

北京市模拟给水管网管壁微生物膜群落分析

刘小琳¹, 刘文君^{1*}, 金丽燕¹, 顾军农²

(1. 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084; 2. 北京市自来水集团水质监测中心, 北京 100031)

摘要:以北京市模拟给水管网管壁微生物膜为研究对象, 采用 HPC(异养菌平板计数)和 PCR-SSCP(单链构象多态性)方法, 分析模拟给水管网管壁微生物膜异养菌数目和微生物群落结构。结果表明, 在相同流速条件下, 镀锌钢管的管壁微生物数量约为 PVC 管的 5 倍。在相同材质的镀锌钢管内, 死水区的 HPC 计数量约为 $0.6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, 是流速区的 1/5。计数结果的差异可能与不同材质表面的光滑度及流速造成微生物生长所需的氧气和营养基质不同有关。而不同材质和不同流速区微生物群落的 SSCP 电泳图谱则显示为一样, 均在相同位置出现同样条带。测序结果显示, SSCP 电泳图中的 3 条带与蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, GenBank 登录号为 AB190077)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. yged143, GenBank 登录号为 EF419342) 和 未分类细菌 (*Bacterium* UASWS0134, GenBank 登录号为 DQ190347) 的同源性分别为 100%、99% 和 94%。测序结果的一致性可能与取样点为同一模拟管网, 距离比较接近, 不同微生物容易在其中流动和转移有关。而潜在致病菌蜡状芽孢杆菌和假单胞菌的存在则提示应该更加重视饮用水的微生物安全性。

关键词:模拟给水管网; 微生物膜; 异养菌平板计数; 单链构象多态性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)05-1170-05

Analysis of Microbial Community of a Beijing Simulator Water Distribution System

LIU Xiao-lin¹, LIU Wen-jun¹, JIN Li-yan¹, GU Jun-nong²

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Center of Water Quality Examination of Beijing Waterworks Group, Beijing 100031, China)

Abstract: Identification of compositions of the biofilm in a Beijing simulator water distribution system pipe networks by PCR and single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and analysis of its heterotrophic bacterial by heterotrophic plate count (HPC) were performed. Results showed that when the water velocities were same, the count of heterotrophic bacterial on the zincated steel wall was about five times of the PVC. On the other hand, when the pipe materials were zincated steel, the count of heterotrophic bacterial in the deadwater pipe wall was about 1/5 of the 0.6 m/s region. The difference of the bacterial count maybe related to the smooth of the water pipe surface and the velocity of flow which affected the attachment of the microorganisms and the quantity of O_2 and nourishment, respectively. Same SSCP electrophoresis profiles were observed between samples from different material pipes and water velocities. After sequencing and contrasting with the GenBank, the identity of three bands from the SSCP gel with *Bacillus cereus* (GenBank AB190077), *Pseudomonas* sp. yged143 (GenBank EF419342) and a unclassified bacteria, *Bacterium* UASWS0134 (GenBank DQ190347) were 100%, 99% and 94%, respectively. The sameness of the microbial community structure may be induced by the samples which were from the same simulator system and the sampling regions were near and the microorganisms could transform in these regions easily. The observed potential pathogens of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* sp. should lead to a consideration of the microbiology safety of drinking water.

Key words: simulator water distribution system; biofilm; heterotrophic plate count(HPC); single strand conformation polymorphism(SSCP)

城市供水系统作为城市的重要基础设施之一, 是人们生活和社会经济发展不可缺少的基本物质条件。我国城市供水中管网的二次污染问题是目前给水工程的热点。饮用水的微生物安全性成为饮用水水质安全性的最重要环节之一。饮用水的微生物风险是由饮用水中存在的病原微生物引起的, 一般用细菌学指标来衡量。细菌在给水管网中繁殖, 会导致供水水质恶化, 加速管网腐蚀。因此了解管网系统中微生物群落的种群分布、遗传多样性及其动态特征, 认识细菌群落的稳定性和功能菌的作用对研究解决管网二次污染是非常必要的。

微生物群落结构分析主要有基于微生物纯培养

的传统分析方法和基于分子生物学的现代分析方法。纯化培养的方法主要为富集、分离, 纯化得到单个微生物的菌落, 然后根据相应的程序进行鉴定。这种方法工作繁复, 分析速度慢, 制约因素多。比较而言, 应用分子生物学方法能更客观地反映微生物群落结构的本征。SSCP 技术是 Orita 等^[1, 2]建立的, 它是以微生物基因组信息为基础, 以核糖体小亚基 RNA 基因为靶对象从而实现分析群落动态的目的。同其他分子生物学技术相比, SSCP 技术具有使用设

收稿日期: 2007-05-23; 修订日期: 2007-06-05

基金项目: 北京市科学技术委员会基金项目(0605004040521)

作者简介: 刘小琳(1974~), 女, 博士, 主要研究方向为饮用水处理。

* 通讯联系人, E-mail: wjliu@mail.tsinghua.edu.cn

备简单,只需普通引物,不需后续杂交处理等优点,在根际微生物群落结构分析^[2]、自然环境微生物多样性调查^[3]、有机肥沤制^[4]和反应器崩溃过程中^[5]微生物群落动态学等研究方面,SSCP 技术都表现出较强的应用潜力.近年来,这一技术也越来越多地应用到水体中微生物群落结构的研究中^[6~8].

在细菌总数的测量方法上,目前国内通常采用以牛肉膏蛋白胨为培养基的异养菌平板计数法(heterotrophic plate counts, HPC)来测定饮用水中的活菌数.但由于饮用水中的贫营养环境有别于传统培养基提供的富营养环境,大多数在显微镜下观察到的细菌不能在传统培养基上生长,导致活菌计数结果偏低甚至检测不出.而采用 R2A 培养基则能取得更好的效果^[9].HPC-R2A 测试方法的培养温度更接近实际管网水的温度,而且培养时间更有利于不同生长特性的细菌生长.美国国家环保总局颁布的美国饮用水水质标准中规定的异养菌总数即以 HPC-R2A 为指标,并认为 HPC-R2A 指标是一个比大肠杆菌总数更为严格的控制指标,可以作为考察水处理效率,指示微生物生长的指标.

要准确地分析实际管网系统中的微生物,最直接的方法是从实际管网取样并检测.但是该过程往往不易进行,而且其水质参数无法控制,不利于研究工作的开展.所以构建试验室的管网模拟系统进行研究是一种非常方便、廉价的方法.管网模拟系统是一种简化的、比实际管网管道距离短但可模拟实际管网水力条件的模拟系统.该系统一般有 2 种设计方法,非循环设计和循环设计.非循环设计系统更接近于实际管网条件,试验过程中需要大量的供水和较大的占地面积.本研究拟通过对非循环设计模拟给水管网管壁微生物膜 HPC-R2A 计数结合细菌 16S rDNA 的 PCR-SSCP 序列的比较分析,考察模拟给水管网的微生物群落结构.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PCR 扩增仪为德国 Eppendorf 5332 型.电泳仪为北京六一仪器厂稳压稳流电泳仪 DYY-Ⅲ型,电泳槽为北京六一仪器厂垂直电泳槽 DYY-Ⅲ-28B 型(带有冷水循环装置).丙烯酰胺、硝酸银、碳酸钠、甲醛等均为国产分析纯产品.

1.2 模拟系统及样品采集

本研究课题的非循环设计管网模拟系统设立在北京市第九水厂 1B 车间内,利用 1B 车间活性炭滤

池的滤后水为试验原水.试验原水的水质参数如表 1 所示.模拟管网运行规模为 80 m³·d⁻¹.试验管材为 PVC(型号为 GB/T 10002.1-96, PVC-U 饮用给水管 ϕ 40 mm×1.6 mm,0.6 MPa)和镀锌钢管(型号为 Q/12×J3601-2002 1/2"×6 m; Q/12×J3601-2002 1"×6 m),分别代表 2 种不同试验管材.系统分为 4 层,上 2 层由若干可拆卸的长为 25 cm,直径为 4 cm(DN40)的管段拼接而成;下 2 层则为若干可拆卸的长为 25 cm,直径为 3.2 cm(DN32)的管段拼接而成.不同试验管径可以控制试验管段中的流速:DN40 管段内流速为 0.6 m·s⁻¹,DN32 管段内流速为 1.0 m·s⁻¹.与此同时,系统在不同管径区域均设置了死水区域,模拟实际给水管网中的“死水区”.系统运行 18 个月后,用无菌棉签分别擦取镀锌钢管、PVC 管和死水管内壁的微生物膜,放入无菌容器,置于便携式冰箱内,尽快送实验室处理.

表 1 试验原水水质参数¹⁾

Table 1 Parameters of the water

项目	变动范围	项目	变动范围
温度/℃	3~15	总硬度/mg·L ⁻¹	178~216
pH	7.71~7.99	SO ₄ ²⁻ /mg·L ⁻¹	37~43
Ca ²⁺ 浓度 ²⁾ /mg·L ⁻¹	112~140	Cl ⁻ /mg·L ⁻¹	16~19
Mg ²⁺ 浓度/mg·L ⁻¹	62~78	总碱度/mg·L ⁻¹	140~155

1)该试验原水水质参数为 2005-09~2006-12 期间监测数据;2)Ca²⁺ 浓度、Mg²⁺ 浓度、总硬度、总碱度均折算为 CaCO₃ 浓度表示

1.3 HPC 计数

采用 R2A 平板培养(酵母提取物 0.50 g,胰蛋白胨 0.50 g,酸水解酪素 0.50 g,葡萄糖 0.50 g,可溶淀粉 0.50 g,丙酮酸钠 0.30 g,磷酸氢钾 0.30 g,七水硫酸镁 0.05 g,琼脂 15.00 g,蒸馏水 1 000 mL).在加入琼脂前用结晶的磷酸氢钾或磷酸二氢钾调整最终 pH 值为 7.2.加入琼脂后,加热培养基使其沸腾,琼脂溶解后在 121℃ 高压灭菌 15 min,24℃ 培养 3~5 d 后,计数.

1.4 DNA 提取,引物选择及 PCR 扩增

R2A 液体培养 3~5 d 后,取 3~5 mL 培养物,12 000 r/min 离心 1 min,收集菌体,采用基因组提取试剂盒(上海生工)提取 DNA,操作步骤按厂家说明.

基因扩增引物为:P968(5' AACGCGAAGAACC-TTAC3')和 P1392(5' ACGGGCGGTGTGTAC3')^[10],对应于 *E. coli* 16S rDNA 的 V6~V8 区.反向引物 P1392 的 5'端采用磷酸化标记.由北京赛百胜生物技术有限公司合成并标记.

PCR 采用大连宝生物有限公司的 *Taq* DNA 聚

合酶, 50 μL 反应体系中分别包括 5 μL 10 $\times$ buffer (plus 215 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+}), 4 μL dNTP (各 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 引物各 5 μL (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 模板 5 μL . 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后, 接以 30 个循环, 即 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s; 循环完毕后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 取 5 μL 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 并与 100 bp DNA marker (大连宝生物有限公司) 比较确定分子大小.

1.5 PCR 产物的 λ 核酸外切酶处理

λ 核酸外切酶能够很专一地降解双链 DNA 中 5'磷酸标记的链, 从而使非标记的单链释放出来^[11]. 60 μL 反应体系中包括, λ 核酸外切酶 (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) (New England Biolabs Inc1, USA) 4 μL ; 10 $\times$ buffer 6 μL ; PCR 产物 50 μL . 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 4 h, 处理完毕后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 灭活 λ 核酸外切酶.

1.6 凝胶制备及 SSCP 图谱的获得

SSCP 电泳采用 5% 的聚丙烯酰胺 (交联度 29:1, Sigma, USA), 30 mL 凝胶中加入 10% 的过硫酸铵 (Amresco) 250 μL , Termed (Applied Biosystem, USA) 25 μL , 室温凝固 30 min 后, 8 mA 恒流, 预电泳 60 min. λ 核酸外切酶处理过的样品与等量上样缓冲液 (体积分数 95% 的去离子甲酰胺, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 质量分数为 0.02% 溴酚蓝和 0.02% 二甲苯氰 FF)^[12] 混合后, 直接上样. 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 恒流 8 mA, 7 h. 电泳结束后, 剥胶染色, 银染按 Bassam 等^[13] 的方法进行.

1.7 条带分离及克隆、测序

特异条带的回收按 Tebbe 等^[12] 的方法进行. 取回收的 DNA 10 μL 为模板, 采用同前体系和 PCR 程序分别进行扩增. 取 5 μL 产物进行琼脂糖电泳验证后, 对 PCR 产物切胶纯化 (纯化试剂盒, 上海生工生物公司) 后, 按产品说明书克隆进 T-载体 (pMD-2182T, 大连宝生物有限公司). 对转化子的筛选采用了蓝白斑及 PCR 的方法, PCR 直接以白斑菌落为模板, 采用能与 T-载体插入点两侧特异结合的 M13 通用引物进行检测. 每条带选取 3~4 个克隆, 同样以 M13 通用引物进行测序 (3730, Applied Biosystems). 测序由上海生工公司完成. 通过 Blast 软件, 将测序获得的序列与 GenBank 进行比对.

2 结果与讨论

2.1 HPC 计数

已有研究表明, 给水管网的材质^[14] 和流速^[15] 均

能影响到管壁微生物的附着和生长. 不同材质和流速的模拟给水管网微生物 HPC 计数结果如表 2 所示. 从中可以看出, 在相同流速条件下, 镀锌钢管的管壁微生物数量约为 PVC 管的 5 倍. 这可能与 PVC 管管壁较为光滑, 不利于微生物的附着生长有关. 在相同材质的镀锌钢管内, 死水区的 HPC 计数量约为 $0.6\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, 是流速区的 1/5. 在实际给水管网中, 一般认为死水区由于没有消毒剂氯, 导致水质恶化, 微生物生长. 由于本试验的模拟管网水未投加氯, 可排除消毒剂的影响, 更直接反应流速与管壁微生物生长的关系. 试验得出的死水区微生物数远低于流动区的结果, 可能与死水区缺乏 HPC 计数微生物生长所必须的氧和营养基质, 如可生物降解有机物 (BDOC) 或生物可同化有机碳 (AOC) 有关^[16,17]. 另一方面, 由于本试验计算了异养菌, 而没有把自养菌考虑在内. 要更加客观地反映管壁微生物总量, 在实际工作中应结合这两方面的数据进行分析.

表 2 模拟给水管网管壁微生物 HPC 计数结果

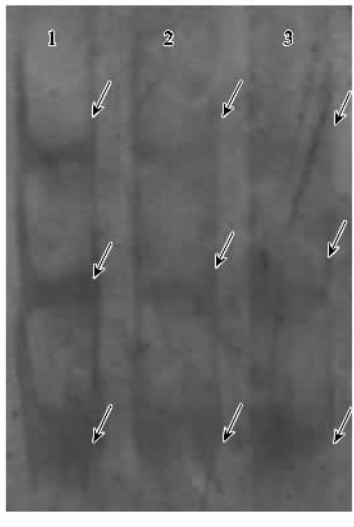
Table 2 HPC results of biofilm on the wall of the simulator water distribution system			
样品号	管网材质	管内水流速度 / $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	微生物 HPC 计数 / $\text{CFU}\cdot\text{cm}^{-2}$
1	PVC	0.6	9.6×10^6
2	镀锌钢管	0 (死水区)	9.2×10^6
3	镀锌钢管	0.6	5.2×10^7

2.2 SSCP 电泳图谱

SSCP 是依据单链 DNA 分子立体构象的不同来实现电泳分离的. 相比于热变性, 用 λ 核酸外切酶 (*lambda* exonuclease) 将 5'磷酸标记的反意义链水解掉, 不仅可以提高 SSCP 的灵敏度, 还可以提高 SSCP 分析长片段 DNA 的能力^[18]. 因为 DNA 样品经热变性处理后, 在 SSCP 图谱上往往显示为 3 条带, 其中 2 条为 DNA 解开的 2 条单链, 另一条为未解开的 DNA 双链. 这种 SSCP 图谱往往条带较多, 且往往出现一个 DNA 片段显示几条带和一条带里包含几个 DNA 片段的现象, 给后续的分析带来巨大的麻烦. 本研究得到的 SSCP 图谱如图 1 所示. 3 个样品均在同一位置出现 3 条带.

SSCP 技术在微生物群落组成结构及动态分析中的应用尚处于起步阶段, 许多方法还需完善统一. SSCP 图谱与群落实际结构符合程度有待提高, 这主要是由基因组 DNA 提取方法和 PCR 选择性放大造成的偏差^[19,20], 到目前为止还没有更好的办法消除. 类似的现象在变性梯度凝胶电泳分析中也出现

过^[21]. 这些问题是以基因指纹技术为基础的群落分析方法的局限性所在.



1、2、3 泳道分别为样品 1、2 和 3;
箭头标示为回收测序条带

图 1 模拟给水管网微生物 SSCP 电泳图谱

Fig.1 SSCP profile of the simulator distribution system loops

2.3 微生物群落及其健康风险分析

将 SSCP 凝胶中条带切胶回收, 与 T-载体连接后转入感受态 *E. coli* DH5 α , 挑阳性克隆, 提取质粒并测序. 将测序结果提交基因组数据库进行 blast 对比, 结果如表 3 所示. 3 个样品(1,2,3 泳道)出现在同一位置的条带均为同一种微生物. 图 1 中 3 条泳道中从上至下的 3 条带分别最可能是蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp. yged143)和 未分类细菌 (*Bacterium* UASWS0134). 蜡状芽孢杆菌为革兰氏阳性菌, 产生芽孢, 需氧或兼性厌氧, 大多数有动力, 无荚膜, 多数溶血, 通常过氧化氢酶阳性, 如果这类细菌在人体内、通常是在肠道内生长, 会导致人的生病, 即感染性食物中毒^[22]. 假单胞菌为革兰氏阴性杆菌, 以极生鞭毛运动, 不形成芽孢, 严格好氧, 呼吸代谢, 从不发酵. 广泛存在于土壤、水、污物及空气中, 大多数种不需要有机生长因子. 化能营养异养菌, 有的种是兼性化能自养, 利用

表 3 模拟给水管网管壁微生物测序结果

Table 3 Sequencing results of biofilm on the wall of the simulator water distribution system

条带位置	最可能的微生物	基因同源性/%	Genbank 登录号
上	<i>Bacillus cereus</i>	100	AB190077
中	<i>Pseudomonas</i> sp. yged143	99	EF419342
下	<i>Bacterium</i> UASWS0134	94	DQ190347

H₂ 或 CO 为能源, 氧化酶阳性或阴性, 接触酶阳性. 广泛分布于自然界. 有的种对人、动物或植物有致病性^[22].

3 结论

- (1) 在相同流速条件下, PVC 管管壁微生物 HPC 计数比镀锌钢管低 5 倍; 在相同材质的镀锌钢管内, 流动区的微生物数目是死水区的 5 倍.
- (2) PCR-SSCP 技术能方便, 快捷地运用于给水管网管壁微生物膜的群落结构分析, 但它还受 DNA 提取方法, PCR 扩增程序及引物选择等一些因素的影响. 因此在实际应用中需要进行实验条件的优化, 以达到较好的分析结果.
- (3) 在北京市模拟给水管网中共发现蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. yged143)和 未分类细菌 (*Bacterium* UASWS0134)等 3 种细菌. 其中蜡状芽孢杆菌和假单胞菌为潜在致病菌.

致谢: 感谢北京市第九水厂在模拟装置安装方面所提供的方便和支持, 感谢黄凯锋和王迪同学在取样时给予的帮助.

参考文献:

[1] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by get electrophoresis as single strand conformation polymorphisms [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 1989, **86** (8): 2766-2770.

[2] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction [J]. Genomics, 1989, **5** (4): 874-879.

[3] Schmalenberger A, Tebbe C C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies [J]. Molecular Ecology, 2003, **12**: 251-262.

[4] Lee D H, Zo Y G, Kim S J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**: 3112-3120.

[5] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, *et al.* Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small subunit rRNA genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**: 930-936.

[6] Brettar I, Labrenz M, Flavier S, *et al.* Identification of a *Thiomicrospira denitrificans*-like epsilonproteobacterium as a catalyst for autotrophic denitrification in the central baltic sea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**: 1364-1372.

- [7] Eichler S, Christen R, Hölzle C, *et al.* Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA-and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 1858-1872.
- [8] Valentin K, Mehl H, Medlin L. Picoplankton culture assessment using single strand conformation polymorphism and partial 18S sequencing [J]. *Journal of Plankton Research*, 2005, **27**(11): 1149-1154.
- [9] 鲁巍, 姜登岭, 张晓健. 配水管网中 AOC 与细菌再生长的关系[J]. *中国给水排水*, 2004, **20**(5): 5-8.
- [10] Zhang T, Fang H P. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm [J]. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 2001, **57**: 437-440.
- [11] Subramanian K, Rutvisuttinunt W, Scott W, *et al.* The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**: 1585-1596.
- [12] Tebbe C C, Schmalenberger A, Peters S, *et al.* Single-strand-conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* [M]. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001. 161-175.
- [13] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, **196**: 80-83.
- [14] Percival S L, Knapp J S, Edyvean R, *et al.*, Biofilm development on 304 and 316 stainless steels in a potable water system[J]. *Inst Wat Environ Manage*, 1997, **11**(4): 289-294.
- [15] Donlan R M, Pipes W O, Yohe T L. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems [J]. *Water Research*, 1994, **28**: 1497-1503.
- [16] Bios F Y, Fahmy T. Dynamic modeling of bacteria in a pilot drinking water distribution system [J]. *Water Research*, 1997, **31**(12): 3164-3156.
- [17] Volk C, Bell K, Lbrahim E, *et al.* Impact of enhanced and optimized coagulation on removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water [J]. *Water Research*, 2000, **34**(12): 3247-3257.
- [18] Schwieger F, Tebbe C C. A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 4870-4876.
- [19] Stach J E M, Bathe S, Clapp J P, *et al.* PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **36**: 139-151.
- [20] Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe C C. Effect of primers hybridizing to evolutionarily conserved regions or the small subunits rRNA gene in PCR2based microbial community analysis and genetic profiling [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 3557-3563.
- [21] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, *et al.* A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, **23**(15): 1205-1208.
- [22] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* [M]. (9th ed). Baltimore: Willism Wilkins Co. 2000. 93-94, 559.