

PCR-SSCP 技术用于脱臭微生物群落结构的研究

米文秀, 谢冰*, 徐亚同

(华东师范大学环境科学系上海市城市化和生态重建重点实验室天童森林生态系统国家野外站, 上海 200062)

摘要:采用 PCR-SSCP(单链构象多态性)技术对脱臭生物滤池中填料生物膜微生物群落结构进行了研究. 生物滤池对臭气中的污染物随驯化时间逐渐增强, 去除率从 50% 升高到 89%. 对 2 种填料树皮和秸秆上生物膜的分析结果表明, 滤池内微生物多样性随运行时间先降后升, 从 1.6~1.9 上升到 2 以上; 而 2 种填料上微生物的相似性逐渐增加, 表明随着驯化进程, 生物填料上的微生物能够利用臭气污染物进行生长, 并随运行时间逐渐趋于丰富和稳定; 树皮比秸秆具有较高的生物多样性, 平均值分别为 2.2 和 2.0, 说明树皮上容易附着多种微生物生长, 电镜照片也显示 2 种填料生物膜的增长和生物多样性的提高. SSCP 条带测序结果表明生物滤池生物膜优势微生物种属为芽孢杆菌属, 占 33.3%; 条带中不可培养细菌占 44.4%; 填料生物膜上的细菌绝大多数是广泛存在于土壤、水体及生物体中的微生物, 它们对环境适应能力强, 在臭气的污染物去除中扮演重要角色.

关键词: PCR-SSCP; 生物除臭; 生物膜; 微生物群落结构; Shannon-Wiener 多样性指数

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)07-1992-06

Analysis of Microbial Community in a Deodorization Biofilter by PCR-SSCP Method

MI Wen-xiu, XIE Bing, XU Ya-tong

(Tiantong National Station of Forest Ecosystem, Key Laboratory of Urbanization and Ecological Restoration of Shanghai, Department of Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Microbial community of biofilm in a biofiltration was investigated using PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) technique in this paper. The results indicated the removal rate of odor pollutants improved with the acclimation, from 50% to 89%, and the microbial diversity of biofilter decreased at the first month and then increased (diversity index H from 1.6-1.9 to 2.0) while the similarity gradually increased during the operation time. Higher microbial diversity ($H = 2.2$) in cortex indicated the microorganisms were easily attached to the media compared to the straw ($H = 2.0$). Dominant bacteria were *Bacillus* found in the biofilm using SSCP method, and the rate is 33.3%. 44.4% of the total bands represented the uncultured bacteria. These bacteria are widely existed in soil, water and nature environment, they have good acclimatization to environment and played important role in treating odors. The biofilm development was identified by the scanning electron microscopy (SEM), which suggested that the microbial community in biofilter could grow by utilizing pollutants and become rich and stable with running time.

Key words: PCR-SSCP; biodeodorization; biofilm; microbial community; Shannon-Wiener diversity index

PCR-SSCP (single stand conformational polymorphism, SSCP, 单链构象多态性)作为一种指纹分析技术,用于临床鉴定基因突变,具有检测灵敏性高、可重复、快速和操作简便等特点^[1,2],近年来被应用于多种环境的微生物群落动态分析中,无论是自然环境中的微生物还是人工系统的功能微生物^[3~5],都有 SSCP 研究微生物群落的报道.在污染控制领域,采用改进的 SSCP 技术,分析微生物群落结构如厌氧反应器群落动力学、完全混合式硫酸盐还原反应器中微生物的群落结构以及硫酸盐还原菌与产酸菌的种间关系,技术的重复性和可靠性较高,该技术被越来越广泛地使用^[6,7].

石化废水产生的恶臭气中含有较高浓度的挥发性有机物类、硫化物、氨等物质,易对人产生“三致”

作用,具有较大毒性,需要妥善处理.采用生物法脱臭是目前普遍采用的臭气处理方法,生物脱臭中生物滤池是主要技术之一^[8,9].生物滤池中的微生物是生物脱臭的主体,在运行过程中,滤池中优势微生物菌群以及微生物群落结构的演化,会对系统的脱臭功能产生影响,因此了解这些变化非常重要,然而这方面的研究报道鲜见^[10].本研究将采用改进的 PCR-SSCP 方法并结合电镜观察,对脱臭的微生物群落结构的动态变化进行分析,以期装置的正常运行提供参考.

收稿日期: 2007-07-12; 修订日期: 2007-08-28

基金项目: 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室开放基金项目(51X1408A)

作者简介: 米文秀(1981~),女,硕士,主要研究方向为环境微生物学.

* 通讯联系人, E-mail: bxie@des.ecnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 样品的选取与预处理

石化废水臭气采用生物滤池装置处理,臭气中的主要成分经测定有硫化氢、氨气、挥发性有机物及苯系物等。样品取自脱臭生物滤池中的填料:植物秸秆和树皮。这些填料在装入脱臭生物滤池前经过了在活性污泥的曝气池中的浸泡。采样时间分别为脱臭生物滤池开始运行后 1、4、8 和 12 周,共计 4 次,每次采秸秆和树皮样品若干(分别标记 g 和 p),放入冷藏罐运回实验室分析。4 次的样品依次标记为: g1 和 p1、g2 和 p2、g3 和 p3 以及 g4 和 p4。

1.2 样品中 DNA 的提取和纯化

1.2.1 样品 DNA 的提取

采用机械-酶-化学法提取样品的 DNA。取冷藏的样品,用刀片将填料表面生物膜刮下,剪碎,取 2 g 于 5 mL 离心管中,加入 2~3 mL 的 TENS 裂解缓冲液,冰浴冷却下超声波作用 1 min, 10 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,重复 1 次。

沉淀中加入 2~3 mL 的 TE 缓冲液,用吸管反复吹打使之垂悬。加入 50 μ L 10% 的 SDS 和 20 μ L 20 mg/mL 的蛋白酶 K,混匀,置于 37℃ 恒温摇床上,以 170 r/min 摇 1 h。详细的提取方法见文献[5]。溶解后的 DNA 溶液保存在 -20℃。

1.2.2 样品 DNA 的纯化

由于样品中含有腐殖酸等杂质,这些物质会对 PCR 扩增反应产生抑制,使得 PCR 反应得不到任何产物,因此,在 PCR 反应之前,必须对样品的基因组 DNA 粗提液进行纯化。本研究中采用电洗脱法[11]对粗提得 DNA 进行纯化。

1.2.3 DNA 的检测

取模板 5 μ L 加 1 μ L 的溴酚蓝,混匀,用琼脂糖凝胶电泳(1%)进行电泳检测,恒压 80 V 1 h,EB 染色 15 min,在紫外凝胶成像系统 Smartview 软件下成像(Shanghai FuRi Co.),与 DNA Marker 对比亮度粗略测 DNA 的浓度。

总 DNA 浓度、纯度和产量的测定。计算公式为 DNA 浓度 $c(\mu\text{mol/mL}) = A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50$ 。用紫外分光光度仪测量样品在 260 nm 的吸光值,然后根据公式计算 DNA 的浓度。

1.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增

1.3.1 引物的选择

PCR 扩增采用引物 SRV3-1、SRV3-2^[12],反向引物 SRV3-2 的 5'端采用磷酸标记,分别对应于 *E. coli*

16S rRNA 基因的 330~348 bp 和 533~515 bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成并标记。引物 SRV3-1 序列 5'-3' 为: CGG (C/T) CCAGACTCCTACGGG,引物 SRV3-2 序列 5'-3' 为: TTACCGCGGCTGCTGGCA。扩增片段长度为 200 bp。

1.3.2 PCR 扩增体系

PCR 反应体系为:总反应体积为 50 μ L,其中包括 10 $\times$ Buffer(Mg^{2+}) 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合液 1 μ L, 20 pmol/L 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L (约 50 ng), *Taq* 酶 0.5 μ L, 加双蒸水 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s; 50℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 40 s, 共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 扩增产物 5 μ L 加 1 μ L 的溴酚蓝,混匀,用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。恒压 80 V 1 h, EB 染色 15 min,在紫外凝胶成像系统 Smartview 下成像,保存图谱。

1.4 反意义链的去除与 PCR 产物的 λ 核酸外切酶处理

为降低图谱的复杂性,提高条带与种群的对应关系,实验采用 λ 核酸外切酶将群落 PCR 产物磷酸标记的反意义链降解^[13]。60 μ L 反应体系包括: λ 核酸外切酶(5 U/ μ L) 6 μ L; 10 $\times$ buffer 6 μ L; PCR 产物 30 μ L。37℃ 温浴 4 h,处理完毕后,72℃ 10 min 灭活 λ 核酸外切酶。

1.5 凝胶制备及 SSCP 图谱的获得

采用 10% 的聚丙烯酰胺(交联度 49:1),并添加 5% 的尿素,以增加 SSCP 的灵敏度及分离长片段的能力^[14]。40 mL 凝胶中加入 1% 的过硫酸铵(APS) 4.50 mL, TEMED 40 μ L,室温凝固 30 min 后,150 V 预电泳 30 min。取混合菌酶解产物 10 μ L 与 10 μ L 上样缓冲液(体积分数 95% 的去离子甲酰胺,10 mmol/L NaOH, 20 mmol/L EDTA,质量浓度 0.02% 溴酚蓝和 0.02% 二甲苯氰 FF)混合后,95℃ 变性 10 min,迅速插入冰中,5 min 后上样。4℃ 恒温,150 V 恒压,电泳 12 h。采用相同的上样量及电泳条件重复实验样品,以得到稳定的条带。电泳完成后采用银染的方法显带。

1.6 多样性和相似性计算

所得图像通过 Smartview 软件分析,将 SSCP 图谱转变为波峰图,每个波峰代表 1 个条带,即 1 个种,峰下面积代表该条带的亮度,即相对数量,用 Shannon-Wiener 多样性指数来表示^[15]:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

式中, H 为 Shannon-Wiener 多样性指标值; p_i 为第 i 个物种所占的百分比, 即是第 i 种的个体数与个体总数的比例; S 为样品中含有多少种不同的物种的数量, 即该样品总 SSCP 条带数.

相似性用索伦森配对相似性系数 (Sorenson Pairwise Similarity Coefficient) 来计算.

$$C_s = 2j / (a + b) \times 100$$

式中, C_s 为索伦森配对相似性系数; a 为某一样品的 PCR-SSCP 图谱的条带数目; b 为另一样品的 PCR-SSCP 图谱的条带数目; j 为 2 个泳道所共有条带的数目.

完全不同的 2 个图谱其 Sorenson 指数为 0, 而完全相同的 2 个 DNA 图谱的 Sorenson 指数是 100%.

运用 MSVP 软件对 SSCP 指纹图谱的相似性数据进行计算并作图.

1.7 特异条带的测序方法

将银染的凝胶浸泡于 ddH₂O 中, 用灭菌的刀片将编号为 1~9 号的条带切下分别放入 0.2 mL 的 PCR 薄壁管中, 用移液器的吸嘴头与管壁挤压将条带研碎. 反复冻融 (−20℃ 冷冻, 45℃ 溶化) 3 次后, 稍离心. 取上清液为模板 6 μL (约 10~20 ng), 以 SRV3-1 和 SRV3-2 为引物, 采用同前体系和 PCR 程序进行扩增. 所得 PCR 产物再进行 SSCP 分析验证确定为单一条带后, 交由上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序. 测序结果提交 NCBI 数据库, 得到各条带序列号.

1.8 生物填料表面微生物电镜观察

每次采样后, 用镊子取树皮、秸秆的表皮 (1×1) cm² 大小, 放入 3% 戊二醛中, 4℃ 保存, 样品经过 25 nm 厚镀金钼混合物处理后在 JSM-5610LV 扫描电子显微镜 (日本电子公司) 观察并拍照.

2 结果与讨论

2.1 脱臭生物滤池对臭气的去除效果

将不同时段进出生物滤池的各臭气浓度作图, 得到生物滤池对臭气的去除效果图, 见图 1.

进入生物滤池的臭气平均进气浓度为 58.8, 最高可达 118.85, 平均出气浓度为 14.7, 平均去除率为 71.9%, 最高去除率可达 89.0%. 从图 1 中可见, 随着生物滤池的运行, 滤池对臭气中污染物的去除率逐渐提高, 开始为 50%, 8 周后去除率达到稳定, 维持在 80% 以上, 表明生物滤池内微生物在经过驯化培养后对臭气污染物开始适应, 其降解作用逐渐增强. 运行 16 周后, 去除率有下降的趋势, 这可能与

进入冬季, 气温下降有关.

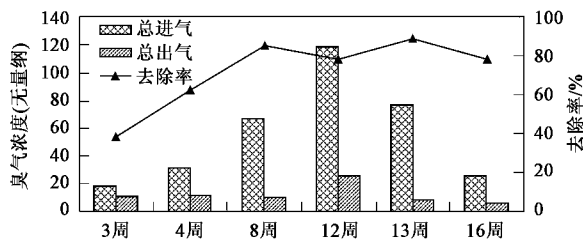


图 1 进出气体浓度及去除率随时间变化

Fig.1 Odor concentration of inlet and outlet and its removal rate with running time

2.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

生物填料上生物膜样品提取 DNA 后经过琼脂糖凝胶电泳检测. 利用酶-化学-机械法可以获得明亮的、长度超过 21 kb 的基因组 DNA. 粗 DNA 经电洗脱方法纯化后, 碎片消失, 保留完整的基因组 DNA (图略), 但是有的样品纯化后浓度降低, 虽然有的在琼脂糖电泳表现微弱, 但结果并不影响后续的 PCR 反应.

采用 SRV3-1 和 SRV3-2 引物及相应实验条件对编号为 g1~g4 及 p1~p4 样品的纯化 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增片段长度约 200 bp, 扩增结果较好.

2.3 生物滤池填料微生物群落结构 PCR-SSCP 分析

对上述 PCR 扩增后的产物进行 SSCP 电泳分离, 得到图 2. 从中可见, 每个样品经过 SSCP 都分离出数目不等的电泳条带, 每个样品的条带数各不相同, 平均有 10 余条. 如果每条带可近似代表 1 个种, 1 个泳道中条带越多, 说明其中的微生物种类越多, 条带的亮度代表该种的相对数量, 亮度越高表明该种的数量越大. 图 2 中不同样品相同的条带较多, 如 5、7、8 和 9 号, 相同的条带中, 有的条带在不同泳道中着色深度差异较大, 如 9 号. 同时部分条带并不在所有泳道中存在, 具有多态性, 如标注的 1~4 号. 通过软件对电泳图谱进行分析可以进一步了解各个样品中微生物的多样性和不同样品中微生物的相似性.

按照 1.6 的方法对图 2 中的条带进行了微生物多样性指数的计算, 得到不同时期样品的微生物群落 Shannon-Wiener 多样性, 见图 3.

从图 3 中可见, 不同填料及不同时期的填料上微生物多样性指数在 1.5~2.5 之间变化. 随运行时间, 微生物的多样性呈现从高到低, 由低逐渐升高的变化. 这是由于刚开始运行时, 填料在活性污泥池曝气池中经过了浸泡, 其上面吸附了大量的活性污泥

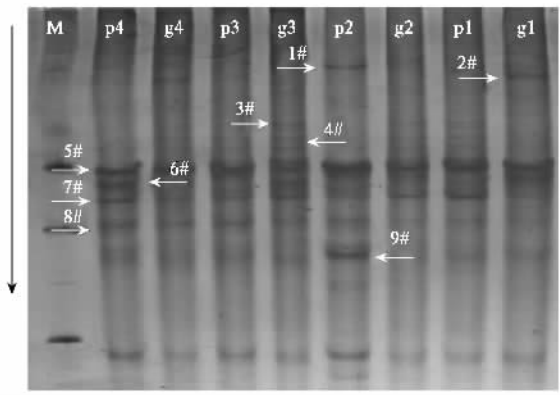


图 2 生物滤池填料微生物群落 PCR 产物 SSCP 分析结果
Fig.2 Results of PCR-SSCP of microbial community in biofilter samples

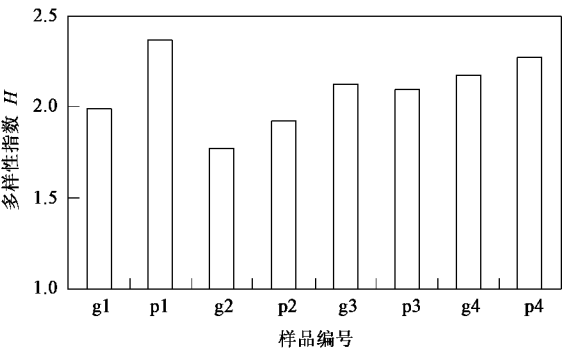


图 3 不同生物填料微生物的 Shannon-Wiener 多样性指数变化
Fig.3 Shannon-Wiener diversity index of different biofilter microbes

微生物,这些微生物在脱臭生物滤池中不会很快消失,故测得运行 1 周后的样品(g1、p1)Shannon-Wiener 多样性值较高,数值在 2 和 2 以上;然而第 2 次样品(第 4 周)g2 和 p2 的微生物多样性下降, H 在 1.6 ~ 1.9 之间,说明随着脱臭生物滤池的运行和驯化过程,不适应的微生物逐渐死亡淘汰,经过驯化后的微生物类群生存下来,相比较开始的活性污泥微生物群落,其在种类和数量上肯定减少,多样性下降;之后,随着运行时间的延长,适应滤池内底物和环境的微生物逐渐生长和壮大,这些微生物以臭气中的污染物为底物生长,滤池内微生物生物量和多样性逐渐升高,8 周后多样性 H 超过 2,12 周后 g4 和 p4 的多样性指数 H 分别达到 2.2 和 2.3. 对比图 1 发现微生物多样性的变化和臭气污染物去除率的变化较好地吻合,即多样性升高稳定后,去除率也较稳定. 在大多数情况下,树皮(标记为 p)微生物的多样性高于秸秆(标记为 g), H 平均值分别为 2.2 和 2.0. 这主要是由于树皮表面粗糙,凹凸不平,相对于秸秆更容易吸附和附着微生物生长的缘故.

对图 2 中的条带经过 Smartview 软件分析后,采用 MVSP 软件及相似性系数计算公式进行了样品间相似性关系的计算,得到不同填料生物膜微生物的相似性 UPGMA 图 4.

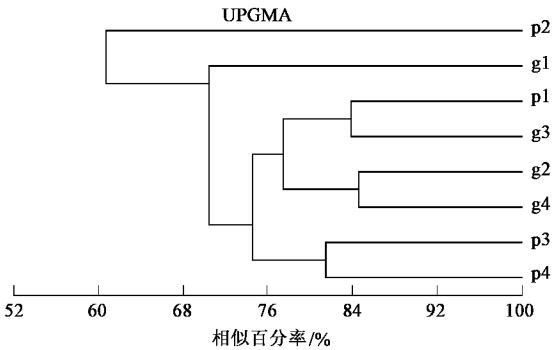


图 4 不同填料之间微生物群落相似性 UPGMA 图
Fig.4 UPGMA Sorensen similarity of different biofilter samples

从图 4 中显示的相似性数据可见,不同取样时间及不同填料之间微生物相似性各不相同,最高为 g2 和 g4,其相似性可达 85%,最低为 60%,为 p1 和 p2. 秸秆上生物膜微生物的相似性在 70% ~ 85% 之间,平均值比树皮的 60% ~ 81% 要高,说明秸秆生物膜的微生物变化较树皮上的小,这可能是由于树皮更加有利于不同新生微生物的生长,更新较快,该结果和微生物多样性的表现相一致. 此外, p3、p4、g3 和 g4 之间的相似性大于 p1、p2、g1 和 g2 之间的相似性,表明填料之间微生物的相似性随装置运行时间的延长而呈增高趋势,说明微生物经过驯化,吸附在填料上的微生物群落结构逐渐趋于相似和稳定,微生物多样性变化趋势的结果也说明了这点.

脱臭装置运行前后,填料生物膜上微生物生长情况,通过电镜分析发现,无论是秸秆还是树皮,经过 12 周运行后,相比较接种 1 周的载体表面,各种形态的微生物及数量有了明显提高(图 5 和图 6),各种微生物大量生长使得生物膜明显增厚,生物膜上微生物多样性的提高和系统的功能增强趋势一致.

2.4 PCR-SSCP 条带的割胶测序结果

对图 2 中得到的 SSCP 胶中出现频率较高,颜色较深的条带进行标记,对 1 ~ 9 号条带进行割胶,提取 DNA,再扩增和测序后,提交 NCBI 基因库,所得结果如表 1.

割胶测序的结果表明,脱臭生物滤池填料微生物中占优势的微生物为杆状芽孢杆菌,占测序结果的 33.3%. 同时样品中还存在假单胞菌、肠杆菌等

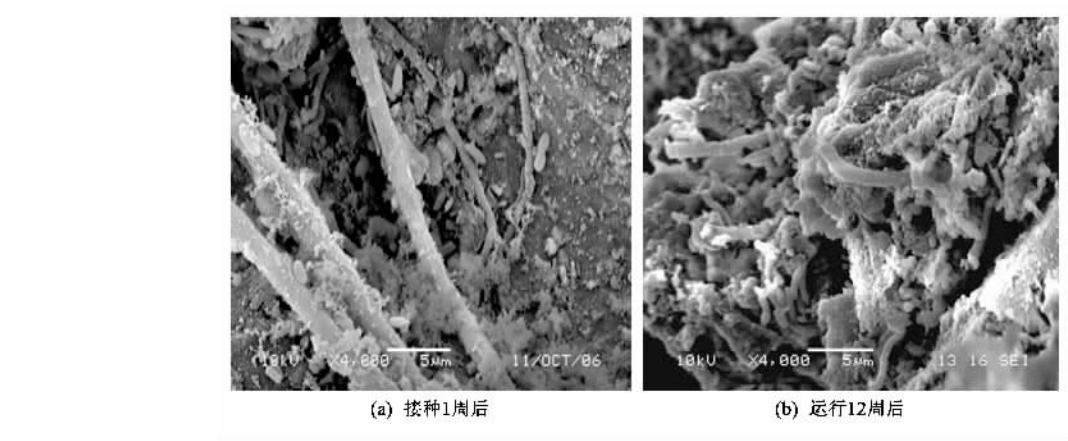


图 5 秸秆表面 SEM 图
Fig.5 SEM photos of straw surface

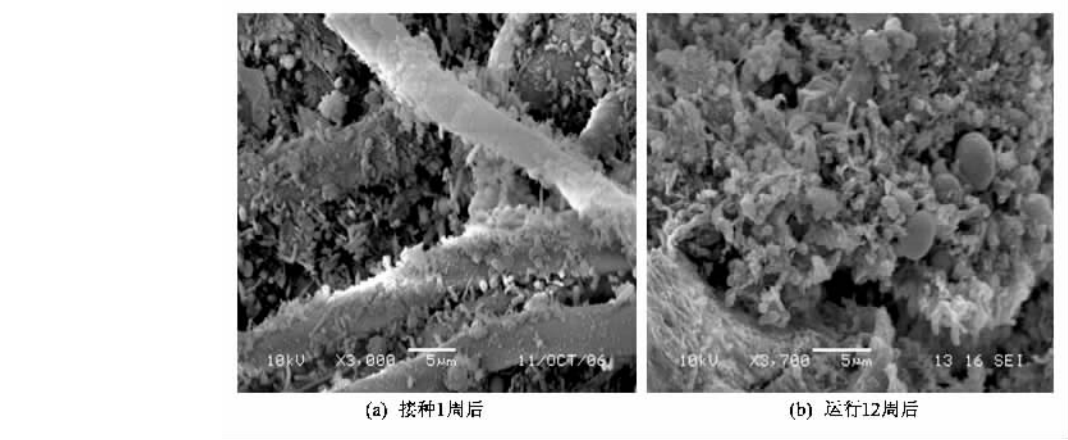


图 6 树皮表面 SEM 图
Fig.6 SEM photos of cortex surface

表 1 序列与基因库数据比对结果

Table 1 Result of bands blasting				
条带号	序列号	查询结果	同源性/%	主要出现地
1	Bankit922930	<i>Bacillus</i> sp. YACN-9	98	土壤、水
2	Bankit922932	Uncultured bacterium clone sv21d5	96	土壤、水
3	Bankit922189	<i>Bacillus mycoides</i>	96	土壤、水
4	Bankit922193	Uncultured <i>Bacillus</i> sp.	95	土壤、水
5	Bankit922960	<i>Pseudomonas</i> sp. Hugh2768	93	土壤
6	Bankit922964	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	97	土壤
7	Bankit922966	Uncultured <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium	98	土壤、植物
8	Bankit922199	Uncultured bacterium clone P6D1-496	98	土壤、水
9	Bankit922970	<i>Mesorhizobium</i> sp.	100	水

属的微生物,它们是自然环境土壤和水中的常见微生物类群,其中芽孢杆菌、假单胞菌等都是文献报道的与含硫、含氮气体以及挥发性有机气体处理有关的功能降解菌^[16-18],承担着其中主要污染物降解功能.从测序比对结果来看,部分微生物为不可培养菌,比例占有测序菌株的 44.4%.利用分子技术

能够反映出纯培养中不能培养的微生物,更加真实地反映出系统中存在的各种微生物类群.

3 结论

(1) 生物滤池对臭气污染物的去除随驯化时间逐渐增强和稳定,去除率从 50%升高到 89%并保持

稳定. 填料生物膜微生物多样性随运行时间先降后升, 而 2 种填料上微生物的相似性逐渐升高, 表明随着驯化进程, 生物填料上的微生物能够利用臭气污染物进行生长, 并随运行时间逐渐趋于丰富和稳定. 树皮生物膜多样性比秸秆高表明树皮较容易附着微生物生长. 电镜照片也显示 2 种填料生物膜的增长和膜上生物多样性的提高, 这和系统功能增强相佐证.

(2) 填料生物膜中优势微生物种属为芽孢杆菌属和假单胞菌属等, 生物膜中的微生物不可培养细菌占 44.4%. 这些功能细菌绝大多数是广泛存在于土壤、水体及生物体中的微生物, 它们在臭气污染物的去除中扮演着重要的角色.

(3) 结合电镜分析的 PCR-SSCP 技术在评价微生物群落结构的变化直观、方便和快捷, 所得结果对于实际脱臭装置的运行有一定的指导意义.

参考文献:

- [1] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1989, **86**: 2766-2770.
- [2] Frank S, Christoph C T A. New approach to utilize PCR-Signal-Strand-Conformation polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 4870-4876.
- [3] Silwinski M K, Goodman R M. Spatial heterogeneity of crearchaeal assemblages within mesophilic soil ecosystems as revealed by PCR single stranded conformation polymorphism profiling[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 1811-1820.
- [4] Duthoit F, Godon J, Montel M. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S RNA gene single-strand conformation polymorphism analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 3840-3848.
- [5] Sabine P, Stefanie K, Frank S. Succession of microbial communities during hot composting an detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism- Based genetic profiles of small-subunit RNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 930-936.
- [6] Zumstein E, Moletta R, Godon J. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis[J]. *Environment Microbiology*, 2000, **66**: 69-78.
- [7] 赵阳国, 任南琪, 王爱杰, 等. SSCP 技术解析硫酸盐还原反应器中微生物群落结构[J]. *环境科学*, 2005, **26**(4): 171-176.
- [8] Joanna E B, Simon A P, Richard M S. Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: a review[J]. *Biotechnology Advance*, 2001, **19**: 35-63.
- [9] Martin R W, Li H B, Mihelcic J R, *et al.* Optimization of biofiltration for odour control: Model calibration, validation, and applications[J]. *Water Environment Research*, 2002, **74**(1): 17-27.
- [10] 陈桐生, 李建军, 岑英华, 等. DG-DGGE 分析除臭生物滤池微生物多样性[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, **12**(1): 113-117.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆指南[M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 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.
- [13] Subramanian K, Rutivisuttinunt W, Scott W, *et al.* The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(6): 1585-1596.
- [14] Kukita Y, Tahira T, Sommer S S, *et al.* SSCP analysis of long DNA fragments in low pH Gel[J]. *Hum Mutat*, 1997, **10**: 400-707.
- [15] Gillan D C, Speksnijder A G, Zwart G. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR amplified gene fragment coding for 16S rDNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 3464-3472.
- [16] Moller S, Pedersen A R, Poulsen L K, *et al.* Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putidas* in a multispecies biofilm assessed by microscopy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **12**: 4632-4640.
- [17] Chung Y, Huang C, Tseng C P. Biological elimination of H_2S and NH_3 from waste gases by biofilter packed with immobilized heterotrophic bacteria[J]. *Chemosphere*, 2001, **43**: 1043-1050.
- [18] 王家德, 陈建孟, 于建明. 二氯甲烷降解菌的研究[J]. *中国环境科学*, 2001, **21**(6): 503-506.