

## 高含油小球藻 (*Chlorella* sp.) 培养工艺条件的研究



YANG Jing

杨 静, 蒋剑春\*, 张 宁

(中国林业科学研究院 林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室; 国家林业局  
林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省生物质能源与  
材料重点实验室; 江苏 南京 210042)

**摘 要:** 考察了小球藻的异养能力, 并利用部分析因试验和正交试验两步试验设计优化了小球藻产油条件。实验结果表明: 所选小球藻能够进行异养, 在葡萄糖、半乳糖和麦芽糖中均生长良好。以葡萄糖为外加碳源时, 兼养组和异养组的生长量较之自养组分别提高了 3.72 和 2.74 倍。经过部分析因试验和正交试验, 筛选出影响小球藻油脂产率的显著因素为氮源浓度和温度。在氮源浓度为 6.0 mmol/L, 温度为 25 °C, pH 值为 6.0 时, 小球藻的油脂产率可达到 58.49 mg/(L·d)。

**关键词:** 小球藻; 油脂产率; 部分析因试验; 正交试验

中图分类号: TQ351

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2011)03-0011-06

## Investigation of Process to Cultivate High-lipid-content *Chlorella* sp.

YANG Jing, JIANG Jian-chun, ZHANG Ning

(Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China)

**Abstract:** The heterotrophic capability of *Chlorella* sp. was investigated. The conditions of lipid productivity were optimized by fractional factorial design (FFD) and orthogonal experiments. The results showed that *Chlorella* sp. had the heterotrophic capability and grew well in glucose, galactose and maltose. Compared to that in autotrophy the biomass which grew in mixotrophy and heterotrophy increased by 3.72 times and 2.74 times respectively, using glucose as additional carbon resource. Through FFD and orthogonal experiments, nitrogen source concentration and temperature were selected as significant factors. The highest lipid productivity of 58.49 mg/(L·d) occurred under the conditions of nitrogen source concentration 6.0 mmol/L, temperature 25 °C and pH value 6.0. GC-MS analysis demonstrated that the fatty acid composition of the lipid was similar to that of vegetable oil and its unsaturated fatty acid content reached 72.97%. It is a promising material for biodiesel production.

**Key words:** *Chlorella* sp.; lipid productivity; fractional factorial design; orthogonal experiment

多年来,传统能源的大量使用导致了能源危机以及环境恶化。为了实现经济和环境的可持续发展,可再生、无污染的生物质能源已成为当今的研究热点。生物柴油是以生物体油脂为原料,通过分解酯化而得到的长链脂肪酸,是一种可以替代普通柴油使用的环保、可再生能源<sup>[1]</sup>。而微藻由于其含油量高、生长周期短、产量高、对环境要求低等突出特点而成为唯一能够完全取代石化柴油的生物柴油原料<sup>[2-3]</sup>。筛选出生长迅速、高产的藻株以及培养条件的优化是利用微藻来生产生物柴油两大基本要点<sup>[4]</sup>。并不是所有的微藻都适合于生产柴油,它需要有较高的油脂含量以及较快的生长速率。高生长速率可以短时间内得到大量的生物量以及减少染菌几率。高含油量能够增加生产过程的得率,并且能够降低生物柴油的生产成本<sup>[5]</sup>。许多研究将重点集中于获得高含油量的微藻而忽略了生长速率,结果

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (20090460037)

作者简介: 杨 静 (1985-), 女, 河北保定人, 硕士生, 主要从事生物质能源方面的研究; E-mail: yj3219@163.com

\* 通讯作者: 蒋剑春 (1955-), 男, 江苏溧阳人, 研究员, 博士生导师, 从事林产化学加工和生物质能源开发技术研究; E-mail: bio-energy@163.com。

导致生物柴油产量很低<sup>[6-7]</sup>。而油脂产率综合考虑了这两个因素,越来越多的被用作筛选适于生物柴油生产的微藻的评价标准。小球藻由于其生长速度快,含油量高而成为生产生物柴油的理想原料。自然条件下小球藻的含油量一般在14%~22%<sup>[8]</sup>,但是在一些极端条件下其含油量可达到55%~70%(细胞质量)<sup>[9-10]</sup>。影响小球藻生长及油脂含量的因素很多,包括环境因素如温度、光照强度、pH值、接种量。以及培养基中营养条件,如氮、磷浓度,对于可以异养的种类,外加葡萄糖也会对其生长量及含油量产生影响<sup>[11-12]</sup>。单因素试验工作繁琐,误差大,而统计试验设计可最大程度降低实验误差,能够同步、系统、有效地分析各因素间的相互关系<sup>[13-14]</sup>。部分析因设计主要用于筛选试验中,可以从众多因素中找出有较大效应的主要因素,从而大大节省试验工作量<sup>[15]</sup>。本研究的目的在于考察小球藻的异养能力,然后利用部分析因试验和正交试验两步优化小球藻产油条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 微藻与培养基

实验所用小球藻(*Chlorella* sp.)购自中国科学院水生生物研究所。所用培养基为SE(Brostell's solution)培养基。微藻置于光照培养箱中静置培养,温度23℃,光照强度3500 Lux,光照:周期12 h/12 h(光照/黑暗),每天振摇3~4次。指数生长末期收获,测定质量,粗脂含量。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 微藻异养能力考察** 为了检测小球藻的异养生长能力,分别选取葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖、甘油、乙酸钠作为唯一有机碳源,加入到SE培养基中,加15 g/L琼脂制成固体平板。取0.1 mL指数生长期的微藻,涂布,做3次重复,以无外加碳源的组为对照组。接种后的平板黑暗条件下培养,温度设为23℃,培养10 d。

**1.2.2 不同培养方式的考察** 选择1.2.1节中所筛选出的碳源,考察小球藻在不同培养方式下生长能力。设定3组实验,其中自养组为基础培养基,兼养组为基础培养基中添加外加碳源。两组置于光照培养箱中静置培养,每天摇藻并随机更换三角瓶位置,以避免光照不匀。异养组为基础培养基加外加碳源,置于完全黑暗条件下。每个条件设3个重复,从接种当天,隔天取藻液测定质量,3次重复取平均值。指数生长末期收获。

### 1.2.3 产油条件优化

**1.2.3.1 部分析因试验设计** 以光照强度、温度、pH值、接种量、外加葡萄糖浓度和氮源浓度6个因素为自变量,油脂产率为应变量,选择STATISTICA8.0中Experimental Design模块中的2×(K-P) standard designs,设计2×(6-2)部分析因筛选试验(表1)。试验中光照强度、温度、pH值和氮源浓度的中心值来自于藻种中心。葡萄糖浓度和接种量的中心值根据文献确定<sup>[16]</sup>。

表1 部分析因实验各因素及水平设置

Table 1 Factors and levels of FFD

|                | 因素 factors   | 水平 levels |      |
|----------------|--|-----------|------|
|                |  | -1        | +1   |
| X <sub>1</sub> | 光照强度 illumination intensity/Lux                            | 2000      | 4000 |
| X <sub>2</sub> | 温度 temperature/℃   | 25        | 28   |
| X <sub>3</sub> | pH值 pH value   | 5         | 8    |
| X <sub>4</sub> | 葡萄糖质量浓度 glucose mass concentration/(g·L <sup>-1</sup> )    | 10        | 20   |
| X <sub>5</sub> | 接种量 inoculation dosage/%                                   | 10        | 20   |
| X <sub>6</sub> | 氮源浓度 nitrogen source concentration/(mmol·L <sup>-1</sup> ) | 1.5       | 3.0  |

**1.2.3.2 正交试验** 由部分析因设计的筛选实验筛选出氮源浓度,温度为主要因素,第三重要影响因素为pH值。因此设计氮源浓度、温度、pH值的3因素3水平正交试验。试验设计如表2所示。

### 1.3 测定方法

**1.3.1 藻体质量的测定** 先取0.45 μm的纤维滤膜于电热鼓风干燥箱中105℃下烘至恒质量,用电

子天平称量滤膜的量( $m_1$ )。然后取一定体积( $V_0$ )的藻液,用此滤膜抽滤分离,将滤膜放入干燥箱内烘至恒质量,取出冷却称量,得到抽滤后总质量( $m_2$ )。藻体的生长量( $W$ )可由下式计算:

$$W = (m_2 - m_1) \times 1/V_0$$

式中: $m_1$ —滤膜质量,g; $m_2$ —抽滤后总质量,g;1—1L的藻液; $V_0$ —所取藻液体积,mL。

表2 正交试验因素及水平设置

Table 2 Factors and levels for orthogonal experiment

| 水平 level | 因素 factor  |                           |                       |
|----------|--|---------------------------|-----------------------|
|          | A<br>氮源浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )<br>nitrogen source concentration | B<br>温度/°C<br>temperature | C<br>pH 值<br>pH value |
| 1        | 1.5  | 23                        | 6                     |
| 2        | 3.0  | 25                        | 7                     |
| 3        | 6.0  | 27                        | 8                     |

**1.3.2 含油量测定** 采用溶剂浸提法,提取溶剂为石油醚、乙醚混合溶液(体积比为2:1),40℃条件下浸提5h。将充分研磨的干燥粉加入提取溶剂,期间适当振荡混匀,待提取结束后,加入质量分数10%的氢氧化钾溶液沉淀微藻细胞,摇匀静止一段时间后,将混合溶液在4000 r/min转速下离心15 min,收集上清液于已质量恒定的离心管中,于60℃水浴中迅速蒸去多余的溶剂,称量,计算油脂含量。含油量( $Y$ )与油脂产率( $W_{LP}$ )计算公式如下:

$$Y = m_L/m_{DA} \times 100\%$$

$$W_{LP} = 1000Y \cdot W/t$$

式中: $Y$ —含油量,%; $m_L$ —油脂的质量,g; $m_{DA}$ —微藻干质量,g; $W_{LP}$ —油脂产率,mg/(L·d); $W$ —微藻生长量,g/L; $t$ —实验周期,这里为8 d。

## 2 结果与分析

### 2.1 小球藻的异养能力考察

在黑暗条件下,经过10 d的培养,小球藻在葡萄糖、半乳糖和麦芽糖中均显示出旺盛的生长力,在甘油中仅有微量的生长,而在乙酸钠中没有生长。异养时小球藻呈现出乳黄色,这与缪晓玲等<sup>[10]</sup>的研究结果类似。培养基中高浓度的葡萄糖抑制叶绿素合成过程中氨基乙酰丙酸(ALA)后的反应步骤,及叶绿素降解加快两方面原因导致异养小球藻细胞中叶绿素消失。结果表明所选小球藻有较强的异养能力,在以下的实验中选取葡萄糖为外加碳源进一步考察其在不同培养方式下的生长情况。

### 2.2 不同培养方式下生长能力

以葡萄糖为外加碳源,本次实验考察了小球藻在自养、异养、兼养条件下的生长情况。小球藻生长曲线见图1。

由图看出,葡萄糖的加入使小球藻生长速率大大增大。经过8 d生长,收获时自养组、异养组和兼养组生长量分别为0.46、1.72和2.17 g/L。异养组和兼养组生长量分别是自养组的3.74倍和4.72倍。兼养组生长速率大约等于自养和异养条件下的总和。这和Kitano等<sup>[16]</sup>的研究结果类似。原因是兼养生长包括光合自养和化能异养生长,且两个过程是同步而又相对独立的过程<sup>[17]</sup>。由于兼养组生长速率快,以后的实验均在兼养状态下进行。

### 2.3 产油条件优化

影响微藻油脂产率的因素很多,本次实验先利用部分析因试验筛选出显著因素,然后利用正交试验确定出因素的最佳值

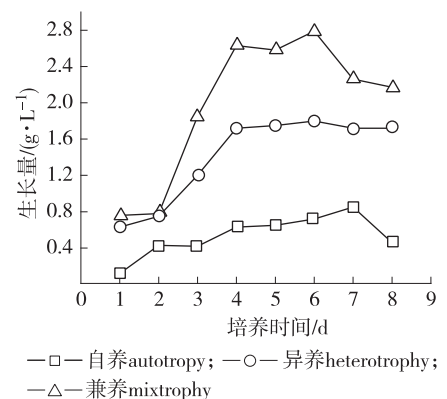


图1 小球藻(*Chlorella* sp.) 3种培养方式下的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of algae using 3 different cultural methods

以及因素的最优组合。

**2.3.1 部分析因设计试验** 部分析因试验设计主要用于从大量因素中筛选出主要因素,被广泛用于优化试验条件。本部分试验中,根据 STATISTICA 8.0 软件中  $2 \times (6-2)$  设计出 16 组试验,每组试验设置 2 个重复。部分析因设计的试验结果如表 3 所示。对试验结果进行分析,结果如表 4。

表 3 部分析因设计及实验结果

Table 3 Results of two-level factorial design

| 编号<br>No. | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | 油脂产率/(mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )<br>lipid productivity |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|
| 1         | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | -1             | 33.82   |
| 2         | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 18.32   |
| 3         | -1             | 1              | -1             | -1             | 1              | 1              | 14.38   |
| 4         | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 1              | 20.19   |
| 5         | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | 27.33   |
| 6         | 1              | -1             | 1              | -1             | -1             | 1              | 23.06   |
| 7         | -1             | 1              | 1              | -1             | -1             | -1             | 16.46   |
| 8         | 1              | 1              | 1              | -1             | 1              | -1             | 21.94   |
| 9         | -1             | -1             | -1             | 1              | -1             | 1              | 13.83   |
| 10        | 1              | -1             | -1             | 1              | 1              | 1              | 17.49   |
| 11        | -1             | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | 17.22   |
| 12        | 1              | 1              | -1             | 1              | -1             | -1             | 15.86   |
| 13        | -1             | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | 16.90   |
| 14        | 1              | -1             | 1              | 1              | -1             | -1             | 12.08   |
| 15        | -1             | 1              | 1              | 1              | -1             | 1              | 14.32   |
| 16        | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 1              | 23.14   |

表 4 部分析因试验结果分析

Table 4 Analysis of results of two-level factorial design

| 因素 factor      | 效应 effect | 系数 coef. | t 值 t-value | P 值 P-value |
|----------------|-----------|----------|-------------|-------------|
| X <sub>1</sub> | 0.00400   | 0.00200  | 0.33297     | 0.74678     |
| X <sub>2</sub> | 0.03700   | 0.01850  | 3.07999     | 0.01314     |
| X <sub>3</sub> | 0.01175   | 0.00588  | 0.97811     | 0.353580    |
| X <sub>4</sub> | -0.00175  | -0.00088 | -0.14568    | 0.887388    |
| X <sub>5</sub> | -0.00275  | -0.00138 | -0.22892    | 0.82405     |
| X <sub>6</sub> | 0.04700   | 0.02350  | 3.91242     | 0.00355     |

由表 4 可看出,氮源浓度和温度这 2 个因素是统计显著的( $P < 0.05$ )。而光照强度、pH 值、接种量和葡萄糖浓度 4 个因素是非统计显著的( $P > 0.05$ )。从而筛选出影响小球藻油脂产率的主要因素为氮源浓度和温度。其中光照强度、温度、pH 值和氮源浓度为正效应,而葡萄糖浓度和接种量为负效应。这就意味着,增大葡萄糖浓度和接种量,油脂产率反而降低。因此在后续实验中,选定葡萄糖质量浓度为 10 g/L,接种量为 10% 体积分数。

同时选定显著因素,氮源浓度和温度,以及第三位影响因素 pH 值制定 3 因素 3 水平的正交试验,从而确定出小球藻产油的最佳条件。

**2.3.2 正交试验结果** 根据部分析因试验所筛选出的主要因素,设计出  $L_9(3^4)$  的 3 因素 3 水平试验。试验结果如表 5。

由极差分析结果可以看出,3 个因素对油脂产量的影响顺序为:C > A > B,即 pH 值 > 氮源浓度 > 温度,最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>,即氮源 6.0 mmol/L,温度 25 °C,pH 值 6.0。此条件下做验证试验,小球藻的油脂产量可达到 58.49 mg/(L·d)。在本次试验中,pH 值对小球藻油脂产率的影响最大,pH 值可通过引起细胞膜点的变化和影响营养物质离子化程度来影响微生物对营养的吸收,而且它还影响细胞内多种酶

的活性。在本试验中,最适宜微藻油脂积累的 pH 值为 6.0,这和张薇等<sup>[18]</sup>的报道类似。

表 5 正交试验结果分析

Table 5 Results of orthogonal experiments of *Chlorella* sp.

| 编号 No. | A<br>氮源浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )<br>nitrogen source concentration | B<br>温度/℃<br>temperature | C<br>pH 值<br>pH value | 油脂产率/(mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )<br>lipid productivity |
|--------|--|--------------------------|-----------------------|---|
| 1      | 1.5  | 23                       | 6.0                   | 32.45   |
| 2      | 1.5  | 25                       | 7.0                   | 33.58   |
| 3      | 1.5  | 27                       | 8.0                   | 35.69   |
| 4      | 3.0  | 23                       | 7.0                   | 32.45   |
| 5      | 3.0  | 25                       | 8.0                   | 32.31   |
| 6      | 3.0  | 27                       | 6.0                   | 41.35   |
| 7      | 6.0  | 23                       | 8.0                   | 24.36   |
| 8      | 6.0  | 25                       | 6.0                   | 50.56   |
| 9      | 6.0  | 27                       | 7.0                   | 39.05   |
| $k_1$  | 33.91  | 29.75                    | 41.45                 |   |
| $k_2$  | 35.37  | 38.81                    | 35.01                 |   |
| $k_3$  | 37.98  | 38.68                    | 30.78                 |   |
| $R$    | 4.07   | 9.06                     | 10.67                 |   |

虽然氮源缺乏会极大增大油脂含量,但是同时因营养缺乏也会抑制微藻细胞的生长,从而使油脂产率偏低。从表中可以看出在氮源浓度为 6.0 mmol/L 时,油脂产率最大,故在本实验中,高浓度的硝酸钠较适合用于油脂的生产。

### 3 结论

**3.1** 所选小球藻具有异养能力,黑暗条件下,其在葡萄糖,半乳糖和麦芽糖中生长旺盛。并且以葡萄糖为外加碳源时,兼养组和异养组的生长量较之自养组分别提高了 3.72 和 2.74 倍。

**3.2** 经过部分析因试验和正交试验,筛选出影响小球藻油脂产率的显著因素为氮源浓度和温度。在氮源浓度为 6.0 mmol/L,温度为 25 ℃,pH 值为 6.0 时,小球藻的油脂产量可达到 58.49 mg/(L·d)。

#### 参考文献:

- [1] 宋东辉,侯李君,施定基. 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用[J]. 生物工程学报,2008,24(3):341-348.
- [2] YUSUF C. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology Advances,2007,25:294-306.
- [3] 梅洪,张成,殷大聪,等. 利用微藻生产可再生能源研究概况[J]. 武汉植物学研究,2008,26(6):650-660.
- [4] GRIFFITHS M J, HARRISON S T L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production[J]. J Appl Phycol,2009,21:493-507.
- [5] HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances[J]. The Plant Journal,2008,54(4):621-639.
- [6] LV J M, CHENG L H, XU X H. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions[J]. Biores Technol, 2010,101:6797-6804.
- [7] LI Y Q, HORSMAN M, WANG B, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2006,81:629-636.
- [8] GOUVEIA L, OLIVAEIRA A C. Microalgae as a raw material for biofuels production[J]. J Ind Microbiol Biotechnol,2009,36(2):269-274.
- [9] 张大兵,吴庆余. 小球藻细胞的异养转化[J]. 植物生理学通讯,1996,32(2):140-141.
- [10] 缪晓玲,吴庆余. 藻类异养转化制备生物油燃料技术[J]. 可再生能源,2004,4:41-45.
- [11] ILLMAN A M, SCRAGG A H, SHALES S W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium[J]. Enzyme Microb Tech,2000,27:631-635.
- [12] CONVERTI A, CASAZZA A A, ORTIZ E Y, et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production[J]. Chem Eng Process,2009,48(6):1146-1151.

- [13] OOIJKAAS L P, WILKINSON E C, TRAMPER J, et al. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minutans* using statistically based experimental design[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 64(1):92-100.
- [14] KWAK K O, JUNG S J, CHUNG S Y. Optimization of culture conditions for CO<sub>2</sub> fixation by a chemoautotrophic microorganism, strain YN-lusing factorial design[J]. *Biochem Eng J*, 2006, 31(1):1-7.
- [15] 马正飞, 殷翔. 数学计算方法与软件的工程应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [16] KITANO M, MATSUKAWA R, KARUBE I. Changes in eicosapentenoic acid content of *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic conditions[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9:559-563.
- [17] GAO C F, ZHAI Y, DING Y, et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides* [J]. *Appl Energy*, 2010, 87:756-761.
- [18] 张薇, 吴虹, 宗敏华. 蛋白核小球藻发酵产油脂的研究[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(6):855-860.

## 本刊信息

### 《林产化学与工业》征稿简介

《林产化学与工业》是中国林业科学研究院林产化学工业研究所和中国林学会林产化学化工分会共同主办的学术类刊物。报道范围是可再生的木质和非木质林产品和生物质资源的化学加工与利用,包括生物质能源、生物质化学品和生物质材料等,主要包括生物质资源的热转化、热化学转化和活性炭,木材化学和制浆造纸,生物质原料水解,松脂及松香、松节油,植物多酚,林产香料、油脂、药物和生物活性物质,木工胶黏剂,树木寄生产物以及其他森林天然产物等方面的最新研究成果。为了保证刊物的质量,根据国家的有关标准和本刊的实际,特制定本简介。

#### 1 文稿基本要求

论文应有一定的科学性、创新性、实用性和可读性,内容充实,数据可靠,论点明确,文字精练。论文一般不超过7000字(含图表)。文稿按顺序应包含:题目,作者姓名、单位,中文摘要,关键词(3~5个),中图分类号,英文摘要,正文,致谢,参考文献。来稿首页页下请注明第一作者的个人信息、基金项目名称及编号。书写格式具体要求请详见本刊网站投稿指南(<http://www.cifp.ac.cn/cn/tgzn.asp>)。

#### 2 投稿约定

**2.1** 来稿请登录 [www.cifp.ac.cn](http://www.cifp.ac.cn), 在线投稿, 并请留下作者详细通讯地址、邮政编码及联系电话。稿件一经受理即交纳审稿费。稿件处理结果可登录投稿系统查询。

**2.2** 对于拟发表的稿件, 作者应根据审稿人和编辑部的意见对稿件进行修改, 在指定时间内修回, 同时提供电子文档, 交纳版面费及照片等。修改后的稿件统一由主编终审后再进行排版印刷(稿件一经发排, 不得擅自修改或变更作者署名, 且一般不得对文稿进行增删)。来稿一经发表, 即酌付稿酬, 并赠送当期期刊2册、单行本5份。本刊以刊登中文稿件为主, 同时接受英文稿件(附中文摘要)。

**2.3** 凡属实验研究报告的稿件, 需提供作者所在单位推荐信, 内容包括: 文章题名、作者姓名及其排序, 无泄密情况, 无一稿多投; 若为基金项目请给出项目名称及编号。

**2.4** 来稿文责自负, 请勿一稿多投。编辑部对来稿有权作技术性和文字修饰, 但实质性内容的修改须征得作者同意。

**2.5** 凡本刊发表的文章将有可能进入国内外相关数据库并在互联网上运行, 其作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入相关数据库, 请在来稿时声明, 本刊将做适当处理。