

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(10):1050–1055; 4 October 2013  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 相似相容物质对嗜冷甲烷叶菌 R15 的冷保护作用

武岳, 艾国民, 东秀珠\*

中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

**摘要:**嗜冷甲烷叶菌 R15 (*Methanolobus psychrophilus* R15) 是本实验室分离自青藏高原若尔盖湿地的一株甲烷古菌新种。前期研究发现其生长温度范围为 0℃–30℃, 最适生长温度为 18℃, 并能在 5 mmol/L 至 800 mmol/L NaCl 中生长。【目的】鉴定甲烷古菌的相似相容物质, 并探讨它们对甲烷古菌的冷保护作用 and 可能的作用机理。【方法】用 LC-MS 分析低温下甲烷古菌胞内积累的相似相容物质; 检测积累的及已知的相似相容物质对 R15 低温生长的促进作用, 并以研究酶稳定性的模式蛋白谷氨酸脱氢酶 (GDH) 为对象, 分析相似相容物质对低温下酶的稳定性作用。【结果】在 4℃ 培养和冷胁迫的 R15 细胞内检测到胆碱和甜菜碱的积累; 发现胆碱、甜菜碱、甘氨酸、肉毒碱、乙偶姻和四氢嘧啶 6 种相似相容物质促进 R15 的低温生长, 而且胆碱、甜菜碱及甘氨酸能提高 GDH 酶的低温稳定性。【结论】甲烷古菌的相似相容物质同时具有低温保护作用, 本研究扩展了对相似相容物质生理功能的认识。

**关键词:**嗜冷甲烷叶菌, 相似相容物质, 低温保护作用

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 10-1050-06

甲烷古菌是目前已知的、唯一产生大量甲烷的生物, 而低温甲烷古菌在低温湿地的甲烷排放中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。但目前获得纯培养的低温甲烷古菌很少, 对它们的冷适应机制也了解甚少。本实验室前期从年平均温度只有 1℃ 的若尔盖湿地分离到一株嗜冷的甲烷古菌新种——嗜冷甲烷叶菌 (*Methanolobus psychrophilus*) R15<sup>[2]</sup>。前期研究已完成菌株 R15 的基因组测序及其 4℃ 和 18℃ 培养物的转录组分析, 发现多数基因显示低温响应的差异表达<sup>[3]</sup>。

相似相容物质 (compatible solute) 指在细胞内可积累到很高浓度却不干扰蛋白功能和其他细胞活

动的有机小分子物质<sup>[4]</sup>。已知相似相容物质可保护细菌抗高渗胁迫。近年在甲烷古菌中也发现相似相容物质, 如甜菜碱、谷氨酰胺等可保护甲烷古菌在高盐中生长<sup>[5]</sup>。微生物可通过渗透压诱导的从头合成、或从环境中摄取相似相容物质<sup>[6]</sup>, 但它们在自然环境中的浓度往往很低 (nmol/L 或  $\mu\text{mol/L}$ ), 因此需要高效的转运系统才能在细胞中积累。最近 Hoffmann 等<sup>[4]</sup>发现一些相似相容物质对枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 具有低温保护功能, 说明这些有机分子的功能不仅限于帮助细胞抗高渗胁迫。为了分析相似相容物质在古菌冷适应中的作用, 本研究分析甲烷古菌 R15 低温生长和冷胁迫处理后的

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30830007, 30621005)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807413; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

**作者简介:** 武岳 (1987–), 男, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为相似相容物质对甲烷菌冷保护作用。E-mail: wuyue3000@sina.com

**收稿日期:** 2013-03-20; **修回日期:** 2013-04-25

相容物质积累,并在生理学和酶活水平分析相似相容物质对 R15 的低温保护作用,及探讨这些相容物质可能的作用原理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂:**甜菜碱(betaine),胆碱(choline chloride),肉毒碱(L-carnitine hydrochloride),二甲基甘氨酸(N,N-Dimethylglycine hydrochloride),肌氨酸(sarcosine),丝氨酸(serine),脯氨酸(L-proline),谷氨酸(glutamate),甲硫氨酸(L-methionine),乙偶姻(acetoin),四氢嘧啶(ectoine),甘氨酸(glycine),谷氨酸脱氢酶(L-Glutamic Dehydrogenase),烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate),还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt)均购于 United States Sigma-Aldrich 公司;BCA 试剂盒购于 Thermal Scientific 公司;色谱纯甲醇,色谱纯乙醇,色谱纯乙腈等购自于德国 Merck 中国公司。

**1.1.2 菌株:***Methanobrevibacter psychrophilus* R15 为本实验室分离和保存。

### 1.2 菌株 R15 的培养

以终浓度 20 mmol/L 的三甲胺为碳源培养 R15,培养基及培养方法参照 Zhang 等<sup>[2]</sup>,根据实验目的在不同温度下培养。

### 1.3 细胞内容物的提取

取培养至对数后期的甲烷菌培养物 40 mL, 5000  $\times$  g 离心 10 min 收集菌体,用 300 mmol/L NaCl 8 mL 洗涤 10 次,转移至 bead-beater 管中,加入 1 mL 70% 的乙醇并适量直径为 0.1 mm 的玻璃珠, 4600 Hz 10 s 3 次。然后 65℃ 水浴 10 min, 13400  $\times$  g 离心 10 min,用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤上清获得细胞内容物提取液<sup>[7]</sup>。

### 1.4 细胞内容物中胆碱和甜菜碱的检测

用 70% 乙醇从细胞中提取内容物,按 1:2 的比例加入乙腈,并以胆碱和甜菜碱标准品为对照。利用高效液相色谱/三重四极杆串联质谱联用仪 Agilent 1260/6460,采用正离子、多反应监测模式(MRM)进行定量分析。色谱柱为 Waters Xbridge HILIC(3.5  $\mu$ m),流动相为乙腈与含 10 mmol/L 醋酸

铵(pH 4.0)的水梯度洗脱,流速为 0.35 mL/min。

### 1.5 甲烷产量的检测

用装备火焰离子化检测器和 C18 柱的 GC-14B 型气相色谱(Shimadzu)检测 R15 产生的甲烷。温度参数设定:柱温 50℃,进样口 80℃,检测器 130℃<sup>[2]</sup>。

### 1.6 谷氨酸脱氢酶活的检测

反应缓冲液为 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、37.5 mmol/L 谷氨酸、1.1 mmol/L NAD 和 0.8 mmol/L ADP。将谷氨酸脱氢酶用双蒸水稀释 1000 倍,于 4℃ 冷藏室静置。取 10  $\mu$ L 纯酶稀释液加入 1.6 mL 反应缓冲液后记录起始与 20 min 后  $OD_{340}$ ,计算酶活<sup>[8-9]</sup>。

### 1.7 细胞蛋白定量

用 1 mL 70% 乙醇溶解 40 mL 培养物的细胞破碎液,取 50  $\mu$ L 加入 950  $\mu$ L 双蒸水混匀作为待测样品。取 50  $\mu$ L 待测样品加入 392  $\mu$ L 试剂盒 buffer A 和 8  $\mu$ L buffer B, 37℃ 水浴中保持 30 min,测量  $OD_{562}$ ,根据蛋白浓度标准曲线计算细胞蛋白浓度。

## 2 结果

### 2.1 低温培养导致 R15 积累更多的甜菜碱,而冷激处理导致甜菜碱和胆碱的积累

为了发现对甲烷古菌具有低温保护作用的物质,我们将 R15 在以三甲胺(终浓度 20 mmol/L)为底物的培养基中分别在 10℃ 和 30℃ 培养。收集对数末期的菌体,提取细胞内容物,分析与冷适应相关的相似相容物质。结果发现,10℃ 培养的细胞中胆碱含量为 23 ng/mg 细胞蛋白,甜菜碱含量为 10.88 ng/mg 细胞蛋白;而 30℃ 培养的细胞中胆碱的含量为 52.92 ng/mg 细胞蛋白,甜菜碱含量为 1.78 ng/mg 细胞蛋白。可见低温下细胞内甜菜碱的积累比中温培养物高约 6 倍,而胆碱含量下降,因此推测甜菜碱与 R15 的冷适应有关。

为了了解冷胁迫诱导的甲烷古菌细胞内积累的物质,我们将在 30℃ 培养的 R15 对数中期和对数末期培养物分别放置于 4℃ 进行冷胁迫处理。结果如表 1 所示,在冷胁迫处理 4 h 到 24 h 的对数中期细胞中,甜菜碱含量上升显著,可达 0 时的 50 倍;冷胁迫处理的对数后期细胞中胆碱含量明显上升(可达 0 时的 9 倍),而甜菜碱一直处于低水平。这说明对

数末期细胞在冷胁迫后主要积累胆碱,而对数中期细胞在冷胁迫后主要积累甜菜碱。因此推测在 R15 中可能存在胆碱与甜菜碱的转化<sup>[10]</sup>。

表 1.4℃冷胁迫处理 R15 细胞中积累的胆碱和甜菜碱 (ng/mg 细胞蛋白)

Cold shock/h	Mid-log phase		Post-log phase	
	Choline	Betaine	Choline	Betaine
0	7. 81	1. 33	12. 35	0. 42
2	11. 27	1. 80	6. 62	0. 25
4	23. 89	6. 50	5. 09	0. 20
12	19. 08	30. 26	57. 31	0. 24
24	8. 52	67. 06	112. 85	0. 41

2.2 促进 R15 低温生长的相似相容物质

根据低温培养及冷胁迫处理导致甲烷古菌 R15 细胞积累甜菜碱和胆碱,本实验我们检测了甜菜碱和胆碱以及其他已知的细菌相似相容物质对 R15 低温生长的促进作用。在培养基中分别添加终浓度为 1 mmol/L 的 8 种物质(表 2),将 R15 分别培养在 4℃ 和 18℃。同时,为了比较所添加的物质对 R15 的抗渗透压作用,我们在上述培养基中添加终浓度为 500 mmol/L 的 NaCl,在 18℃ 培养。通过测定上述培养物的生长速率,发现胆碱、甜菜碱、甘氨酸、乙偶姻、四氢嘧啶和肉毒碱同时具有抗渗透压和冷保护的双重作用,而甲硫氨酸和脯氨酸只具有抗渗透压

作用(表 2)。

为了分析这些物质促进 R15 低温生长的最适浓度,我们在培养基中分别添加了 1 mmol/L, 5 mmol/L 和 10 mmol/L 的胆碱、甜菜碱、甘氨酸、乙偶姻、四氢嘧啶和肉毒碱,然后根据 R15 的 4℃ 生长曲线,计算不同处理的培养物的代时。结果如表 3 所示,甜菜碱和四氢嘧啶随着浓度升高,促进 R15 的低温生长的效果也相应增强;而胆碱和甘氨酸的低温促进效果在 1 mmol/L 最好;乙偶姻与肉毒碱在 5 mmol/L 浓度时促低温生长作用最显著。

表 2. 对 R15 冷胁迫和渗透压胁迫具有保护作用 的相似相容物质

Supplement	Stress protection	
	Osmostress (500 mmol/L NaCl)	Cold stress (4℃)
Glycine	+	+
Betaine	+	+
Choline	+	+
Methione	+	-
Carnitine	+	+
Ectoine	+	+
Acetoin	+	+
Proline	+	-

+ : doubling time was shortened for more than 15% than the blank control; - : doubling time was changed less than 15% compared with the blank control.

表 3. 含不同浓度相似相容物质的 R15 4℃培养物的倍增时间 (d)

Table 3. Doubling times (d) of R15 growing at 4℃ supplemented with various concentrations of the compatible solutes						
c (Supplement)/(mmol/L)	Choline	Betaine	Glycine	Acetoin	Ectoine	Carnitine
0	40. 02	40. 02	40. 02	40. 02	40. 02	40. 02
1	30. 35	39. 48	29. 47	34. 69	39. 50	34. 64
5	32. 75	33. 69	32. 68	28. 51	33. 34	31. 90
10	34. 49	30. 35	31. 97	36. 34	30. 54	34. 86

2.3 外源相似相容物质对 R15 细胞内甜菜碱和胆碱积累的影响

在 R15 的培养基中分别添加 1 mmol/L 丝氨酸、甘氨酸、肌氨酸、二甲基甘氨酸、胆碱和肉毒碱,或 10 mmol/L 甜菜碱,并将其分别在 10℃ 和 30℃ 培养至对数后期收集细胞(*OD*<sub>600</sub> 为 0.6),提取内容物检测胞内胆碱和甜菜碱的含量。结果发现(表 4),外源的胆碱和甜菜碱均显著调高它们在细胞内的积

累,说明这 2 种物质主要是由外部环境转运至胞内。10℃ 下 R15 摄取的甜菜碱似乎比 30℃ 的更多,而摄取胆碱在 30℃ 高于 10℃,进一步说明甜菜碱的低温保护作用。10℃ 培养物中添加甘氨酸、肉毒碱和甜菜碱可提高细胞内胆碱的积累不到 2 倍,添加甘氨酸、二甲基甘氨酸和肉毒碱也只能提高甜菜碱积累的 2 倍左右。这说明低温下 R15 合成相似相容物质甜菜碱和胆碱的活力都较低。

表 4. 不同添加物对胞内胆碱和甜菜碱积累的影响 (ng/mg 细胞蛋白)

Supplement *	Choline		Betaine	
	10℃	30℃	10℃	30℃
—	23. 56	52. 92	10. 88	1. 78
Serine	16. 31	56. 82	2. 97	3. 50
Glycine	42. 23	43. 18	25. 57	2. 17
Sarcosine	20. 04	105. 59	4. 54	18. 55
Dimethylglcine	19. 68	44. 83	25. 66	4. 54
Betaine	35. 21	90. 18	2512. 28	1115. 72
Choline	481. 45	12792. 02	0. 77	2. 39
Carnitine	41. 02	50. 09	18. 27	0. 68

\* The final concentration of each supplement was 1mmol/L, except 10mmol/L for betaine.

2.4 甜菜碱等相似相容物质对酶的低温稳定性作用

为探讨 R15 的相似相容物质可能的冷保护作用

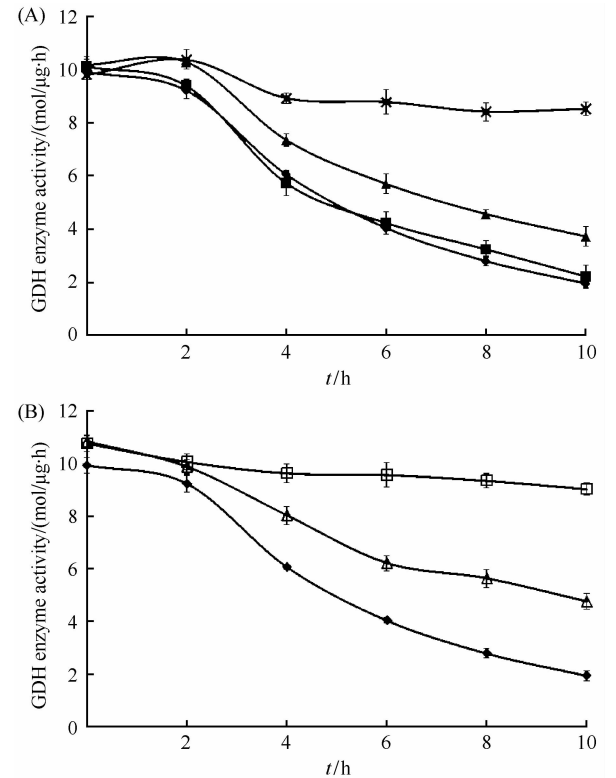


图 1. 甘氨酸甜菜碱,胆碱和甘氨酸对 GDH 酶稳定性促进作用  
Figure 1. Improvement of the cold stabilization of GDH by glycine betaine (A) and choline and glycine (B). The enzymatic solution supplemented with various compounds were incubated at 4℃ for 10 h and then the enzymatic activities were determined at 2 h interval. ■, supplemented with 20 mmol/L glycine betaine; ▲, supplemented with 200 mmol/L glycine betaine; ×, supplemented with 1 mol/L glycine betaine; □, supplemented with 200 mmol/L choline; △, supplemented with 200 mmol/L glycine; ◆, no supplement.

用机制,我们利用研究酶稳定性的模式蛋白谷氨酸脱氢酶 (GDH) 作为对象。将酶蛋白分别与 20 mmol/L、200 mmol/L 和 1 mol/L 的甜菜碱,以及 200 mmol/L 甘氨酸和胆碱在 4℃ 孵育,每 2 h 间隔取样测量酶的活性;通过计算酶活残留量,鉴定 3 种相似相容物质对酶的低温稳定性影响。结果显示(图 1),3 种物质对 GDH 的低温稳定性均有保护作用,而且这种作用与甜菜碱的浓度呈正相关,如与 1 mol/L 甜菜碱在 4℃ 孵育 24 h 后, GDH 仍保留 50% 以上的酶活,而不加甜菜碱的对照在 4℃ 孵育 24 h 后检测不到酶活。另外,200 mmol/L 胆碱对 GDH 稳定性保护作用明显高于同浓度的甜菜碱和甘氨酸。在酶液中添加 200 mmol/L 胆碱并 4℃ 孵育 24 h 后, GDH 仍保留 >70% 的酶活。这表明与甘露糖苷甘油酸的冷保护作用相似<sup>[9]</sup>,相似相容物质可能通过保护蛋白质稳定性而发挥对甲烷古菌的冷保护作用。

3 讨论

相似相容物质最初作为细胞抵抗盐胁迫物质被发现,但随着研究的深入发现它们对细胞对抗冷胁迫也有作用<sup>[10]</sup>。这些相似相容物质可能在嗜冷甲烷古菌 R15 的冷保护过程中作为化学伴侣改善酶的低温环境。本研究中我们发现并非所有抗渗透胁迫的相似相容物质都具有抗低温作用,如甲硫氨酸和脯氨酸。这说明尽管高渗和低温对细胞的胁迫有共同之处,但也有差异。

甲烷古菌 R15 的原位环境是长年处于低温的高原湿地。本工作发现低温培养的 R15 在胞内积累高水平的甜菜碱,尽管外源添加胆碱和甜菜碱均能促进 R15 在 4℃ 下的生长,但高浓度的甜菜碱明显提高低温生长(提高 25%),而胆碱的低温促进作用在高浓度时反而下降,说明甜菜碱更符合相似相容物质的特征,推测合成甜菜碱是嗜冷甲烷古菌 R15 适应低温的策略之一。对对数生长中期的 R15 的冷胁迫实验发现,随着冷胁迫时间的延长,胆碱积累量先上升随后下降,而甜菜碱的含量却不断上升,暗示胆碱可能转化为甜菜碱。这与长期低温培养物中甜菜碱的积累相似。因此冷胁迫实验也支持甜菜碱是嗜冷甲烷古菌 R15 的冷保护物质的推测。

尽管在 R15 的培养物中添加甘氨酸、甜菜碱、

肉毒碱和肌氨酸导致细胞内的胆碱含量上升,添加甘氨酸、肌氨酸、二甲基甘氨酸和肉毒碱则导致细胞内的甜菜碱含量上升,说明上述物质可能是 R15 合成甜菜碱和胆碱的前体物质。但是与外源添加胆碱和甜菜碱后胞内积累的 2 种物质的含量相比,发现 R15 从环境中摄取甜菜碱和胆碱的能力高于胞内的合成能力。我们在前期 R15 低温响应的转录组中发现一个甜菜碱转运蛋白亚基基因在 4℃ 下上调表达 7 倍多<sup>[11]</sup>,也间接说明低温下胞内的甜菜碱可能更多来自环境。

已知甜菜碱在甲烷古菌中可由丝氨酸通过甘氨酸、肌氨酸、二甲基甘氨酸到甜菜碱的途径合成<sup>[12]</sup>。我们也在 R15 的基因组中发现了由丝氨酸合成甜菜碱的途径,但是在低温响应的转录组数据中,这些基因并没有在低温下显著上调表达。而在冷激处理的细胞中胆碱和甜菜碱的积累分别提高了 10 倍和 50 倍,暗示它们在一定条件下可以大量合成。而我们在 R15 基因组中没有找到由胆碱合成甜菜碱的途径。已知海洋中的微生物可将甜菜碱和胆碱转化为三甲胺,后者是甲基营养型甲烷古菌的底物。R15 也属于甲基营养型甲烷古菌,本研究利用三甲胺为底物,结果在冷激处理的细胞中发现大量的甜菜碱和胆碱积累,而在甲醇培养的细胞中没有 2 种物质的积累(未显示结果)。因此推测 R15 可能存在将三甲胺转化为甜菜碱和胆碱的代谢途径。

## 参考文献

- [ 1 ] Ding W, Cai Z. Methane emission from natural wetlands in China. *Pedosphere*, 2007, 17:475-486.
- [ 2 ] Zhang G, Jiang N, Liu X, Dong X. Methanogenesis from methanol at low temperatures by a novel psychrophilic methanogen, "Methanobolus psychrophilus" sp. nov., prevalent in Zoige wetland of the Tibetan plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(19): 6114-6120.
- [ 3 ] Chen Z, Yu H, Li L, Hu S, Dong X. The genome and transcriptome of a newly described psychrophilic archaeon, *Methanobolus psychrophilus* R15, reveal its cold adaptive characteristics. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(6):633-641.
- [ 4 ] Hoffmann T, Bremer E. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(7):1552-1562.
- [ 5 ] Roberts MF, Lai MC, Gunsalus RP. Biosynthetic pathways of the osmolytes N epsilon-acetyl-beta-lysine, beta-glutamine, and betaine in *Methanohalophilus* strain FDF1 suggested by nuclear magnetic resonance analyses. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(20):6688-6693.
- [ 6 ] Kuhlmann AU, Bursy J, Gimpel S, Hoffmann T, Bremer E. Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenticus* is triggered by high salinity and low growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14):4560-4563.
- [ 7 ] Lai MC, Sowers KR, Robertson DE, Roberts MF, Gunsalus RP. Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(17): 5352-5358.
- [ 8 ] Tang H, Li S, Wang G. Measurement of glutamate dehydrogenase activity and its application in marine ecosystem. *Marine Science Bulletin*, 1997, 16(2): 87-92. (in Chinese)  
汤鸿, 李少菁, 王桂忠. 谷氨酸脱氢酶(GDH)活力测定及其在海洋生态系统中的应用. *海洋通报*, 1997, 16(2): 87-92.
- [ 9 ] Ramos A, Raven N, Sharp RJ, Bartolucci S, Rossi M, Cannio R, Lebbink J, Van Der Oost J, De Vos WM, Santos H. Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 4020-4025.
- [ 10 ] Roberts MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline System*, 2005, 1: 5.
- [ 11 ] Lai MC, Hong TY, Gunsalus RP. Glycine betaine transport in the obligate halophilic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17):5020-5024.
- [ 12 ] Lai MC, Wang CC, Chuang MJ, Wu YC, Lee YC. Effects of substrate and potassium on the betaine-synthesizing enzyme glycine sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase from a halophilic methanoarchaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Research in Microbiology*, 2006, 157(10):948-55.

# Cryoprotection of compatible-solutes for *Methanolobus psychrophilus* R15

Yue Wu, Guomin Ai, Xiuzhu Dong\*

State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** *Methanolobus psychrophilus* R15, isolated from the Zogei wetland at Tibetan plateau, is a cold-active methanogenic archaeon growing from 0 to 30°C and optimally at 18°C. R15 grew in the NaCl concentrations ranging from 5 to 800 mmol/L. [ **Objective** ] This study aimed to find compatible solutes that can improve the growth of R15 at cold, and the possible function as cryoprotectant. [ **Methods** ] Using LC-MC we determined the accumulated substances in the R15 cells growing at lower temperatures, as well as in the cold-shocked cells; by supplementing the accumulated substances and the chemicals known as the bacterial compatible solutes in the R15 culture, we detected their functions of assisting the cold-growth of R15; by adding the detected compatible solutes into the glutamate dehydrogenase (GDH), we determined the enzymatic stabilities at lower temperatures. [ **Results** ] Choline and betaine were accumulated both in the 4°C-cultured and 4°C-shocked 30°C culture of R15. It was determined that choline, betaine, glycine, carnitine, acetoin and ectoine all improved the growth of R15 at cold. Choline, betaine and glycine could enhance the stability of GDH at low temperature. [ **Conclusion** ] Some compatible solutes can act as the cryoprotectant for methanogenic archaea, which expands our knowledge of the physiological functions of the compatible solutes.

**Keywords:** methanogenic Archaea, compatible solutes, cryoprotectant function

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30830007, 30621005)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-64807413; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

Received: 20 March 2013/Revised: 25 April 2013

## 《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。