

产黑色素海洋放线菌的分离、鉴定和 产色素条件优化

徐静^{1*} 吴少杰² 阎斌伦¹ 魏威²

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室 江苏 连云港 222005)

(2. 淮海工学院 海洋学院 江苏 连云港 222005)

摘 要: 【目的】从连云港高公岛沿岸海底泥样中分离筛选到一株产黑色素的海洋放线菌。【方法】对筛选得到的菌株 HT-18 所产的色素进行紫外-可见吸收光谱、红外光谱分析。通过形态特征、培养特征、生理生化测定以及 16S rRNA 序列的系统发育学分析确定菌株 HT-18 的分类学地位。采用单因素对产色素发酵条件进行优化。【结果】菌株 HT-18 所产色素为黑色素。鉴定该菌株属链霉菌属(*Streptomyces*)。最佳产色素条件为: 初始 pH 7.0, 装液量为 70/250 mL, 温度 31 °C, 发酵时间为 3 d。【结论】海洋链霉菌 HT-18 是一株具有研究和应用潜力的产黑色素菌株。

关键词: 黑色素, 链霉菌, 鉴定, 发酵条件优化

Screening, identification of marine actinomycete strain HT-18 and its optimization of melanin-producing conditions

XU Jing^{1*} WU Shao-Jie² YAN Bin-Lun¹ WEI Wei²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology,
Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

(2. School of Marine Science & Technology, Huaihai Institute of Technology,
Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

Abstract: [Objective] A melanin-producing actinomycete was isolated from the mud collected

*通讯作者: Tel: 86-518-85895253; ✉: sweetcabin@163.com

收稿日期: 2012-06-23; 接受日期: 2012-09-04

from Gaogong Island, Lianyungang. **[Methods]** The pigment separated from the fermentation broth of HT-18 was characterized by UV-visible absorption spectroscopy and infrared spectroscopy. The strain was clarified by colonial morphology, physiological and biochemical tests and 16S rRNA sequence phylogenetic analysis. The shake flask condition for pigment fermentation was optimized using single factor test. **[Results]** The results showed that HT-18's production was melanin. The strain was preliminary identified *Streptomyces*. The optimal fermentation process was that 70 mL of tyrosine medium was contained in a 250 mL flask for 3 d fermentation at initial pH 7.0, 31 °C. **[Conclusion]** HT-18 was a melanin-producing strain with research and application potential.

Keywords: Melanin, *Streptomyces*, Identify, Optimization of fermentation conditions

黑色素(Melanin)是一类具有复杂结构的非均质类多酚聚合体,常由 L-多巴、酪氨酸和半胱氨酸氧化或聚合而成。它作为着色剂,在酒、饮料及其他食品加工过程中广泛使用。由于黑色素的抗氧化^[1-2]、抗衰老^[3]等功能,使其在保健品中的应用逐年增加。它在化妆品、染发剂中起装饰作用^[4],可以防紫外线辐射^[5-6]、清除自由基^[7],还可作为生物杀虫剂的光保护剂。另外,作为新型天然的药物载体,还可用来治疗某些与黑色素缺乏有关的神经系统疾病^[8]。

合成色素被陆续发现具有慢性毒性和致癌性,已逐渐被天然色素取代。天然黑色素在植物、动物及微生物中均可产生。动植物材料生长繁殖受季节、气候、产地等因素的影响,提取的色素价格昂贵,应用受到局限。微生物所产黑色素是体内的酪氨酸酶催化酪氨酸形成 L-多巴,然后继续氧化形成,属于氨基酸的衍生物,无毒无害。此外微生物发酵周期短、成本低廉、易于工业化,因此采用微生物生产天然黑色素将逐渐成为主流。

细菌、真菌和放线菌均可产黑色素^[9-11],已报道产黑色素的放线菌多分离自陆地土壤中。柯冠群等^[12]在成都近郊土样中分离筛选得到一株高产黑色素的菌株,初步确定其为链霉菌属,并比

较了其在不同培养基上产黑色素的能力,经过培养基优化后产量可达 0.70 g/L。顾敏舟等^[13]在四川师大校园土壤中分离得到一株高产黑色素菌株 MV5002,初步鉴定为放线菌,并对发酵条件和培养基成分做了优化,在优化条件下产量达 3.45 g/L。

海洋环境的特殊性造就了海洋微生物更加多样和特殊,越来越多的海洋放线菌被发现可产生结构新颖、生物活性强的物质,而分离自海洋的放线菌生产黑色素的研究国内还鲜见报道。本实验旨在从海洋环境中分离、筛选一株高产黑色素的放线菌,对该菌株进行鉴定并对其产黑色素条件进行优化,为今后大规模发酵生产黑色素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 从连云港高公岛沿岸海底泥样中分离纯化得到的编号为 HT-18 的放线菌菌株。

1.1.2 试剂: 细菌 DNA 提取试剂盒购自上海赛百盛生物有限公司;凝胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司;标准黑色素购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: 海水高氏 I 号培养基(可溶性淀粉

20 g, KNO_3 1 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO_4 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, 陈海水 1 000 mL, 调节 pH 7.2–7.4); 酪氨酸培养基^[14](葡萄糖 1 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, CaCl_2 0.1 g, L-酪氨酸 1 g, 陈海水 1 000 mL, 调节 pH 7.0)。

1.2 菌株的分离和筛选

1.2.1 分离与初筛: 泥样做梯度稀释, 取稀释液涂布于海水高氏 I 号培养基, 挑取形态不同的菌落用划线法分离纯化, 纯化后的菌株接种至酪氨酸培养基平板上, 挑选生长快、颜色深、色素扩散圈大的菌株进行摇瓶复筛。

1.2.2 复筛: 从初筛得到的菌株斜面挑取两环孢子, 接入海水高氏 I 号, 150 r/min、28 °C 培养 24 h, 然后按 10% 接种量接入酪氨酸培养基振荡培养 5 d, 发酵液离心取上清测 OD_{400} 值, 比较产黑色素情况。将得到的黑色素高产菌株连续传代 5 次, 分别测定黑色素产量, 比较菌株的遗传稳定性。

1.3 黑色素的提取和理化性质测定

1.3.1 黑色素的提取: 将 HT-18 接种于海水高氏 I 号, 150 r/min、28 °C 培养 24 h 制成种子液, 后转接于酪氨酸培养基中振荡培养 5 d。发酵液经抽滤去除菌体, 用盐酸调节 pH 至 2–3, 静置过夜, 5 000 r/min 离心 20 min 得沉淀, 在 5 mol/L HCl 中浸泡 4 h, 接着用 2 次无水乙醇、1 次丙酮依次洗涤, 烘干后即为纯化的黑色素。

1.3.2 黑色素产量的计算: 将提纯的黑色素干燥至恒重, 称取 9 mg 溶于 250 mL 蒸馏水中, 配制黑色素含量为 36 mg/L 的原液, 对此原液进行倍数稀释并分别测出 OD_{400} 值, 以黑色素含量为横坐标, 以 OD_{400} 值为纵坐标制作标准曲线。黑色素含量与 OD_{400} 值呈线性关系, 其决定系数 $R^2=0.995\ 4$, 由此可得到黑色素产量计算方程: $y=267.78x-0.464\ 6$ (mg/L)。

1.3.3 黑色素紫外-可见吸收光谱扫描: 取 HT-18

所产黑色素和标准黑色素配成溶液, 以蒸馏水作空白对照, 在 190–910 nm 进行紫外-可见吸收光谱分析。

1.3.4 黑色素红外吸收光谱扫描: 取 HT-18 所产黑色素和标准黑色素充分干燥, 按 1:100 比例加入 KBr, 混匀并压片, 在红外光谱仪 4 000–400 cm^{-1} 区间进行红外分析。

1.4 产黑色素菌的鉴定

1.4.1 形态学观察: 采用平皿插片法。将菌株 HT-18 接种于高氏 I 号固体培养基上, 28 °C 培养 7 d 后, 取插片用光学显微镜和扫描电镜观察菌丝和孢子形态。

1.4.2 培养特征: 参照《链霉菌鉴定手册》^[15]中推荐的培养基(表 1) 28 °C 培养 7–10 d 后观察记录特征。

1.4.3 生理生化特征: 参照《链霉菌鉴定手册》中的方法观察生理生化特性。

1.4.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及其系统发育分析: 试剂盒法提取菌株 HT-18 总基因组 DNA。用于 16S rRNA 基因扩增的引物为通用引物(P₁: 5'-AGAGTTTGATCATGGC-3'; P₂: 5'-TACCTGTTACGACTT-3'), 由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。PCR 扩增产物用凝胶回收试剂盒进行回收, 测序。将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行 BLAST 分析比对, 并选取相似性较高的菌株与菌株 HT-18 用 ClustalX 1.83 软件进行多重序列匹配排列(Multiple alignments)分析, 用 MEGA 4 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.5 产黑色素条件的优化

以发酵液的 OD_{400} 值为指标进行单因素实验, 研究初始 pH、装液量、温度和发酵时间等因素对摇瓶培养产黑色素能力的影响。

2 结果与分析

2.1 泥样筛选结果

从泥样中共分离获得 47 株放线菌菌株, 其中产黑色素菌株 13 株, 取产量较高的 5 株经连续传代后发现 HT-18 不仅产量高且遗传稳定性好, 将其作为实验菌株进一步研究产黑色素性质、菌种鉴定和产黑色素的条件优化。

2.2 黑色素紫外-可见吸收光谱

HT-18 所产黑色素同 Sigma 公司的标准黑色素的紫外-可见吸收光谱图一致, 如图 1 所示。两者在紫外光区和可见光区均无特征吸收峰, 吸收值随波长的增大而降低。

2.3 黑色素的红外吸收光谱

由图 2 可知, HT-18 所产黑色素在 $3\,296\text{ cm}^{-1}$ 处有强吸收峰, 是由 O-H 和吡啶的 N-H 伸缩振

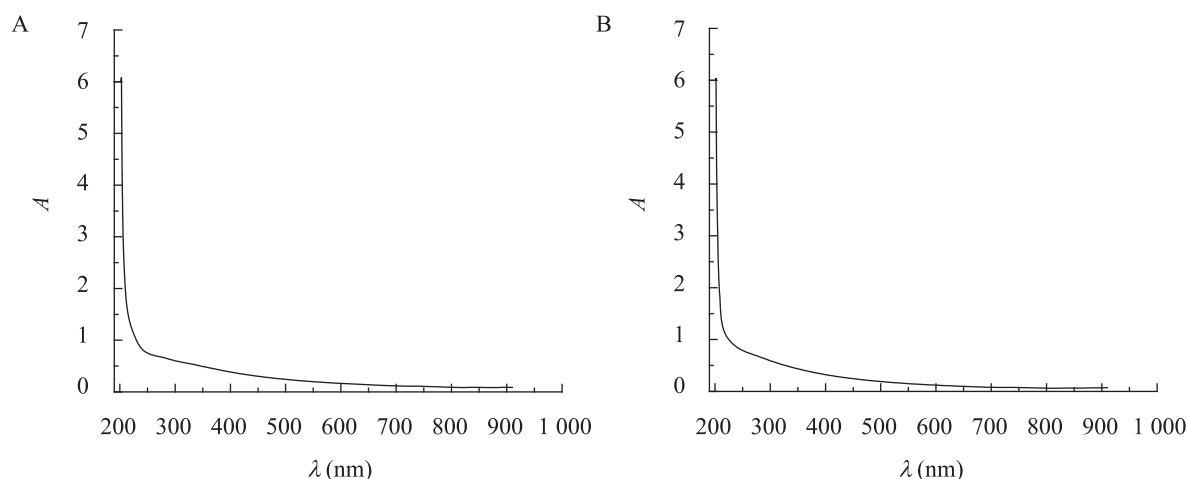


图 1 黑色素紫外-可见吸收光谱图

Fig. 1 UV-Absorption spectrum of melanin

注: A: HT-18 所产黑色素; B: Sigma 标准黑色素.

Note: A: Melanin produced by HT-18; B: Standard melanin from Sigma.

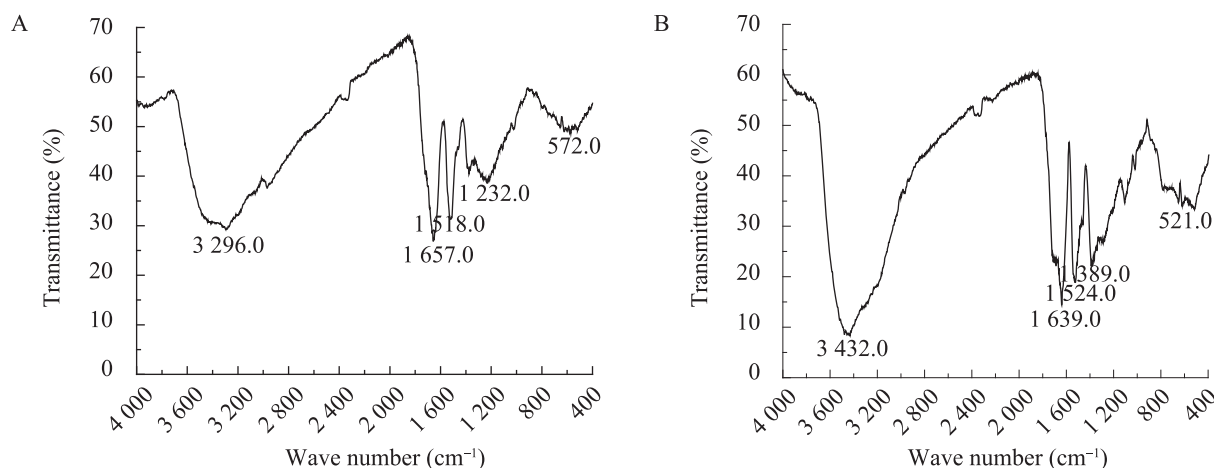


图 2 黑色素的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectrum of melanin

注: A: HT-18 所产黑色素; B: Sigma 标准黑色素.

Note: A: Melanin produced by HT-18; B: Standard melanin from Sigma.

动产生的; 1 657 cm⁻¹附近存在的强吸收峰, 说明分子中存在羰基结构, 与 3 296 cm⁻¹处的强吸收峰一起指示-COOH 结构的存在; 1 518 cm⁻¹附近的相关峰为芳环骨架振动引起, 以上特征峰与 Sigma 公司标准黑色素的特征峰一致, 且与文献报道中不同来源黑色素的红外光谱图也基本一致。

2.4 菌株鉴定

2.4.1 形态学观察: 在高氏 I 号固体培养基上菌株 HT-18 的菌落中间凸起, 边缘光滑; 气生菌丝白色, 日久成灰绿色, 基内菌丝灰色, 不产生可溶性色素, 无吸水现象。基内菌丝无横隔膜, 气生菌丝繁茂多分枝, 常在气丝末端形成长孢子丝, 孢子丝呈松散的螺旋形; 孢子(图 3)卵圆形, 表面光滑。

2.4.2 培养特征: 从表 1 可看出, 菌株 HT-18 在多数培养基上生长良好, 能产褐色、黑色可溶性色素, 在不同培养基上生长时气生菌丝主要呈现白色至灰绿的渐变过程, 基内菌丝则以黄色居多。

2.4.3 生理生化测定: 菌株 HT-18 的生理生化特征的结果见表 2。HT-18 能产生 H₂S, 能水解淀粉, 不能使明胶液化, 不能使牛奶凝固或胨化, 纤维

素上不生长。对碳源的利用结果表明, 菌株 HT-18 可以利用葡萄糖、蔗糖、肌醇、麦芽糖、甘露醇、L-半乳糖、D-阿拉伯糖、L-鼠李糖, 不能利用 D-果糖。

2.4.4 16S rRNA 序列分析: 菌株 HT-18 的 16S rRNA 基因核苷酸序列全长为 1 403 bp, GenBank 登录号为 HM348894。将该序列与 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 与其同源性较高的菌株均属于链霉菌属, 选取 14 株相关菌株进行系统发育分析, 用 MEGA 4 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 4), 可以看出, 菌株 HT-18

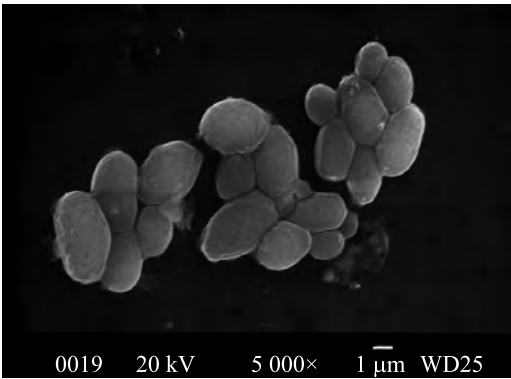


图 3 菌株 HT-18 孢子的电镜图(5 000×)
Fig. 3 Electron micrograph of spores (5 000×)

表 1 菌株 HT-18 的培养特征 Table 1 Cultural characteristics of strain HT-18				
培养基 Medium	生长状况 Growth	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
高氏 I 号培养基 Gause's synthetic agar	良好	白至灰绿	灰色	无
察氏培养基 Czapek's medium	中等	白至灰绿	黄色	无
淀粉铵培养基 Ammonium salt starch agar	良好	白至灰绿	浅黄	无
葡萄糖酵母培养基 Glucose yeast agar	良好	白色	浅黄	褐色
葡萄糖天门冬素培养基 Glucose asparagine agar	良好	白至灰绿	浅黄	无
无机盐淀粉培养基 Inorganic salt starch agar	良好	灰绿	灰绿	无
土豆培养基 Potato block	中等	灰色	褐色	黑色

表 2 菌株 HT-18 的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical properties of strain HT-18

试验项目 Test item	结果 Results	试验项目 Test item	结果 Results
麦芽糖 Maltose	+	D-阿拉伯糖 D-arabinose	+
葡萄糖 Glucose	+	牛奶凝固 Milk solidification	-
蔗糖 Sucrose	+	牛奶胨化 Milk peptonization	-
甘露醇 Mannitol	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	-
肌醇 Inositol	+	淀粉酶 Amylase	+
L-半乳糖 L-galactose	+	纤维素酶 Cellulase	-
L-鼠李糖 L-rhamnose	+	酪氨酸酶 Tyrosinase	+
D-果糖 D-fructose	-	产生 H ₂ S Production of H ₂ S	+

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应.
Note: +: Positive results; -: Negative results.

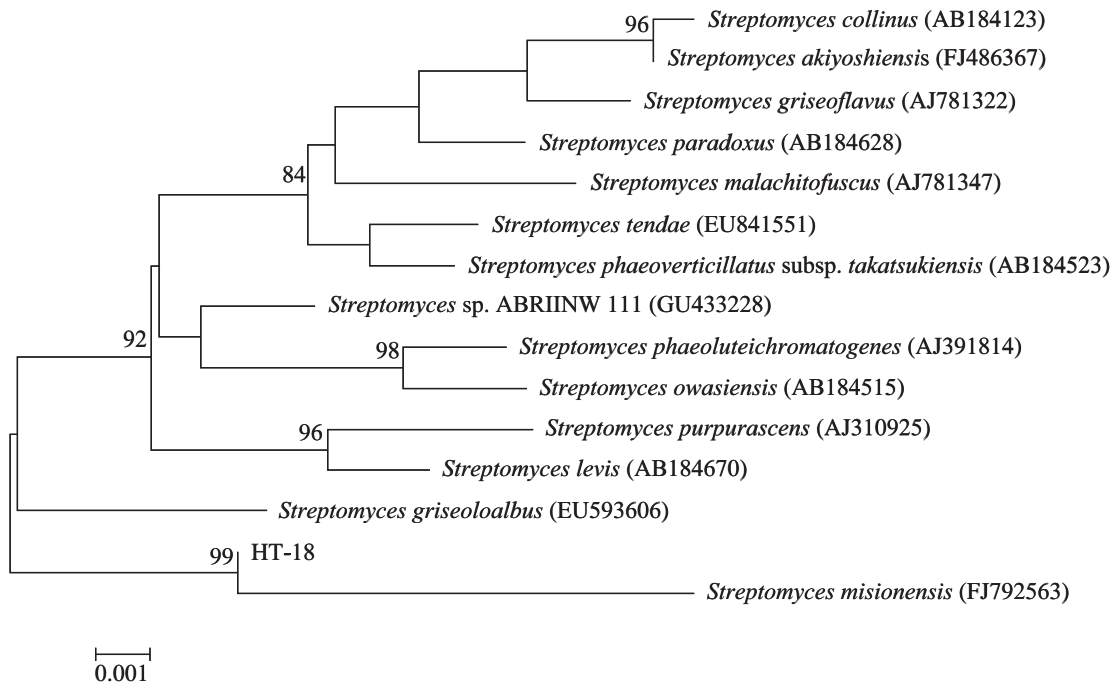


图 4 基于 16S rRNA 序列构建的菌株 HT-18 的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequence of strain HT-18 and related *Streptomyces* species

注: 括号内为 GenBank 登录号; 分支点上的数字为自展值百分比; 线段 0.001 为核苷酸替换率.
Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.001 substitutions per nucleotide position.

与 *Streptomyces misionensis* (FJ792563)聚于同一分支中, 其相似性达到 99.3%。结合形态特征、培养特征、生理生化特征和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析结果, 可将菌株 HT-18 的分类地位确定至属的水平, 即: 菌株 HT-18 属于链霉菌属 (*Streptomyces*), 并且与米修链霉菌 (*Streptomyces misionensis*)具有高于 99% 的 16S rRNA 序列相似性。

2.5 产黑色素的条件优化

2.5.1 初始 pH 对黑色素产量的影响: 将发酵培养基初始 pH 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 以 1% 的接种量接种于 50 mL 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 的条件下振荡培养 7 d, 发酵液 3 500 r/min 离心后取上清, 测 OD_{400} 值。结果见图 5, 当培养基初始 pH 为 5.0、6.0、7.0 时, 黑色素产量比较接近, OD_{400} 值分别为 0.655、0.625、0.635, 远高于其他 pH 条件, 说明此菌株的最适产黑色素 pH 范围较宽。另外当培养基初始 pH 为 4.0 时, OD_{400} 值只有 0.231, 这种现象可能是因为菌株 HT-18 不适宜在酸性条件下生长影响了黑色素的产生和释放, 也可能是黑色素本身在酸性条件下不易溶解所致。与酸性环境相比, 培养基初始 pH 为 8.0 时, OD_{400} 值有所下降, 当 pH 为 9.0 时, OD_{400} 值仅为 0.017, 说明碱性条件非常不利于菌株的生长导致黑色素产量几乎为零。

2.5.2 装液量对黑色素产量的影响: 将菌株 HT-18 以 1% 的接种量分别接种于含有 30、50、70、90、110 mL 液体培养基的三角瓶(250 mL)中, 28 °C、150 r/min 的条件下振荡培养 7 d, 发酵液 3 500 r/min 离心后取上清, 测 OD_{400} 值。结果见图 6, 随着摇瓶装液量的增加, 产黑色素量随之增加, 70 mL 时产量最大, 再增加装液量则产量下降, 因此 250 mL 的三角瓶装入 70 mL 最有利于黑色素的合成。

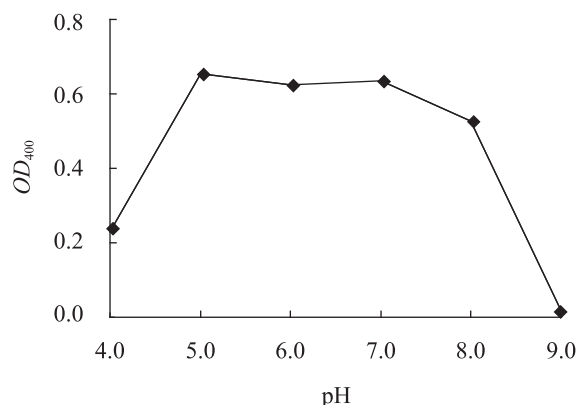


图 5 初始 pH 对黑色素产量的影响

Fig. 5 Effect of initial pH on the melanin production

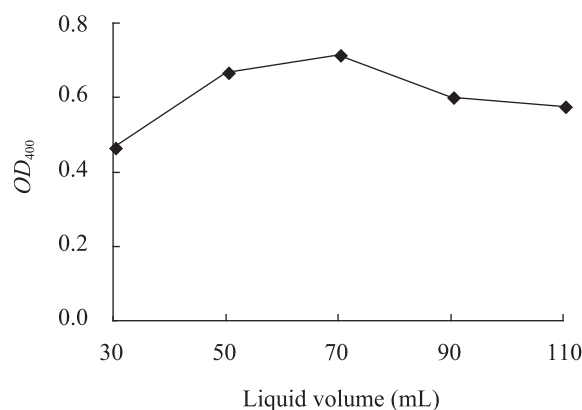


图 6 装液量对黑色素产量的影响

Fig. 6 Effect of liquid volume on the melanin production

2.5.3 温度对黑色素产量的影响: 将菌株 HT-18 以 1% 的接种量接种于 50 mL 液体发酵培养基中, 分别在 25 °C、28 °C、31 °C、34 °C、37 °C、40 °C 条件下, 150 r/min 振荡培养 7 d, 发酵液 3 500 r/min 离心后取上清, 测 OD_{400} 值。结果见图 7, 黑色素产量在 25 °C–31 °C 随温度升高而升高, 并于 31 °C 达到最大值, 继续升高温度则产量下降。

2.5.4 发酵时间对黑色素产量的影响: 将菌株 HT-18 以 1% 的接种量接种于 70 mL 液体发酵培养基中, 31 °C、150 r/min 的条件下振荡培养 7 d, 每隔 24 h 取样 1 次, 发酵液 3 500 r/min 离心后取上清, 测 OD_{400} 值。结果见图 8, HT-18 菌株在培养基中培养 1 d 时, 黑色素就开始迅速产生, 在

第3天时,黑色素的产量达到较高值,其后产量趋于稳定,几乎没有变化。因此确定最佳培养时间为3 d。在确定基础发酵培养基的情况下,对发酵培养条件进行了摸索,将培养基的起始 pH 调至 7.0, 70/250 mL, 31 °C 恒温摇床培养 3 d, 其黑色素产量最高, 约为 0.24 g/L, 所以选择此培养条件作为后续实验发酵培养条件。

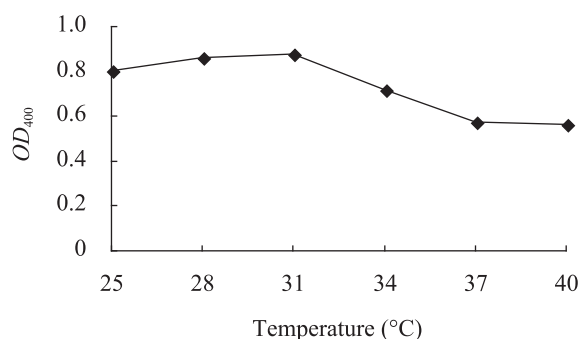


图7 温度对产黑色素产量的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the melanin production

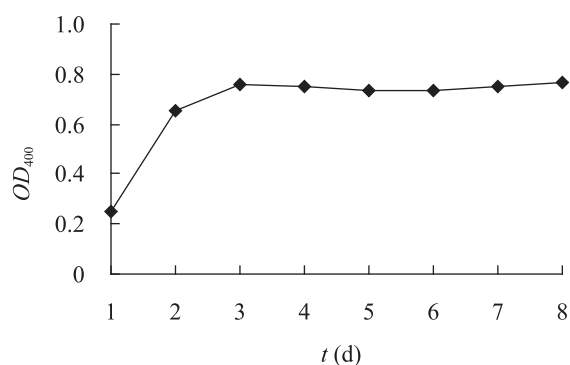


图8 发酵时间对产黑色素产量的影响

Fig. 8 Effect of fermentation time on the melanin production

3 结论

本研究对一株分离自连云港沿海底泥的海洋放线菌 HT-18 所产色素进行提取、纯化并鉴定, 结果发现该菌所产色素确为黑色素。通过对菌株 HT-18 的形态学观察、生理生化测定, 结合 16S rRNA 序列分析, 确定其属于链霉菌属 (*Streptomyces*)。

该菌种的最高产量约为 0.24 g/L, 与其他学者发现的菌株相比, 产量并不算高, 但该菌株分离自海洋, 所产黑色素的化学结构可能有异于陆地菌株, 下一步将借助其他分析测试手段对黑色素的结构做进一步的研究和比较。此外在功能方面进行了探索, 对菌株 HT-18 发酵液的乙酸乙酯萃取物进行抗菌实验, 发现对多株病原菌均有抑菌效果, 这提示发酵液中有抗生素的存在, 将来在明确抗生素成分的基础上, 有望使用该菌株既生产黑色素, 又生产某种抗生素, 从而成倍提高经济效益。

参考文献

- [1] 徐磊, 王长海. 短梗霉黑色素的提取及其理化性质的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 122-125.
- [2] 吴尧, 马爱民, 倡国涵, 等. 香灰菌黑色素的分离及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(3): 470-473.
- [3] 王玉洁, 符坚, 刘楠, 等. 重要的生物资源黑色素及其功能的机理[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1): 12-14.
- [4] 张沙艳, 胡春霞. 毛发中黑色素的提取和利用[J]. 辽宁师专学报: 自然科学版, 2003, 5(3): 95-96.
- [5] Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24(1): 411-451.
- [6] Ruan LF, Yu ZN, Fang B, et al. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(3): 286-289.
- [7] 陈玢, 彭珍荣. 嗜麦芽假单胞菌黑色素的抗氧化作用研究[J]. 氨基酸和生物资源, 1997, 19(2): 32-34.
- [8] 彭方, 王伟, 彭珍荣. 高产黑色素微生物资源的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(4): 150-154.

- [9] 倪丽娜. 一株高产黑色素细菌的分离及鉴定[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 55-59.
- [10] Selvakumar P, Rajasekar S, Periasamy K, et al. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2125-2131.
- [11] Egorov SY, Krasnovsky AA, Bashtanov MY, et al. Photosensitization of singlet oxygen formation by pterins and flavins: time-resolved studies of oxygen phosphorescence under laser excitation[J]. Biochemistry (Moscow), 1999, 64(10): 1117-1121.
- [12] 柯冠群, 淳泽, 万波. 高产黑色素菌株的分离及鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(6): 760-762.
- [13] 顾敏舟, 汤建才, 黄敏. 一株高产黑色素菌的筛选及发酵条件优化[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(6): 735-738.
- [14] Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and function of fungalmelanins[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24(1): 411-451.
- [15] 中国科学院微生物研究所. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 1-18.

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, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 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, 被选入新闻出版总署设立的“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, 2013 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

另, 本编辑部现存有少量过刊, 如有需要者可直接与编辑部联系。(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