DOI ：10. 13227zj. hjkx. 2007. 03. 031

第28卷第3期

2007年3月

环 境 科 学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

降解多环芳桂的菌株***Gordonia* sp. He4**的分离鉴定及 其在菲污染土壤修复过程中的动态变化

刘磊"，李习武刘双江刘志培1 [[1]](#footnote-2) [[2]](#footnote-3)

(1.中国科学院微生物研究所，北京100080； 2.中国科学院研究生院，北京100049)

摘要:从石油污染土壤中分离得到1株降解石油炷类污染物的He4菌株.该菌株能够以正十六烷、苯、蔡、蔥、菲和荒作为唯一 的碳源生长.经过对其形态特征、生理生化、以及16S rRNA基因序列分析，该菌株初步鉴定为*Gordonia* sp..通过分析其16S rRNA基因序列，设计引物并构建了竞争性模板.通过竞争性定量PCR(quantitative conpetitive-PCR)分析了该菌株在含有菲的污 染土壤中数量的变化.结果表明，部分菌株He4在土壤中转变为不可培养状态，采用传统的稀释涂布菌落计数法(CFU)无法对 其进行定量,而通过QC-PCR能够较准确地测定土壤中微生物的动态变化.

关键词：多环芳炷;生物降解;生物修复;QC-PCR

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301 (2007)03-0617-06

Isolation and Identification of a PAHs-Degrading Strain *Gordonia* sp. He4 and Its Dynamics During Bioremediation of Phenanthrene Polluted Soil

LIU Lei1 \ UXi^vu1, LIU Shuang-jiang1, LIU Zhi-pei1

(1. Institute of Microbiology, Chinese Acaden^ of Sciences, Beijing 100080, China； 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract：** A bacterial strain, He4, capable of degrading az-hexadecane and other polycyclic aromatic compounds was isolated from petroleum polluted soil. This strain was identified as *Gordonia* sp. He4 according to its morphology, physiological, biochemical properties and the analysis of its 16S rRNA gene sequence. Based on its 16S rRNA gene sequence, specific primers were designed and a competitor template was amplified by PCR. The dynamics of strain He4 in phenanthrene polluted soil was analyzed by colony forming unit (CFU) method and QC-PCR method. The results showed that partial of He4 become non-culturable and un-detectable by CFU method. But by using QC-PCR, the population density of strain He4 could be measured accurately.

**Key words：** polycyclic aromatic compounds； biodegradation； bioremediation； quantitative competitive PCR(QC-PCR)

生物修复(bioremediation)是利用微生物所具有 的广泛的代谢途径对污染物进行处理的一种环境生 物技术⑴，其中投加高效降解菌株是生物修复中最 常见最有效的一种方法•为了更有效地控制生物修 复过程，提高其效率，需要对加入的活性菌株的数量 和降解活性进行实时检测.然而，土壤是一个十分复 杂的环境体系，受到其中很多因素，例如营养成分 (碳、氮、磷源等)，温度，氧分压，含水量,pH值或盐 浓度的变化等的影响，某些微生物细胞以一种不可 培养(viable but non-culturable )的状态存在・Xu等㈢ 发现，将实验室获得的纯培养菌株*Escherichia coli*或 *Vibrio cholerae* O1在缺乏营养以及低温的条件下进 行培养，一段时间后通过荧光显微镜观察，活细胞的 总体数量并没有明显下降，但是当使用通用的培养 基进行培养计数时，其结果却明显偏低，有些细胞已 经无法在培养基内生长•研究表明，这种现象在环境 中普遍存在•由于土壤的复杂性以及微生物在环境 中存在不可培养的状态，采用传统的以培养为基础 的方法，如最大可能数法(most probable number, MPN)或稀释涂布菌落计数法(colony forming unit, CFU)等,对加入到环境中进行生物修复的微生物数 量的变化进行动态监测，就有一定困难⑺・

目前，以环境中DNA或RNA为基础的定量技 术已经开始广泛应用，其中基于杂交探针进行定量 的狭缝杂交(quantitative slot-blot hybridization)和荧光 原位杂交(fluoTescent *in situ* hybridization, FISH)已经 成功地运用于确定微生物种群的数量，但是这些方 法需要较高浓度的rRNA样品，要求目标菌株在土

壤中具有较高的丰度或较快的生长速率同，另外由 于环境样品中会产生自发荧光，使得荧光原位杂交 具有较高的假阳性率⑹，这些不利因素制约了定量 核酸杂交技术在土壤微生物种群计数中的应用•同 以上技术相比，PCR技术具有很高的灵敏度，即使某 种菌株在土壤中的含量很低，通过PCR扩增技术也 能够得到检测，定量PCR技术应运而生，并且开始 用于环境样品中微生物数量的检测W其中竞争 性定量 PCR 技术(quantitative competitive PCR, QC~ PCR)是指在PCR反应体系中加入一定已知量的竞 争性模板(con^etitor)作为内标(internal standard与 未知浓度的目标模板(target)—起进行PCR扩增，为 了达到相近的扩增效率，竞争性模板应当具有与目 标模板相同的引物结合位点，且二者的扩增产物大 小应相近同，通过二者扩增产物的比值反映初始目 标模板的浓度凹，进而可以计算出样品中目标菌株 的总数量•通过MPN法或CFU法的计数结果与QC- PCR的计数的比较，可以计算出样品中目标菌株的 不可培养细胞的数量.

本研究从石油污染土壤中分离得到1株具有多 环芳桂化合物(PAHs)降解活性的菌株He4,分析其 降解PAHs的特性，并进一步以该菌株为对象，应用 QC PCR和CFU方法，分别鉴定了土壤中菌株He4 不可培养和可培养细胞数量的动态变化，为进一步 研究菌株He4在受多环芳桂污染土壤的生物修复中 的应用奠定了基础.

**1**材料与方法

**11**菌株的分离、培养及鉴定

菌株He4分离自石油污染的土壤，具体方法如 下:将采自华北油田的原油污染土壤置于装有100 mL液体无机盐培养基的三角瓶内，其组成为 K2HPO4 1. 0 g； KH2PO4 1. 0 g；附O4 ° 7H2O 0. 5 g； NH4NO3 1. 0 g；CaCl2 0. 02 g；痕量的 FeCl3；H2O 1 000 mL,固体培养基内加入1.5%的琼脂•分别加入正十 六烷、荼、蔥、菲和花作为唯一的碳源，在30 °C下摇 床振荡培养，进行驯化•其中正十六烷和荼的浓度为 200 mg L,蔥、菲和瓦的浓度为100 mgL.驯化2 ~3 代后，取培养液涂布含有上述污染物的无机盐固体 平板，于30 °C温箱培养，挑取单菌落进行验证.

按照文献［10］的方法对菌株进行生理生化鉴定.

提取菌株He4的总DNA,采用PCR扩增其16S rRNA基因•使用通用引物27f (5'<jAGAGTIT GAITCOGGCrCAG-3')和 ］541r ( 5'-AAGGAGGTG AIUZAGCC-3'), PCR 反应条件为：95 °Q 5 min； 94 °Q 1 min； 55 °Q 1 min； 72 °Q 1 min,共 30 个循环，最后一 个循环72 °C延长至5 min.扩增产物由上海基康公司 测序.

**1.2**菌株He4降解能力的测定

以正十六烷、苯、荼、蔥、菲和梵等底物为唯一碳 源对He4进行培养•对于正十六烷、苯和荼3种底 物，通过测定培养液的046。的值衡量菌株对底物的 降解能力•通过HPLC法测定培养液中残留的的蔥、 菲和陀，计算其降解速率•具体测定方法为:将待测 样品的pH值调至2. 0,以等体积的正己烷萃取2 min,将有机相用孔径为0. 2 Mm的虑膜过滤后进行 HPLC分析•采用HP-Extender<18柱，流动相为乙月青 :水=60 ：40,流速为1. 0 mL/nin•蔥、菲和花的检测 波长分别为254 nm, 251 nm和240 nm.根据标准曲 线分别计算蔥、菲和花的量.

**1.3**菌株He4对菲污染土壤生物修复系统的建立

菌株He4在含有100 mg菲的无机盐培养基 中培养，收集菌体加入到70 g含有菲(500 mg °kg\_1 ) 的灭菌土壤中，使其初始浓度达到1. 14 X 108 CFUog\_1. 土壤的含水量控制在40%〜60 %，30°C避 光培养•分别在0, 4, & 13, 19, 28, 38 d取土壤样品 0. 5 g,加入1. OmLNaCl溶液(0. 9%),涡旋振荡1. 0 min,将混合悬液进行10倍梯度稀释，取100 4L不同 浓度的稀释液涂布含有lOOmg^f1菲的无机盐固体 平板，30 °C培养并对菌落进行计数(CFU).同时另取 0.5g 土壤样品用于DNA提取.

**1.4** 土壤样品中基因组DNA的提取

采用Laurenet等的方法“口，并作适当调整，提取 土壤中的基因组ITQA.具体如下：取0. 5 g 土壤，加 入 1. 0 mL 提取液(100 mmol *L* Tris, 100 nmol *L* EDIA, 100 mmol *L* NaCl, 1 % polyvinylpyrrolidone, 2% SDS )和0.5g玻璃珠(直径460如i)；剧烈振荡5 min, 在13 000 r/nin下离心5 min,取出上清液，加入1 /l0 体积冰冷的乙酸钠(5 mol L),冰上放置10 min后， 在14 OOOr/nin下离心10 min,取出上清夜，加入等体 积的异丙醇，沉淀30 min, 13 000 r /nin下离心10 min, 收集沉淀，溶解于 50 ML IE (10 mmol *L* Tris, 1 mmol *L* EDIA, pH & 0)缓冲液中.DNA经过稀释后用于QC- PCR分析.

**15**引物设计及竞争性模板的构建

本实验根据菌株He4的16S rRNA基因序列设 计了表1中的引物，通过2次PCR反应构建了长度 为890 bp的竞争性模板(con④etitor)用于QC-PCR.

**1.6**标准曲线的建立

| 表**1**本实验所用的引物  Table 1 Primers used in this study | | |
| --- | --- | --- |
| 引物名称 | 引物序列 | 特异性 |
| 456 F | 5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3‘ | Universal |
| 1482 R | 5LACG GCT ACC TIG TIA CGA CT 3’ | Universal |
| HYB-He4 F | 5 '<K5CCCAGACTCCrACGGGAGGCAGCAGTGCGAGCGTTCTCCGG3' | Specific to He4 |
| 1338 R | 5 'CGGTGTGTACAAGGOCC3 / | Universal |
| 298 F | 5' CCIACGGGAGGCAGCAG 3' | Universal |
| He4-961 R | 5 '<]GCrATATCTCrACAGCnTCrGG3 / | Specific to He4 |

将不同浓度的He4菌悬液加入到0.5 g无菌土 壤中，使其终浓度分别达到5. 76X 10% 2. 88X 107,

1. 44X 10% 7. 2X 108 和 3.6X 109CFUog\_19 提取土壤 样品中的DNA,进行QC PCR扩增，其中竞争性模板 为 16^(16X10\_12n]g).

**1.7** QCPCR

将土壤中提取的以及16 *fg*竞争性模板在 同一反应体系内进行PCR扩增，25 4L体系中加入： 1 X PCR 缓冲液，1. 5 mmol L NfeCl2, 0. 2 mmol *L* dNTP, 0.2 Mmolt 引 物 298F He4 961R, 0. 5 U *Taq* DNA聚合酶，目标模板1 ML以及竞争性模板16 *fg.* PCR反应条件为：95 *°C，*5 min； 94 °Q 1 min； 51 °Q 1 min； 72 °Q 40 s，共30个循环，最后1个循环72 °C延 长至5 min.取5 ML PCR产物在1. 2 %的琼脂糖上进 行凝胶电泳.

**1.8**数据处理

琼脂糖凝胶经EB染色后，采用凝胶成像分析 软件Quantity One (Bio-Rad)读取条带亮度，并换算为 单位面积的光密度，通过目标模板与竞争性模板产 物光密度的比值确定菌株He4的数量•数据处理使 用Excel 2000•所有实验均为3个重复.

**2**结果与分析

**2.1**菌株的分离及其对多环芳桂的降解

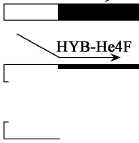
通过对石油污染土壤样品进行3次富集培养， 并通过划线分离得到菌株He4.菌株He4细胞为革 兰氏阳性、杆状，大小约为0. 5 Mm X 1. 0 3n・接触酶 阳性，能够利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等.

扩增菌株He4的16S rRNA基因，并对序列进行 同源性分析，结果表明该菌株与*Gordonia amicalis*的 亲缘关系最近，16S rRNA基因相似性为99%.结合 菌株的形态和生理生化特性，菌株He4初步鉴定为 *Gordonia* sp..

该菌株能够以正十六烷、苯、茶、蔥、菲和芜作为 唯一的碳源生长•其中正十六烷的浓度可达到2 000 mgt苯的浓度为200 MLt荼、蔥、菲和陀的浓度为 100 mg L.

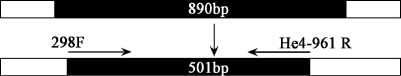
**2.2**菌株He4竞争性模板的构建

对菌株He4的16S rRNA基因序列进行分析表 明，在930〜1010 bp之间包含了 1个可变区，通过 比对发现其序列具有较强的特异性•根据这段可变 区的序列设计引物，通过2次PCR反应得到了竞争 性模板，其构建过程如图1所示.

**L482R**

竞争性 模板

**456 F**

以菌株He4基因组*WA*为模板，采用通用引物 456 F和1 482 R扩增得到996 bp的片段A；以片段 A为模板，用引物HYB He4F和1338R进行扩增，其 中 HYB He4 F 由 2 部分组成：GGCCCAGACT CCIACGGGAGGCAGCAG 对应于 He4 16S rRNA 基因 序列的288 -314 bp,其中包含了与引物298F相同 的序列(CCIACGGGAGGCAGCAG)；另一部分则对应 于480〜495 bp之间的序列，利用这对引物扩增得到 890 bp的片段，该片段既为竞争性模板(competitor). 当采用引物298F和He4-961 R对基因组DNA模板 进行扩增时，得到大小为666 bp的片段，而以竞争 性模板为模板进行扩增，得到的产物大小为501 bp, 该产物缺失了 315〜479之间的165 bp,通过电泳可 以将两者区分.

**1338R**

**996bp**

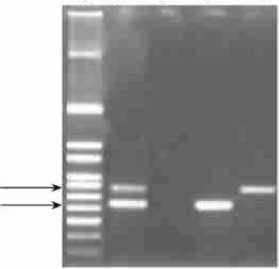
图**1**竞争性模板的构建过程

Fig. 1 Diagram of the strategy used to construct the c(xq)etitive template

利用298 F和特异性引物He4-961 R分别对加 入和未加入降解菌株He4的土壤进行PCR扩增・对 没有加入He4的土壤样品进行扩增没有得到任何产 物(图2)，表明所设计的引物在本实验所采用的土 壤体系中具有较强的特异性，这也增加了结果的可

信度.

**M I 2 3 4**



M： Marker； 1：含有He4的土壤DNA与竞争性模板； 2：不含He4的土壤DNA； 3：竞争性模板；4：He4 DNA 图**2**不同样品的**QC-PCR**电泳图谱

Fig. 2 Agarose electrophoresis of the QC-PCR product of diflerent samples

**2.3 QC-PCR**扩增效率

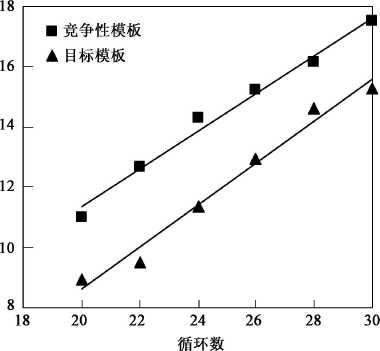
扩增效率是QC-PCR中1个重要的参数，只有 当竞争性模板与目标模板的扩增效率相等或相近时 才能正确反映目标模板的真实初始数量•分别以竞 争性模板与He4的 E 为目标模板进行扩增，在反 应分别进行到20, 22, 24, 26, 2& 30个循环时取样，在 1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳，EB染色后，通过凝胶 成像分析软件Quantity One （Bio-Rad）读取条带亮度， 并换算为单位面积的光密度，与循环数对应做回归 曲线，分别得到两者得扩增效率，如图3所示.

图3的结果表明，目标模板和竞争性模板在20 〜30循环内产物的量与循环次数呈线性相关，目标 模板的相关系数为v = 0. 698 3兀一5. 360 9 （疋= 0. 981 3）,竞争性模板的相关系数为*y = 0.* 627 2兀-

1. 203 1 （7?2=0. 985 6）•根据公式 Efl5ciency[eflf] = 10° -Id为斜率）⑺可以计算出目标模板的的扩增效 率为eflf=3. 992 3,竞争性模板的扩增效率为eff= 3.238 4；在20〜30循环内，两者的扩增效率基本一 致，其比值保持恒定为0. 811 2.当竞争性模板与目标 模板的扩增效率相同或接近时，能较真实地反映样 品中目标模板的浓度•另外，根据数据处理结果发 现，当循环数大于30时，扩增产物趋于饱和，产物的 浓度与循环数不再成线性关系，因此将循环数确定 为30个.
2. **4**菌株He4的细胞数量与PCR产物的相关性

将土壤中加入He4使其浓度分别为5. 76X 10%

1. 88 X 10\ 1.44 X 10% 7. 2 X 108 和 3. 6 X 109



图**3**目标模板和竞争性模板的扩增效率

Fig. 3 Comparison of amplification efficiency of competitor and target

CFU^1,提取土壤中的总DNA后进行QC-PCR扩 增，结果表明土壤中He4的菌体浓度与16电竞争性 模板之间存在线性相关（图4）,其线性范围是5. 76 X106〜3.6X 109CFUog-\利用这一标准曲线可以 直接计算土壤中菌株He4的数量，其中包括可培养 与不可培养细胞的总量.

**2.5** 土壤中菌株He4可培养与不可培养细胞数量 的动态变化

将He4接入菲污染的土壤中，其初始浓度为 1. 14X 108 CFUog\_1,并在30 °C温箱中培养，分别于 0,4, & 13, 19, 28, 38 d取样，通过稀释涂布法计数 CFU和QC PCR方法计算He4的数量变化（图5）.

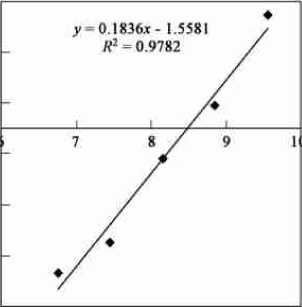
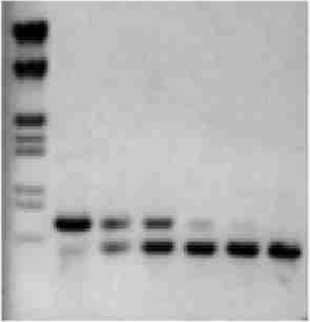
图5的结果表明，在培养初期（4 d内），用2种 方法测定的He4菌株细胞数量都呈现增加的趋势， 只是增长幅度有所区别;然而随着培养时间的延长， 稀释涂布法所得到的He4数量开始下降，到38 d时 只有2. 3X 107CFU°g1,明显低于接入的量;而利用 QC-PCR法所得到的He4数量仍然呈上升趋势，到 38 d时达到了 1.2X109CFU°g \比接入量提高了 10 倍左右，比CFU方法的结果高了近50倍•该结果说 明菌株He4可以在土壤中存活和生长，这对于其在 污染土壤生物修复中的应用极为有利;但2种方法 测定的细胞数存在较大的差异，可能是由于在土壤 培养过程中，受土壤环境的影响，部分He4细胞逐渐 变为不可培养的状态，无法通过涂布法测定;而QC- PCR提取的是土壤中的总WA,因此反映的是土壤 中该菌株的细胞总数的变化，其中包括了可培养的 和不可培养的细胞，因此得到的结果是细胞的数量 呈上升趋势,这也表明菌株He4在土壤中能够存活 和增殖，随着菌株He4在土壤中培养时间的延长，大

细胞数的对数值

25

0.

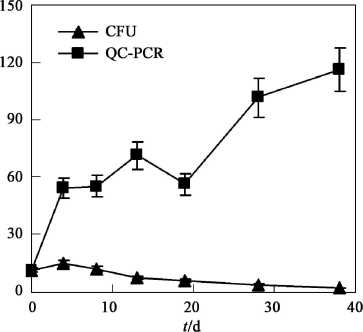
**-035**



He4 的浓度分别为 3. 6X 109 , 7. 2X 108, 1. 44X 108 , 2. 88X 107 和 5. 76X 106CFU°g\_1（电泳图中1 *~5*泳道，泳道6为土壤空白对照）,竞争性模板为16 *fg*图**4**不同浓度**He4**细胞与竞争性模板之间的线性关系

Fig. 4 Relationship between competitor and the density of He4 cells added to soil

多数菌体细胞变为不可培养状态・



图*5*采用**CFU**法和**QC-PCR**法测定土壤中菌株**He4**数量的变化

Fig. 5 Changes in the population density of He4 as measured

with CFU and QC PCR in soil

躱轻寸OH

3讨论

在石油污染土壤中，能够降解烷桂和结构较为 简单的芳香桂(如苯和荼)的微生物数量相对较多， 而多环芳桂类化合物随着芳香环数量的增加，如蔥、 菲或花等,其可降解性逐渐降低•另外，多环芳桂类 化合物由于水溶性差，且更容易吸附于土壤颗粒，因 而不易被微生物利用U •因此，筛选具有多环芳桂 类污染物降解功能的微生物对于石油污染土壤的生 物修复具有重要的应用意义.

本研究从石油污染土壤中分离得到1株能够降 解多环芳桂的细菌*Gordonia* sp. He4•通过比较该菌 株的16S rRNA基因，设计特异性引物以及PCR扩 增，建立了 QC-PCR的方法，用于检测土壤中不可培 养微生物的数量•结果表明，采用传统的以培养为基 础的稀释涂布法所得到的土壤中He4的CFU远远 低于通过QC PCR所得到的菌体数量，是由于土壤 环境的影响导致部分He4菌体细胞进入不可培养状 态，使得稀释涂布培养无法测定这部分菌体数量，而 QC-PCR是通过提取DNA进行定量研究，因此更能 反映土壤中He4的实际数量.

QC-PCR技术被日益广泛地用于土壤中微生物 的定量研究"14],这种方法也被应用于一些未培养 微生物的定量研究⑺•由于16S rRNA基因序列具有 较强的保守性，通过设计不同的特异性引物,可以选 择性地监测某一特定种属的微生物在土壤中的数量 动态变化•除了以核糖体RNA(rRNA)的基因序列设 计竞争性模板外，还可以按照其他功能基因的序列 为基础设计竞争性模板用以监测具有特定功能的微 生物的数量・Qiu等w以铜离子依赖的硝酸还原酶 基因为基础设计了特异性引物以及竞争性模板，对 土壤中依赖铜离子的硝化细菌进行了定量研究•在 生物修复技术的使用过程中，将具有特定降解功能 的高效降解菌株加入污染土壤中对污染物进行降解 是比较有效的方法，为了对修复过程进行控制以及 提高降解效率，需要对所加入的降解菌株的活性和 数量的动态变化进行实时监测，由于微生物在土壤 中以多种方式存在，因此传统的平板稀释涂布法 (CFU)和MPN法都无法反映土壤中降解菌株的实 际数量•而QC-PCR法则通过对土壤中降解菌株的 DNA进行定量来计算降解菌株的数量，能够客观地 反映降解菌株的动态变化•因此，该方法能够实时监 测土壤中高效降解菌株的动态变化，从而调整生物 修复过程中的工艺参数，提高污染物的修复效率.

**4**结论

1. 本研究从石油污染土壤中分离得到1株能 够降解多环芳桂的细菌*Gordonia* sp. He4.根据其 16S rRNA基因序列，设计引物并构建了竞争性模 板，建立了竞争性定量PCR(QC-PCR)的方法.
2. 利用QC-PCR对土壤中菌株He4的数量进 行了研究，结果表明该方法能检测到土壤中可培养 和不可培养的细胞总数，能够准确地反映土壤中菌 株He4的动态变化.

参考文献：

[1 ] Dua M, Singh A, Sethunathan N, *et al.* Biotechnology and bioremediation： successes and limitations [ J] . Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **59：** 143 ~ 152.

[2 ] Xu H S, Roberts N, Singleton F L, *et al.* Survival and viability of nonculturable *Escherichia coll* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[ J] . Microb. Ecol., 1982, 8： 313 ~323.

[3 ] Van Elsas J D, Rosado, A S, Wolters A C, *et al.* Quantitative detection of *Sphingomonas chlorophenolica* in soil via competitive polymerase chain reaction[ J] . J. Appl. Microbiol., 199& **85：** 463 〜471.

[4 ] Kemp P F, Lee S, LaRoche J. Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria Iran RNA content [ J] . Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59：** 2594 ~2601.

[5 ] Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization of suspended cells with rRNA targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms [ J]. Cytanetiy, 1993, **14：** 136 〜143.

[6] Lim E L, Tomita, A V, Thilly W G, *et al.* Canbination of canpetitive quantitative PCR and constant-denaturant capillaiy electrophoresis for high-resolution detection and enumeration of microbial cells[ J| . Appl. Environ. Microbiol., 2001, **67：** 3897 ~ 3903.

[7 ] Barbieri E, Riccioni G, Pisano A, *et al.* Competitive PCR *for* Quantitation of a *Cytophaga -F lexibacter^Bacteroides* Phylum

bacterium associated with the *Tuber borchii* vittad nycelium [ J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, **68：** 6421 ~6424.

[8 ] Raeymaekers L. Basic Principles of Quantitative PCR[ J] . Mol. Biotech., 2000, **15：** 115 ~ 122.

[9 ] Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, *et al.* Analysis of cytokine mRNA and DNA： Detection and quantitation by canpetitive polymerase chain reaction [ J] . Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1990, **87：** 2725 ~2729.

1. Sneath P H A, Mair NS, Sharpe M E, *et al.* Bergey s Manual of Systematic Bacteriology [ M] . Volume 2. London： Williams and Wilkins, 1989.
2. Laurenet M F, Philippot L, Hallet S, *et al.* DNA extraction form soils： old bias for new microbial diversity analysis methods [ J]. Appl. Environ. Micorbiol., 2001, 67： 2354 ~2359.
3. Jonathan D, Van Hamme, Singh A, *et al.* Recent advances in petroleum microbiology[ J] . Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2003, 67： 503 ~549.
4. Lee S Y, Bollinger J, Bezdicek D, *et al.* Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a canpetitive quantitative PCR method[ J] . Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62：** 3787 -3793.
5. Van Elsas J D, Duarte G F, Rosado A S, *et al.* Microbiolc^ical and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment[ *J] .* J. Microbiol. Methods, 1998, **32：** 133 〜154.
6. Qiu X Y, Hurt R A, Wu L Y, *et al.* Detection and quantification of copper-denitrifying bacteria by quantitative competitive PCR[ J]. J. Microbiol. Methods, 2004, **59：** 199 ~210.

1. 收稿日期:2006-04-13；修订日期:2006-05-26

   基金项目：国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601150)；中 国科学院百人计划项目CBRJH-200)

   作者简介:刘磊(1977 ~),男，博士研究生，主要研究方向为环境微生 物学. [↑](#footnote-ref-2)
2. 通讯联系人,E-mail： liudip @sun. im .ac. cn [↑](#footnote-ref-3)