

# 微生物生态学研究方法进展

张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术研究室, 北京 100085)

**摘要:** 微生物培养及显微技术作为鉴定微生物种群的手段有很大的局限性, 因为环境中大多数微生物处于“存活但不能培养”的状态。因此, 不依赖于微生物培养的生物化学以及分子生物学方法正被广泛地用于微生物生态学研究。主要介绍了荧光技术, 基于 PCR 的分析技术和 PLFA 等技术在表征微生物多样性研究中的某些进展。

**关键词:** 微生物生态; 荧光标记蛋白; FISH; PCR-RFLP; PCR-SSCP; PCR-DGGE; PLFA

## Development in research methods of microbial ecology

ZHANG Hong-Xun, WANG Xiao-Yi, QI Hong-Yan (Environmental Biotechnology Lab., Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5): 988~995.

**Abstract:** The cultivation of microbes and microscopy techniques as a means to identify microbial communities have severe limitations, since the majority of microbes in the environment are viable but nonculturable. For this reason, the methods of biochemistry and molecular biology that are independent of culturing are being widely used in the studies of microbial ecology. In this paper, fluorescent technique, PCR-based technique, PLFA technique and others to characterize diversity of microorganisms are reviewed.

Fluorescence-based microscopy techniques are widely used in microbial ecology. Such techniques include fluorescent protein, fluorescence staining for total counts, viability counts and fluorescence in situ hybridization (FISH). The advantage of FISH is that it does not need cell lysis and easy to perform. But the result affected by the difference of the cell membrane's penetration ability. It is powerful tool for studying population dynamics, tracking microorganisms released into the environment but can't identify microorganisms has not been cultured.

PCR-based techniques include PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR-DGGE. They have been the most useful in providing information about microbial communities. The greatest advantage of those methods is avoiding cultivation which solves the big obstacle "VNBC". The technology has been well established and applied into microbial communities researches of soil, biofilms, seawater, wetlands and *et al.* The disadvantages caused by the storage, extraction efficiency, lysis efficiency and PCR efficiency have been solved in some extent but still need further study.

**基金项目:** 国家“十五”科技攻关重点项目 (2001BA903B)

**收稿日期:** 2002-09-09; **修订日期:** 2002-03-15

**作者简介:** 张洪勋 (1953~), 男, 吉林人, 博士, 研究员, 主要从事微生物生态学, 环境生物技术的研究。E-mail: hxzhang@mail.rcees.ac.cn

**Foundation item:** The National “Tenth Five-year Plan” Key Technologies R&D Programme (2001BA903B)

**Received date:** 2002-09-09; **Accepted date:** 2003-03-15

**Biography:** 张洪勋, Ph. D., Professor, main research areas: microbial ecology and environmental biotechnology. E-mail: hxzhang@mail.rcees.ac.cn

PLFA and FAME are exclusively present in living cell and only in cell membranes. Since unique fatty acids are indications of specific groups, such signature molecules can be bacteria taxonomic discriminator especially FAME which has been accepted. Because fatty acids are rapidly metabolized following cell death, this method is very fit for community dynamics study. The shortcoming is that the method cannot be used to characterize microorganisms to species. Another is it need careful operation because any variation in those signatures would give rise to false community estimates created by artifacts in the methods.

In some research areas, only one method cannot serve well. Synthetically use two or more methods provides favorable result and avoids intrinsical shortcomings.

Summarily, the use of molecular techniques for microbial ecology research provided new understanding of microbial community. They give us a more complete picture of this area.

**Key words:** microbial ecology; GFP; FISH; PCR-RFLP; PCR-SSCP; PCR-DGGE; PLFA

文章编号:1000-0933(2003)05-0988-08 中图分类号:Q938.1 文献标识码:A

微生物生态学作为一门学科出现在 20 世纪 60 年代早期。20 世纪 70 年代后期,随着人们对环境问题的日益关注,微生物生态学得到了迅速的发展<sup>[1]</sup>。90 年代引入分子生物学技术之后,微生物生态学的研究更加深入。许多研究已经证实,通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1%~10%<sup>[2,3]</sup>,远远不能满足微生物生态学研究的需要。应用现代生物化学和分子生物学方法,克服了传统微生物生态学研究技术的局限性,获取更加丰富的微生物多样性信息,推动着当今微生物生态学研究的进一步发展。下面介绍近年来微生物生态学研究的主要方法。

## 1 荧光技术

以荧光为基础的显微技术在微生物生态学研究中的应用广泛,主要包括荧光标记蛋白的应用;测定总菌数、活菌数以及荧光定位杂交(Fluorescent in situ hybridization, FISH)。

### 1.1 荧光标记蛋白的应用

许多微生物在环境变化过程中表现出一种“存活但不能被培养”(viable but nonculturable, VBNC)的状态。在这种状态下,细胞不能在传统的培养基上生长,但仍然处于存活状态,并在一定条件下可以恢复代谢活性并转入可培养的状态<sup>[4]</sup>。M. Lowder 等人他们用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的一种短半衰期突变株作为新陈代谢的指示,对这种状态的微生物进行了研究。这种不稳定的蛋白不同于一般的 GFP,在“饥饿”或者 VBNC 状态下很快失去荧光。这样,就可以用 GFP 作为指示剂监测由于环境变化而引起微生物新陈代谢的变化<sup>[5]</sup>。

根瘤菌在植物的根部形成有固氮作用的瘤状物。C. Xi, I G. Dirix<sup>[6]</sup>等人利用一个合成的双标记微——Tn5 转座子(该转座子包含一个连续表达的 GFP 基因和一个没有启动子的 *gusA* 基因)找到了一个有效共生所需要的新基因。*gusA* 基因是用来检测在半模拟共生环境下不同的靶基因的表达水平;而 GFP 的作用是确定微生物在共生体系中的位置。这个方法可以通过基因突变株在植物共生体系中的位置来确定有关共生的重要基因,也可以推广用于研究其它植物微生物共生体系。

### 1.2 荧光染色计算菌数

Boulos L. 提出了一种简便、快速计量活菌/死菌的方法<sup>[7]</sup>。他用两种染料对样品染色。一种是 SYTO9,分子量约为 10Da 的绿色染料,它可以进入活的或死的细胞中;另一种是 Propidium Iodide,分子量约为 668Da 的红色染料,它只进入死的细胞。活菌率即为:

$$\text{活菌}\% = \frac{\text{绿色细胞记数}}{(\text{绿色细胞记数} + \text{红色细胞记数})} \times 100\%$$

### 1.3 荧光定位杂交数据

荧光定位杂交主要是用于研究原核生物,它可以直接鉴定以及定量分析样品中的特定的微生物或者

是分类群。该方法中,整个细胞是被固定的。它的 16S 或者 23SrRNA 与荧光标记的特异性寡核苷酸探针杂交。再由扫描共聚焦激光显微镜(Scanning confocal laser microscopy, SCLM)观察固定的细胞。由于杂交的是整个细胞,省去了提取 DNA, PCR 扩增以及克隆等步骤。Gall 和 Pardue 最早描述了荧光定位杂交技术<sup>[8]</sup>。这项技术最早应用是放射性的互补序列作探针对 DNA 靶序列进行研究。后来 Manning 等人首次将非放射性的定位杂交技术应用于细胞遗传学的研究<sup>[9]</sup>。而荧光定位杂交(fluorescence in-situ hybridization, FISH),就像 Northern、Southern 印记一样,是基于两个寡核苷酸通过互补序列配对。但是对 FISH 来说,靶序列是留在组织中而没有必要象 Northern、Southern 技术一样在杂交之前首先要分离核酸<sup>[10]</sup>。H. U. Uphoff 等人在研究海洋微小浮游生物的时候应用 FISH 技术来确定群落的丰度<sup>[11]</sup>。Russell Connally 等人应用时段荧光显微技术(Time-resolved fluorescence microscopy, TRFM)检测环境微生物样品,解决了藻类以及矿务颗粒的自荧光对免疫荧光以及 FISH 的干扰<sup>[12]</sup>。

FISH 技术的应用受到环境样品微生物的生理状态的影响,芽孢、放线菌及休眠时期的细胞的细胞膜的通透性低,影响群落中部分种属丰度的错误估计。而且,FISH 由于事先要根据已知种属设计探针,不能检测出环境样品中的未知种属<sup>[13]</sup>。

## 2 基于 PCR 的研究方法

### 2.1 PCR-RFLP 方法

限制性内切核酸酶,又称限制酶(Restriction endonuclease),特异的结合于一段 DNA 的识别序列或其附近的特异位点上,并在此切割双链 DNA<sup>[14]</sup>。因此,特定的限制性酶谱图可以对群落中的微生物加以区分。PCR-RFLP(PCR-restriction fragment length polymorphisms)法是将 PCR 引物中的一条加以荧光标记,反应后用合适的限制酶切、电泳分析,再根据片断的大小不同以及标记片断种类和数量的不同分析群落的结构及组成多样性<sup>[15]</sup>。现在很多研究人员利用 16SrRNA 来研究土壤微生物的多样性<sup>[16~19]</sup>。该技术还可以用来监测因环境改变而引起的微生物种群的变化。耕作过的土壤中的微生物种群结构的变化越来越多的引起人们的重视,D. H. Buckley<sup>[20]</sup>等人提取土壤中微生物的 RNA,通过标记过的不同引物扩增,确定 16SrRNA 的丰度。同时可以根据 PCR 扩增的 16SrDNA 的荧光标记末端多形态限制性片断(fluorescently tagged terminal restriction fragment length polymorphisms, T-RFLP)来判断微生物群落的生态状况。

### 2.2 PCR-SSCP 方法

PCR-单链构象多态性研究(single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)方法本来是用于临床鉴定基因突变,近年来被应用到微生物生态学的研究<sup>[21~23]</sup>。单链 DNA 片段呈复杂的空间折叠构象,这种立体结构主要是由其内部碱基配对等分子内相互作用力来维持的。当有一个碱基发生改变时,会或多或少地影响其空间构象,使构象发生改变。空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中受排阻大小不同。因此,通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),可以非常敏锐地将构象上有差异的分子分离开。SSCP 技术刚建立时是将同位素掺入 PCR 扩增物中,通过放射自显影来显示结果。这给该技术的推广造成一定的困难。随着 DNA 银染方法与 PCR-SSCP 结合,尤其是直接溴化乙锭染色方法的应用,使得该方法大大简化。由于 RNA 有着更精细的二级和三级构象,这些构象对单个碱基的突变很敏感,而且 RNA 不易结合成双链,可以较大量的进行电泳,有利于用溴化乙锭染色,一部分研究人员转而利用 RNA 来研究。但该方法增加了一个反转录过程,还需要一个较长的引物,内含有启动 RNA 聚合酶的启动序列,从而相对地增加了该方法的难度。SSCP 方法包括 5 个步骤:①提取样品基因组 DNA;②用真细菌通用的扩增 16SrDNA 的引物(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 5'-TTACCGCGGC(T/G)GCTGGCAC-3',相应于 16SrDNA 序列的 8 到 27 和 533 到 515)扩增 16SrDNA;③将扩增后的产物变性,形成单链的 DNA;④用聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同的片断分离;⑤回收 DNA,测定不同条带的序列,同基因文库的 16SrDNA 序列比较,确定微生物的种属。Frank Schwieger 等人通过对根系微生物的分析表明 PCR-SSCP 可以很好的分析微生物群落的动态变化,并应用此方法研究了种植对土壤微生物群落的影响<sup>[24]</sup>。Sabine Peters 等人用该法研究**群落数据**和菌种的多样性,并同传统的培养方法比较指出 PCR-SSCP 方法避免了传统培养的费时费力以及误差大的干扰,适合对微生物群落结构和演替的分析<sup>[25]</sup>。

## 2.3 PCR-DGGE 方法

同 PCR-SSCP 法一样,PCR-变性梯度凝胶电泳,(PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)或 PCR-温度梯度凝胶电泳(PCR-Temperature Gradient Gel Electrophoresis, PCR-TGGE)一开始也是在医学上用来检测基因突变,后来被广泛应用于微生物生态的研究。同样大小的 DNA 序列由于含有的碱基不同,各片断的  $T_m$  也就不同。甚至一个碱基对的不同,都会引起  $T_m$  很大的差异。DGGE 或 TGGE 就是应用这种差异来区分不同的基因序列。这种电泳方法在聚丙烯酰胺中加入甲酰胺(DGGE),从正极到负极梯度递加(浓度可随试验要求改变),或是形成温度梯度(TGGE)。电泳中的 DNA 到达它的变性甲酰胺浓度或温度时,双链部分解开,造成泳动速度发生变化,从而达到分离效果。而且染色后的凝胶用成像系统分析,还可以半定量地测定样品 DNA 浓度的大小,反映微生物群落组成的变化。该方法扩增环境样品的 16SrRNA 的部分基因序列(100~400bp),通过 DGGE 或 TGGE 分离,收集不同条带的 DNA 测序,再同基因文库中的现有序列比较,即可确定微生物的种类。该方法的要点在于 PCR 引物的选择。由于扩增的环境样品成分复杂,所以研究人员都选择了核糖体小亚基的 DNA 的保守序列作为引物。由于电泳的限制,被分析的片断不能大于 400bp。为了便于电泳的分析,提高分辨率,引物的 5'端有一个 40bp 左右的发夹结构,提高了引物合成的成本。

Luca cocolin 等人用 PCR-DGGE 方法监测了意大利香肠的自然发酵过程中微生物群落结构的变化。通过对不同引物的比较,确定了 P1、P2 这对引物。他们的试验打破了研究传统发酵中由于不能被培养微生物无法分离而导致的阻滞不前的状况<sup>[26]</sup>。Jens Walter 等人用 PCR-DGGE 法分析了人类粪便中的乳酸菌(*Lactobacillus*)、微球菌(*Pediococcus*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)以及魏斯氏菌(*Wessella*)。他们选用的引物为 lac1、lac2GC,试验表明,这对引物可以很好的分离不同的 DNA 片断。该法提供了检测肠道微生物菌群状态以及演替的简便、快捷又可靠的方法<sup>[27]</sup>。L. D. Rasmussen 提取了湖底沉积层的微生物 DNA,对其进行 PCR-DGGE 分析。他们扩增的是原生动物的 Kinetoplastida 的特异性 24SrDNA,选取了不同的引物。结果表明,该法对亦可以用于研究环境中的原生动物的群落结构和多样性<sup>[28]</sup>。

基于 PCR 的方法有很多,以上例举的几种是现代微生物生态学常用的方法。他们的共同点是首先提取环境样品的核酸,然后用合适的引物扩增。环境样品的核酸提取效率迄今仍是研究是重点之一,这在土壤微生物生态中尤其重要。很多工作者都将研究重点放在提高核酸的提取效率上。最初采用的方法主要是剧烈的机械打碎以及超声波破碎细胞<sup>[29,30]</sup>。但是这种方法得到的 DNA 片断一般在 5K~10K 大小,不适合微生物的群落分析<sup>[31]</sup>。微生物细胞与环境中的土壤颗粒、粘土以及有机物接合紧密,这对高效率提取核酸造成了很大的困难。同时,腐植酸对 DNA 的检测和定量也有很大的影响,主要表现在抑制 DNA 高温聚合酶的活性<sup>[32,33]</sup>,干扰限制酶的位点识别<sup>[34]</sup>,降低转化效率<sup>[35]</sup>以及 DNA 杂交的特异性<sup>[36]</sup>。由于腐植酸难以去除,DNA 样品的纯化也成为研究的重点之一。Jizhong Zhou 等人研究了各种提取方法,他们将土壤样品 DNA 提取分为细胞裂解粗提 DNA 和纯化两个步骤,并将几种方法进行比较,建立了一种对大多数土壤样品简单、快速、高效的基于 SDS 的提取方法<sup>[37]</sup>。很多实验表明,现在能够从土壤样品中提取出超过 90% 的 rDNA<sup>[38]</sup>。

基于 PCR 技术的方法解决了由于 VNBC 状态而导致大部分环境微生物不能被鉴定出来的状况,各个方法已经建立了比较成熟的技术。几种方法的应用大大推进了微生物生态学的研究,是当今该领域应用最为广泛的方法。但是它们也存在着共同的不足:①环境样品在提取核酸前的厌氧或室温存放不可避免的导致其样品中微生物的变化,冷冻可以减缓变化,但是不能存放时间过长,真菌在 0~4 摄氏度仍可以观察到明显的生长现象<sup>[39]</sup>。②每次提取 DNA 的效率不同,造成结果重复性差<sup>[40]</sup>。③某些原核生物细胞比其他细胞容易裂解,引起裂解程度不均一,使得不易裂解的细胞的丰度估计过低<sup>[39]</sup>。④引物对不同样品的扩增效率不同,引起丰度估计偏差<sup>[41,42]</sup>。⑤理论上,对真核生物的分析应该象原核生物一样进行,但是由于真核生物的核糖体的编码基因以及调节机制比较复杂,对其的研究还不够透彻,现今应用在真核微生物生态学的分析上还是

## 3 PLFA 谱图分析

磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)谱图分析、脂肪酸(Fatty acid, MFA)谱图以及甲基脂肪酸酯(fatty acid methyl ester, FAME)谱图分析在群落动态分析上的应用也是十分广泛。磷脂是构成生物细胞膜的主要组分,约占细胞干重的5%, (Lechevalier MP 1977 Lipids in bacterial taxonomy—a taxonomist's view. Critic Rev Microbiol 5:109~210)在细胞死亡时,细胞膜很快被降解,磷脂脂肪酸被迅速的代谢掉,因此它只在活细胞中存在,十分适合于微生物群落的动态监测。另一个重要因素是脂肪酸具有属的特异性,特殊的甲基脂肪酸已经被作为微生物分类的依据。磷脂脂肪酸谱图分析法首先将磷脂脂肪酸部分用 Bligh 和 Dyer 法提取出来<sup>[44]</sup>,然后用气象色谱分析,得出 PLFA 谱图。群落的微生物结构发生变化,即可以通过谱图的变化得到快速有效的监测。甲基脂肪酸酯是细胞膜磷脂水解产物,该法是利用 MIDI 系统(一种气相色谱分析系统)分析出全细胞的 FAME 谱图。S. C. Wilkinson 等人用 PLFA 谱图法找出了微生物群落结构与树木根系的关系<sup>[45]</sup>。D. E. Langworthy 等人利用 PLFA 谱图,分析了多环芳香碳水化合物(Polycyclic aromatic hydrocarbons PAH)在环境中的微生物降解<sup>[46]</sup>。Sheridan Kidd Haack 等人通过试验验证了 FAME 谱图法分析土壤微生物群落的可行性,还同时进行了生物量、分类结构的试验,结果表明 FAME 谱图法能够检测出土壤微生物群落细微变化,为人们提供了一个检测土壤微生物群落的常规方法<sup>[47]</sup>。A. G. Werker, E. R. Hall 等人利用 MFA 谱图分析法来估计生物方法处理废水时固体颗粒的微生物群落的生态结构。他们从固体颗粒提取脂肪部分,用毛细管气象色谱仪分析脂肪酸包含的酯类,得出微生物量及其细微群落结构<sup>[48]</sup>。

PLFA 方法适合跟踪研究微生物群落的动态变化,能够快速有效的从环境样品中提取大部分脂肪酸,但是也有其局限性。第一,他不能从种的水品上鉴定微生物,只能鉴定到属;第二,这种方法强烈的依赖于标记脂肪酸,标记脂肪酸变化导致错误的群落变化估计,因此操作过程需要十分谨慎,防止人为因素的干扰。第三,细菌和真菌在不同的生长时期以及环境压力下的脂肪酸含量有所变化,给监测带来困难<sup>[43]</sup>。

#### 4 其他分析方法

Garland 和 Mills 提出了一种研究异养微生物群落代谢多样性的方法——Biolog microplates<sup>[49,50]</sup>。这种方法是基于微生物群落对 95 种不同碳源的利用度来描述群落中微生物动态变化。微平板中有氧化还原指示剂和 95 种不同的碳源,加入样品后,由于样品对每种碳源的呼吸能力不同,导致的氧化剂颜色变化不同,用分析系统分析结果,就可以得出群落代谢的变化情况。这样,这种碳源利用度的信息就可以用来研究不同环境条件引起的微生物群落的变化。

A. J. Palomares 等人建立了一个和真核生物荧光素酶基因耦合的热调系统分析质粒转移<sup>[51]</sup>。他们将 *luc*、*lucOR* 基因与  $\lambda$  噬菌体右启动子  $\lambda PE$  融合,在温度敏感抑制子 *cl857* 的控制下表达。微生物适应新环境以及新的环境选择压力的能力很大程度上是通过基因的水平传播来改变的,这是远远多于微生物由于点突变的积累而形成的基因功能的改变从而适应环境的情况。现在人们越来越关注致病菌的对抗生素抗性,而这种情况的产生和一些基因改造过的微生物被释放到环境中有很大的关系。在对微生物进行基因改造的时候,经常用抗生素法来筛选目的菌株,这样就将很多抗抗生素的基因传播到环境中。A. J. Palomares 建立的系统成功的避免了抗生素筛选转化结合子带来的环境微生物生态的变化。

#### 5 组合应用

以上几种方法是近几年来常用的微生物生态学研究的方法。在解决实际问题的过程中,往往不拘泥于一种方法。N. Ross 等人收集了地下水中的微生物,让它们在陶瓷表面形成生物膜,并分别分析地下水中的微生物群落以及生物膜的微生物群落。他们采用 SSCP 方法和 Biolog microplates 法研究它们的遗传多样性和代谢多样性<sup>[52]</sup>。A. Mark Ibekwe 等人研究薰剂对土壤微生物的影响时同时采用了 PCR-DGGE 法和 PLFA 谱图法<sup>[37]</sup>。各种方法组合应用,避免了由于方法原理本身所带来的不可避免的偏差,提供了更加全面的群落组成、变化方面的信息,必将成为今后研究的有力工具。

#### 6 总结

一系列两学数据学以及分子生物学技术应用于微生物生态学研究,大大加速了该学科的发展速度。综上所述,可知微生物生态学向纵深发展过程中方法学的重要性。可以预见,新的研究方法的灵活运用,必

将为这门学科带来繁荣的未来。

## References:

- [ 1 ] Ronald M, Richard B. *Microbial Ecology*. fourth edition. 1997.
- [ 2 ] Brock T D. The study of microorganisms in situ; progress and problems. *Symp. Soc. Gene Microbiol.*, 1987, **41**: 1~17.
- [ 3 ] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**(1): 143~169.
- [ 4 ] Oliver J D. Problems in detecting dormant (VBNC) cells and the role of DNA elements in this response. In: Jansson JK, van Elsas JD, Bailey MJ MJ eds. *Tracking Genetically-Engineered Microorganisms*. Landes Biosciences, Georgetown, TX, 2000.
- [ 5 ] Lowder M, Oliver J D. The use of modified GFP as a reporter for metabolic activity in *Pseudomonas putida*. *Microb. Ecol.*, 2001, **41**:310~313.
- [ 6 ] Xi C, Dirix G, Hofkens J, *et al.* Use of dual marker transposons to identify new symbiosis genes in *Rhizobium*. *Microb. Ecol.*, 2001, **41**:325~332.
- [ 7 ] Boulos L, Preiävost M, Barbeau B, *et al.* Live/dead Baclight: Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Microbiol Methods*, 1999, **37**:77~86.
- [ 8 ] Gall J G, Pardue M L. Formation of RNA-DNA hybrid molecules in cytogenetical preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, **63**:378~383.
- [ 9 ] Manning J E, Hershey N D, Brooker T R, *et al.* A new method of in situ hybridization. *Chromosoma*. 1975, **53**: 107~117.
- [ 10 ] Nath J, Johnson K L A review of fluorescence *in-situ* hybridization(FISH): Current status and future prospects. *Biotech. Histochem.*, 2000, **75**: 54~78.
- [ 11 ] Uphoff H U, Felske A, Fehr W, *et al.* The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **35**:249~258.
- [ 12 ] Connally R, Veal D, Pipe J. High resolution detection of fluorescently labeled microorganisms in environmental samples using time-resolved fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **41**:239~245.
- [ 13 ] Felske A, Akkermans A D L. Prominent occurrence of ribosomes from an uncultured bacterium of the Verrucomicrobiales cluster in grassland soils. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998, **26**: 219~223.
- [ 14 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2nd ed, 1989.
- [ 15 ] Nassar A, Darrasse A, Lematre M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**:2228~2235.
- [ 16 ] Borneman J, Skroch P W, O'Sullivan K M, *et al.* Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**:1935~1943.
- [ 17 ] Duarte G F, Rosado A S, Seldin L, *et al.* Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *J. Microbiol. Methods.*, 1998, **32**: 21~29.
- [ 18 ] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**: 1721~1730.
- [ 19 ] Zhou J Z, Davey M E, Figueras J B, *et al.* Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology*, 1997, **143**:3913~3919.
- [ 20 ] Buckley D H, Schmidt T M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.*, 2001, **42**: 11~21.
- [ 21 ] Head I M, Saunders J R, Pickup R W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.*, 1998, **35**: 1~21.
- [ 22 ] Marilley L, Vogt G, Blanc M, *et al.* Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis. *Plant Soil*, 1998, **198**: 219~224.
- [ 23 ] Frank S, Christoph C T. A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S

- rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(12): 4870~4876.
- [24] Frank S, Christoph C T. Effect of Field Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the Composition of Bacterial Communities in Rhizospheres of a Target Plant (*Medicago sativa*) and a Non-Target Plant (*Chenopodium album*) Linking of 16S rRNA Gene-Based Single-Strand Conformation Polymorphism Community Profiles to the Diversity of Cultivated Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(8): 3556~3565.
- [25] Sabine P, Stefanie K, Frank S, *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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(3): 930~936.
- [26] Luca C, Marisa M, Carlo C, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16SrDNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 5113~5121.
- [27] Jens W, Christian H, Gerald W T, *et al.* Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Wessella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2578~2585.
- [28] Rasmussen L D, Ekelund F, Hansen L H, *et al.* Group-Specific PCR Primers to Amplify 24S a-Subunit rRNA Genes from Kinetoplastida (Protozoa) Used in Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Microb. Ecol.*, 2001, **42**: 109~115.
- [29] Liesack W, Stackebrandt E. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestria lenvironment. *J. Bacteriol.*, 1992, **174**: 5072~5078.
- [30] Ogram A, Sayler G S, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods*, 1987, **7**: 57~66.
- [31] Liesack W, Weyland H, Stackebrandt E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16SrDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.*, 1991, **21**: 191~198.
- [32] Smalla K, Cresswell N, Mendonca-Hagler L C, *et al.* Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.*, 1993, **74**: 78~85.
- [33] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**: 2292~2295.
- [34] Porteous L A, Armstrong J L. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. *Curr. Microbiol.*, 1991, **22**: 345~348.
- [35] Tebbe C C, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 2657~2665.
- [36] Steffan R J, Atlas R M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**: 2185~2191.
- [37] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and environmental microbiology*, 1996, **62**(2): 316~322.
- [38] Porteous L A, Seidler R J, Watrud L S. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol. Ecol.*, 1997, **6**: 787~791.
- [39] VanWinzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, **21**: 213~229.
- [40] Moran MA, Torsvik VL, Torsvik T, *et al.* Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 915~918.
- [41] Zheng D, Alm E W, Stahl DA, *et al.* Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 4504~4513.
- [42] Suzuki M, Ammon S J. Bias caused by template annealing in the amplification mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 625~630.

- [43] Hilla G T, Mitkowskia N A, Aldrich-Wolfeb L, *et al.* Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 2000, **15**: 25~36.
- [44] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Microbiol.*, 1959, **37**: 911~917.
- [45] Wilkinson S C, Anderson J M. Spatial patterns of soil microbial communities in a Norway. *Microb. Ecol.*, 2001, **42**: 248~255.
- [46] Langworthy DE, Stapleton R D, Sayler G S, *et al.* Lipid analysisi of the response of a sedimentary microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mocrob. Ecol.*, 2002, **43**: 189~198.
- [47] Hack S K, Garchow H, Odelson D A, *et al.* Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 2483~2493.
- [48] Werker A G, Hall E R. Quantifying Population Dynamics Based on Community Structure Fingerprints Extracted from Biosolids Samples. *Microb. Ecol.*, 2001, **41**: 195~209.
- [49] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**: 2351~2359.
- [50] Konopka A, Oliver L, Turco R F J. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb. Ecol.*, 1998, **35**: 103~115.
- [51] Palomares A J, Va'zquez M E, Rodry'guez-Llorente I D, *et al.* Caviedes plasmid transfer detection in soil using the iducible IPR system fused to eukaryotic luciferase genes. *Microb. Ecol.*, 2001, **41**: 352~359.
- [52] Ross N, Villemur R, Marcandella E, *et al.* Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm. *Microb. Ecol.*, 2001, **42**: 56~68.
- [53] Ibekwe A M, Papiernik S K, Gan J, *et al.* Yates. Impact of fumigants on soil microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 3245~3257.

#### 参考文献:

- [14] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南, 第二版, 1989.

