

# 四川大公古盐井中可培养中度嗜盐菌的初步分析

冯 玮<sup>1</sup> 向文良<sup>1,2</sup> 郭建华<sup>1</sup> 宋 鹏<sup>3</sup> 张 驰<sup>1</sup> 杨志荣<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

(2. 西华大学生物工程学院 成都 610039)

(3. 四川大学生命科学学院 成都 610064)

**摘 要:**以四川自贡大公古盐井盐卤为研究对象,分离获得112株中度嗜盐菌。经形态特征、生理生化特征和16S rRNA同源序列分析表明:112菌株分属于细菌域的*Planococcus*、*Halomonas*、*Halobacillus*、*Oceanobacillus*和*Virgibacillus*属,与*P. rifitiensis*和*H. venusta*、*H. trueperi*、*H. blutaparonensis*、*V. picturae*在16S rRNA基因水平分别有100%和99%的高相似性。但菌株QW06、QW12、QW15和QW18分别与*O. profundus*、*H. trueperi*和*H. blutaparonensis*在菌落形态、革兰氏染色、产酸、明胶水解和淀粉水解等表型特征上有明显的差异。同时,16S-23S rRNA ISR-PCR基因指纹图谱也表明QW06、QW12、QW15和QW18不同于参考菌株*O. profundus* KCCM 42318和*H. trueperi* DSM 1040<sup>T</sup>、*H. blutaparonensis* ATCC BAA 1217<sup>T</sup>,说明QW06、QW12、QW15和QW18分类地位有待进一步确定。实验结果不仅揭示了大公古盐井中可培养中度嗜盐菌的多样性和系统发育关系,而且也表明了16S rRNA高度相似菌的16S-23S rRNA ISR在进化的过程中发生了某些突变。

**关键词:**大公古盐井,中度嗜盐菌,表型分析,16S rRNA系统发育,16S-23S rRNA ISR特性分析

## A Primary Investigation on the Culture-dependent Moderately Halophilic Bacteria Colonizing in Dagong Ancient Brine Well, Sichuan

FENG Wei<sup>1</sup> XIANG Wen-Liang<sup>1,2</sup> GUO Jian-Hua<sup>1</sup> SONG Peng<sup>3</sup>  
ZHANG Chi<sup>1</sup> YANG Zhi-Rong<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-resource and Bio-control, Sichuan University, Chengdu 610064)

(2. College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039)

(3. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

**Abstract:** 112 aerobic moderate halophilic bacteria were isolated from Daong Ancient Brine Well located in Zigong city, Sichuan Province, China. And they were subjected to the analysis of phenotype, physiology, 16S rRNA sequence. Furthermore, the intra specific phylogeny of closely related strains was also screened by PCR fragment length polymorphism of 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer regions (ISR). The result showed that the halophilic isolates found in current study were closely related to the following genera:

*Planococcus*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus* and *Virgibacillus*, a lineage of the domain Bacteria. 16S rRNA analysis revealed that their sequences sharing 100% and 99% similarity were obtained from the GenBank database for *P. rifitiensis*, *H. venusta*, *H. trueperi*, *H. blutaparonensis*, *O. profundus* and *V. picturatae*. However, isolates QW06, QW12, QW15 and QW18 exhibited differences from their corresponding reference strains to some degree, including colony pigmentation, gram staining, acid production and hydrolysis of gelatin, casein and starch. The ISR analysis disclosed variation of banding pattern in these isolates related to *Oceanobacillus* and *Halobacillus* which was observed with phenotypic and physiological characterizations as well. It was clear that these halophiles have adapted to the special man-made hypersaline environment by the basic physiological evolution during phylogenesis. So they could be determined according to further polyphasic taxonomy data. The current primary result also indicated the diversity of species of culture-dependent moderately halophilic bacteria colonizing in Dagong Ancient Brine Well as well as phenotypic and genotypic and phylogenetic diversity.

**Keywords:** Dagong ancient brine well, Moderately halophilic bacteria, Phenotype, 16S rRNA, 16S-23S rRNA ISR

中度嗜盐菌广泛生存于各种盐生环境中, 是一类在5%~20% NaCl的环境中有最佳生长能力的极端微生物<sup>[1]</sup>, 主要位于细菌域的各主要系统发育分支上, 也包括古菌和真菌中的某些类群。在对高盐环境的早期研究中, 中度嗜盐菌常常被忽略。直到20世纪90年代, 伴随着对各种地理条件下极端高盐环境中古菌的研究, 大量的中度嗜盐菌被发现, 这一类群微生物才引起了人们的注意<sup>[2]</sup>。各种盐生环境, 包括盐湖、海洋等盐水环境, 盐碱地、盐池等盐土环境, 盐渍发酵食品等人工盐生环境被广泛的研究。随着研究的深入, 人们越来越清楚地认识到其重要性。特别是在长期盐胁迫下, 中度嗜盐菌进化所形成的独特的生理功能、遗传特性以及在生物电子、医药和工业生产中潜在的用途等方面都强烈地吸引着人们的注意, 引起了极大的关注<sup>[3]</sup>。

四川自贡享有“盐都”之称, 其特殊的地质构造孕育了地下丰富的盐卤资源。在秦汉时期, 四川的先民就开始了造井制盐, 其中著名的古盐井有: 自流井、贡井和大公井<sup>[4]</sup>。作为一种古老的特殊人造盐生环境, 对其嗜盐菌的调查还未见报道。本研究以位于自贡荣县开凿于北周武帝时期的大公盐井盐卤为研究对象, 研究其中度嗜盐菌分类地位及系统发育, 并在分子水平上进行了16S-23S rRNA间区PCR片段指纹图谱分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品的采集和菌株的分离

从自贡大公盐井井壁及相关的制盐设备上共采

集盐土、盐结晶和卤水等样品12个。菌种分离和富集培养采用参照Gochner等方法<sup>[5]</sup>。向CM培养基中接入适量样品, 30°C、150 r/min光照富集培养14 d~30 d后CM平板分离、纯化后于4°C保藏。

CM培养基(g/L): 酵母膏 10.0 g; 酪氨酸 7.5 g; 柠檬酸三钠 3 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 g; KCl 2.0 g; FeCl<sub>2</sub> 0.02 g; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.36 g; NaCl 100 g; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3.0 g, 其中NaCl和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>配成溶液分别灭菌后加入, 调pH 7.3, 加无菌水定容至1000 mL。

### 1.2 表型性状分析

参照王钱福<sup>[6]</sup>关于《嗜盐菌的分离及其多相分类学研究》及东秀珠<sup>[7]</sup>《常见细菌鉴定手册》中相关内容进行。通过光学显微镜(Olympus microscope BH-2)和扫描电子显微镜(JEOL model JSM5600LV)观察菌体的形态特征。生化特征测定主要包括碳、氮源生长试验、明胶液化、厌氧生长、硝酸盐还原、硝酸盐产气以及NaCl的耐受试验等。

### 1.3 16S rRNA 序列及系统发育分析

基因组DNA的提取和16S rRNA的扩增及序列分析参见Toru Shigematsu<sup>[8]</sup>等方法。引物采用细菌16S rRNA PCR扩增通用引物Eu27F (5'-AGAGT TTGATCMTGGCTCAG-3', positions 8-27 of *E. coli* 16S rRNA)和原核微生物特异性引物1490R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', positions 1491-1509 of *E. coli* 16S rRNA)。PCR扩增条件: 94°C变性1 min, 50°C退火45 s, 72°C延伸1.5 min, 30个循环。PCR产物经pUC18-T载体T-A克隆入*E. coli* DH5 $\alpha$ , 挑选阳性菌落, 提取重组质粒, 采用Applied

Biosystems DNA Sequencer (model 377)自动进行, 测序引物为M13F 和M13R。16S rRNA序列经校对后与GenBank数据做相似性分析, 并通过Clustal X 程序多重比对后用Mega3.1 软件Neighbor-Joining法进行 1000 次步长计算构建系统发育树图<sup>[9,10]</sup>。

#### 1.4 16S-23S rRNA 间区 PCR 片段性分析

参见Jensen<sup>[11]</sup>等方法PCR扩增QW1011 菌体的 16S-23S rRNA 间隔序列(ISR), 引物分别采用 G1(5'-GAAGTCGTAACAAGG-3')和 L1(5'-CAAGG CATCCACCGT-3')。其中G1 高度保守, 紧邻 16S-23S rRNA ISR的上游 30 bp~40 bp区域; L1 为 23S rRNA的一个保守区域, 位于 16S-23S rRNA ISR下游 20 bp区域。PCR扩增条件: 94°C变性 1 min, 55°C退火 2 min, 72°C延伸 3 min, 25 个循环。ISR-PCR产物PAGE电泳后条带经LabImage 2.7.1 识别并转化成 0/1 矩阵, 采用NTSYS PC 2.11 做UPGMA聚类分析<sup>[12,13]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 表型性状分析

采集盐土、盐结晶和卤水等样品混合后富集培养, 接种于 10%的NaCl(W/V)平板培养基上光照培养发现: 10 d后菌落开始出现, 14 d后几乎不再有新的菌落出现, 其中 90%的菌落为黄色或橙色, 少数菌落为乳白色。经初筛后得分离菌 112 株, 多数为 G<sup>+</sup>, 少数为 G<sup>-</sup>或染色可变。细胞形态方面, 有 106 株菌为杆状, 6 株菌为球形; 根据所有分离菌株的表型特征相关性, 所有菌株共分为 6 组(见表 1), 分别和菌株 *P. rifitiensis* ATCC BAA 790<sup>T</sup>, *H. venusta* ATCC 27125, *H. trueperi* DSM 1040<sup>T</sup>, *H. blutaparonensis* ATCC BAA 1217<sup>T</sup>, *O. profundus* KCCM 42318 and *V. picturae* DSM 14867<sup>T</sup>的表型特征相似。其中, 组、组和组的菌株分别与ATCC BAA 790<sup>T</sup>、ATCC 27125、DSM 14867<sup>T</sup>的特征相同; 而组, 组的部分菌株和组全部菌株则分别与 KCCM 42318、DSM 1040<sup>T</sup>和ATCC BAA 1217<sup>T</sup>的部分表型特征有差异。

### 2.2 16S rRNA 基因的系统发育学分析

所有分离菌株的完整 16S rRNA 基因经 Blast 分析及多种比对后, 选取菌株 QW02、QW04、QW05、QW18、QW09、QW12、QW15、QW06 和 QW07 分别代表 Sub1-9 类群构建的系统发育树, 见图 1。

结果表明: 112 株菌分别属于细菌域的 *Planococcus*、*Halomonas*、*Halobacillus*、*Oceanobacillus* 和 *Virgibacillus* 属。菌株 QW14 与 *V. picturae* 的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%, 同时其表型特征与报道的 *V. picturae* 相同, 因此 QW14 与 *V. picturae* 应属同种; QW02 和 QW04 分别与 *P. rifitiensis* 和 *H. venusta* 在 16S rRNA 基因水平上有 99%的相似性, 在表型特征方面也与分别与这两个种相同。因此, 在分类水平上 QW02 和 QW04 分别与 *P. rifitiensis* 和 *H. venusta* 同种; QW06 与 *Oceanobacillus* 属的相关种聚集成簇, 与 *O. profundus* 在 16S rRNA 水平上相似性为 99%, 但在生理水平上有一定的差异, 因此 QW06 可能属于新的分类单元; QW05、QW18、QW09、QW12、QW15 和 *Halobacillus* 属的相关种聚集成簇, QW05 和 QW18 聚成亚簇, 与 *H. trueperi* 相似性为 99%; 但二者在表型特征方面也有一定的差异, QW05 表现与 *H. trueperi* 相同的生化特征, 而 QW18 却不尽相同。因此, QW18 可能属于新的分类单元。QW09、QW12 和 QW15 聚集成亚簇与 *H. blutaparonensis* 相似性为 99%, 但在表型特征方面 QW09 相同于 *H. blutaparonensis*, 而异于 QW12 和 QW15。因此该亚簇中, QW12 和 QW15 也可能属于新的分类单元。因此, 对于 QW06、QW12、QW15 和 QW18 的具体分类地位有待进一步研究。

菌株 QW02、QW04、QW05、QW06、QW07、QW09、QW12、QW15、和 QW18、的完整 16S rRNA 在 GenBank 中的接受号分别为: EF622537、EF647208、EU124353、EU124354、EU124355、EU124356、EU124357、EU124359 和 EU124360。

### 2.3 16S-23S rRNA 间区 PCR 片段分析

分离菌株的 16S-23S rRNA 间区 PCR 片段 PAGE 电泳图及聚类分析图见图 2。从图 2A 可知: 所有菌株的 ISR-PCR 片段的长度主要分布在 170 bp~1200 bp, 其中 Group I、Group II 和 Group VI 中, 菌株 QW02、QW04 和 QW14 的 ISR-PCR 片段指纹图谱分别相似于其参考菌株的 ISR-PCR 片段的 PAGE 模式, 在 UPGMA 聚类图(图 2B)也清楚表明了这一点。然而, Group V 中 QW06、Group III 中 QW18 和 Group IV 中 QW15、QW12 的 ISR-PCR 片段指纹图谱无论从条带分布还是条带的亮度方面都明显区别于其参考菌株(图 2A), 其 Dice 指数分别为 0.67、0.74、0.21

表1 分离菌株及参考菌株的形态和部分生化特征  
Table 1 Phenotypic and physiological characteristics of isolates and their reference strains

表型特征 Characteristicsa	Group I		Group II		Group III			Group IV				Group V		Group VI	
	Ref1	Sub1	Ref2	Sub2	Ref3	Sub3	Sub4	Ref4	Sub5	Sub6	Sub7	Ref5	Sub8	Ref6	Sub9
Amount of the isolates		6		31		17	3		3	4	17		20		11
Cell shape	cocci	cocci	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Colony pigmentationb	BO	BO	Y	Y	O	O	O	CY	CY	PY	BY	PO	PO	C	C
Gram staining	+	+	-	-	+	+	+	V	V	+	V	+	+	+	+
Spore formation	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth temp Range(°C)	5-42	5-42	4-40	4-40	10-44	10-44	10-40	ND	10-40	10-45	10-40	15-42	15-42	5-40	5-40
Optimum	37	37	30	30	30	30	30	28	30	25	28	30	30	28	30
Salts conc. Range(%)	0.5-15	0.5-20	0.5-20	0.5-25	0.5-30	0.5-25	0.5-25	0.5-20	0.5-20	0.5-20	0.5-20	0.5-14	0.5-25	0.5-20	0.5-20
Optimum	10	10	0.5-7	10	10	10	15	2-4	8	10	5	5-10	15	5-10	8-10
pH range	6-10.5	6-10.5	5-10	5-10	6-9.5	6-9.5	6-9.0	6-9.0	6-9.0	5-9.0	6-9.0	6-9.5	6-8.5	6-9.0	6-9.0
Hydrolysis of Gelatin	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	v	v
Casein	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	W	W
Starch	ND	ND	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	ND	ND
Acids from D-Fructose	ND	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acids from D-Galactose	+	+	-	-	+	+	+	W	W	-	W	+	+	+	+
Acids from D-Glucose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acids from D-Xylose	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Acids from D-Mannitol	ND	ND	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Acids from Maltose	+	+	-	-	ND	+	+	+	-	-	+	+	+	W	W
Acids from Sucrose	+	+	-	-	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
Aerobic NO <sub>3</sub> reduction	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+
Aerobic NO <sub>2</sub>	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND

注：Ref1-6：参考菌株*P. rifitiensis* ATCC BAA-790<sup>T</sup>、*H. venusta* ATCC 27125、*H. trueperi* DSM 1040<sup>T</sup>、*H. blutaparonensis* ATCC BAA 1217<sup>T</sup>、*O. profundus* KCCM 42318和*V. picturae* DSM 14867<sup>T</sup>；Sub1-9：分别表示表形特征相似的亚组；BO：亮黄色；O：橙色；PO：淡黄色；C：乳白色；Y：黄色；CY：乳黄色；V：可变；ND：无法判定；W：弱性；+：阳性；-：阴性  
Note: Characteristics were described based on group. Ref 1-6: The reference strains for each group: *P. rifitiensis* ATCC BAA-790<sup>T</sup>, *H. venusta* ATCC 27125, *H. trueperi* DSM 1040<sup>T</sup>, *H. blutaparonensis* ATCC BAA 1217<sup>T</sup>, *O. profundus* KCCM 42318 and *V. picturae* DSM 14867<sup>T</sup>, respectively; Sub 1-9: The sub-group 1-9, respectively; BO: Brilliant orange; O: Orange; PO: Pale orange; C: Cream; Y: Yellow; CY: Cream yellow; V: Varied; ND: Not determined; W: Weak; +: Positive; -: Negative

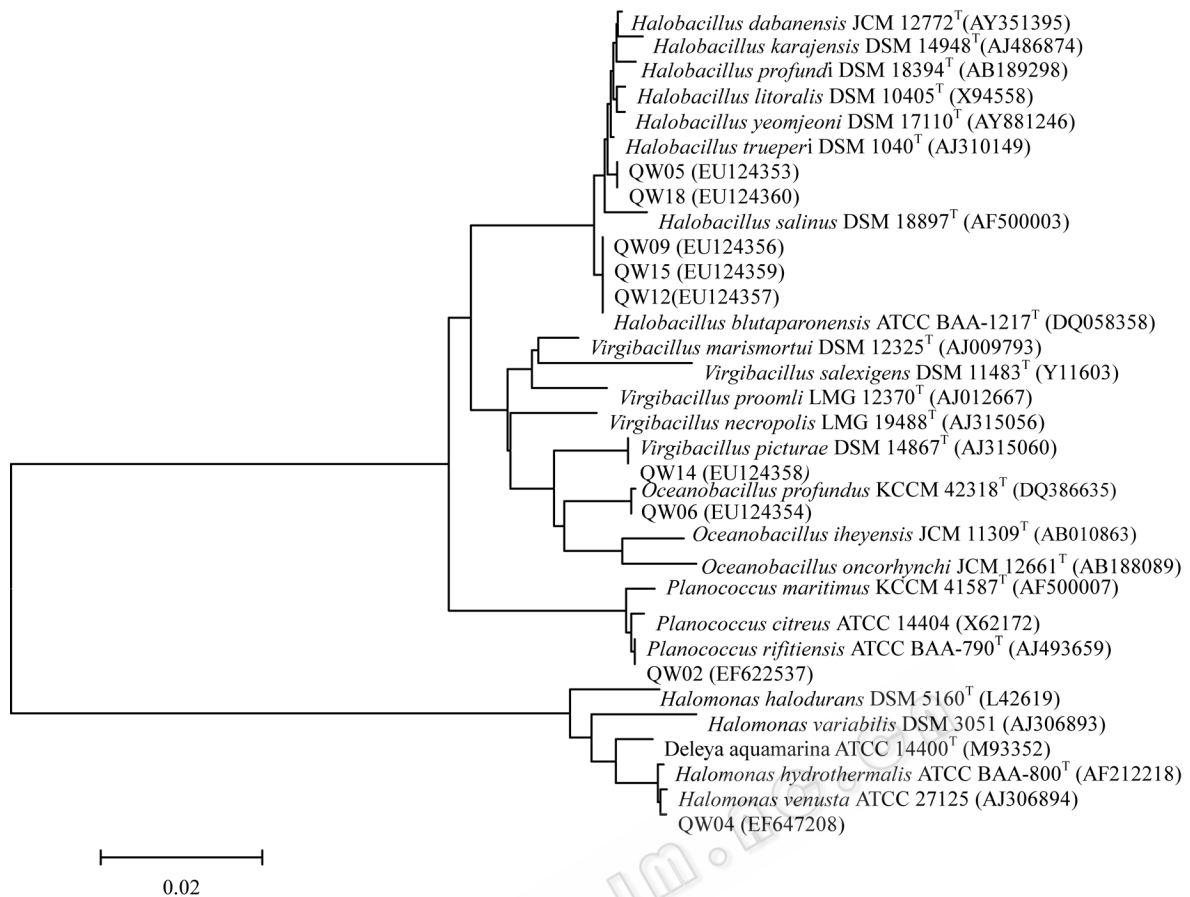


图1 基于16S rRNA基因序列构建的代表菌株的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the complete 16S rRNA gene sequences of the representative isolates in Table 1 by the neighbor-joining method

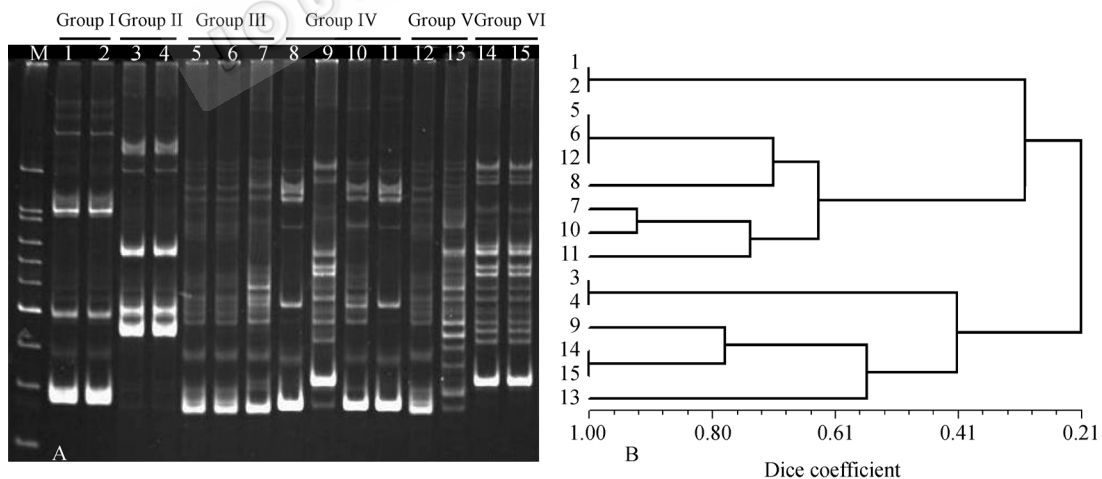


图2 分离菌株和代表菌株的ISR-PCR片段聚丙烯酰胺电泳图(A)及ISR-PCR指纹图谱的NTSYS聚类图(B)

Fig. 2 PAGE profiles of ISR-PCR patterns of the representative isolates and their corresponding reference stains (A) and dendrogram depicting the relationships of isolates based on the ISR-PCR patterns (B)

注: M: 100 bp梯度Marker; 1-13 分别代表: *P. rifitiensis* ATCC BAA-790<sup>T</sup>, QW02, *H. venusta* ATCC 27125, QW04, *H. trueperi* DSM 1040<sup>T</sup>, QW05, QW18, *H. blutaparonensis* ATCC BAA 1217<sup>T</sup>, QW09, QW12, QW15, *O. profundus* KCCM 42318, QW06, *V. picturae* DSM14867<sup>T</sup> 和 QW07

Note: M: 100 bp ladder size marker (small strand 100 bp, Invitrogen); 1,2: *P. rifitiensis* ATCC BAA-790<sup>T</sup>, QW02; 3,4: *H. venusta* ATCC 27125, QW04; 5-7: *H. trueperi* DSM 1040<sup>T</sup>, QW05, QW18; 8-11: *H. blutaparonensis* ATCC BAA 1217<sup>T</sup>, QW09, QW12, QW15; 12,13: *O. profundus* KCCM 42318, QW06; 14,15: *V. picturae* DSM 14867<sup>T</sup>, QW07

和 0.21(图 2B)。这些结果进一步从分子水平上证实了 QW06、QW12、QW15 和 QW18 的具体分类地位有待进一步研究。

### 3 讨论

中度嗜盐菌是盐生生态系统重要的组成之一,在盐生环境地球物理循环中扮演着关键的作用。虽然分子生态学的方法为我们研究和揭示微生物多样性得到了极大的拓展,但是要了解微生物在生物圈行使的生态功能,仍需要得到它们的纯培养,因此分离培养的工作仍然是研究微生物多样性一个不可缺少的手段<sup>[14]</sup>。CM培养基是分离嗜盐或耐盐微生物一种有效的寡营养培养基<sup>[15]</sup>。应用CM培养基从大公古盐井中分离得到 112 株中度嗜盐菌,经初步分类属于 *Planococcus*、*Halomonas*、*Halobacillus*、*Oceanobacillus*和*Virgibacillus*属不同的类群,其结果初步揭示了盐卤中可培养的中度嗜盐菌的多样性及其系统发育。

16S rRNA的系统发育是研究环境微生物相互关系的有效工具。然而,大量的数据表明尽管 16S rRNA 是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标,但由于 16S rRNA 序列在原核生物中的高度保守性,对于相近种或同一种内的不同菌株之间的鉴别分辨力较差,因此其可靠性不充分<sup>[16]</sup>。从系统树上可以看出菌株QW06、QW12、QW15 和QW18 分别聚集在*O. profundus*、*H. trueperi*和*H. blutaparonensis*簇中,与*O. profundus*、*H. trueperi*和*H. blutaparonensis*都具有 99%的高似性,但在菌落形态、革兰氏染色、产酸、明胶水解和淀粉水解等表型特征方面却异于参考菌株。Ripka等研究不同盐生环境的微生物时也发现了同样的现象,说明来自于不同生境的微生物为了适应其生存环境在一些基本的生理过程中已经进化出了某些适宜于环境的生理变化<sup>[17]</sup>。

16S-23S rRNA间区近年来在细菌系统发育学,特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面倍受关注。当研究的 16S rRNA序列高度相似性时,16S-23S rRNA区间序列分析可以进一步为这些菌株的分类进一步提供分子证据<sup>[18]</sup>。研究认为,16S-23S rRNA的ISR区域包括功能区和非功能区。在进化的过程中,功能区如tRNA基因、核糖核酸酶 和Box A等相对保守。然而,非功能区由于受到环境的压力经常会

受到碱基的插入或缺失突变。因此, Song 等认为对起源相近的菌株,其ISR的在进化过程中发生的突变在一定程度上响应了环境的独特性,可以作为菌株的分类信息<sup>[18]</sup>。由于大公古盐井不同于其它盐生环境,具有低Mg<sup>2+</sup>、黑卤、恒温和人造盐生生态系统等独特性。过去认为这样的人工生态环境中,微生物的多样性极低。然而,ISR-PCR指纹图谱分析表明:在进化过程中,*Oceanobacillus*属和*Halobacillus*属的菌株QW06、QW12、QW15 和QW18 在盐卤独特环境因子长期的压力下已经在分子水平上出现了分化,表现了人工古盐井微生物在进化水平上的多样性。

目前,可分离培养的微生物仅占环境微生物的 1%~10%,大量的微生物不能培养或现阶段难于培养,在这些未知种群中,蕴藏着目前还无法估量的资源。因此,进一步研究古盐井中的微生物,加强对这类特殊生境中微生物的认识,将有利于丰富我国中度嗜盐菌的生物多样性,为我们利用这些特殊的微生物资源奠定基础。

### 参 考 文 献

- [1] Francisco RV. The ecology and taxonomy of aerobic chemoorganotrophic halophilic eubacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1986, **39**(1-2): 17-22.
- [2] Ventosa A, Nleto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Bio Rev*, 1998, **62**(2): 504-544.
- [3] 赵百锁, 杨礼富, 宋 蕾, 等. 中度嗜盐菌在生物技术中的应用. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 359-362.
- [4] Kuhn O. Salt drilling in ancient China and other Stories. *Journal of the Canadian Society of Exploration Geophysicists RECORDER*. 2004, **6**: 39-43.
- [5] Gochner MB, Kushner DJ. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. *Can J Microbiol*, 1969, **15**(10): 1157-11651.
- [6] 王钱富. 嗜盐菌的分离及多相分类学研究. 兰州大学博士学位论文, 2007.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.1330-3361.
- [8] Shigematsu T, Tang YQ, Kawaguchi H, et al. Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. *J Biosci Bioeng*, 2003, **96**(6): 547-558.
- [9] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple se-

- quence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(24): 4876–4882.
- [10] Kumar SK, Tamura I, Nei M, *et al.* MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, **5**(2): 150–163.
- [11] Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(4): 945–952.
- [12] Cytryn E, Rijn JV, Schramm A, *et al.* Identification of bacteria potentially responsible for oxic and anoxic sulfide oxidation in biofilters of a recirculating mariculture system. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(10): 6134–6141.
- [13] Nayak S, Prasanna R, Prasanna BM, *et al.* Analysing diversity among Indian isolates of Anabaena (Nostocales, Cyanophyta) using morphological, physiological and biochemical characters. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**(11): 1575–1584.
- [14] 潘海莲, 周 成, 王红蕾, 等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 1–6.
- [15] Abd-El-Haleem D, Layton AC, Saylor GS. Long PCR amplified rDNA for PCR-RFLP and Rep-PCR-based approaches to recognize closely related microbial species. *J Microbiol Methods*, 2002, **49**(3): 315–319.
- [16] Ripka K, Denner EBM, Michaelsen A, *et al.* Molecular characterization of Halobacillus strains isolated from different medieval wall paintings and building materials in Austria. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2006, **58**(3-4): 124–132.
- [17] Ruiz A, Poblet A, Mas JM, *et al.* Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(6): 1981–1987.
- [18] Song Y, Liu C, Molitoris D, *et al.* Use of 16S-23S rRNA Spacer-Region (SR)-PCR for identification of intestinal Clostridia. *Syst Appl Microbiol*, 2002, **25**(4): 528–535.

## 征订启事

### 欢迎订阅 2009 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部 邮编: 100193  
电话: 010-62819059, 62815914 传真: 010-62815914  
E-mail: zwbh1963@263.net 网址: www.plantprotection.ac.cn  
联系人: 王 音 高洪荣