

# 分子生物学方法在水体微生物生态研究中的应用\*

王晓丹 李艳红\*\*

(首都师范大学生命科学学院 北京 100037)

**摘要** 微生物是生态系统的重要组成部分,研究水体中微生物的多样性和群落结构对于开发微生物资源、进行水体生物修复具有重要意义。现代分子生物学的发展为研究水体微生物提供了行之有效的方法。综述了 16S rDNA 文库构建、变性梯度凝胶电泳、限制性片段长度多态性、末端标记限制性片段长度多态性等技术的原理以及在水体微生物研究中的主要应用。

**关键词** 分子生物学方法 水体微生物生态 16S rDNA 文库构建 变性梯度凝胶电泳

**中图分类号** :Q938.1 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)04-0777-05

## Advances in Studying Water Microbial Ecology by Molecular Biological Techniques\*

WANG Xiao-Dan LI Yan-Hong\*\*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037)

**Abstract** Microbes are important composition of ecology system. Nowadays it's very important to study the microbial diversity and community structure, especially in water bioremediation by microbiological resources. Modern molecular biology techniques provide effective methods to study the microbial ecosystem in aqua. Several techniques were summarized, including 16S rDNA clone library, DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), while their application to analyze water microbial diversity were introduced.

**Key words** Molecular Biological techniques, Water microbial ecology, 16S rDNA clone library, DGGE

水体中微生物种类繁多、数量巨大,尤其是污染水体中微生物的种类仅次于土壤。微生物具有很强的降解和转化污染物的能力,因而在受污水体中起着举足轻重的作用。通过对目标水源微生物群落的种群结构和多样性进行解析并研究其动态变化,可以为优化群落结构、调节群落功能和发现新的重要功能类群提供可靠的依据。若能从中进一步分离得到优势菌株<sup>[1-3]</sup>,再通过调整该优势菌的活性状态还可用于修复水体,进行生态恢复。

微生物多样性以及群落结构的研究一直沿用传统分离、培养、鉴定并描述特征的方法。然而,研究证实自然界中有 85% ~ 99.9% 的微生物至今还不可纯培养<sup>[4]</sup>,因而以此为前提的形态学、生理生化反应和细胞组成成分结构的观察均受到了影响。

此外,传统方法过程繁杂,很难对分离物进行精确鉴定并反映系统发育关系,导致研究微生物多样性的真实概况受到限制。

近年来,随着从环境中提取微生物 DNA 方法的不断改进<sup>[5]</sup>,以核酸一级结构为依据对微生物进行分类、进化、功能方面的研究获得了较大发展。一些分子生物学技术已用于微生物生态的研究,操作简便还可有效地避免实验数据丢失,通过从基因水平探索微生物群落的丰度、均匀度、分析菌种的变异情况等,可将微生物多样性的研究提高到遗传多样性水平上,为全面认识微生物多样性在生态系统中的原始构成、筛选出未知菌种提供了行之有效的技术手段。目前,用于水体微生物生态研究的分子生物学方法主要基于 PCR 技术,利用扩增产物再进

\* 北京市自然科学基金资助项目(No. 5062003),2006 年北京市留学人员科技活动择优资助启动项目

\*\* 通讯作者 Tel: 010-68901692, E-mail: liyh@mail.cnu.edu.cn

收稿日期: 2006-10-30, 修回日期: 2007-01-15

行各种分析。较为成熟的技术包括:16S rDNA 文库构建、变性梯度凝胶电泳(DGGE)<sup>[6]</sup>、限制性片段长度多态性(RFLP)<sup>[7]</sup>、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)<sup>[8]</sup>、单链构象多态性分析(SSCP)、荧光原位杂交(FISH)、随机扩增多态性(RAPD)<sup>[9]</sup>等。本文综述了部分主要分子生物学技术的原理及其在水体微生物生态系统研究中的应用。

## 1 16S rDNA 文库构建

克隆文库方法是使用较广泛的一种方法<sup>[10]</sup>。16S rRNA 由多个臂环组成,部分碱基配对,其余形成环,可划分成四个结构域。1970年 Woese 发现 16S rRNA 在生物进化过程中具有高度保守性,因而在系统发育研究中具有重要作用<sup>[11]</sup>;同时不同种的 16S rRNA 在结构上具有特异性。依据其保守性和特异性可确定它们系统发育的相关性或进化距离。以 16S rRNA 的基因为模板,使用特异性引物对未知样品的总 DNA 进行 16S rRNA 的基因扩增,将产物克隆到载体,通过构建克隆文库分离不同的序列,再通过测序与 GenBank 数据库中已知菌种的 16S rDNA 序列比对,鉴定其分类地位。通过分析 rDNA 片段的类型和出现频率,可以得到微生物群落结构和多样性的信息<sup>[12]</sup>。

Tamaki 等<sup>[13]</sup>通过构建 16S rDNA 文库分析了 Kasumigaura 湖底细菌群落多样性,实验显示该湖底细菌群落具有明显的多样性,并发现了一些未知菌种。Kathleen 等<sup>[14]</sup>将 Crater 湖分离出的浮游细菌 16S rDNA 序列与构建的文库比对,发现高通量培养方法是传统分离培养方法的改进。它可以分离出环境中的优势菌和与文库中序列不一致的菌种,同时也证实光合作用是新鲜水源中重要的生理过程。Tian Yang-jie 等<sup>[15]</sup>利用 16S rDNA 文库构建法分析了由垃圾填埋引起污染的地下水中微生物群落,实验显示微生物群落中 95.9% 为细菌,其中优势菌为变形细菌,占细菌总量的 63.5%。Tringe 等<sup>[16]</sup>使用该方法比较了陆地和海洋两种不同环境中微生物群落新陈代谢的能力,结果表明特定环境能诱导特定微生物产生与该环境相适应的新陈代谢相关的基因,该特定基因决定了环境样品中此微生物的功能,此现象有助于解释和诊断环境问题。

尽管通过该方法获得了较多水体中微生物群落多样性的信息,但其对分析的克隆数目有要求,

只有在克隆数目足够的情况下才可以较为完整的认识种群组成的情况。因此造成工作量较大。此外,由于核酸提取、PCR 及克隆过程产生的偏差可能导致样品的基因克隆库并不太准确,因此有时也不能完全正确反映水体中微生物群落的真实面貌。

## 2 变性梯度凝胶电泳技术

### 2.1 原理

1983年 Fisher 和 Lerman<sup>[17]</sup>首次将变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)引入微生物生态学研究,他们将 16S rDNA PCR 扩增后的片段进行变性梯度凝胶电泳,分析了环境中微生物区系的变化。DGGE 是基于核酸序列的不同将 DNA 片段分开的。在线性梯度变性的聚丙烯酰胺凝胶上,部分解链的双链 DNA 分子的电泳迁移率降低,而 DNA 序列不同,其解链的温度和所需的变性浓度也不一样,它们在凝胶的不同位置停止迁移,最终不同的 DNA 片段会在凝胶上呈现不同的条带,从而使长度相同而序列不同的 DNA 片段分离<sup>[18]</sup>。通过 SYBR Green I 或银染即可成像,通过对电泳图谱的直接分析可以对微生物生态系统中的各种细菌进行相对定量。在理论上,这项技术可区分一个碱基的差异。由于各类微生物的 16S rRNA 基因序列中可变区的碱基序列有很大差异,通过利用 DGGE 技术,分析图谱上条带的数目和所处的位置,就可以初步的辨别出该样品中微生物的种类和数量,从而可粗略分析该水体中微生物的多样性。之后该技术也不断得到发展。罗海峰等<sup>[19]</sup>人在利用 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性时采用带 GC 串结构的引物,结果发现由含 GC Clamp 的引物 PCR 扩增后在 DGGE 中能够得到很好的分离效果。因此在引物设计时通常在正向引物的 5'端加入 GC Clamp,使得对不同微生物的定性和分析更深入细致。

当前,PCR-DGGE 技术已广泛地应用于研究复杂环境微生物生态系统,如海洋、根际、土壤和沙丘<sup>[20-23]</sup>。监测区系组成变化、分离细菌、比较各种 DNA 抽提方法的效率以及监测 PCR 和克隆过程中产生的偏差等。该方法的主要优势在于不仅能鉴别样品中可培养的类别,而且还能鉴定不可培养的微生物的类别,检测极限低、速度快、结果准确可靠,根据不同条件下得到的谱带,有助于人们高效地进行各种环境样品中微生物的优势群落鉴定和

优势菌的分离。

## 2.2 微生物群落多样性的研究

人们对水体微生物多样性的了解还不够全面。目前,最主要采用的还是传统的培养和分离鉴定的方法,大多数微生物无法培养造成人们对样品中种群的组成分析受到很大限制。从 DNA 水平上研究水源微生物的多样性无疑是一种非常好的非培养方法。Finlay<sup>[24]</sup>研究显示,真核微生物在几乎所有的生态系统中种类都十分丰富,它是全球生物多样性的的重要组成部分。1993 年 Muyzer<sup>[25]</sup>首次应用 PCR-DGGE 研究了菌藻系和细菌生物膜中微生物的遗传多样性,将 DGGE 带谱上的印迹转移到尼龙膜上,再与硫还原细菌特异性探针进行杂交,结果发现样品与探针出现了强烈的杂交信号,表明环境中存在硫还原细菌。Ferris 等<sup>[26]</sup>利用 PCR-DGGE 对温泉不同温度菌藻系中细菌多样性比较,发现不同温度的样品带谱差异很大,表明其中的细菌多样性不同。Kawai 等<sup>[27]</sup>应用 PCR-DGGE 技术和聚类分析对制药工程中使用的净化水的微生物多样性进行估测,结果表明净化水的微生物多样性远不及环境水体,且净化水中的优势菌无法通过传统的方法培养或繁殖。Webster 等<sup>[28]</sup>利用 DGGE 分析了深层海底标记为 1173 处沉积物中微生物群落组成,结果显示其中微生物多样性比较丰富,含有  $\beta$ -变形细菌、浮霉状菌、蓝细菌、 $\gamma$ -变形细菌等。而标记为 1174 处则微生物种类明显贫乏。

PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮状处理中也有应用。王峰等<sup>[29]</sup>通过 PCR-DGGE 等分子生物学技术直接分析活性污泥与生物膜中微生物种群结构,实验结果表明活性污泥培养前后微生物种群结构发生很大改变,同时测定了活性污泥中部分菌种的 16S rDNA V3 区片段序列,通过与基因库比对,初步确定了细菌的属。再次证明 PCR-DGGE 结合测序技术是一种完全可行的快速进行环境样品微生物研究的分析方法。

DGGE 方法和培养方法结合能更全面地分析水体中微生物群落的多样性。Thompson 等<sup>[30]</sup>利用上述两种方法研究了自然海岸区域内的 *V. splendidus*, 证实浮游细菌群落具有基因型的多样性。

## 2.3 微生物群落动态变化的研究

PCR-DGGE 技术不仅可用于研究微生物群落的多样性,同样也可用于研究群落动态变化。主要研

究环境变化与微生物群落动态变化的关系。1998 年 Gucht 等<sup>[31]</sup>利用 PCR-DGGE 技术分析了 Blankaart 和 Visvijver 两湖中浮游细菌群落的动态变化,发现两湖中浮游细菌群落呈现出明显的季节变化规律。在春季和夏季,Blankaart 湖中细菌生物量比 Visvijver 湖高出 3 倍,Visvijver 湖中出现藻类而 Blankaart 湖中却未出现。Lindstrom 等<sup>[32]</sup>使用 PCR-DGGE 技术研究一个中营养水平的北方森林湖,结果却显示细菌群落组成未发生剧烈的变化,而是呈现了相对稳定且缓慢的变化,表明季节与细菌群落变化和分类无明显关系。水源环境不同微生物群落结构不同。Gast 等<sup>[33]</sup>采用 PCR-DGGE 技术分析南极洲罗斯海中微生物组成随水体类型不同所发生的变化,实验表明相同环境中存在类似的种群组成,微环境的变化明显影响种群组成,环境中占优势的为纤毛虫、鞭毛虫等原生生物。Boivin 等<sup>[34]</sup>利用该方法研究污染诱导群落耐受性时发现,虽然温度不是引起群落连续变化的主要因素,但温度对于细菌群落的耐受性确有影响,温度越高,群落对于铜的耐受性越强。

这些实验结果再次证实,DGGE 可有效的分析水体中微生物生态系统的多样性、群落结构,监测环境中微生物群落的动态变化。但 DGGE 可以监测到的理想片段为 100bp ~ 500bp 而且 PCR 产物常出现假阳性情况,易造成菌种的丢失,给新菌种的鉴定带来困难。巢式或半巢式 PCR 技术与 DGGE 结合,使用一对或一对半引物通过两次 PCR 反应对基因进行检测,能在一定程度上解决该困难。Boon 等<sup>[35]</sup>采用巢式 PCR 结合 DGGE 技术分析了不同污水处理工厂中细菌群落,结果表明该技术不仅有效的减少了假阳性的出现,而且使检测的下限值下降几个数量级。DGGE 本身还存在一些难以克服的缺点。首先,通常只能检测到水体环境中的优势菌群,若微生物含量过少,利用该技术就很难检测到。Sekiguchi 等<sup>[36]</sup>认为 DGGE 方法可能低估了环境微生物的种群多样性,若把 DGGE 与其它技术结合使用,不仅可以提高对水体微生物群落分析的准确性,也可以提高微生物生态学的研究水平。

## 3 限制性片段长度多态性

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性)是一种 DNA 分子水平上的多态性检测技术,它是限制性内切酶、核酸电泳、

印迹技术、探针-杂交技术的综合应用。该技术也用于微生物群落的研究。限制性内切酶能识别并切割特异核苷酸序列。由于碱基序列不同或某位点核苷酸序列发生突变,导致酶的识别、切割位点和数目不同,因而可产生大小不同的片段。PCR-RFLP可以检测出碱基发生突变、插入或缺失的位点。切割产生的不同片段通过特定探针杂交进行检测,从而可比较不同品种的DNA水平的差异(即多态性)。多个探针的比较可以确立生物的进化和分类关系,该方法检测结果不受环境因素的影响。

Darrell等<sup>[37]</sup>利用RFLP技术研究水面下堆积物被搅动后微生物群落的反应,结果显示共有98个不同的片段长度,随着时间的推移,不断有新的片段长度被检测到,但只有12种片段长度来自于均一且完整的微生物群落。由此说明,微生物群落随环境改变也发生了巨大的变动。Sekiguchi等<sup>[38]</sup>采用PCR-RFLP分析了长江C1处细菌群落结构,发现不仅包括 $\alpha$ -变形细菌和 $\gamma$ -变形细菌,还存在 $\beta$ -变形细菌、C/F/B群、低G+C含量的革兰氏阳性菌、高G+C含量的革兰氏阳性菌和疣微菌门等,反映了长江口C1处的富营养化程度较高。Dickerman等<sup>[39]</sup>用PCR-RFLP证实,Eric湖水中分离出的细菌中多一半为气单胞菌,其余大部分为来自于肠杆菌种。Bakermans等<sup>[40]</sup>采用PCR-RFLP检测了煤污染地下水中微生物群落的多样性,结果说明污染水源中既存在耗氧菌也存在厌氧菌。若将PCR-RFLP技术与其它非培养方法结合起来使用,监测效果会更好。Gemert等<sup>[41]</sup>就用16S rDNA测序与PCR-RFLP技术结合测定新鲜水体中微生物的多样性。

与16S rDNA文库构建相比,该方法可省去建库中许多繁琐的工序,而且灵敏度高、分辨率高、重复性好、简便快速直观。但是由于克隆探针较为困难,且限制性内切酶水解不完全或酶切片段相近,也给PCR-RFLP技术的利用带来了障碍。随着可标记多态性探针的增多,该技术将在微生物生态学中得到更广泛的应用。

#### 4 末端限制性片段长度多态性

T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism,末端限制性片段长度多态性)技术是在RFLP技术基础上发展起来的,也是依据16S rDNA序列高度的保守性和特异性,选择具有系统进

化标记特征的序列作为目的分析序列。设计保守区特异性引物,其中一个引物的5'端用荧光物质标记。以样品中DNA为模板进行PCR扩增后产物就带有荧光标记。用合适的限制性内切酶消化PCR产物,可产生不同长度的限制性片段。用DNA自动测序仪可检测出末端带荧光标记的片段获得峰值图。由于每种菌末端带荧光标记的片段(Terminal Restriction Fragment, T-RF)长度是唯一的,所以峰值图中每一个峰至少代表一种菌,每个峰的面积占总面积的百分比代表这种菌的相对数量。

T-RFLP技术灵敏度高,能检测活菌和未降解死菌,成为研究者们青睐的一种高效微生物群落结构分析方法。Bernhard等<sup>[42]</sup>用此技术区分来自人和奶牛的非点粪便污染源。采用拟杆菌属和双歧杆菌属的细菌作为污染指示菌,对这两种菌的16S rDNA扩增后用T-RFLP分析,根据人粪便和牛粪在峰值图上出现的特征峰分析污染水体,从而判断是何种污染。Katharine等<sup>[43]</sup>利用T-RFLP和异质PCR(Length-Heterogeneity polymerase chain reaction, LH-PCR)相结合研究如何区分污染水体的粪便来源,得到了相似的结果。Vaisanen等<sup>[44]</sup>也利用T-RFLP检测了不同水源中微生物群落的特征。

Gonzalez等<sup>[45]</sup>对赤潮海域的细菌作了16S rDNA克隆文库测序和T-RFLP分析,将T-RF与克隆测序后的结果比对后,发现*Rosebacter*在整个群落中数量最多。Polymenakoll等<sup>[46]</sup>将T-RFLP与DGGE相结合,探测了地中海微生物群落组成。

T-RFLP技术可更为准确的估测水源中微生物群落的动态变化,却无法较好地区分近缘种,峰和菌种也不是准确的一一对应关系,因而定量的结果是一个相对值而不是一个绝对值。另外限制性内切酶的选择和待测片段的大小也影响T-RFLP的检测效果。

#### 5 小结与展望

综上所述,现代分子生物技术的发展为研究水体微生物的多样性和群落动态变化提供了有利工具,人们对环境样品中微生物生态的了解也将更加真实和准确。总体来说每种方法均各有优势和局限性,因此在今后的发展中采用多种技术相结合及与传统的培养方法相结合的方式,相互补充相互完善,不断提高检测的灵敏度和准确度,对进一步真

正深入了解微观生态环境具有重要意义。

## 参考文献

- [ 1 ] Kisand V, Wikner J. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, **54**: 183 ~ 191.
- [ 2 ] Yuan S Y, Yu C H, Chang B V, *et al.* *Environmental pollution*, 2004, **127**: 425 ~ 430.
- [ 3 ] Mulkerrins D, W Dobson S D, *et al.* *Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 699 ~ 704.
- [ 4 ] Amann R I, Ludwig Wand Schleifer K. *Microbiological Reviews*, 1995, **59**(1): 143 ~ 169.
- [ 5 ] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 316 ~ 322.
- [ 6 ] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 695 ~ 700.
- [ 7 ] Burkel D A, Hamerlynck E P, Hahn D. *Plant and soil*, 2002, **239**: 141 ~ 154.
- [ 8 ] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 4516 ~ 4522.
- [ 9 ] Hadrys H, Balick M, Schierwater B. *Molecular Ecology*, 1992, **1**: 55 ~ 63.
- [ 10 ] Ranjard L, Poly F, Nazaret S. *Research in Microbiology*, 2000, **151**: 167 ~ 177.
- [ 11 ] 杨苏声, 周俊初. 微生物生物学. 北京: 科学出版社, 2004. pp. 291 ~ 292.
- [ 12 ] Mccaig A E, Glover L A, Prosser J I. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 1727 ~ 1730.
- [ 13 ] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **4**: 2162 ~ 2169.
- [ 14 ] Page K A, Connon S A, Giovannoni S J, *et al.* *Applied and Environment Microbiology*, 2004, **70**(11): 6542 ~ 6550.
- [ 15 ] Tian Y J, Yang H, Wu X J, *et al.* *Journal of Zhejiang University Science*. 2005, **6B**(3): 165 ~ 170.
- [ 16 ] Tringe S G, Mering C V, Kobayashi A, *et al.* *Science*, 2005, **308**: 554 ~ 557.
- [ 17 ] Fisher S G, Lerman L S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 1579 ~ 1583.
- [ 18 ] Muyzer G, Smalla K. *Antoni Van Leeuwenhoek*, 1998, **73**: 127 ~ 141.
- [ 19 ] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. *生态学报*, 2003, **23**(10): 2170 ~ 2175.
- [ 20 ] Moseneder M, Arrieta J S M, Muyzer G, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(8): 3518 ~ 3525.
- [ 21 ] Bano N, Hollibaugh J T. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(2): 505 ~ 518.
- [ 22 ] Malla K, Wieland G, Buchner A, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(10): 4742 ~ 4751.
- [ 23 ] Smit E, Leeflang P, Gommans S, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(5): 2284 ~ 2291.
- [ 24 ] Finlay B J. *Science*, 2002, **296**: 1061 ~ 1063.
- [ 25 ] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695 ~ 700.
- [ 26 ] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 340 ~ 346.
- [ 27 ] Kawai M, Matsutera E, Kanda H, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(2): 699 ~ 704.
- [ 28 ] Webster G, Newberry C J, Fry J C, *et al.* *Journal of Microbiological Methods*, 2003, **55**: 155 ~ 164.
- [ 29 ] 汪峰, 傅以钢, 夏四清, 等. *环境科学*, 2004, **25**(6): 74 ~ 79.
- [ 30 ] Thompson J R, Pacocha S, Phario C, *et al.* *Science*, 2005, **307**: 1311 ~ 1313.
- [ 31 ] Gucht K Van de, Sabbe K, Meester L De, *et al.* *Environmental Microbiology*, 2001, **3**(11): 680 ~ 690.
- [ 32 ] Lindstrom Eva S. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27**: 163 ~ 174.
- [ 33 ] Gast R J, Dennett M R, Caron D A, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **4**: 2028 ~ 2037.
- [ 34 ] Boivin M Y, Massieux B, Breure A M, *et al.* *Aquatic Toxicology*, 2005, **71**: 345 ~ 356.
- [ 35 ] Boon N, Windt W D, Verstraete W, *et al.* *Microbiology Ecology*, 2002, **39**: 101 ~ 112.
- [ 36 ] Schabereiter G C, Jimenez S, Pinar G, *et al.* *Environmental Microbiology*, 2002, **4**(7): 392 ~ 400.
- [ 37 ] Darrell P C, Fred J B, Jim K F. *Microbiology Reviews*, 1997, **20**: 217 ~ 230.
- [ 38 ] Sekiguchi H, Koshikawa H, Hiroki M, *et al.* *Microbial Ecology*, 2002, **43**: 82 ~ 91.
- [ 39 ] Dickerman B, Metzger J, Lee T W. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006, **22**: 29 ~ 33.
- [ 40 ] Bakermans C, Madsen E L. *Microbial Ecology*, 2002, **44**: 95 ~ 106.
- [ 41 ] Gernert C, Glockner F O, Krohne G, *et al.* *Microbial Ecology*, 2005, **50**(2): 206 ~ 212.
- [ 42 ] Bernhard A E, Field K G. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **4**: 1587 ~ 1594.
- [ 43 ] Katharine G P, Anne E B, Timothy J B, *et al.* *Environmental Monitoring and Assessment*, 2003, **81**: 313 ~ 326.
- [ 44 ] Vaisanen R K, Roberts M S, Garland J L, *et al.* *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, **37**: 2007 ~ 2016.
- [ 45 ] Gonzalez J M, Simo R, Massana R, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(10): 4237 ~ 4246.
- [ 46 ] Polymenakou P N, Bertilsson S, Tselepidis A, *et al.* *Microbial Ecology*, 2005, **49**(3): 367 ~ 378.