

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第 32 卷 第 14 期 Vol.32 No.14 **2012**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 14 期

2012 年 7 月 (半月刊)

目 次

海滨沙地砂引草对沙埋的生长和生理适应对策.....	王 进,周瑞莲,赵哈林,等 (4291)
外源 K ⁺ 和水杨酸在缓解融雪剂对油松幼苗生长抑制中的效应与机理 ...	张 莹,李法云,严 霞,等 (4300)
钱塘江中游流域不同空间尺度环境因子对底栖动物群落的影响.....	张 勇,刘朔孺,于海燕,等 (4309)
贡嘎山东坡非飞行小型兽类物种多样性的垂直分布格局.....	吴永杰,杨奇森,夏 霖,等 (4318)
基于斑块的红树林空间演变机理分析方法.....	李春干,刘素青,范航清,等 (4329)
亚热带六种天然林树种细根养分异质性.....	熊德成,黄锦学,杨智杰,等 (4343)
浙江省植被 NDVI 动态及其对气候的响应	何 月,樊高峰,张小伟,等 (4352)
亚热带 6 种天然林树种细根呼吸异质性.....	郑金兴,熊德成,黄锦学,等 (4363)
亚高山/高山森林土壤有机层氨氧化细菌和氨氧化古菌丰度特征	王 奥,吴福忠,何振华,等 (4371)
耕作方式对紫色水稻土轻组有机碳的影响.....	张军科,江长胜,郝庆菊,等 (4379)
火烧对长期封育草地土壤碳固持效应的影响.....	何念鹏,韩兴国,于贵瑞,等 (4388)
闽江河口潮汐湿地二氧化碳和甲烷排放化学计量比.....	王维奇,曾从盛,仝 川,等 (4396)
2010 年夏季珠江口海域颗粒有机碳的分布特征及其来源	刘庆霞,黄小平,张 霞,等 (4403)
新疆冷泉沉积物葡萄糖利用细菌群落多样性的稳定同位素标记分析.....	楚 敏,王 芸,曾 军,等 (4413)
土壤微生物群落多样性解析法:从培养到非培养.....	刘国华,叶正芳,吴为中 (4421)
伊洛河河岸带生态系统草本植物功能群划分	郭屹立,卢训令,丁圣彦 (4434)
濒危植物蒙古扁桃不同地理种群遗传多样性的 ISSR 分析	张 杰,王 佳,李浩宇,等 (4443)
强潮区较高纬度移植红树植物秋茄的生理生态特性.....	郑春芳,仇建标,刘伟成,等 (4453)
冬季高温对白三叶越冬和适应春季“倒春寒”的影响	周瑞莲,赵 梅,王 进,等 (4462)
中亚热带细柄阿丁枫和米槠群落细根的生产和死亡动态.....	黄锦学,凌 华,杨智杰,等 (4472)
欧美杨水分利用效率相关基因 <i>PdEPF1</i> 的克隆及表达	郭 鹏,金 华,尹伟伦,等 (4481)
再力花地下部水浸提液对几种水生植物幼苗的化感作用.....	缪丽华,王 媛,高 岩,等 (4488)
无致病力青枯雷尔氏菌对烟草根系土壤微生物脂肪酸生态学特性的影响.....	郑雪芳,刘 波,蓝江林,等 (4496)
基于更新和同化策略相结合的遥感信息与水稻生长模型耦合技术的研究.....	王 航,朱 艳,马孟莉,等 (4505)
温度和体重对克氏双锯鱼仔鱼代谢率的影响.....	叶 乐,杨圣云,刘 敏,等 (4516)
夏季西南印度洋叶绿素 a 分布特征.....	洪丽莎,王春生,周亚东,等 (4525)
大沽排污河生态修复河道水质综合评价及生物毒性影响.....	王 敏,唐景春,朱文英,等 (4535)
李肖叶甲成虫数量及三维空间格局动态.....	汪文俊,林雪飞,邹运鼎,等 (4544)
专论与综述	
基于景观格局的城市热岛研究进展	陈爱莲,孙然好,陈利顶 (4553)
沉积物质量评价“三元法”及其在近海中的应用	吴 斌,宋金明,李学刚,等 (4566)
问题讨论	
中国餐厨垃圾处理的现状、问题和对策	胡新军,张 敏,余俊锋,等 (4575)
研究简报	
稻秸蓝藻混合厌氧发酵沼液及其化学物质对尖孢镰刀菌西瓜专化型生长的影响.....	刘爱民,徐双锁,蔡 欣,等 (4585)
佛山市农田生态系统的生态损益.....	叶延琼,章家恩,秦 钟,等 (4593)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 314 * zh * P * ¥70.00 * 1510 * 33 * 2012-07



封面图说: 噶龙山南坡的高山湖泊——喜马拉雅山南坡的噶龙山光照强烈、雨量充沛,尽管是海拔 4500 多米的高寒地区,山上的草甸依然泛着诱人的翠绿色,冰川和雪山的融水汇集在山梁的低洼处形成了一个又一个的高山湖泊,由于基底的差别和水深的不同,使得纯净清澈的冰雪融水在湖里呈现出不同的颜色,湖面或兰或绿,颜色或深或浅,犹如一块块通透透明的翡翠镶嵌在绿色的绒布之中。兰天下面,白云落在山间,通往墨脱的公路像丝带一样随随便便地缠绕着,一幅美丽的自然生态画卷就这样呈现在你的面前。

彩图提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201107051003

楚敏,王芸,曾军,张志东,娄恺. 新疆冷泉沉积物葡萄糖利用细菌群落多样性的稳定同位素标记分析. 生态学报, 2012, 32(14): 4413-4420.

Chu M, Wang Y, Zeng J, Zhang Z D, Lou K. The glucose-utilizing bacterial diversity in the cold spring sediment of Shawan, Xinjiang, based on stable isotope probing. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(14): 4413-4420.

新疆冷泉沉积物葡萄糖利用细菌群落多样性的稳定同位素标记分析

楚 敏, 王 芸, 曾 军, 张志东, 娄 恺*

(新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要: 新疆沙湾冷泉低盐且不含硫化物, 为了解其沉积物细菌群落的碳源利用, 以 ^{13}C 稳定同位素标记的葡萄糖作为底物培养沉积物中的细菌, 通过提取和分离带有 ^{13}C 标记的总 DNA, 结合 16S rDNA-PCR 克隆文库法以及限制性片段长度多态性方法, 对冷泉沉积物中葡萄糖利用细菌群落多样性进行分析。随机挑取 417 个阳性克隆, *Hae*III 酶切分型, 共获得 27 个 OTUs。经测序、序列同源性对比和系统发育学分析, 归为细菌域中的 9 个门, 即厚壁菌门 (Firmicutes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、放线菌门 (Actinobacteria)、变形杆菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 其中, 厚壁菌门和变形杆菌门为优势类群, 分别占克隆文库的 28.3% 和 38.6%。与前期研究比较, 以葡萄糖为碳源的细菌 OTUs 仅占总菌群的 31%, 表明该环境中可能存在其它碳源利用方式的细菌群落。

关键词: 冷泉; 稳定同位素; 细菌多样性

The glucose-utilizing bacterial diversity in the cold spring sediment of Shawan, Xinjiang, based on stable isotope probing

CHU Min, WANG Yun, ZENG Jun, ZHANG Zhidong, LOU Kai*

Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agriculture Science, Urumqi 830091, China

Abstract: Most methods for investigating bacterial diversity of soil microorganisms was lack of the ability to establish a causal relationship between function and community compositions. Recently, using stable isotopes to label phylogenetically informative biomolecules (phospholipid fatty acids, DNA, or RNA), has the advantage of providing more definitive evidence that a detected population is active in a specific process, if that process leads to assimilation of C or N into cellular constituents. In practice, Nucleic acid SIP is considerably more sensitive and more informative for taxonomic purposes, particularly among of those related organisms, and thus is more generally useful.

Shawan cold spring provides a typical non-sulfide cold spring environment in the arid and semi-arid areas of Xinjiang. In the previous research, the first overview of microbial diversity in the Shawan cold spring had provided, and the results showed that bacterial communities in the Shawan cold spring were diverse which comprised of 11 phyla and maybe exist a diversity of functional groups. In this paper, we surveyed the carbon sources utilization functional bacteria and their diversity in the sediment of the cold spring by stable isotope probing (SIP) and 16S rDNA clone library. The functional bacteria were enriched using ^{13}C -labeled glucose as substrate, and then ^{13}C -labeled genomic DNA was separated directly from the sediment samples and then it used as template for the PCR amplification of bacterial 16S rRNA gene and

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2011211B41)

收稿日期: 2011-07-05; 修订日期: 2012-02-22

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

construction of the gene clone library. Based on restriction fragment length polymorphism (RFLP), 417 positive clones were picked up and grouped into 27 operational taxonomic units (OTUs) by *Hae* III digestion. Subsequently, unique clones were sequenced. The blast search in Genbank and phylogenetic sequence analysis showed that 27 OTUs were divided into 9 phyla of bacterial domain i. e., Firmicutes, Chloroflexi, Nitrospirae, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Cyanobacteria and Acidobacteria. Of those, Firmicutes and Proteobacteria were the dominant groups, and accounted for 28.3% and 38.6% of the total clone library respectively.

Compared with 86 OTUs in the previous publication, Gemmatimonadetes, Chlorobi and Verrucomicrobia were not captured in glucose-utilizing bacteria, and the number of OTUs in other phyla decreased evidently, especially in Acidobacteria, only 6.45% of OTUs was observed in this research (48% in the previous research). In sum, that only 31% OTUs utilized glucose as carbon source in the system, suggesting there maybe exist other carbon sources utilization bacteria in the environment. In addition, we found that the incubating time and substrate concentration are key factors for the detection of some species that in low lever in the environment. As the result of enriching in this paper, a lots of OTUs were detected for the first time, such as the phylum Chloroflexi and genus *Desulfuromonas*. Particularly, genus *Desulfuromonas* was an important supplement to previous research, because strains belonged to the genus could reduce the sulfur to H_2S , and the reason why the genus existed in a non-sulfide cold spring need further study. Additionally, compared with previous research, we found that the proportion of OTUs in Firmicutes was increased obviously from 1 to 7, which were divided into order Clostridiales and order Lactobacillales, and replaced Acidobacteria as the second dominant groups. Hence, the results indicated that an appropriate and reasonable pre-culture could be a useful supplement to study microbial composition and diversity in environmental samples by using culture-independent methods.

Key Words: cold spring; stable isotope probing; bacterial diversity

稳定同位素标记 (Stable Isotope Probing, SIP) 技术以其示踪、指示和判断的功能及检测快速、结果准确等特点已成为了解生态过程与机制的重要研究手段之一^[1-3]。在微生物生态学领域,国外学者分别利用基于 ^{13}C 的磷酸脂肪酸稳定同位素标记 (Stable isotope probing of phospholipid fatty acids, PLFA-SIP)、DNA-SIP 以及 RNA-SIP 技术,对诸如盐湖沉积物、海底沉积物、有机物污染土壤等特殊环境功能微生物的多样性进行了研究^[4-6],DNA-SIP 和 RNA-SIP 因通过构建基因文库便于进一步分析微生物群落组成,最为常用。较之国外,国内对基于核酸上的稳定同位素标记的相关研究鲜有报道。

冷泉作为一种极端环境 (低温和寡营养等),因其大多起源于深层地下并且含有硫化物而被广泛研究,已发现硫代谢微生物类群对于维持该生态系统的稳定性和一些特殊地貌 (喀斯特地貌) 的形成起了重要作用^[7-8]。对于低盐、不含硫化物的冷泉微生物相关研究还比较少,本实验室对新疆地区冷泉沉积物微生物多样性的前期研究结果表明,该环境中原核微生物种群具有丰富的多样性^[9-10],暗示着该环境中可能存在多种碳源代谢类型,但具体的细菌活性类群需要进一步研究。

在前期研究基础上,以新疆沙湾冷泉沉积物细菌群落为研究对象,选择 ^{13}C 稳定同位素标记的葡萄糖作为底物,富集培养沉积物中细菌,通过 ^{13}C 标记 DNA 的提取及分离、细菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建、测序和同源对比等,从而确定该环境中葡萄糖利用细菌群落的组成和多样性。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和保存

沙湾冷泉位于东经 $85^{\circ}22'35''$,北纬 $43^{\circ}50'30''$,海拔 1500 m,泉水清澈透明,全年温度保持在 $5.5-7.5^{\circ}C$ 之间,水质呈弱酸性 (pH 值 5.0),主要阳离子为 Na^{+} 和 Ca^{2+} ,阴离子为 SO_4^{2-} 、 HCO_3^{-} 和 Cl^{-} ,不含 H_2S 。本研究组于 2008 年 9 月 18 日进行实地考察并采样,取冷泉中心附近区域距表层 10 cm 的沉积物 (水温 $6.3^{\circ}C$,pH 值 5.0),迅速置于无菌 50 mL 离心管中,放 $4^{\circ}C$ 车载冰箱,4 h 之内运回实验室进行研究,剩余样品 $-70^{\circ}C$ 保存。

1.2 主要试剂和仪器

^{13}C -glucose (Aladdin, 上海), pMD18-T (TaKaRa, 大连), *Hae* III 限制性内切酶 (TaKaRa, 大连), 凝胶回收试剂盒 (博大泰克, 北京), 超速离心机 (Hitachi, 日本), PCR 扩增仪 (Eppendorf, 德国), DNA 电泳仪 (Bio-Rad, 美国), 和凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 冷泉沉积物细菌的培养和标记

在无菌条件下, 分别取约 10 g 采集的沉积物置于不同的 50 mL 无菌玻璃烧杯中, 取 0.5 mL 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ^{12}C -葡萄糖溶液均匀喷洒到样品表面, 并用无菌玻璃棒混匀后, 无菌透气膜封口后, 置于 10 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱预培养 5 d。然后, 向上述处理中均匀喷洒 0.5 mL 浓度为 50、100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 ^{13}C -葡萄糖, 并用无菌玻璃棒混匀, 于 10 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静止好氧培养 9 d 进行 ^{13}C DNA 标记^[11-12]。同时相同体积的灭菌水培养 9 d 的土壤样品, 100 $\mu\text{mol/L}$ ^{12}C -葡萄糖溶液培养 9 d 的土壤样品为对照。

1.3.2 沉积物总 DNA 的提取

取上述样品 10 g, 放入无菌研钵后加入液氮研磨 10 min, 转至 50 mL 无菌大离心管中, 采用文献报道方法^[10, 13]提取样品总 DNA。使用 70% 乙醇洗涤 DNA 两遍, 空气干燥并加 TE 缓冲液 1.0 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 并使用紫外分光光度计测定 DNA 纯度和浓度。

1.3.3 ^{13}C 标记 DNA 分离

^{13}C 标记 DNA 与 ^{12}C 标记 DNA 分离采用超速 CsCl 梯度离心法。上述方法提取的总 DNA (约为 1 mg) 加入到含有 3.8 g CsCl 的 4.0 mL TE 溶液中, 并加入 100 μL 浓度为 10 mg/mL 的 EB 溶液, 混匀后, 置于高速离心机中于 54000 r/min (140000 g) 20 $^{\circ}\text{C}$ 离心 60 h。参考文献^[14]的方法分别以 ^{12}C -葡萄糖、 ^{13}C -葡萄糖以及 ^{12}C 与 ^{13}C -葡萄糖同比例混合培养的 *E. coli* DNA 为土壤 DNA 样品的对照组。

小心平稳的取出上述离心管, 置于紫外灯下观察。使用 18 号针头的无菌注射器于 ^{13}C 条带下 0.1 cm 下穿刺吸出目的条带, 并收集放置于灭菌离心管中。使用 1 mL 水饱和正丁醇, 混匀离心, 去除有机层。反复洗涤 4—6 次后, 加 3 mL TE 溶液, 300 μL 浓度为 3 mol/L 的醋酸钠 (pH 值 4.6), 2 倍体积乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀后, 于 13000 g 离心 15 min, 收集 DNA^[15]。

1.3.4 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增及克隆文库的构建

采用细菌 16S rDNA 通用引物 8F: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 以及 1492R: (5'-TACGGHTAGGT-TACGACTT-3')^[16], 进行 PCR 扩增, 条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经切胶纯化回收后, 加去离子水溶解。取上述纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接 (操作方法参照说明书), 连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 中。采用浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 为筛选压力及蓝白斑筛选阳性克隆子, 并挑选白色阳性克隆转至 LB Amp^r 平板培养, 并保存备用。

1.3.5 阳性克隆子的 PCR-RFLP 分析

用无菌牙签挑取少量阳性克隆子菌体, 采用引物 M13-48 和 M13-47 进行菌落 PCR, PCR 产物采用 PCR 快速纯化试剂盒纯化。纯化后的 PCR 产物经 *Hae* III 核酸限制性内切酶进行限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析, 3% 琼脂糖凝胶电泳, 分析克隆子 RFLP 谱型, 计算每个谱型的出现频率。以覆盖率 (c) 来评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现, 计算公式为: $c = [1 - (n1/N)] \times 100\%$, 式中, N 代表分析的克隆数, $n1$ 代表具有不重复谱型的克隆数。

1.3.6 系统发育树的构建及分析

选取代表性克隆子送往上海英骏生物技术有限公司进行测序, 所测得序列去除载体序列后, 将有效序列在 RDP II (Ribosomal Database Project II, <http://rdp.cme.msu.edu>) 进行分类地位确定。并在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 数据库上进行 BLAST 比对, 选取同源性最高的序列; 同时, 通过网站 EzTaxon (<http://www.EzTaxon.org>) 与模式菌株进行比对, 选取同源性最高的模式菌株序列^[17], 一同使用 MEGA5.0

进行多重比对,使用 NJ 法构建系统发育树^[18],自举值(Bootstrap)为 1000。相关序列已上传到 NCBI 数据库,其 GenBank 登录号为:JF815499-JF815525。

2 结果

2.1 ^{13}C 标记冷泉沉积物 DNA 分离及获得

沙湾冷泉沉积物经 ^{12}C -葡萄糖预培养 5 d,使利用葡萄糖的细菌复苏并进入快速生长阶段,便于菌体 DNA 的标记^[14]。本研究选择使用 0.5 mL 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ^{13}C 葡萄糖进行标记培养 9 d,此时 DNA 浓度适中,且 ^{13}C 标记 DNA 分离效果最好。

将提取的 ^{13}C 标记总 DNA 及 *E. coli* ^{12}C 对照 DNA 加入到含有 3.8 g CsCl 的 4.0 mL TE 溶液中,经超高速离心机于 54000 r/min,20℃ 离心 60 h 后,小心平稳的取出上述离心管,置于紫外灯(波长 302 nm)下观察,发现 ^{12}C 标记 DNA 与 ^{13}C 标记 DNA 条带明显分开(图 1)。预培养的 ^{13}C 标记样品的 DNA,经超速 CsCl 梯度离心后,出现一条中间粗亮、边缘模糊的条带,与 ^{12}C 标记的对照 DNA 比较,此条带介于 ^{12}C 标记 DNA 与 ^{13}C 标记 DNA 中间(图 2),说明冷泉沉积物中以葡萄糖为碳源的细菌群落进行了繁殖,其 DNA 已被 ^{13}C 标记。

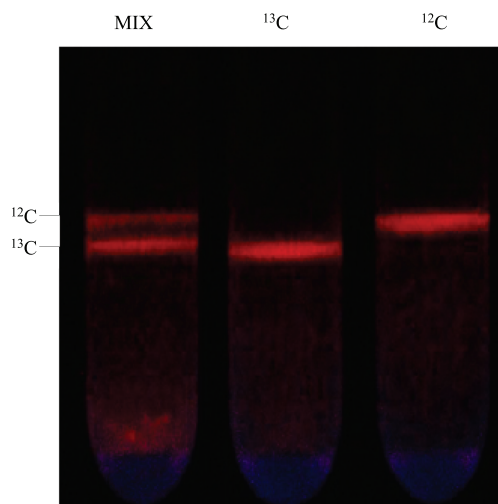


图 1 ^{13}C 同位素标记对照 *E. coli* DNA 的超速梯度照片

Fig. 1 Density gradient of isotopically labelled DNA from the controls

MIX: ^{13}C DNA 和 ^{12}C DNA 混合样品; ^{13}C : ^{13}C 标记的 *E. coli* DNA; ^{12}C : *E. coli* ^{12}C DNA

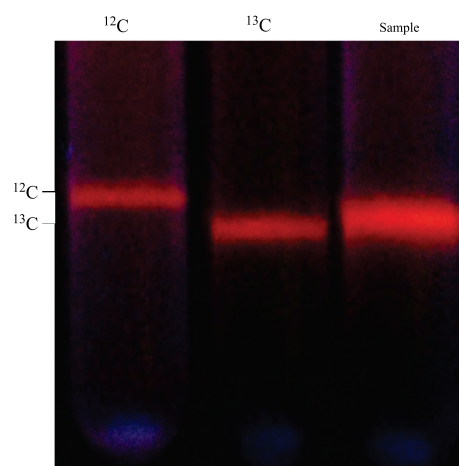


图 2 ^{13}C 同位素标记的样品 DNA 超速梯度照片

Fig. 2 Density gradient of isotopically labelled DNA from spring sediment

^{13}C : ^{13}C 标记的 *E. coli* DNA; ^{12}C : *E. coli* ^{12}C DNA; Sample: ^{13}C 标记的样品 DNA

2.2 ^{13}C 标记冷泉沉积物总 DNA 的细菌 16S rRNA 基因克隆文库分析

将收集到的 ^{13}C 标记总 DNA 经正丁醇洗涤离心,乙醇沉淀去除 EB 及 CsCl 后,构建细菌 16S rRNA 基因克隆文库。从文库中随机挑取 417 个阳性克隆子进行 PCR-RFLP 分析(图 3),样品 *Hae* III 酶切片段大小和条带数量表明存在 27 种细菌 RFLP 谱型。所构建的 16S rDNA 克隆文库覆盖率达到 93.5%,较为充分地反映出了冷泉沉积物中利用葡萄糖作为碳源的微生物组成及多样性。

2.3 ^{13}C 标记冷泉沉积物细菌 16S rRNA 克隆文库系统发育分析

将代表不同谱型的 27 个克隆子经测序、序列比对及系统发育分析后(图 4),沙湾冷泉沉积物葡萄糖利用

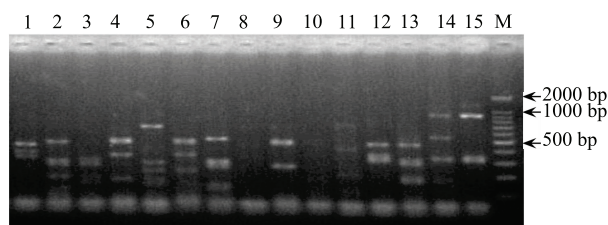


图 3 16S rDNA 文库中部分阳性克隆子 RFLP 结果

Fig. 3 Partial results of RFLP analysis in 16S rDNA library

M: 100bp DNA marker; 1—15: 阳性克隆子

细菌群落可归于细菌域的 9 个门,即厚壁菌门(Firmicutes)、绿菌门(Chloroflexi)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、放线菌门(Actinobacteria)、变形杆菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)。其中,变形杆菌门和厚壁菌门为优势菌群,分别占克隆文库的 38.60%和 28.30%(表 1)。

变形杆菌门(Proteobacteria)为本研究文库的主要菌群,共包括 9 个 OTUs,分属于 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 δ -Proteobacteria 四个菌纲,高相似序列均来自纯培养菌株序列。其中, δ -Proteobacteria 包括 4 个 OTUs,代表性克隆子 X23、X179、X369 和 X412,相似性 96.0%—99.0%; α -Proteobacteria 包括 3 个 OTUs,代表性克隆子 X162、X267 和 X399,相似性 95.1%—99.2%; β -Proteobacteria 包括 1 个 OTU,代表性克隆子 X137,相似性 99.6%; γ -Proteobacteria 包括 1 个 OTU,代表性克隆子 X18,相似性 99.6%。

厚壁菌门(Firmicutes)为本系统研究的另一主要菌群,共包括 7 个 OTUs,分属于厚壁菌门中的梭菌目(Clostridiales)和乳杆菌目(Lactobacillales)。其中,6 个 OTUs 归属于梭菌目,代表性克隆 X7、X126、X133、X155、X153 和 X358,相似性 90.7%—99.4%;1 个 OTU 归属乳杆菌目,代表性克隆 X331,相似性 99.8%。

放线菌门(Actinobacteria)中共包括 3 个 OTUs,其中,2 个 OTUs 与与非培养该门类群相似,相似性 97.6%—99.2% 代表性克隆 X253 和 X372;1 个 OTU 与纯培养该门类群相似,相似性 99.8%,代表性克隆 X106。浮霉菌门(Planctomycetes)中共包括 2 个 OTUs,均与非培养该门类群相似,相似性 95.4%—96.1%,代表克隆子 X200 和 X276。酸杆菌门(Acidobacteria)中共包括 2 个 OTUs,均与非培养该门类群相似,相似性 94.5%—97.2%,代表克隆子 Xb5 和 X333。

硝化螺旋菌门(Nitrospirae)共包括 1 个 OTU,代表克隆子 X9 与非培养该门类群相似,相似性 99.6%。拟杆菌门(Bacteroidetes)共包括 1 个 OTU,代表克隆子 X305。均与非培养该门类群相似,相似性 99%。蓝细菌门(Cyanobacteria)共包括 1 个 OTU,代表克隆子 X29 与纯培养该门相似,相似性 97.6%。绿菌门(Chloroflexi)共包括 1 个 OTU,代表克隆子 X19 与非培养该门类群相似,相似性仅为 90.7%。

3 讨论

泉作为连接地下水与地表环境的特殊生态交替区,是研究特殊生境微生物的分布、代谢以及新种的理想对象^[19]。冷泉作为泉的特殊形式,多位于高山或高纬度地区,泉水常年低温(<20℃)。对美国密歇根州富硫

表 1 沙湾冷泉沉积物葡萄糖利用细菌 16S sDNA 克隆文库序列分析结果

Table 1 The sequences analysis results of glucose-utilizing bacterial 16S rDNA clone library from the Shawan cold spring sediment

代表克隆 The clone	克隆子数量 No. of clones	占有比例 Percent of Total/%	细菌分类 Bacterial division
X162	14	3.38	变形杆菌 α 菌纲 α -Proteobacteria
X267	11	2.64	
X399	6	1.44	
X137	30	7.19	
X18	17	4.08	变形杆菌 β 菌纲 β -Proteobacteria
X23	18	4.32	变形杆菌 γ 菌纲 γ -Proteobacteria
X179	13	3.11	变形杆菌 δ 菌纲 δ -Proteobacteria
X369	23	5.52	
X412	30	7.19	厚壁菌门 Firmicutes
X7	21	5.04	
X126	5	1.20	
X133	4	0.96	
X155	30	7.19	
X153	19	4.56	
X358	24	5.76	
X331	15	3.60	
X253	8	1.92	
X372	12	2.88	
X106	11	2.64	放线菌门 Actinobacteria
Xb5	45	10.79	
X333	26	6.24	酸杆菌门 Acidobacteria
X200	6	1.44	
X276	2	0.47	浮霉菌门 Planctomycetes
X9	6	1.44	
X305	4	0.96	硝化螺旋菌门 Nitrospirae
X29	10	2.40	拟杆菌门 Bacteroidetes
X19	8	1.92	蓝细菌门 Cyanobacteria
总计 Total		417	绿菌门 Chloroflexi
			100.00

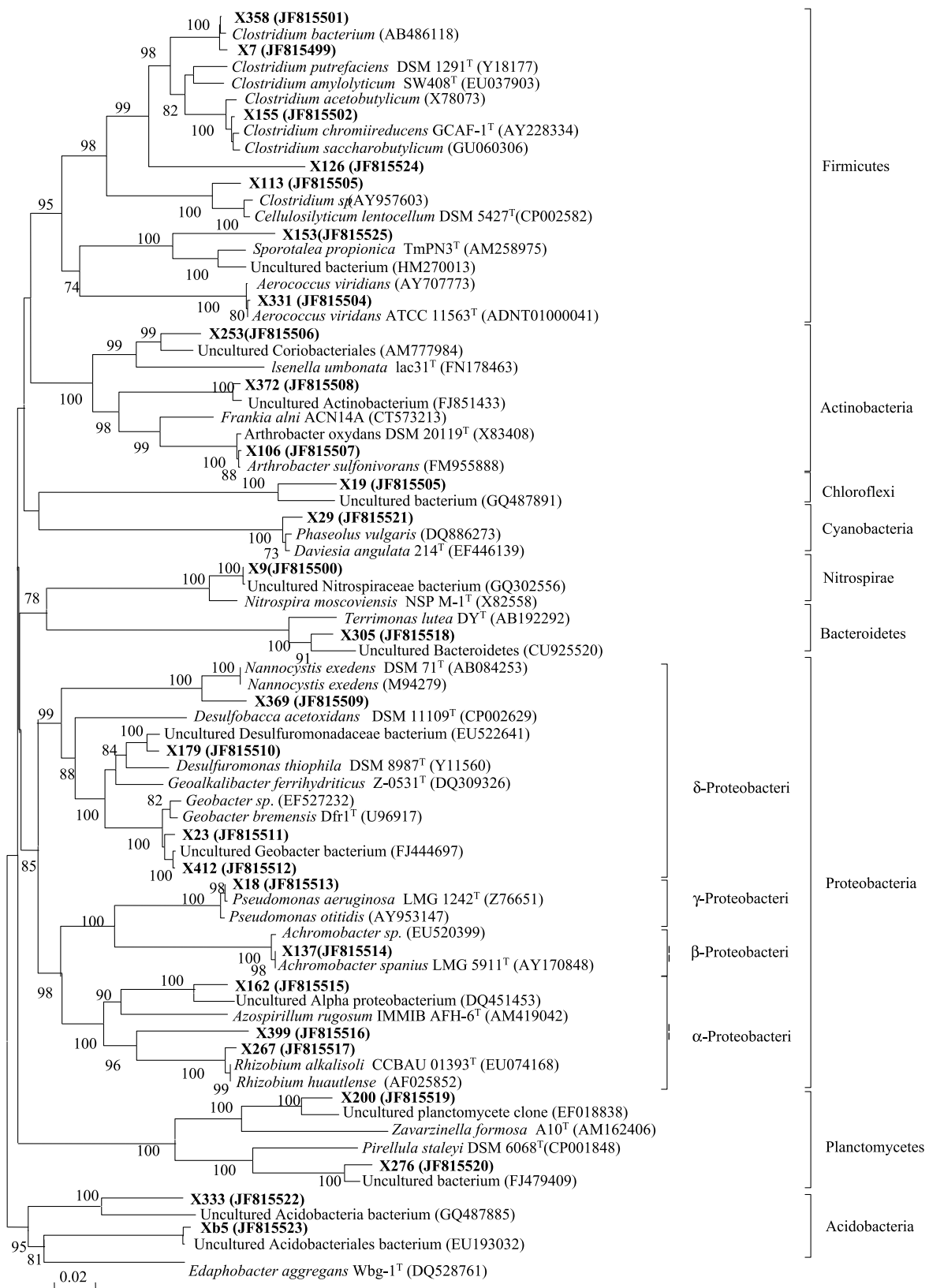


图 4 沙湾冷泉中以葡萄糖为唯一碳源的细菌系统发育进化树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial ¹³C-labeled bacterial 16S rDNA clones library from Xinjiang Shawan cold spring sediment samples

进化树中步长值支持率(%) 基于 1000 次重复建树的结果, 树中仅显示步长值支持率大于 70% 以上的数据; 进化树下的标尺刻度为 2% 进化距离

冷泉^[20]、加拿大 Axel Heiberg 岛高盐冷泉^[21]、阿尔卑斯喀斯特冷泉^[22]等含硫冷泉的研究表明,细菌主要由变形杆菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)组成,约占 70% 以上,并存在着大量未知种属;变形杆菌门(Proteobacteria)中多数细菌与硫化物代谢有关,且硫化物作为主要的能源物质对维持微生物群落稳定性起着重要作用,新疆断裂带含硫冷泉的研究结果也进一步印证了上述论点^[23]。新疆沙湾冷泉无硫且低盐,在国内外极为少见,其细菌群落主要由酸杆菌门(Acidobacteria, 48%)和变形杆菌门(Proteobacteria, 25%)组成,与上述冷泉明显不同且未发现与硫代谢相关的细菌种属,这表明可能存有其它碳源利用方式以维持此生态系统的稳定^[10]。

本文采用 DNA-SIP 技术,对新疆沙湾冷泉沉积物细菌群落的葡萄糖利用进行分析,Corinne 等^[24]认为预培养可使环境微生物复苏或活化,有利于后期标记的菌体快速生长繁殖,本研究结果支持其观点。标记 DNA 实际是一个培养微生物群落的过程,功能菌和非功能菌之间有可能出现交叉标记的问题^[25],因此,¹³C 底物的浓度和标记时间至关重要,浓度过低或时间过短可能导致大多数菌体 DNA 标记不完全,致使¹³C-DNA 和¹²C-DNA 分离困难;浓度过高或标记时间过长,某些生长较快的菌群大量繁殖使多样性降低,或部分种群利用预培养微生物的次级代谢产物进行生长而增加其多样性,不能客观反映环境中功能微生物的真实情况。本文确定了沉积物细菌群落预培养时间和¹³C 标记条件,预培养 2 d 后,再使用 0.5 mL 浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 的¹³C 葡萄糖培养 9 d,此时¹³C 标记 DNA 分离效果最好。

沙湾冷泉沉积物中能够利用葡萄糖的细菌群落有 27 个 RFLP 谱型,分属于细菌域的 9 个门,与前期结果的 86 个 RFLP 谱型及细菌 11 个门相比^[10],本研究未发现芽单孢菌门(Gemmatimonadetes)、绿菌门(Chlorobi)和头疣微菌门(Verrucomicrobia)的细菌利用葡萄糖作为碳源。变形杆菌门(Proteobacteria)仍为优势菌群,同样包括了 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria、 δ -Proteobacteria 四个菌纲,不同的是 δ -Proteobacteria 纲取代了此前的 α -Proteobacteria 纲成为优势菌群,并获得一个与脱硫单胞菌属(*Desulfuromonas*)具有较高同源性(97.3%)的 OUT X179,而脱硫单胞菌属可在一定条件下将硫还原成 H_2S ,这一结果是对此前未发现与硫代谢相关细菌种属存在的重要补充,是否存在更多此类种群,有待进一步研究。此前第一优势菌群为酸杆菌门^[10],可能因为该门细菌群主要以有机酸为碳源进行代谢的原因,在本研究中酸杆菌门仅发现 2 个 OTUs。同时,本文也发现个别自养性细菌 DNA 被¹³C 所标记,它是利用葡萄糖还是利用代谢产生的 CO_2 作为代谢物还有待进一步研究证实。上述实验结果表明新疆沙湾无硫低盐冷泉沉积物中微生物还可能存在着其它碳源利用形式。

在本研究中作为第二优势菌群的厚壁菌门(Firmicutes)细菌,共 7 个 OTUs,分属于梭菌目(Clostridiales)的梭菌属(*Clostridium*)和厌氧杆菌属(*Anaerobacter*)及乳杆菌目(Lactobacillales)的气球菌属(*Aerococcus*),均为严格厌氧或兼性厌氧微生物,此类微生物的可能与冷泉沉积物环境有关。前期研究中^[10],该门细菌仅发现 1 个与 *Bacillus subtilis* 具有同源性较高的克隆子,这可能与该类细菌在冷泉中的丰度较低有关,而适当的富集有利于此类菌的检出。

本文的绿弯菌门前期结果未获得,它利用葡萄糖作为碳源生长,这表明在以非培养法研究环境微生物多样性的过程中,某些种群可能因为丰度较低或克隆文库覆盖率不足等原因,造成多样性比环境中实际值低。因此,适当合理的预培养,可为非培养法研究环境微生物组成和多样性的方法提供有益的补充。

References:

- [1] Neufeld J D, Dumont M G, Vohra J, Murrell J C. Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 2007, 53(3): 435-442.
- [2] Kreuzer-Martin H W. Stable isotope probing: linking functional activity to specific members of microbial communities. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, 71(2): 611-619.
- [3] Lin G H. Stable isotope ecology: a new branch of ecology resulted from technology advances. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2010, 34(2): 119-122.
- [4] Lin J L, Radajewski S, Eshinimaev B T, Trotsenko Y A, McDonald I R, Murrell J C. Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikian soda

- lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2004, 6 (10): 1049-1060.
- [5] MacGregor B J, Boschker H T S, Amann R. Comparison of rRNA and polar-lipid-derived fatty acid biomarkers for assessment of ^{13}C -substrate incorporation by microorganisms in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5246-5253.
- [6] Schwarz S, Waschkwitz T, Daniel R. Enhancement of gene detection frequencies by combining DNA-based stable-isotope probing with the construction of metagenomic DNA libraries. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 22(4): 363-368.
- [7] Farnleitner A H, Wilhartz I, Ryzinska G, Kirschner A K T, Stadler H, Bartscher M M, Hornek R, Szewzyk U, Herndl G, Mach R L. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1248-1259.
- [8] Perreault N N, Andersen D T, Pollard W H, Greer C W, Whyte L G. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(5): 1532-1543.
- [9] Zeng J, Yang H M, Lou K. Prokaryotic diversity of a non-sulfide, low-salt cold spring sediment of Shawan County, China. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 50(5): 484-493.
- [10] Zeng J, Yang H M, Xu J H, Wu J C, Zhang T, Sun J, Lou K. Bacterial phylogenetic diversity of a cold spring sediment of Shawan, Xinjiang. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(21): 5728-5735.
- [11] Webster G, Watt L C, Rinna J, Fry J C, Evershed R P, Parkes R J, Weightman A J. A comparison of stable-isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(9): 1575-1589.
- [12] Lundström P, Teilmann K, Carstensen T, Bezsonova I, Wiesner S, Hansen D F, Religa T L, Akke M, Kay L E. Fractional ^{13}C enrichment of isolated carbons using $[1-^{13}\text{C}]$ - or $[2-^{13}\text{C}]$ -glucose facilitates the accurate measurement of dynamics at backbone C^α and side-chain methyl positions in proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 2007, 38(3): 199-212.
- [13] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [14] Padmanabhan P, Padmanabhan S, DeRito C, Gray A, Gannon D, Snape J R, Tsai C S, Park W, Jeon C, Madsen E L. Respiration of ^{13}C -labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ^{13}C -Labeled soil DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1614-1622.
- [15] Kunapuli U, Lueders T, Meckenstock R U. The use of stable isotope probing to identify key iron-reducing microorganisms involved in anaerobic benzene degradation. *International Society for Microbial Ecology*, 2007, 1(7): 643-653.
- [16] Gürtler V, Stanisich V A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 1996, 142(1): 3-16.
- [17] Chun J, Lee J H, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim B K, Lim Y W. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(10): 2259-2261.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [19] Freckman D W, Blackburn T H, Brussaard L, Hutchings P, Palmer M A, Snelgrove P V R. Linking biodiversity and ecosystem functioning of soils and sediments. *Ambio*, 1997, 26(8): 556-562.
- [20] Chaudhary A, Haack S K, Duris J W, Marsh T L. Bacterial and archaeal phylogenetic diversity of a cold sulfur-rich spring on the shoreline of lake Erie, Michigan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5025-5036.
- [21] Perreault N N, Andersen D T, Pollard W H, Greer C W, Whyte L G. Characterization of the Prokaryotic Diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(5): 1532-1543.
- [22] Farnleitner A H, Wilhartz I, Ryzinska G, Kirschner A K, Stadler H, Bartscher M M, Hornek R, Szewzyk U, Herndl G, Mach R L. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1248-1259.
- [23] Li H, Zeng J, Gao X Q, Yang H M, Zhang T, Yang X F, Sun J, Lou K. Bacterial community structure and diversity in a cold sulfur spring in Xinjiang faulting zone. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(5): 595-602.
- [24] Whitby C, Bailey M, Whiteley A, Murrell C, Kilham K, Prosser J, Lappin-Scott H. Stable isotope probing links taxonomy with function in microbial communities. *American Society for Microbiology News*, 2005, 71(4): 169-173.
- [25] Radajewski S, McDonald I R, Murrell C M. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(3): 296-302.

参考文献:

- [3] 林光辉. 稳定同位素生态学: 先进技术推动的生态学新分支. *植物生态学报*, 2010, 34(2): 119-122.
- [10] 曾军, 杨红梅, 徐建华, 吴江超, 张涛, 孙建, 姜恺. 新疆沙湾冷泉沉积物的细菌系统发育多样性. *生态学报*, 2010, 30(21): 5728-5735.
- [23] 李慧, 曾军, 高小其, 杨红梅, 张涛, 杨晓芳, 孙建, 姜恺. 新疆断裂带含硫冷泉水细菌群落结构多样性. *微生物学报*, 2011, 51(5): 595-602.

CONTENTS

Growth and physiological adaptation of <i>Messerschmidia sibirica</i> to sand burial on coastal sandy	WANG Jin, ZHOU Ruilian, ZHAO Halin, et al (4291)
Alleviation effect and mechanism of exogenous potassium nitrate and salicylic acid on the growth inhibition of <i>Pinus tabulaeformis</i> seedlings induced by deicing salts	ZHANG Ying, LI Fayun, YAN Xia, et al (4300)
Influence of different spatial-scale factors on stream macroinvertebrate assemblages in the middle section of Qiantang River Basin	ZHANG Yong, LIU Shuoru, YU Haiyan, et al (4309)
Species diversity and distribution pattern of non-volant small mammals along the elevational gradient on eastern slope of Gongga Mountain	WU Yongjie, YANG Qisen, XIA Lin, et al (4318)
A patch-based method for mechanism analysis on spatial dynamics of mangrove distribution	LI Chungan, LIU Suqing, FAN Huangqing, et al (4329)
Nutrient heterogeneity in fine roots of six subtropical natural tree species	XIONG Decheng, HUANG Jinxue, YANG Zhijie, et al (4343)
Variation of vegetation NDVI and its response to climate change in Zhejiang Province	HE Yue, FAN Gaofeng, ZHANG Xiaowei, et al (4352)
Heterogeneity in fine root respiration of six subtropical tree species	ZHENG Jinxing, XIONG Decheng, HUANG Jinxue, et al (4363)
Characteristics of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea abundance in soil organic layer under the subalpine/alpine forest	WANG Ao, WU Fuzhong, HE Zhenhua, et al (4371)
Effect of tillage systems on light fraction carbon in a purple paddy soil	ZHANG Junke, JIANG Changsheng, HAO Qingju, et al (4379)
Effects of prescribed fire on carbon sequestration of long-term grazing-excluded grasslands in Inner Mongolia	HE Nianpeng, HAN Xingguo, YU Guirui, et al (4388)
Stoichiometry of carbon dioxide and methane emissions in Minjiang River estuarine tidal wetland	WANG Weiqi, ZENG Congsheng, TONG Chuan, et al (4396)
Distribution and sources of particulate organic carbon in the Pearl River Estuary in summer 2010	LIU Qingxia, HUANG Xiaoping, ZHANG Xia, et al (4403)
The glucose-utilizing bacterial diversity in the cold spring sediment of Shawan, Xinjiang, based on stable isotope probing	CHU Min, WANG Yun, ZENG Jun, et al (4413)
Culture-dependent and culture-independent approaches to studying soil microbial diversity	LIU Guohua, YE Zhengfang, WU Weizhong (4421)
The classification of plant functional types based on the dominant herbaceous species in the riparian zone ecosystems in the Yiluo River	GUO Yili, LU Xunling, DING Shengyan (4434)
Genetic diversity of different eco-geographical populations in endangered plant <i>Prunus mongolica</i> by ISSR Markers	ZHANG Jie, WANG Jia, LI Haoyu, ZHANG Huirong, et al (4443)
Ecophysiological characteristics of higher-latitude transplanted mangrove <i>Kandelia candel</i> in strong tidal range area	ZHENG Chunfang, QIU Jianbiao, LIU Weicheng, et al (4453)
The effect of artificial warming during winter on white clover (<i>Trifolium repens</i> Linn): overwintering and adaptation to coldness in late spring	ZHOU Ruilian, ZHAO Mei, WANG Jin, et al (4462)
Estimating fine root production and mortality in subtropical <i>Altingia grilipes</i> and <i>Castanopsis carlesii</i> forests	HUANG Jinxue, LING Hua, YANG Zhijie, et al (4472)
The cloning and expression of WUE-related gene (<i>PdEPF1</i>) in <i>Populus deltoides</i> × <i>Populus nigra</i>	GUO Peng, JIN Hua, YIN Weilun, et al (4481)
The allelopathy of aquatic rhizome and root extract of <i>Thalia dealbata</i> to seedling of several aquatic plants	MIAO Lihua, WANG Yuan, GAO Yan, et al (4488)
Effect of the avirulent strain of <i>Ralstonia solanacearum</i> on the ecological characteristics of microorganism fatty acids in the rhizosphere of tobacco	ZHENG Xuefang, LIU Bo, LAN Jianglin, et al (4496)
Coupling remotely sensed information with a rice growth model by combining updating and assimilation strategies	WANG Hang, ZHU Yan, MA Mengli, et al (4505)
Effects of water temperature and body weight on metabolic rates of Yellowtail clownfish <i>Amphiprion clarkii</i> (Pisces: Perciformes) during larval development	YE Le, YANG Shengyun, LIU Min, et al (4516)
The distribution of chlorophyll a in the Southwestern Indian Ocean in summer	HONG Lisha, WANG Chunsheng, ZHOU Yadong, et al (4525)
Evaluation of the effects of ecological remediation on the water quality and biological toxicity of Dagou Drainage River in Tianjin	WANG Min, TANG Jingchun, ZHU Wenyong, et al (4535)
Quantitative dynamics of adult population and 3-D spatial pattern of <i>Ceoporus variabilis</i> (Baly)	WANG Wenjun, LIN Xuefei, ZOU Yunding, et al (4544)
Review and Monograph	
Studies on urban heat island from a landscape pattern view: a review	CHEN Ailian, SUN Ranhao, CHEN Liding (4553)
Sediment quality triad and its application in coastal ecosystems in recent years	WU Bin, SONG Jinming, LI Xuegang, et al (4566)
Discussion	
Food waste management in China: status, problems and solutions	HU Xinjun, ZHANG Min, YU Junfeng, et al (4575)
Scientific Note	
Effects of microchemical substances in anaerobic fermented liquid from rice straw and cyanobacteria on <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> growth	LIU Aimin, XU Shuangsoo, CAI Xin, et al (4585)
Ecological benefit-loss analysis of agricultural ecosystem in Foshan City, China	YE Yanqiong, ZHANG Jiaen, QIN Zhong, et al (4593)

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7 国外邮发代号:M670 标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 32 卷 第 14 期 (2012 年 7 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32 No. 14 (July, 2012)

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100071	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元