

代表活性污泥中苯酚降解菌群的 ERIC-PCR 产物片段的多态性

高平平², 王 健², 席玉英³, 赵立平^{1*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 山西大学生物技术研究所, 太原 030006; 3. 山西大学环境与资源学院, 太原 030006)

摘要:对可能代表活性污泥中两个时期的主要苯酚降解菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱中的两条 2.1 kb 的条带 (P1 和 P8) 中的 DNA 片段进行克隆、转化, 得到 193 个转化子。Hinf I 物理图谱分析得到 35 种酶切类型, 将两端各进行 1 次测序后, 同源性大于 90% 的克隆归为一类, 共得到 10 种序列类型。对各类型的代表克隆进行了全长测序, 5 种类型为 P1 条带所有, 3 种类型为 P8 所有, 二者共享的类型为 2 种, 丰度最高的片段为 S3, P1 条带中 76.3% 的转化子和 P8 条带中 66.7% 转化子属该类型。对所得序列进行检索分析, 它们与 GenBank 中已知基因序列均无显著同源性。用 S3 特异性引物对活性污泥样品及其它在 LB、dCGY、MP 和 FWM 培养基上的回收菌进行扩增, 除 LB 上的回收菌没有显示目的条带外, 活性污泥和其回收菌中均检测到带有该基因组片段的菌种的存在。研究为专一性分离降解活性污泥中的优势菌提供了分子探针。

关键词:群落结构 ERIC-PCR 指纹图; 特征性条带; 基因组片段测序

Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge as reflected by composition of ERIC-PCR fragments in a function-associated signature band of communities' fingerprints

GAO Ping-Ping², WANG Jian², XI Yu-Ying³, ZHAO Li-Ping^{1*} (1. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; 2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006; 3. School of Environment and Resources, Shanxi University, Taiyuan 030006). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(6): 1095~1100.

Abstract: One 2.1 kb signature DNA band whose intensity was correlated to phenol degrading efficiency of activated sludge was identified from ERIC-PCR DNA fingerprints after one-month monitoring of structural dynamics of microbial communities in a phenol-degrading activated sludge system. The DNA fragments from the signature bands (P1 and P8) of ERIC-PCR profiles at first and eighth monitoring stage (three weeks apart) were eluted from the agarose gel and cloned into pGEM-T Easy vector. A total of 193 transformants were obtained and physically mapped with Hinf I into 35 groups. One sequence reaction from each end of 35 representative clones was undertaken. The 35 physical mapping groups were grouped

基金项目: 国家“863”高科技研究发展计划资助项目 (No. SZ-03-01-04, 2001AA214131)

收稿日期: 2002-07-07; 修订日期: 2003-03-10

作者简介: 高平平 (1957~), 女, 山西洪洞人, 博士生, 主要从事微生物分子生态学 research。

* 通讯联系人 Author correspondence, lpzhao@mail.sjtu.edu.cn

Foundation item: the Hi-Tech Research and Development Program of China

Received date: 2002-07-07; Accepted date: 2003-03-10

Biography: GAO Ping-Ping, Ph.D. candidate, main research field: molecular microbial ecology.

into 10 types after clones sharing 90% sequence homology were considered as the same type. Each representative clone from the ten groups was fully sequenced. It was found that the 10 representative DNA fragments showed no significant homology with all known sequences in the database after BLAST analysis against GenBank. Two types of fragments were shared between the P1 and P8 bands, while 5 types were only found in P1, other 3 only in P8. The change of DNA fragment composition in the two bands was a reflection of the dynamics of population composition in the phenol-degrading consortium. Phenol removal efficiency remained similar between the two stages but population structures changed as a response to changes of pollutant concentrations in the feeding water. S3 was the most abundant fragment in all groups, accounting for 76.3% of all clones from P1 and 66.7% of that from P8 respectively. The specific amplification of DNA bands with S3 specific primers showed that the corresponding functional bacteria were detected in the activated sludge from M1 stage and its recovered colony mixtures from dCGY, MP and FWM media of the same sludge sample, but not from LB medium. Probes and primers designed to specifically detect the presence of the S3 containing bacteria can thus be used to isolate the potentially functional bacteria to realize the so called "sequence-guided isolation" strategy.

Key words:ERIC-PCR community fingerprinting; signature band; genomic fragment sequencing

文章编号:1000-0933(2003)06-1095-06 中图分类号:Q938.1 文献标识码:A

对大量有重要生态功能,但尚难以分离培养的细菌的研究和利用是环境微生物学领域中一个具有重要理论价值和前景的方向^[1~3],因此许多可直接对环境样品中微生物组成进行分析的分子生物学方法,如 16S rDNA/18S rDNA-PCR 的 DGGE/TGGE 分析、RAPD-PCR 指纹图分析等被越来越多的应用于微生物种群结构特征、系统多样性、动力学变化和相互作用等方面的研究^[4~6]。这些不依赖于分离培养的方法为比较全面、客观认识微生物区系结构特征,了解一些主要功能菌群在环境中的生态作用等提供了可行的途径,也为实现基因组序列引导下的重要功能细菌的分离鉴定提供了手段^[7]。发展和探讨新的研究技术和方法一直是分子生态学领域的一项重要内容^[1]。

作者对 ERIC-PCR——一种广泛用于纯培养细菌分类、鉴定和系统进化的基因组指纹图谱技术,用于复杂环境微生物群落生态学研究的可行性进行了探讨。用该技术对焦化废水处理系统中的活性污泥种群结构进行了 8 个时间点的连续动态跟踪研究,一条大小为 2.1kb 的 DNA 条带的消长与活性污泥的苯酚降解效率表现出一定的正相关,可能是一些主要功能降解菌的特征性条带^[8]。在本研究中对两个监测时期活性污泥 ERIC-PCR 指纹图谱中 2.1kb 的 DNA 片段进行了回收、克隆和序列多态性分析,探讨了由这些基因组 DNA 片段代表的细菌种群结构与环境变化的关系,并设计了其基因组专一性 DNA 探针,为用分子生物学方法分离废水处理系统中的主要功能降解菌提供了一条可行之路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 活性污泥来源和特点 活性污泥样品取自山西某焦化厂污水处理厂第 1 曝气池(TJ1)。该焦化废水处理厂采用两级曝气(AB 法)处理工艺,其中 TJ1 活性污泥为降解污染物的主体,对酚类化合物和氰化物的去除率分别在 90%~99%和 70%~95%之间,COD_{Cr} 的去除率最高约为 70%左右。在 2000 年 5 月对该系统进行了每隔 3d 1 次,连续 8 次的系统跟踪监测,分析指标包括主要污染物浓度测定、污泥沉降值、主要污染物降解效率和微生物群落结构的 ERIC-PCR 图谱分析等。本研究的对象为第 1 和第 8 监测时期(M1 和 M8)的活性污泥样品。

1.1.2 菌种回收培养基 苯酚降解菌选择性培养基(dCGY)^[9]、以苯酚为唯一碳源和能源的基本培养基(MP)^[9]和本室发展的含酚焦化废水培养基(feed water medium, FWM)被用于从活性污泥中回收分离细菌菌群。对照培养基为牛肉膏蛋白胨丰富培养基(LB)^[14]。FWM 配制方法如下:取经调节池调节,尚待处理的焦化废水(TJ)1L;高速离心(10,000×g, 5min)后,将上清液过滤除菌(0.22μm 细菌滤膜),测定生废水苯

酚含量,用化学纯苯酚将 FWM 中的苯酚量调整到 300mg/L。将含有 1.8g 琼脂粉的三角瓶灭菌后(121℃, 0.105 MPa, 25min),取 100ml 的无菌废水加入其中,微波炉加热溶解琼脂后倒平板。

1.1.3 主要试剂及酶类 限制性内切酶(*Hinf* I), *Taq* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, PCR 产物回收试剂盒, DNA marker, pGEM-T Easy 载体等均购自 Promega 公司, IPTG 和 X-Gal 购自北方同正公司, 抗生素、LB 培养基购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 活性污泥总 DNA 提取采用文献方法^[10]

1.2.2 活性污泥回收菌的获得和基因组 DNA 提取 取 M1 时期的解絮凝的活性污泥样品(100 μ l)分别在 LB、dCGY、MP 和 FWM 平板上涂板培养(28℃, LB:24h; dCGY 和 FW:72h; MP:96~120h), 每个培养基设 3 个重复。平板上菌落直径多数达到 1~2mm 后, 用 5ml 的无菌水洗涤平板, 收集菌体。将回收菌群分装在灭菌的 1.5ml Eppendorf 管(含有 20%甘油)并保存在 -70℃ 冰箱中备用。细菌基因组 DNA 提取按文献^[11]。

1.2.3 DNA 浓度测定 用 DyNA QuantTM200 荧光仪(Hoefer Pharmacia Biotech)测定 DNA 浓度。

1.2.4 PCR 扩增反应 ERIC 引物设计参照 Versalovic^[12], S3 特异性引物为本室设计。两对引物由 TaKaRa(大连)公司合成, 序列如下:

ERIC 引物 ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'

ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

S3 引物 S3-f 5'-GACATTGATGCTGCCAATTTT-3'

S3-r 5'-CAAAGATTGAGCCTACGCAAC-3'

25 μ l 的反应体系中含有 2 μ l dNTP(2.5mmol/L), 2.5 μ l 10 \times Buffer, 2 μ l MgCl₂(25mmol/L)和 0.5 μ l *Taq* 酶(5u/ μ l)。引物量为 12.5 p mol, DNA 模板量 60ng。ERIC-PCR 和 S3 特异性扩增反应程序参照 Di Giovanni^[13], 反应循环为 95℃ 预变性 7min, 94℃ 10s, 92℃ 40s, 49℃ 8s, 52℃ 1min, 74℃ 10s, 72℃ 5min, 共 35 循环, 最后 72℃ 终延伸 10min。

1.2.5 PCR 扩增产物的检测 用 1.5% 琼脂糖凝胶(含有溴化乙锭 1.5 μ g/ml)进行电泳检测, UVP-GDS8000 凝胶成像系统(Ultra-Violet Product Ltd)拍摄纪录结果。

1.2.6 2.1kb 条带的回收、纯化和克隆 将目标条带中的 DNA 片段洗脱、回收、连接到 pGEM-T Easy 载体上, 转化到 DH5(*E. coli*)DH5 α 中, 具体方法参考《分子克隆实验指南》^[14]及 Promega 公司试剂说明书。

1.2.7 克隆的筛选、酶切、测序和同源性分析 随机从含有 X-Gal 和 IPTG 的平板上筛选克隆, 每个条带筛选 100 个左右转化子, 用碱裂解法提取质粒; 对质粒进行 *Hinf* I 酶切分析, 按物理图谱将克隆分型; 每种类型选择 1 个转化子进行 DNA 序列测定, 测序工作由 Sangon(上海)完成。用 DNAMAN 和 GeneTool 等工具和软件对测序结果进行编辑、分析。序列结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索。

2 结果与分析

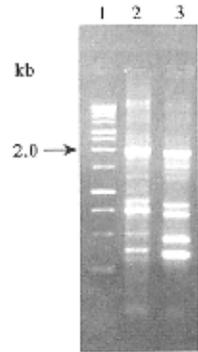
2.1 2 个监测时期活性污泥的 ERIC-PCR 扩增结果

对 M1 和 M8 两个监测时期的活性污泥样品进行 ERIC-PCR 扩增, 结果见图 1。图谱中 2.1kb 处有 1 条主带, 分别命名为 P1 和 P8。前期结果表明, 当该主带亮度减弱到几乎消失时, 系统中活性污泥的苯酚降解效率也最低, 因此该条带代表的细菌菌群可能与系统高效降解苯酚有一定的相关性^[8]。为了验证这个结论, 有必要对该条带中的 DNA 片段进行克隆、测序, 并以此为线索设法分离相关菌群。另外 M1 和 M8 监测时期间隔 21d, 这两个时期活性污泥对苯酚的降解效率虽然相差不大, 但进水中污染物组分和浓度却有较大差异。M1 时期, 氰化物浓度为 34.75mg/L, 是监测时期废水中氰化物平均值的 3.22 倍, 此时废水中的酚含量为 43.63mg/L, 低于平均值(68.06mg/L)。21d 后的 M8 时期, 废水中的氰化物浓度仅为 5.2mg/L, 而苯酚含量达到 132.82mg/L。因此, 这两个时期主要功能菌群的组成可能也有变化, 这将会在其 ERIC-PCR 图谱中**序带数据** A 片段组成上反映出来。于是对这两个时期活性污泥 ERIC-PCR 指纹图谱中的 2.1kb 的片段进行 DNA 组分分析。

2.2 重组质粒的提取及酶切分析

将 P1 和 P8 条带从凝胶中切割,分别回收其中的 DNA 片段,与 pGEM-T Easy 载体连接,转化到 *E. coli* DH5 α ,在含有 X-Gal、IPTG 和 ampicillin 的 LB 平板上涂板培养,随机挑取 229 个克隆(P1,120 个;P8,109 个)。质粒 DNA 提取和电泳检测表明 193 个克隆为含有目的片段的重组子,其中含有 P1 插入片段的转化子为 97 个,含有 P8 片段的重组子为 96 个。对 193 个重组质粒进行 *Hinf* I 酶切分析,共得到 35 种物理图谱类型(图 2),命名为 S1-S35。P1 表现为 20 种类型,其中 S3 和 S4 为主要类型,二者占总数的 49.5%,其余 49 个转化子分属 18 个类型。P8 片段的酶切结果为 27 种类型,12 种类型和 P1 共享,不同于 P1 条带的有 15 种类型,以 S3、S4 和 S5 三种类型为主,占总克隆数的 37.5%。

2.3 重组质粒测序结果和同源性分析



1 M1 和 M8 监测时期活性污泥的 ERIC-PCR 指纹图谱
Fig. 1 ERIC-PCR fingerprinting of activated sludge from M1 and M8 monitoring stage
1, 1kb ladder; 2, M1; 3, M8

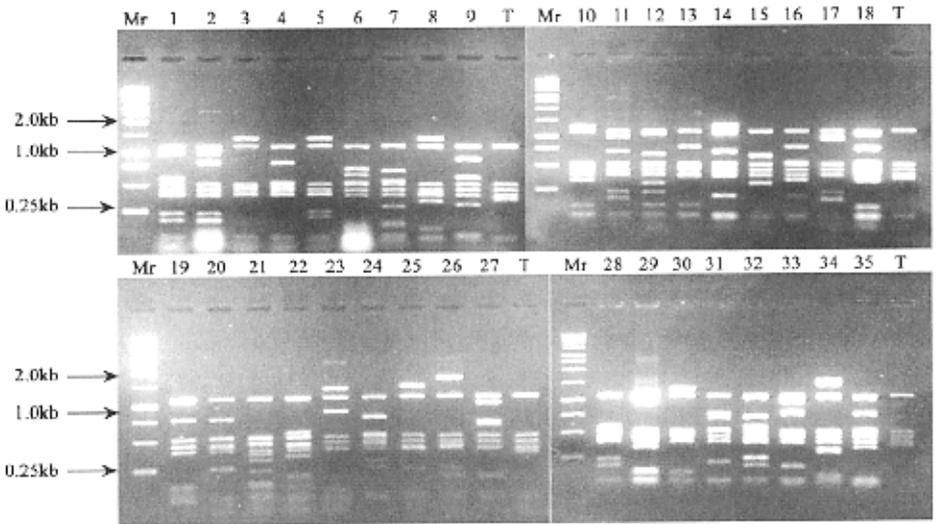


图 2 35 个代表类型的转化子 *Hinf* I 酶切图谱

Fig. 2 *Hinf* I profiles of 35 representative clones.

Mr:1kb ladder; T:T-East vector; 1-35:representative clones

193 个转化子共表现为 35 种不同酶切类型(S1-S35),每种类型选一个转化子,两端各进行 1 个测序反应,将同源性 $\geq 90\%$ 的片段归属一类,排除反向插入的类型,共得到 10 种不同类型的 DNA 片段,每个类型选择一个代表克隆进行全长测序。两个条带中 10 种类型片断丰度分布见表 1。

从表 1 可知不同类型插入片段的丰度差异非常明显,丰度最高的是 S3,P1 条带中 76.3%的转化子和 P8 条带中 66.7%转化子归属该类型;其次为 S1,在两条条带中所占比例分别为 16.5%和 28.1%。在所有转化子中,含有 S3 序列的重组子数目共 138 个,丰度为 71.5%;含有 S1 的质粒数目为 43,丰度为 22.3%。S1 和 S3 类型为 P1 和 P8 条带所共有,占总数的 93.8%,其它 5 种类型为 P1 条带所独有,3 种类型为 P8 的专一性条带。两个条带的主要组分相同,说明它们代表的主要降解细菌种群结构基本一致,在部分细菌种群组成上存在差异可能与两个时期废水中主要污染物的组分和浓度变化有关。

对 10 种代表类型 DNA 片段进行检索分析,10 个片段与 GenBank 中任何已知基因序列均无显著同源

性。预示这些基因组 DNA 片段代表的可能是一些新的细菌种类,也可能代表在基因水平上研究较少的已知种类。

表 1 两个特征性条带中 10 个不同基因组片段的多态性分布

Table 1 Abundance of clones from P1 and P8 signature bands based on sequence analysis

类型 Type	S1	S1	S3	S3	S7	S9	S12	S15	S19	S21	S33	S34
数量 Number of clones	16	27	74	64	1	3	1	1	1	1	1	3
丰度 Abundance(%)	16.5	28.1	76.3	66.7	0.5	1.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.6
来源 Signature band	P1	P8	P1	P8	P1	P1	P1	P1	P1	P8	P8	P8

2.4 特异引物 PCR 扩增结果

S3 序列的丰度最高,是 P1 和 P8 条带的主要组分。根据该序列 5' 和 3' 端约 500bp 处碱基序列设计特异性引物并对 M1 时期活性污泥及其它在 LB、dCGY、MP 和 FFW 培养基上的回收菌的总基因组 DNA 进行扩增检测,这种专一性扩增的产物长度约为 1.1kb。图 3 显示,除 LB 上的回收菌没有显示条带外,活性污泥和其它回收菌中均有 1.1kb 的目的条带出现,表明活性污泥和其它 3 种培养基的回收菌中都有这些主要功能降解菌群存在。

3 讨论

用酶切图谱和测序分析的方法对 P1 和 P8 两个主要功能降解菌群的特征性 DNA 条带进行研究,表明它们是大小相同但序列不同的基因组片段的混合物。这些片段的组成反映了细菌种群的组成特征。

Whiteley 等^[7]对一个工业规模污水处理系统的微生物区系结构、生理特性和一些主要污染物(总酚量、pH、硫氰酸、氰化物、氨、总有机氮和活性污泥浓度)的相关分析表明,一个处理系统中微生物区系的形成和变化与不同的选择压相关。在所检测的污染物中,总酚含量对某些功能菌群如 γ -Proteobacteria 的种群结构和生理活性有极明显的调控作用,其次为硫氰酸盐。

在本研究中,M1 和 M8 时期系统的降酚和降解氰化物的效率较好,分别为 99.1%,92.7% 和 97.8%,87.7%,但 M1 时期焦化废水中的苯酚浓度较低,而氰化物为监测时期最高。M8 时期,处理废水中的酚浓度为 8 个时期的最高,氰化物浓度相对较低。P1 和 P8 条带组分分析显示在这两个时期它们所代表的系统中的细菌群落结构有差异。因此,当环境发生变化时,群落在维持功能稳定的时候就需要相应调整其种群结构。同样,微生物群落结构要保持稳定则其功能就会发生变化。这种环境条件-群落结构-生态功能的互作关系,是群落生态学中的一个重要理论问题,本课题为深入研究这个问题提供了模型和分子监测手段。

Brinkhoff 等^[15]在对已知硫氧化细菌(Sulfur-oxidizing *Thiomicrospira*)和不同变形杆菌亚纲细菌的 16S rRNA 序列对比分析的基础上发展了硫氧化细菌特异性引物,用特异性 PCR 扩增的方法对不同生态系统中硫氧化细菌 *Thiomicrospira* 的存在进行了分析,并尝试用富集培养和选择培养的方法对它们进行分离。通过对在培养基上获得的分离物进行特异引物 PCR 扩增和引物专一性探针杂交的方法,从几种不同的生态系统中分离到 7 种新的 *Thiomicrospira* 菌株,是一个典型的“序列引导下”的分离重要细菌的成功案例。用 S3 特异性引物对活性污泥和它在 dCGY、MP 和 FWM 培养基上的回收菌进行特异扩增,显示出较好的专一性,均检测到带有 S3 片段的功能降酚菌群的存在。如果把 S3 进行 DIG 标记,制备专一性探针,有可能用探针杂交对这些菌群进行分离,这种用未知细菌的基因组片段辅助分离该细菌的做法是非常值得尝试的一个技术路线,有关工作正在进行之中。

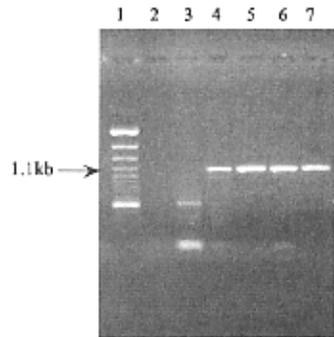


图 3 含有 S3 序列的细菌在不同样品中的专一性检测
Fig. 3 PCR detection for the presence of bacteria containing S3 fragment.

LB 丰富培养基的回收菌中没有检测到目的条带,可能与 LB 培养基对细菌种群的选择性有关。Wagner 等用探针原位杂交和培养相结合的方法对一活性污泥处理系统中两个高、低负荷曝气池的活性污泥微生物种群结构进行了研究,显示用丰富培养基培养的方法对活性污泥中的微生物种群进行描述具有很大的片面性。LB 培养基对活性污泥系统中一些细菌种群如 β -亚纲的变形杆菌有着明显的选择作用,对变形杆菌 α -亚纲的一些细菌菌群如肠杆菌等有着较好的回收能力^[16]。

本研究对群落结构指纹图谱中与苯酚降解菌群相关的特征性条带的 DNA 片段组成特征及其序列特点进行了解析,得到功能菌群的部分基因组序列信息并发展了基因组专一性探针,这对用分子生物学的方法辅助分离一些用常规方法分离不到的重要微生物功能类群提供了可行的技术路线,对实现大量难培养细菌的基因资源的研究利用具有一定的参考价值。

References:

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**(1): 143~169.
- [2] Naimuddin M, Kurazono T, Zhang Y H, et al. Species-identification dots: a potent tool for developing genome microbiology. *Gene*, 2000, **261**: 243~250.
- [3] Van Elsland J D, Duarte G F, Rosado A S, et al. Microbiological and molecular biological methods for monitoring inoculants and their effects in the soil environment. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, **32**:133~154.
- [4] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprintings. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **44**:253~262.
- [5] Vallaeyts T, Topp E, Muyzer G, et al. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, **24**:279~285.
- [6] Felske A, Wolterink A, van Lis R, et al. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, **30**:137~145.
- [7] Whiteley A S and Bailey M J. Bacterial Community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**(6): 2400~2407.
- [8] L Zhao, P Gao, et al. ERIC-PCR as a community fingerprinting technology for identification of functional components in activated sludge for wastewater treatment in coke industry. *Proceedings of 101st Annual Meeting of American Society of Microbiology*, Orlando, FL., 2001. 600.
- [9] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbio.*, 1998, **64**(11): 4396~4402.
- [10] Gao P P, Zhao L P. DNA Extraction from Activated Sludge for Microbial Ecological Analysis. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, **22**(5):236~240.
- [11] Zhao L P, Xiao H, Li Y Q, et al. ERIC-PCR as a new tool for quick identification of environmental bacteria. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 1999, **5** (Suppl):30~33.
- [12] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 1991, **19**:6823~6831.
- [13] Di Giovanni G D, Watrud L S, Seidler R J, et al. Fingerprinting of mixed bacterial strains and BIOLOG Gram-Negative(GN) substrate communities by enterobacterial repetitive intergenic consensus Sequence-PCR (ERIC-PCR). *Current Microbiology*, 1999, **38**:217~223.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory manual. 2nd ed.. Beijing: Science Press, 1999.
- [15] Brinkhoff T and Muyzer G. Increased species diversity and extended habits range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* SPP. *Appli. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(10):3789~3796.
- [16] Wagner M, Amann R, Lemmer H, et al. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appli. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**(5):1520~1525.

参考文献:

- [10] 高平平,赵立平. 可用于微生物群落分子生态学研究的活性污泥总 DNA 提取方法研究. *生态学报*, 2002, **22** (11): 2015~2019.
- [11] 赵立平,肖红,李艳琴,等. ERIC-PCR: 一种快速鉴定环境细菌菌株的方法. *应用和环境生物学报*, 1999, **5**(增刊):30~36.
- [14] J. 萨姆布魯克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1999.