

PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析

刘新春, 吴成强, 张 昱, 杨 敏, 李红岩

(中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要:应用 PCR-DGGE 方法, 对在相同的操作条件下分别用低温菌和常温菌接种的两套活性污泥系统中的微生物群落结构的动态变化进行了追踪。研究表明: 由于工艺和操作条件相同, 两系统的微生物群落结构的相似性随着运行时间的增加而增加。PCR-DGGE 方法可以在一定程度上反应出系统以及操作条件对微生物群落结构变化的影响。

关键词: PCR-DGGE 方法; 活性污泥系统; 微生物群落分析

Application of polymerase chain reaction -denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) to the analysis of changes of microbial ecological communities in activated sludge systems

LIU Xin-Chun, WU Cheng-Qiang, ZHANG Yu, YANG Min, LI Hong-Yan (State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(4): 842~847.

Abstract: Population dynamics in two activated sludge systems inoculated with seed sludge cultivated respectively at a low temperature ($(5 \pm 1)^\circ\text{C}$) and normal temperature ($(20 \pm 1)^\circ\text{C}$) were followed under the same operation conditions using the PCR-DGGE method.

The genomic DNA was extracted from activated sludge using phenol-chloroform. PCR amplification of the extracted microbial 16S rRNA gene fragments was performed using primers GC341F and 518R. The result of agarose gel (1.8%) electrophoresis shows that the PCR products were about 230bp in length. Using PCR products, DGGE was performed on a DGGE analyzer with a 10% (w/v) loading acrylamide (39:1 acrylamide-bisacrylamide) gel under a 30% to 50% linear gradient of denaturant. Some bands appeared in all samples, while the others were specific only in specific samples. Despite the difference of inoculums, however, the bacterial community structures in the two systems were quite similar.

The similarity of community structures in the two systems increased gradually from 41.6% (the first day), 50.2% (the fourth day) up to 59.3% (the twentieth day) with the prolongation of operational period. The PCR-DGGE method was a useful tool for the analysis of population dynamics in biological systems.

Key words: activated sludge system; community structure; PCR-DGGE

文章编号: 1000-0933(2004)11-0842-06 中图分类号: Q938, S154.3 文献标识码: A

PCR-DGGE 作为一种指纹分析技术, 具有可重复、快速和操作简便等特点, 近年来在分子微生态研究方面得到了广泛的应用^[1~9]。比如: 用 DGGE 研究微生物群落的复杂性^[10], 观察种群动态^[11], 跟踪相关基因在环境中的表达^[12], 对分离的细菌样品检查其在丰富培养基上的培养效率^[13, 14]等。而 PCR-DGGE 方法在污水处理中的应用, 则使人们对污水处理过程中微生物群落

基金项目: 国家自然科学基金联合资助项目(20521140076, 50238050); 国家 973 资助项目(2003CB415006)

收稿日期: 2003-11-21; **修订日期:** 2004-08-05

作者简介: 刘新春(1968~), 男, 河南开封人, 博士生, 主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail: liuxinchun415@yahoo.com.cn

Foundation item: The National Natural Science Foundation of China (No. 20521140076, 50238050); National 973 Project(2003CB415006)

Received date: 2003-11-21; **Accepted date:** 2004-08-05

Biography: LIU Xin-Chun, Ph.D. candidate, mainly engaged in molecular ecology of environmental micro-organism.

的变化产生了新的认识^[15~17]。

本实验室在前人研究的基础上,建立了 PCR-DGGE 技术,并利用该技术对常温条件下运行的两个不同的活性污泥系统中微生物群落结构的变化状况进行了比较研究。活性污泥法属于废水生物处理工艺中最基本、最古老一种工艺,具有悠久的历史,然而,由于环境样品中绝大多数的微生物不能用标准的方法加以培养,两者在微生物群落结构方面到底有多大差别一直不是很清楚。通过本研究建立一个从微生物角度对不同生物处理体系进行比较的研究手段。

1 材料和方法

1.1 反应器及废水

本文采用活性污泥的反应器处理生活污水,该反应器为曝气池与沉淀池一体反应器,曝气池和沉淀池的有效容积分别为 5L 和 1.25L,水力停留时间为 8h,运行温度为 20±1℃。原废水采用北京市某小区生活污水,其水质见表 1。各项分析指标 COD、BOD、NH₃、TN、TP、SS 都按《水和废水监测分析方法》第 3 版进行检测^[18]。

表 1 废水水质指标
Table 1 Characteristics of wastewater samples

项目 Item	COD _{Cr}	BOD	NH ₄ -N	TN	TP	SS
标范围 Index range(mg/L)	121~650	72~380	21.83~65.29	36.02~78.38	4.13~5.39	48~204

1.2 样品准备

用在 4~6℃ 条件下运行半年后的低温活性污泥和从某污水厂采取的常温活性污泥分别对两个生物反应器进行接种,在常温下对污水进行处理。在系统运行的第 1 天,第 4 天,第 20 天分别取样,将样品放置片刻,待其沉淀后倾去部分上清液,然后放入-20℃ 冰箱中贮存。在储存过程中由于清理冰箱内物品,使部分样品经过数次冻融。

1.3 DNA 提取

将样品离心,得湿重 50~100mg;在样品中加入 300μl 磷酸盐缓冲液(100mmol/L NaH₂PO₄, pH8.0),300μl 裂解液(100mmol/L NaCl,500mmol/L Tris-HCl[pH8.0],5%SDS),再加氯仿 300~600μl,然后再超声处理(20W,30Sec,(美)SONICS;VC105PB,100W/20KHZ);60℃,温育 10min;离心后取上清;加入等体积 PCI 溶液(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1),除去蛋白;用等量异丙醇沉淀 DNA;离心后,用 70%乙醇洗涤,干燥,用 TE 缓冲液溶解 DNA。DNA 的提取参照 Miller 的方法^[19],并在样品的前处理方面作了改变,用超声法代替其珠磨匀化法。

为避免样品 DNA 的流失,本试验所用-20℃ 贮存样品未用 PBS 溶液(磷酸缓冲盐溶液)洗涤,采取直接加裂解液的方法裂解菌体。

(1)DNA 的检测 在 0.5μg/ml 的溴化乙锭溶液中染色 30~45min,用去离子水漂洗后,放在 254nm 的紫外下照相。检测结果如图 2 所示。

(2)DNA 的定量测定 计算公式为[DNA]=50×(OD₂₆₀-OD₃₁₀)[ng/μl]。用紫外分光光度仪(日本岛津 UV-1600)测量样品在 260nm 和 310nm 的吸光值,然后根据公式计算 DNA 的浓度。

1.4 PCR 扩增

用于 DGGE 的 PCR 扩增引物 上游引物为 GC341F (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3');下游引物 p2 为 EU500R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3')。

PCR 反应(第 1 轮)采用 100μl 的反应体系,其组分为:10×PCR buffer (不含 Mg²⁺) 10μl;MgCl₂25mmol/L 溶液,6μl;4 种脱氧核苷酸(dNTP)的混合物,各 10mmol/L,2μl;上游引物 GC341F 20pmol;下游引物 EU500R 20pmol;Taq 酶 2.5U(美 Promega, PCR 扩增试剂盒);模板 DNA 1~10ng;最后加灭菌双蒸水至 100μl。

扩增反应在(美)BIO-RAD 公司的 iCycler Thermal Cycler 中进行,采用 Touchdown PCR 模式运行^[20]。具体运行条件如下:94℃,预变性 5min,使双链 DNA 变性,解链为单链,然后再加入 Taq 酶,使用该热启动技术旨在最大限度地减少引物和非靶序列 DNA 的结合,又可保持 Taq 酶原有的活力,使其活力不受 5min 加热过程的影响。然后,94℃,变性 1min;65℃,复性 1min,之后每两个循环降低复性温度 1℃,共计 20 个循环,72℃延伸 1min;剩下 10 个循环的扩增参数为 94℃,变性 1min;55℃,复性 1min;72℃,延伸 1min。最后 72℃延伸 7min。使用该程序可以减少扩增过程中副产物的形成^[21]。

用于 DGGE 条带测序的引物 上游引物 p3-PRBA 338F (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3');下游引物 p4-PRUN 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')。PCR 反应(第 2 轮)也采用 100μl 的反应体系,其组分用量同上。扩增参数为:94℃,预变性 5min;94℃变性 30sec,55℃复性 30sec,72℃延伸 30sec,扩增 30 个循环。最后 72℃延伸 7min,PCR 扩增原理如图 1 所示。

为了便于对污染源进行追踪,在每一组 PCR 扩增过程中,都设立了阴性对照,阴性对照除了不加模板 DNA 外,其它组分全部相同。

PCR 扩增产物的检测 用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查,溴化乙锭染色 30~45min,用去离子水漂洗两次各 10min,254nm 下观察并照相。

1.5 DGGE 凝胶电泳

DGGE 所用仪器为 The Dcode™ Universal Mutation Detection System (U. S. A, Bio-Rad Co.). DGGE 电泳所用的胶浓度为 10% (丙烯酰胺/双丙烯酰胺 37.5 : 1),其变性梯度范围为 30%~50% (100% 的变性剂中含有 7mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺),上样量为 20μl 的 PCR 产物 (第 1 轮扩增)。其运行条件是:在 1 × TAE (20mmol/L Tris, 10mmol/L 冰乙酸, 0.5mmol/L EDTA pH7.4) 电泳缓冲液中,60℃ 条件下,25V 运行 20min,然后 150V 运行 4.5h,电泳完成后,用 0.5μg/ml 的溴化乙锭染色 20min,再用去离子水漂洗 2 次,各 10min,然后在紫外 (254nm) 照射下观察电泳结果并照相 [Gel Documentation Systems (Gel Doc 2000™), BIO-RAD Laboratories-Segrate (Millan) Italy]

所得图像用 BIO-RAD QUANTITY ONE 4.3.0 软件进行处理。有关泳道和条带的技术处理都用该软件进行。DGGE 条带图案相似性的系统树图,由系统依据戴斯系数 C_s (Dice coefficient) 按照有关方法 (如: complete linkage 算法, UPGMA 算法等) 自动计算绘出。 $C_s = 2j / (a + b)$, j 是样品 A 和 B 共有的条带, a 和 b 分别是样品 A 和 B 中各自的条带数。戴斯系数的范围是从 0 (没有相同条带) 到 1 (所有的条带相同)。

在图像处理过程中,对于在 DGGE 电泳图上是肉眼可见、但被软件忽略掉的一些小条带 进行了手动处理^[22],条带的密度由该软件自动算出。

1.6 切胶和测序

对于头一轮 PCR 扩增的产物, DGGE 完成后,经过溴化乙锭染色,去离子水漂洗,在 354nm 的长波紫外下,选择 DGGE 胶上 10 条比较亮的条带进行切割。对于选定的每一个条带,只选择其中间部分进行切割。用消毒过的手术刀将切下的约 30mg 的薄片放入 2ml 的离心管中,再加入 100μl 的 TE buffer 将其淹没。将凝胶压碎后, -20℃ 冷冻过夜。然后用 60~100℃ 的热水温育 10min,待凝胶融化后,在 5000r/min 的速度下离心 5min。取 6μl 样品进行 PCR 扩增 (第 2 轮),条件同上。用 1.8% 琼脂糖凝胶进行电泳,检查回收产物。看到目的产物后,再取 20μl 的 PCR 产物做 DGGE,条件同上,检查回收条带的纯度和分离状况,从胶上显示的多条 DGGE 条带可以看到:一些 DNA 样品依然是混合产物,在这种情况下,将目的条带再次切割,按上述方法回收,再做第二轮 PCR 扩增,然后检查扩增效果,直到有满意的结果为止。将 95μl PCR 产物送交专业测序公司 (上海基康公司) 进行测序。

2 结果和讨论

2.1 DNA 的提取和 PCR 扩增

图 2 显示 6 个样品的 DNA 均已提出,通过与两边的 DNA marker 进行对比,可以看出其分子量大小约为 23kb,与细菌基因组的大小相同,因此所提 DNA 属于比较完整的细菌基因组 DNA,亮度和纯度都较好,没有出现拖尾现象,说明 DNA 的提取获得了满意的结果。

图 3 显示 6 个样品均已扩出,且亮度和纯度都比较好,未出现非特异性扩增,通过与两边的 DNA ladder 对比,可知其片段大小约为 230bp,且阴性对照未有产物出现,说明 PCR 扩增效果良好。

2.2 细菌群落多样性分析

2.2.1 DGGE 图案分析 从 DGGE 条带图案上可以看到:两种活性污泥样品,其菌种丰富度都比较高,而且条带之间差异比

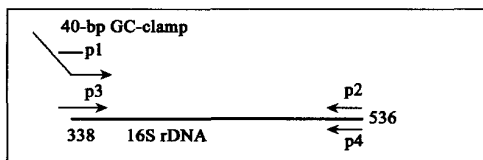


图 1 PCR 扩增 16S rRNA 基因片段示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the 16S rDNA region amplified by PCR in this study

引物 3 和 4 扩增的片段长度为 198bp, 对应于 *E. coli* 上 16S rDNA 的 338~536 位置。引物 1 和 2 扩增的是该基因的同—区域, 对应于 *E. coli* 上 16S rDNA 的 341~534 位置, 但因其 5' 端带有一个 40-bp 的 GC clamp, 故其片段长度增长为 233bp (193bp + 40bp)

Primers 1 and 2 amplify a fragment of 198 bp, which corresponds to position 338 to 536 in the 16S rDNA of *E. coli*. Primers 1 and 3 amplify the same region but incorporate a 40-bp GC clamp at its 5' end at position 338, after which the total size of the fragment increases to 238bp

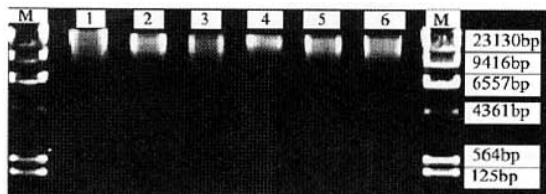


图 2 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图象

Fig. 2 Agarose gel (1.5%) electrophoresis of genomic DNA of 6 different samples

图 2 中 1~6 条带分别为从 6 个样品中提取的 DNA; 运行条件: 50V, 45min

较明显,充分显示了两种系统中的微生物多样性。应用系统软件对这些条带进行分析,便能得到一系列的结果。

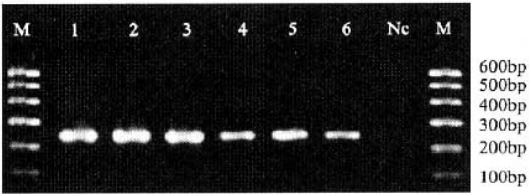


图3 PCR 扩增产物凝胶电泳图象

Fig. 3 Agarose gel (2.0%) electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA of 6 samples

M 100~600bp DNA ladder, Nc 阴性对照 Negative control, 1~6 号条带为 6 个样品的 PCR 扩增产物 (233bp) Amplified DNA fragments of 6 samples

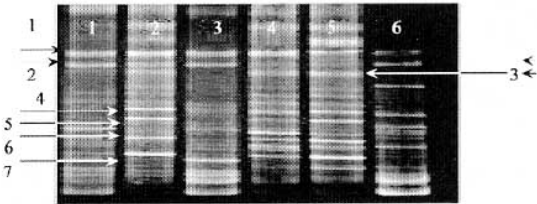


图4 DGGE 凝胶电泳图象

Fig. 4 DGGE patterns produced from 6 different samples

1~3: 低温菌在常温下运行样品 Samples running at 4~6 C (1st, 4th, 20th respectively) ; 4~6: 常温菌在常温下运行样品 samples running at 20±1 C; 其取样时间分别为系统运行的第 1、4、20 天 1st, 4th, 20th respectively

图 5 是以第 3 泳道为标准做出的各泳道比较图,并以第 3 泳道为标尺放在图表两边作参照。泳道中条带粗细不一,对应其在 DGGE 胶上的密度大小不同。密度大,则条带比较粗黑;密度小,则条带比较细。从图中可对各样品的条带多样性及均匀分布程度作一直观了解。

2.2.2 样品相似性分析 表 3 是用戴斯系数 (Dice coefficient) 计算出的各样品相似性的矩阵图。用该图可以对各样品之间的相似性进行比较。

表 3 相似性矩阵图

Table 3 Dice coefficients (Cs) comparing the similarities of PCR-DGGE fingerprints

Lane	1	2	3	4	5	6
1	100	38.1	56.9	41.6	31.8	47.1
2	38.1	100	31.8	53.2	50.2	20.1
3	56.9	31.8	100	32.6	45.6	59.3
4	41.6	53.2	32.6	100	52.4	23.7
5	31.8	50.2	45.6	52.4	100	21.9
6	47.1	20.1	59.3	23.7	21.9	100

从表 3 中可以看出:样品 1 与 4 相似性为 41.6%(第 1 天),样品 2 与 5 相似性为 50.2%(第 4 天),样品 3 与 6 相似性最高,为 59.3%(第 20 天),表明在相同的操作条件下,随着系统运行时间的增加,两个系统中菌群结构相似程度越来越高,既接种的不同来源的活性污泥在相同的工艺和操作条件下其优势菌群的结构会变得越来越相似。

2.2.3 族群归属分析 用 The complete linkage 算法对样品进行了 聚类分析,结果如图 6 所示。该图显示:6 个样品共分为 两大族群,族群间的相似性为 20%,族群内的相似性分别为 47%。

样品 3 与 6 相似性最高,即在两个系统运行的第 20 天,相似性达到了 59.3%。样品 1,2,3 未归为单独的一族,样品 4,5,6 也未归为单独的一族,说明在处理过程中,菌群结构发生了较为复杂的变化。

另外,用 WPGMA(The weighted pair group method with arithmetic averages)算法和 UPGMA(The unweighted pair group method with arithmetic averages)算法做出的系统树状图(图略)与下图基本相同,差异 较小。说明用系统树状图来说明不同样品之间微生物群落的同源性,虽然应用的计算方法不同,但所得出的结论相对来说还是比较一致的。

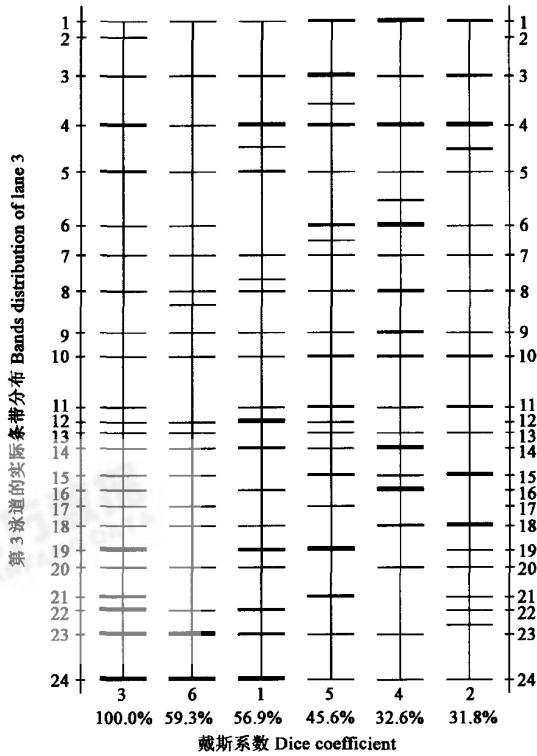


图5 泳道比较图

Fig. 5 Lane compare

2.2.4 测序结果 10 个样品中有 7 个获得满意的结果。将这 7 个序列提交基因库进行鉴定, 比对结果见表 4。

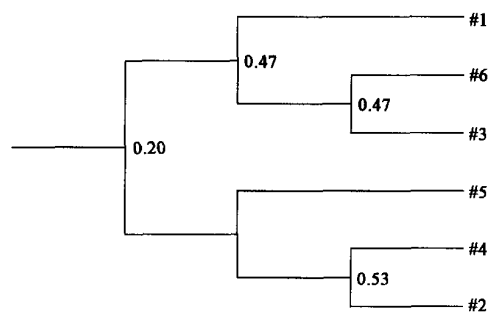


图 6 用 The complete linkage 算法计算出的系统树图
Fig. 6 Clustering analysis of the DGGE patterns of 6 samples

表 4 测序结果			
Table 4 results of sequencing of 7 bands			
条带 Band	提交序号 Accession No.	同源性(%) Identity	最相近序列 Mostly closely related bacterial sequence
1	AY338406	95	Uncultured beta proteobacteria
2	AY338407	100	Uncultured beta proteobacteria
3	AY338408	98	Uncultured beta proteobacteria
4	AY338409	100	Uncultured beta proteobacteria
5	AY338410	98	Uncultured beta proteobacteria
6	AY338411	100	Uncultured gamma proteobacteria
7	AY338412	99	Uncultured gamma proteobacteria

从以上的鉴定结果可以看出:在活性污泥系统运行过程中,拥有大量的 β 及 γ 变形菌属,这些菌属都是优势菌群,在废水的生物处理过程中起着重要的作用。由于序列长度只有约 190 个 bp,碱基数太少,尚不能鉴定到种,一般情况下只能鉴定到属。

以上所做的关于微生物群落多样性的分析,基于这样一个假设:每一个单独的条带对应于一个单独的菌种,条带的密度对应于该菌种的丰度。这些假设,对于微生物群落多样性的分析来说是必需的,但并不完全正确。原因在于:由于 DNA 提取和 PCR 扩增某些未知种群在定量方面的限制^[23~26],以及不同序列的 DNA 存在共迁移的可能性,因此,由该方法得出的定量结果存在偏差。另外,由于一些丰度很低的菌种难以在 DGGE 胶上检出,据研究,PCR~DGGE 对细菌群落的检出率为 95%~99%^[27]。所以严格说来,该方法并不十分精确,但条带的丰度在一定程度上确实能作为起始细菌群落多样性的一个量度,况且, DGGE 条带图案的确提供了一个量度微生物群落多样性变化的方法^[16]。与传统的培养技术相比较,该方法无疑是一个巨大的进步。因此,可以说 PCR~DGGE 方法在分析微生物群落结构变化方面有良好的应用前景。

3 结论

通过对不同的生物处理技术及不同的操作条件进行对比,可以得出以下结论:对于环境样品 DNA 的提取,取样后应尽快进行,最好不要反复冻融,以免 DNA 的流失;对于已长期存放的样品,前处理时尽量不用 PBS 溶液洗涤,以最大限度地保存样品中的 DNA;如果 DNA 样品含有较多的酶抑制剂,可采用将模板 DNA 逐步稀释的方法进行 PCR 扩增,以便获得满意的结果。

由于工艺相同,使得接种的低温菌群和常温菌群在相同的操作条件下,产生了相似的微生物群落结构。随着运行时间的增加,其菌群结构相似程度也越来越高;PCR-DGGE 技术在评价生物废水处理过程中微生物群落结构的变化方面方便、快捷,具有良好的应用前景。

References:

[1] Muyzer G, and Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 1998, **73**:127~141.

[2] Bernard L, Courties C, Duperray C, *et al.* A new approach to determine the genetic diversity of viable and active bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*, 2001, **43**, 314~321.

[3] Casamayor E O, Schafer H, Baneras L, *et al.* Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 499~508.

[4] Ferris M J, Muyzer G, and Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis of 16SrRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 340~346.

[5] Iwamoto T, Nakamura K, Suzuki Y, *et al.* Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol Col.*, 2000, **32**, 2007~141.

[6] Nielsen A T, W Liu T, Filipe C, *et al.* Identification of a novel group of bacterial in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 1251~1258.

[7] Van Elsland J D, Duarte G F, Rosado A S, *et al.* Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and

- their effects in the sea environment. *J. Microbiol. Method.*, 1998,**32**, 133~154.
- [8] Curtis T P, and Craine N G. The comparison of the diversity of activated sludge plants. *Water Sci. Techol.*, 1998,**37**, 71~78.
- [9] Eichner C A, Erb R W, Timmis K N, Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999,**65**, 102~109.
- [10] 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**, 2676~2680.
- [11] Donner G, Schwarz K, Hoppe HG, *et al.* Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Arch Hydrobiol Special Issues Advance Limnol.*, 1996,**48**, 7~14.
- [12] Wawer C, Jetten M, Muyzer G. Genetic diversity and expression of the (NiFe) hydrogenase large subunit gene of *Desulfovibrio* spp in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997,**63**, 4360~4369.
- [13] Felske A, Engelen B, Nubel U, *et al.* Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996,**62**, 4162~4167.
- [14] Ward DM, Santegoeds CM, Nord SC, *et al.* Biodiversity within hot spring microbial mat communities molecular monitoring of enrichment cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, **71**:143~50.
- [15] Nico Boon, Wim De Windt, Willy Verstraete, *et al.* 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.
- [16] David M, Stamper, Marianne Walch, *et al.* Bacterial population changes in a membrane bioreactor for gray-water treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003,**69**, 852~860.
- [17] Timothy M, LaPara, Cindy H, *et al.* Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. *Water Research*, 2002,**36**, 638~646.
- [18] Miller N, Bryant J E, Madsen E L, *et al.* Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1999,**65**: 4715~4724.
- [19] Rosado A S, Duarte G R, Seldin L, *et al.* Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strain and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998,**64**, 2770~2779.
- [20] Gerard Muzer, Ellen C, De Wall, *et al.* Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993,**59** (3), 695~700.
- [21] Eichner C A, Erb R W, Timmis K N, *et al.* Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bio-protection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999,**65**, 102~109.
- [22] Becker S, Boger P, Oehlmann R, *et al.* PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000,**66**, 4945~4953.
- [23] Farrelly V, Rainey F A, and Stackebrandt E. Effect of genome size and copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995,**61**, 2798~2801.
- [24] Polz M F, and Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multi-template PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998,**64**, 3724~3730.
- [25] Suzuki m t, and Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixture of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996,**62**, 625~630.
- [26] Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, *et al.* Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, 1999,**38** (1~2), 1~15.

参考文献:

- [18] 国家环保局,《水和废水监测分析方法》编委会编.《水和废水监测分析方法》第3版.北京:中国环境科学出版社,1998. 278~286.