

用 ERIC-PCR 结合分子杂交监测焦化废水处理系统 (A²/O) 中微生物群落结构的变化

陈 敏^{1,2}, 魏桂芳¹, 高平平¹, 王凌华¹, 庞晓燕¹, 赵立平¹

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物分子生态学与生态基因组学实验室, 上海 200240;

2. 杭州师范学院生命科学学院, 杭州 310012)

摘要: 建立一种不依赖纯培养, 可以在废水处理工业现场使用的监测微生物群落结构变化的分子技术。以处理焦化工业废水 (A²/O 生物膜工艺) 不同构筑物中的悬浮污泥的微生物群落为研究对象, 每周采样 1 次, 连续 4 周。获得悬浮污泥总 DNA 的 ERIC-PCR 指纹图谱, 结合分子杂交进一步区分相同条带间的不同序列信息。结果表明, 在缺氧池 (A₂ 池) 和好氧池 (O 池) 之间, 各个采样点的 ERIC-PCR 图谱差异不大, 悬浮污泥在各构筑物之间交流充分; 同一采样点的图谱在不同采样时期具有明显差异, 显示了在此期间微生物群落的连续动态变化过程。通过对生物膜系统中悬浮污泥的微生物群落结构的指纹图谱分析, 可开发出对该系统微生物群落结构动态变化进行检测的技术。

关键词: ERIC-PCR; 指纹图谱; 分子杂交; 污水处理

Using ERIC-PCR and molecular hybridization for monitoring changes in the structure of microbial community in coking wastewater treatment system

CHEN Min^{1,2}, WEI Gui-Fang¹, GAO Ping-Ping¹, WANG Ling-Hua¹, PANG Xiao-Yan¹, ZHAO Li-Ping¹ (1. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. School of Life Science, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310012, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(7): 1330~1334.

Abstract: A culture-independent approach to monitor changes in the structures of microbial communities in industrial scale treatment basins was developed. Sludge samples were taken from the wastewater treatment system (A²/O, A1: Anaerobic tank; A2: Anoxic tank; O: Oxidic tank) of a local coking plant. Suspended sludge was collected weekly from six different locations in different tanks over a period of four weeks. The total DNA was extracted and ERIC-PCR was used to generate DNA fingerprints. Southern blot was carried out to compare sequence homology between identical bands with microbial community probes, which were labeled from the ERIC-PCR products of one sample.

The results showed that the ERIC-PCR banding patterns of the A2 and O tanks were identical, and the microbial community structures in these tanks were similar, which suggests that the suspended sludge was mixed completely between the two tanks. In contrast, the ERIC-PCR profiles produced from the A1 samples were distinct from those of the A2 and O samples, with both common and unique bands apparent. Thus, the microbial communities of the different tanks could be differentiated on the basis of their ERIC-PCR banding patterns. The banding patterns of ERIC-PCR fingerprint analysis of samples collected simultaneously from different locations within a single tank were identical. This indicated that the compositions of microbial communities from different locations within a single tank were comparable. Dynamic changes with time in the microbial community structures in the A2 and O tanks were visualized by banding pattern shifts after molecular hybridization of the profiles with total ERIC-PCR products of the O tank as mixed probes. The shifts recorded during the four-

基金项目: 国家高科技研究发展计划项目 ("863" 项目计划) (SZ-03-01-04, 2001AA214131)

收稿日期: 2003-12-10; 修订日期: 2004-04-10

作者简介: 陈敏 (1963~), 女, 浙江绍兴人, 副教授, 主要从事微生物分子生态学研究。E-mail: mchen63@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lpzhao@mail.sjtu.edu.cn

Foundation item: the Hi-Tech. Research and Development Program of China (No. SZ-03-01-04, 2001AA 214131)

Received date: 2003-12-10; Accepted date: 2004-04-10

Biography: CHEN Min, Associate professor, mainly engaged in molecular microbial ecology. E-mail: mchen63@163.com

week study indicated that the structures of the microbial communities were not static but rather dynamic. This was particularly apparent during the third week when the number of bands decreased and one band (1.25 kb) disappeared. ERIC-PCR banding patterns of sludge samples at 4 stages recorded mean Cs values of 49.2% in tank A2 and 56.7% in tank O.

ERIC-PCR fingerprinting coupled with molecular hybridization may be a practical method to monitor the changes in microbial community structures in wastewater treatment systems.

Key words: ERIC-PCR; microbial community probes; wastewater treatment

文章编号:1000-0933(2004)07-1330-05 中图分类号:Q938.1 文献标识码:A

污水生物处理技术是环境保护中最重要的技术方法之一,其原理主要是通过微生物对各种有机污染物的降解作用。无论是活性污泥或生物膜装置,其反应的主体都是由各种细菌、真菌、藻类和原生动植物等构成的一个复杂的微生物生态系统。装置的运行是以其中的微生物种群为基础的,种群结构的变化决定了其处理功能的变化。通过研究微生物群落结构动力学变化与降解功能的关系,就有可能在提高装置的处理效果、降低运行成本、扩大处理能力等方面取得显著效果。因此,污水处理装置中的微生物相可以起到指示生物的作用,由此来检查、判断处理装置的运转情况和污水处理效果。

但是,过去受传统分离培养方法的限制,人们对环境中的复杂微生物群落的组成及功能没能得到深入的认识。以污水生物处理为例,由于技术的局限,毫无疑问使一些关键问题无法得到解决,如活性污泥的膨胀;主要优势功能菌的鉴定及其生长速率的测定等等。对微生物群落结构变化规律的认识不足,直接影响了生产实际中污水处理的效果。

近年来,人们开始发展一些新方法研究环境中的微生物群落,其中 BIOLOG 鉴别系统是重要的方法之一^[1],它是通过微生物对一系列(95种)唯一碳源利用能力上的差异来加以鉴别。这种方法的局限性是仍然必须基于微生物的可培养性。完整细胞的方法也一直用于对微生物群落的鉴别上,它是基于在添加了不同底物的各种土壤中对微生物细胞呼吸作用的测定^[2]。此外,White 等人也曾描述了用脂质生物标记的方法来鉴别微生物群落^[3]。而作为分子生物学方法引入生态学研究的结果,人们可以通过直接分析自然环境中微生物的 DNA/RNA 来分析和鉴别微生物,这些方法包括 RFLP^[4],TGGE/DGGE^[5],以及 ERIC-PCR 指纹图的方法^[6]等。

ERIC 序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence)是首先在肠道细菌基因组中发现的长为 126bp 的非编码保守重复序列^[7],随后相继又在其他许多肠道的、非肠道的细菌中发现了 ERIC 序列。ERIC 序列在不同细菌中的拷贝数和定位都不同。利用 ERIC 保守序列设计的引物对细菌 DNA 进行 PCR 扩增,可以得到反映细菌基因组结构特征的谱带,因此可广泛用于细菌鉴定、分类等研究^[8]。在后来 Gillings 等人^[9,10]的工作中发现 ERIC 引物在扩增过程中并不一定匹配 ERIC 序列,而实际上是随机结合的,ERIC-PCR 实际上是随机的扩增技术。人们曾以肠道微生物区系和活性污泥微生物区系为研究对象,探讨了 ERIC-PCR 在分析和检测细菌种群结构动态变化中的作用。研究表明,用 ERIC-PCR 分析所得到的指纹图谱,在比较不同群落结构特征的差异以及同一群落在一段时间内微生物种群的变化过程是有效的^[11]。

本研究直接以污水处理构筑物为研究对象,旨在以 ERIC-PCR 为基础并结合分子杂交,建立一种不依赖于纯培养、可以直接对构筑物中微生物群落变化进行动态监测和精细比较的分子方法。

1 材料与方法

1.1 污泥样品

取自上海某焦化厂 A²/O 生物膜污水处理系统(A1:厌氧池;A2:缺氧池;O:好氧池)。共设置 6 个采样点,分别是 A1 池中间、A2 池进水、A2 池中间、O 池进水、O 池中间、O 池出水。每个点采集悬浮污泥水样约 2000 ml。每间隔 1 周采样 1 次,连续 4 周。

1.2 样品处理

污水样品,10000×g 5 min,收集沉淀。加 5 倍体积的 TENP buffer 加玻璃珠充分旋涡,10000×g 5 min,收集沉淀(重复 2 次)。加 5 倍体积的 PBS buffer,旋涡,收集沉淀(重复 2 次)。加 PBS 悬浮,分装试管(10 ml 离心管,每管加 4 ml 悬浮液和 1 ml 甘油),旋涡均匀,-70℃ 保藏。

1.3 总 DNA 提取及纯化

样品 0.3 g~0.5 g(10 ml 离心管),加 2 ml extraction buffer 悬浮,加 2 粒玻璃珠旋涡 5 min。加入 2 ml 2% SDS buffer,上下颠倒 10 min(放置冰上)。13000×g 10 min,收集上清。加入 4 ml 酚轻轻混匀。13000×g 15 min,取上清。加入 2 ml 酚和 2 ml 氯仿,颠倒几下混匀,13000×g 15 min,取上清。加入 4 ml 氯仿,颠倒几下混匀。13000×g 15 min,取上清。加入 0.6 倍体积异丙醇,混匀,-20℃ 1 h 或过夜。14000×g 20 min,弃上清。沉淀用 70% 乙醇洗 1 次,冷冻干燥。100 μl TE 或超纯水悬浮,加入 1.5 μl RNase H(10 U/ml)37℃ 消化 20 min。 -20℃ 保藏。必要时,DNA 样品用“MOBIO”DNA purification Kit 过柱纯化。

1.4 ERIC-PCR 引物序列

ERIC1R; 5'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-3'; ERIC2; 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'。

反应体系与反应参数见文献^[8]。

1.5 探针标记与 DNA 分子杂交

选 ERIC-PCR 图谱中条带数最多的污泥 DNA 样品(O 池进水点样品), PCR 扩增后产物过柱纯化, 地高辛标记做成微生物群落结构探针(DIG DNA Labeling and Detection Kit)^[12]。

1.6 图谱的相似性分析

用 Sorenson 配对比较相似性系数(pairwise similarity coefficient, C_s)比较 ERIC-PCR 指纹图谱的相似性^[13]。

2 结果与分析

2.1 不同处理池微生物群落遗传指纹图分析

图 1 所示是同一时间分别取自 A1、A2 和 O 池中央悬浮污泥样品的 ERIC-PCR 指纹图谱。结果显示, A2 和 O 池的指纹图相似, 均显示约 14 条清晰可辨的条带, 且主带位置一致, C_s 值为 100%; 而 A1 池指纹图明显不同于 A2 和 O 池, 既显示了共同的条带又存在独特的条带, 其条带数较少, C_s 值仅为 40%。此图谱反映了在同一时间不同处理池悬浮污泥中微生物群落结构的基本状况, 可以初步判断 A2 和 O 池悬浮污泥中微生物的组成是相似的。分析原因可能与两池之间污水有交流有关, 因为 A2 池的水直接流入 O 池, 而 O 池的水有部分回流至 A2, 即两池的水是循环交流的, 这样可能就导致了 A2 和 O 池的悬浮污泥中微生物群落结构的相似性。另一方面, 为了考察总 DNA 提取、PCR 扩增以及凝胶电泳分离方法的可重复性, 分别将 A1、A2 和 O 池的样品分成相同的两份进行平行重复实验, 结果表明重复试验产生的指纹图非常一致。

2.2 同一处理池不同采样点微生物群落遗传指纹图分析

除 A1 池以外, A2 和 O 池均设置了进水处(S1)、池中间(S2)和出水处(S3)3 个采样点。因 A2 和 O 池有管道相通, 即 A2 出水就是 O 池进水, 故 A2 池实际只有两个采样点(进水和池中间)。如图 2(a)所示, A2 或 O 池不同采样点悬浮污泥样品的 DNA 指纹图相同, 说明各采样点之间的微生物群落组成没有显著差异。

但这种以比较条带的数目、位置和亮度的指纹图方法, 只能是初步判断样品间微生物组成的异同, 确切的判断还应该提供相应条带之间的序列信息。为此, 使用了微生物群落结构探针的方法, 即选取图谱中条带数最多的 O 池进水点样品[如图 2(a) Lane 6], ERIC-PCR 扩增后用地高辛标记 PCR 产物, 做成探针。如图 2(b)所示是 A2 和 O 池不同采样点样品的 ERIC-PCR 图谱与群落结构探针杂交所得到的相应的 Southern blot 图谱, 基本显示了与 ERIC-PCR 指纹图分析相一致的结果。

根据以上结论, 在以后的研究中, 每个处理池只需选择一个采样点即可。

2.3 不同监测时期 A/O 池中微生物群落结构的变化

图 3 所示是 4 个不同时期 T1、T2、T3 和 T4(每间隔 1 周)分别从 A2 和 O 池采集样品的 ERIC-PCR 指纹图(A)以及与群落结构探针杂交所得的相应的 Southern blot 图谱(图 3b)。结果表明, 这 4 个时期系统中的优势种群是相对稳定的, 但同时也显示了整个群落的连续变化过程。前者表现为共有一些主带, 后者则主要表现为条带数目及条带亮度上的变化, 较明显的是 1.25 Kb 处的条带(红色箭头所示), 第 1、第 2 周时此条带清晰可辨, 第 3 周时条带消失, 第 4 周又重新出现, 但较弱。此外, 图 3 也显示了 A2 池的变化过程与 O 池是一致的, 这再次说明了这两个池子悬浮污泥的主要微生物组成及数量是相

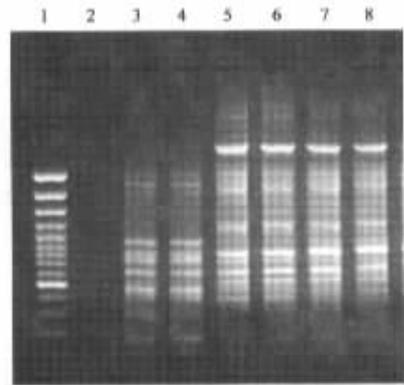


图 1 同一监测时期 A/O 池的 ERIC-PCR 指纹图

Fig. 1 The banding patterns produced by ERIC-PCR analysis of samples collected from A1, A2 and O tank at the same time

1: 分子量标记 Mr(1 Kb ladder); 2: 阴性对照 Negative control; 3~4: 厌氧池 Anaerobic tank; 5~6: 缺氧池 Anoxic tank; 7~8: 好氧池 Oxidic tank

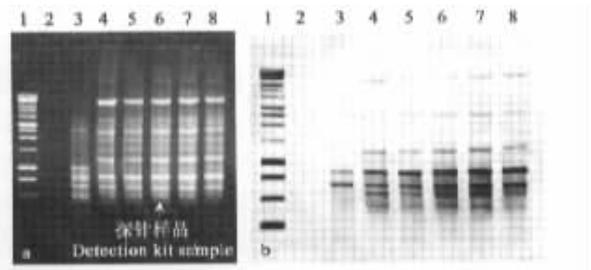


图 2 同一监测时期 A/O 池不同采样点的 ERIC-PCR 指纹图(a) Southern blot(b)

Fig. 2 The banding patterns produced by ERIC-PCR fingerprint analysis of samples collected from different locations within the A1, A2 and O tank at the same time(a) Southern blot(b)

1: 分子量标记 Mr(1 Kb ladder); 2: 阴性对照 Negative control; 3: A1; 4: A2-S1; 5: A2-S2; 6: O-S1; 7: O-S2; 8: O-S3
A1: 厌氧池 Anaerobic tank; A2: 缺氧池 Anoxic tank; O: 好氧池 Oxidic tank; S1: 进水处 inlet; S2: 池中间 middle; S3: 出水处 outlet

似的。

4 个不同时期 A₂ 和 O 池样品的 ERIC-PCR 指纹图谱的 C_s 值分析如表 1 所示。

从以上实验结果充分说明了 ERIC-PCR 指纹图结合微生物群落结构探针的方法,可用于监测复杂微生物群落的结构特征及优势种群的动态变化。

3 讨论

3.1 关于 ERIC-PCR

ERIC-PCR 是以分布在细菌基因组中的重复共有序列为基础的 DNA 指纹分析技术。从环境样品中提取的总 DNA 为模板进行 ERIC-PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离形成每一微生物群落所特有的条带图谱。条带的数量、确切的位置和亮度,反映了微生物群落结构的特征。这样,对环境微生物群落结构的分析已转化为对其 DNA 指纹图的分析。就一些图谱会比较复杂的微生物系统而言,可通过建立数量测定的方法对图谱进行客观的分析,如用 C_s 系数^[13]比较图谱间的相似性;用 Shannon 指数^[14]来计算群落多样性的变化。图谱中每一条带来自源于不同的细菌,同一条带 DNA 片段大小相同而序列可能不同,为此通过分子杂交技术进一步分析更深层次的序列信息。

ERIC-PCR 指纹图谱分析技术已被赵立平研究小组成功用于对活性污泥中微生物区系结构变化的研究上^[15],利用这一技术研究了 AB 工艺焦化废水处理系统曝气池的微生物种群结构的动态变化与污染负荷以及主要污染物降解效果变化之间的关系。结果显示,在系统对苯酚和氰化物去除效率相对稳定的状态下,ERIC-PCR 整体图谱特征保持稳定,反映出监测期间该活性污泥处理系统微生物种群结构比较稳定。与此同时,通过指纹图谱分析鉴定出了亮度变化与苯酚降解效率大致呈正相关的 DNA 条带。通过对该条带的分子克隆、物理图谱分析和部分克隆的测序,找到了反映苯酚降解效率功能菌的特异标记^[16]。我们的研究也证明了通过 ERIC-PCR 的方法能产生不同时间或空间微生物群落的特征性指纹图,并在动态监测过程中反映出群落结构特征的变化。

3.2 种群结构与功能的相关性

一般来说,在由多种细菌组成的微生物群落中,各种细菌只有当其种群数量超过总数量的 1%~10% 时,其特征性的条带才可以在群落结构 DNA 指纹图中表现出来。因此,图谱所反映的应该是群落中数量占优势的种类。但是,不同的环境样品 DNA 分子的组成及相对数量不同,重复序列在不同基因组 DNA 分子中分布及拷贝数均不同,这种差异可以反映在 ERIC-PCR 获得的指纹图谱中,因此图谱反映的是某一环境样品中微生物种群组成的特征。本文作者用 ERIC-PCR 结合分子杂交技术来分析和比较系统的微生物优势种群结构与功能的相关性。

微生物的群落结构决定了其生态功能。因此,污水处理装置中微生物群落结构的变化将能反映该系统的运行状况及降解效率。在整个监测时期,根据水样分析数据(数据未显示),有一次较大的波动是在第 3 周,此时原水中的 COD、酚及氨氮含量远高于前两周。对应于指纹图分析来看,第 3 周样品的条带数量明显减少,特别是大约 1.25 Kb 处一条较亮的条带消失。这可能是由于受到高负荷的冲击后,使微生物群落结构发生了明显的变化,有时甚至使整个群落崩溃^[17]。关于这方面的结论还有待进一步的研究证实。

3.3 液相悬浮微生物与生物膜的相关性

生物膜是由固定在附着生长载体上的细胞所组成。生物膜形成的第一步就是液相中的悬浮微生物在载体表面的可逆附着过程,即液相中的微生物附着与脱析的双相动态过程。此时附着的微生物密度与悬浮微生物浓度间存在着正比例的关系。随着微生物的不断附着,固着的微生物增长繁殖,同时会向水中释放出游离的细胞。最后,生物膜老化剥落,然后又开始新的生物膜形成过程。因此,生物膜的微生物组成与液相中悬浮的微生物具有相关性。通过分析悬浮微生物的结构与组成,在一定程

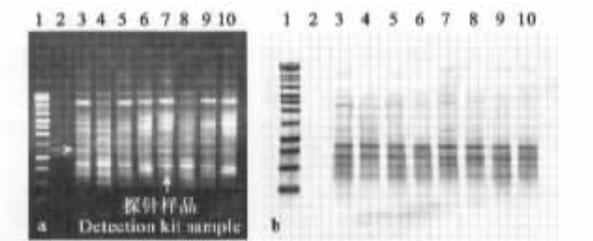


图 3 不同监测时期 A/O 池的 ERIC-PCR 指纹图(a)Southern blot (b)

Fig. 3 The ERIC-PCR banding patterns(a) produced from A₂ and O tank samples collected at one weekly interval over a four-week period and the analysis of Southern blotting (b)

1: 分子量标记 Mr(1 Kb ladder); 2: 阴性对照 negative control; 3: A₂-T₁; 4: A₂-T₂; 5: A₂-T₃; 6: A₂-T₄; 7: O-T₁; 8: O-T₂; 9: O-T₃; 10: O-T₄

A₂: 缺氧池 Anoxic tank; O: 好氧池 Oxidic tank; T₁~T₄: 第一周至第四周的样品 samples obtained from first to fourth weeks

表 1 4 个时期 A₂ 和 O 池样品的 ERIC-PCR 指纹图谱的相似性系数

样品 Sample	C _s (%)					
	A ₂			O		
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃
T ₂	41			76		
T ₃	49	44		62	44	
T ₄	53	42	67	50	45	65

A₂ 缺氧池 anoxic tank; O 好氧池 oxidic tank; T₁~T₄ 第一周~第四周的样品 samples obtained from first to fourth weeks

度上能够反映出生物膜上的微生物生长和功能的特点。所不同的是,由于生物膜上的微生物没有悬浮生长的微生物那样承受强烈的曝气搅拌冲击,因此生物膜上除大量细菌生长外,还可能大量真菌、线虫类、轮虫类等生物。此外,由于生物膜上生物平均停留时间较长,能够生长世代时间较长、增殖速度慢的微生物,如硝化菌等。所以,在某种程度上,生物膜上的生物多样性和相互作用会更加复杂。有关生物膜的微生物群落结构以及与悬浮微生物间的关系有待进一步的研究。

References:

- [1] George D D, Lidia S W, Ramon J S, *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.
- [2] Degens B P, Harris J A. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, **29**:1309~1320.
- [3] White D C, Stair J O, Ringeberg D B. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Ind. Microbiol.*, 1996, **17**:185~196.
- [4] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**:4516~4522.
- [5] Nico B, Wim D W, Willy V. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **39**:101~112.
- [6] Bassam B J, Caetano-Anolle's G, Gresshoff P M. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **38**:70~76.
- [7] Per W, Ann-Christin A, Mats F. Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principal component analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **28**:131~139.
- [8] Zhao L P, Xiao H, Li Y Q. ERIC-PCR as a new tool for quick identification of environmental bacteria. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 1999, **5**:30~33.
- [9] Gillings M, Holley M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letts. Appl. Microbiol.*, 1997, **25**:17~21.
- [10] Gillings M, Holley M. Amplification of anonymous DNA fragments using pairs of long primers generates reproducible DNA fingerprints that are sensitive to genetic variation. *Electrophoresis*, 1997, **18**:1512~1518.
- [11] Pan L, Du HM, Huang HD, *et al.* ERIC-PCR fingerprinting of structural features of microbial communities in children's intestines with different types of diarrhea. *Chinese Journal of Microecology*, **15**(30): 141~143.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1999. 55~60.
- [13] Murray A E, Hollibaugh J T, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**(7):2676~2680.
- [14] Wintzingerode F. V, Gobel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, **21**:213~229.
- [15] Gao P P, Zhao Y, Zhao L P. Analysis of the microbial community of activated sludge in different aeration basins within an industrial phenol remediation system by ERIC-PCR fingerprinting. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2003, **23**(6):705~710.
- [16] Gao PP, Wang J, Xi YY, *et al.* 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. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(6): 52~58.
- [17] Kazuya W, Maki T, Shigeaki H. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**(7):2813~2819.

参考文献:

- [8] 赵立平,肖红,李艳琴. ERIC-PCR:一种快速鉴别环境细菌菌株的方法. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**:30~33.
- [11] 潘莉,杜惠敏,黄海东,等. 腹泻儿童肠道菌群结构特征的 ERIC-PCR 指纹图分析. *中国微生态学杂志*, 2003, **15**(3):141~143.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. *分子克隆实验指南*. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 55~60.
- [15] 高平平,赵义,赵立平. 焦化废水处理系统微生物群落结构动态的 ERIC-PCR 指纹图谱分析. *环境科学学报*, 2003, **23**(6):705~710.
- [16] 高平平,王健,席玉英,等. 代表活性污泥中苯酚降解菌群的 ERIC-PCR 产物片段的多态性分析. *生态学报*, 2003, **23**(6):52~58.