GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 20/39

生物产品中光合细菌测定

**Determination of photosynthetic bacteria in biologic products**

（征求意见稿）



**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

1. 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

生物产品中光合细菌测定

**1 范围**

本标准规定了生物产品中光合细菌生化测定和MNP标记测定原理、试剂与材料、仪器与设备、操作步骤及结果分析。

本标准适用于生物产品中一种或多种红螺菌科光合细菌的测定。

**2 规范性引用文件**

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适应于本标准。

GB 4789.1 食品安全国际标准 食品微生物学检验 总则

GB 4789.28 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB 19489 实验室生物安全通用安全

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27405 实验室质量控制规范 食品微生物检测

**3 术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**3.1**

**生物产品 biologic products**

利用生物技术获得的产品。

**3.2**

**光合细菌 photosynthetic bacteria**

一类能利用多种基质，可营异养、自养或兼性营养的原核生物。

注：属于细菌门真细菌纲红螺菌目，包括红螺菌科（*Rhodospirillaceae*）、着色菌科（*Chromatiaceae*）、绿硫菌科（*Chlorobiaceae*）、绿色丝状菌科（Chloroflexaceae）等4科。

**3.3**

单核苷酸多态性 single nucleotide polymorphism，SNP

在基因组水平上由单个核苷酸引起的序列多态性。

3.4

多核苷酸多态性 multiple nucleotide polymorphism，MNP

一段核苷酸区域内多个核苷酸引起的序列多态性。

3.5

覆盖倍数 average coverage of markers

检测到的标记的测序片段的数目。

3.6

检出标记 detected markers

覆盖倍数大于50的标记。

第一法 培养法

**4 原理**

将待分离的样品进行稀释后，接种于选择性培养基中，由单个细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落。随机挑取平板中的5个菌落进行生理生化鉴定，根据平板的菌落数及挑取菌落的生理生化鉴定结果，对生物产品中的光合细菌进行计数。

**5 试剂和材料**

本方法所用试剂均为分析纯，除特殊说明外，实验用水均为GB/T 6882规定的二级水。

5.1 AT培养基：参见附录A。

5.2 光合细菌分离琼脂：参见附录A。

5.3 磷酸盐缓冲稀释液：参见附录A。

5.4 革兰氏染色液：参见附录A。

**6 设备和器具**

6.1 光照恒温培养箱：照度不小于2000 lx。

6.2 天平：精度为0.001g。

6.3 真空过滤装置。

6.4 水相滤膜：微孔径0.45 μm。

6.5 微需氧培养罐：能维持1%氧浓度的透明培养容器装置。

6.6 微量移液器。

6.7 显微镜：最低100×。

**7 操作步骤**

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体样品：称取25 g样品置盛有225 mL磷酸盐缓冲液的无菌均质杯内，8000 r/min～10000 r/min均质1 min～2 min，或放入盛有225 mL稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1 min～2 min，制成1:10的样品匀液。

7.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取25 mL样品置盛有225 mL磷酸盐缓冲液的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成1:10的样品匀液。

7.1.3 用1 mL无菌吸管或微量移液器吸取1:10样品匀液1 mL，沿管壁缓冲注入盛有9 mL稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用1支无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成1:100样品匀液。

7.1.4 按6.1.3操作，制备10倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用1次1 mL无菌吸管或吸头。

7.1.5 根据对样品中光合细菌数量的估计，选择2个～3个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行10倍递增稀释时，吸取1 mL样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个平皿。同时，分别吸取1 mL空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。

7.1.6 及时将15 mL～20 mL冷却至46℃的光合细菌分离琼脂培养基倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。

7.2 培养

待琼脂凝固后，将平皿翻转，将其置于微需氧培养罐中30℃±1℃光照培养5 d。

7.3 菌落计数

7.3.1 可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

7.3.2 选取菌落数在30～300 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30 CFU的平板记录具体菌落数，大于300 CFU的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

7.3.3 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以2，代表一个平板菌落数。

7.3.4 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

7.4 光合细菌的鉴定

7.4.1 菌落挑选和纯培养

挑取计数平板上5个菌落大、红色、表面光滑、质地柔软、边缘整齐的菌落分别接种于光合细菌分离琼脂平板，置微需氧培养罐中，30℃±1℃光照培养2～3 d。

7.4.2 形态学鉴定

挑取斜面上的纯培养物，进行染色镜检，光合细菌红螺菌科中各属的形态特征见附录B.1。

7.4.3 生化鉴定

使用细菌生化鉴定试剂盒进行生化鉴定。红螺菌科中代表属种的生理生化鉴定特征见附录B.2-B.6。

7.5 结果计算

7.5.1 光合细菌菌落的计算见公式（1）：

 ••••••••••••••••••••••••••••••••••••••公式 （1）

式中：

*a*——每块平板上的某种特定光合细菌菌落数；

*b*——挑取后经证实为某种特定光合细菌的菌落数；

*A*——挑取平板上用于验证的菌落数；

*C*——平板上的所有特征菌落数。

7.5.2 菌落总数的计算方法

7.5.2.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每g（mL）样品中菌落总数结果。

7.5.2.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按式（2）计算：

** ·**···························（2）

式中：

*N*——样品中某一种光合细菌的活菌数

****——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

*n*1——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

*n*2——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

*d*——稀释因子（第一稀释度）；

*a*——7.4鉴定结果中某一种光合细菌的阳性数；

5——每个计数平板中挑出的5个菌落数；

7.5.2.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可

记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

7.5.2.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数

计算。

7.5.2.4 若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无菌落生长，则以小于1乘以最低稀释倍数计算。

7.5.2.5 若所有稀释度的平板菌落数均不在30 ~300 CFU 之间，其中一部分小于30 CFU 或大于

300 CFU 时，则以最接近30 CFU 或300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.6 菌落总数报告

7.6.1 菌落数小于100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

7.6.2 菌落数大于或等于100 CFU 时，第3位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前2位数字，后面用

0代替位数；也可用10的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

7.6.3 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

7.6.4 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

7.6.5 称重取样以CFU/g为单位报告，体积取样以CFU/mL为单位报告。

第二法 MNP标记法

**8 原理**

利用多重PCR和二代高通量测序扩增并检测样品的中MNP标记位点，利用生物信息学软件分析测序产物，得出鉴定结果。

**9 试剂与材料**

本方法所用试剂均为分析纯，除特殊说明外，实验用水均为GB/T 6882规定的一级水。

9.1 多重PCR扩增与文库构建试剂盒。

9.2 高通量测序试剂盒。

9.3 引物：见附录C

**10 仪器与设备**

10.1 PCR扩增仪。

10.2 离心机，转速可达12000 rpm以上。

10.3 电泳仪。

10.4 凝胶成像仪。

10.5 超微量分光光度计。

10.6 实时定量PCR仪。

10.7 高通量测序仪。

**11 操作步骤**

11.1 样品要求

样品在检测前应充分混匀，取少量样品进行总DNA的提取。

11.2 样品DNA提取

提取与纯化的DNA溶液在260 nm与230 nm处的吸光度值的比值大于2.0；在260 nm与280 nm处的吸光度值的比值介于1.7与1.9之间；DNA电泳主带明显，无明显降解；无明显RNA残留。

11.3 多重PCR扩增与文库构建

按多重PCR扩增与文库构建试剂盒的说明书进行DNA质控、多重PCR扩增、文库构建与纯化，且多重PCR的扩增循环数不高于20个。

11.4 高通量测序

按高通量测序试剂盒和高通量测序仪的操作说明进行高通量测序与测序质控。

高通量测序的平均覆盖倍数设置为700倍以上，测序长度大于标记引物在参考基因组上的扩增长度。

**12 实验数据质量控制**

利用光合细菌鉴定软件将样品的测序数据比对到参考基因组的标记位点上，统计标记位点的平均覆盖倍数。

当时，判定样品的测序数据量不足，从11.4或之前的步骤开始重新实验。

当时，判定测序数据合格。

**13 结果判定**

利用光合细菌鉴定软件统计光合细菌的检出标记的数目N，并输出判定结论。

若，判定结论为“待测样品中不存在该光合细菌”；

若或，判定结论为“待测样品中可能存在该光合细菌”

若，判定结论为“待测样品中存在该光合细菌”。

对于判定结论为“待测样品中可能存在该光合细菌”的样品，可采用本标准第一法进行鉴定。

**14 防污染措施**

样品准备、核酸提取、多重PCR扩增与高通量测序在规定的区域按单一方向进行操作且保持实验室通风良好。不同区域的仪器和设备应专用。

附录 A

（资料性附录）

培养基

**A.1 AT培养基**

**A.1.1 基础培养基成分**

乙酸钠 3.0 g

碳酸氢钠 1.0 g

酵母膏 2.0 g

磷酸氢二钾 0.5 g

氯化铵 1.0 g

氯化镁 0.2 g

氯化钠 5.0 g

乙二胺四乙酸铁钠 1.0 mL

蒸馏水 1000 mL

**A.1.2 微量元素添加液**

**A.1.2.1 成分**

氯化铁 1.8 g

氯化钴 250 mg

氯化镍 10 mg

氯化铜 10 mg

氯化锰 70 mg

氯化锌 100 mg

硼酸 500 mg

钼酸钠 30 mg

亚硒酸钠 10 mg

**A.1.2.2 制法**

上述盐分别溶解到约900 mL水中，用1 mol/L的盐酸调节pH为2～3，定容至1 L。

**A.1.3 维生素添加液**

**A.1.3.1 成分**

对-氨基苯甲酸 20 mg

生物素 10 mg

蒸馏水 100 mL

**A.1.3.2 制法**

经0.22 μm滤膜过滤，保存在无菌容器中，冷藏保存。

**A.1.4 抗坏血酸添加液**

**A.1.4.1 成分**

抗坏血酸 5.0 g

蒸馏水 100 mL

**A.1.4.2 制法**

经0.22 μm滤膜过滤，保存在无菌容器中，冷藏避光保存。

**A.1.4.3 制法**

临用前，1000 mL A.1.1基础液中添加1 mL A.1.2微量元素添加液、1 mL A.1.3 维生素添加液和10 mL A.1.4抗坏血酸添加液，调节pH 6.9±0.1，培养基经0.45 μm滤膜过滤，分装到13 mL灭菌螺口试管中，每管装液12 mL。加入

**A.1.5 不同碳源AT培养基**

将A1.1 基础液中乙酸钠换为其他所需碳源，其他成分及制法同A1.4.3

**A.2 光合细菌分离琼脂**

**A.2.1 基础培养基**

**A.2.1.1 成分**

乙酸钠 3.0 g

碳酸氢钠 1.0 g

酵母膏 2.0 g

磷酸氢二钾 0.5 g

氯化铵 1.0 g

氯化镁 0.2 g

氯化钠 5.0 g

乙二胺四乙酸铁钠 1.0 mL

琼脂粉 10 g

蒸馏水 1000 mL

**A.2.1.2 制法**

除琼脂外，将其余成分溶解于蒸馏水中，pH 6.9，加入琼脂，加热溶解，定量分装适宜容器，121℃高压灭菌15 min。

**A.2.2 乙二胺四乙酸铁钠溶解**

硫酸亚铁 557 mg

乙二胺四乙酸二钠盐 745 mg

蒸馏水 100 mL

**A.2.3 光合细菌分离琼脂制法**

临用前，将A.2.1基础培养基融化，保温于46℃水浴，1000 mL A.2.1 基础培养基中加入5 mL A.1.4抗坏血酸添加液。摇匀后备用。

**A.3 磷酸盐缓冲稀释液**

**A.3.1 贮存液**

**A.3.1.1 成分**

磷酸二氢钾 34.0 g

蒸馏水 500 mL

**A.3.1.2 制法**

用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钾溶液调节pH至7.2，用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱中。

**A.3.2 稀释液**

用蒸馏水稀释1.25 mL贮存液至1000 mL，分装于适宜容器中，121℃高压灭菌15 min。

**A.4 革兰氏染色法**

**A.4.1 结晶紫染色液**

**A.4.1.1 成分**

结晶紫 1.0 g

95%乙醇 20 mL

1%草酸铵水溶液 80 mL

**A.4.1.2 制法**

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

**A.4.2 革兰氏碘液**

**A.4.2.1 成分**

碘 1.0 g

碘化钾 2.0 g

蒸馏水 300 mL

**A.4.2.2 制法**

将碘与碘化钾先行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至300 mL。

**A.4.3 复染液**

**A.4.3.1 成分**

沙黄 0.25 g

95%乙醇 10 mL

蒸馏水 90 mL

**A.4.3.2 制法**

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

**A.4.4** 染色法

**A.4.4.1** 将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染色1 min，水洗；

**A.4.4.2** 滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗；

**A.4.4.3** 滴加95%乙醇脱色，约30 s，水洗；或将乙醇滴满整个涂片，立即倾去，再用乙醇滴满整个涂片，脱色10 s；

**A.4.4.4** 水洗，滴加沙黄复染液，复染1 min，水洗，待干，镜检。

**A.4.4.5** 结果：革兰氏阳性菌呈紫色，革兰氏阴性菌呈红色。

附录B

（规范性附录）

光和细菌形态和生化特征

B.1 紫色非硫细菌形态特征j见表B.1

表B.1 紫色非硫细菌形态特征

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 特征 | 红螺菌属 | 红假单胞菌属 | 红微菌属 |
| 培养液颜色 | 红色或棕色 | 红色 | 棕色 |
| 细胞形态 | 螺旋形或弧形 | 球形或卵圆形 | 球形或卵圆形 |
| 鞭毛 | 极生鞭毛 | 极生鞭毛 | 周生鞭毛 |

B.2 深红红螺菌生理生化特征见表B.2

表B.2 深红红螺菌生理生化特征

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | 深红红螺菌 | 鉴定项目特征 | 深红红螺菌 |
| pH 7.0 | + | 乙醇 | + |
| 37℃ | - | 天门冬酰胺 | + |
| 葡萄糖 | - | 硫代硫酸钠 | - |
| 丙氨酸 | + | 硫化钠 | - |
| 谷氨酰胺 | + |  |  |

注：+表示不小于90%阳性, -表示阴性

B.3 黄褐红螺菌生理生化特征见表B.3

表B.3 黄褐红螺菌生理生化特征

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | 黄褐红螺菌 | 鉴定项目特征 | 黄褐红螺菌 |
| pH 7.0 | + | 葡萄糖 | - |
| 37℃ | - | 果糖 | - |
| 苯甲酸盐 | + | 糖醇 | - |
| 琥珀酸盐 | + | 硫代硫酸盐 | - |
| 乙醇 | + |  |  |

注：+表示不小于90%阳性, -表示阴性

B.4 沼泽红假单胞菌生理生化特征见表B.4

表B.4 沼泽红假单胞菌生理生化特征

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | 沼泽红假单胞菌 | 鉴定项目特征 | 沼泽红假单胞菌 |
| pH 5.5 | + | 柠檬酸 | + |
| 37℃ | + | 硫代硫酸钠 | + |
| 葡萄糖 | - | 触酶 | + |
| 苯甲酸 | + | 氢化酶 | + |
| 酒石酸 | + | 甲酸脱氢酶 | + |
| 乙醇 | + |  |  |

注：+表示不小于90%阳性, -表示阴性

B.5 荚膜红假单胞菌生理生化特征见表B.5

表B.5 荚膜红假单胞菌生理生化特征

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | 荚膜红假单胞菌 | 鉴定项目特征 | 荚膜红假单胞菌 |
| pH 5.5 | + | 山梨醇 | - |
| 25℃ | + | 亮氨酸 | - |
| 果糖 | - | 硫代硫酸钠 | - |
| 葡萄糖 | + | 甘油 | - |
| 甘露醇 | - | 氢化酶 | + |
| 乙醇 | - | 甲酸脱氢酶 | + |

注：+表示不小于90%阳性，-表示阴性

B.6 球形红假单胞菌生理生化特征见表B.6

表B.6 球形红假单胞菌生理生化特征

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | 球形红假单胞菌 | 鉴定项目特征 | 球形红假单胞菌 |
| pH 6.0 | + | 山梨醇 | + |
| 25℃ | + | 乙醇 | + |
| 果糖 | + | 苯甲酸钠 | - |
| 葡萄糖 | + | 硫代硫酸钠 | - |
| 甘露糖 | + | 氢化酶 | + |
| 甘油 | + | 甲酸脱氢酶 | + |

注：+表示不小于90%阳性, -表示阴性

附录C

（规范性附录）

MNP标记引物

MNP标记引物见表C.1

表C.1 MNP标记引物

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 物种 | 标记位点编号 | 引物类别 | 引物序列（5'端到3'端） |
| 沼泽红假单胞菌 | 1 | 正向引物 | GATGGGCGTCAAGGTCGA |
| 反向引物 | ACCGGCTTCGGCATGAA |
| 沼泽红假单胞菌 | 2 | 正向引物 | ATCAAGATCAACCACGAGACCCA |
| 反向引物 | GAGACGTGGATCAGGCCTTC |
| 沼泽红假单胞菌 | 3 | 正向引物 | CGGGTGCTGATGATGCTGT |
| 反向引物 | ACGCCGTCGGTGCTTAAA |
| 沼泽红假单胞菌 | 4 | 正向引物 | TCTTGCCGACCACGATCG |
| 反向引物 | CGACCGAAGTCGAGGTCAAG |
| 沼泽红假单胞菌 | 5 | 正向引物 | GGCGAAATCGTCGCCTG |
| 反向引物 | GAGCACGCTTTGGACGAAC |
| 沼泽红假单胞菌 | 6 | 正向引物 | ATCAACGCCTTCACCAACCC |
| 反向引物 | CGGACCCGGATCGATCTTG |
| 沼泽红假单胞菌 | 7 | 正向引物 | GGCACGCTGTTCACCTTC |
| 反向引物 | CTTGATGTCGCCCTTGGC |
| 沼泽红假单胞菌 | 8 | 正向引物 | TAACGGCTGGCATTCATCGTTTA |
| 反向引物 | TGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGCA |
| 沼泽红假单胞菌 | 9 | 正向引物 | CCTGCTCGTCGGTCTTCATG |
| 反向引物 | CGGTTGAACTCGCAGCTGAT |
| 沼泽红假单胞菌 | 10 | 正向引物 | AAGTGGTGCTGGTCGGC |
| 反向引物 | CGAGAACACCTGGCTCTTCTTG |
| 沼泽红假单胞菌 | 11 | 正向引物 | CGGCACTTCCATGCCGA |
| 反向引物 | GTCAACTTCGAAGAGCCGC |
| 荚膜红假单胞菌 | 12 | 正向引物 | GGGAAATTGGAATGGGCGAAGAT |
| 反向引物 | GGTCGATCAGCGTGCTGAA |
| 荚膜红假单胞菌 | 13 | 正向引物 | GGAAGCGCGTCTGTTCAAATAC |
| 反向引物 | TCGATGACCTTCCAGTTGATGAATTC |
| 荚膜红假单胞菌 | 14 | 正向引物 | ATGCGGGAACGCGCAGATA |
| 反向引物 | ATGGTCGGAGCGAGAGGAT |
| 荚膜红假单胞菌 | 15 | 正向引物 | CGCGCAATACTACATGAACCAC |
| 反向引物 | CCATGCCCAGACGTTCTTTCTT |
| 荚膜红假单胞菌 | 16 | 正向引物 | TAGCGCACCACATCCTCG |
| 反向引物 | ATCCCGGTGGCGGTGAAGA |
| 荚膜红假单胞菌 | 17 | 正向引物 | CTGATCTTTGACGCCTGCG |
| 反向引物 | AGGTGAATGCCCAGCGC |
| 荚膜红假单胞菌 | 18 | 正向引物 | TTGACCACCTGCACCAGCAT |
| 反向引物 | AGCATGACCACGATCACCATG |
| 荚膜红假单胞菌 | 19 | 正向引物 | CGGTCTGGGCAAGACCTA |
| 反向引物 | GCTTGCCCAGATAGGTCGA |
| 荚膜红假单胞菌 | 20 | 正向引物 | GCGATGCTGCGCAAGAAC |
| 反向引物 | GTCGGCCTTCACCACCAGAC |
| 荚膜红假单胞菌 | 21 | 正向引物 | GCCTGCAAGCGCAAGATC |
| 反向引物 | CCGATCATCACCACTTCAAGC |
| 荚膜红假单胞菌 | 22 | 正向引物 | GCGGCATCTTTGCCGAA |
| 反向引物 | GCGACGATATTGGGCAGC |
| 球形红假单胞菌 | 23 | 正向引物 | TCGATCTGGTCGAGGCCA |
| 反向引物 | ACATGGCGACGCCCATG |
| 球形红假单胞菌 | 24 | 正向引物 | TCCAGTCCTCGAAGGTGCT |
| 反向引物 | CATAGCCGAGGTAGCCGT |
| 球形红假单胞菌 | 25 | 正向引物 | CGACATGCGGTTGTTCTCGA |
| 反向引物 | GTGATCGTGGATGGCTGGTT |
| 球形红假单胞菌 | 26 | 正向引物 | ACCCGGATCCAGACCTTCG |
| 反向引物 | GCAGGATCACCCGGATCTC |
| 球形红假单胞菌 | 27 | 正向引物 | TTGCCCATGCCGAGGATCG |
| 反向引物 | GCTTGCACAGGATGGCC |
| 球形红假单胞菌 | 28 | 正向引物 | GCGTCGATCAGGTCCATCT |
| 反向引物 | ATCGCCGTCGATGACGGGA |
| 球形红假单胞菌 | 29 | 正向引物 | GCTTCGGCGATCGGCTT |
| 反向引物 | TTCACTACGGCCACCAGACC |
| 球形红假单胞菌 | 30 | 正向引物 | GATGGCCGTTCCGTCCTA |
| 反向引物 | GCAGCCATTTCTTCGACGA |
| 球形红假单胞菌 | 31 | 正向引物 | CGGTGAACTCGAACGGGA |
| 反向引物 | CATCAAGAACGAGATGCTGGAC |
| 球形红假单胞菌 | 32 | 正向引物 | GGTGCAGGAGGTGATCGA |
| 反向引物 | CGACATGGGCGAGATCGT |
| 球形红假单胞菌 | 33 | 正向引物 | TGCAACATGCTGTTCCGCTA |
| 反向引物 | GATGTCGTCGGCCTCGAA |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_