

高活性高耐受甲醛降解菌株的分离鉴定及降解条件研究

徐云, 金晶, 郑重, 钟卫鸿*, 吴石金, 邱乐泉, 陈建孟

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014)

摘要:以甲醛为唯一碳源, 从土壤中分离得到1株甲醛降解菌, 经形态学观察、生理生化特性研究和16S rDNA鉴定, 该菌株属于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。通过单因素试验和正交试验考察培养基及培养条件对菌株降解甲醛的影响, 得出该菌株降解甲醛的最适条件为: 蛋白胨 1.2 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, 微量元素母液 0.1 mL/L, 温度 30℃, pH 值 8。在最适降解条件下, 分别对不同初始浓度甲醛进行降解试验, 结果表明该菌株对甲醛的耐受浓度可达 6 g/L, 54 h 可将其降解 86%, 46 h 可将 5 g/L 甲醛全部降解, 35 h 可全部降解 4 g/L 甲醛。

关键词: 甲醛降解; 恶臭假单胞菌; 菌种鉴定; 降解条件; 正交试验

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)10-2481-06

Isolation, Identification and Conditions of Bacterial Strain Capable to Metabolize High Concentrations of Formaldehyde

XU Yun, JIN Jing, ZHENG Zhong, ZHONG Wei-hong, WU Shi-jin, QIU Le-quan, CHEN Jian-meng

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: One bacterial strain capable to degrade and metabolize formaldehyde as a sole carbon source was isolated from soil. Based on the results of standard morphological identification, physiological and biochemical characters, and 16S rDNA sequence analysis, the strain was identified as *Pseudomonas putida*. After single factor test and orthogonal test, the optimal condition for formaldehyde degradation was determined as the follows: peptone 1.2 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, trace elements solution 0.1 mL/L, temperature 30℃, pH 8. Under the optimal conditions, the strain tolerance of original formaldehyde concentration was up to 6 g/L and 86% of formaldehyde was consumed after 54 h. It completely consumed 5 g/L formaldehyde after 46 h and degraded 100% of 4 g/L formaldehyde after 35 h.

Key words: formaldehyde degradation; *Pseudomonas putida*; strain identification; metabolize conditions; orthogonal test

近年来,由于各种装潢材料、涂料及黏接剂的大量使用,使得室内空气中各种有害物质浓度不断增加。其中,不少物质具有较强的毒性或致癌性,而甲醛就是其中一种。甲醛是一种原生毒素,它易发生加成、氧化、还原、聚合反应,同时有较好的水溶性。甲醛具有致畸和致癌性,在我国有毒化学品优先控制的名单上居第2位。因此找到室内空气中甲醛污染防治对策刻不容缓,对人类健康意义重大。

生物法防治尤其是降解微生物法是人们寻求的重要方法之一。然而,目前国内关于甲醛降解菌的报道很少。黄赛花等^[1]报道筛选获得了1株甲醛降解真菌黄曲霉,它能在144 h内将1.241 g/L甲醛降解至0.004 g/L;吕阳等^[2]使用滴滤塔处理甲醛及三苯,并从中分离出了1株甲醛降解菌假单胞菌(*Pseudomonas putida*),该菌能72 h内将26.2 mg/L甲醛降解至2.5 mg/L。国外关于甲醛降解菌的报道相对较多。Iwahara等^[3]分离了1株*Paecilomyces*,能在20 d之内完全降解20 g/L的甲醛;Yamazaki等^[4]

从海水里分离了1株甲醛耐受细菌,它在3%的氯化钠里能降解甲醛0.4 g/L;Mirdamadi等^[5]报道*P. pseudoalcaligenes* OSS菌株能在24 h内将浓度为3.7 g/L甲醛完全降解,72 h内能降解70%浓度为5.92 g/L的甲醛,*Methylobacterium extorquens* ESS和*Methylobacterium extorquens* PSS能完全降解浓度为2.96 g/L的甲醛;Adroer等^[6]分离的*Pseudomonas putida* A₂菌株能降解浓度为0.25 g/L的甲醛;Eiroa等^[7]报道以甲醇为添加碳源,硝化细菌也可以降解0.03~3.89 g/L的甲醛;而反硝化细菌在甲醛和甲醇并存时也可以降解1.36 g/L的甲醛^[8];Kondo等^[9]从土壤中分离了1株甲醛耐受真菌*Aspergillus nomius* IRI013,在甲醛浓度为4.5 g/L时还能生长并把甲醛完全消耗掉;Mitsui等^[10]分离了1株甲基营

收稿日期:2009-12-07;修订日期:2010-02-08

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA061404)

作者简介:徐云(1984~),女,硕士研究生,主要研究方向为应用微生物学,E-mail:xuyunxufei@163.com

* 通讯联系人,E-mail:whzhong@zjut.edu.cn

养菌 *Methylobacterium* sp. MF1 能够在 200 h 内降解 1.2 g/L 甲醛。迄今国内外报道的甲醛降解菌,其甲醛的耐受浓度和降解活性都还不够高,影响了其实际应用。因而本研究旨在筛选到高耐受高活性的甲醛降解菌,并对其降解条件进行优化,为其应用于室内空气甲醛净化打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种来源

从浙江工业大学废弃试剂处理点土壤分离得到的能够以甲醛为唯一碳源的菌株。

1.1.2 培养基及试剂

基本培养基 (g/L): KH_2PO_4 0.7, K_2HPO_4 0.85, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCl_2 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, 微量元素母液 0.1 mL, pH 7.0, 115℃ 灭菌 30 min。

微量元素母液 (g/L): H_3BO_3 6, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2。

乙酰丙酮溶液^[11]: 50 g 乙酸铵、6 mL 冰乙酸及 0.5 mL 乙酰丙酮试剂溶于 100 mL 水中。此溶液在冰箱内保存至少可稳定 1 个月。

1.2 方 法

1.2.1 甲醛检测方法

甲醛检测方法参照修订后的 GB/T 13197-1991, 吸取适量试样于 25 mL 具塞刻度管中, 用水稀释至标线, 加入 2.5 mL 乙酰丙酮溶液摇匀, 于 60℃ 水浴 15 min, 取出冷却后在波长 414 nm 处, 以水为参比测量吸光度, 减去空白管所测得的吸光度, 然后从校准曲线上查出试样中甲醛的含量。

1.2.2 菌株的筛选及纯化

将少量土壤样品置于 100 mL 无菌生理盐水中, 加玻璃珠振荡 15 min 后静置, 取 15 mL 上清用针筒加滤膜过滤, 然后将滤膜取出置于基本培养基中, 然后加入一定量的 0.1 g/L 甲醛, 180 r/min、30℃ 摇床中培养。

将少量培养液涂布到以甲醛作为唯一碳源的基本培养基平板, 将培养皿于 30℃ 培养箱倒置培养, 观察菌落形态并挑取培养皿上的单菌落进行进一步鉴定。

1.2.3 菌株的鉴定

使用透射电镜观察细菌形态, 用革兰氏染色法将细菌染色并在显微镜下观察菌体颜色, 按标准方

法进行细菌的生理生化指标^[12]测定。

16S rDNA 序列的扩增采用正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCGA-3', 反向引物 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 以细菌的总 DNA 为模板, PCR 反应程序如下: 94℃ 变性 4 min, 94℃ 50 s, 52℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 5 min, 4℃ 保存。PCR 产物的测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

将 16S rDNA 的碱基序列在 NCBI 数据库上进行 BLAST, 选出具有代表性的 9 株细菌的 16S rDNA 全序列, 利用软件 MEGA4.0 构建系统发育树, 进行系统发育分析。

1.2.4 培养条件对菌株降解能力的影响及其正交优化

分别选取无机氮源 KNO_3 、 $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ 、尿素、有机氮源蛋白胨和酵母膏, 测定甲醛降解率。在选择较佳氮源的基础上, 再考察氮源添加量对细菌降解甲醛的影响, 试验以无菌的含 2 g/L 甲醛的培养基作为对照。

考察 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和微量元素母液对细菌降解甲醛的影响; 考察温度对细菌降解甲醛的影响, 因甲醛的挥发性与温度有关^[13], 每个温度都设定一个对照; 考察 pH 对细菌降解甲醛的影响, 试验以无菌的含 3 g/L 甲醛的培养基作为对照。

在单因素试验基础上, 按表 1 的试验因素和水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以获得较优甲醛降解条件。再获得的最优条件下, 进一步提高甲醛浓度, 以考察细菌对高浓度甲醛的降解能力, 甲醛浓度取 4、5 和 6 g/L, 每个甲醛浓度分别设置对照, 每隔一段时间测定培养基及对照组中甲醛浓度, 绘制甲醛降解曲线。

表 1 正交试验因素与水平

水平	A (KH_2PO_4)	B (K_2HPO_4)	C (Peptone)	D ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
	/g·L ⁻¹	/g·L ⁻¹	/g·L ⁻¹	/g·L ⁻¹
1	2	2	0.3	0.05
2	3	3	0.6	0.1
3	4	4	1.2	0.2

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与鉴定

利用添加甲醛为唯一碳源的基本培养基, 从土壤中筛选到了 1 株能够利用甲醛的菌株 xyz-zjut, 经

平板涂布分离得到单菌落,菌落呈圆形,边缘整齐,凸起,颜色为白色,表面光滑.通过透射电镜观察,菌株 xyz-zjut 呈短杆状,端生鞭毛,鞭毛数为 2 根(图 1).细菌革兰氏染色法显示,该菌株为革兰氏阴性菌.对细菌的多项生理生化指标进行测定,其结果如表 2 所示.其结果与恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)生理生化指标基本匹配,初步鉴定其为恶臭假单胞菌.

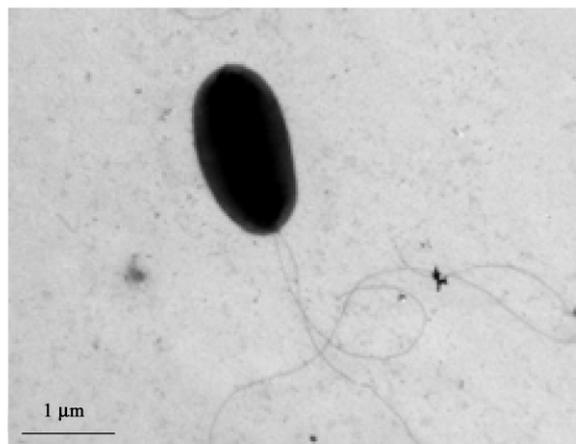


图 1 扫描电镜照片

Fig. 1 Photo of transmission electron microscope

表 2 细菌生理生化指标

Table 2 Physiological and biochemical index of bacterium

生理生化反应	xyz-zjut	<i>Pseudomonas putida</i>
淀粉水解试验	-	-
葡萄糖发酵试验	+	+
木糖	+	+
吡啉试验	-	-
甲基红试验	-	-
伏-普试验	-	-
接触酶试验	+	+
氧化酶试验	+	+
明胶水解试验	-	-
柠檬酸试验	+	+
硫化氢试验	+	-
硝酸盐还原试验	+	+

细菌 16S rDNA 序列测序后在 GenBank 注册,其登录号为 GQ502786.1.通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,结果显示分离的菌株属于假单胞菌属,进一步通过与其它具有代表性的 9 株细菌的 16S rDNA 全序列比对,构建该菌株的系统进化树(图 2),结果表明分离所得甲醛降解菌为与恶臭假单胞菌有 100% 相似度.

2.2 培养条件对菌株降解能力的影响

不同氮源对细菌降解甲醛的影响如图 3.由图 3 可以看出有机氮源相比无机氮源更有利于细菌降解甲醛,原因可能是细菌在有机氮源存在的条件下快速增殖,然后大量的细菌同时降解甲醛,可以显著提高甲醛降解效率.作为有机氮源,加入蛋白胨的甲醛降解效果比酵母膏稍好.不同浓度蛋白胨对细菌降解甲醛的影响如图 4,结果显示细菌降解甲醛的效率随着蛋白胨浓度的升高而升高,但是到了一定浓度以后甲醛降解率提高幅度很小,甚至有所降低,原因可能是细菌优先利用有机氮源,适量的蛋白胨能在短时间内促进细菌大量繁殖而又不影响甲醛的降解,如果有机氮源的量较多,细菌大量利用有机氮源从而影响甲醛的利用,导致甲醛的降解效率得不到显著提高.

无机盐是微生物生命活动所不可缺少的物质.其主要功能是构成菌体成分、作为酶的组成成分、酶的激活剂或抑制剂等.试验考察了培养基中无机盐对细菌降解甲醛的影响,细菌降解甲醛的效率随着 KH_2PO_4 (图 5)和 K_2HPO_4 (图 6)浓度的升高而升高,当达到一定的值以后,甲醛降解率反而会降低. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 也能促进细菌降解甲醛,当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (图 7)浓度达到一定值以后,甲醛的降解效率并不会因为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度的升高而升高,而是保持在一个比较比较稳定的范围,推测可能是因为 Mg^{2+} 是甲醛降解途径中某关键酶的辅因子.试验结果表明 CaCl_2 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 并不能促进细菌降解

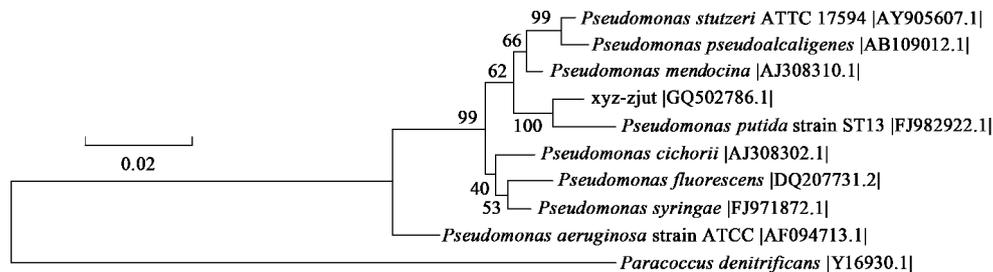
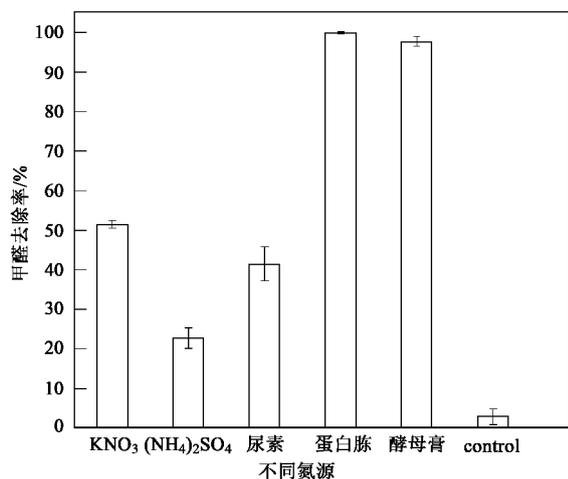


图 2 细菌系统发育进化树

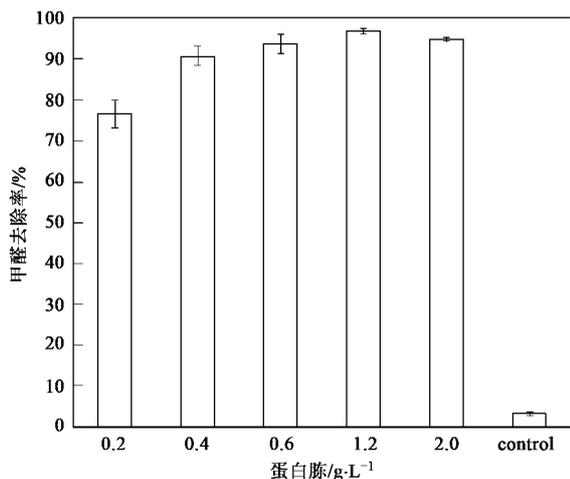
Fig. 2 Phylogenetic tree of bacterium



2 g/L 甲醛, 1.2 g/L 氮源, 降解时间 24 h,
pH 7, 180 r/min, 30℃

图 3 不同氮源对细菌降解甲醛的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen source on formaldehyde degradation



2 g/L 甲醛, 降解时间 24 h, pH 7, 180 r/min, 30℃

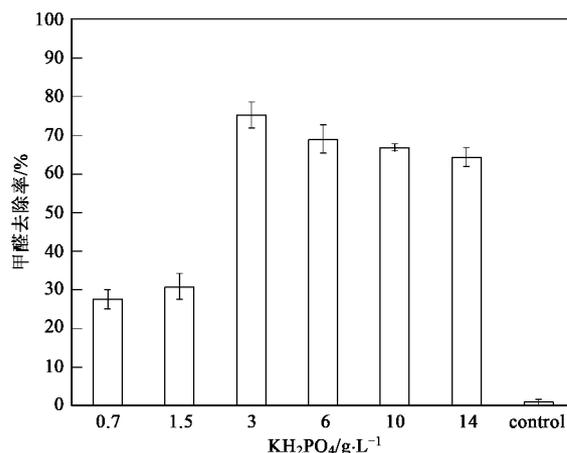
图 4 蛋白胨浓度对细菌降解甲醛的影响

Fig. 4 Effect of peptone concentration on formaldehyde degradation

甲醛,随着这 2 种物质浓度的升高甲醛降解率无明显变化,所以,以下的试验中不再加入这两种物质.微量元素母液中含有多种金属离子,其中某种离子可能是甲醛降解关键酶的辅因子,结果显示(图 8),添加少量的微量元素母液能提高甲醛降解效率,过多的微量元素反而会使甲醛降解率降低,可能是因为重金属离子对细菌的毒害作用所致.

考察不同 pH 值及温度下甲醛的降解效率,其结果如图 9 和图 10 所示,从中可知细菌降解甲醛的最适 pH 值为 8,最适温度为 30℃.

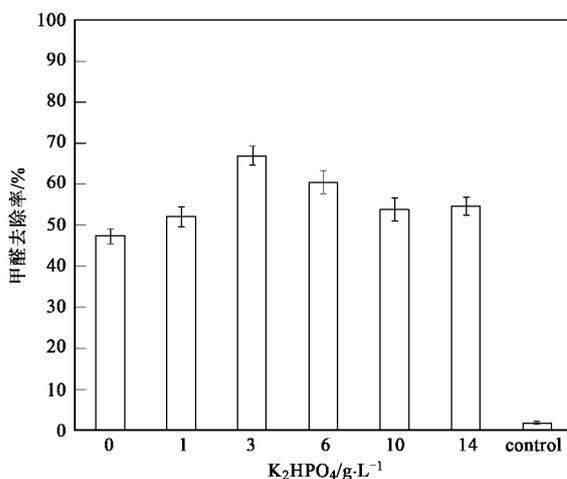
综合以上单因素试验结果,选择 KH₂PO₄、K₂HPO₄、蛋白胨和 MgSO₄·7H₂O 进行 L₉(3⁴) 正交



3 g/L 甲醛, 降解时间 24 h, pH 7, 180 r/min, 30℃

图 5 KH₂PO₄ 对细菌降解甲醛的影响

Fig. 5 Effect of KH₂PO₄ on formaldehyde degradation



3 g/L 甲醛, 降解时间 24 h, pH 7, 180 r/min, 30℃

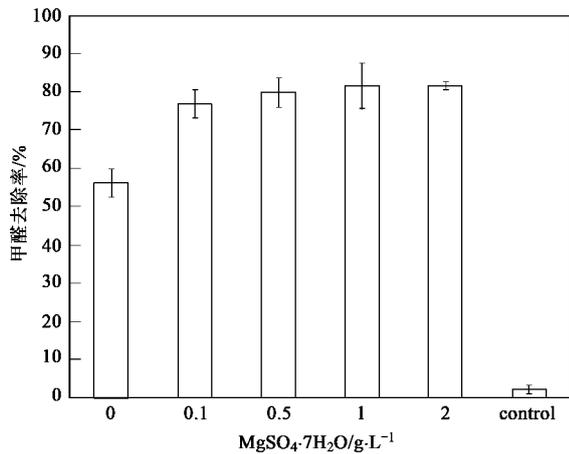
图 6 K₂HPO₄ 对细菌降解甲醛的影响

Fig. 6 Effect of K₂HPO₄ on formaldehyde degradation

试验,以获得较优的甲醛降解条件,其结果如表 3 所示.

由表 3 可知,各因素的主次顺序为 D > A、B > C,最优组合为 A₃B₂C₃D₃,既细菌降解甲醛较优的条件为:KH₂PO₄ 4 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L,蛋白胨 1.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L.

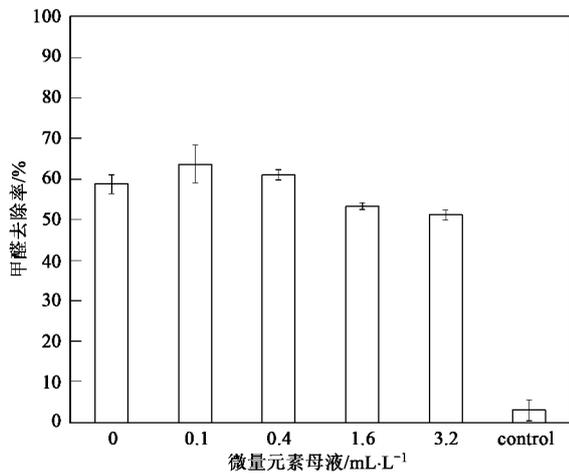
细菌在较高甲醛浓度下的降解过程如图 11,降解条件为 180 r/min, 30℃.由图 11 可知,对照中甲醛挥发很少,细菌对甲醛的耐受浓度可达 6 g/L, 54 h 可将其降解 86%, 46 h 可将 5 g/L 甲醛全部降解, 35 h 可全部降解 4 g/L 甲醛.经过优化后,菌株对甲醛的耐受浓度及降解效率大大提高,与 Iwahara 等^[3]分离 *Paecilomyces* sp. no. 5 相比,其耐受浓度(6



3 g/L 甲醛, 降解时间 24 h, pH 7, 180 r/min, 30℃

图 7 MgSO₄·7H₂O 对细菌降解甲醛的影响

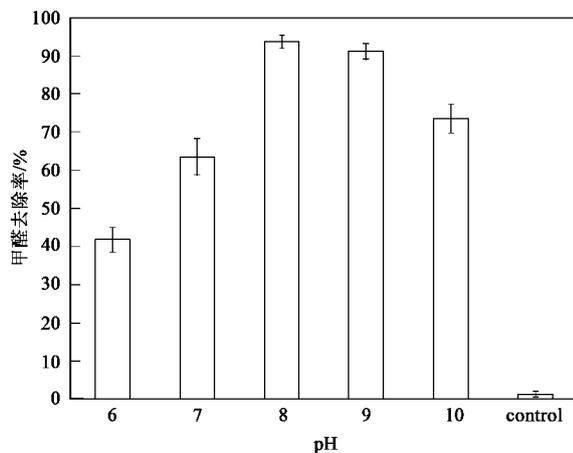
Fig. 7 Effect of MgSO₄·7H₂O on formaldehyde degradation



3 g/L 甲醛, 降解时间 24 h, pH 7, 180 r/min, 30℃

图 8 微量元素母液对细菌降解甲醛的影响

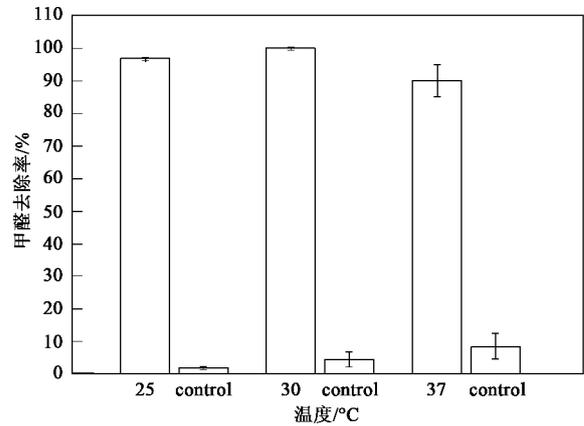
Fig. 8 Effect of trace elements on formaldehyde degradation



3 g/L 甲醛, 降解时间 24 h, 180 r/min, 30℃

图 9 pH 值对细菌降解甲醛的影响图

Fig. 9 Effect of pH on formaldehyde degradation



3 g/L 甲醛, 降解时间 24 h, pH 7, 180 r/min

图 10 温度对细菌降解甲醛的影响

Fig. 10 Effect of temperature on formaldehyde degradation

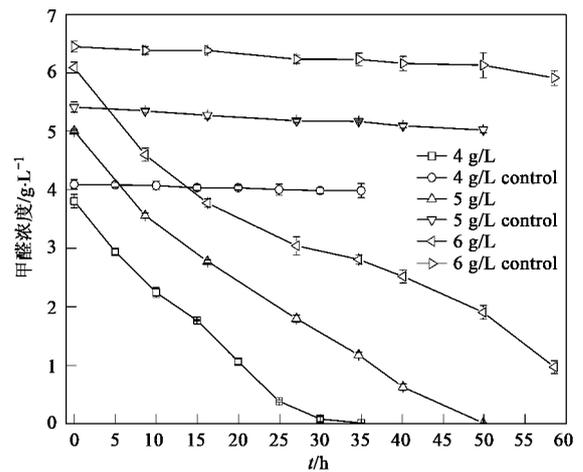


图 11 不同浓度甲醛降解过程

Fig. 11 Time course of formaldehyde degradation

表 3 正交试验结果

Table 3 Result of orthogonal test

试验编号	A	B	C	D	甲醛降解率/%
1	1	1	1	1	60
2	1	2	2	2	69
3	1	3	3	3	82
4	2	1	2	3	76
5	2	2	3	1	65
6	2	3	1	2	67
7	3	1	3	2	69
8	3	2	1	3	83
9	3	3	2	1	68
K1	211	205	210	193	
K2	208	217	213	205	
K3	220	217	217	241	
R	12	12	6	48	

g/L) 比 *Paecilomyces* sp. no. 5 (20 g/L) 低, 但是其降解效率可达 95 mg/(L·h), 比 *Paecilomyces* sp. no. 5

菌株 41.6 mg/(L·h) 的降解率高。

近年来微生物多种甲醛解毒机制和分子生物学研究也有一些报道。比如在甲基营养型细菌中甲醛的同化作用和异化作用^[14]; Ito 等^[15]从恶臭假单胞菌中克隆了甲醛脱氢酶基因, 并成功转化到大肠杆菌中进行高效表达。Mitsui 等^[16]从 *Mycobacterium gastri* MB19 克隆到了一段 4.2 kb 的编码甲醛同化的核酮糖单磷酸途径 (RuMP) 关键酶基因片段 *Pst I*。Chistoserdova 等^[17]分离并鉴定了 *Methylobacterium extorquens* AM1 中 3 个参与 C₁ 化合物同化的丝氨酸循环途径中的关键酶基因 *orf4*、*mtkA* 和 *mtkB*。本研究获得的 xyz-zjut 菌株的甲醛降解机制和分子生物学研究也正在进行中。

3 结论

(1) 筛选获得 1 株对甲醛具有高效降解能力的菌株 xyz-zjut, 经鉴定为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。

(2) 菌株 xyz-zjut 降解甲醛的最优条件为: 蛋白胨 1.2 g/L, KH₂PO₄ 4 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, 微量元素母液 0.1 mL/L, 温度 30℃, pH 值 8。

(3) 在最优降解条件下, 菌株 xyz-zjut 对甲醛的耐受浓度可达 6 g/L, 54 h 可将其降解 86%, 46 h 可将 5 g/L 甲醛全部降解, 35 h 可全部降解 4 g/L 甲醛。本研究获得菌株 xyz-zjut 的甲醛耐受浓度和降解速度比已有文献报道的甲醛降解菌要高。

参考文献:

- [1] 黄赛花, 陈能场. 一株甲醛降解真菌 *Aspergillus* spp. H4 的分离鉴定[J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1175-1179.
- [2] 吕阳, 刘京, 吕炳南, 等. 生物滴滤塔处理甲醛和三苯混合气体的实验研究[J]. 天津大学学报, 2007, 40(10): 1215-1219.
- [3] Iwahara M, Fukuda R, Nakahara K, et al. Isolation and properties of *Paecilomyces* sp. no. 5 capable of degrading high concentrations of formaldehyde [J]. Biocontrol Sci, 2002, 7(2): 107-110.
- [4] Yamazaki T, Tsugawa W, Sode K. Biodegradation of formaldehyde by a formaldehyde-resistant bacterium isolated from seawater [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2001, 91(3): 213-217.
- [5] Mirdamadi S, Rajabi A, Khalilzadeh P, et al. Isolation of bacteria able to metabolize high concentrations of formaldehyde [J]. World J Microb Biot, 2005, 21(6-7): 1299-1301.
- [6] Adroer N, Casas C, Demas C, et al. Mechanism of Formaldehyde Biodegradation by *Pseudomonas-putida* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33(2): 217-220.
- [7] Eiroa M, Kennes C, Veiga M C. Formaldehyde biodegradation and its inhibitory effect on nitrification [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2004, 79(5): 499-504.
- [8] Eiroa M, Vilar A, Kennes C, et al. Formaldehyde biodegradation in the presence of methanol under denitrifying conditions [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2006, 81(3): 312-317.
- [9] Kondo T, Morikawa Y, Hayashi N, et al. Purification and characterization of formate oxidase from a formaldehyde-resistant fungus [J]. Fems Microbiol Lett, 2002, 214(1): 137-142.
- [10] Mitsui R, Omori M, Kitazawa H, et al. Formaldehyde-limited cultivation of a newly isolated methylotrophic bacterium, *Methylobacterium* sp. MF1: Enzymatic analysis related to C-1 metabolism [J]. J Biosci Bioeng, 2005, 99(1): 18-22.
- [11] GB 13197-1991 水质甲醛的测定——乙酰丙酮分光光度法 [S].
- [12] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 116-120.
- [13] 王金权, 罗建中, 温碧燕, 等. 室内甲醛释放规律研究进展 [J]. 环境与可持续发展, 2006, 1: 24-26.
- [14] Yurimoto H, Kato N, Sakai Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism [J]. Chem Rec, 2005, 5(6): 367-375.
- [15] Ito K, Takahashi M, Yoshimoto T, et al. Cloning and high-level expression of the glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida* [J]. J Bacteriol, 1994, 176(9): 2483-2491.
- [16] Mitsui R, Sakai Y, Yasueda H, et al. A novel operon encoding formaldehyde fixation: the ribulose monophosphate pathway in the gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Mycobacterium gastri* MB19 [J]. J Bacteriol, 2000, 182(4): 944-948.
- [17] Chistoserdova L V, Lidstrom M E. Genetics of the Serine Cycle in *Methylobacterium extorquens* AM1: identification, sequence, and mutation of three new genes involved in C₁ assimilation, *orf4*, *mtkA*, and *mtkB* [J]. J Bacteriol, 1994, 176(23): 7398-7404.