

81 株铜绿假单胞菌 16S rRNA 基因序列 测定及系统发育学分析

Identification of 81 *Pseudomonas aeruginosa* by phylogenetic
analysis of 16S rRNA gene sequence

曾晓琮^{1,2} 周露^{1,2} 苏妙贞^{1,2} 韩志杰^{1,2} 陈丹霞^{1,2}

ZENG Xiao-cong^{1,2} ZHOU Lu^{1,2} SU Miao-zhen^{1,2} HAN Zhi-jie^{1,2} CHEN Dan-xia^{1,2}

(1. 广东省食品检验所, 广东 广州 510435; 2. 广东省酒类检测中心, 广东 广州 510435)

(1. Guangdong Provincial Institute of Food Inspection, Guangzhou, Guangdong 510435, China;

2. Guangdong Provincial Liquor Testing Center, Guangzhou, Guangdong 510435, China)

摘要:采用 16S rRNA 基因序列分析法对 2015 年 7~9 月广东省食品检验所桶装水专项抽检中筛查所得的 81 株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)进行复核鉴定。菌株经纯化培养后提取总 DNA,采用细菌 16S rRNA 通用引物进行 16S rRNA 基因序列扩增,PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,进行序列测定,序列经人工校对后用 Clustal X 进行比对分析,最后用 MEGA5.1 软件构建系统发育树。系统发育分析结果表明:81 株铜绿假单胞菌与原鉴定结果一致。其中,编号 24-3-QY、100-5-JM、106-3-JM 菌株形成一个分支,28-1-WD 单独为一支,其余 77 株野生菌和铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC27853 聚为一群。该研究是 2015 年 5 月 24 日中国开始实施 GB 19298—2014《食品安全国家标准 包装饮用水》以来,广东省首次对水源性铜绿假单胞菌进行的研究,为下一步菌种污染溯源等研究提供依据。

关键词:铜绿假单胞菌;16S rRNA 基因;序列分析;系统发育树

Abstract: 81 *Pseudomonas aeruginosa* from Guangdong Provincial Institute of Food Inspection were identified by 16S rRNA sequence analysis. The DNA was isolated and the sequences of 16S rRNA gene were amplified by PCR with the bacterium universal primers, and then the PCR products were sequenced after 2% agarose gel electrophoresis. Moreover, the corrected sequences were aligned with Clustal X and the phylogenetic tree was constructed by MEGA5.1. Consequently, the identified results of the 81 strains confirmed their original identification before. On the phylogenetic tree, No. 24-3-QY strain formed a separate branch with No. 100-5-JM strain and No.

106-3-JM strain. No.2 8-1-DW formed one branch and the other 77 strains formed a separate branch with *P. aeruginosa* ATCC 27853. This was the first research about waterborne *P. aeruginosa* in Guangdong Province when China began to implement GB 19298—2014 “National food safety standards of packaged drinking water” since May 24, 2015. The waterborne *P. aeruginosa* culture collection in Guangdong was preliminarily established basing on these strains. These data will provide a powerful tool for effectively tracing source of *P. aeruginosa* and controlling the water contamination in future.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; 16S rRNA gene; gene sequence analysis; phylogenetic tree

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)又称为绿脓杆菌,1872 年由 Schroeter 命名,在分类学上属于细菌界变形菌门 γ -变形菌纲假单胞菌目假单胞菌科假单胞菌属,为无芽孢端生单鞭毛革兰氏阴性小杆菌,典型嗜氧化能异养代谢。该菌在自然界分布广泛,存在于水、土壤、空气以及人和动物皮肤及肠道中^[1]。该菌具有强大的环境适应性和生存能力,尤其适应潮湿的环境,甚至能适应太空微重力环境,形成生物被膜而呈现出地球上未曾见过的独特柱状冠层结构^[2]。该菌是重要的食源性致病菌之一,能感染拟南芥^[3]和窝苣^[4-5]等较高等植物,能感染新杆状线虫^[6-7]、果蝇^[8]和大蜡螟^[9]等无脊椎动物。更严重的是,铜绿假单胞菌也能感染免疫力下降或缺失的病人、囊性纤维化病人、烧伤和手术患者,会引发炎症和败血症,假如该菌在人体重要器官如肺部、尿道和肾脏定植,则可能会危及生命^[10]。但对于健康者来说,铜绿假单胞菌是机会性致病菌。

近年来,饮水安全越来越受到人们的重视,饮用水中铜绿假单胞菌的污染情况也日渐受到关注。2012 年李飞^[11]在广东省矿泉水厂和山泉水厂采集了 206 份水样,其中 43 份

作者简介:曾晓琮,男,硕士。

通信作者:周露(1982—),女,广东省食品检验所高级工程师,博士。

E-mail: zhoulu1982@sohu.com

收稿日期:2016-05-12

水样检测出有铜绿假单胞菌,污染率为20.9%。徐励琴等^[12]在2012~2013年间对惠州市80批次的桶装水检测中共检出8份水样含有铜绿假单胞菌,污染率为10.0%。2013年魏磊^[13]对全国9个省36家厂家108份水样中筛查出36株铜绿假单胞菌。2015年,蔡双福^[14]在广东市场上168份水样检测中检出2份水样含有铜绿假单胞菌,不合格率为1.2%。Silva M.E.Z等^[15]从自来水、瓶装矿泉水和井水中分离得到的30株铜绿假单胞菌,并进行了药敏毒力因子等相关研究。Venier D.等^[16]调查了希腊国内的瓶装矿泉水中微生物情况,从1995~2003年间共采集1527份样品,检出90份铜绿假单胞菌,污染率为5.9%。

中国关于饮用水的标准有GB 5749—2006《生活饮用水卫生标准》、GB 8537—2008《饮用天然矿泉水》及2015年5月24日开始实施的GB 19298—2014《食品安全国家标准包装饮用水》。GB 19298—2014代替了GB 19298—2003《瓶(桶)装饮用水卫生标准》、GB 17324—2003《瓶(桶)装饮用纯净水卫生标准》、GB 17323—1998《瓶装饮用纯净水》,对包装饮用水中致病菌的检测设定了更严格的要求,即同一批次5

份样品中不得检出铜绿假单胞菌。为保障广大人民群众饮水安全,针对GB 19298—2014《食品安全国家标准 包装饮用水》新标准的实施,广东省食品检验所在2015年7~9月开展了广东省桶装饮用水专项抽检。从中筛查出81株野生型铜绿假单胞菌,在此基础上,本研究期望通过16S rRNA基因序列分析法,在分子生物学水平上对81株野生型铜绿假单胞菌进行复核鉴定,旨在为建立具有广东特色的水源性铜绿假单胞菌菌株资源库和溯源数据库奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

1.1.1 样品来源

1株铜绿假单胞标准菌株 ATCC 27853:广东环凯生物技术有限公司;

81株野生型菌株(见表1):均是2015年7~9月广东省食品检验所桶装水专项抽检中依据GB/T 8538—2008《饮用天然矿泉水检验方法》、GB 19298—2014《食品安全国家标准包装饮用水》筛查所得。

表1 试验所用野生型菌株
Table 1 Wild type strains used in our research

序号	编号	菌株来源	序号	编号	菌株来源	序号	编号	菌株来源
1	8-ZHQ	肇庆	28	98-JM	江门	55	131-HZH	惠州
2	8-1-ZHQ	肇庆	29	100-1-JM	江门	56	133-1-JM	江门
3	9-1-MM	茂名	30	100-3-JM	江门	57	133-2-JM	江门
4	19-MM	茂名	31	100-2-JM	江门	58	133-5-JM	江门
5	24-1-QY	清远	32	100-4-JM	江门	59	136-1-QY	清远
6	24-2-QY	清远	33	100-5-JM	江门	60	136-2-QY	清远
7	24-3-QY	清远	34	102-2-JM	江门	61	137-1-JY	揭阳
8	24-4-QY	清远	35	102-5-JM	江门	62	137-2-JY	揭阳
9	26-1-ZHJ	湛江	36	103-3-FSH	佛山	63	137-3-JY	揭阳
10	26-2-ZHJ	湛江	37	104-1-JM	江门	64	137-4-JY	揭阳
11	27-2-MM	茂名	38	104-4-JM	江门	65	137-5-JY	揭阳
12	27-4-MM	茂名	39	105-1-JM	江门	66	146-1-JY	揭阳
13	28-1-DG	东莞	40	105-2-JM	江门	67	146-2-JY	揭阳
14	28-2-DG	茂名	41	105-3-JM	江门	68	146-3-JY	揭阳
15	47-2-FSH	佛山	42	106-3-JM	江门	69	146-4-JY	揭阳
16	47-5-FSH	佛山	43	106-4-JM	江门	70	146-5-JY	揭阳
17	48-1-FSH	佛山	44	107-1-JM	江门	71	149-2-HZH	惠州
18	48-2-FSH	佛山	45	107-2-JM	江门	72	154-1-HY	河源
19	48-3-FSH	佛山	46	107-4-JM	江门	73	156-1-HZH	惠州
20	50-SHG	韶关	47	108-1-JM	江门	74	156-2-HZH	惠州
21	55-1-SHG	韶关	48	108-4-JM	江门	75	156-3-HZH	惠州
22	55-2-SHG	韶关	49	108-5-JM	江门	76	156-4-HZH	惠州
23	55-3-SHG	韶关	50	109-2-JM	江门	77	156-5-HZH	惠州
24	55-4-SHG	韶关	51	109-3-JM	江门	78	161-2-HZH	惠州
25	55-5-SHG	韶关	52	109-4-JM	江门	79	161-5-HZH	惠州
26	56-4-HY	河源	53	123-HZ	惠州	80	162-1-ZHSH	中山
27	56-5-HY	河源	54	123-1-HZ	惠州	81	162-1-ZHSH	中山

1.1.2 培养基及主要试剂

营养肉汤:广东环凯生物技术有限公司;

DNA 提取试剂盒和 DNA marker 2000:日本 Takara 公司;

电泳级琼脂糖:西班牙 Biowest 公司;

超纯水、 $2 \times \text{Hs}^{\text{TM}}$ Mix、 $50 \times \text{TAE}$ 、Gold View:广州民塞生物科技有限公司;

PCR 引物由北京华大基因研究中心合成。

1.1.3 主要仪器设备

Biometra DNA 扩增循环仪:T-professional thermocycler 型,德国 Biometra 公司;

UVP 凝胶成像仪:ImageQuant 350 system 型,美国 GE Healthcare 公司;

微量核酸测定仪:NANO 型,日本岛津公司;

全自动灭菌锅: SX-700 型,日本 Tomy 公司;

超净工作台: SW-CJ-2FD 型,中国苏净安泰公司;

电热恒温培养箱: DHP-9052 型,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌体培养 将保存于 30% 甘油、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的铜绿假单胞菌复壮培养后,在平板上划线分离,培养 18 h 后挑取单菌落接种到 15 mL 液体培养基中, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。

1.2.2 DNA 提取 按照 Takara DNA Extraction Kit Ver.3.0 提取 81 株野生型铜绿假单胞菌和 1 株铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC 27853 总 DNA,用微量核酸测定仪检测 DNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值。提取的 DNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2.3 PCR 扩增及电泳检测 根据文献[17]的方法,选用 27F/1492R 扩增 16S rRNA 基因片段,正向引物序列 27F: $5'-\text{AGAGTTTGATCTGGCTCAG}-3'$,反向引物序列 1492R: $5'-\text{GGTTACCTTGTTACGACTT}-3'$ 。扩增反应在 Biometra TProfessional PCR 仪上进行。反应体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$,其成分为: $2\text{ }\mu\text{L}$ DNA 模板(浓度 $25\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$), $2\text{ }\mu\text{L}$ 引物(浓度 $10\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$), $12.5\text{ }\mu\text{L}$ $2 \times \text{Hs}^{\text{TM}}$ Mix,超纯水补足 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增程序为:首先 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s,共进行 35 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增结束后用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物(含 0.005% Goldview staining)。

1.2.4 序列测定 16S rRNA 基因序列测定由北京华大基因研究中心完成。

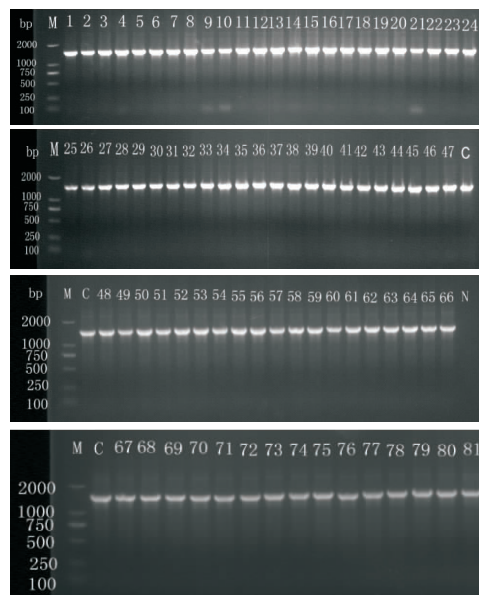
1.2.5 16S rRNA 基因序列分析与构建 参考程池等[18]的方法,采用序列图谱软件 Chromas,参照正、反向序列图谱,对序列人工校对。将 81 株野生型菌株的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性比较。从 GenBank 核酸序列数据库中下载假单胞属恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*, NC 002947.3)的 16S rRNA 基因序列,与铜绿假单胞标准菌株 ATCC 27853 及 81 株野生型菌株序列一起,用 Clustal X 软件进行序列比对(alignment),然后利用 MEGA 5.1 生物学软件构建系统发育树,采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析,并进行 1 025 次重复的 Bootstraps 统计学

检验。

2 结果与讨论

2.1 菌种 DNA PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳检测与分析

铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC 27853 和 81 株野生型菌株 DNA 提取后经琼脂糖凝胶电泳分析结果见图 1,所提取片段均约为 1 425 bp 的特异条带,与预期大小相符。



M, Marker C, 阳性对照 N, 阴性对照

图 1 81 株铜绿假单胞菌 16S rRNA 的 PCR 扩增产物

Figure 1 16S rRNA PCR amplification products of 81

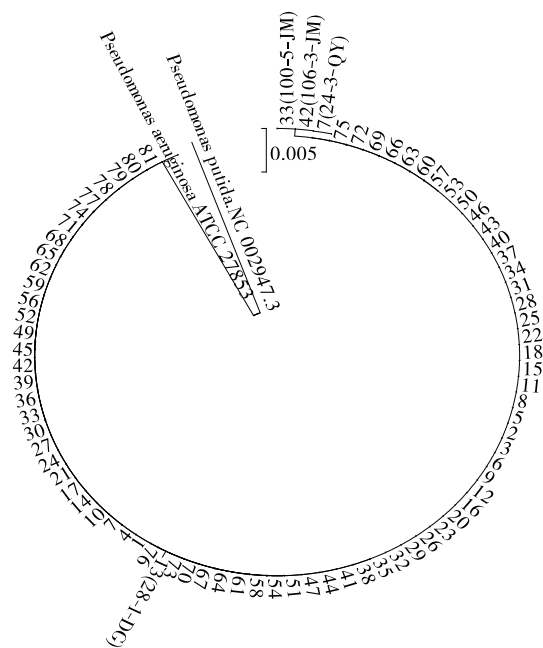
Pseudomonas aeruginosa

2.2 16S rRNA 基因序列分析及系统树构建

随着核酸测序技术的发展,通过 16S rRNA 基因的序列测定,从分子遗传进化和分子水平上对细菌进行鉴定,已得到越来越广泛的应用,也越来越科学[19]。16S rRNA 基因序列被称为“细菌化石”,因为在漫长的生物进化过程中,16S rRNA 基因序列的变化非常缓慢,具有高度的保守性,可以用来标记生物的进化距离和亲缘关系,而利用 16S rRNA 序列中可变区序列的差异,则可以鉴定不同菌属、菌种的细菌。16S rRNA 基因序列是细菌分类鉴定的主要依据之一,研究[20]表明,16S rRNA 序列同源性小于 97%,属于不同的种,同源性小于 93%~95%,则属于不同的属。程池等[18]采用 16S rRNA 基因序列分析法对中国工业微生物菌种保藏管理中心保藏的 55 株枯草芽孢杆菌进行复核鉴定,发现有 3 株菌种与原鉴定结果存在差异。张晓娟等[21]采用 16S rRNA 基因序列分析对西南菌种站收集保藏的 23 株芽孢杆菌进行了复核鉴定,发现有 13 株与原学名一致,有 9 株需要进一步核实。朱飞舟等[22]通过 16S rRNA 基因序列分析鉴定 14 种病原细菌,发现其中 12 种细菌可以鉴定到“种”,2 种细菌可以鉴定到“属”。刘大佳等[23]采用 16S rRNA 基因分析技术鉴定正畸患者矫治前龈沟液的细菌种类,共鉴定出 43 株菌。吴至成等[24]对不同地理种群栖稻假单胞菌株进行了 16S rRNA 基因序列分析,发现大部分栖稻假单胞菌可根

据 16S rRNA 基因序列鉴别不同地理种群株。

本研究将 81 株野生型菌株的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性比较,结果发现 81 株菌与铜绿假单胞杆菌模式菌(NC 002516.2)的同源性均在 99%~100%,由此可以判定 81 株野生菌均为铜绿假单胞菌。图 2 是以假单胞菌属中恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*, NC 002947.3)为外群的 16S rRNA 基因序列系统发育树,从系统发育树上看,81 株分离株和 1 株标准菌株分成了 3 个大的分支,编号 7(24-3-QY),33(100-5-JM),42(106-3-JM)形成一个分支,编号 13(28-1-DG)单独为一支,其余 77 株野生菌和标准菌株 ATCC 27853 聚为一群。图 2 所示铜绿假单胞菌群内 16S rRNA 差异非常小,当这些序列在 Cluster X 构建系统发生树时,由于序列差异太小,系统发生树不会显示其清晰的分析结构。这也从反面说明了它们的高度相似性和一致性^[25]。



标尺表示 0.5% 的序列差异;分支上的数据表示 Bootstrap 值

图 2 基于 16S rRNA 基因序列的 81 株铜绿假单胞菌系统发育树

Figure 2 The phylogenetic tree of 81 *Pseudomonas aeruginosa* based on 16S rRNA sequence

3 结论

本研究采用 16S rRNA 基因序列分析法对广东省食品检验所 2015 年 7~9 月桶装水专项抽检中筛查所得的 81 株铜绿假单胞菌进行复核鉴定。经序列比对发现,81 株野生菌与 GenBank 中铜绿假单胞杆菌模式菌的同源性均在 99%~100%,81 株野生菌均为铜绿假单胞菌。从系统发育树发现,81 株分离株和 1 株标准菌株分成了 3 个分支,清远 24-3-QY,江门 100-5-JM,江门 106-3-JM 形成一个分支,东莞 28-1-DG 菌株单独为一支,其余 77 株野生菌和标准菌株 ATCC 27853 聚为一群。本研究推测地域可能是造成菌株 16S rRNA 变异的主要原因^[26]。而同属于一支的江门分离株 100-5-JM、106-3-JM 来自同一地区的不同厂家,两者是否

存在联系,是否存在交叉污染,则有待进一步调查研究。

本研究是 2015 年 5 月 24 日中国开始实施 GB 19298—2014《食品安全国家标准 包装饮用水》以来,广东对全省重要城市的水源性铜绿假单胞菌进行的研究,初步建立了具有广东特色的水源性铜绿假单胞菌菌种资源库,为饮用水中铜绿假单胞菌的风险识别及污染溯源提供了数据基础,对保障该省居民饮水安全具有重要意义。对本研究中所复核鉴定的铜绿假单胞菌进行药敏分析、毒力因子分析以及分子分型研究将会是下一步研究的重点。

参考文献

- [1] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1999: 383-389.
- [2] KIM W, TENGRA FARAH K, YOUNG Z, et al. Spaceflight promotes Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. PLOS One, 2013, 8(4): 624-627.
- [3] WALKER T S, BAIS H P, DEZIEL E, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation [J]. Plant Physiol, 2004, 134(1): 320-331.
- [4] RAHME L G, STEVENS E J, WOLFORT S F, et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals [J]. Science, 1995, 268(5 219): 1 899-1 902.
- [5] RAHME L G, TAN M W, LE L, et al. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(24): 13 245-13 250.
- [6] MAHAJAN-MIKLOS S, TAN M W, RAHME L G, et al. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model [J]. Cell, 1999, 96(1): 47-56.
- [7] MARTINEZ C, PONS E, PRATS G, et al. Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development[J]. Plant J, 2004, 37(2): 209-217.
- [8] DARGENIO D A, GALLAGHER L A, BERG C A, et al. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. J Bacteriol, 2001, 183(4): 1 466-1 471.
- [9] MIYATA S, CASEY M, FRANK D W, et al. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis[J]. Infect Immune, 2003, 71(5): 2 404-2 413.
- [10] BALTCH A L, SMITH R P. *Pseudomonas aeruginosa*: infections and treatment[J]. New York: M.Dekler,1994: 83-84.
- [11] 李飞. 包装饮用水食源性致病菌分布规律和遗传多样性研究[D]. 广州:华南理工大学, 2013: 35-36.
- [12] 徐励琴, 薛计泉, 罗泽燕, 等. 桶装饮用水铜绿假单胞菌检测及耐药性分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2015, 21(3): 56-57.
- [13] 魏磊, 吴清平, 张菊梅, 等. 矿泉水和山泉水中铜绿假单胞菌污染调查及分离菌株毒力基因与耐药性分析[J]. 微生物通报, 2015, 42(1): 125-132.
- [14] 蔡双福, 张琴, 黄耀雄. 食品中铜绿假单胞菌的监测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 26(3): 875-905.

程序,可以看出刀路优化后的 NC 程序变得更加复杂多变,但是刀具路径基本一致。从优化的结果来看,优化后的刀具路径大大节省了加工时间,提高了工作效率。

优化节省计算器	
零件节省	
原始时间 (hh:mm:ss)	0:22
优化时间 (hh:mm:ss)	0:18
节省时间百分比 (%)	17.01
零件数	100
机器每小时估价 (\$/hour)	100
零件节省的时间 (hh:mm:ss)	6:19
零件节省的全钱 (\$)	632
计算零件的节省	
车间节省	
车间每小时估价 (\$/hour)	100
机器数	5
每班加工时间 (hours)	8
轮班数	2
每年的工作天数	220
年节省总数 (\$)	299,376
计算车间年节省	
<input checked="" type="checkbox"/> 在优化结束时显示对话框	
关闭	

图 11 优化时间计算

Figure 11 Optimization time calculation

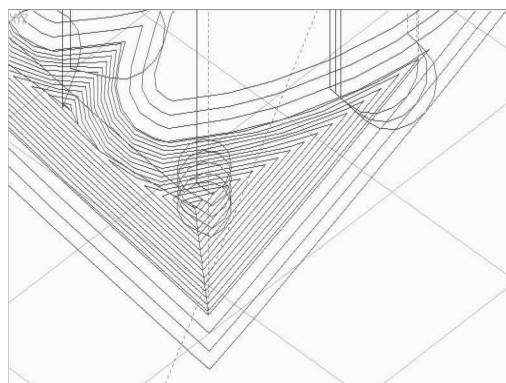


图 12 优化前刀具路径

Figure 12 Tool path before optimization

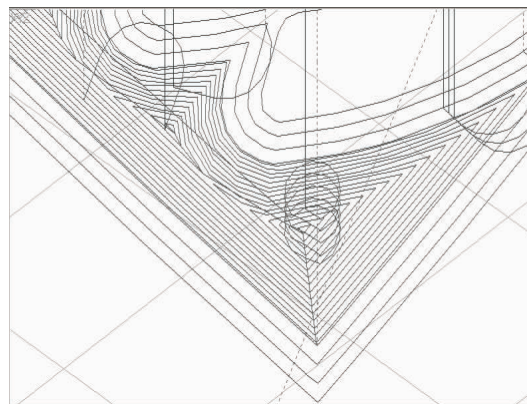


图 13 优化后刀具路径

Figure 13 Tool path after optimization

参考文献

- [1] 郑峰, 葛春荣, 周德钊, 等. 汽轮机叶片数控编程及加工过程全景仿真与优化[J]. 组合机床与自动化加工技术, 2013(6): 122-123.
- [2] 陈常标, 王保民, 孙柯, 等. 基于 UG 和 VERICUT 数控加工与仿真研究[J]. 机械工程师, 2014(11): 174-176.
- [3] RUAN Xiao-guang, ZHAO Rong-rong, CAI An-jiang, et al. Research and application of cutting efficiency optimization based on VERICUT and UG[J]. Applied Mechanics and Materials, 2014, 635-637: 612-615.
- [4] 周矿兵. 浅析数控加工中切削用量的合理选择[J]. 甘肃冶金, 2011, 33(1): 113-114.
- [5] 郑贞平, 黄云林, 陈思涛. VERICUT7.3 数控仿真技术与实例详解[M]. 北京: 机械工业出版社, 2015.
- [6] 邓集松. 基于 VERICUT 数控加工仿真与优化的研究与应用[J]. 机械工程师, 2009(2): 125-126.
- [7] 丁科, 邓奕. 基于 VERICUT 的虚拟机床建模及应用[J]. 湖南工程学院学报, 2016(2): 36-39.

(上接第 24 页)

- [15] SILVA M E, FILHO I C, ENDO E H, et al. Characterisation of potential virulence markers in *pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008, 93(4): 323-334.
- [16] VENIERI D, VANTARAKIS A, KOMNINO G, et al. Microbiological evaluation of bottled non-carbonated("still") water from domestic brands in Greece [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 107(1): 68-72.
- [17] LAVENIR R, JOCKTANE D, LAURENT F, et al. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70: 20-29.
- [18] 程池, 刘光全, 李金霞, 等. 55 株芽孢杆菌 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 20-24.
- [19] TENG L J, HSUEH P R, HUANG Y H, et al. Identification of *Bactericidetes thetaiotaomicron* on the basis of an unexpected specific applicant of Universal 16S Ribosomal DNA PCR[J].

Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(4): 1 727-1 730.

- [20] STACKEBRANDT E B, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-RNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 842-849.
- [21] 张晓娟, 宋萍, 王柱, 等. 23 株芽孢杆菌 16S rRNA 基因序列扩增与系统发育分析[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(2): 9-12.
- [22] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(10): 1 035-1 041.
- [23] 刘大佳, 杨明, 陈利玉, 等. 采用 16S rRNA 基因分析技术鉴定正畸患者矫治前龈沟液的细菌种类[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(2): 43-46.
- [24] 吴至成, 伍丽娟, 李丽花, 等. 不同地理种群栖假单胞菌株的 16S rRNA 基因序列分析[J]. 中国热带医学, 2012, 12(12): 1 453-1 456.
- [25] 邹寰, 喻子牛, 孙明. 蜡状芽孢杆菌群 16S rDNA 分析[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(4): 478-482.
- [26] 赵耘, 杜昕波, 李伟杰, 等. 袋鼠源铜绿假单胞菌分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(2): 139-141.