

张 闻,郑立稳,王加宁,等. 利用实时荧光定量 PCR 特异检测多环芳烃污染土壤中的外源降解菌[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):15-18.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.004

利用实时荧光定量 PCR 特异检测多环芳烃污染土壤中的外源降解菌

张 闻¹, 郑立稳¹, 王加宁¹, 黄玉杰¹, 张思玉², 高永超¹, 陈贯虹¹, 郭书海^{1,2}, 李 蕾¹, 王磊磊¹

[1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)/山东省科学院生态研究所/山东省应用微生物重点实验室, 山东济南 250103;

2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳 110164]

摘要:生物强化法修复有机污染土壤过程中,外源降解菌的丰度直接关系着修复效果,有必要开发出特定外源降解菌在土壤中的数量检测方法。针对多环芳烃降解菌 PPZ-1,基于基因组测序结果,筛选可能的特异基因序列,设计对应引物。比对各组引物对菌株及污染土壤样品 DNA 的 PCR 扩增产物,确定适于实时荧光定量 PCR 检测的特异性基因序列和引物。以含有特异性基因序列的重组质粒为标准品,确定实时荧光定量 PCR 反应试验条件,建立标准曲线。将该方法应用于投加了菌株 PPZ-1 的多环芳烃污染土壤,验证其可行性。结果表明,所筛选的特异性引物在菌株中可以扩增出条带,在土壤样品相同位置无明显条带,具有较好的特异性。实时荧光定量 PCR 反应标准曲线相关系数为 0.999 9,斜率为 -3.365,扩增效率为 98.233%,熔点曲线无杂峰。对投加了外源降解菌 PPZ-1 的多环芳烃污染土壤进行绝对定量检测,检测数值与理论值数量级相同,该检测方法能较准确地反映土壤中 PPZ-1 的数量。

关键词:实时荧光定量 PCR;多环芳烃;土壤;外源降解菌;假单胞菌

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0015-04

多环芳烃是环境中广泛存在的一类典型持久性有机污染物,污染范围大、涉及面广,并呈现加重的趋势^[1-2],治理多环芳烃污染迫在眉睫。国内外学者对多环芳烃污染修复技术开展了大量研究,主要有物理、化学、生物修复^[3-6],其中生物修复因具有成本低、无二次污染、可大面积应用等优点而受到重视。生物强化法是生物修复的重要手段之一,其主体是人为投加有高效降解能力的降解菌或菌群,这些微生物可以通过从土著菌中筛选驯化获得、对土著菌进行物理化学诱变后筛选获得、通过基因工程构建获得,降解菌的浓度可控,降解能力强。外源降解菌进入污染环境后,会受污染物胁迫,并与土著菌竞争,其存活和增殖情况在整个修复期内呈现动态变化。外源降解菌的丰度与分布直接关系着修复效果。对降解菌进行实时定量追踪,可准确了解其进入土壤后的存活、增殖情况,从而为改进修复时菌剂的投加量和投加方式提供理论指导,因此有必要开发出特定外源降解菌在土壤中数量的检测方法。

传统的微生物数量检测方法有稀释平板法、血球计数板法等,但这些方法只能对样品中的全部微生物进行无差别的计数,无法对样品中的微生物进行准确的种属区分,因此无法排除环境样品中土著微生物的干扰对特定菌株进行数量检

测。实时荧光定量 PCR 技术^[7-10]可以准确定量特定类群微生物的数量,具有灵敏度高、精确性好、特异性强、安全快速等优点^[11-13],已被应用于检测环境样品中的目标微生物。目前,基于实时荧光定量 PCR 技术对有机污染土壤及其他环境样品中微生物的定量方法多以 16S/18S rDNA、ITS 或功能基因为目的基因^[14-15],研究多集中于某类或某几类土著降解菌,缺少对某种特定外源降解菌进入环境后数量、分布情况的关注。本研究针对外源多环芳烃降解菌,筛选出其特异性基因序列及特异引物,构建实时荧光定量 PCR 反应体系,将其应用于污染土壤中外源降解菌的检测,并验证其可行性。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

多环芳烃降解菌假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) PPZ-1 菌株分离自多环芳烃污染土壤,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,菌种保藏号为 CGMCC No. 12596。将菌株送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行基因组框架图测序,得到编码基因预测结果。

1.2 试验土壤

土壤样品分别采自山东济南(36°42'29"N, 117°04'40"E)、浙江永康(29°00'17"N, 120°14'36"E)地区的农田,采样时间为 2017 年 1 月。2 种土壤样品质地分别为壤土、沙壤土,分别命名为土 1、土 2。土壤样品的部分理化性质如下:pH 值分别为 8.25、5.57;有机质含量分别为 5.2%、3.1%;阳离子交换量分别为 22.6、11.8 cmol/kg;全氮含量分别为 2.28、2.05 g/kg;全磷含量分别为 0.96、0.42 g/kg;全钾含量分别为 13、16 g/kg。检测土壤中多环芳烃模式化合物菲的本底含量分别为 194、748 μg/kg,向土壤中加入菲使其浓度为

收稿日期:2017-08-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:41601331);国家国际科技合作专项(编号:2014DFE90100);山东省自然科学基金(编号:BS2015HZ011);泰山学者工程专项;中国科学院沈阳分院-山东省科学院青年科学家合作伙伴项目。

作者简介:张 闻(1983—),女,山东泰安人,博士,助理研究员,主要从事环境污染修复研究。E-mail:zw-sunshine@163.com。

100 mg/kg, 老化 2 周, 以刺激土著降解菌的生长。

1.3 主要试剂

LB 培养基, 购自北京索莱宝科技有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、10 × PCR buffer (无 Mg^{2+} , 100 mmol/L Tris - HCl, pH 值为 8.8, 25 °C, 500 mmol/L KCl, 0.8% 乙基苯基聚乙二醇)、 $MgCl_2$ (25 mmol/L)、dNTP (10 mmol/L)、Marker、6 × DNA Loading Dye、10 × TAE (400 mmol/L Tris - acetate, 10 mmol/L EDTA, pH 值为 8.0)、引物、细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (B518225)、土壤基因组 DNA 抽提试剂盒 (B618763)、4S Red Plus 核酸染色剂 (BBI A606695)、琼脂糖 - 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (SK8131)、一步法快速感受态细胞制备试剂盒 (SK9307)、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (SK8191), 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; pMD® 18 - T Vector, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.4 主要仪器

HC - 2518R 高速冷冻离心机, 购自安徽中科中佳科学仪器有限公司; DYY - 6C 型稳压稳流电泳仪, 购自北京六一生物科技有限公司; FR980 凝胶成像系统, 购自上海复日科技有限公司; TU - 1901 紫外分光光度计, 购自北京普析通用仪器有限责任公司; PCR 反应扩增仪, 购自美国 Bio - Rad 公司; 3730XL 测序仪, 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; StepOne 型荧光定量 PCR 仪, 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.5 DNA 提取

使用细菌及土壤基因组 DNA 抽提试剂盒, 分别提取菌株 PPZ - 1、土壤样品的 DNA。提取结果经 1% 琼脂糖凝胶电泳检查, 电泳条件为 1 × TAE, 150 V, 100 mA, 20 min。通过凝胶成像系统分析试验结果, 于微量分光光度计下检测 DNA 浓度及 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$, -20 °C 保存备用。

1.6 特异性基因序列的筛选与引物设计

根据菌株 PPZ - 1 基因组测序结果, 将编码基因分别在通用功能数据库基因本体 (gene ontology, 简称 GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, 简称 KEGG)、直系同源序列聚类分析 (cluster of orthologous groups of proteins, 简称 COG)、非冗余蛋白质序列数据库 (non - redundant protein database, 简称 NR)、蛋白质家族数据库 (protein family database, 简称 Pfam)、Swiss - Prot 蛋白质序列数据库 (Swiss - Prot protein sequence database, 简称 Swiss - Prot) 等中进行 Blast 比对, 筛选未注释到的基因序列, 这些序列即为该菌株可能的特异性基因序列。针对得到的基因序列, 使用 PrimerPremier 5.0 分别设计引物。

1.7 PCR 扩增及电泳

PCR 扩增体系为 25 μL: 0.5 μL 模板 DNA, 0.5 μL 引物 F (10 μmol/L), 0.5 μL 引物 R (10 μmol/L), 0.5 μL dNTP (10 mmol/L), 2.5 μL *Taq* buffer (10 ×), 2.0 μL $MgCl_2$ (25 mmol/L), 0.2 μL *Taq* 酶 (5 U/μL), 18.3 μL ddH₂O。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 修复延伸 8 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查, 电泳条件同“1.5”节。通过凝胶成像系统分析试验结果, 选择菌株扩增成功, 而土壤样品扩增失败的基因序列及相应引物作为后续目标序列及特异

性引物, 确定特异性序列, 切胶回收, 克隆测序。

1.8 质粒标准品的制备

将目的条带用手术刀切下, 用试剂盒回收, 与 T 载体连接, 转化进入大肠杆菌感受态细胞内, 涂布于氨苄青霉素抗性平板, 置于 37 °C 环境中培养 24 h, 挑选单克隆于液体 LB 培养基中培养 24 h, 提取质粒; 以质粒为模板进行 PCR 扩增, 获得阳性目标质粒。质粒经测序鉴定无误后用紫外分光光度计测定质粒的 $D_{260\text{nm}}$, 换算成拷贝数。

1.9 实时荧光定量 PCR 标准曲线、反应体系及条件

10 倍梯度稀释构建好的质粒, 90 μL 稀释液 + 10 μL 质粒。实时荧光定量 PCR 扩增体系为 20 μL: 10 μL 2 × SybrGreen qPCR Master Mix, 0.4 μL 10 μmol/L 引物 F, 0.4 μL 10 μmol/L 引物 R, 7.2 μL ddH₂O, 2 μL DNA 模板。实时荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 57 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 45 个循环。

1.10 实时荧光定量 PCR 法的应用可行性

向 2 种土壤样品中分别投加活化后的 PPZ - 1 菌液并混合均匀, 使其投加量分别为 2.0×10^9 、 2.0×10^7 、 2.0×10^5 、 2.0×10^3 CFU/g, 分别标为 1、2、3、4, 同时设不加菌液的土壤样品作为对照, 记作 CK。提取土壤样品的 DNA, 将其稀释适当倍数上机进行实时荧光定量 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 菌株特异性基因序列与引物

根据菌株 PPZ - 1 的基因组测序结果, 所筛选的未注释到的基因序列如下, 这些序列即为该菌株可能的特异性基因序列: (1) ATGAGCCACCTCTCCGCCGCCAGATAAATTCATGGTGATATAGAATCGGCCGGACTGATCAAATGCGCACCGACGGGTATGCTGTCTGCGGACCTCTCGATATCGACCAGCTTC - AACGGGACATCCACCATGCGCCCAGGCAGATTGCTGCCGTAACGGGCTGCGGAACACAGATGACGTTCCGGCAGCGGCACACTCAAGCGGTAGAAAACGCTCGTCTGTTAA; (2) ATGTTCTCCC - ATGAGTCTCGCAGGCCCGCTGCCGGGTGGGTAGTGACGGTTCACCTCTGGTGGCAGATGCGTGGAATGTTGGACCAAGTGGCGCACTTCCACTTGGAAAAATTCATCAGCGCAGGTTTGGCGGGGTTTTTCTCGGGGGCGGGAGGTGTTGCTGTTCAGGCAGCGTGT - TTGTTCCGGCGGAACCTTGCAGTTCGGTAATTTTGAGGGGGTAATGCTTCCTGCTAATCAGTTCGTTGTACCTGCATCGTTGCCTTGATAGAGTTCAGTGAACGCAAGGGCAATAGCCCCGCACATGAGTTGGCCACTTTCCCTACCCCGTCAGTGTCTAG; (3) ATGCTGCCCGGGCCCGTGCTGGGCGTAGACGCGGTGCGGGTGTTCGAGGTTTACGTGCAGCTTTGCGCTTTTTCGAGTAGGCCAGCCACTGCCGCAGATCTTGCAAACATGAGCTACAAGCTCTTCGGGCATGGTTGCCTCCAGGGTGGCGGGTTATGGGCAGCAGAATTGCGCCGCCAGTAAAAGCGGCCGTGCGCGTCATGGTTAGGGA - GGCCGTATTTATTTCCGCAACCGCAGCAAGCAACCTCGCGCA - GCCCTTCGATAAGCTCGGCTCCGCAAGCAGGACAGTTGCCTTCGTTCTCGGTGACTTCTGTTTGCCAAACAGCTCACC GCAGGATGA; (4) ATGCAGTTTGATTTTCTAAAGATGCTTTTCGCTATA - TACCCCTGAGCAGCGTGAAAGATGGCCAAATGATATGTCCG - AATGCTTCGGTACTTGTTCATCGTTATGTGGCTCATCAATGT -

TTTGATTAACATTTCAAACTGAGCCTGCGGCCCTATATGAAT-GGAGCTACTGAGGTTGGTATGGCGCTGGGCAATGAGAAGCGG-CGGAAGGAGAACCTGCCCCGCGATATAG。

针对以上基因序列分别设计引物,引物核苷酸序列见表 1。

表 1 引物核苷酸序列

序号	正向引物(F)(5'→3')	反向引物(R)(5'→3')
1	TCTCCGCCGCCAGATAA	TGGATGTCCCGTTGAAGC
2	GCGGGAGGTGTGCTGTT	CCTATGCGCTTGCCTTC
3	CGGGTTATGGGCAGCAGA	GGTTGGCAAACAGGAAGTCA
4	CCCTGAGCAGCGTGAAG	CATTGCCACCGCCATAC

分别利用上述引物对假单胞菌 PPZ-1、土 1-CK、土 2-CK 的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。由图 1 可知,4 对引物均能成功扩增菌株 DNA。第 1、第 3、第 4 对引物在土壤样品 DNA 相同位置均有模糊条带

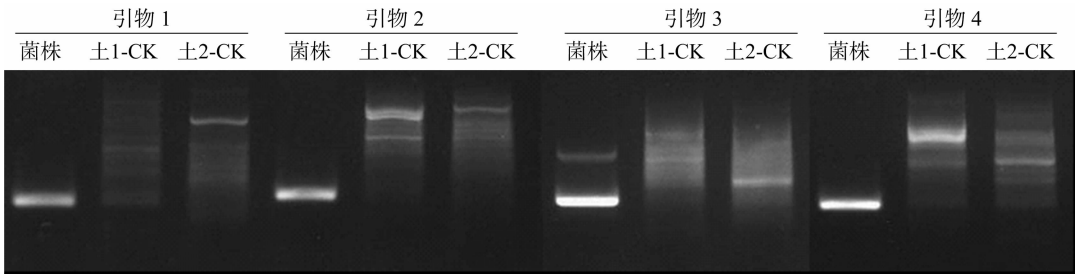


图1 菌株 PPZ-1 及 2 种土壤样品 DNA 的 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 实时荧光定量 PCR 检测体系

构建好的质粒浓度为 106.02 ng/μL,换算成拷贝数为 3.46 × 10¹⁰ copies/μL。标准曲线最高拷贝数为 1.73 × 10⁸ copies/μL。梯度稀释样品扩增曲线如图 2 所示,每个稀释度有 3 个平行,从左到右标准品浓度依次为 1.73 × 10⁸、1.73 × 10⁷、1.73 × 10⁶、1.73 × 10⁵、1.73 × 10⁴、1.73 × 10³ copies/μL。曲线较光滑,为典型的“S”形曲线,各循环阈值(cycle threshold,简称 C_T 值)间隔均匀。

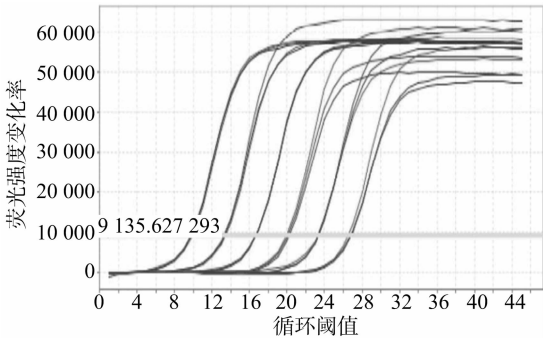


图2 梯度稀释样品扩增曲线

梯度稀释样品溶解曲线如图 3 所示,曲线峰值单一,峰值出现在 84.73 ℃,表明扩增反应产物特异性良好且无引物二聚体影响。

标准曲线结果如图 4 所示,纵坐标是 C_T 值,横坐标是 lg(拷贝数/μL),斜率为 -3.365,扩增效率 E = (10^{-1/斜率} - 1) × 100% = (10^{-1/-3.365} - 1) × 100% = 98.233%,相关系数 r = 0.999 9,截距为 37.624。

综合上述引物检测、扩增曲线、溶解曲线和标准曲线的结

存在,说明其对土壤样品 DNA 扩增出了相同大小的基因片断,其特异性不足以排除土壤背景 DNA 的干扰。第 2 对引物在土壤样品相同位置无明显条带,特异性较好。土壤性质在一定程度上决定了土著微生物的群落结构和多样性。土 1 与土 2 性质差异明显,它们质地不同,分属壤土和砂壤土;pH 值不同,分属碱性土和酸性土;有机质含量、营养元素等也有所不同,因此所孕育的微生物种群会存在差异。土 1-CK、土 2-CK 中有丰富的 DNA 片断,以其 DNA 扩增产物与菌株 PPZ-1 进行比对,可有效筛选出菌株 PPZ-1 的特异性引物。对第 2 对引物在 NCBI 上通过 Blast 特异性检验,无显著匹配结果,表明该组引物在 NCBI 数据库中也是特异的。因此,将第 2 对引物及其所对应的基因序列确定为菌株 PPZ-1 的特异性引物及特异性基因序列,据此构建实时荧光定量 PCR 检测体系。

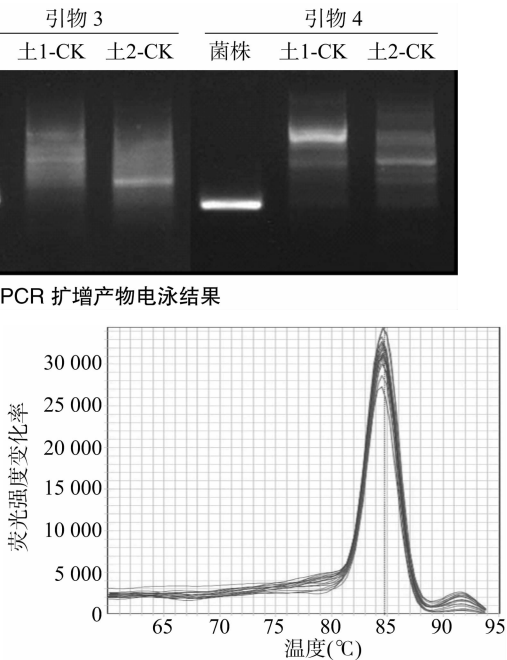


图3 梯度稀释样品溶解曲线

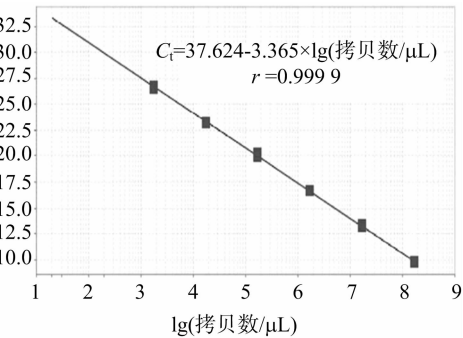


图4 菌株 PPZ-1 实时荧光定量 PCR 标准曲线

果,可以确定建立的菌株 PPZ-1 实时荧光定量 PCR 检测体系及反应条件合理可靠。

2.3 实时荧光定量 PCR 法的应用可行性

已有学者采用实时荧光定量 PCR 检测环境样品中的有

机污染物降解菌。Tay 等利用特异性 16S rDNA 引物扩增 2 种甲苯降解菌(自养黄色杆菌、分枝杆菌),构建实时荧光定量 PCR 方法检测污染水中的目标菌数量^[16]。王金玉等以功能酶基因邻苯二酚 1,2 双加氧酶的基因序列为目标序列,构建实时荧光定量 PCR 方法,定量检测苯胺降解菌在苯胺废水生物强化序批式活性污泥系统中的丰度变化^[17]。目前,尚未见严格区分土著降解菌和外源降解菌的研究。对土壤中的外源降解菌进行绝对定量的关键,在于找到该菌株与土著降解菌、土著同种属菌具有差异的特异性基因序列设计引物,排除土著菌的干扰,同时还要保证其扩增结果的准确性。

由表 2 可知,本试验的定量检测方法所检测出的 2 种土壤中多环芳烃降解菌 PPZ-1 的数量与理论投加量的数量级相同,且对照土壤中检测不到该菌存在,说明该检测方法能够有效排除土著菌的干扰,准确、特异地检测出土壤中菌株 PPZ-1 的数量,从而可以为改进修复时菌剂的投加量和投加方式提供理论指导。

表 2 土壤中 PPZ-1 菌株的数量

编号	检测值 (CFU/g)	理论值 (CFU/g)
土 1-CK	ND	0
土 1-1	$4.2 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^8$	2.0×10^9
土 1-2	$3.8 \times 10^7 \pm 3.1 \times 10^6$	2.0×10^7
土 1-3	$4.1 \times 10^5 \pm 9.9 \times 10^4$	2.0×10^5
土 1-4	$4.1 \times 10^3 \pm 2.5 \times 10^2$	2.0×10^3
土 2-CK	ND	0
土 2-1	$2.7 \times 10^9 \pm 1.9 \times 10^8$	2.0×10^9
土 2-2	$2.3 \times 10^7 \pm 3.6 \times 10^6$	2.0×10^7
土 2-3	$7.2 \times 10^5 \pm 7.2 \times 10^4$	2.0×10^5
土 2-4	$3.3 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^3$	2.0×10^3

注:ND 表示未检测到。

3 结论

本研究针对外源多环芳烃降解菌 PPZ-1,基于基因组测序结果,筛选出了适于实时荧光定量 PCR 检测的特异性基因序列和引物。所筛选的特异性引物在菌株中可以扩增出条带,在土壤样品相同位置无明显条带,具有较好的特异性。

以含有特异性基因序列的重组质粒为标准品,确定实时荧光定量 PCR 反应试验条件,建立标准曲线。标准曲线相关系数为 0.999 9,斜率为-3.365,扩增效率为 98.233%,熔点曲线无杂峰。实时荧光定量 PCR 检测体系及反应条件合理可靠。

将该检测方法应用于投加了 PPZ-1 菌株的多环芳烃污染土壤,验证其可行性。对污染土壤中的菌株 PPZ-1 进行绝对定量检测,检测值与理论值数量级相同,说明该检测方法能够有效排除土著降解菌、土著同种属菌以及其他土著菌的干扰,准确、特异地检测出土壤中菌株 PPZ-1 的数量,从而可以为改进修复时菌剂的投加量和投加方式提供理论指导。

参考文献:

[1]Zhang P,Chen Y. Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in

surface soil of China;a review[J]. Science of the Total Environment, 2017,605/606:1011-1020.

[2]Xu S,Liu W,Tao S. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons in China[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40 (3): 702-708.

[3]Sun G D,Xu Y,Jin J H,et al. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012,233/234(3):72-78.

[4]Peng S,Wu W,Chen J. Removal of PAHs with surfactant-enhanced soil washing: influencing factors and removal effectiveness [J]. Chemosphere, 2011,82(8):1173-1177.

[5]Pazos M, Rosales E, Alcántara T, et al. Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: a review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010,177(1/2/3):1-11.

[6]Gan S,Lau E V,Ng H K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009,172(2/3):532-549.

[7]魏春花,曾文炉,周启星,等. 荧光定量 PCR 技术在环境领域的应用[J]. 中国环境监测, 2012,28(4):48-53.

[8]刘雅慈,何泽,张胜,等. 油气田土壤甲烷氧化菌实时荧光定量 PCR 检测技术的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2014,41(6):1071-1081.

[9]张海燕,张小芳,魏兰芳,等. 土壤中茄科雷尔氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测体系的建立与应用[J]. 江苏农业科学, 2017,45(14):17-20.

[10]Göhler A, Trung T T, Hopf V, et al. Quantitative detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil samples using multiple gene targets in real time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017,83(8):3212-3216.

[11]张海燕,张小芳,魏兰芳,等. 土壤中茄科雷尔氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测体系的建立与应用[J]. 江苏农业科学, 2017,45(14):17-20.

[12]张永英,马腾壑,刘彦威,等. 猪瘟病毒强毒株 SYBRGreen I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2017,45(13):142-143.

[13]张文志,鲁 绯,闫 红. 酱油中抗草甘膦大豆转基因多种成分的检测:实时荧光定量 PCR 和传统 PCR 的比较[J]. 江苏农业科学, 2016,44(6):372-376.

[14]Yu C P, Farrell S K, Robinson B, et al. Development and application of real-time PCR assays for quantifying total and aerolysin gene-containing *Aeromonas* in source, intermediate, and finished drinking water[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(4): 1191-1200.

[15]魏 巍,许艳丽,朱 琳,等. 土壤木霉菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及应用[J]. 土壤与作物, 2013,2(1):53-58.

[16]Tay S L, Hemond F, Krumholz L, et al. Population dynamics of two toluene degrading bacterial species in a contaminated stream[J]. Microbial Ecology, 2001,41(2):124-131.

[17]王金玉,李旭东,刘庆华. 荧光定量 PCR 检测生物强化 SBR 系统中苯胺降解菌的数量变化[J]. 环境科学学报, 2014,34(7): 1674-1679.