

一株沙门氏菌拮抗菌的筛选及其在污染土壤原位修复中的应用

宋德显^{1,2,3} 尹睿^{1,2*} 林先贵^{1,2} 王一明^{1,2} 张华勇^{1,2} 王纪杰^{1,2}

- (1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室 江苏 南京 210008)
- (2. 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室 江苏 南京 210008)
- (3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 利用无菌滤纸片平板法从沙门氏菌(*Salmonella*)污染土壤中筛选到一株有效拮抗沙门氏菌的细菌 A45, 通过形态学、革兰氏染色和 16S rDNA 序列同源性分析鉴定为产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)。温室土培试验和田间原位试验结果都发现, 利用该菌株制备的沙门氏菌拮抗菌剂能显著降低土壤中沙门氏菌数量($P < 0.05$), 与对照相比土壤中沙门氏菌数量下降 2-3 个数量级, 表明该拮抗细菌可应用于沙门氏菌污染土壤的修复。

关键词: 沙门氏菌, 拮抗菌, 土壤污染, 微生物修复, 产碱菌属

Screening of an Antagonistic Bacterial Strain Against *Salmonella* and Its Application in In-site Bioremediation of *Salmonella*-contaminated Soils

SONG De-Xian^{1,2,3} YIN Rui^{1,2*} LIN Xian-Gui^{1,2} WANG Yi-Ming^{1,2}
ZHANG Hua-Yong^{1,2} WANG Ji-Jie^{1,2}

- (1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China)
- (2. Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science and Hongkong Baptist University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)
- (3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A bacterial strain, A45, with antagonistic activity against *Salmonella* was isolated from *Salmonella*-contaminated soils, which was identified as *Alcaligenes* sp. by checking the individual morphology, colony characteristics and 16S rDNA sequencing. The inhibiting effects of A45 to *Salmonella* in soils were investigated by field and greenhouse pot experiments respectively. The amounts of *Salmonella* in soils decreased up to three orders of magnitude after spraying A45 into soils both under greenhouse and field conditions. It suggested that it might be an effective, economical and environmentally friendly approach to apply A45 for in-site remediation of pathogens-contaminated soils.

Keywords: *Salmonella*, Antagonistic bacterium, Soil pollution, Bioremediation, *Alcaligenes* sp.

沙门氏菌(*Salmonella*)是引起肠道细菌性感染和细菌性食物中毒的重要病原体。在全球范围内,近年来沙门氏菌中毒事件急剧上升^[1],其中许多中毒事件是由于食用了沙门氏菌污染食物和饮用了沙门氏菌污染水而引起的,因而人们对导致食物和水体污染的土壤病原菌污染更加关注^[2]。研究表明,大量的未经妥善处理的人、畜、禽粪便施入土壤以及生活、养殖污水排放到土壤环境是增加沙门氏菌污染土壤风险的主要因素^[3],人、畜、禽粪便作为有机肥施加到土壤中增加了沙门氏菌在土壤中的存活时间,而土壤中大量存在的沙门氏菌又增加了畜禽养殖业的风险^[4]。土壤中大多数病原菌在4°C–6°C范围内可存活30 d左右,但是沙门氏菌存活时间相对较长^[3],在20°C–30°C的土壤中,也要比其他病原菌存活时间要长得多^[5]。Islam等^[6]研究发现沙门氏菌随污灌或畜禽粪便不当使用进入土壤后,203 d–231 d后在土壤样品中仍然可以检测到存活的沙门氏菌;在沙门氏菌污染土壤上播种小萝卜84 d和播种红萝卜203 d后仍能检测土壤中沙门氏菌的存在。也有文献报道夏季随着畜禽粪便施加到土壤中的沙门氏菌可存活近300 d^[7]。土壤中存活的沙门氏菌也可随地表径流进入到地表水,从而污染地表水^[8]。土壤的沙门氏菌能通过造成食物和水源污染而引起人体肠道感染,进而影响公共卫生安全。因此,抑制或杀灭土壤环境中沙门氏菌、修复污染土壤对于减少沙门氏菌感染性肠道病的爆发和蔓延具有重要意义。但是国内外有关沙门氏菌污染土壤微生物修复的研究鲜见报道。

本研究旨在运用微生物生态学的原理,利用自沙门氏菌污染土壤中分离筛选的沙门氏菌拮抗菌的抑制或杀灭作用对其污染土壤进行微生物修复,期望达到降低沙门氏菌污染带来的潜在危害和保障公共卫生安全的目的。

1 材料与方法

1.1 拮抗菌株的筛选

1.1.1 培养基:沙门氏菌鉴别培养基:氯化镁孔雀绿增菌培养基(Magnesium Chloride Malachite Green Enrichment Medium), HE 琼脂培养基(Hektoen En-

teric Agar),均购自上海中科昆虫生物技术开发有限公司。

LB 细菌 (Luria-Bertani)培养基:蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; 固体培养基添加琼脂粉 1.2%–1.5%。

1.1.2 沙门氏菌菌株:标准菌株:肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*), 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)。分离菌株:采用选择性培养基分离自畜禽粪便。

1.1.3 样品来源:分离拮抗菌的环境样品采自浙江、江苏、山东等地畜禽养殖场(养猪场、养鸡场、养兔场)的新鲜粪便、粪便堆肥以及沙门氏菌污染土壤。

1.1.4 分离筛选方法:目标菌株分离:分别称取5 g 鲜样到50 mL 无菌水中,振荡45 min,然后分级稀释(10^{-3} – 10^{-8})涂布在LB细菌培养基,30°C 恒温培养24 h,待平板上长出菌落后,挑选单菌落备用。

目标菌株培养:用无菌牙签挑取分离得到的单菌落到96孔微孔板中,每个微孔中在接入菌种前各注入130 μ L LB培养基,然后置于28°C 恒温培养48 h。

沙门氏菌拮抗细菌的初筛:采用无菌滤纸片平板法^[9]进行初筛。首先均匀涂布病原菌接种液于LB细菌培养基平板上,分别将蘸有96孔微孔板中的各种菌液的圆形灭菌(直径6 mm)滤纸片贴在涂过病原菌的平板上,28°C 恒温培养2 d,检查滤纸片周围的菌落生长情况。如有明显抑菌圈或者影响了病原菌的生长,说明该种菌对相应病原菌有拮抗作用。取对病原菌生长有抑制作用的不同形态菌落,记录,拍照,分离纯化,编号后4°C 保存。

高效拮抗细菌的复筛:选取对所有供试沙门氏菌抑菌圈较大的菌株进行复筛,复筛方法同初筛方法,挑选抑菌效果稳定的菌株。

1.2 拮抗菌株的鉴定

1.2.1 拮抗菌株的形态观察和生理生化鉴定:取合适稀释度的拮抗菌株纯培养液涂平板,置37°C 培养,待长出菌落后,观察菌落形态特征。采用革兰氏

染色镜检,扫描电镜观察其个体形态。另外,进行葡萄糖发酵试验、吡啶试验、甲基红试验、伏普试验、硫化氢试验等生理生化鉴定^[10]。

1.2.2 拮抗菌株 16S rDNA 鉴定:拮抗菌株 DNA 提取, LB 液体培养基培养 24 h, 使用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 K 713 (Bacteria Genomic DNA CTAB Miniprep Kit), 购自申能博彩生物科技有限公司, 具体使用参照说明书。

PCR 扩增引物选用 16S rDNA 细菌通用引物 27f/1492r, (f/r 分别代表正向/反向引物) 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3^[11], 1492r: 5'-CGGGC GGTGTGTACAAG-3^[12], PCR 片段长度 1465 bp。

扩增反应体系(50 μ L): buffer(10 \times) 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 10.0 μ mol/L 引物 27f 和引物 1405r 各 0.25 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.125 μ L, 模板 1.0 μ L, 加超纯水补至 50 μ L。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖胶鉴定后, PCR 产物由上海英骏生物技术有限公司完成序列测定, 测序所获得序列信息通过 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)网站, 用 BLAST 软件比对, 进行同源性检索。

1.3 拮抗菌生长特性

1.3.1 生长曲线的绘制:将斜面保藏菌种活化后转接液体 LB 培养基中培养 12-14 h, 用 5 mL 无菌吸管吸取 2.5 mL 培养液转入盛有 50 mL LB 液体培养基的三角瓶内, 混合均匀后取 5 mL 放入无菌试管中; 将接种的试管置摇床 37 $^{\circ}$ C (150 r/min)培养 24 h, 每隔 2 h 取样, 用未接种的 LB 液体培养基作空白对照, 在 600 nm 波长下测定吸光度 OD_{600} , 同时做稀释平板活菌计数, 根据测定结果绘制生长曲线^[10]。

1.3.2 最适温度和适宜生长温度范围:250 mL 的培养瓶中, 各装入培养液 50 mL, 以 1%的接种量接种对数生长期的菌悬液, 分别于不同的温度条件(温度设定为 10 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C)振荡(150 r/min)培养 10 h, 在 600 nm 波长下测定菌悬液浊度, 每个温度设 3 个重复。

1.3.3 最适 pH 和适宜 pH 值范围:配制不同初始 pH 值(4、5、6、7、8、9、10)梯度的液体培养基, 取

对数生长期的菌悬液以 1%的接种量接种, 在 1.3.2 所得最适温度条件下振荡(150 r/min)培养 10 h, 在 600 nm 波长下测定菌悬液浊度, 每个 pH 设 3 个重复。

1.3.4 摇瓶培养适宜装液量:于 250 mL 的培养瓶中, 分别装入 25、50、100 和 150 mL 液体培养基(初始 pH 为 1.3.3 中所得最佳 pH), 以 1%的接种量接种对数生长期的菌悬液, 在 1.3.2 所得最佳温度条件下振荡(150 r/min)培养 10 h, 在 600 nm 波长下测定菌悬液浊度, 每个装液量设 3 个重复。

1.4 土壤环境中拮抗菌对沙门氏菌的拮抗作用

1.4.1 温室土培试验:采用温室土培的方法, 研究拮抗菌在土壤环境中对沙门氏菌的拮抗效果。供试土壤和有机肥取自江苏宜兴菜园土和南京某养殖场新鲜猪粪。将所选取的拮抗菌株 A45 经过 LB 液体培养基发酵扩大培养(菌液含菌数量级 10^{12} 个/mL), 实验分对照和喷施菌剂 2 个处理, 每个处理设 4 个重复。具体做法是: 盆钵(底部直径 8 cm, 口径 12 cm, 有效高度 15 cm)中加入过 20 目筛的风干土 500 g, 加 2%新鲜猪粪, 混合均匀, 施菌处理盆钵中投加拮抗菌液 60 mL, 对照处理投加经灭菌处理的菌液 60 mL, 然后加水至土壤最大持水量的 60%, 盆钵置于温室中自然条件下培养。分别于施菌后第 0、1、3、5 和 7 天用土钻采集土壤样品, 立即用 MPN 法经氯化镁孔雀绿选择性培养基增菌, 然后用 HE 琼脂培养基检验, 平板变蓝绿色或蓝色, 菌落中心黑色或几乎全黑色, 反应阳性者为含沙门氏菌^[13-14]。

1.4.2 田间原位试验:田间小区试验在南京卫岗奶牛基地有机肥厂附近菜地进行。试验分对照和喷施拮抗菌剂 2 个处理, 每个处理设 3 个重复。具体做法为: 参考当地习惯按照 20 t/hm² 的量施加新鲜猪粪, 然后把猪粪和耕层土耙匀, 施菌处理喷施预先制备好的拮抗菌液, 喷施量为 1500 mL/m²(菌液含菌量约 1×10^{10} 个/mL), 对照处理喷施等量的经灭菌处理的拮抗菌液, 然后覆盖一层农膜。于喷施菌液后第 0、5、10、15、20、30、40 天按五点采样法采集田间实验小区 0-10 cm 表层土样, 采集后立即检测土壤中沙门氏菌数量。采用 MPN 法经氯化镁孔雀绿选择性培养基增菌, 然后用 HE 琼脂培养基检验, 反应阳性者为含沙门氏菌。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的筛选和鉴定

复筛后获得一株拮抗效果稳定且抑菌圈较大的菌株(图 1), 命名为 A45。从图 1 中的抑菌圈可以看出, 在涂有沙门氏菌的平板上用无菌滤纸片验证结果表明, 拮抗菌株 A45 对沙门氏菌的较好的拮抗效果。

经革兰氏染色、镜检和扫描电镜(图 2)观察菌株形态, 该菌株为革兰氏阴性杆菌, 短杆状, 不产芽孢, 其大小为 $(2.519 \pm 0.933) \mu\text{m} \times (0.540 \pm 0.047) \mu\text{m}$ 。

生理生化鉴定结果如下: 葡萄糖发酵试验, 阴性; 吡啶试验, 阴性; 甲基红试验, 阴性; 伏普试验, 阴性; 柠檬酸盐试验, 阴性; 硫化氢试验, 阳性。

将拮抗菌 A45 的 16S rDNA 序列结果通过 BLAST 软件与 GenBank 数据库中核酸数据进行同源性比对, 选取同源性在 99%以上的细菌, 再利用 Clustal X1.8 和 MEGA 4.0 分析构建系统发育树。由系统发育树结果(图 3)可知, 菌株 A45 与产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp. F78, 登录号: EU443097.1)的同源性达 100%。结合形态学参照《伯杰细菌鉴定手册》^[15]和系统发育树分析结果将拮抗菌株 A45 初步鉴定为产碱杆菌, 拮抗菌 A45 在细菌分类学地位上归属于产碱菌属(*Alcaligenes* sp.)。

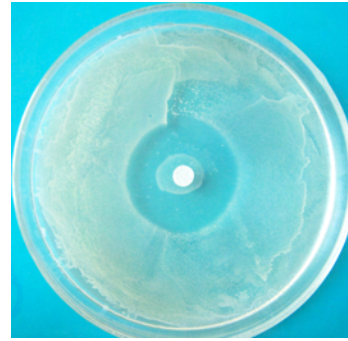


图1 无菌滤纸片平板法验证拮抗菌株A45对沙门氏菌拮抗效果

Fig. 1 The antagonistic effect of A45 against *Salmonella* by using sterile filter paper discs

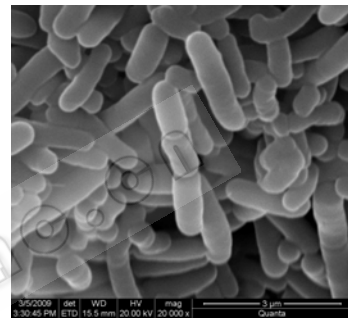


图2 拮抗菌 A45 扫描电镜图片

Fig. 2 Scanning Electron Microscope photo of antagonistic bacterial strain A45

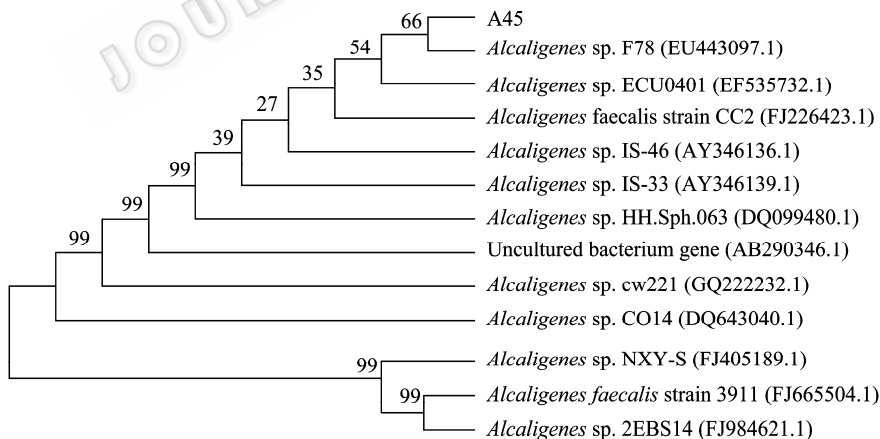


图3 基于16S rDNA基因序列绘制的A45系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of A45 based on 16S rDNA sequence

2.2 拮抗菌生长特性

2.2.1 生长曲线: 从生长曲线(图 4)结果看, 分光光度计浊度法和活菌计数法两种方法均表明拮抗菌在培养 4 h 后进入对数生长期, 两种方法测定对数期的菌数基本一致; 但是, 活菌计数法表明拮抗菌在

培养 12 h 后进入平稳生长期, 持续到 18 h 后开始出现下降趋势, 拮抗菌生长进入衰亡期; 然而分光光度计浊度法测生长曲线 12–18 h 这段时间, 从曲线上看拮抗菌生长并没有出现下降反而一直上升的趋势, 直到 20 h 时才进入平稳期。这是因为分光光度

计测出的为细菌的总数,其中包括死亡的细菌,在对数生长期死亡的细菌极少,可以忽略不计,而稳定期时细菌出现大量死亡,浊度增加,因此两种测定方法对稳定期结果存在差异。鉴于分光光度法测定结果具有快速的优点,在培养条件试验中采用分光光度法测定菌液浊度来比较各培养条件对细菌生长影响的差异。

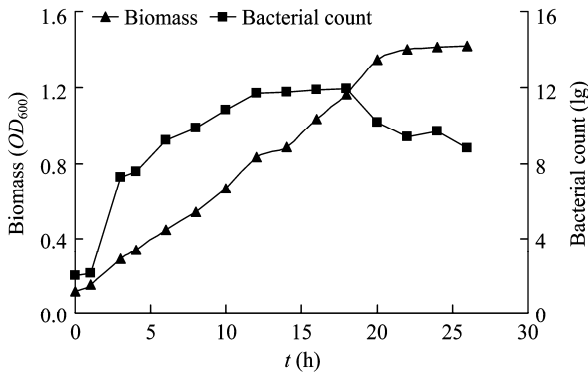


图4 拮抗菌株 A45 的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of the antagonistic bacterial strain A45

2.2.2 最适温度和适宜生长温度范围:在其他培养条件相同的情况下,细菌的生长状况随着温度的变化而变化。如图(5)所示,拮抗菌在 30°C 的生长量最大,生长状况最佳,其 OD₆₀₀ 测定值明显高于其余温度条件所得的结果,统计结果表明结果存在差异显著性。因此,温度培养条件实验结果表明拮抗菌株适宜生长温度范围为 20°C–40°C,最适生长温度为 30°C。

2.2.3 适宜 pH 和最适生长 pH 范围:细菌生长需要一个适宜的 pH 范围。从图 6 中可以看出,在 pH

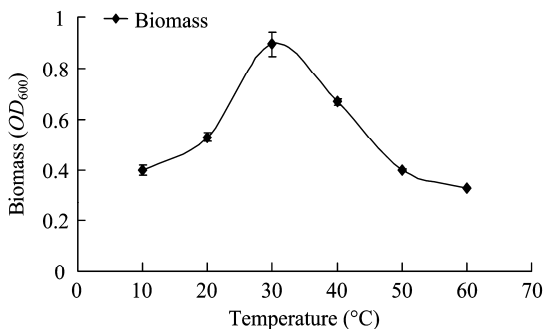


图5 温度对拮抗菌株 A45 生长的影响

Fig. 5 Influences of temperature on the growth of antagonistic bacterial strain A45

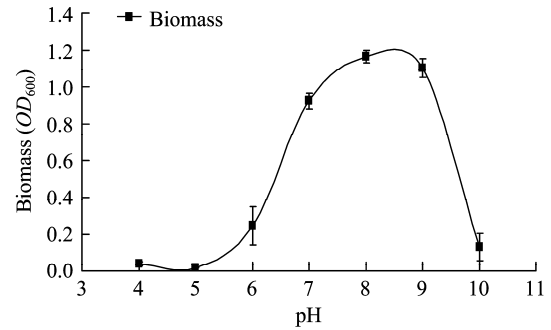


图6 pH 对拮抗菌株 A45 生长的影响

Fig. 6 Influences of pH on the growth of antagonistic bacterial strain A45

6.0–10.0 范围内该菌都能生长,但是在 pH 7.0–9.0 的范围内生长良好,最适 pH 值为 8.0。

2.2.4 适宜的装液量:在其他条件相同的情况下,好氧细菌培养过程中的通气量也会影响细菌的生长。由图 7 可知,在培养温度条件和初始 pH 相同的情况下,培养相同的时间,装液量在 25 mL/250 mL,拮抗菌生长情况最好,与装液量分别为 50 mL/250 mL、100 mL/250 mL、150 mL/250 mL 条件下培养结果存在显著的差异。实验结果表明,拮抗菌 A45 为专性好氧细菌。

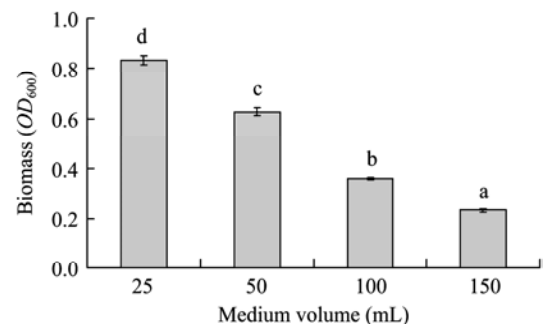


图7 装液量对拮抗菌株 A45 生长的影响

Fig. 7 Influences of medium volume on the growth of antagonistic bacterial strain A45

2.3 土壤环境中拮抗菌对沙门氏菌拮抗效果

2.3.1 温室土培试验:土培试验结果见图 8。在培养的前 3 天,对照和添加菌剂处理之间沙门氏菌数量没有显著性差异;但是添加拮抗菌剂 5 d 后,与对照相比,添加拮抗菌的处理土壤中沙门氏菌数量显著下降,说明加入的拮抗菌对土壤中的沙门氏菌已开始发挥拮抗或抑制作用;添加拮抗菌剂 7 d 后,添加菌剂处理与对照之间土壤中沙门氏菌数量相差达

2-3 个数量级, 表明添加到土壤中拮抗菌显著抑制了土壤中的沙门氏菌的生长或杀灭了土壤中存活沙门氏菌, 致使检测到土壤中的沙门氏菌数量急剧减少, 而对照处理土壤中的沙门氏菌却只有缓慢下降。

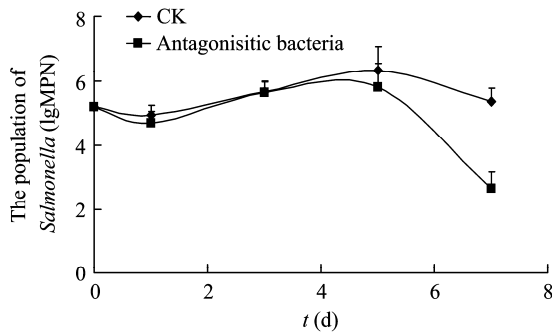


图8 温室土培条件下拮抗细菌A45对土壤中沙门氏菌数量的影响

Fig. 8 The influence of the antagonistic bacterial strain A45 on the amounts of *Salmonella* in soils under the greenhouse condition

2.3.2 田间原位修复试验: 田间小区试验结果见图9, 可以看出, 与土培试验不同, 在田间条件下, 喷施拮抗菌剂后 10 d 内施菌处理和对照处理之间并未出现显著差异, 说明在此阶段, 拮抗菌尚未发挥抑制或拮抗作用。但是从 10 d 以后喷施菌剂处理与对照之间沙门氏菌数量表现出显著差异, 而且随着时间的延长, 两者之间的差异逐渐增加。30 d 后喷施菌剂处理的土壤中沙门氏菌数量比对照低 10 倍以上, 而 40 d 后喷施菌剂的土壤中沙门氏菌数量比对照下降近 100 倍, 说明在田间条件下喷施沙门氏菌拮抗菌剂可以有效地减少土壤中沙门氏菌数量, 而且具有较长的持续性。

将田间试验与土培试验进行比较即可发现, 在

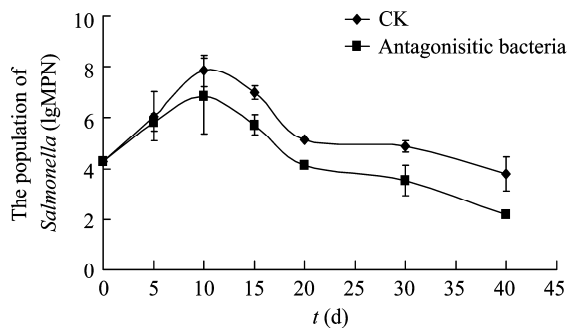


图9 田间条件下拮抗细菌A45对土壤中沙门氏菌数量的影响
Fig. 9 The influence of the antagonistic bacterial strain A45 on the amounts of *Salmonella* in soils under the field condition

田间条件下拮抗菌对沙门氏菌的抑制效应相对滞后, 而且拮抗效果也稍差一些, 这主要是由于土培试验是夏季在温室内进行, 气温较高, 而田间试验是秋季在田间进行, 气温较低, 因此可以看出, 温度是影响拮抗菌发挥拮抗功能的重要因子。两个试验结果都说明沙门氏菌拮抗菌株可以应用于病原菌污染土壤的原位修复, 降低污染土壤中沙门氏菌的存活数量, 降低沙门氏菌对公共环境卫生安全所带来的风险。

3 结论

利用无菌滤纸片平板法从沙门氏菌污染土壤中筛选到一株能有效拮抗沙门氏菌的细菌菌株 A45, 通过对其进行形态观察、生理生化鉴定及 16S rDNA 测序, 鉴定该菌株属于产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.); 对其生长特性测试结果表明, 该菌株为专性好氧菌; 适宜生长温度范围为 20°C-40°C, 最适生长温度为 30°C; 适宜生长 pH 范围为 7-9, 最适生长 pH 为 8。

该菌株在土壤中具有较好的抑制或拮抗沙门氏菌的作用, 用该菌株制备的沙门氏菌拮抗菌剂显著降低土壤中沙门氏菌数量($P < 0.05$), 与对照相比土壤中沙门氏菌数量下降达 2-3 个数量级, 减轻了沙门氏菌污染土壤的生态环境风险。结果证明利用拮抗细菌原位修复病原菌污染土壤是一条切实可行的有效途径。





参考文献

- [1] Gales AC, Sader HS, Mendes RE, et al. *Salmonella* spp. isolates causing bloodstream infections in Latin America: report of antimicrobial activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*, 2002, 44(3): 313-318.
- [2] Nirit Bernstein, Shlomo Sela, Sarit Neder-Lavon. Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrigation Science*, 2007, 26(1): 1-8.
- [3] Holley RA, Arrus KM, Ominski KH, et al. *Salmonella* survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. *Journal of Environmental Quality*, 2006, 35(4): 1170-1180.
- [4] Forshell LP, Ekesbo I. Survival of *Salmonellas* in composted and not composted solid animal manures. *Journal of Veterinary Medicine*, 1993, 40(9/10): 654-658.
- [5] Guan TY, Holley RA. Pathogen survival in swine manure

- environments and transmission of human enteric illness: A review. *Journal of Environmental Quality*, 2003, **32**(2): 383–392.
- [6] Mahbub Islam, Jennie Morgan, Michael P Doyle, *et al.* Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(4): 2497–2502.
- [7] Block JC, Havelaar AH, Hermite PL. Epidemiological studies of risks associated with the agricultural use of sewage sludge. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 166.
- [8] Peter D Gessel, Neil C Hansen, Sagar M Goyal, *et al.* Persistence of zoonotic pathogens in surface soil treated with different rates of liquid pig manure. *Applied Soil Ecology*, 2004, **25**(3): 237–243.
- [9] Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, *et al.* Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal of Medical Mycology*, 2007, **17**(4): 242–249.
- [10] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 69–72.
- [11] Edwards U, Rogall T, Blocker H, *et al.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**(19): 7843–7853.
- [12] Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, **28**(9): 1942–1946.
- [13] 杜兆丰, 李惠萍. 氯化镁-雀绿培养基增菌效果与改良. 实用预防医学, 1992, **2**(3): 180–181.
- [14] 段卫平, 叶秀雯. 污水沙门氏菌定量检验方法的改进. 环境与健康杂志, 2000, **17**(4): 236–237.
- [15] Buchanan(布坎南) RE, Gibbons(吉本斯) NE. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984: 371–374.

征订启事

2010年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月4日出版), 单价55.00元, 全年定价660元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月25日出版), 单价65.00元, 全年定价780元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月20日出版), 单价48.00元, 年价576元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月15日出版), 单价80元, 全年定价480元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订 阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路1号院3号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量