

中药废水污泥群落结构解析中 PCR-DGGE 引物的选择与评价

林海龙^{1,2}, 李伟光¹, 闫险峰¹, 任南琪^{1*}

(1. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090; 2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025)

摘要:在中药废水生物活性污泥群落 DGGE 解析过程中,为了探讨 16S rDNA 通用引物的扩增效率和对污泥细菌群落的表征能力,选用包括简并性引物在内的 11 对通用引物扩增 16S rDNA 序列的 4 个可变区,并应用 DGGE 图谱评价不同引物的扩增效率和微生物种群多样性。结果表明,采用不同引物对进行 DGGE 分析时,微生物种群多样性存在着显著的差异,其中 V3 和 V6 ~ V8 可变区分辨率较高,图谱中条带丰富,多样性较好,适合分析中药废水生物活性污泥群落的结构,而 V1 ~ V3 和 V3 ~ V5 可变区 DGGE 图谱多样性较差。基于此,采用 16S rDNA 的 V3 和 V6 ~ V8 区引物调查中药废水生物活性污泥群落都是适宜的,若考虑到序列携带更多的分类信息,建议应用 V6 ~ V8 可变区引物 (B968F/B1401R);为获得更高的群落多样性信息,建议将简并和通用引物扩增的 V3 区 PCR 产物等量混合后进行 DGGE 分析。

关键词:中药废水;活性污泥;16S rDNA;DGGE;微生物多样性

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)05-1505-06

Evaluation and Choice of PCR-DGGE Primers in Analyzing the Microbial Community Structure of Activated Sludge in Traditional Chinese Medicine Wastewater

LIN Hai-long^{1,2}, LI Wei-guang¹, YAN Xian-feng¹, REN Nan-qi¹

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: In the study of traditional Chinese medicine wastewater, it was discussed for the effect of different sets of 16S rDNA universal primers on DGGE fingerprinting and microbial community diversity of aerobic and anaerobic activated sludge from one traditional Chinese medicine wastewater treatment. The genome DNA of activated sludge was isolated, and eleven sets of primers were used to amplify the four variable regions of 16S rDNA, the resolution of DGGE fingerprinting and community diversity was analyzed. The results indicated that community diversity with different sets of universal primers by DGGE was obviously different. Separated patterns of the V3 and V6-V8 regions were better than of V1-V3 and V3-V5. In the DGGE profiles, bands and diversity from V3 were most, bands and diversity from V3-V5 and V6-V8 were a little worse than those of V3. According to the length of targeted sequence and the resolution of DGGE fingerprinting, V6-V8 (B968F/B1401R) are recommended to be used to do the DGGE analysis. Mix I341F/I534R and B341F/B534R PCR product equally to make DGGE analysis can get more community diversity information.

Key words: traditional Chinese medicine wastewater; active sludge; 16S rDNA; DGGE; microbial diversity

中药废水含有高浓度的难降解有机污染物,且污染物成分复杂,因此,处理难度较大。目前主要采用生物手段(好氧或厌氧)和物化方法^[1]联用工艺进行多级处理,其中处理的方法和参数决定了处理效能、活性污泥中微生物群落结构与其功能;而活性污泥中微生物群落的结构又可以指导中药废水处理的实践过程。为了更有效地控制中药废水生物处理工艺的运行,同时提高难降解有机物的去除效率,必须充分揭示系统内功能细菌群落的真实结构,而国内外对于中药废水生物处理微生物群落结构的研究却鲜有报道。DGGE 技术具有分辨率高、可靠性强

和可重复性等优点,目前已成为研究活性污泥^[2~4]、生物膜^[5~8]、海洋^[9,10]、垃圾渗滤液^[5,11]、石油^[12]、矿产^[13]、地下水^[14]以及植物根际土壤^[15,16]等环境样品微生物群落结构、微生物遗传多样性和指导微

收稿日期:2010-04-12;修订日期:2010-10-01

基金项目:国家自然科学基金重点项目(50638020);国家自然科学基金青年基金项目(50908062);中国博士后科学基金项目(20090450983);黑龙江省博士后资助经费项目(LBH-Z08197);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551141);哈尔滨师范大学青年学术骨干项目(KGB200807)

作者简介:林海龙(1977~),男,博士,讲师,主要研究方向为环境生物技术,E-mail:linhaili234@126.com

* 通讯联系人,E-mail:rmq@hit.edu.cn

生物菌种分离的重要工具。然而,选择适用于中药废水微生物群落结构 DGGE 分析的 16S rDNA 可变区是提高图谱分辨率,获得更高群落多样性的关键。

目前,常用的 16S rDNA 通用引物包括 B63F/B534R (V1 ~ V3 区)、B341F/B534R (V3 区)、B341F/B926R (V3 ~ V5 区)、B968F/B1401R (V6 ~ V8 区)。虽然,邢德峰等^[17]和魏利等^[18]对不同废水处理样品 DGGE 分析中扩增 16S rDNA 不同可变区的引物组合进行了优化选择,获得了较好的引物组合,但均未对简并引物组合进行分析。Watanabe 等^[19]在微生物群落分析中提出了与 B341F、B533R、B926R 相应的简并引物,应用这些简并引物,可以使扩增效率更加宽泛,群落多样性也相应有所提高。基于此,本研究从中药废水污水处理厂直接提取好氧和厌氧活性污泥的总 DNA,以 11 对通用引物(包括简并引物)分别扩增其 16S rDNA 片段,并进行 DGGE 分析,根据 DGGE 图谱评价每对引物对微生物菌种检出率和对微生物多样性和表征能力,从而获得适合中药废水活性污泥 DGGE 分析的较佳引物。

1 材料与方法

1.1 活性污泥样品来源及基因组 DNA 的提取

本实验样品采自哈尔滨市某中药废水污水处理厂,该处理厂采用两相厌氧-MBR 法处理中药废水,存在好氧活性污泥和厌氧活性污泥。取 1 mL 活性污泥,根据产品说明书,应用 DNA 小量细菌提取试剂盒(上海华舜生物技术有限公司)进行基因组 DNA 提取,获得的总 DNA 保存在 -20℃ 冰箱中。

1.2 基因组 DNA 的 PCR 扩增

选用 11 对细菌 16S rDNA 通用引物(表 1)扩增 16S rDNA 不同可变区序列。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。Ex Taq 酶和 dNTP 购于宝生物工程(大连)有限公司。采用 Applied Biosystem 的 GeneAmp PCR system 9700 型基因扩增仪。参考文献和引物 T_m 值,确定 B63F/B534R、B341F/B534R^[20]、B341F/B926R^[21]和 B968F/B1401R^[22]PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,62℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,退火温度每个循环降低 0.4℃,共 25 个循环;然后 94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 5 个循环;最后 72℃ 最终延伸 8 min。B63F/I533R、B341F/I533R、I341F/B534R、I341F/I533R 和 I341F/B926R 的 PCR 反应条件参考

Watanabe 等方法^[19]稍作修改:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,退火温度每个循环降低 0.2℃,共 25 个循环;94℃ 变性 1 min,47℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,5 个循环;最后 72℃ 最终延伸 8 min。B341F/I926R 和 I341F/I926R 的 PCR 反应条件参考 Watanabe 等^[19]的方法稍作修改:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,退火温度每个循环降低 0.6℃,共 25 个循环;94℃ 变性 1 min,40℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,5 个循环;最后 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用 Bio-Rad 的 Dcode™ 基因突变检测系统(Bio-Rad Laboratories, USA)进行 DGGE 分析,制备 8% 的聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓度为 30% ~ 60%。去离子甲酰胺和尿素购于 Sigma。5 μL PCR 样品和 5 μL 上样缓冲液混合后加入点样孔。电泳条件设定为:在 75 V 的电压下,60℃ 电泳 12 h,电泳结束后,银染凝胶,扫描获得 DGGE 图谱。应用 BandScan 5.0 软件对 DGGE 图谱进行多样性分析评价。

2 结果与讨论

2.1 16S rDNA 的 PCR 扩增

采用 11 对 16S rDNA 的通用引物对好氧和厌氧活性污泥总 DNA 进行扩增,PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1 和图 2。从中可见,引物 B341F/B534R、B968F/I401R、B63F/B534R 和 B341F/926R 的扩增片段大小分别为 200、450、470、600 bp 左右。对于好氧活性污泥(图 1),B341F/B534R、B341F/I533R、I341F/B534R、I341F/I533R、B341F/B926R、I341F/B926R、B968F/B1401R 扩增效果较好;B341F/I926R、I341F/I926R 无扩增产物,B63F/B534R、B63F/I533R 扩增结果有非特异性条带出现。所以,在对好氧活性污泥 DGGE 分析中,没有选用 B63F/B534R、B63F/I533R。对于厌氧活性污泥(图 2),B63F/B534R、B63F/I533R、B341F/B534R、B341F/I533R、I341F/B534R、I341F/I533R、B341F/B926R、I341F/B926R、B968F/B1401R 扩增效果较好;I341F/I926R 无扩增产物,B341F/I926R 有非特异条带。因此,在对厌氧活性污泥 DGGE 分析中,没有选用 B341F/I926R、I341F/I926R。

2.2 微生物群落多样性

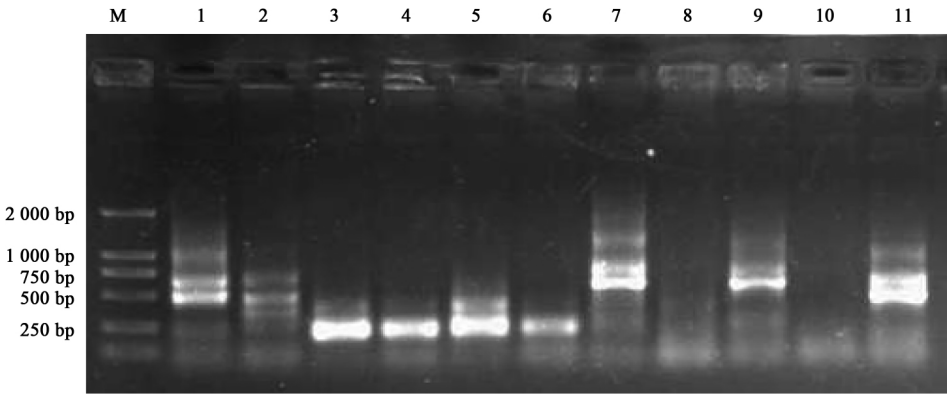
好氧活性污泥和厌氧活性污泥样品的 DGGE 谱如图 3 和图 4 所示。从中可见,同一样品不同

表 1 16S rDNA 细菌 PCR 扩增引物¹⁾

Table 1 16S rDNA primers of bacteria for PCR amplification

引物组合	通用引物	引物序列(5'-3')	引物位置	16S rDNA 靶区域
B63F/B534R	B63FGC	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	63 ~ 83	V1 ~ V3 区
	B534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	508 ~ 534	
B63F/I533R	B63FGC	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	63 ~ 83	V1 ~ V3 区
	I533R	TIACCGHICTICTGGCAC	505 ~ 533	
B341F/B534R	B341FGC	CCTACGGGAGGCAGCAG	341 ~ 357	V3 区
	B534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	508 ~ 534	
B341F/I533R	B341FGC	CCTACGGGAGGCAGCAG	341 ~ 357	V3 区
	I533R	TIACCGHICTICTGGCAC	505 ~ 533	
I341F/B534R	I341FGC	CCTACGGGIGGCIGCA	341 ~ 356	V3 区
	B534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	508 ~ 534	
I341F/I533R	I341FGC	CCTACGGGIGGCIGCA	341 ~ 356	V3 区
	I533R	TIACCGHICTICTGGCAC	505 ~ 533	
B341F/B926R	B341FGC	CCTACGGGAGGCAGCAG	341 ~ 357	V3 ~ V5
	B926R	CCGTCAATTC(A/C)TTTGAGTTT	904 ~ 926	
B341F/I926R	B341FGC	CCTACGGGAGGCAGCAG	341 ~ 357	V3 ~ V5
	I926R	CCGICIATHTTTTTHAGTTT	904 ~ 926	
I341F/B926R	I341FGC	CCTACGGGIGGCIGCA	341 ~ 356	V3 ~ V5
	B926R	CCGTCAATTC(A/C)TTTGAGTTT	904 ~ 926	
I341F/I926R	I341FGC	CCTACGGGIGGCIGCA	341 ~ 356	V3 ~ V5
	I926R	CCGICIATHTTTTTHAGTTT	904 ~ 926	
B968F/B1401R	B968FGC	AACGCGAAGAACCTTAC	968 ~ 984	V6 ~ V8 区
	B1401R	GCGTGTGTACAAGACCC	1 395 ~ 1 401	
	GC clamp	CGCCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG		

1) I: 次黄嘌呤核苷酸(inosine)



M: Marker DL2 000; 1: B63F/B534R; 2: B63F/I533R; 3: B341F/B534R; 4: B341F/I533R; 5: I341F/B534R; 6: I341F/I533R; 7: B341F/B926R; 8: B341F/I926R; 9: I341F/B926R; 10: I341F/I926R; 11: B968F/B1401R

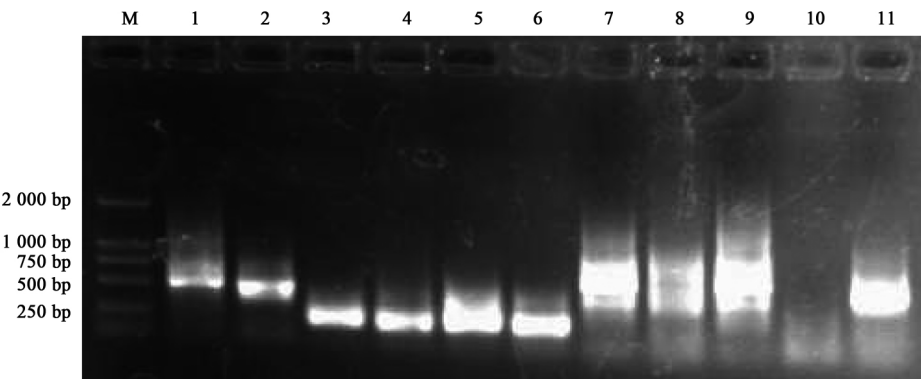
图 1 不同引物 PCR 扩增好氧活性污泥产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products with different primers for aerobic activated sludge

16S rDNA 可变区序列经过 DGGE 分析后,其指纹图谱差异非常大,呈现出的电泳条带数目多少不等,而且各个条带的相对信号强弱程度不同. 不同引物组合的 DGGE 图谱所显示的微生物群落结构和微生物多样性信息是不同的. 其中分离得到条带的多少反映出样品中微生物种群的多样性;而条带信号强弱程度,可以反映出微生物群落结构中每一种群的

相对数量^[17,18]. 所以,可以根据图谱的指纹信息确定不同样品中微生物的种类及其相对数量关系,从而获得样品的微生物群落结构和微生物种群多样性信息.

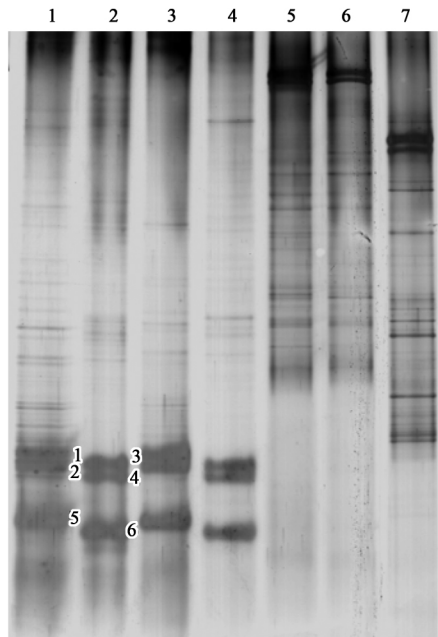
采用 BandScan 5.0 软件对图 3 和图 4 进行分析,分析结果见表 2. 图 3 中,I341F/I533 和 B968F/B1401R 的 DGGE 图谱中 DNA 条带最丰富;I341F/



M: Marker DL2 000; 1:B63F/B534R; 2:B63F/I533R; 3:B341F/B534R; 4:B341F/I533R; 5:I341F/B534R; 6:I341F/I533R; 7:B341F/B926R; 8:B341F/I926R; 9:I341F/B926R; 10:I341F/I926R; 11:B968F/B1401R

图 2 不同引物 PCR 扩增厌氧活性污泥产物琼脂糖凝胶电泳图谱

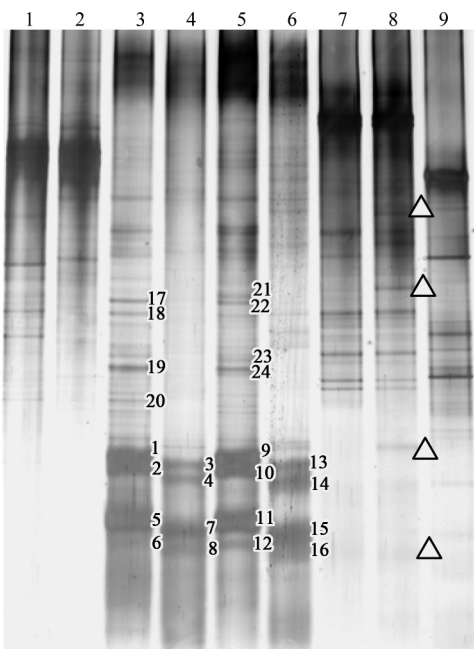
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products with different primers for anaerobic activated sludge



1:B341F/B534R; 2:B341F/I533R; 3:I341F/B534R;
4:I341F/I533R; 5:B341F/B926R; 6:I34F/B926R;
7:B968F/B1401R

图 3 不同引物扩增好氧活性污泥样品的 DGGE 分离图谱

Fig.3 DGGE profile of PCR products with different primers for aerobic activated sludge



1:B63F/B534R; 2:B63F/I533R; 3:B341F/B534R;
4:B341F/I533R; 5:I341F/B534R; 6:I341F/I533R;
7:B341F/B926R; 8:I341F/B926R; 9:B968F/B1401R

图 4 不同引物扩增厌氧活性污泥样品的 DGGE 分离图谱

Fig.4 DGGE profile of PCR products with different primers for anaerobic activated sludge

926R、B341F/B534R、B341F/B926R 的 DGGE 图谱中 DNA 条带较丰富。B341F/B926R 和 I341F/B926R 的扩增区域完全一致,虽然 I341F 是简并性引物,但二者的扩增条带数基本相同,只是有些条带的信号强弱有差异。图 4 中,I341F/I533、B341F/B534R 和 B968F/B1401R 的 DGGE 图谱中 DNA 条带最丰富;B341F/I533R、B341F/B926R 和 I341F/

B926R 的 DGGE 图谱中 DNA 条带较丰富;而 B63F/B534R、B63F/I533R 和 I341F/B534R 的 DGGE 图谱中 DNA 条带最少。对于好氧和厌氧活性污泥样品来说,虽然 B341F/B534R、B341F/I533R、I341F/B534R 和 I341F/I533R 的扩增区域是完全一致的。但其扩增结果存在着较大的差异。见图 3,B341F/B534R 中条带 1、2、5 不存在 B341F/

表 2 BandScan 5.0 软件分析活性污泥 DGGE 电泳图谱结果

Table 2 Analysis results of DGGE fingerprinting of activated sludge with BandScan 5.0 software														
泳道	好氧活性污泥 DGGE 图谱							厌氧活性污泥 DGGE 图谱						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
条带数量	18	18	13	19	18	19	21	13	12	21	18	13	23	18

I533R 图谱中,而 B341F/I533R 中的条带 3、4、6 不存在 B341F/I533R 图谱中。同样,图 4 中也存在着差异条带。

可见,同一样品采用不同 16S rDNA 可变区进行 DGGE 分析时,其分析结果差异比较显著^[17~19,23~25],且简并引物与特异引物的分析结果也有较大差别。所以,非常有必要对同一样品进行不同 16S rDNA 可变区及其引物组合的筛选工作,尤其是进行简并引物优化的筛选工作。

2.3 引物的选择

采用 16S rDNA 序列不同可变区对同一样品进行 DGGE 分析,其分析结果差异显著。与邢德峰^[17,23]、魏利^[18]等的研究结果一致,341F/534R(V3 区)和 968F/1401R(V6~V8 区)的条带最丰富,而 341F/926R(V3~V5 区)的条带较丰富,63F/534R(V1~V3 区)的条带最少。其中 341F/534R 的 PCR 扩增片段长度只有约 200 bp,对于 16S rDNA 序列全长来说所提供的菌种鉴定信息有限,精确度不高,系统发育分类信息较少。341F/926R 和 968F/1401R 的 PCR 扩增片段长度分别为约 580 bp 和 450 bp,系统发育分类信息相对更为丰富,且精确度较高。其中,968F/1401R 的条带数比 341F/926R 的丰富,这与 Luo 等^[25]的研究相一致。所以,在需要获得较高分类精确水平时,建议在实际工程应用中选择 B968F/B1401R。

由于近些年来发现少数细菌的 16S rDNA 保守区并非完全保守,存在少数几个碱基的变化,所以 Watanabe 等^[19]设计了含有稀有碱基 I 的简并引物,获得了较好的结果。因为简并引物中碱基 I(引物 I341F 中有 2 个 I;引物 I533R 中有 5 个 I)可以分别与 A、T、C、G 这 4 种碱基进行配对,所以简并引物相当于多个引物的集合,通过降落 PCR 能扩增得到较多的目的 DNA 片段。本研究应用简并引物对活性污泥的扩增结果同 Watanabe 等^[19]结果一致,简并引物扩增到特异引物没有扩增到的少数细菌的 16S rDNA 条带。而且简并引物 I341F/I533R 图谱条带数是最多的,获得的生物多样性也最多。而且与其相对应得特异性引物相比,2 个图谱中存在一部分差异条带。这些差异条带互补可以大大增加微生物

的检出率,从而更加全面地分析活性污泥中生物多样性。所以,在需要获得更全面的实验结果时,可选用 I341F/I533R 和 B341F/B534R 的 PCR 产物等量混合进行分析。

采用 DGGE 进行活性污泥中微生物多样性分析是受多因素影响的,除了 16S rDNA 特异性可变区比较重要之外,还会受到 DNA 提取方法、DNA 提取质量、PCR 扩增体系及条件、DGGE 电泳条件、银染显色程度等因素的影响。所以,要获得较好的分离结果还需要对其它因素进行优化。

3 结论

(1) 利用 DGGE 分析中药废水活性污泥微生物生物多样性时,同一样品采用不同 16S rDNA 靶序列引物进行微生物多样性分析时,DGGE 图谱差异明显,而特异性引物和简并性引物扩增同一靶序列也存在一定的差异。所以,为了获得最佳的 DGGE 分析效果,对扩增引物的筛选和优化是非常重要的。

(2) V3 和 V6~V8 分辨率较好,图谱中条带丰富;V1~V3 分辨率较差,图谱中条带最少。因此,在进行 DGGE 分析时,应选用 V3 区和 V6~V8 区引物。但考虑到分辨率高低及可变区长短,建议选择 B968F/B1401R。

(3) 考虑到 16S rDNA 可变区扩增引物的简并性,16S rDNA 的 V3 区可以获得的图谱最丰富,建议采用 B341F/B534R 和 I341F/I534R 的 PCR 扩增产物等量混合上样,以获得更高的微生物多样性。

参考文献:

[1] 祝坚. 中药废水污染特点和处理研究进展[J]. 能源环境保护,2007,21(5):15-17.

[2] 赵继红,何淑英,李继香,等. PCR-DGGE 分析啤酒废水生物处理工艺的微生物区系[J]. 环境科学,2008,29(10):2950-2955.

[3] 苏俊峰,马放,赵立军,等. 石化废水处理系统微生物群落结构 PCR-DGGE 分析[J]. 南京理工大学学报(自然科学版),2008,32(1):127-130.

[4] Ren L J, Wu Y N, Ren N Q, et al. Microbial community structure in an integrated A/O reactor treating diluted livestock wastewater during start-up period[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(5): 656-662.

[5] 肖勇,杨朝晖,曾光明,等. PCR-DGGE 研究处理垃圾渗滤液序批式生物膜反应器(SBBR)中的细菌多样性[J]. 环境科

- 学,2007,**28**(5):1095-1101.
- [6] Besemer K, Singer G, Limberger R, *et al.* Biophysical controls on community succession in stream biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(15): 4966-4974.
- [7] Dopheide A, Lear G, Stott R, *et al.* Molecular characterization of ciliate diversity in stream biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(6): 1740-1747.
- [8] Liu H J, Yang F L, Shi S Y, *et al.* Effect of substrate COD/N ratio on performance and microbial community structure of a membrane aerated biofilm reactor [J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, **22**(4): 540-546.
- [9] 刘敏,朱开玲,李洪波,等. 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成 [J]. 环境科学, 2008, **29**(4): 1082-1091.
- [10] Gao Z, Li B L, Zheng C C, *et al.* Molecular detection of fungal communities in the hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(19): 6091-6101.
- [11] Brad T, Braster M, Breukelen B M, *et al.* Eukaryotic diversity in an anaerobic aquifer polluted with landfill leachate [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(13): 3959-3968.
- [12] 王君,马挺,刘静,等. 利用 PCR-DGGE 技术指导高温油藏中功能微生物的分离 [J]. 环境科学,2008,**29**(2):462-468.
- [13] 刘艳阳,郭旭,姜成英. 生物浸矿反应器中的微生物种群结构及其中可培养微生物的特征 [J]. 微生物学报, 2010, **50**(2): 244-250.
- [14] Da Silva M L B, Johnson R L, Alvarez P J J. Microbial characterization of groundwater undergoing treatment with a permeable reactive iron barrier [J]. Environmental Engineering Science, 2007, **24**(8): 1121-1126.
- [15] Brons K J, Elsas D J. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(9): 2717-2727.
- [16] Gao Y, Zhou P, Mao L, *et al.* Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution [J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, **22**(7): 1040-1048.
- [17] 邢德峰,任南琪,宋佳秀,等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响 [J]. 环境科学, 2006, **27**(7): 1424-1428.
- [18] 魏利,马放,王欣宇,等. 基于 16S rDNA 不同靶序列对厌氧 ABR 反应器微生物多样性分析的影响 [J]. 环境科学, 2008, **29**(3): 776-780.
- [19] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, **44**(3): 253-262.
- [20] 雷娟利,周艳虹,丁桔,等. 不同蔬菜连作对土壤细菌 DNA 分子水平多态性影响的研究 [J]. 中国农业科学, 2005, **38**(10): 2076-2083.
- [21] Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian Sausages [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(11): 5113-5121.
- [22] Susanne N, Dennis S N, Lotte L, *et al.* Impact of diet on the intestinal microbiota in 10-month-old infants [J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2007, **44**(5): 613-618.
- [23] 邢德峰,任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析 [J]. 微生物学报, 2006, **46**(2): 331-335.
- [24] Lorbeg P M, Majhenic A C, Rogelj I. Evaluation of different primers for PCR-DGGE analysis of cheese-associated enterococci [J]. Journal of Dairy Research, 2009, **76**(3): 265-271.
- [25] Luo P, Hu C Q, Zhang L P, *et al.* Effects of DNA extraction and universal primers on 16S rRNA gene-based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming water [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2007, **25**(3): 310-316.