

降解多环芳烃的菌株 *Gordonia* sp. He4 的分离鉴定及其在菲污染土壤修复过程中的动态变化

刘磊^{1,2}, 李习武¹, 刘双江¹, 刘志培^{1*}

(1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 从石油污染土壤中分离得到 1 株降解石油烃类污染物的 He4 菌株. 该菌株能够以正十六烷、苯、萘、蒽、菲和芘作为唯一的碳源生长. 经过对其形态特征、生理生化、以及 16S rRNA 基因序列分析, 该菌株初步鉴定为 *Gordonia* sp.. 通过分析其 16S rRNA 基因序列, 设计引物并构建了竞争性模板. 通过竞争性定量 PCR (quantitative competitive-PCR) 分析了该菌株在含有菲的污染土壤中数量的变化. 结果表明, 部分菌株 He4 在土壤中转变为不可培养状态, 采用传统的稀释涂布菌落计数法 (CFU) 无法对其进行定量, 而通过 QC-PCR 能够较准确地测定土壤中微生物的动态变化.

关键词: 多环芳烃; 生物降解; 生物修复; QC-PCR

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)03-0617-06

Isolation and Identification of a PAHs-Degrading Strain *Gordonia* sp. He4 and Its Dynamics During Bioremediation of Phenanthrene Polluted Soil

LIU Lei^{1, 2}, LI Xi-wu¹, LIU Shuang-jiang¹, LIU Zhi-pei¹

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A bacterial strain, He4, capable of degrading *n*-hexadecane and other polycyclic aromatic compounds was isolated from petroleum polluted soil. This strain was identified as *Gordonia* sp. He4 according to its morphology, physiological, biochemical properties and the analysis of its 16S rRNA gene sequence. Based on its 16S rRNA gene sequence, specific primers were designed and a competitor template was amplified by PCR. The dynamics of strain He4 in phenanthrene polluted soil was analyzed by colony forming unit (CFU) method and QC-PCR method. The results showed that partial of He4 become non-culturable and un-detectable by CFU method. But by using QC-PCR, the population density of strain He4 could be measured accurately.

Key words: polycyclic aromatic compounds; biodegradation; bioremediation; quantitative competitive PCR (QC-PCR)

生物修复 (bioremediation) 是利用微生物所具有的广泛的代谢途径对污染物进行处理的一种环境生物技术^[1], 其中投加高效降解菌株是生物修复中最常见最有效的一种方法. 为了更有效地控制生物修复过程, 提高其效率, 需要对加入的活性菌株的数量和降解活性进行实时检测. 然而, 土壤是一个十分复杂的环境体系, 受到其中很多因素, 例如营养成分 (碳、氮、磷源等), 温度, 氧分压, 含水量, pH 值或盐浓度的变化等的影响, 某些微生物细胞以一种不可培养 (viable but non-culturable) 的状态存在. Xu 等^[2]发现, 将实验室获得的纯培养菌株 *Escherichia coli* 或 *Vibrio cholerae* O1 在缺乏营养以及低温的条件下进行培养, 一段时间后通过荧光显微镜观察, 活细胞的总体数量并没有明显下降, 但是当使用通用的培养基进行培养计数时, 其结果却明显偏低, 有些细胞已经无法在培养基内生长. 研究表明, 这种现象在环境中普遍存在. 由于土壤的复杂性以及微生物在环境

中存在不可培养的状态, 采用传统的以培养为基础的方法, 如最大可能数法 (most probable number, MPN) 或稀释涂布菌落计数法 (colony forming unit, CFU) 等, 对加入到环境中进行生物修复的微生物数量的变化进行动态监测, 就有一定困难^[3].

目前, 以环境中 DNA 或 RNA 为基础的定量技术已经开始广泛应用, 其中基于杂交探针进行定量的狭缝杂交 (quantitative slot-blot hybridization) 和荧光原位杂交 (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) 已经成功地运用于确定微生物种群的数量, 但是这些方法需要较高浓度的 rRNA 样品, 要求目标菌株在土

收稿日期: 2006-04-13; 修订日期: 2006-05-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA601150); 中国科学院百人计划项目 (BRJH-200)

作者简介: 刘磊 (1977 ~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物学.

* 通讯联系人, E-mail: liuzhp@sun.im.ac.cn

壤中具有较高的丰度或较快的生长速率^[4],另外由于环境样品中会产生自发荧光,使得荧光原位杂交具有较高的假阳性率^[5],这些不利因素制约了定量核酸杂交技术在土壤微生物种群计数中的应用.同以上技术相比,PCR 技术具有很高的灵敏度,即使某种菌株在土壤中的含量很低,通过 PCR 扩增技术也能够得到检测,定量 PCR 技术应运而生,并且开始用于环境样品中微生物数量的检测^[6-7].其中竞争性定量 PCR 技术(quantitative competitive PCR, QC-PCR)是指在 PCR 反应体系中加入一定已知量的竞争性模板(competitor)作为内标(internal standard),与未知浓度的目标模板(target)一起进行 PCR 扩增,为了达到相近的扩增效率,竞争性模板应当具有与目标模板相同的引物结合位点,且二者的扩增产物大小应相近^[8],通过二者扩增产物的比值反映初始目标模板的浓度^[9],进而可以计算出样品中目标菌株的总数量.通过 MPN 法或 CFU 法的计数结果与 QC-PCR 的计数的比较,可以计算出样品中目标菌株的不可培养细胞的数量.

本研究从石油污染土壤中分离得到 1 株具有多环芳烃化合物(PAHs)降解活性的菌株 He4,分析其降解 PAHs 的特性,并进一步以该菌株为对象,应用 QC-PCR 和 CFU 方法,分别鉴定了土壤中菌株 He4 不可培养和可培养细胞数量的动态变化,为进一步研究菌株 He4 在受多环芳烃污染土壤的生物修复中的应用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 菌株的分离、培养及鉴定

菌株 He4 分离自石油污染的土壤,具体方法如下:将采自华北油田的原油污染土壤置于装有 100 mL 液体无机盐培养基的三角瓶内,其组成为 K_2HPO_4 1.0 g; KH_2PO_4 1.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g; NH_4NO_3 1.0 g; $CaCl_2$ 0.02 g; 痕量的 $FeCl_3$; H_2O 1 000 mL,固体培养基内加入 1.5% 的琼脂.分别加入正十六烷、萘、蒽、菲和芘作为唯一的碳源,在 30℃ 下摇床振荡培养,进行驯化.其中正十六烷和萘的浓度为 200 mg/L,蒽、菲和芘的浓度为 100 mg/L.驯化 2~3 代后,取培养液涂布含有上述污染物的无机盐固体平板,于 30℃ 温箱培养,挑取单菌落进行验证.

按照文献^[10]的方法对菌株进行生理生化鉴定.

提取菌株 He4 的总 DNA,采用 PCR 扩增其 16S rRNA 基因.使用通用引物 27f (5'-GAGAGTTT GATTCCTGGCTCAG-3') 和 1541r (5'-AAGGAGGTG

ATCCAGCC-3'),PCR 反应条件为:95℃,5 min;94℃,1 min;55℃,1 min;72℃,1 min,共 30 个循环,最后一个循环 72℃ 延长至 5 min.扩增产物由上海基康公司测序.

1.2 菌株 He4 降解能力的测定

以正十六烷、苯、萘、蒽、菲和芘等底物为唯一碳源对 He4 进行培养.对于正十六烷、苯和萘 3 种底物,通过测定培养液的 D_{460} 的值衡量菌株对底物的降解能力.通过 HPLC 法测定培养液中残留的蒽、菲和芘,计算其降解速率.具体测定方法为:将待测样品的 pH 值调至 2.0,以等体积的正己烷萃取 2 min,将有机相用孔径为 0.2 μm 的滤膜过滤后进行 HPLC 分析.采用 HP-Extender-C18 柱,流动相为乙腈:水 = 60:40,流速为 1.0 mL/min.蒽、菲和芘的检测波长分别为 254 nm,251 nm 和 240 nm.根据标准曲线分别计算蒽、菲和芘的量.

1.3 菌株 He4 对菲污染土壤生物修复系统的建立

菌株 He4 在含有 100 mg·L⁻¹ 菲的无机盐培养基中培养,收集菌体加入到 70 g 含有菲(500 mg·kg⁻¹)的灭菌土壤中,使其初始浓度达到 1.14×10^8 CFU·g⁻¹.土壤的含水量控制在 40%~60%,30℃ 避光培养.分别在 0,4,8,13,19,28,38 d 取土壤样品 0.5 g,加入 1.0 mL NaCl 溶液(0.9%),涡旋振荡 1.0 min,将混合悬液进行 10 倍梯度稀释,取 100 μL 不同浓度的稀释液涂布含有 100 mg·L⁻¹ 菲的无机盐固体平板,30℃ 培养并对菌落进行计数(CFU).同时另取 0.5 g 土壤样品用于 DNA 提取.

1.4 土壤样品中基因组 DNA 的提取

采用 Laurennet 等的方法^[11],并作适当调整,提取土壤中的基因组 DNA.具体如下:取 0.5 g 土壤,加入 1.0 mL 提取液(100 mmol/L Tris,100 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,1% polyvinylpyrrolidone,2% SDS)和 0.5 g 玻璃珠(直径 460 μm);剧烈振荡 5 min,在 13 000 r/min 下离心 5 min,取出上清液,加入 1/10 体积冰冷的乙酸钠(5 mol/L),冰上放置 10 min 后,在 14 000 r/min 下离心 10 min,取出上清液,加入等体积的异丙醇,沉淀 30 min,13 000 r/min 下离心 10 min,收集沉淀,溶解于 50 μL TE(10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)缓冲液中.DNA 经过稀释后用于 QC-PCR 分析.

1.5 引物设计及竞争性模板的构建

本实验根据菌株 He4 的 16S rRNA 基因序列设计了表 1 中的引物,通过 2 次 PCR 反应构建了长度为 890 bp 的竞争性模板(competitor)用于 QC-PCR.

表 1 本实验所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	特异性
456 F	5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3'	Universal
1482 R	5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT-3'	Universal
HYB-He4 F	5'-GCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGCAGCGTTGTCCGG-3'	Specific to He4
1338 R	5'-CGGTGTGTACAAGCCCC-3'	Universal
298 F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Universal
He4-961 R	5'-GGCTATATCTCTACAGCTTTCTGG-3'	Specific to He4

1.6 标准曲线的建立

将不同浓度的 He4 菌悬液加入到 0.5 g 无菌土壤中,使其终浓度分别达到 5.76×10^6 , 2.88×10^7 , 1.44×10^8 , 7.2×10^8 和 3.6×10^9 CFU·g⁻¹,提取土壤样品中的 DNA,进行 QC-PCR 扩增,其中竞争性模板为 16 fg(16×10^{-12} mg).

1.7 QC-PCR

将土壤中提取的 DNA 以及 16 fg 竞争性模板在同一反应体系内进行 PCR 扩增,25 μL 体系中加入:1 × PCR 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP,0.2 μmol/L 引物 298F-He4 961R,0.5 U *Taq* DNA 聚合酶,目标模板 1 μL 以及竞争性模板 16 fg. PCR 反应条件为:95℃,5 min;94℃,1 min;51℃,1 min;72℃,40 s,共 30 个循环,最后 1 个循环 72℃延长至 5 min.取 5 μL PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖上进行凝胶电泳.

1.8 数据处理

琼脂糖凝胶经 EB 染色后,采用凝胶成像分析软件 Quantity One(Bio-Rad)读取条带亮度,并换算为单位面积的光密度,通过目标模板与竞争性模板产物光密度的比值确定菌株 He4 的数量.数据处理使用 Excel 2000.所有实验均为 3 个重复.

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及其对多环芳烃的降解

通过对石油污染土壤样品进行 3 次富集培养,并通过划线分离得到菌株 He4. 菌株 He4 细胞为革兰氏阳性、杆状,大小约为 0.5 μm × 1.0 μm.接触酶阳性,能够利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等.

扩增菌株 He4 的 16S rRNA 基因,并对序列进行同源性分析,结果表明该菌株与 *Gordonia amicalis* 的亲缘关系最近,16S rRNA 基因相似性为 99%. 结合菌株的形态和生理生化特性,菌株 He4 初步鉴定为 *Gordonia* sp..

该菌株能够以正十六烷、苯、萘、蒽、菲和芘作为

唯一的碳源生长.其中正十六烷的浓度可达到 2 000 mg/L,苯的浓度为 200 μL/L,萘、蒽、菲和芘的浓度为 100 mg/L.

2.2 菌株 He4 竞争性模板的构建

对菌株 He4 的 16S rRNA 基因序列进行分析表明,在 930 ~ 1 010 bp 之间包含了 1 个可变区,通过比对发现其序列具有较强的特异性.根据这段可变区的序列设计引物,通过 2 次 PCR 反应得到了竞争性模板,其构建过程如图 1 所示.

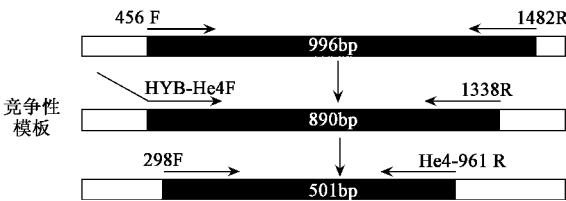


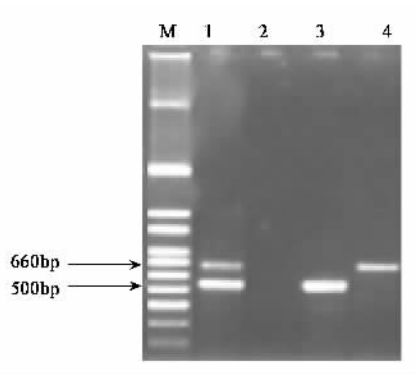
图 1 竞争性模板的构建过程

Fig.1 Diagram of the strategy used to construct the competitive template

以菌株 He4 基因组 DNA 为模板,采用通用引物 456 F 和 1 482 R 扩增得到 996 bp 的片段 A;以片段 A 为模板,用引物 HYB He4F 和 1338R 进行扩增,其中 HYB He4 F 由 2 部分组成:GCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG 对应于 He4 16S rRNA 基因序列的 288 ~ 314 bp,其中包含了与引物 298F 相同的序列(CCTACGGGAGGCAGCAG);另一部分则对应于 480 ~ 495 bp 之间的序列,利用这对引物扩增得到 890 bp 的片段,该片段既为竞争性模板(competitor).当采用引物 298F 和 He4-961 R 对基因组 DNA 模板进行扩增时,得到大小为 666 bp 的片段,而以竞争性模板为模板进行扩增,得到的产物大小为 501 bp,该产物缺失了 315 ~ 479 之间的 165 bp,通过电泳可以将两者区分.

利用 298 F 和特异性引物 He4-961 R 分别对加入和未加入降解菌株 He4 的土壤进行 PCR 扩增.对没有加入 He4 的土壤样品进行扩增没有得到任何产物(图 2),表明所设计的引物在本实验所采用的土

壤体系中具有较强的特异性,这也增加了结果的可信度.



M: Marker; 1: 含有 He4 的土壤 DNA 与竞争性模板;
2: 不含 He4 的土壤 DNA; 3: 竞争性模板; 4: He4 DNA

图 2 不同样品的 QC-PCR 电泳图谱

Fig.2 Agarose electrophoresis of the QC-PCR product of different samples

2.3 QC-PCR 扩增效率

扩增效率是 QC-PCR 中 1 个重要的参数,只有当竞争性模板与目标模板的扩增效率相等或相近时才能正确反映目标模板的真实初始数量.分别以竞争性模板与 He4 的 DNA 为目标模板进行扩增,在反应分别进行到 20, 22, 24, 26, 28, 30 个循环时取样,在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,EB 染色后,通过凝胶成像分析软件 Quantity One(Bio-Rad)读取条带亮度,并换算为单位面积的光密度,与循环数对应做回归曲线,分别得到两者得扩增效率,如图 3 所示.

图 3 的结果表明,目标模板和竞争性模板在 20 ~ 30 循环内产物的量与循环次数呈线性相关,目标模板的相关系数为 $y = 0.6983x - 5.3609$ ($R^2 = 0.9813$),竞争性模板的相关系数为 $y = 0.6272x - 1.2031$ ($R^2 = 0.9856$).根据公式 $\text{Efficiency}[\text{eff}] = 10^{\frac{1}{\alpha} - 1}$ (α 为斜率)^[7] 可以计算出目标模板的扩增效率为 $\text{eff} = 3.9923$,竞争性模板的扩增效率为 $\text{eff} = 3.2384$;在 20 ~ 30 循环内,两者的扩增效率基本一致,其比值保持恒定为 0.8112.当竞争性模板与目标模板的扩增效率相同或接近时,能较真实地反映样品中目标模板的浓度.另外,根据数据处理结果发现,当循环数大于 30 时,扩增产物趋于饱和,产物的浓度与循环数不再成线性关系,因此将循环数确定为 30 个.

2.4 菌株 He4 的细胞数量与 PCR 产物的相关性

将土壤中加入 He4 使其浓度分别为 5.76×10^6 , 2.88×10^7 , 1.44×10^8 , 7.2×10^8 和 3.6×10^9

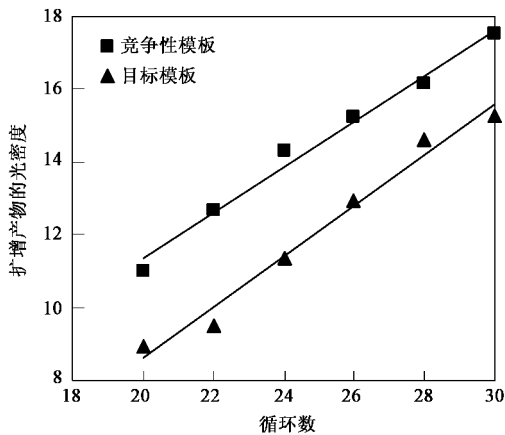


图 3 目标模板和竞争性模板的扩增效率

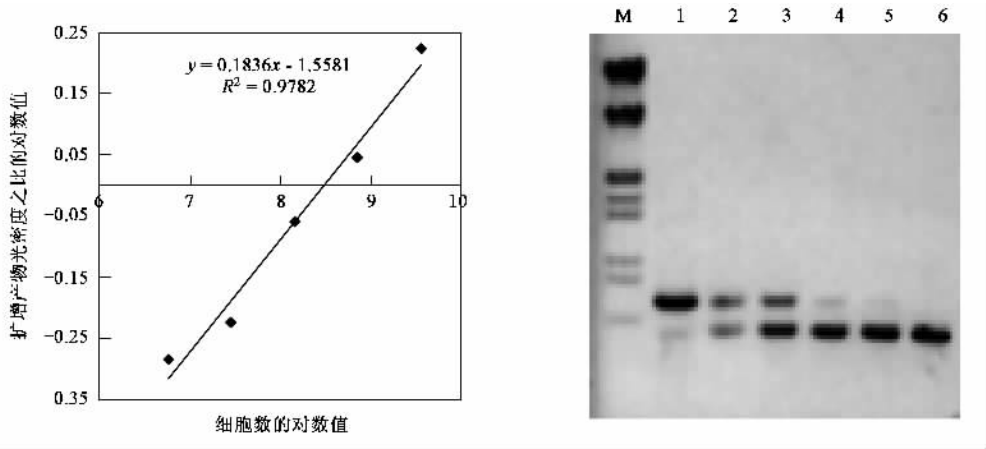
Fig.3 Comparison of amplification efficiency of competitor and target

$\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,提取土壤中的总 DNA 后进行 QC-PCR 扩增,结果表明土壤中 He4 的菌体浓度与 16 fg 竞争性模板之间存在线性相关(图 4),其线性范围是 $5.76 \times 10^6 \sim 3.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,利用这一标准曲线可以直接计算土壤中菌株 He4 的数量,其中包括可培养与不可培养细胞的总量.

2.5 土壤中菌株 He4 可培养与不可培养细胞数量的动态变化

将 He4 接入菲污染的土壤中,其初始浓度为 $1.14 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,并在 30°C 温箱中培养,分别于 0, 4, 8, 13, 19, 28, 38 d 取样,通过稀释涂布法计数 CFU 和 QC-PCR 方法计算 He4 的数量变化(图 5).

图 5 的结果表明,在培养初期(4 d 内),用 2 种方法测定的 He4 菌株细胞数量都呈现增加的趋势,只是增长幅度有所区别;然而随着培养时间的延长,稀释涂布法所得到的 He4 数量开始下降,到 38 d 时只有 $2.3 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,明显低于接入的量;而利用 QC-PCR 法所得到的 He4 数量仍然呈上升趋势,到 38 d 时达到了 $1.2 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,比接入量提高了 10 倍左右,比 CFU 方法的结果高了近 50 倍.该结果说明菌株 He4 可以在土壤中存活和生长,这对于其在污染土壤生物修复中的应用极为有利;但 2 种方法测定的细胞数存在较大的差异,可能是由于在土壤培养过程中,受土壤环境的影响,部分 He4 细胞逐渐变为不可培养的状态,无法通过涂布法测定;而 QC-PCR 提取的是土壤中的总 DNA,因此反映的是土壤中该菌株的细胞总数的变化,其中包括了可培养的和不可培养的细胞,因此得到的结果是细胞的数量呈上升趋势,这也表明菌株 He4 在土壤中能够存活和增殖,随着菌株 He4 在土壤中培养时间的延长,大



He4 的浓度分别为 3.6×10^9 , 7.2×10^8 , 1.44×10^8 , 2.88×10^7 和 5.76×10^6 CFU·g⁻¹
(电泳图中 1~5 泳道,泳道 6 为土壤空白对照),竞争性模板为 16 fg

图 4 不同浓度 He4 细胞与竞争性模板之间的线性关系

Fig.4 Relationship between competitor and the density of He4 cells added to soil

多数菌体细胞变为不可培养状态.

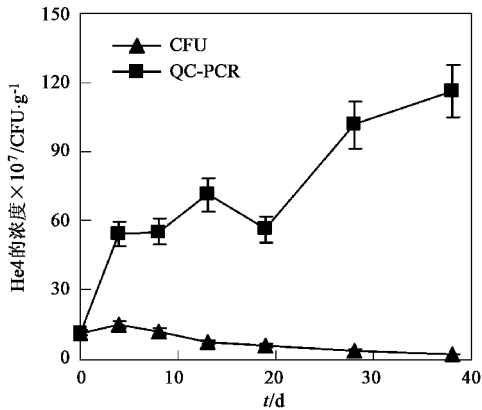


图 5 采用 CFU 法和 QC-PCR 法测定土壤中菌株 He4 数量的变化

Fig.5 Changes in the population density of He4 as measured with CFU and QC-PCR in soil

3 讨论

在石油污染土壤中,能够降解烷烃和结构较为简单的芳香烃(如苯和萘)的微生物数量相对较多,而多环芳烃类化合物随着芳香环数量的增加,如蒽、菲或芘等,其可降解性逐渐降低.另外,多环芳烃类化合物由于水溶性差,且更容易吸附于土壤颗粒,因而不易被微生物利用^[12].因此,筛选具有多环芳烃类污染物降解功能的微生物对于石油污染土壤的生物修复具有重要的应用意义.

本研究从石油污染土壤中分离得到 1 株能够降解多环芳烃的细菌 *Gordonia* sp. He4.通过比较该菌株的 16S rRNA 基因,设计特异性引物以及 PCR 扩

增,建立了QC-PCR的方法,用于检测土壤中不可培养微生物的数量.结果表明,采用传统的以培养为基础的稀释涂布法所得到的土壤中 He4 的 CFU 远远低于通过 QC-PCR 所得到的菌体数量,是由于土壤环境的影响导致部分 He4 菌体细胞进入不可培养状态,使得稀释涂布培养无法测定这部分菌体数量,而 QC-PCR 是通过提取 DNA 进行定量研究,因此更能反映土壤中 He4 的实际数量.

QC-PCR 技术被日益广泛地用于土壤中微生物的定量研究^[13, 14],这种方法也被应用于一些未培养微生物的定量研究^[7].由于 16S rRNA 基因序列具有较强的保守性,通过设计不同的特异性引物,可以选择性地监测某一特定种属的微生物在土壤中的数量动态变化.除了以核糖体 RNA(rRNA)的基因序列设计竞争性模板外,还可以按照其他功能基因的序列为基础设计竞争性模板用以监测具有特定功能的微生物的数量.Qiu 等^[15]以铜离子依赖的硝酸还原酶基因为基础设计了特异性引物以及竞争性模板,对土壤中依赖铜离子的硝化细菌进行了定量研究.在生物修复技术的使用过程中,将具有特定降解功能的高效降解菌株加入污染土壤中对污染物进行降解是比较有效的方法,为了对修复过程进行控制以及提高降解效率,需要对所加入的降解菌株的活性和数量的动态变化进行实时监测,由于微生物在土壤中以多种方式存在,因此传统的平板稀释涂布法(CFU)和 MPN 法都无法反映土壤中降解菌株的实际数量.而 QC-PCR 法则通过对土壤中降解菌株的 DNA 进行定量来计算降解菌株的数量,能够客观地

反映降解菌株的动态变化.因此,该方法能够实时监测土壤中高效降解菌株的动态变化,从而调整生物修复过程中的工艺参数,提高污染物的修复效率.

4 结论

(1) 本研究从石油污染土壤中分离得到 1 株能够降解多环芳烃的细菌 *Gordonia* sp. He4. 根据其 16S rRNA 基因序列,设计引物并构建了竞争性模板,建立了竞争性定量 PCR(QC-PCR)的方法.

(2) 利用 QC-PCR 对土壤中菌株 He4 的数量进行了研究,结果表明该方法能检测到土壤中可培养和不可培养的细胞总数,能够准确地反映土壤中菌株 He4 的动态变化.

参考文献:

- [1] Dua M, Singh A, Sethunathan N, *et al.* Biotechnology and bioremediation: successes and limitations[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **59**: 143 ~ 152.
- [2] Xu H S, Roberts N, Singleton F L, *et al.* Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. Microb. Ecol., 1982, **8**: 313 ~ 323.
- [3] Van Elsas J D, Rosado, A S, Wolters A C, *et al.* Quantitative detection of *Sphingomonas chlorophenolica* in soil via competitive polymerase chain reaction[J]. J. Appl. Microbiol., 1998, **85**: 463 ~ 471.
- [4] Kemp P F, Lee S, LaRoche J. Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59**: 2594 ~ 2601.
- [5] Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms[J]. Cytometry, 1993, **14**: 136 ~ 143.
- [6] Lim E L, Tomita, A V, Thilly W G, *et al.* Combination of competitive quantitative PCR and constant-denaturant capillary electrophoresis for high-resolution detection and enumeration of microbial cells[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, **67**: 3897 ~ 3903.
- [7] Barbieri E, Riccioni G, Pisano A, *et al.* Competitive PCR for Quantitation of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* Phylum bacterium associated with the *Tuber borchii* vittad mycelium[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, **68**: 6421 ~ 6424.
- [8] Raeymaekers L. Basic Principles of Quantitative PCR[J]. Mol. Biotech., 2000, **15**: 115 ~ 122.
- [9] Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, *et al.* Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1990, **87**: 2725 ~ 2729.
- [10] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Volume 2. London: Williams and Wilkins, 1989.
- [11] Laurenet M F, Philippot L, Hallet S, *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, **67**: 2354 ~ 2359.
- [12] Jonathan D, Van Hamme, Singh A, *et al.* Recent advances in petroleum microbiology[J]. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2003, **67**: 503 ~ 549.
- [13] Lee S Y, Bollinger J, Bezdicek D, *et al.* Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**: 3787 ~ 3793.
- [14] Van Elsas J D, Duarte G F, Rosado A S, *et al.* Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment[J]. J. Microbiol. Methods, 1998, **32**: 133 ~ 154.
- [15] Qiu X Y, Hurt R A, Wu L Y, *et al.* Detection and quantification of copper-denitrifying bacteria by quantitative competitive PCR[J]. J. Microbiol. Methods, 2004, **59**: 199 ~ 210.