

微生物群落结构探针杂交评价不同培养基 从活性污泥分离优势菌群的能力^{*}

高平平^{1 2} 赵立平^{1**}

(¹ 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(² 山西大学生物技术研究所 太原 030006)

摘 要 用 ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) 苯酚羟化酶大亚基基因 (LmPHs) 扩增和群落结构探针分子杂交检测技术对 LB、dCGY、MP 和 FWM 4 种培养基从焦化废水处理厂 2 个曝气池活性污泥中分离优势功能菌群的能力进行了比较研究。LmPHs 扩增显示 7 种回收菌群中均有以多亚基苯酚羟化酶为代谢途径的苯酚降解菌存在。用代表苯酚降解高峰期活性污泥优势菌组成的总 DNA 的 ERIC-PCR 产物经地高辛标记作为群落结构的混合探针 M1 和 M8 对 8 种回收菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱进行杂交检测。不同培养基回收优势菌的能力不同,以废水为基础的 FWM 培养基从活性污泥中回收到的优势菌群最多 (30.8% ~ 42.9%)。本文建立了用微生物群落结构探针杂交技术对不同培养基回收分离优势菌能力进行评价的方法。

关键词 分离培养基,活性污泥,苯酚降解菌,ERIC-PCR,群落结构

中图分类号: X172, Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)02-0264-07

对微生物多样性、种群结构和功能的认识取决于我们分离、培养微生物的能力。大量研究表明,由于对细菌在自然环境下的生存状况及其生理特性缺乏了解,85% ~ 99.999% 的细菌种群无法通过纯培养的方法获得^[1-3],发展新型培养基和培养技术仍是一个尚待开拓的研究领域。在评价不同分离技术的效果时,分离到的细菌种群是否是环境样品中的代表菌、优势菌和主要功能菌是一个核心问题^[4]。

近年来,国外有关培养基对细菌种群的选择性分离的研究报道日益增多,主要集中在土壤、植物根际微生物、动物肠道微生物以及一些与健康 and 疾病相关的细菌种群分离回收的研究上^[5-7]。苯酚降解菌在工业废水处理、污染水体净化和土壤原位修复中起着非常重要的作用,许多选择培养基被广泛用于从活性污泥、土壤、沉积物、工业处理废水中筛选、分离苯酚降解菌^[8,9]。但是,目前常用的批式富集培养结合选择性培养基回收的方法往往不能把系统中的真正优势功能菌分离出来^[10,11]。

作者从处理焦化工业废水的活性污泥中直接提取总基因组 DNA,用 ERIC-PCR 指纹图谱和常规水质分析相结合的方法对某一工业规模焦化废水处理系统中活性污泥细菌种

^{*} 863 计划资助项目(SZ-03-01-04, 2001AA214131)

^{**} 通讯作者。E-mail: lpzhao@mail.sjtu.edu.cn

作者简介: 高平平 (1957 -) 女,山西洪洞人,博士,1998 年赴英国谢菲尔德大学访问研修一年,研究方向为环境微生物学。E-mail: gaopp@sxu.edu.cn

收稿日期: 2002-04-30,修回日期: 2002-11-04

群结构和降解效率进行了为期 4 周 8 个时间点的动态分析 ,其中第 1 次监测(M1)和第 8 次监测(M8)时期的活性污泥显示出较好的苯酚降解能力^[12]。对 M1 和 M8 活性污泥 ERIC-PCR 指纹图谱中的所有条带进行 DIG 标记 ,发展了可以反映处于降解高峰期的活性污泥微生物群落结构特征的混合 DNA 探针 M1 和 M8。本文用这两种探针对不同活性污泥在 4 种分离培养基上的回收菌群进行分析 ,目的是对不同培养基分离优势功能菌的能力进行比较研究 ,为发展新型培养基和分离技术提供理论依据和分子水平的评价方法。

1 材料和方法

1.1 材料来源

活性污泥样品取自太原某焦化厂污水处理厂第一和第二曝气池(简称 TJ1 和 TJ2)。该污水处理厂采用两级曝气 AB 法处理工艺处理含酚废水 ,其中 TJ1 的活性污泥为降解污染物的主体 ,对酚类化合物和氰化物的去除率分别在 90% ~ 99% 和 70% ~ 95% 之间 ,COD_{Cr} 的去除率最高约为 70% 左右。

PCR 试剂购自 Promega 公司 ,地高辛核酸标记检测试剂盒为德国宝灵曼公司产品。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基 :dCGY 和 MP 培养基按文献[11]。含酚焦化废水培养基(feed water medium ,FWM) 配制方法如下 :取经调节池调节 ,尚待处理的焦化废水(TJ)1L ,高速离心 (10 000 × g ,5min)后 ,将上清液过滤除菌(0.22μm 细菌滤膜) ,测定生废水苯酚含量 ,用化学纯苯酚将 FWM 中的苯酚量调整到 300mg/L ,取 100mL 的无菌废水加入到含有 1.8g 琼脂粉的灭菌三角瓶中(121℃ ,0.105 MPa ,25min) ,溶解后倒平板。

1.2.2 对照培养基 :LB 固体培养基。

1.3 分离菌的获得

置 10mL 活性污泥样品于含有 3g 玻璃珠(直径 0.11mm ~ 0.12mm)的灭菌 50mL 离心管中 ,在旋涡混合器击打 15min 去絮凝。取 100μL 解絮凝样品分别在 LB、dCGY、MP 和 FWM 平板上涂板 ,28℃ 培养 ,时间为 LB :24h ;dCGY 和 FWM :72h ;MP :96h ~ 120h。每种培养基设三个重复。平板上菌落直径多数达到 1mm ~ 2mm 后 ,用 5mL 的无菌水洗涤平板 ,收集菌体。将回收的混合菌分装在灭菌的 Eppendorf 管中(含有 20% 甘油)并保存在 - 70℃ 冰箱中备用。从第一曝气池活性污泥中回收的菌群命名为 FLB、FdCGY、FMP 和 FFWM ,第二曝气池的回收菌群为 SLB、SdCGY、SMP 和 SFWM。

1.4 总 DNA 的提取

细菌培养物总 DNA 的提取按文献[13]。从活性污泥样品中提取总 DNA 按文献[14]。

1.5 ERIC-PCR 和 LmPHs 扩增

ERIC-PCR 引物设计和反应条件按文献[15 ,16]。LmPHs 扩增参照 Watanabe 等^[11]方法。PHE1(5'-ATCgACgAgCTgCgCCA-3')和 PHE2(5'-gTTggTCAgCACgTACTCgAAggAgAA-3')用于多组分苯酚羟化酶大亚基(LmPHs)基因扩增。25μL 的反应体系中含有 2μL dNTP (2.5mmol/L) ,2.5μL 10 × Buffer ,2μL MgCl₂ (25mmol/L) 和 0.5μL Tag 酶 (5u/μL)。引物量为 12.5 p mol ,DNA 模板量 60ng。

PCR 反应在 MiniCycler™ (MJ Research Inc)上进行 ,PCR 引物由宝生物工程 (大连) 有限

公司合成。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,ERIC-PCR 点样量为 500ng,LmPHs 点样量为 200ng。GDS8000 凝胶成像系统(Ultra-Violet Product Ltd)照像、记录分析结果。

1.6 微生物群落结构探针制备

以 M1 和 M8 两个监测时间点的活性污泥总 DNA 为模板进行 ERIC-PCR 扩增,对全部的 PCR 条带直接进行 DIG 标记,制备成可以反映优势菌群组成的混合探针,即微生物群落结构探针。具体方法按宝灵曼公司地高辛核酸标记检测试剂盒的使用方法进行。

1.7 Southern blot

核酸 DNA 分子杂交按宝灵曼公司地高辛核酸标记检测试剂盒的使用方法进行。

1.8 DNA 指纹图谱的相似性比较

为了客观、定量评价不同指纹图谱之间的相似性,用 Sorenson^[17]配对比较相似性系数(pairwise similarity coefficient, C_s)比较凝胶电泳 DNA 指纹图谱和分子杂交 DNA 指纹图谱的相似性。 $C_s = 2j / (a + b) \times 100$,其中 a 是凝胶电泳 DNA 指纹图谱的条带数目, b 是分子杂交 DNA 指纹图谱的条带数目, j 是两个图谱中共有的条带的数目。

2 结果和分析

2.1 不同培养基回收菌的 ERIC-PCR 指纹图谱

对第一和第二曝气池活性污泥在 4 种培养基上的回收菌群提取基因组 DNA 进行 ERIC-PCR 扩增,均显示出复杂的 ERIC-PCR 指纹图谱(图 1)。扩增片断大小在 0.1~3.0kb 之间,条带数目在 11~14 左右,说明不同培养基均回收到一定数量的细菌种群。FLB、FdCGY、FMP、FFWM、SLB 和 SMP 的 ERIC-PCR 指纹图谱比较接近,均有一条大小约 1.1kb 的主带(L3、4、5、6、7、9),可能是某一类型细菌的特征条带。SdCGY 和 SFW 的 ERIC-PCR(L8、10)与 SLB、SMP 及其它回收菌群的图谱差异明显,表明其多样性组成不一。因此,用不同的培养基从同一曝气池活性污泥样品中观察到多样性不同的细菌种群。

2.2 不同回收菌群的 LmPHs 扩增

多亚基苯酚羟化酶被认为是大多数环境细菌进行酚代谢的一种主要酶类,LmPHs 片断(209bp)编码的多肽对酶的催化能力有着重要影响^[11]。Watanabe 等^[11]对在 dCGY 和 MP500 培养基从活性污泥中分离到的 27 个单菌落进行 LmPHs 扩增,在 17 个分离物中检测到 LmPHs 基因。徐玉泉等^[18]采用苯酚羟化酶基因检测苯酚降解菌,有该基因的细菌菌株具有降酚能力而无该特征条带的细菌不能在含有苯酚的培养基中生长。对 FLB、FdCGY、FMP 和 FFWM 进行 LmPHs 片断扩增均获得目的片断(图 2)。对 SLB、SMP 和 SFWM 检测也有特异条带出现但 SdCGY 没有出现 209bp 的片断(数据从略),表明在 7 种回收菌群中均有以多亚基苯酚羟化酶为代谢途径的苯酚降解菌。

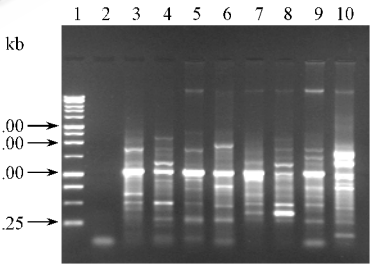


图 1 不同培养基回收菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱

Fig.1 The ERIC-PCR profiles of bacteria isolated from two activated sludge samples by using 1B,dCGY,MP and FWM media
1.1kb DNA ladder 2.Negative control ;
3.FLB 4.FdCGY 5.FMP 6.FFWM 7.SLB ;
8.SdCGY 9.SMP 10.SFWM.

2.3 不同培养基分离降酚功能菌的能力比较

用 DIG 标记的 M1 和 M8 群落结构探针(含有 12 ~ 14 条 DNA 主条带)分别与回收菌 ERIC-PCR 产物进行 Southern 杂交。图 3 显示,用两种探针杂交,FFWM 分别出现 2 条和 3 条信号较强的杂交条带(2.0kb,1.0kb 和 2.0kb,0.8kb 和 0.5kb,图 3A 和图 3B,16)。用 M1 探针,FLB, FMP, SLB 和 SdCGY 只显示一条 1.1kb 的条带(图 3A,13、5、7、8),FdCGY 有一条 1.0kb 的条带(图 3A,14)而 SMP 和 SFWM 中则没有杂交条带出现(图 3A,19、10)。用 M8 探针杂交, FdCGY 和 FMP 有一条 0.8kb 的条带, SFWM 的杂交条带为 1.5kb 和 1.2kb(图 3B,14、5、10),FLB, SLB, SdCGY 和 SMP 4 种回收菌群没有显示任何杂交信号(图 3B,13、7、8、9)。

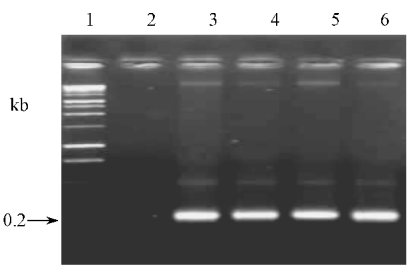


图 2 FLB、FdCGY、FMP 和 FFWM 4 种回收菌的 LmPHs 扩增结果

Fig.2 PCR detection of the LmPHs from mixed isolates of FLB, FdCGY, FMP and FFWM
1.1kb DNA ladder 2. Negative control ;
3. FLB 4. FdCGY 5. FMP 6. FFWM.

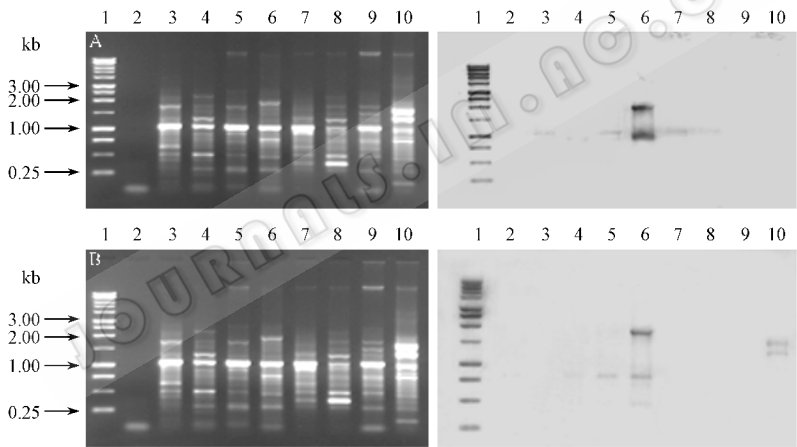


图 3 不同回收菌的 ERIC-PCR 及群落结构探针 Southern blot 杂交结果

Fig.3 ERIC-PCR and Southern blot of isolated bacteria with mixed probes for community structural detection
1.1kb DNA ladder 2. Negative control 3. FLB 4. FdCGY 5. FMP 6. FFWM 7. SLB 8. SdCGY 9. SMP 10. SFWM.
A. M1 probe B. M8 probe.

C_s 的计算结果表明(表 1),各回收菌群 ERIC-PCR 指纹图谱和其对应的探针杂交图谱的相似性比较低,其值在 0% ~ 42.9% 之间,说明用培养基方法分离到的优势菌群的比例比较少。在 4 种培养基中,FFWM 分离优势菌群的效果较好,用 M1 探针检测,30.8% 的主要菌群被回收(TJ1)。用 M8 探针杂交,分别有 42.9% (TJ1) 和 25.0% (TJ2) 的种群被检测到。dCGY 和 MP 培养基对优势菌的回收率为 16.7% ~ 18.2%,但 MP 从 TJ2 的活性污泥中没有分离到任何优势菌群。M1 探针杂交,FLB 和 SLB 回收菌中优势菌群的比例分别为 20.0% 和 18.2%,而 M8 探针分析显示它们对优势菌群的回收率为零。

3 讨 论

ERIC 是一个长度为 126bp ,以多拷贝形式存在于细菌基因组的非编码区的反向重复序列^[15] ,该序列在细菌染色体上分布的多态性允许设计特异引物对其进行扩增而形成具有种、属、菌株特异性的指纹图谱 ,已经被广泛应用于纯培养细菌的鉴别、分类、基因组多态性和系统进化等方面的研究^[13,19]。Di Giovanni 等^[16,20]的工作表明 ERIC-PCR 可以反映在 BIOLOG(GN)板上生长的混合菌群的种群组成特征。前期工作也表明 ERIC-PCR 可以对活性污泥、动物肠道等复杂微生物群落中优势菌的种群组成特征进行分析^[12,21]。用代表某个典型微生物群落特征的指纹图谱中所有 DNA 片段制备群落结构探针 ,可以通过分子杂交对这类 DNA 指纹图反映的微生物群落结构特征做更为精细的比较分析。

本文用微生物群落结构探针对不同培养基从活性污泥中回收优势菌的能力进行了评价 ,其原理是 ,M1 和 M8 两个时期的活性污泥的总 DNA 的 ERIC-PCR 产物代表了样品中优势菌组成特征 ,这些产物经标记后成为可以反映样品中优势菌组成的核酸探针 ,即所谓“微生物群落结构探针”。不同培养基上可以回收分离的优势菌是不同的 ,如果把所有分离到的细菌菌群混合提取总 DNA 进行 ERIC-PCR ,可以得到反映这种混合菌组成特征的 ERIC-PCR 指纹图。用上述探针与回收菌的 ERIC-PCR 指纹图杂交 ,出现的杂交条带数目代表了活性污泥中的优势菌有多少被特定的培养基回收到。本研究中 ,8 种回收菌群样品中有 7 种通过 LmPHs 扩增显示有苯酚降解菌存在 ,其 ERIC-PCR 指纹图谱也显示复杂带型 ,但用群落结构探针进行 Southern blot 分析 ,其回收菌群中只显示较少的杂交条带或没有杂交条带出现 ,Cs 最高为 42.9% ,大部分在 16.7% ~ 20% 之间 ,一些为零 ,说明用这些分离培养基回收的细菌种群只有少数是系统中的优势菌群 ,有的样品则完全不含有优势菌。

4 种分离培养基中 ,FWM 显示出较好的优势菌群回收特性。FWM 以未经处理的焦化废水为基础配制 ,除主要污染物苯酚外 ,还有氰化物及其它几十种芳香族、杂环类化合物。长期以来 ,一些细菌种群已适应这种多种有毒物质并存的环境并作为优势和功能菌群在污染物降解中发挥作用。利用生废水做分离培养基 ,可能为活性污泥中的优势功能菌提供了最接近其生态环境的生长条件。以无机盐培养基为基础 ,以苯酚为唯一碳源的 MP 培养基组分明显不足 ,难以满足此类细菌种群的生长需要。dCGY 和 LB 培养基由于缺少选择压(不含有毒物质) ,可能会导致一些非主要降解菌过度生长。

该研究表明用合成培养基得到的降解菌并非完全是生态环境中的优势功能菌 ,部分

表 1 8 种回收菌群的 ERIC-PCR 指纹图谱和群落结构探针分子杂交图谱的相似性比较
Table 1 Pairwise similarity coefficient of ERIC-PCR fingerprints and southern blot profiles with community structural probes of 8 recovered mixed populations from activated sludge sample(Cs , %)

M1 probe		M8 probe	
Recoveries	Similarity/ %	Recoveries	Similarity/ %
FLB	20.0	FLB	0
FdCGY	16.7	FdCGY	16.7
FMP	18.2	FMP	18.2
FFWM	30.8	FFWM	42.9
SLB	18.2	SLB	0
SdCGY	16.7	SdCGY	0
SMP	0	SMP	0
SFFW	0	SFFW	25.0

解释了为什么一些以此为出发菌构建的基因工程菌在原地修复过程中效果不理想。不同分离培养基分离优势功能菌的能力存在差异,因此在分子生态学技术辅助下开展对现有分离培养基的有效性评价和发展新型培养基势在必行。

参 考 文 献

- [1] Amann R I , Ludwig W , Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* , 1995 , **59** (1) : 143 ~ 169.
- [2] Iwamoto T , Tani K , Nakamura K , *et al.* Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacteria community by DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* , 2000 , **32** : 129 ~ 141.
- [3] Rheims H , Felske A , Seufert S , *et al.* Molecular monitoring of an uncultured group of the class *Actinobacteria* in two terrestrial environments. *Journal of Microbiological Methods* , 1999 , **36** : 65 ~ 75.
- [4] Allison E , McCaig A , Susan J , *et al.* Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacteria communities. *FEMS Microbiol Ecol* , 2001 , **35** : 37 ~ 48.
- [5] Tabacchioni S , chiarini L , Bevivino A , *et al.* Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial Ecology* , 2000 , **40** : 169 ~ 176.
- [6] Feder I , Nietfeld J C , Kelly B , *et al.* Evaluation of enrichment techniques for the isolation of *Salmonella choleraesuis* from swine feces. *Journal of Microbiological Methods* , 1998 , **33** : 143 ~ 151.
- [7] Uyttendaele M , Bagamboula C F , De Smet E , *et al.* Evaluation of culture media for enrichment and isolation of *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*. *International Journal of Food Microbiology* , 2001 , **70** : 255 ~ 265.
- [8] Van Schie P M , Yong L Y. Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** (7) : 2432 ~ 2438.
- [9] 徐玉泉 , 张 维 陈 明 , 等. 一株苯酚降解菌的分离和鉴定. *环境科学学报* , 2000 , **20** (4) : 450 ~ 455.
- [10] Wagner M , Amann R , Lemmer H , *et al.* Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria : inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** (5) : 1520 ~ 1525.
- [11] Watanabe K , Teramoto M. Futamata H , *et al.* Molecular detection , isolation , and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** (11) : 4396 ~ 4402.
- [12] Zhao L P , Gao P P. ERIC-PCR as a community fingerprinting technology for identification of functional components in activated sludge for wastewater treatment in coke industry. Proceedings of 101st Annual Meeting of American Society for Microbiology , 2001 , Orlando , FL. p600.
- [13] 赵立平 , 肖 红 , 李艳琴 , 等. ERIC-PCR : 一种快速鉴定环境细菌菌株的方法. *应用与环境生物学报* , 1999 , **5** (增刊) : 30 ~ 33.
- [14] 高平等 , 赵立平. 可用于微生物群落分子生态学研究的活性污泥总 DNA 提取方法的研究. *生态学报* , 2002 , **22** (11) : 2015 ~ 2020.
- [15] Versalovic J , Koeuth T , Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl Acids Res* , 1991 , **19** (24) : 6823 ~ 6831.
- [16] Di Giovanni G D , Watrud L S , Seidler R J , *et al.* Fingerprinting of mixed bacterial strains and BIOLOG Gram-Negative (GN) substrate communities by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). *Curr Microbiol* , 1999 , **38** (4) : 217 ~ 223.
- [17] Gillan D C , Speksnijder A G C L , Zwart G , *et al.* Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca , Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rDNA. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** (9) : 3464 ~ 3472.
- [18] 徐玉泉 , 方宣钧 , 陈 明 , 等. 采用苯酚羟化酶基因特异引物检测苯酚降解菌. *微生物学报* , 2001 , **41** (3) : 298 ~ 303.
- [19] De Bruijn F J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacteria repetitive intergenic consensus)

sequence and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(7): 2180 ~ 2187.

- [20] Di Giovanni G D, Watrud L S, Seidler R J, *et al.* Comparison of parental and transgenic Alfalfa rhizosphere bacterial communities using GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **37**(2): 129 ~ 139.
- [21] Song G, Wei G, Cao Y, *et al.* Use of ERIC-PCR as a community fingerprinting technology in elucidation of mode of action of a new probiotic formulation for prevention and treatment of bacterial diarrhea in piglets. Book of abstracts of the Asia Pacific Conference On Plant Tissue Culture & Agribiotechnology 19 ~ 23 November 2000. Singapore G16, p166.

Capacity Evaluation of Different Media for Isolating Predominant Phenol-degrading Bacteria from Activated Sludge with Community Structure-specific DNA Probes^{*}

Gao Pingping^{1,2} Zhao Liping^{1,*}

(¹ School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(² Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The capabilities of LB, dCGY, MP and FWM media for the recovery of predominant phenol-degrading bacteria in activated sludge samples from the aeration tanks of a two-stage system for coking wastewater treatment were evaluated with ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) profiling, PCR detection of the largest subunit of phenol hydroxylase (LmPHs) and hybridization with community structural DNA probes. The specific amplification of LmPHs revealed that seven out of eight recovered mixed populations employed the multi-component phenol hydroxylase to degrade phenol. ERIC-PCR products amplified from total DNA of activated sludge samples with high phenol removal efficiency were DIG-labeled as mixed probes reflecting composition of predominant bacteria in the sludge samples to hybridize with ERIC-PCR fingerprints amplified from total DNA of pooled colonies recovered from different isolation media as a way to evaluate the media's capacity for recovering predominant bacteria from activated sludge systems. It was demonstrated that the feeding water based medium FWM recovered the highest proportion (30.8% ~ 42.9%) of predominant populations from activated sludge samples in the first aeration tank. A new strategy has been proposed for evaluating capacity of different media in terms recovery of predominant populations from activated sludge systems.

Key words: Selective medium, Activated sludge, Phenol-degrading bacteria, ERIC-PCR, Community structure

^{*} Supported by project of Chinese National Programmes for High Research and Development (SZ-03-01-04 2001AA214131)

^{**} Corresponding author. E-mail: lplzhao@mail.sjtu.edu.cn