

一株珊瑚礁-海草床复合生态系统固氮菌的 分离与鉴定

凌娟^{1,2,3} 董俊德^{1,2*} 张燕英^{1,2} 蔡创华^{1,2} 王友绍¹ 张偲¹

- (1. 中国科学院南海海洋研究所 广东 广州 510301)
(2. 中国科学院海南热带海洋生物实验站 海南 三亚 572000)
(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要: 三亚珊瑚礁自然保护区部分珊瑚礁退化后逐渐演替为以泰来藻(*Thalassia hemprichii*)为优势种的海草床群落, 采用选择性无氮培养基从泰来藻植株的根际, 分离得到一株固氮菌, 编号为 G33-1, 经形态学、生理生化鉴定和 16S rDNA 及固氮基因 *nifH* 的序列分析, 初步鉴定为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。该菌为革兰氏阴性菌, 以周生鞭毛运动, 呈直杆状, 菌落圆形, 半透明乳白色, 比较湿润, 有光泽, 直径约 1 mm, 低凸, 光滑, 边缘比较整齐。最适培养条件为: 氯化钠浓度 25‰, 生长温度为 37°C, 起始 pH 值为 8。与成团泛菌标准菌株(ATCC27155TM)相比较, 在碳源利用、精氨酸双水解、苯丙氨酸脱氨酶、鸟氨酸脱氨酶、以及生长温度和盐度等方面都具有较高的相似性, 以 16S rDNA 为基础构建的系统进化树分析结果, 表明其与成团泛菌属 *Pantoea agglomerans* WAB1870 进化距离最近, 相似性大于 99%。此外, 利用乙炔还原法对固氮活性进行测定, 其具有较高的固氮活性, 达 299.16 nmol C₂H₂/(mL·h)。

关键词: 珊瑚礁-海草生态系统, 固氮菌, 16S rDNA, *nifH*

Isolation and Characterization of a N₂-fixing Bacterium from Coral Reef-seagrass Ecosystem

LING Juan^{1,2,3} DONG Jun-De^{1,2*} ZHANG Yan-Ying^{1,2} CAI Chuang-Hua^{1,2}
WANG You-Shao¹ ZHANG Si¹

- (1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)
(2. National Experiment Station of Tropical Marine Biology, Sanya, Hainan 572000, China)
(3. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: A strain capable of growth at high rates under nitrogen fixation conditions was isolated from the root of the seagrass (*Thalassia hemprichii*), which appeared after the degradation of coral reefs in Sanya natural reserves. The bacterium was identified as *Pantoea agglomerans*, which was also called

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目(No. 2009BAB44B03); 国家自然科学基金项目(No. 40776069, 40676091); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-YW-G-075-10, KSCX2-SW-132); 国家 973 计划项目(No. 2010CB833800); 海洋公益性行业科研专项经费项目(No. 200705026); 广东省科技计划项目(No. 2004B60302004, 2005B60301032)

* 通讯作者: Tel: 86-20-89023225; E: dongjunde@vip.163.com

收稿日期: 2010-01-22; 接受日期: 2010-04-21

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Enterobacter agglomerans, on the basis of its morphology, physiological and biochemical characteristics, and the sequence analysis of 16S rDNA and the nitrogenase structural gene *nifH*. It was identified as a gram-negative, smooth, low raised, straight-rod bacterium, which formed translucent colony with diameter of about 1 mm on the solid agar medium. Compared with the standard strain of the species *Pantoea agglomerans* (ATCC27155TM), there were high similarity in the carbon sources utility, hydrolysis and the optimal growth temperature and salinity. It could use a series of hydrocarbons as carbon sources, such as D-glucose, L-arabinose, sucrose, raffinose, maltose, rhamnose, D-xylose, D-mannitol, cellobiose, micronesia disaccharide. The results of the arginine dihydrolase, phenylalanine deaminase, lysine decarboxylation, ornithine deaminase were negative. The optimal growth temperature, pH and salinity were 37°C, 8 and 25‰, respectively. It could also grow at 40°C and pH was 10 but could not grow at zero salinity. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene sequences (EU841417) showed more than 99% similarities to that from other recognized *Pantoea agglomerans*. The nitrogen fixation rate of G33-1 was 299.16 nmol C₂H₂/(mL·h).

Keywords: Coral reef-seagrass ecosystem, Nitrogen fixing bacterium, 16S rDNA, *nifH*

珊瑚礁、海草与红树林并称为三大典型海洋近岸生态系统,均以丰富的生物多样性和极高生产力著称。珊瑚礁生态系统仅占海洋面积的 0.2%,但是在其上面生活的海洋生物占总数的 1/4,从而被誉为“海洋中的热带雨林”,其具有重要的生态功能,如防岸护堤、保护环境、提供海产品、药品、建筑和工业原材料^[1]。海草是唯一可以在水下开花的被子植物,其构成的海草床生态系统可以改善水的透明度和水质,具备抗波浪与海潮的能力,保护海岸,为一些海洋生物提供生存场所和食物^[2-6]。海草叶面和根际附着有大量的固氮微生物,如蓝藻类、异养细菌类、光合细菌类,可以通过将空气中的氮气(N₂)转化为可被生物体利用的氮素,将“新”氮源引入该生态系统,并同时促进碳的光合固定,形成新生产力,从而在一定程度上缓解了氮素对于初级生产力的限制,对海洋的氮、碳等生源元素的生物地球化学循环和海洋生产力的形成和持续发展有重要意义^[2]。王汉奎等^[7]发现三亚湾海域氮素含量较低,并且在夏秋季节会出现氮限制,但是该季节的生态系统仍然具有较高初级生产力水平,由此可见生物固氮在这区域起着重要的作用。关于三亚湾珊瑚礁-海草床生态系统固氮蓝藻的分离、鉴定以及固氮活性的研究已有研究报道^[8-9],但是针对该生态系统的固氮细菌的分离和鉴定的尚未有研究。

本研究以我国海南三亚湾鹿回头珊瑚礁-海草复合生态系统中的海草泰来藻(*Thalassia hemprichii*)为研究对象,采用无氮培养基分离得到了一株具有较高固氮酶活性的菌株 G33-1,并进行了相

关的鉴定工作,如形态学、生理生化鉴定、16S rDNA 以及固氮基因 *nifH* 的序列分析等,初步鉴定为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*),也叫成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*),成团泛菌最早是从水稻、种子、水果、土壤等中由 Beijerinck 等人分离出来的^[10-11],早在 1888 年就有了对此菌的描述,被命名为成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)^[12],后于 1989 年改名为 *Pantoea agglomerans*,该菌为国内首次在珊瑚礁-海草床生态系统中分离出^[13]。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1.1.1 样品采集: 样品采集时间为 2008 年 4 月,采样地点为中国海南省三亚市三亚湾珊瑚礁保护区珊瑚退化后生长的海草(18.25°N, 109.50°E),主要海草种类为泰来藻(*Thalassia hemprichii*),低潮时用无菌小铲进行取样,将海草整株植物以及根系周围的沉积物和附着生物一并装入灭菌的封口聚乙烯袋中,并将每个样品进行分类、编号,带回实验室立即低温保存(-20°C)。

1.1.2 培养基: 选择性固氮培养基参考 Smith GW^[14],并将培养基成分进行了改良: NaCl 25 g, KCl 0.56 g, MgSO₄·7H₂O 4.8 g, MgCl₂·6H₂O 4.0 g, K₂HPO₄ 0.01 g, FeSO₄·7H₂O 0.001 g, Tris 0.48 g, 蛋白胨 4.0 g, 酵母提取物 2.0 g, 甘油 2.0 mL, 蒸馏水 1 L, 终 pH 为 8.2。固体培养基中加入 2%的 Agar,其中液体培养基采用 0.22 μm 抽滤法灭菌法,固体培养基采用高温高压蒸汽灭菌法(1×10⁵ Pa 灭菌

25 min)。

LB 液体培养基, 将其培养基成分进行了改良: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 25 g, 蒸馏水 1 L, 固体培养基固体培养基中加入 2% 的琼脂。

1.2 菌株的分离筛选

取海草样品的根际(即叶鞘以及根状茎), 用灭过菌的剪刀剪成 2 cm 左右的小块, 放入被稀释成 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度的选择性固氮液体培养基中, 进行 30°C、180 r/min, 恒温 48 h 的加富培养后, 从中吸取 200 μ L 平板涂布法转移至固体培养基上培养(每个梯度 3 个重复), 于 30°C 进行培养。48 h 培养后, 选择典型的单一菌落做进一步纯化, 直至获得纯种。将纯化的菌接种至斜面培养基上培养, 用于固氮酶活性的检测。

1.3 固氮酶活性能力测定

菌株 G33-1 的纯培养物的固氮活性测定参照 Dong JD 和 Capone DG^[9,15-16], 其中乙炔还原的乙炔量与固定氮气的比例采用: $C_2H_4/N_2 = 4:1$ 进行换算^[16-17]。具体方法: 将斜面保存的纯菌株接种于 10 mL 液体改良培养基内, 于 30°C 摇床振荡培养 72 h 测定 OD_{480} , 进行统一调整, 分别取 1 mL 于灭菌的 5 mL 小瓶中, 盖上橡皮塞。瓶盖边缘以石蜡封口。用注射器将 1 mL 的乙炔注入, 在同样条件下培养 24 h, 然后取其中 40 μ L 反应后气体, 采用气相色谱仪测固氮菌的乙炔还原活性(Acetylene-reducing activity, ARA)。乙炔还原活性计算方法参见文献[18]:

$$ARA[nmol/(mL \cdot h)] = \frac{V_{st} \times C_{st} \times A_{sa} \times V_{tu}}{V_{sa} / A_{st} / h / 22.4}$$

其中, V_{st} 是注入标准气的体积(mL), C_{st} 是标准气的浓度, V_{tu} 是所用试管体积(mL), A_{sa} 是样品乙烯峰的面积(cm^2), V_{sa} 是样品注入体积(mL), A_{st} 是标准气峰面积(cm^2), h 是培养时间。

1.4 最适培养条件

1.4.1 盐度: 将菌液移种到含氯化钠为 0‰、5‰、10‰、15‰、20‰、25‰、30‰、33‰、40‰ 的基本培养基培养, 每隔 6 h 取样, 测 OD_{480} 。

1.4.2 温度: 移种后, 置于 4°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、37°C 和 40°C 恒温箱静置培养, 每隔 6 h 取样, 测 OD_{480} 。

1.4.3 起始 pH 值: 移种到起始 pH 值为 4.0、5.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 的基本培养基培养, 每

隔 6 h 取样, 测 OD_{480} 。

1.5 革兰氏染色和生理生化鉴定

革兰氏染色, 用光学显微镜观察细菌的形态和大小, 30°C 培养, 观察 18–24 h 菌龄的菌落形态。生理生化鉴定方法具体见参考文献[19]。

1.6 DNA 提取、扩增以及测序

DNA 模板提取: 将细菌接种于 LB 液体培养基中, 37°C、200 r/min 振荡培养过夜, 取 1.5 mL 培养物 8000 r/min 离心收集菌体, 重悬于 1 mL TE (pH 8.0), 用 SDS-溶菌酶联合裂解, 高盐沉淀法去除蛋白质和多糖, 再用乙醇沉淀提取总 DNA。细菌 16S rDNA 全序列采用通用引物 27F/1492R^[20], 固氮基因 *nifH* 特定的引物 PolF/PolR 进行 PCR 扩增^[21], 扩增程序如下: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min。取 2 μ L PCR 产物, 1% 琼脂糖电泳进行产物检测。

序列测序和分析: 16S rDNA 扩增产物经纯化后, 送交测序公司(拓谱)测序, 将所得到序列利用 EditSeq 软件处理, 利用 BLAST 软件将测定得到的基因序列与 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库进行序列比对分析, 获取相近典型菌株的 16S rDNA 基因序列, 然后利用 BIOEDIT 中的 ClustalW 对序列进行排列, 利用 MEGA 中的邻接法(Neighbor-joining)建立 16S rDNA 基因的系统发育树, 进行系统发育分析, 各枝上的数字是 1000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比^[22-24]。

2 结果与分析

2.1 菌的分离与形态学特征

该菌为革兰氏阴性菌, 以周生鞭毛运动, 呈直杆状, 菌落圆形, 半透明乳白色, 比较湿润, 有光泽, 直径约 1 mm, 低凸, 光滑, 边缘比较整齐。

2.2 生理生化初步鉴定结果

将菌株 G33-1 的生理生化鉴定结果与成团肠杆菌标准菌株 ATCC27155TM 进行了比较。通过表 1 可以看出, 该 G33-1 菌株的生理生化特征为: 不产生吲哚, V-P 阳性, 明胶液化阴性, 精氨酸双水解酶, 苯丙氨酸脱氨酶, 赖氨酸脱羧基, 鸟氨酸脱氨酶都为阴性, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, V-P 测定反应为阳性。可以利用的碳源: D-葡萄糖, L-阿拉伯糖, L-阿拉伯醇, 蔗糖, 棉籽糖, 麦芽糖, 鼠李糖, D-木糖, D-甘露醇, 纤维二糖, 密二糖等, 可以利用柠檬酸

表 1 成团肠杆菌标准菌株和 G33-1 的生理生化特征
Table 1 The physiological and biochemical characteristics of strains of *Pantoea agglomerans* and G33-1

特征 Characteristics	成团肠杆菌标准菌株(ATCC 27155 TM) Stand strain of <i>Pantoea agglomerans</i> (ATCC 27155 TM)	菌株 G33-1 Strain G33-1
吲哚产生 Indole production	—	—
甲基红 Methyl red	—	ND
伏-普二氏反应 Voges-Proskauer reaction	+	+
柠檬酸盐 Citrate	+	—
硫化氢 Hydrogen sulfide	—	—
脲酶 Christensen's	—	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	—	+
赖氨酸脱氢酶 Lysopine dehydrogenase	—	—
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	—	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—
运动性 Motility	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	—
氰化钾 KCN	—	ND
丙二酸盐利用 Saline malonate	+	+
D-葡萄糖产酸 D-glucose: Acid	+	+
D-葡萄糖产气 D-glucose: Gas	—	—
乳糖 Lactose	—	—
蔗糖 Sucrose	+	+
卫矛醇 Galactitol	—	—
水杨苷 Salicin	+	—
D-木糖 D-Xylose	+	+
D-阿东醇 D-Aribitol	—	—
D-山梨醇 D-Sorbitol	—	—
L-阿拉伯糖 L-Arabinitol	+	+
棉籽糖 Raffinose	+	—
麦芽糖 Maltose	+	+
L-鼠李糖 L-rhamnose	+	+
纤维二糖 Cellobiose	ND	+
蜜二糖 Melibiose	ND	+
D-阿拉伯糖醇 D-Arabite	ND	+
DNA 酶 DNase	—	—
氧化酶 Oxidases	—	—
邻硝基酚 β-D-半乳糖苷水解 ONPG hydrolysis	+	+
D-甘露糖 D-mannose	+	—
酒石酸盐利用 Tartrate utilization	—	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
色素: 黄色 Pigment: yellow	+	—
有机酸: 柠檬酸 Organic acid: Citric acid	—	ND

注: +: ≥90%菌株为阳性; -: ≥90%菌株为阴性; ND: 未测定。

Note: +: Denotes more than 90% of bacteria was positive; -: Denotes more than 90% of bacteria was negative; ND: Not determined.

盐和丙二酸盐,可以利用的有机酸为柠檬酸, DNA 结果阴性,该菌的最适生长盐度 25‰, 盐度为 0‰ 时不能生长,最适生长 pH 为 8, pH 为 10 时亦能生

长,最适生长温度为 37℃,温度为 40℃ 时能够生长,根据常见细菌系统鉴定手册鉴定,该菌为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)^[18]。

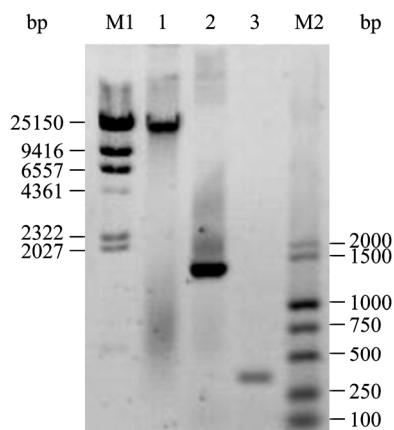


图1 菌株 G33-1 电泳图

Fig. 1 The Gel electrophoresis figure of G33-1

2.3 固氮酶活性测定和固氮基因 *nifH* 分析

通过分析乙炔峰图和公式计算推导得出, 菌株 G33-1 乙炔还原速率为 $299.16 \text{ nmol C}_2\text{H}_2/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 。分

析 *OD* 值测定结果, 表明此时的溶液中细菌数为 $1.3 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ 。菌株 G33-1 的基因组 DNA、16S rDNA、*nifH* 如图 1 中 1、2、3 所示, 其中 *nifH* 条带长度约为 350 bp, 为固氮酶的编码基因, 从而更加确定了该菌的固氮能力, 此结果与形态学和生理生化结果较为一致。

2.4 系统发育分析

菌株 G33-1 的 16S rDNA 和 *nifH* 序列结果已经提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中, 得到的 Accession numbers 分别是 EU841417 和 FJ875969。通过 G33-1 的 16S rDNA 序列以及 GenBank 里相近序列所建立的系统进化树(图 2), 显示该菌株与成团泛菌属 *Pantoea agglomerans* WAB1870 (AM184212), 相似度大于 99%, 这与形态和生理生化的鉴定结果具有一致性。

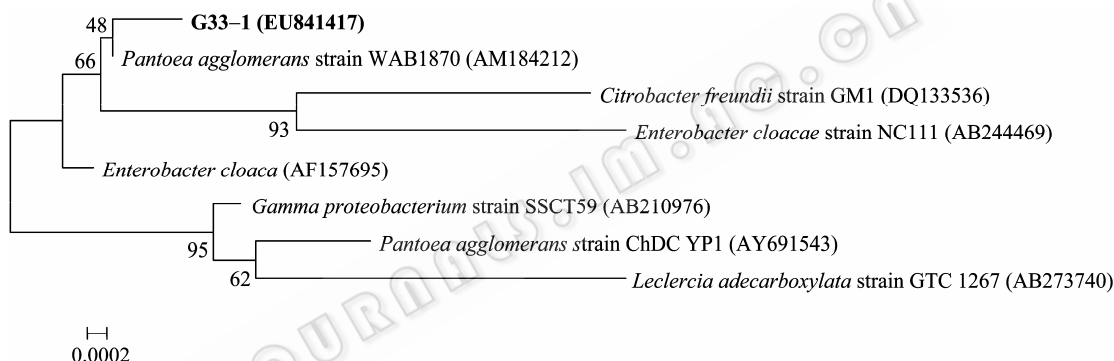


图2 菌株 G33-1 及其相关菌株的 16S rDNA 序列分析系统进化聚类图

Fig. 2 Phylogenetic analysis of G33-1 based on the 16S rDNA sequences of related species showing the position of strain among its phylogenetic neighbours

注: 括号内数字为 GenBank 登录号; 分支数表示 1000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比; 0.02% 表示差异值。

Note: The number in the bracket denotes the GenBank accession number; The value in the branch stand for the Bootstrap value. Bar: 0.02% sequence divergence.

3 结论与讨论

本研究是国内首次针对海草床-珊瑚礁固氮菌进行研究, 分离得到具有较高固氮活性的菌株 G33-1, 并进行了形态、生理生化特性测定以及分子生物学方法鉴定, 根据常见细菌系统鉴定手册, 该菌为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。该菌为革兰氏阴性菌, 以周生鞭毛运动, 呈直杆状, 菌落圆形, 半透明乳白色, 比较湿润, 有光泽, 直径约 1 mm, 低凸, 光滑, 边缘比较整齐, 能在无氮培养基上生长良好, 且能扩增出固氮基因 *nifH*, 16S rDNA 分析进一

步对该菌鉴定进行了验证。该菌的生理生化特征为: 不产生吡啶, 明胶液化阴性, 精氨酸双水解酶, 苯丙氨酸脱氨酶, 赖氨酸脱羧基, 鸟氨酸脱氨酶都为阴性, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, V-P 测定反应为阳性, 可以利用多种糖和有机酸, DNA 酶阴性, 该菌的最适生长盐度 25‰, 该菌的最适生长盐度 25‰, 盐度为 0‰ 时不能生长, 能在全海水的盐度环境中生长(25‰), 最适生长 pH 为 8, 而 pH 为 10 时能生长, 最适生长温度为 37°C, 温度为 40°C 时仍能生长, 也是在珊瑚礁-海草床复合生态系统中首次发现, 具有较高的固氮活性, 高达 $299.16 \text{ nmol C}_2\text{H}_2/(\text{mL}\cdot\text{h})$, 它

在该生态系统中的氮素和营养物质的循环以及整个海草群落的演替和持续发展起着重要作用。

生物固氮作用在海草床生态系统的氮素来源中占有较大的比例,已有研究表明泰来藻固氮效率高,达 $1700 \text{ kg N}/(\text{hm}^2 \cdot \text{a})$,以针叶藻 (*Syringodium isoetifolium*) 为优势的海藻生态群落,在海草叶表寄生的固氮生物固氮量占总固氮量的 5%,而与针叶藻根际根子联系共生的固氮量占 8%,固氮海洋植物的所需求的 8%–16% 来自于当季的生物固氮作用,其在该生态系统中的氮循环中是比较重要的环节^[7,25]。由于对于海草床重要性缺乏认识,一些区域的海草床的生境受到明显的威胁,如修建虾塘与海水养殖围网捕鱼与底网拖鱼毒虾、电虾、炸鱼及挖贝和耙螺等人为污染与开挖航道等,使得海草的大面积减少,直接导致了海草生态系统中的生物的多样性减少,最终结果可能会导致沿海生态系统的崩溃。对海草的保护和研究工作已经得到了全球的重视,全球范围内已召开了 6 次关于海草的会议,美国、澳大利亚以及地中海沿岸国家专门为海草研究立项,我国由国务院委托国家海洋局在中国海域划分了 15 个海洋生态脆弱区和生态敏感观察区,其中就有海南岛东海岸和广西北海的两个海草生态监控保护区^[26]。

有关报道表明,阴沟肠杆菌的发酵液中含有够产生促进植物生长的吲哚乙酸 (IAA),并且用其来处理水稻的叶片能够提高其对水稻白叶枯病的抗病能力,结合阴沟肠杆菌的特性以及 IAA 能够在植物的生长发育中起着重要的调控作用,其在农业生产上已经得到了广泛的应用^[27]。所以,将该海草床生态系统中分离得到的固氮菌 G33-1 用于海草固氮菌肥的研制,对海草生态系统的恢复和保护工作具有一定的推动作用。

参 考 文 献

- [1] 赵美霞,余克服,张乔民. 珊瑚礁区的生物多样性及其生态功能. 生态学报, 2006, **26**(1): 186–194.
- [2] Bell PRF, Elmetri I, Uwins P. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp. in the central and northern great barrier reef lagoon: relative importance of the fixed-nitrogen load. *Marine Ecology Progress Series*, 1999(186): 119–126.
- [3] Capone DG, Taylor BF. Nitrogen fixation (Acetylene Reduction) in the phyllosphere of *Thalassia testudinum*. *Marine Biology*, 1997(40): 19–28.
- [4] Carpenter EJ. Major role of the cyanobacterium *Trichodesmium* sp. in nutrient cycling in the north Atlantic ocean. *Science*, 1991, **254**(5036): 1356–1358.
- [5] Karl D. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*, 1997, **388**(7): 533–538.
- [6] 黄小平, 黄良民, 李颖虹, 等. 华南沿海主要海草床及其生境威胁. 科学通报, 2006, **51**(增刊 II): 114–119.
- [7] 王汉奎, 董俊德. 三亚湾氮磷比值分布及其对浮游植物生长的限制. 热带海洋学报, 2002, **21**(1): 33–39.
- [8] 张燕英, 董俊德, 张恩, 等. 海洋固氮蓝藻 *Calothrix* sp. 与 *Lyngbya* sp. 固氮生理的研究. 热带海洋学报, 2006(4): 46–50.
- [9] Dong JD, Zhang YY, Wang YS, *et al.* Spatial and seasonal variations of Cyanobacteria and their nitrogen fixation rates in Sanya Bay, South China Sea. *Scientia Marina*, 2008, **72**(2): 239–251.
- [10] Ewing WH, Fife MA. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (The Herbicola-Lathyri Bacteria). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1972, **22**(1): 4–11.
- [11] 谢关林, 徐传雨, 任小平. 稻谷病原细菌 *Pantoea agglomerans* 的特征化研究. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2001, **27**(3): 317–320.
- [12] Edwards PR. Edwards and Ewing of Identification of *Enterobacter agglomerans*. 4th. New York: Elsevier, 1986, 391–415.
- [13] Francoise G, Joris M. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1989(39): 337–345.
- [14] Smith GW, Hayasaka SS. Nitrogenase activity associated with *Halodule wrightii* roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **43**(6): 1244–1248.
- [15] Lily PG, Nehemia S, Yaakov L. *In situ* nitrogen fixation associated with seagrasses in the Gulf of Elat (Red Sea). *Aquatic Ecology*, 2002(36): 387–394.
- [16] Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, *et al.* Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Oregon: CRC Press, 1993: 621–629.
- [17] Postgate JR. The Fundamentals of Nitrogen Fixation. London: Cambridge University Press, 1982: 131–133.
- [18] Xie GH, Cai MY, Tao GC, *et al.* Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice field along Yangtze River Plain. *Biology and Fertility of Soils*, 2003(37): 29–38.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 330–336.

- [20] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(2): 697-703.
- [21] Poly F, Ranjard L, Nazaret S, *et al.* Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(5): 2255-2262.
- [22] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution*, 1980(16): 111-120.
- [23] Kimura M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. New York: Cambridge University Press, 1983.
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007(24): 1596-1599.
- [25] 董俊德, 王汉奎, 张偲, 等. 海洋固氮生物多样性及其对海洋生产力的氮、碳贡献. *生态学报*, 2002, **22**(10): 1741-1749.
- [26] 杨顶田. 海草的卫星遥感研究进展. *热带海洋*, 2007, **26**(4): 83-86.
- [27] 陈卫良, 徐平, 龚鸿飞, 等. *Enterobacter cloacae* B8X 在水稻叶部定殖及防治水稻白叶枯病的研究. *农业生物技术学报*, 1994(2): 61-66.

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(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、名师名课(原名师讲堂)、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/wwxtbcn>, 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、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。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 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内,研究报告 4-7 页(以上均包括图表)。

3.2 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)。

3.3 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。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,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 *nsP14* 基因的克隆和表达. *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 Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程. 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. 北京:中国农业出版社,1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2010-00-00; 接受日期: 2010-00-00

(下转 p.974)