

低温沼气发酵优良菌系筛选及优势菌群分析

孔维涛^{1,2Δ} 胡栋² 马福民³ 贾楠² 张翠棉² 齐永敏³ 王占武^{2Δ*}

(1. 河北农业大学 食品科技学院 河北 保定 071001)

(2. 河北省农林科学院遗传生理研究所 河北省植物转基因中心 河北 石家庄 050051)

(3. 河北省临漳县生态能源局 河北 邯郸 056600)

摘要:【目的】为获得低温沼气发酵高效菌系,从张家口、承德和邯郸地区采集低温产气良好的沼气池中沼泥样品 12 份。【方法】以沼泥为接种源进行 16 °C–5 °C 阶段降温模拟沼气发酵试验,对处理组 HL2、ZG2、CW1 及其相应的接种源 HLA、ZGB、CWB 进行 DGGE 分析。【结果】ZG2 处理组模拟沼气发酵综合性能最优,与其他处理组呈显著性差异; DGGE 图谱显示,被检测样品中古菌种属多样性丰富,但图谱中代表优势种属条带的位置存在较大差异。通过 16S rDNA 克隆及测序分析,样品中主要优势菌属为甲烷八叠球菌属、甲烷鬃毛菌属和甲烷粒菌属。【结论】DGGE 图谱中代表甲烷八叠球菌属的条带是样品 ZG2 和 ZGB 中唯一重复出现的条带,且未作为优势条带出现在其他样品中,推测甲烷八叠球菌属与低温产沼气有密切相关性。

关键词: 沼气, 低温, PCR-DGGE, 产甲烷古菌, 克隆

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2012BAD14B07-06); 国家科技重大专项项目(No. 2012ZX07203003)

*通讯作者: Tel: 86-311-87652276; 信箱: hbbio@126.com

Δ 共同第一作者

收稿日期: 2012-11-15; 接受日期: 2013-01-29

Screening and dominant population analysis of microbial strains in biogas fermentation under the low temperature

KONG Wei-Tao^{1,2Δ} HU Dong² MA Fu-Min³ JIA Nan² ZHANG Cui-Mian²
QI Yong-Min³ WANG Zhan-Wu^{2Δ*}

(1. Institute of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

(2. Institute of Genetics and Physiology of Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Hebei Plant Gene Transport Center, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

(3. Linzhang Bureau of Ecological Energy, Handan, Hebei 056600, China)

Abstract: [Objective] To obtain the best produce methane of microbial strains, twelve biogas slurry samples were collected from the biogas digesters in Zhangjiakou, Chengde and Handan. **[Methods]** Biogas fermentation experiment were produced with different biogas slurry samples by decreasing the operating temperature form 16 °C to 5 °C. DGGE analysis was taken on samples (HL2, ZG2, CW1, HLA, ZGB and CWB). **[Results]** The results showed the ZG2 with biogas yield, gas-production rate and methane content were significantly superiority at the same temperature stage among the inoculation treatments. In addition, DGGE chart were observed that there were abundant microbial diversity and it was significantly different bands among the dominant archaea. Through 16S rDNA cloning sequencing analysis, the dominant archaea were composed of *Methanosarcina*, *Methanosaet* and *Methanocorpusculum* in the samples. **[Conclusion]** Furthermore, *Methanosarcina* major existed only in ZG2 and the same dominant archaea as ZGB. In conclusions, *Methanosarcina* were closely related to effectively gas under low temperature condition.

Keywords: Biogas, Low temperature, PCR-DGGE, *Methanogenic archaea*, Clone

清洁能源的开发与利用是世界各国关注的焦点。沼气作为一种可再生的洁净生物质能源,已经得到广泛重视和利用^[1-3]。发展沼气事业不仅能够提供清洁能源,同时还能解决环境污染问题,特别适用于人口众多,人均能源占有量严重不足,生态环境急需改善的发展中国家^[4-6]。

目前人们对沼气发酵过程的控制还不完善,存在着沼气发酵启动时间长、原料利用率低、工艺控制不合理等问题,其中低温条件下产气率低的问题是制约沼气事业发展的最重要因素之

一^[7]。由于沼气发酵涉及分解物料、产酸、产氢和产甲烷等多种微生物,是一个非常复杂的厌氧消化过程,对各类微生物在沼气发酵中所起作用的研究尤为重要^[8]。产甲烷古菌作为沼气厌氧发酵过程中最重要的微生物,因其潜在的经济价值、社会效益和生态功效而受到研究人员的青睐^[9-11]。然而由于传统分离纯化技术的缺陷,目前沼气池中被能够分离纯化的种属还很有限,这限制了人们对沼气发酵微生物的认识和利用。1993年 Muyzer 等在微生物生态领域首次运用了

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术,为微生物多样性研究开辟了新的道路^[12]。成晓杰等采用宏基因组技术建立了沼气发酵微生物的质粒文库,为沼气发酵过程中水解酶基因资源的挖掘利用奠定了基础^[13]。何志刚等通过构建 16S rDNA 基因文库的方法,研究了牛粪沼气池发酵液中产甲烷菌的菌群结构^[14]。丁建南等运用 16S rDNA 基因文库和实时荧光 qPCR 技术,对低温沼气功能菌群结构和数量进行了研究^[15]。DGGE、宏基因组文库和 16S rDNA 基因文库等以分子生物学为基础的非培养技术对人们进一步认识和利用沼气发酵中各类微生物起到了推动作用。但有关采用沼气发酵综合性能检测试验同微生物非培养分子技术相结合,分析、探明与低温沼气发酵相关微生物菌群的研究鲜有报道^[16-18]。

本研究以不同地区产气良好沼气池中的沼泥为接种源,通过阶段降温模拟沼气发酵试验,筛选耐低温且发酵性能稳定的优良微生物菌系,并采用 DGGE、基因克隆及测序技术,分析与低温沼气发酵产气特性相关的微生物菌群,为此类菌群的分离及利用研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 沼泥样品采集: 2011 年 10 月下旬至 11 月

中旬,先后在河北省张家口市、承德市、保定市和临漳县不同纬度地区的户型沼气池集中区,采集低温产沼气良好沼气池中下层沼泥样品 12 份,详细信息见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒购于上海生工生物公司,40% 丙烯酰胺(37.5:1)购于上海索莱宝生物科技有限公司, N,N-dimethylformamide 购于 AMRESCO 公司。16S rDNA 通用引物和 V3 区特异性引物由 Invitrogen 公司合成, TD-TSPO4C 型气相色谱分析仪, Bio-Rad 凝胶成像仪 Gel DocXR, MicroCL21R 型离心机, DYY-6C 型电泳仪, PCR 仪、D Code DGGE 系统(Bio-Rad, USA)。

1.2 试验方法

1.2.1 耐低温优良菌系筛选: 以采集的沼泥为接种源,利用自制的 10 L 排空式模拟沼气发酵反应器,在 16 °C-5 °C 范围进行阶段降温沼气发酵试验。试验开始后,将圆形集气罩内的空气排净,并将集气罩顶部与储液器边缘的距离记为零刻度,之后根据集气罩上升的高度和底面积计算实际产气量。每个温度阶段试验结束后,将集气罩内的气体排净,开始下阶段试验,总产气量为 5 个温度阶段产气量的总和。采用干牛粪作为发酵底物,物料质量比为: 自来水(37 °C):干牛粪:沼泥=70:15:15。阶段温度设计为 16 °C、13 °C、10 °C、7 °C 和 5 °C,温度控制精度为±0.5 °C;每

表 1 沼泥样品采集地点及沼气池发酵原料
Table 1 Sampling sites and the fermentation material in the original biogas digester

沼泥样品编号 Sampling sites No.	采样地点 Sampling site	发酵原料 Fermentation material	沼泥样品编号 Sampling sites No.	采样地点 Sampling site	发酵原料 Fermentation material
HLA	临漳县西羊羔乡	人、牛粪	CPA	平泉县道虎沟乡	人、牛粪
HLB	临漳县西羊羔乡	人、牛粪	CPB	平泉县道虎沟乡	人、羊粪
HLC	临漳县西羊羔乡	人、牛粪	CPC	平泉县道虎沟乡	人、兔粪
ZGA	涪源县战石沟村	牛粪	CWA	围场县朝阳湾镇	牛粪
ZGB	涪源县战石沟村	牛粪	CWB	围场县朝阳湾镇	牛粪
ZGC	涪源县战石沟村	牛粪	CWC	围场县朝阳湾镇	牛粪

个温度阶段试验周期为 8 d。采用排气法测定产气量, 气相色谱分析仪测定沼气中甲烷含量。

1.2.2 样品总 DNA 提取: 采用 Ezup 柱式 DNA 抽提试剂盒, 分别从沼气发酵反应液和接种源沼泥中提取微生物 DNA 进行比较分析, 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.3 16S rDNA 片段的 PCR 扩增: (1) 古菌 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增。采用古菌 16S rDNA 通用引物 Arch (5'-CCGGTTGATCCYGCCGGA-3') 和 Arch958R (5'-CCGGCGTTGAMTCCAA TT-3')^[19], 以纯化后的接种源沼泥和沼气发酵反应液中的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测后切胶回收。(2) 古菌 16S rDNA V3 区片段 PCR 扩增。采用古菌 16S rDNA V3 区引物古菌 340F (5'-CCCTACGGGGYGCASCAG-3') 和古菌 529R (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3'), 为了提高 DGGE 图谱分辨率, 在 340F 的 5'端加入 45 bp 的 GC 发夹(CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG)^[20]。以古菌 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增片段回收产物为模板进行 PCR 扩增, 其反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min, 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测、分析。

1.2.4 菌系组成 PCR-DGGE 分析^[21]: DGGE 实验参数为: 凝胶浓度为 8%; 变性梯度为 30%–60%。电泳条件为 60 °C, 80 V, 10 h, 上样量为 30 μL; 采用银染法进行胶染色, 使用凝胶成像仪 Gel DocXR 进行检测、照相; 使用 Quantity One 软件对获得的图像进行分析。

1.2.5 优势条带克隆和测序分析: 将 DGGE 图谱中与沼气低温产气特性有关的清晰且较亮的条带在无菌环境下回收, 以回收的条带为模板进行

PCR 扩增。所用引物为古菌 340F (5'-CCC TACGGGGYGCASCAG-3') 和古菌 529R (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3'), PCR 体系和条件与 1.2.3 中(2)相同。将 PCR 扩增产物进行基因克隆, 克隆产物送 Invitrogen 公司测序, 将获得的有效序列与 NCBI-GenBank 数据库中序列比对, 以其中同源性最高的序列为参考菌株。

2 结果与分析

2.1 耐低温优势菌系的比较筛选

2.1.1 总产气量的比较: 对采集的 12 份样品进行了 16 °C–5 °C 阶段降温沼气发酵试验, 周期为 40 d。对不同样品的总产气量进行了分析, 从图 1 结果可见, 接种了取自张家口沽源县沼泥的处理组 ZG1、ZG3 和 ZG3 的总产气量均高于其他处理组, 其中 ZG2 最优, 与其他处理组存在显著性差异。而接种了来自临漳县沼泥的处理组 HL1、HL2 和 HL3 的总产气量均低于其他处理组。总体上看, 总产气量与接种源所处地区纬度有一定相关性。

2.1.2 不同温度阶段产气速率比较: 从图 2 可见, 在 16 °C–5 °C 之间, 随着环境温度的降低, 所有处理组的产气速率均呈下降趋势, 相比而言, ZG2 的产气速率在各温度阶段均最大,

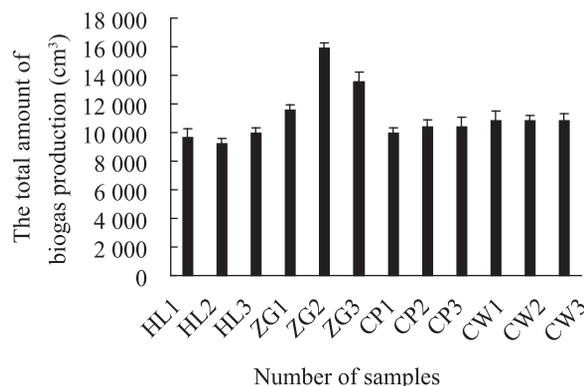


图 1 接种了不同来源沼泥样品的沼气发酵总产气量
Fig. 1 Total biogas production with different biogas slurry samples

与其他处理组的产气率有明显差异,在 16 °C、13 °C 和 10 °C 三个温度阶段的产气速率分别为: 0.050 9 cm³/(cm³·d)、0.050 9 cm³/(cm³·d) 和 0.045 5 cm³/(cm³·d), 变化不大, 且均大于 0.040 cm³/(cm³·d)。当环境温度低于 10 °C 时, ZG2 的产气速率明显下降, 7 °C 时的产气速率只有 0.015 0 cm³/(cm³·d)。据统计, 当沼气产气速率在 0.040 cm³/(cm³·d) 以上时, 可满足三口之家一天的炊事之用。可见, 当环境温度高于 10 °C 时, ZGB 作为接种剂可以满足农户的基本炊事需要。

2.1.3 甲烷含量的比较: 测定了不同温度阶段沼气中的甲烷含量, 由图 3 可见, 在试验初期, 虽然环境温度(16 °C)相对较高, 但微生物还处在发酵初期, 此时期微生物以细胞分裂增殖和物料分解活动为主, 因此甲烷产生量相对较少。发

酵一段时间后, 微生物数量增多, 甲烷产生量也随之增加, 13 °C 发酵阶段均达到最大值。随着温度的下降, 菌体生长和生化反应均受到抑制, 沼气中甲烷含量也随之降低。ZG2 和 ZG3 在各温度阶段的甲烷含量均高于其他处理组。

2.2 总 DNA 的提取及古菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

采用 Ezup 柱式 DNA 抽提试剂盒提取试验处理组 ZG2、CW1 和 HL2 以及相对应的接种源 ZGB、CWA 和 HLB 样品中的总 DNA, 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 4A)。所测 6 个样品总 DNA 片段约为 20 kb, 符合目标片段长度。以提取的总 DNA 为模板, 采用古菌 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 4B 所示, PCR 扩增片段的长度大约为 900 bp, 与目标片段长度大小一致。

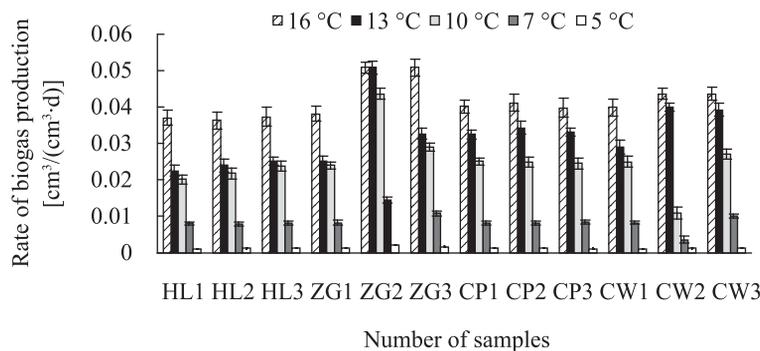


图 2 不同温度阶段的产气速率

Fig. 2 Biogas production rate under different temperatures

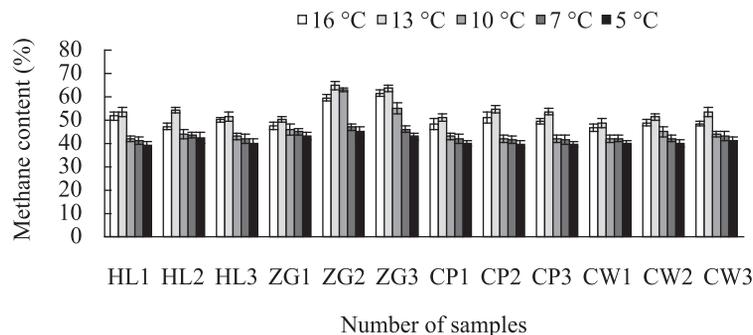


图 3 各温度阶段的甲烷含量

Fig. 3 Methane content of groups under different temperatures

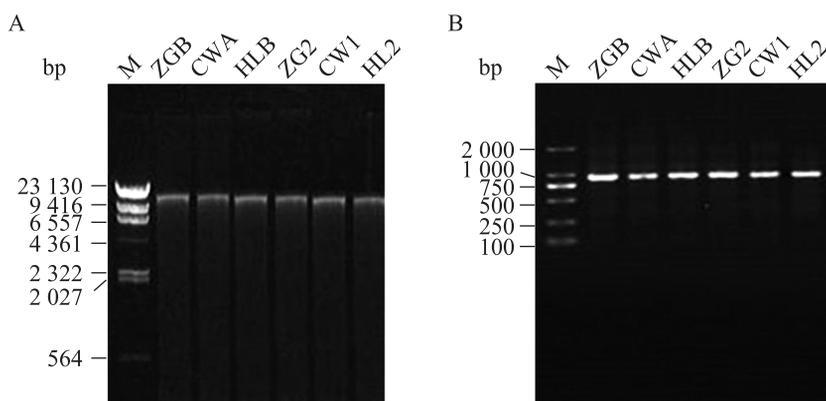


图4 样品总DNA及古菌16S rDNA片段PCR扩增电泳图

Fig. 4 Total DNA of samples and PCR amplification of 16S rDNA segment agarose gel electrophoresis

注: M: DL2000 marker; A: 沼泥样品提取总DNA电泳结果; B: 古菌16S rDNA片段扩增电泳结果。

Note: M: DL2000 marker; A: Total DNA of samples agarose gel electrophoresis; B: PCR amplification of 16S rDNA using purified DNA.

2.3 古菌16S rDNA V3区片段PCR扩增

对古菌16S rDNA V3区片段PCR扩增产物进行了2.5%琼脂糖凝胶电泳检测(图5)。PCR扩增片段的长度大约为200 bp,与目标片段长度大小一致,且条带中未出现非特异性扩增,可用于DGGE分析。

2.4 菌系组成DGGE分析

对6个样品中古菌16S rDNA V3区的PCR

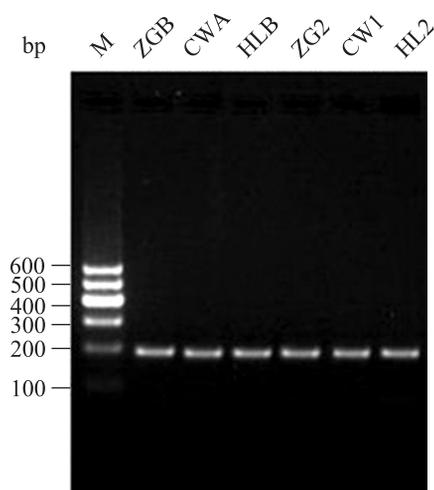


图5 16S rDNA V3区片段PCR扩增结果

Fig. 5 PCR amplification of V3 region segment results

Note: M: DL2000 marker.

产物进行了DGGE分析。从图6结果可见,所测样品的条带数量都较多,说明古菌微生物的多样性十分丰富,但条带位置差异较大,这表明种群结构差异较大(图6)。从图6B可见,ZGB、CWA、ZG2和CW1样品中的条带数量均多于HLB和HL2。ZGB、CWA和HLB3个样品的条带数量和位置差别较大,而以这3个样品为接种源,在统一的基质和条件下进行模拟沼气发酵试验,其处理组ZG2、CW1和HL2的反应体系中菌群条带数量明显增多,且相似度也有所提高(图6B),说明发酵基质和发酵条件对菌群结构产生了较大影响,使用Quantity One软件对获得的DGGE图谱进行分析,相似性聚类图中数据也得到相似的结论(图7)。试验结果表明,在所有处理组中ZG2的总产气量、产气速率和甲烷含量优势最为明显,与其他处理组呈显著性差异。从图6可以看出ZGB-7号和ZG2-7号是两个样品DGGE图谱中位置相同且较亮的条带,而其他样品的DGGE图谱中在该位置没有出现类似的条带,推测7号条带所代表的菌群与沼气优良的低温发酵特性有密切关系。

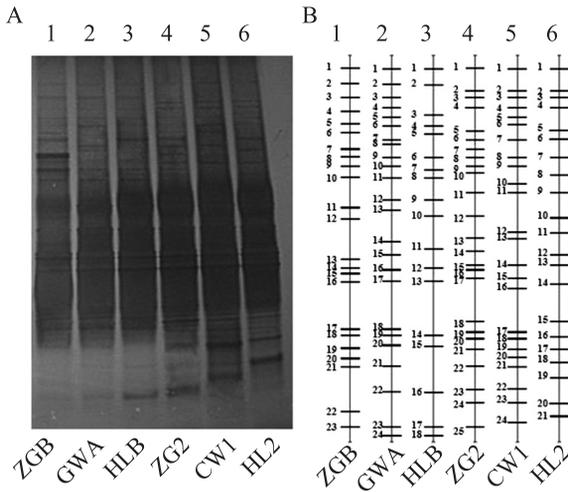


图 6 沼气样品的 DGGE 图谱及 DGGE 图谱条带强度示意图

Fig. 6 Diagram of DGGE pattern and the schematic representation from biogas slurry

注: A: 样品微生物多样性 DGGE 图谱; B: DGG 图谱条带强度示意图。

Note: A: The DGGE gel showing diversity of banding patterns present in each pond; B: The schematic representation of the DGGE gel.

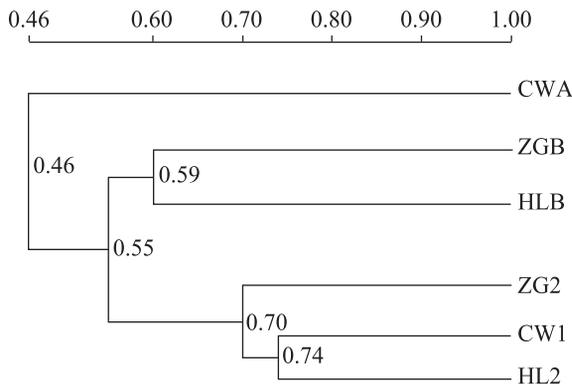


图 7 沼泥样品中的微生物群落结构相似性聚类分析

Fig. 7 Cluster analysis of community structure similarity in different samples from biogas slurry

2.5 优势条带的克隆测序

选择不同样品中亮度较高的条带进行切胶回收,以古菌 16S rDNA V3 区不含 GC 夹板引物进行 PCR 扩增,克隆测序,测序结果进行 BLAST 比对,结果如表 2 所示。与测定的 8 条目标序列片段同源性最高的序列均属未培养古

表 2 DGGE 切胶条带序列比对结果		
Table 2 Alignment of DGGE sequenced clone to its most-similar NCBI-BLAST sequence		
Band	Closest genera	Similarity (%)
1-7	Uncultured Methanosarcina (JQ684610.1)	99
1-18	Uncultured Methanocorpusculum (JQ772449.1)	99
2-6	Uncultured Methanosaeta (JX301662.1)	99
3-4	Uncultured Methanosaeta (JX301657.1)	99
3-13	Uncultured Methanocorpusculum (JQ772449.1)	99
4-7	Uncultured Methanosarcina (JQ684610.1)	99
5-23	Uncultured Methanosaeta (JX301657.1)	99
6-21	Uncultured Methanocorpusculum (JQ772449.1)	99

菌生物。1-7 和 4-7 回收条带测序结果相同,其相似度最高的序列为甲烷八叠球菌属;1-18、3-13 和 6-21 回收条带的位置虽有不同,但其相似度最高的序列均为甲烷粒菌属;2-6、3-4 和 5-23 条带处于同一位置,测序比对相似度最高的序列均为甲烷鬃毛菌属。

3 讨论

本研究首次以不同温度环境来源的优良沼泥为试验样品,采用沼气模拟发酵与 DGGE 技术、基因克隆及测序分析技术相结合的方法,进行了耐低温优良菌系的研究。通过总产气量、产气速率和甲烷含量三项指标的测定,对 12 个处理组在低温环境下沼气发酵综合性能进行了评估,结果显示, ZG2 处理组的低温发酵性能最佳。将 DGGE 图谱技术与基因克隆技术相结合,对处理组 ZG2、CW1 和 HL2 以及相对应的接种源 ZGB、CWA 和 HLB 进行了非培养分析。结果表明,8 条回收片段序列分别与 NCBI-GenBank 中已公布的甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷粒菌属(*Methanocorpusculum*)、甲烷鬃毛菌属(*Methanosaeta*)的序列相似度最高,其相似度为 99%。图谱中 ZGB-7 号与 ZG2-7 号条带是两个样品中唯一位置相同,且其他样品在该水平位置处

没有优势条带出现, 推测甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 是低温环境下维持沼气池正常产气的关键菌属^[22-23], 这与何志刚等以驯化的耐低温沼液为样本的研究结果相一致^[14]。本试验为下一步优化低温下沼气发酵条件和研制低温沼气发酵菌剂提供了依据。

参考文献

- [1] Lettinga G, Rebac S, Zeeman G. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment[J]. *Trends Biotechnology*, 2001, 19(9): 363-370.
- [2] 肖超, 李遐. 开展沼气综合利用加快农村经济发展[J]. *中国沼气*, 1996, 14(1): 32-34.
- [3] Polprasert C, Edwards P, Rajput VS, et al. Integrated biogas technology in the tropics 1. Performance of small-scale digesters[J]. *Waste Management & Research*, 1986, 4(2): 197-213.
- [4] Pathak H, Jain N, Bhatia A, et al. Global warming mitigation potential of biogas plants in India[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2009, 157(1/4): 407-418.
- [5] I-Shin Chang, Ji Zhao, Jing Wu, et al. Comprehensive utilizations of biogas in Inner Mongolia, China[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, 15(3): 1442-1453.
- [6] Murphy JD, Mccarthy K. The optimal production of biogas for use as a transport fuel in Ireland[J]. *Renewable Energy*, 2005, 30(14): 2111-2127.
- [7] Alvarez R, Liden G. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2009, 33(3): 527-533.
- [8] 刁彦花, 程辉彩, 张丽萍, 等. 产氢产乙酸菌 ZR-1 的分离鉴定及产酸特性[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(2): 181-186.
- [9] Bond T, Templeton MR. History and future of domestic biogas plants in the developing world[J]. *Energy for Sustainable Development*, 2011, 15(4): 347-354.
- [10] Ryckebosch E, Drouillon M, Vervaeren H. Techniques for transformation of biogas to biomethane[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(5): 1633-1645.
- [11] 刘晓宁, 李珍, 林国秀, 等. 一株甲烷氧化菌的分离鉴定与特性[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(9): 1265-1271.
- [12] Muyzer G, Waal de EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [13] 成晓杰, 仇天雷, 王敏, 等. 低温沼气发酵微生物区系的筛选及其宏基因组文库构建[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(11): 50-55.
- [14] 何志刚, 牛世伟, 于涛. 低温条件下牛粪沼气产甲烷菌多样性初步研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(6): 189-193.
- [15] 丁建南, 田晓娟, 张国华, 等. 低温沼气功能菌群的产甲烷菌分析[J]. *江西科学*, 2012, 30(1): 36-38, 43.
- [16] Zhang D, Zhu W, Tang C, et al. Bioreactor performance and methanogenic population dynamics in a low-temperature (5 °C-18 °C) anaerobic fixed-bed reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 136-143.
- [17] Takemoto S, Niwa S, Okada H. Effect of storage temperature on soil nematode community structures as revealed by PCR-DGGE[J]. *Journal of Nematology*, 2010, 42(4): 324-331.
- [18] Dong X, Reddy GB. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1175-1182.
- [19] Reed DW, Fujita Y, Delwiche ME, et al. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3759-3770.
- [20] Yu Z, García-González R, Schanbacher FL, et al. Evaluations of different hypervariable regions of

- archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environment Microbiology, 2008, 74(3): 889-893.
- [21] Liu FH, Wang SB, Zhang JS, et al. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis[J]. Applied Microbiology, 2009, 106(3): 952-966.
- [22] 王彦伟, 徐凤花, 阮志勇, 等. 用 DGGE 和 Real-Time PCR 对低温沼气池中产甲烷古菌群落的研究[J]. 中国沼气, 2012, 30(1): 8-12.
- [23] Cadillo-Quiroz H, Bräuer S, Yashiro E, et al. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(8): 1428-1440.



(上接 p.1579)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 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(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

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