

一株甲烷氧化菌的分离鉴定与特性

刘晓宁 李珍 林国秀 王培培 王立明 张杰*

(四川大学生命科学学院 资源微生物与微生物技术四川省重点实验室 四川 成都 610064)

摘要: 甲烷氧化菌是一类能以甲烷作为唯一碳源和能源进行同化和异化代谢的微生物。从若尔盖高原不同地点采集的样品中筛选得到一株名为 XN1 的甲烷氧化菌, 根据此菌株的形态与 16S rRNA 序列同源性分析, 证实该菌株属于 *Methylobacter* 属。对该菌株的培养条件进行研究的结果表明, 以甲烷与甲醇共同作为碳源, 硝酸钾和氯化铵共同为氮源时菌生长最好, 最适生长温度为 25°C, 最适生长 pH 为 6.5, 培养基中 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度以 0.03 mg/L 和 0.4 mg/L 为宜。

关键词: 甲烷氧化菌, 分离鉴定, 特征, 培养条件

Isolation, Identification and Characterization of Methanotrophic Bacteria

LIU Xiao-Ning LI Zhen LIN Guo-Xiu WANG Pei-Pei WANG Li-Ming
ZHANG Jie*

(Key Laboratory of Microbial-resources and Microbial-technology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: Methanotrophs are a kind of bacteria which can use methane as the sole carbon source and energy for their anabolism and catabolism. A strain methanotroph was isolated from different samples of the Zoige Plateau, named XN1, and was studied. It was identified a strain of *Methylobacter* through 16S rRNA sequencing and comparison. The investigation result showed that the optimal conditions for the strain were methane gas together with methanol as carbon source and the coexistence of NH_4Cl and KNO_3 as nitrogen source, the cultivation temperature of 25°C and medium initial pH of 6.5, and the optional concentration of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ of 0.03 mg/L and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg/L.

Keywords: Methanotrophic bacteria, Isolation and identification, Characterization, Culturing conditions

甲烷气体既是重要的化学能源和化工原料, 又是温室气体, 其所产生的温室效应是等量 CO_2 的 20–30 倍^[1–2], 同时也是造成煤矿事故的主要原因之一。因此, 合理利用和有效控制甲烷具有重要的经济与环保意义。甲烷氧化菌是以甲烷为唯一碳源和能源的特殊微生物, 它广泛分布于湖泊、水田、森

林、沼泽及极端环境中^[3]。本实验样品采集点若尔盖高原的环境条件较恶劣, 低温、缺氧且紫外线强是其典型特点。甲烷氧化菌可利用本身含有的甲烷单加氧酶(MMO)氧化甲烷使其转化成甲醇、甲酸等物质, 而且还能降解污水中的三氯甲烷、三氯乙烯等有毒卤代烃和多环芳烃^[4–5], 因此从工业利用和

生态保护的角度考虑,甲烷氧化菌都具有很重要的研究价值。但甲烷氧化菌生长速率慢、细胞浓度低、分纯和保种困难是限制甲烷氧化菌工业化使用的关键问题。因此,实现甲烷氧化菌的大规模高效培养是实现其工业生产应用的前提。

本实验从若尔盖高原某地区土样中筛选出一株名为 XN1 的甲烷氧化菌,并对其进行了分子生物学鉴定、生理生化以及培养条件等的初步研究,为进一步对甲烷氧化细菌的遗传改良和工业生产的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 采集于若尔盖地区沙地、草地、湿地。

1.1.2 培养基: 选用选择性培养基^[6], 成分为(g/L): NH_4Cl 0.25; KH_2PO_4 0.28; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.36; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; KNO_3 1.0; 微量元素液 1 mL; 琼脂 15–20; pH 为 6.8–7.0。其中,微量元素液组成为(g/L): Na_2EDTA 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.03; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.003; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.003。

1.1.3 试剂和仪器: 甲烷气体购于成都石化有限公司,纯度为 99.9%。FastDNA SPIN for Soil Kit 试剂盒。

1.2 土质和土壤深度对甲烷氧化菌的影响

分别将采集于若尔盖高原地区沙地、草地、湿地的表层、表层下 20 cm、40 cm、60 cm、80 cm 的土壤样品采用 FastDNA SPIN for Soil Kit 试剂盒提取总 DNA, 进行 PCR 扩增。扩增反应体系为 50 μL , 含有 3 μL MgCl_2 , 5 μL PCR 缓冲液, 5 μL dNTPs 混合物, 1 μL 的上游引物 A189 (5'-GGNGACTGG GACTTCTGG-3')、1 μL 的下游引物 mb66 (5'-CCGG MGCAACGTCYTTACC-3')^[7], 1 μL 总 DNA, 0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶和 34.5 μL 水。PCR 反应按下述程序进行扩增: 94°C 1 min, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。回收纯化后的目的片段, 测序并进行序列比对。

1.3 甲烷氧化菌的分离纯化方法

各取约 1 g 样品溶于 10 mL 水, 过滤, 取其 5 mL 接种于装有已灭菌的 50 mL 分离培养基的 150 mL 的血清瓶中, 用橡胶塞密封, 同时用注射器抽出 30 mL 的空气后注入等量的甲烷, 置于 27°C、

180 r/min 摇床培养至培养液混浊。取 5 mL 培养液接种于新鲜培养基中, 在相同条件下培养至培养基混浊, 如此重复 3 次。将菌液在固体平板上划线, 然后放入充入一定量甲烷的干燥器中, 对照组放在未充甲烷的干燥器中, 在 27°C 培养至长出单菌落为止。将长出的单菌落挑至液体培养基中, 置于 27°C、180 r/min 摇床培养至培养液混浊。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 菌体的形态特征和培养特征: 对分离的单菌落进行革兰氏染色^[8], 然后在光学显微镜下观察其菌体形态。对样品进行处理后在扫描电镜下观察其菌体形态^[9]。同时, 在无机盐培养基中观察其菌落特征。

1.4.2 甲烷氧化菌的生理生化实验: 参照微生物实验指导对分纯的菌株进行生理生化实验^[9]。

1.4.3 16S rDNA 的 PCR 扩增及其序列分析: 提取该菌株的总 DNA^[10], 并以此为模板 PCR 扩增 16S rRNA 的基因。PCR 扩增体系为 25 μL , 含有 PCR Mixture 反应缓冲液 12.5 μL ; 基因组 DNA 2 μL ; 上、下游引物 27F 和 1492R 各 1 μL ; ddH₂O 补足体积。样品在 PTC-200 扩增仪上进行扩增, 扩增程序为: 94°C 4 min; 94°C 1 min, 55°C 40 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统观察并照相, 产物纯化后测序。根据获得的 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST 搜索同源序列, 然后通过软件 MEGA 4.1 构建系统发育树。

1.5 菌种的生长条件研究

1.5.1 菌种生长曲线的测定: 将菌株接种于 50 mL 灭菌培养基中, 置入 30 mL 甲烷气体, 在 27°C、180 r/min 条件下培养, 每隔 24 h 取样, 使用分光光度计在 560 nm 波长下^[11]测定菌悬液吸光度。

1.5.2 碳源实验: 分别在添加了葡萄糖、乳糖、甘油、柠檬酸钠、甲醇、甲酸、甲醛、乙醇、乙酸、甲苯、二氯甲烷、甲烷与甲醇及不添加任何碳源的液体培养基中接种 1% 的菌液, 观察该菌株对不同碳源的利用情况。

1.5.3 氮源实验: 以蛋白胨、甘氨酸、丝氨酸、 NH_4Cl 、 KNO_3 、 $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KNO}_3$ 、 N_2 做单因子氮源实验。

1.5.4 温度和 pH 对菌株生长的影响: 结合若尔盖高原的环境条件将温度设定在 5°C–40°C, pH 设定为

5.5–9.5 对该菌株进行培养, 并用分光光度计在波长 560 nm 处检测吸光度, 以确定其最适生长条件。

1.5.5 CH₄ 含量对菌株生长的影响: 在 50 mL 液体培养基中接种 1% 的菌液, 并置入不同体积的甲烷, 使甲烷含量分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%, 通过测 560 nm 处的吸光度来确定该菌株生长最适的甲烷浓度。

1.5.6 金属离子对菌株生长的影响: 研究表明, Fe²⁺ 是甲烷单加氧酶所必需的, 其表达受 Cu²⁺ 的调控^[12]。因此, 本实验主要研究这两种离子的不同浓度对菌株 XN1 的影响。培养基中 CuSO₄·5H₂O 的浓度设为 0.03 mg/L, FeSO₄·7H₂O 的浓度梯度设为 (mg/L): 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2; 控制 FeSO₄·7H₂O 浓度为 0.2 mg/L, CuSO₄·5H₂O 浓度设为 (mg/L): 0、0.01、0.03、0.05、0.07、0.09、0.11, 然后测 560 nm 处吸光度。

2 结果与分析

2.1 土质和土壤深度对甲烷氧化菌的影响

目前, 甲烷氧化菌特征酶——颗粒性甲烷单加氧酶的基因 *pmoA* 被普遍用于环境中甲烷氧化菌的检测^[13], 利用此基因对若尔盖高原上不同地区的甲烷氧化菌的分布进行系统的研究。结果见图 1。

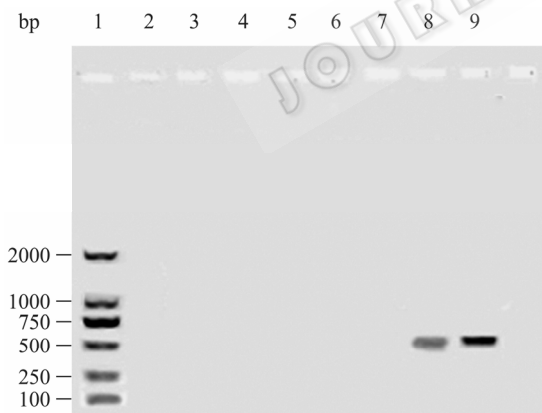


图 1 湿地样品 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR production electrophoretogram of Wetland

Note: The samples in the lanes are standard marker DL2000, negative control, forward primer control, reverse primer control, the wetland soil sample from 80 cm, the wetland soil sample from 60 cm, the wetland soil sample from 40 cm, the wetland soil sample from 20 cm, the wetland soil sample from surface, respectively.

采集于草地和湿地的样品成功扩增出 *pmoA* 基因, 且草地样品的电泳条带很弱; 采集于沙地的样品未能扩增出 *pmoA* 基因。这可能是由于这两个地区气候较干燥, 土壤含水量少而导致甲烷氧化菌

含量较少。

来自草地表层、湿地表层及 20 cm 处土样的 DNA 扩增出了 *pmoA*, 大小约为 500 bp。20 cm 处样品电泳条带较弱, 且 20 cm 以下的土样未扩增成功, 说明甲烷氧化菌可能含量极少或是不存在。这可能与深层土壤含氧量少, 而甲烷氧化菌绝大多数为好氧菌有关。

序列比对结果显示, 克隆的 *pmoA* 序列与 *Methylomonas* 同源性达 99%, 表明该土壤中有大量的 I 型菌存在。

因此, 本实验筛选菌种的样品均来自于湿地表层。

2.1.1 菌株的形态特征和培养特征: 利用选择性无机盐培养基筛选出了一株甲烷氧化菌, 将其编号为 XN1。革兰氏染色结果如图 2 所示, 由图可知菌株 XN1 为革兰氏阴性菌。从图 3 的扫描电镜观察结果可看出, 该菌株为直杆状, 菌体直径约为 0.5 μm–2.0 μm。在固体培养基上观察到的甲烷氧化菌菌落为乳白色, 圆形, 微隆起, 直径约为 1 mm–2 mm, 不透明, 较湿润, 菌落边缘整齐。

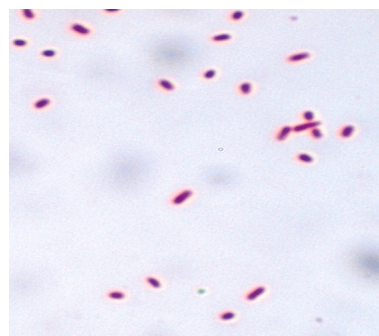


图 2 甲烷氧化菌 XN1 的革兰氏染色图

Fig. 2 The Gram stain of the strain XN1

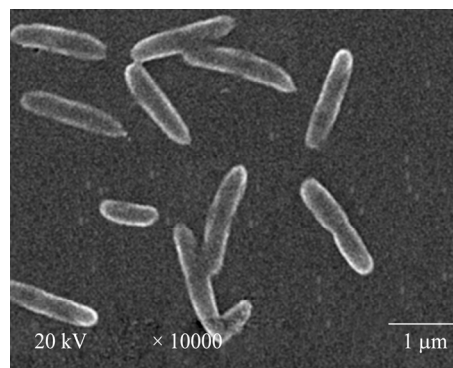


图 3 菌株 XN1 的扫描电镜观察图

Fig. 3 The SEM photograph of the strain XN1

2.1.2 菌株的生理生化特征：菌株 XN1 的生理生化实验结果见表 1。

表 1 甲烷氧化菌 XN1 的生理生化特征 Table 1 Biochemical and physiological characteristics of strain XN1		
项目 Items	结果 Results	
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	
明胶水解 Gelatin hydrolysis	—	
石蕊牛乳 Litmus milk	—	
产 H ₂ S 实验 H ₂ S production test	—	
吲哚试验 Indole production test	—	
甲基红试验 Methyl red test	—	
V. P 实验 V-P test	—	
柠檬酸盐 Citrate	+	
接触酶 Catalase	+	
氧化酶 Oxidase	—	

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

2.2 16S rDNA 碱基序列与系统发育树

测序后菌株 XN1 的 16S rDNA 碱基长度约为 1269 bp。GenBank 的登录号为 GU577112。经 BLAST 序列比对后发现有 6 株菌与菌株 XN1 同源性较高，同源性达 96%–98%。将这些菌株序列构建系统发育树，见图 4。由图 4 的系统发育树可见，菌株 XN1 与 *Methylobacillus* 位于一个分支，而其他的 3 个属可以作为外群。因此将菌株 XN1 归入 *Methylobacillus* 属。

2.3 菌株的生长曲线

由图 5 可看出，菌株 XN1 的生长周期较长，约为 13 d。接种约 3 d 后进入对数生长期，对数生长期为 3 d，稳定期持续约 5 d，此后进入衰亡期。菌株 XN1 生长较慢，这可能是因为菌株生长利用的碳源是甲烷，而常压下甲烷在水溶液中的溶解度很低所致^[14]。

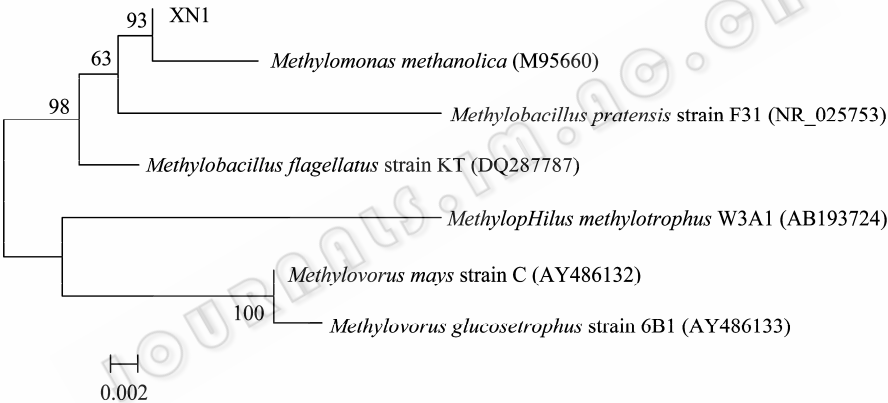


图 4 基于 16S rRNA 序列的甲烷氧化菌 XN1 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic neighbour-joining tree of the strain XN1 based on 16S rRNA sequences

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining method based on 1000 replications. The numbers on the tree indicate bootstrap values greater than 50%. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Bar: 0.002 sequence divergence.

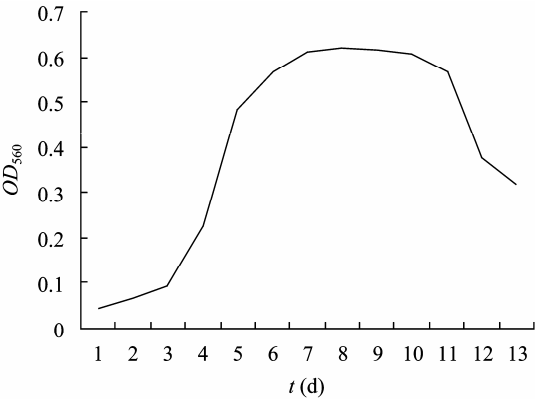


图 5 甲烷氧化菌 XN1 的生长曲线图

Fig. 5 The growth curve of the strain XN1 ethanotroph XN1

2.4 菌株的生长特性

2.4.1 碳源实验：菌株 XN1 对各种碳源的利用情况见表 2。从该表可以看出，菌株 XN1 能较好地利用葡萄糖、柠檬酸钠和甲醇，但以葡萄糖为唯一碳源有时会出现染菌的问题；以甲醇为唯一碳源时菌株生长很快但菌体生物量较低，这可能是由于甲醇对菌体有一定的毒害作用所致。该菌株可微弱利用乳糖、甘油与乙醇，不能利用甲醛、甲酸、乙酸及空气中的 CO₂。以甲烷和甲醇共同作为碳源时菌株生长较快，菌体生物量最高，且不易染菌。

2.4.2 氮源实验：表 3 为氮源实验结果。菌株 XN1 只能利用某些有机氮源，这可能是某些氨基酸在一

定程度上能促进菌体的生长。菌株在硝基态氮和氨态氮同时存在时的生长情况比两者单独存在时要好, 这是由于少量的 NH_4Cl 能促进菌的生长。但以氨态氮单独作为氮源时生长情况较差, 这可能是由于 CH_4 和在分子形状和大小上非常相似, 且甲烷单加氧酶对底物的选择性很低, 所以 NH_4^+ 和 CH_4 之间的竞争是 NH_4^+ 对 CH_4 氧化抑制作用的主要机制^[15-17]。

表 2 甲烷氧化菌 XN1 的碳源实验
Table 2 Carbon utilization test on the strain XN1

碳源	利用情况	碳源	利用情况
Carbon source	Utilization	Carbon source	Utilization
Glucose	++	Formic acid	-
Lactose	+	Ethanol	+
Sodium-Citrate	++	Acetic acid	-
Glycerin	+	Methane and methanol	++
Methanol	++	Toluol	-
Formaldehyde	-	Dichloromethane	-
CO_2	-		

Note: ++: Well used; +: Weakly used; -: Unavailability.

表 3 甲烷氧化菌 XN1 的氮源实验
Table 3 Nitrogen utilization test on the strain XN1

氮源	利用情况	氮源	利用情况
Nitrogen source	Utilization	Nitrogen source	Utilization
Protein	+	NH_4Cl	+
Serine	+	KNO_3	+
Glycin	-	NH_4Cl and KNO_3	++
L-Glutamate	-	N_2	-

Note: ++: Well used; +: Weakly used; -: Unavailability.

2.4.3 温度与 pH 对菌株生长的影响: 实验结果见图 6。菌株 XN1 在 15°C – 35°C 范围内生长良好, 最适生长温度为 25°C , 这比王晓丽、赵良贵等人所报道的菌株的最适生长温度低 5°C ^[11,18], 这可能与菌的原始生长条件与关。该菌能在 pH 6–9 范围内生长, 最适生长 pH 为 6.5, 属于喜酸性菌。

2.4.4 CH_4 含量对菌株生长的影响: 图 7 显示, 当甲烷含量在一定范围内, 随甲烷的增加, 菌体生物量呈先上升后下降的趋势。当甲烷含量约为 40% 时, 菌株生物量最高, 这说明该菌株需在氧气充分的条件下才能很好地氧化甲烷。

2.4.5 金属离子对菌株生长的影响: 从图 8 中易得出如下结论: 随着 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 浓度的增加, 菌体生物量先逐渐升高然后趋于稳定, 浓度为 0.03 mg/L

时生物量达到最大, 这是因为 MMO 的表达受 Cu^{2+} 浓度的调控, Cu^{2+} 浓度低时 sMMO 表达; Cu^{2+} 浓度高时 pMMO 表达, 并且 pMMO 的表达会随着 Cu^{2+} 浓度的增加而增加^[18]。但之后趋于稳定可能是由于 sMMO 活性减少, 两者达到一个平衡状态。因此, 培养该菌株时 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的浓度以 0.03 mg/L 为好。

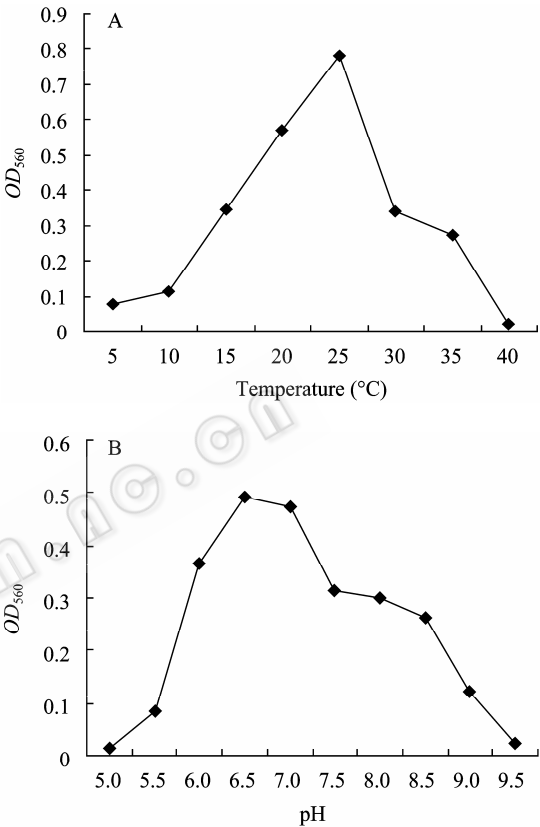


图 6 温度(A)和 pH (B)对甲烷氧化菌 XN1 生长的影响
Fig. 6 Effect of temperature (A) and pH (B) on cell growth of the strain XN1

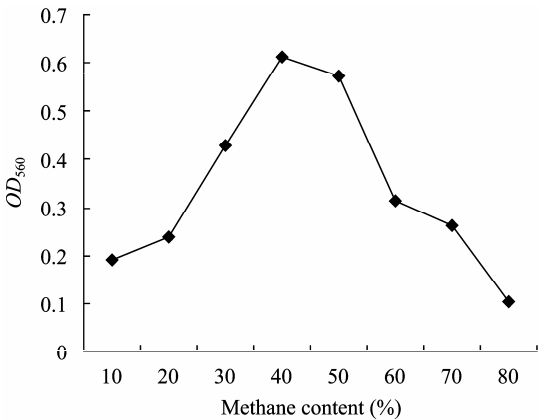


图 7 CH_4 含量对甲烷氧化菌 XN1 生长的影响
Fig. 7 Effect of different methane content on cell growth of the strain XN1

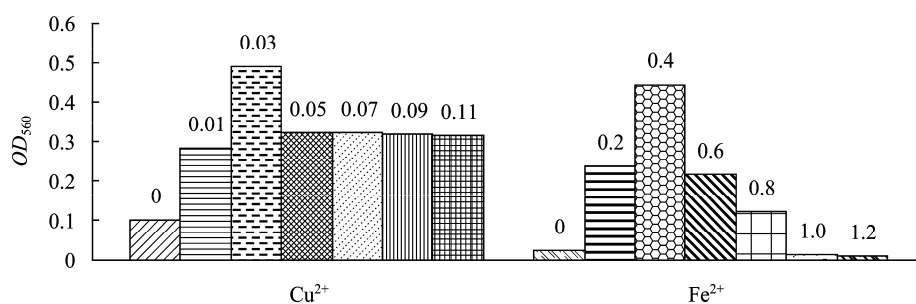


图 8 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对甲烷氧化菌 XN1 生长的影响

Fig. 8 Effect of the concentration of Cu^{2+} and Fe^{2+} on cell growth of the strain XN1

Fe^{2+} 对菌株的影响与 Cu^{2+} 相比有些不同, 菌体生物量随 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加而升高, 但浓度高于 0.4 mg/L 时 OD_{560} 值迅速下降, 在浓度为 1.0 mg/L 时菌体几乎不生长。这可能是因为高浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 抑制了 pMMO 活性, 或是高浓度的 Fe^{2+} 降低了体系氧化还原电位, 不利于甲烷的氧化过程。因此, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度以 0.4 mg/L 为宜。

3 总结

甲烷氧化菌因其分布的广泛性及潜在的工业价值、环保功效而一直备受科学家青睐。近 20 年, 世界各国的科研机构对甲烷氧化菌及其相关酶系的研究更是与日俱增, 并且在各种极端环境下也发现甲烷氧化菌的存在。我国也相继出现了甲烷氧化菌的报道, 如李树本、邢新会、闵航等人都有其较深入的研究。

通过本次实验发现, 甲烷氧化菌在含水量高、含氧量高、含氮丰富的地方很丰富^[19]。因此, 在筛选甲烷氧化菌时最好选择具备以上条件的环境采集样品。本实验筛选得到的甲烷氧化菌 XN1 的生长温度及 pH 范围广泛, 在 15°C–35°C、pH 6–9 范围内均可生长, 其最适生长温度为 25°C, 这比目前国内报道过的菌株的最适生长温度稍低。其最适 pH 为 6.5, 偏酸。该菌株生长的稳定期持续长, 这对其以后应用于工业生产是一个优势条件。

本次实验证明, 通过在培养基中添加葡萄糖或柠檬酸钠等物质或甲醇等中间代谢产物, 可极大地缩短菌株的生长周期, 提高菌体的细胞密度。这是解决甲烷氧化菌工业化应用的限制性问题的方法之一。但考虑到菌种纯度及菌体生物量等问题, 以甲醇与甲烷共同作为碳源应是最佳选择。此外, 甲烷氧化菌的特征酶还有待于研究, 并通过基因工程手

段改造其产酶基因或是构建基因工程菌以使其更好地应用于工业基础生产, 或是为甲烷传感器的改进做好准备。

参考文献

- [1] Amato FD, Mazzinghi P, Castagnoli F. Methane analyzer based on TDL's for measurements in the lower stratosphere: design and laboratory tests. *Applied Physic*, 2002(B75): 195–202.
- [2] Cicerone RJ, Oremland RS. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Glob Biogeochem Cy*, 1998(2): 299–327.
- [3] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Res*, 1996, 60(2): 439–471.
- [4] Clapp LW, Regan JM, Ali F, *et al.* Activity, structure, and stratification of membrane-attached methanotrophic biofilms cometabolically degrading trichloroethylene. *Water Science and Tech*, 1999, 39(7): 153–161.
- [5] 梁战备, 史奕, 岳进. 甲烷氧化菌研究进展. *生态学杂志*, 2004, 23(5): 198–205.
- [6] 光亚, 方柏山, 闵航. 甲醇对土壤甲烷氧化的影响及其微生物学机理. *生态环境*, 2003, 12(4): 469–472.
- [7] 余海霞, 闵航. 利用微生物技术治理煤矿瓦斯的研究. 浙江大学博士学位论文, 2007.
- [8] 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2008: 22–24.
- [9] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2004: 116–123.
- [10] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2008: 150–151.
- [11] 王晓丽, 于建国. 一个甲烷氧化菌株的分离、鉴定及其特性研究. *微生物学通报*, 2008, 35(6): 934–938.
- [12] 崔俊儒, 辛嘉英, 李树本, 等. 颗粒性甲烷单加氧酶的研究. *微生物学报*, 2002, 42(5): 594–599.
- [13] 韩冰, 邢新会. 甲烷氧化菌的微生态解析及其应用基础

研究. 清华大学博士学位论文, 2008.

- [14] 王福来, 郑坚, 王钊, 等. 一株催化丙烯环氧化菌株的分离及特性. 微生物学报, 1993, **33**(2): 129-134.
- [15] Bender C, Knowleg R. Physiology, biochemistry and specific inhibitors of CH_4 , NH_4^+ and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev*, 1989(53): 68-84.
- [16] King GM, Schnell S. Effect of increasing atmospheric methane concentration on ammonium inhibition of soil methane consumption. *Nature*, 1994, **370**(6487): 282-284.
- [17] King GM. Associations of methanotrophs with the roots

and rhizomes of aquatic vegetation. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(9): 3220-3227.

- [18] 赵良贵, 郑军, 杨素萍. 一株甲烷利用菌的分离及其在甲烷气体测定中的应用. 微生物学报, 2008, **48**(3): 398-402.
- [19] 韩冰, 苏涛, 邢新会. 甲烷氧化菌及甲烷单加氧酶的研究进展. 生物工程学报, 2008, **24**(9): 1511-1594.
- [20] 周叶锋, 廖晓兰, 黄横. 甲烷氧化细菌氧化活性影响因素的研究. 微生物学杂志, 2008, **28**(3): 77-80.

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, 本部恕不接受。

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.1346)