

# 紫色非硫细菌固体石蜡双层平板培养法

冯有智<sup>1,2</sup> 林先贵<sup>1,2\*</sup> 王一明<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院 南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 江苏 南京 210008)  
(2. 中国科学院 南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室 江苏 南京 210008)

**摘要:** 紫色非硫细菌是一类不产氧光合细菌,具有重要的生态学意义和应用价值。建立固体石蜡双层平板法,与传统的培养法相比较,发现该方法可以更方便、更快捷地计数和分离紫色非硫细菌。结合分子生物学技术,将该方法应用于水稻土紫色非硫细菌的研究,发现以甲酸为碳源的固体石蜡双层平板法可以很好地对环境中可培养的紫色非硫细菌多样性进行研究。该方法的建立将更有助于紫色非硫细菌的研究。

**关键词:** 紫色非硫细菌,可培养方法,水稻土

## The paraffin wax overlay plate method for purple nonsulfur bacteria

FENG You-Zhi<sup>1,2</sup> LIN Xian-Gui<sup>1,2\*</sup> WANG Yi-Ming<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China)  
(2. Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences and Hongkong Baptist University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

**Abstract:** Purple nonsulfur bacteria are one branch of purple phototrophic bacteria, which are ecologically important and have valuable applications. In this study, we established paraffin wax overlay plate method for the isolation and the enumeration of purple nonsulfur bacteria. Compared with several traditional methods, the new one was found to be more rapid and convenient. We applied this method together with molecular approaches to investigate purple nonsulfur bacteria in paddy soil, and found that it can well reveal the diversity of purple nonsulfur bacteria at culturable level, when formate acts as carbon source. We believe the new method would be of great help to the investigation of purple nonsulfur bacteria in environment.

**Keywords:** Purple nonsulfur bacteria, Culture-reliant method, Paddy soil

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41001142, 40771202)

\* 通讯作者: Tel: 86-25-86881589; 邮箱: xglin@issas.ac.cn

收稿日期: 2011-01-14; 接受日期: 2011-04-18

光合细菌(Phototrophic bacteria)是一类能够吸收光能生长的细菌,是地球上最早出现的具有光能合成体系的原核生物。紫色光合细菌(Purple phototrophic bacteria, PPB)是光合细菌中重要的组成部分<sup>[1]</sup>。紫色光合细菌分为两类,紫色硫细菌(Purple sulfur bacteria)和紫色非硫细菌(Purple nonsulfur bacteria)。

紫色非硫细菌是紫色光合细菌的一个重要分支,分类位于变形菌门的 Alpha 和 Beta 分支上<sup>[2]</sup>。它们具有极其丰富的代谢模式,可光能异养、光能自养和化能异养<sup>[3]</sup>型生长。代谢的多样性使得它们广泛存活于不同的生态系统中,如土壤、湖泊、海洋及底泥等<sup>[3-4]</sup>,并赋予了重要的生态学意义,如作为初级生产力加快环境中物质和能量的循环<sup>[5]</sup>、促进水稻增产<sup>[6]</sup>等;同理,也使得它们具有多种多样的应用价值,如降解芳香类化合物<sup>[7]</sup>和生物制氢<sup>[8]</sup>。

传统的紫色非硫细菌可培养方法有液体石蜡覆盖平板法、最大或然数法(Most probable number, MPN)和厌氧罐培养法等。这些方法都存在缺陷,如液体石蜡覆盖法无法很好地隔绝氧气,致使其他好氧或微好氧微生物也可富集,进而抑制了紫色非硫细菌的生长;MPN 法偏好性强,工作量大,且不利于后期的分离纯化;厌氧罐培养法对设备和空间的要求较高,不便于大批量实验,同时因培养过程中需要光照,设备需特制。基于以上问题,本文尝试建立固体石蜡双层平板法来计数和分离紫色非硫细菌,并与传统方法进行比较;结合分子生物学,将该方法应用于水稻土紫色非硫细菌研究,以期更方便、更快捷地从环境中计数和分离紫色非硫细菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 纯菌和环境样品

沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*, *R. palustris*)为本实验室保藏。

水稻土采自江苏省扬州市小纪镇,土壤类型为下位砂姜土,土壤基本理化性质: pH 6.8, 有机质 18.4 g/kg, 全氮 1.46 g/kg, 全磷 0.63 g/kg, 全钾 14.0 g/kg, 速效磷  $10.04 \times 10^{-3}$  g/kg, 速效钾  $70.09 \times 10^{-3}$  g/kg。

长期旱地农田土壤采自江苏无锡安镇,土壤类

型为黄棕壤,土壤基本理化性质: pH 6.1, 有机质 19.2 g/kg, 全氮 1.3 g/kg, 全磷 0.5 g/kg, 全钾 14.2 g/kg, 速效磷  $3.6 \times 10^{-3}$  g/kg, 速效钾  $86.0 \times 10^{-3}$  g/kg。

### 1.2 样品采集

非根际土壤为远离作物 20 cm–30 cm 处 0–5 cm 的表层土壤,用直径为 7.5 cm 的土钻随机取 5 个点混匀;根际土壤为附着在作物根上 2 mm 厚的土壤。样品于 4 °C 保藏。

### 1.3 主要试剂和仪器

细菌 DNA 提取试剂盒为 Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA)。PCR 反应的 *rTaq* 聚合酶和克隆所需的 pMD 18-T 载体均购自于 TaKaRa 公司,氨苄青霉素购自于 Sigma 公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 仪为 MyCycler™ PCR (Bio-Rad, Hercules, Calif.); 基因突变仪为 Dcode 通用突变检测系统(Bio-Rad, Hercules, Calif.)。

### 1.4 紫色非硫细菌培养基

紫色非硫细菌培养基(g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgCl}_2$  0.2,  $\text{NaCl}$  2, 牛肉膏 2, 有机酸 2, 琼脂粉 12。灭菌前 pH 调节到 7.2。碳源比较试验中分别以 2 g 的甲酸、乙酸、乳酸、丙酮酸、苹果酸和柠檬酸为单一碳源,以各 0.7 g 的苹果酸、琥珀酸和丙酮酸为混合碳源。

### 1.5 固体石蜡双层平板法、MPN 法和液体石蜡覆盖法

紫色非硫细菌固体石蜡双层平板法: 用 50 mL 无菌水均悬 5 g 土壤,再以 10 倍稀释法稀释到所需浓度。将稀释后的土壤悬液 100  $\mu\text{L}$  加入到灭菌的培养皿中,再加入 20 mL 温度在 40 °C–45 °C 的固体培养基(未凝固),均匀摇晃使得菌液和培养基充分混合。等固体培养基凝固后,再在上面倒上 55 °C–60 °C 的溶化态的固体石蜡,缓慢的摇动培养皿,使得石蜡均匀的覆盖在固体培养基的上面,特别注意将培养基的边缘封口严密。等固体石蜡凝固后,将培养皿倒置,放置在强度为 2 400 lux 的白炽灯下照射,于 30 °C $\pm$ 2 °C 培养 3 周。当紫色非硫细菌菌落形成后,将覆盖在上层的固体石蜡揭去,挑取菌落进行纯化。

MPN 法: 菌悬液 10 倍梯度稀释至  $10^{-10}$ , 每个浓度梯度 3 管, 3 个重复。

液体石蜡覆盖法: (1) 将菌液涂布在固体培养基表面, 再覆盖液体石蜡; (2) 将菌液包埋于固体培养基内, 再覆盖液体石蜡。

## 1.6 细菌总 DNA 提取

挑取包埋在固体培养基内的紫色非硫细菌菌落于液体培养基中光照富集培养。3 周后取富集液 2 mL, 利用试剂盒 Bacterial DNA Kit 提取细菌总 DNA。具体步骤请参照该试剂盒使用手册。

## 1.7 紫色光合细菌 *pufM* 基因扩增

利用紫色光合细菌光反应中心蛋白 M 亚基编码基因片段 *pufM* 基因的特异性引物对 *pufM557F* (5'-CGCACCTGGACTGGAC-3') 和 *pufM750R* (5'-CCATGGTCCAGCGCCAGAA-3') 进行 *pufM* 基因扩增<sup>[9]</sup>。PCR 反应应用试剂盒 Premix Taq<sup>®</sup> Version 2.0 Kit (TaKaRa), 50  $\mu$ L 的 PCR 体系添加 50 ng 的 DNA 模板量。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物在 1.2% (W/V) Tris-acetate- EDTA (TAE) 琼脂糖凝胶中电泳验证。

## 1.8 DGGE 电泳分析

基因突变仪用于 *pufM* 基因的 DGGE 分析。使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE, 变性梯度 45%–75%; PCR 产物上样量为 200 ng DNA; 电压 80 V, 60  $^{\circ}$ C, 电泳 13 h; 用 SYBR Green I (Invitrogen) (1:10 000, V/V) 染色 30 min, 后用 Gel Doc<sup>TM</sup> EQ imager (Bio-Rad) 成像拍照<sup>[9]</sup>。

将 DGGE 特征条带割胶, 放入含有 40  $\mu$ L 去离子水的 1.5 mL 的离心管中, 置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜。以此溶液为模板, 再次使用 *pufM* 基因引物对其进行扩增。PCR 扩增体系和反应条件如上。将扩增后的 PCR 产物进行 DGGE 验证, 以确定各个 *pufM* 基因型的位置和纯度。如不符, 继续切带、扩增和验证。

## 1.9 克隆测序以及基因序列比对

将验证后的 *pufM* 基因扩增产物连接到 pMD 18-T vector (TaKaRa), 并转化到 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上培养过夜。挑取具有氨苄青霉

素抗性的白色转化子, 采用 T 载体通用引物 M13 进行菌落 PCR, 扩增产物经 1.2% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测是否为阳性克隆。将含有正确克隆子的细胞扩大液交由上海 Invitrogen 公司进行测序。将测序得到的序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 网站上 BLAST 比对, 进行同源性检索。本实验获得的序列已提交 GenBank, 登录号为 AB607003 和 AB607010。

## 1.10 数据统计分析

运用 SPSS 13.0 进行统计分析, 并使用 Duncan 检验进行多重比较 ( $p < 0.05$ )。

# 2 结果与讨论

## 2.1 固体石蜡双层平板法建立

可培养技术是微生物学和生态学研究的重要手段之一。紫色非硫细菌的计数和筛选方法要难于多数好氧和厌氧微生物, 因为在培养过程中不仅要隔绝氧气, 还要有光照。传统的紫色非硫细菌培养方法又均存在缺陷。所以, 我们将紫色非硫细菌包埋在固体培养基中, 再将固体石蜡覆盖在培养基上以隔绝氧气, 建立固体石蜡双层平板法来计数和筛选紫色非硫细菌。固体石蜡双层平板如图 1 所示, 上部分是对沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*, *R. palustris*) 的计数照片, 下部分是对环境样品的计数图片, 左边为覆盖固体石蜡, 右边为只包埋而未覆盖固体石蜡。在覆盖固体石蜡处理中, 纯菌的平板上长出了红色的、大小和形状一致的群落, 而环境样品的计数平板上呈现出红色的、大小和形状不同的群落 (图 1 左)。与之相反, 在未覆盖固体石蜡的纯菌对照中, 只有无色菌落长出 (图 1 右), 而对于环境样品, 则是其它微生物大量生长。紫色非硫细菌在氧气存在条件下合成光合色素基因的转录被抑制<sup>[10]</sup>, 因此纯菌对照中长出了无色菌落。同理, 环境样品对照中其它微生物抑制了紫色非硫细菌的生长。由此可见, 固体石蜡封盖可以很好地隔绝氧气, 达到计数和筛选紫色非硫细菌的目的。待菌落形成后, 将固体石蜡层去除, 挑取单菌落, 或用无菌水稀释后再用固体石蜡双层平板法分离纯化, 或直接液体富集培养。

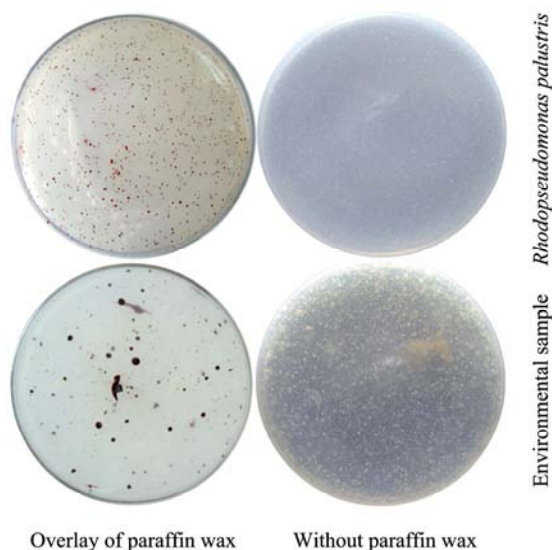


图1 纯菌和环境样品的固体石蜡双层平板照片  
Fig. 1 Pictures of paraffin wax overlay plates of *Rhodospseudomonas palustris* and environmental sample

## 2.2 固体石蜡双层平板法和 MPN 法、液体石蜡覆盖法比较

为了明确各方法的优劣,我们以 *R. palustris*、水稻土样品和长期旱地农田土壤样品为例,对固体石蜡双层平板法、MPN 法和液体石蜡覆盖法进行比

较。经过 14 d 的培养,由于液体石蜡无法很好地隔绝氧气,无论将菌液包埋在培养基中,还是将菌液涂布在培养基上,都无法长出红色的紫色非硫细菌菌落(图 2)。对于水稻土样,培养基内(上)也已布满其他微生物。与之相反,固体石蜡双层平板法可以很好地对纯菌和环境样品进行紫色非硫细菌的计数。

在定性比较的基础上,我们又定量地比较了 MPN 法和固体石蜡双层平板法。MPN 法是目前计数紫色非硫细菌最通用的方法。但是,图 3 表明固体石蜡双层平板法更具有优势:无论对于纯菌还是环境样水稻土,MPN 法和固体石蜡双层平板法的计数结果没有显著差异,但是后者变异系数(Coefficient of variation)较小,利于后期的统计分析。此外,固体石蜡双层平板法平板中形成的各个菌落易于挑取、分离和纯化。由于紫色非硫细菌是厌氧微生物,在旱地土壤中难以存活,所以两种方法均无紫色非硫细菌检出(图 3)。

通过以上几种可培养计数方法的比较,我们发现固体石蜡双层平板法更适合纯菌和环境样品中紫色非硫细菌的计数,也便于后期菌体的分离和纯化。

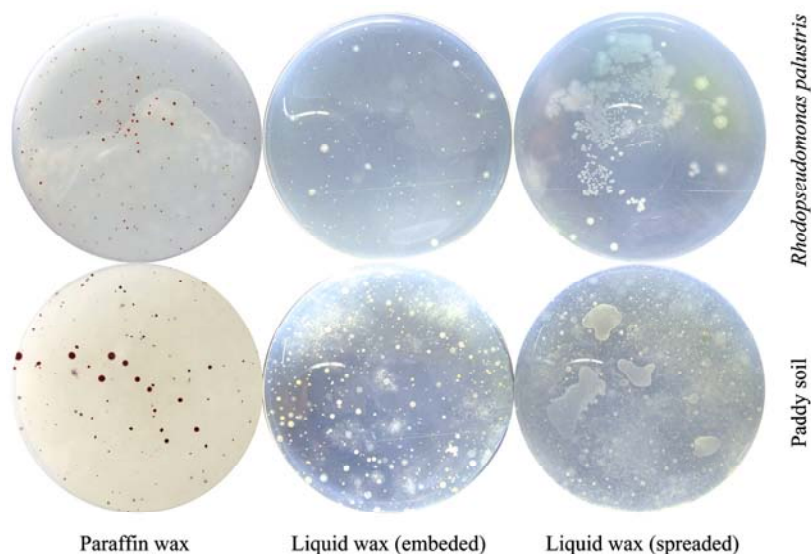


图2 各种平板法效果图  
Fig. 2 Pictures of different plate methods

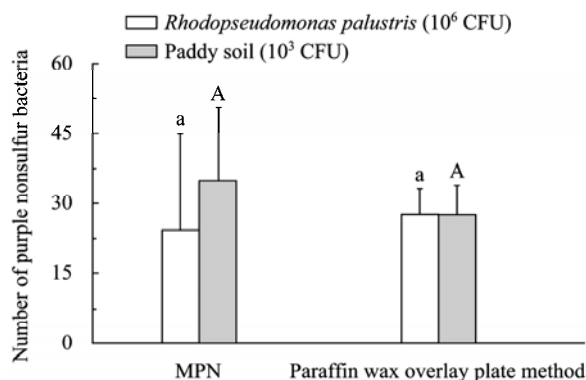


图3 MPN法和固体石蜡双层平板法计数比较

Fig. 3 The enumeration comparison of MPN and paraffin wax overlay plate methods

### 2.3 固体石蜡双层平板法对水稻土紫色非硫细菌研究的应用

水稻土被公认为是研究土壤微生物的典型模式环境,一直备受研究者的重视。水稻土含有丰富的有机质,保持着充足的光照和长期的厌氧环境,这些因素都有利于紫色光合细菌的生长。原位研究也证实水稻土中含有大量的、多样性丰富的紫色光合细菌,且以紫色非硫细菌为主<sup>[9]</sup>。因此,我们利用固体石蜡双层平板法在可培养水平上研究水稻土紫色非硫细菌。

碳源的选择是可培养技术的关键之一。对此,我们选择6种有机酸(甲酸、乙酸、乳酸、丙酮酸、

苹果酸、柠檬酸)和一种混合碳源(苹果酸、琥珀酸和丙酮酸),分别计数水稻根际和非根际土壤中紫色非硫细菌,以期找到适合水稻土中优势紫色非硫细菌的碳源。

由于作物的种植,淹水的水稻土形成了两个理化性质差异很大的区间-根际和非根际<sup>[11]</sup>。7种碳源对根际和非根际土壤中紫色非硫细菌的计数结果差异很大,如图4所示。对于根际土壤,以甲酸、苹果酸和混合酸为碳源能够培养出较多的紫色非硫细菌,数量在 $1.6 \times 10^5$ – $2.2 \times 10^5$  CFU (Colony-forming unit)/(g·DWS) (Dry weight soil);其次是柠檬酸和丙酮酸,数量在 $0.4 \times 10^5$ – $0.5 \times 10^5$  CFU/(g·DWS);乙酸和乳酸效果较差,几乎没有检测出紫色非硫细菌。对于非根际土壤,筛选紫色非硫细菌的通用碳源,如乙酸、苹果酸和混合酸都不能正常的检测出其中的紫色非硫细菌。相反,以甲酸为碳源的培养基却显示出非根际土壤中也存在大量的紫色非硫细菌,数量大约在 $1.16 \times 10^5$  CFU/(g·DWS)。

根际是植物根系与土壤微生物之间相互作用所形成的独特圈带<sup>[12]</sup>。植物根系分泌的大分子氨基酸和糖类,经微生物迅速降解为小分子的有机酸,所以根际土壤含有大量的柠檬酸、丙酮酸、苹果酸和琥珀酸等有机酸。这些有机酸刺激紫色非硫细菌的生长,而其中的紫色非硫细菌也适应这些高浓度的

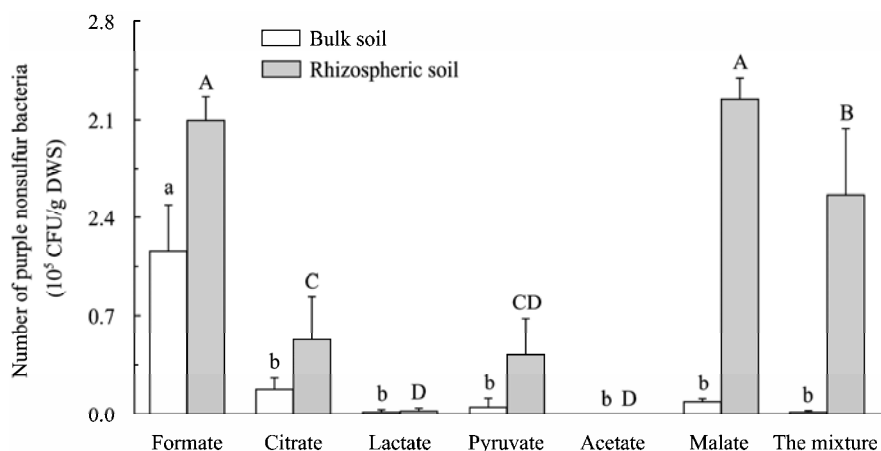


图4 固体石蜡双层平板法7种有机酸对根际和非根际土壤中紫色非硫细菌计数

Fig. 4 The enumeration of 7 different organic carbon sources for paraffin wax overlay of pour plate methods

有机酸。与之相反,非根际土壤营养贫瘠,少量的有机酸已被其它异养微生物代谢,所以非根际土壤中的紫色非硫细菌无法在含有这些碳源的培养基上良好生长,进而导致同一碳源(柠檬酸、丙酮酸、苹果酸和混合碳源)对根际和非根际土壤中紫色非硫细菌计数产生巨大差异。所以柠檬酸、丙酮酸、苹果酸和琥珀酸都不是计数和分离水稻非根际土壤中紫色非硫细菌的合适碳源。

甲酸是厌氧条件下各类大分子有机物代谢的重要中间产物<sup>[13]</sup>。水稻土中微生物的食物网络主要由植物分泌的有机酸、氨基酸、多糖类物质和植物体自身的纤维素所推动<sup>[11]</sup>。在厌氧环境中,纤维素、氨基酸和多糖类物质等因缺乏电子受体最终转化为甲酸,因此,水稻土含有丰富的甲酸<sup>[13]</sup>。甲酸还是厌氧环境中碳代谢末端微生物喜好的碳源,特别是厌氧细菌和古菌<sup>[14]</sup>,它们都可利用甲酸生长。因此,以甲酸为碳源的固体石蜡双层平板法能够很好地应用于计数和分离水稻土中的紫色非硫细菌。

## 2.4 菌落的 *pufM* 基因 PCR-DGGE 和系统发育分析

固体石蜡双层平板法揭示甲酸是计数和分离水稻土中紫色非硫细菌的合适碳源。为明确双层平板上主要生长的为何种紫色非硫细菌。我们随机挑取

了非根际和根际土壤处理平板上 9 和 19 个菌落,进行基于 *pufM* 基因的 PCR-DGGE 和系统发育分析。

*pufM* 基因的 DGGE 图谱如图 5 所示,每个泳道为 1 个菌落的 *pufM* 基因。DGGE 显示固体石蜡双层平板法无论从根际还是非根际土壤中获得的紫色非硫细菌种类并不多,共只有 3 个基因型,如图 5 所示。将 DGGE 中下划线标出的菌落条带割胶、验证、克隆和测序,获得的序列在 GenBank 中进行同源性检索(图 6),发现所挑取的各菌落的 *pufM* 基因序列与 *R. palustris* 的 *pufM* 基因序列同源性最高。由于 *pufM* 基因具有很高的保守性,且得到的系统发育分析结果与 16S rRNA 基因结果相一致<sup>[15]</sup>,所以我们认为以甲酸为碳源的固体石蜡双层平板法从水稻土中分离到的主要是 *R. palustris*。*R. palustris* 是自然环境中分布较为广泛的一种紫色非硫细菌,兼性厌氧,主要以(光能)化能异养生长。原位研究显示水稻土中紫色非硫细菌种类不多,只有 4 种<sup>[9]</sup>;传统培养方法<sup>[16]</sup>和现代分子生物学技术<sup>[9]</sup>均揭示 *R. palustris* 是水稻土中优势的紫色光合细菌。因此,虽然该方法只从水稻土中获得了一种紫色非硫细菌,但我们认为以甲酸为碳源的固体石蜡双层平板法可以很好地在可培养水平上对水稻土中紫色非硫细菌进行研究。

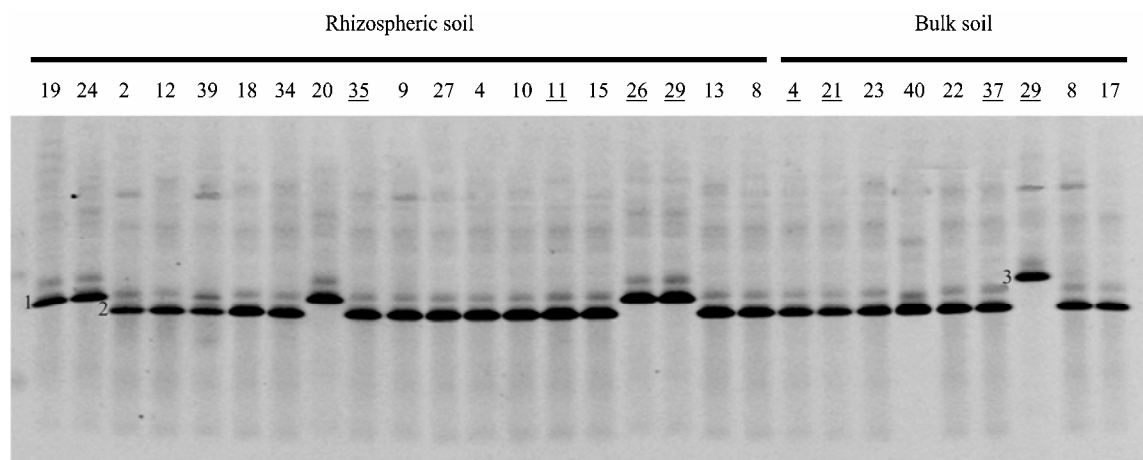


图 5 双层平板上不同菌落的 *pufM* 基因 DGGE 图谱

Fig. 5 PCR-DGGE fingerprinting profiles of *pufM* genes retrieved from colonies isolated from medium

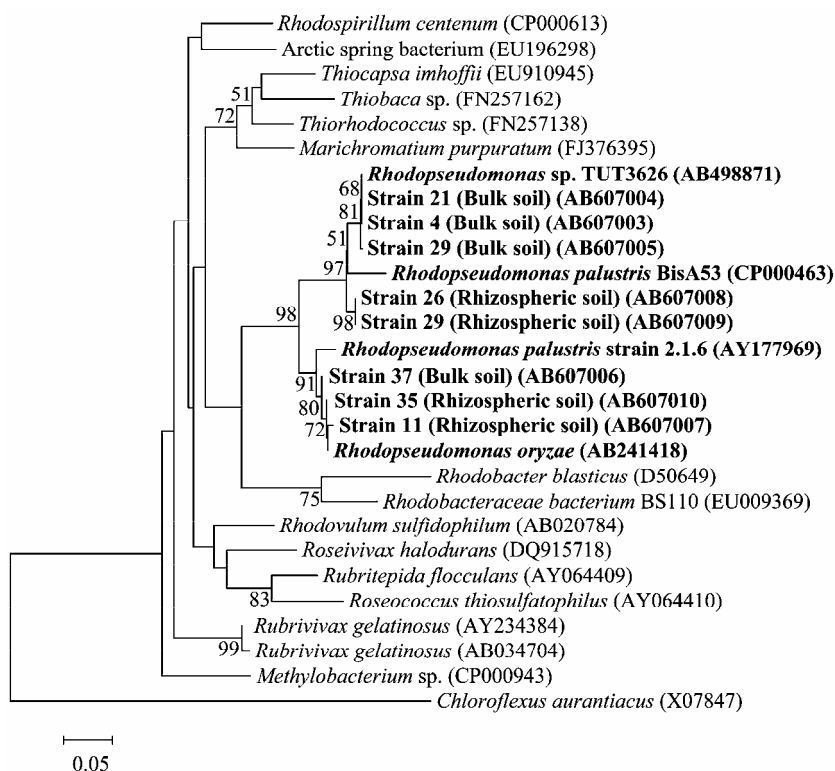


图 6 固体石蜡双层平板上典型菌落的 *pufM* 基因系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis showing the relationships of bacterial *pufM* genes in DGGE fingerprints to the closest relatives in the GenBank

注: 在树节上的数字代表 1 000 取样的百分比, 括号中为菌株的 GenBank 登录号, 比例尺代表 5% 的序列差异。

Note: The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1 000 bootstrapped trees. The GenBank accession number of each strain is indicated in parentheses and the scale bar represents 5% sequences difference.

### 3 结论

(1) 建立固体石蜡双层平板法计数和分离环境中的紫色非硫细菌, 与 MPN 法和液体石蜡覆盖法等进行比较, 结果表明固体石蜡双层平板法更适合紫色非硫细菌的可培养研究。

(2) 结合分子生物学技术, 通过比较 7 种代表性的有机碳源, 表明以甲酸为碳源的固体石蜡双层平板法可以很好地在可培养水平上对水稻土中紫色非硫细菌进行研究。

### 参 考 文 献

- [1] Bryant DA, Frigaard NU. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated[J]. Trends Microbiol, 2006, 14(11): 488–496.
- [2] Overmann J, Garcia-Pichel F. The Phototrophic Way of Life//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The Prokaryotes[M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2006: 32–85.
- [3] Imhoff JF, Trüper HG. The genus *Rhodospirillum* and related genera//Balows A, Trüper HG, Dworkin M, et al. The Prokaryotes[M]. 2nd ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1992: 2141–2155.
- [4] Hiraishi A, Ueda Y. *Rhodoplanes* Gen. Nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Phodoplanes roseus* Comb. Nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. Nov[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(4): 665–673.
- [5] Eiler A. Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(12): 7431–7437.
- [6] Harada N, Nishiyama M, Otsuka S, et al. Effects of inoculation of phototrophic purple bacteria on grain yield of rice and nitrogenase activity of paddy soil in a pot experiment[J]. Soil Sci Plant Nutr, 2005, 51(3): 361–367.

- [7] Oda Y, Larimer FW, Chain PSG, et al. Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(47): 18543–18548.
- [8] Basak N, Das D. Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: a case study[J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(6/7): 911–919.
- [9] Feng YZ, Lin XG, Wang YM, et al. Free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) enhances the biodiversity of purple phototrophic bacteria in flooded paddy soil[J]. Plant and Soil, 2009, 324(1/2): 317–328.
- [10] Beatty JT. On the natural selection and evolution of the aerobic phototrophic bacteria[J]. Photosynth Res, 2002, 73(1/3): 109–114.
- [11] Liesack W, Schnell S, Revsbech NP. Microbiology of flooded rice paddies[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(5): 625–645.
- [12] Paterson E, Hall JM, Rattray EAS, et al. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on rhizosphere carbon flow and soil microbial processes[J]. Global Change Biology, 1997, 3(4): 363–377.
- [13] Chin KJ, Rainey FA, Janssen PH, et al. Methanogenic degradation of polysaccharides and the characterization of polysaccharolytic clostridia from anoxic rice field soil[J]. Syst Appl Microbiol, 1998, 21(2): 185–200.
- [14] Ferry JG. Formate dehydrogenase[J]. FEMS Microbiol Lett, 1990, 87(3/4): 377–382.
- [15] Achenbach LA, Carey J, Madigan MT. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 2922–2926.
- [16] Harada N, Otsuka S, Nishiyama M, et al. Characteristics of phototrophic purple bacteria isolated from a Japanese paddy soil[J]. Soil Sci Plant Nutr, 2003, 49(4): 521–526.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年,是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,国内外公开发行人,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:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。**欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买**,2012 年的每册定价为 58 元,全年 696 元,我们将按期免费邮寄。

另,本编辑部现存有少量过期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413