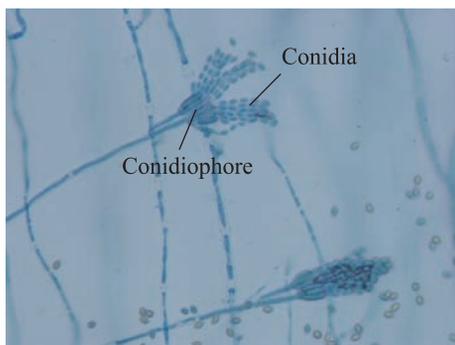


图 1 SJ1 菌株的形态特征(100 \times)

Fig. 1 The morphologic characteristics of SJ1 strain (100 \times)

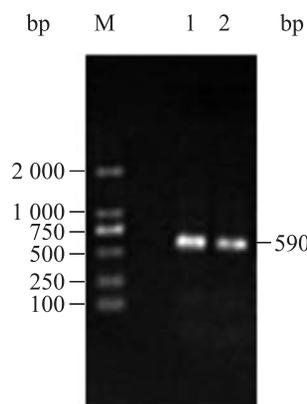


图 2 SJ1 的 ITS rDNA 鉴定

Fig. 2 Identification of SJ1 ITS rDNA

注: 1、2: SJ1 菌株的 ITS 序列。

Note: 1, 2: The ITS sequence of SJ1.

```

1   TCCGTAGGTG AACCTGCCGA AGGATCATT A CCGAGTGAGG GCCCTCTGGG TCCAACCTCC
61  CACCCGTGTT TATCGTACCT TGTGCTTCC GCGGGCCCCG CTCACGGCCG CCGGGGGGCA
121 TCCGCCCCCG GGCCCGCGCC CGCCGAAGAC ACACAAACGA ACTCTTGTCT GAAGATTGCA
181 GTCTGAGTAC TTGACTAAAT CAGTTAAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG GTTCCGGCAT
241 CGATGAAGAA CGCAGCGAAA TGGCATAAGT AATGTGAATT GCACAATTCA GTGAATCATC
301 GAGTCTTTGA ACGCACATTG CGCCCCCTGG TATTCCGGGG GGCATGCCTG TCCGAGCGTC
361 ATTGCTGCCC TCAAGCACGG CTTGTGTGTT GGGCTCTCGC CCCCCGCTTC CGGGGGGCGG
421 GCCCCAAAAG CAGCGCGCGC ACCCGCTCCG GTCCTCGAGC GTATGGGGCT TCGTCACCCG
481 CTCTGTAGGC CCGGCCGGCG CCCGCCGGCG AACACCATCA ATCTTAACCA GGTTGACCTC
541 GGATCAGGTA GGGATACCCG CTGAACTTAA GCATATCAAT AAGCGGAGGA
    
```

图 3 菌株 SJ1 的 ITS rDNA 基因序列
Fig. 3 The ITS rDNA gene sequence of SJ1

(Version 4.0)软件包中的 Kimura two-parameter 矩阵模型和 Neighbor-Joining 法进行进化树的构建。结果如图 4 所示, 由图 4 可以看出, 纤维素酶高产菌株 SJ1 与草酸青霉 *Penicillium oxalicum* (HE651152.1)聚为一支, Bootstrap 验证分值高达 100, 结果可靠。

3 讨论

纤维素降解真菌广泛存在于自然界中, 其降

解纤维物质主要是通过分泌大量的胞外酶来进行的, 这一特点使得纤维素降解真菌在纤维素酶的开发和应用上, 具有细菌、放线菌等其他菌株所不具有的优势。目前, 纤维素降解真菌的研究和应用主要集中在木霉属、青霉属和曲霉属等, 而青霉属(*Penicillium*)真菌具有生长快和易培养的优点, 其不仅能够分泌比较全的降解天然木质纤维材料的聚糖酶系, 而且较木霉纤维素酶系能够产较多的 β -葡萄糖苷酶^[13]。

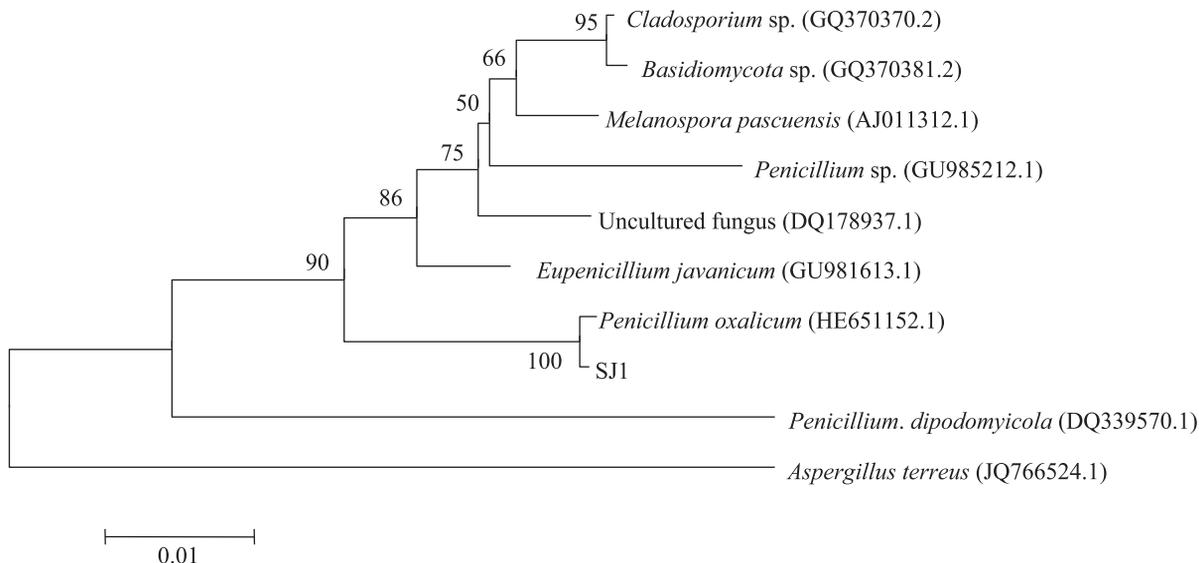


图 4 菌株 SJ1 与相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain SJ1 and its relatives

注: 括号中的序号表示 GenBank 登录号; 树枝上的数字表示 Bootstrap 值; 标尺表示分支长度。

Note: The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers. The numbers on each branch indicate the bootstrap values (1 000 bootstrap replicates). The scale bar defines branch length.

本试验通过 CMC 固体培养基初筛, 结合透明圈的大小和滤纸的降解率, 从甘蔗土壤中筛选到 6 株纤维素酶活较高的真菌菌株, 再对这 6 株菌株进行滤纸酶活、CMC 酶活、 β -葡萄糖苷酶活和 CBH 酶活的测定, 最终得到一株高酶活的菌株 SJ1, 经形态学观察及分子生物学鉴定, 该菌株属于草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。所筛选到的青霉属真菌 SJ1 具有较全的纤维素酶系和较好的产酶能力, 对天然的滤纸具有较高的降解率, 其在 3 d 内对滤纸的降解率为 32.95%。

此外, 本试验还对 SJ1 与黑曲霉的产酶活力在同等条件下进行了比较, 结果显示, SJ1 的各酶活都明显高于黑曲霉, 但由于菌株的生产习性及其最适产酶条件等存在差异, 且目前对酶活的测定和计算都还没有统一的方法, 所以单从酶活的对比上比较不同菌酶活的高低还缺乏一定的说服力。所以在菌种筛选方法上, 本试验从菌株对滤纸的降解出发进行初筛, 通过实验中对滤纸的形态变化观察及降解率的计算来定性地分析菌株分解纤维素能力的高低, 从而能够确切地筛选到高酶活的菌株。

目前, 关于青霉属中能够降解纤维物质的菌株报道比较多的有斜卧青霉(*P. decumbens*)、微紫青霉(*P. janthinellum*)和绳状青霉(*P. funiculosum*)等, 但对草酸青霉的研究报道还比较少。草酸青霉 SJ1 是本试验中获得的产纤维素酶最好的菌株, 其产酶能力较好, 且对滤纸的降解能力较强, 是一株具有研究潜力的菌株, 接下来将对 SJ1 的发酵条件等进行优化, 并研究其内切葡聚糖酶基因在酵母中的高效表达, 进一步为研究草酸青霉的应用奠定基础。

参考文献

- [1] Tangnu SK, Blanch HW, Wilke CR. Enhanced production of cellulose, hemicellulase and β -xylosidase by *Trichoderma reesei* (RUT-C30)[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1981, 23(8): 1837-1849.
- [2] 张继泉, 王瑞明, 孙玉英. 利用木质纤维素生产燃料酒精的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2003, (1): 39-42.
- [3] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 506-577.
- [4] Verena S, Christian G, Irina SD, et al. The Hyp Creajecorina (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 327.
- [5] 宫玉胜, 李玉成, 吴旺宝, 等. 中温(37 °C)纤维素分解菌的筛选及混合培养研究[J]. *生物技术*, 2010, 20(2): 50-53.
- [6] Coward-Kelly G, Aiello-Mazzari C, Kim S, et al. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82(6): 745-749.
- [7] Mandels M, Sternbrg D. Recent advances in cellulose technology[J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1976, 54(4): 267-286.
- [8] Christakopoulos P, Goodenough PW, Kekos D. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 224(2): 378-385.
- [9] Li RQ, Wang AY, Kong LD. Isolation and screening of a cellulose-decomposing fungus strain[J]. *Journal of Shanxi University: Natural Science Edition*, 2006, 9(3): 317-320.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1985, 1(1): 17-20.
- [12] Eickmeyer K, Huggins P, Pachter L, et al. On the

- optimality of the neighbor-joining algorithm[J]. Algorithms for Molecular Biology, 2008, 3: 5.
- [13] Jørgensen H, Mørkeberg A, Krogh KBR, et al. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2005, 36(1): 42–48.

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/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“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 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.255)