垃圾填埋场渗滤液中古细菌群落 16S rRNA 基因的 ARDRA 分析

黄立南^{1,2},周 惠¹,陈月琴¹,罗 硕¹,蓝崇钰¹,屈良鹄^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院,基因工程教育部重点实验室,广州 510275; 2. 中山大学环境科学系,广州 510275)

摘要:利用特异性的引物对,选择性扩增垃圾填埋场渗滤液中古细菌群落的 16S rRNA 基因片断,在此基础上建立 16S rDNA 克隆文库。经古细菌通用寡核苷酸探针的原位杂交筛选后,克隆文库内古细菌 16S rDNA 扩增片断的多样性通过 ARDRA 分析(amplified rDNA restriction analysis)而获得。利用 PCR 将各重组克隆子内的 16S rDNA 外源片断再扩增 出来后,两种限制性内切酶-*Hha* I和 *Hae* II-被分别用于 16S rDNA 克隆片断的限制酶切分析。结果表明,随机选出的 70 个古细菌 16S rDNA 克隆片断被分为 21 个不同的 ARDRA 型(组),其中的两个优势型总共占了所有被分析克隆子的 60%,而其余 19 个型的相对丰度均处于较低的水平,当中的 14 个型更仅含有 1 个克隆子。通过对 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、克隆及其 ARDRA 分析,能快速地获得有关垃圾填埋场渗滤液中古细菌群落的结构及其多样性的初步信息。 关键词:垃圾渗滤液;古细菌;16S rRNA 基因;ARDRA

ARDRA Analysis of 16S rRNA Genes from the Archaeal Community in Landfill Leachate

HUANG Li-Nan^{1,2}, ZHOU Hui¹, CHEN Yue-Qin¹, LUO Shuo¹, LAN Chong-Yu¹, QU Liang-Hu^{1*} (1. Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Environmental Sciences, Zhongshan University, Guangzhou

510275, China). Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(7): 1085~1090.

Abstract: Using PCR and a pair of specific primers, archaeal small subunit 16S rRNA genes were selectively amplified from total genomic DNA extracted from the microbial community in the leachate of a full-scale sanitary landfill, and an archaeal 16S rDNA clone library was subsequently established. Clones were screened by colony hybridization with an archaeal oligonucleotide probe, and diversity of amplified 16S rDNA fragments in the library was gained by a restriction fragment length analysis (ARDRA). The cloned 16S rDNA fragments were reamplified, and restriction analysis was performed following separate digestion with enzymes *Hha* I and *Hae* II. A total of 70 cloned 16S rDNA fragments were analyzed, and they were finally clustered into 21 different groups (ARDRA patterns), with two most abundant groups accounting for 60% of all the 16S rDNA clones. The remaining 19 groups presented at low levels, of which a total of 14 groups were represented by a single clone. By the method of ARDRA, we could rapidly estimate the population structure of *Archaea* in the landfill leachate.

Key words: landfill leachate; Archaea; 16S rRNA genes; ARDRA

文章编号:1000-0933(2002)07-1085-06 中图分类号:Q78 文献标识码:A

基金项目:国家杰出青年基金资助项目(39525007);教育部长江学者特聘教授配套优秀青年教师骨干基金资助项目;广 东省自然科学基金资助项目(011120)

收稿日期:2001-08-08;修订日期:2002-03-13

作者简介:黄立南方数据,男,广西横县人,硕士,讲师。主要从事环境生态学研究。

*通讯联系人 Author for correspondence,E-mail:Psbrco4@zsu.edu.cn

作为一种简单有效的生物过程,厌氧消化已被大规模应用以减少有机废物所造成的环境污染^[1]。土地 填埋由于具有处理量大、操作简单以及运作费用低廉等优点,全球每年产生的城市固体废弃物(Municipal solid waste, MSW 俗称城市垃圾)中,绝大部分被以土地填埋的方式处置掉。作为古细菌域的一个重要类 群,产甲烷微生物在各种厌氧系统内有机废物的生物降解过程中扮演重要角色,由它们参与催化的处于垃 圾连续矿化作用末端的解聚反应常常是垃圾厌氧降解速度的限制因素^[2,3],因此,研究垃圾填埋场内部产 甲烷古细菌群落的结构及其多样性,对全面了解有机废物厌氧消化过程中的微生物生态及其与厌氧系统 整体表现之间的关系具有重要意义。

由于基于培养的传统微生物技术的局限性,自然界各种生境中的微生物种类大部分至今仍无法培 养^[4~6],因此,分离自一个生境的所有微生物种的集合通常并不能代表该生境内真正的微生物多样性。到目 前为止,人们对各种厌氧系统内微生物种群和群落的生态的了解甚少,因为利用传统微生物技术研究这些 严格厌氧、生长缓慢的微生物类群时尤其面临很大困难。核酸技术正被广泛用于对环境样品中微生物群落 的研究,许多这些技术根据对同源生物聚合物的序列的比较分析而推断系统发育关系。不同的微生物其 rRNA 基因序列在某些位点以不同的几率发生突变,但是它们又具有高度的保守性,从而可以作为生物进 化史上的计时器,其序列的相似程度可以反映它们在系统发育上的关系。特别地,与核糖体小亚基 rRNA 分子(small-subunit rRNA, SSU rRNA)有关的技术,例如对 16S rRNA 基因的选择性扩增、克隆及其序列 的测定与系统发育分析,由于摆脱了对微生物培养和纯种分离的依赖,因此在过去的十多年里被广泛应用 于对各种生境中微生物群落的结构及其多样性的研究^[7~10]。对 16S rDNA 扩增片断的 RFLP 分析也称 ARDRA(amplified rDNA restriction analysis, ARDRA)^[11],其最大特点是操作简单快捷,不需要任何待分 析 16S rDNA 片断的序列信息,因而尤其适合对扩增和克隆自自然微生物群落的大量 16S rDNA 片断的初 步分析或者是对这些混合种群的 16S rDNA 进行测序前的简单筛选。

通过 PCR 从提取自垃圾填埋场渗滤液的总 DNA 中选择性地扩增古细菌群落的 16S rDNA 片断,在 此基础上建立古细菌 16S rDNA 克隆文库,并利用 ARDRA 法对其进行分析,从而获得有关垃圾填埋场内 部古细菌群落的结构及其多样性的初步信息。

1 材料与方法

1.1 研究地点

李坑垃圾填埋场位于广州市北郊,自 1992 年开始投入使用,是该市两个正在运行中的大型垃圾填埋 场之一。其总面积约 3,200hm²,设计容量为 2.9×10⁶m³,日接受城市生活垃圾 1 400 ~ 1 700 t。为减轻其 现场垃圾渗滤液处理设施的负担,部分从填埋场新填埋区流出的"高浓度"的渗滤液经回灌系统返回旧填 埋区的上游,并借重力作用渗入到已填埋多年的垃圾层中。

1.2 垃圾渗滤液的理化分析

用具螺旋盖的 1L 采样瓶收集从旧填埋区流出的垃圾渗滤液(3 个重复),并立即置于冰浴中。渗滤液 样品的理化参数根据标准的水样分析方法^[12]测定,主要参数包括 pH 值、电导率、碱度(滴定法)、总固体 (TS)和挥发性固体(VS)、挥发性酸(蒸馏滴定法)、硫酸盐(浊度法)、总凯氏氮(凯氏定氮法)、总磷(钼蓝比 色法)以及 COD(高锰酸钾消化法)等。

1.3 核酸抽提

将体积约为 4 ml 的渗滤液子样品离心收集于 1.5 ml 的小型离心管中($12\ 000\ g$, 4° C, $10\ min$),弃上 清后细胞沉淀贮存于— 80° C直至核酸抽提。

细菌群落的总 DNA 用溶菌酶/蛋白酶 K/SDS 法提取^[13]。核酸浓度用紫外分光光度计测定(Beckman DU530),其大小和质量用 1%琼脂糖凝胶电泳检查。

1.4 古细菌 16S rDNA 片断的扩增

合并 3 个重复渗滤液样品提取到的总 DNA,之后用 w002(GNTACCTTGTTACGACTT,反向引物, 所有生物通用,所数据(ATTCYGGTTGATCCYGSCRG,正向引物,古细菌特异)引物对^[9]选择性扩增总 DNA 中的古细菌 16S rDNA 片断。每一 PCR 反应管内含有 3.0 mM Mg²⁺,10% DMSO,1×Taq reaction Buffer、各 0.12 μg 的两个引物、0.2 mM ddNTP(每种)、约 50ng 的模板 DNA、1 单位的 Taq 酶(上海生工 公司),补加 ddH₂O 至终体积 20 μl,最后用矿物油覆盖。如此总共作 10 个重复。反应程序为:94 C 变性 4 min;然后 94 C 1 min、50 C 1 min、72 C 2 min 共 30 个循环;最后在 72 C 充分延伸 10 min。

1.5 克隆文库的建立及原位杂交筛选

将所有反应体系合并、浓缩,扩增产物的大小用 1%的琼脂糖凝胶电泳检查,经溴化乙锭染色后在紫外 灯下割下具正确长度(约 1 500 碱基)的 DNA 条带,之后用割胶纯化试剂盒纯化(Qiaex II gel extraction kit, Qiagen, Germany)。纯化后的 PCR 产物经补平磷酸化后(平端)连接至 pTZ 质粒载体上^[14],转化 *E. coli* TG1 感受态细胞。

经氨卡青霉素选择和蓝白颜色初步筛选后,可能含有被克隆古细菌 16S rDNA 片断的 *E. coli* 菌落被 划线转接至尼龙滤膜(Amersham)上培养,然后按照标准的方法原位裂解并将 DNA 紫外交联至尼龙膜 上^[15]。古细菌通用的寡核苷酸探针(S-D-Arch-0915-a-A-20,GTGCTCCCCGCCAATTCCT,以下简称 Arch915)^[16]用 T4 多核苷酸激酶(Promega)和 [γ -³²P]ATP 对其 5'-未端进行同位素标记。滤膜先在 40 C 下预杂交 2~3 h(杂交缓冲液为 5×SSPE, 1% SDS 和 5×Denhardt),接着加入同位素标记的寡核苷酸探 针杂交过夜,然后在室温下洗膜(洗膜液为 0.1×SSPE,0.1%SDS)2次、每次 30 min。充分凉干后的滤膜在 -70 C下自显影生成 X 光片(Fuji Super RX)。

1.6 ARDRA 分析

与古细菌 16S rRNA 通用探针杂交呈阳性反应的克隆子中的质粒用标准方法提取^[15],然后用 w002 和 w017 引物对再扩增其中的 16S rDNA 插入片断,所得 PCR 产物经浓缩后分别用 *Hha* I 和 *Hae* II 两种限 制性内切酶(Takara 公司)消化(37 C, 1h)。酶切 DNA 片断用 2%的琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭染 色和凝胶成像系统照相(配有 Kodak DC-120 数码相机)后,所得 DNA 带型图谱在 Kodak 凝胶分析系统辅 助下用人工进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 垃圾渗滤液的理化性质

从李坑垃圾填埋场旧填埋区流出的渗滤液其理化性质见表 1。其总固体含量为 8.4 g/L,当中有机成分 (挥发性固体)占 59%左右。碱性的 pH 值、较低的挥发性酸浓度以及很低的硫酸盐水平显示该填埋区内部 正处于较稳定的产甲烷状态,但其 COD 及 TKN 仍维持在稍高的水平。

2.2 16S rDNA 文库的建立及原位杂交筛选

利用溶菌酶/蛋白酶 K/SDS 法,每毫升的垃圾 渗滤液样品约能提取出 1.5 μ g 的总 DNA。如此所 获得的高质量 DNA 样品无需作进一步的纯化,即 可用 w002/w017 引物对从中扩增出具正确长度的 古细菌 16S rDNA 片断(约 1.5 kb)。在此基础上采 用平端连接策略所建立的 16S rDNA 克隆文库包含 超过 1200 个 β -半乳糖苷酶-阴性的重组克隆子单菌 落。随机挑取 120 个单菌落,经与古细菌 16S rRNA 寡核苷酸探针(Arch915)原位杂交的筛选,证实其中 有 70 个(约 58%)具有古细菌 16S rDNA 插入片断。 2.3 克隆 16S rDNA 片断的 ARDRA 分析

两种限制性内切酶,*Hha* I和 *Hae* II,被用来对 文库内古细菌 16S rDNA 片断的多样性进行初步的 比较分析。由于这两种酶的识别位点均为4个碱基, 假设 16S rI**万**了声觉如樱基排列完全是随机的话,那 表1 李坑垃圾填埋场旧填埋区渗滤液的理化特征

| Table 1 | Physico-chemical of | characteristics of | of leachate | from |
|------------|---------------------|--------------------|-------------|------|
| the closed | l part of Likeng La | ndfill | | |

| 会物 Demomentan | 浓度 Concentration | |
|---|------------------------|--|
| | (mean \pm SD) (mg/L) | |
| pН | 8.6 \pm 0.4 | |
| 电导率 Conductivity (mS/cm) | 20.6 \pm 6.8 | |
| 总固体 TS | 8425 ± 1061 | |
| 挥发性固体 VS | $4977\ \pm 690$ | |
| 碱度 Bicarb. alkalinity (as CaCO ₃) | 1012 ± 312 | |
| 硫酸盐 Sulfate (as SO ₄) | 0.5 \pm 0.3 | |
| 生化耗氧量 COD | 4456 ± 608 | |
| 总凯氏氮 TKN | 2843 ± 436 | |
| 挥发性酸 VA (as acetic acid) | $309\ \pm 59$ | |
| Ca | 23.4 \pm 9.5 | |
| Mg | 27.6 \pm 4.6 | |
| K | 880.3 \pm 84.8 | |
| Na | 907.3 \pm 90.1 | |

1033

么,理论上它们将以相似的频率对任一给定的序列进行切割。

将各克隆子内质粒上的外源片断用 w002 和 w017 引物对再扩增出来,经 *Hha* I 酶切及电泳分离之后,70 个克隆子被分成 15 个不同的 ARDRA 型,其中最大的两个型分别含有 35 和 11 个克隆子,而剩下的 13 个型中有 7 个只包含 1 个克隆子。利用 *Hae* II 对含有 2 个或 2 个以上克隆子的 *Hha* I ARDRA 型进行 进一步的酶切分析,结果表明当中某些型还可以被细分。但为了得到全部 *Hae* II ARDRA 型的集合,对所 有 70 个重组克隆子均进行了 *Hae* II 酶切分析和比较。结果显示,*Hae* II 也将它们划分为 15 个不同的 ARDRA 型,其中最大的两个型分别含有 43 和 10 个克隆子,而剩下的 13 个型中有 10 个型仅包含 1 个克隆子,其余 3 个型所包含的克隆子均在 3 个以内。综合两种限制酶的分析结果,所有被分析的 70 个 16S rDNA 克隆子被划分为 21 个不同的 ARDRA 型(图 1),它们当中包括两个最大的、分别含有 32 个和 10 个克隆子的型,以及 14 个仅含 1 个克隆子的型;而在这 14 个型当中有 4 个克隆子的*Hha* I 和 *Hae* III 型均是 唯一的。



图 1 李坑垃圾填埋场渗滤液中古细菌群落 16SrDNA 片断的 ARDRA 型(A: Hha I: B: Hae Ⅱ)

Fig. 1 *Hha* I -(A)and *Hae* II -based(B)ARDRA patterns of 16S rDNAs from mixed archaeal populations in the leachate of Likeng Landfill

泳道:M,size marker;1~21,乃综合两种限制性内切酶的 ARDRA 分析结果而划分的 21 个不同的组(型),其命名 (编号)严格按照原来的检测顺序进行(注意:电泳图上并没有按该顺序给出)Lane:M,size marker;1 to 21,groups 1 to 21 clustered after combining the results of both ARDRAs. The groups were named in order of initial detection

70 个克隆子在这 21 个 ARDRA 型中的分布如图 2 所示。图中各型的编号严格按照原来的酶切检测顺 序进行(即由每一型中第一个被发现的克隆子决定),从而完全是随机的。第 1 和第 3 型共占所有被分析 16S rDNA 克隆子的 60%,其中前者占 14.3%,后者占 45.7%。其余 19 个型当中只有 5 个型包含超过 1 个 以上(2~4 个)的克隆子。

为判断所分析的 70 个重组克隆子是否真正代表了原来的垃圾渗滤液样品中古细菌群落 16S rDNA 的 多样性(假设 w002 / w017 引物对适用于所有古细菌),将酶切分析过程中所累计的 ARDRA 型的数目作 为已分析 16万 方数据隆子数的函数并作图(图 3),图中所有克隆子的编号(计数)均严格按照原来的检测 顺序进行,亦即完全是随机的。在完成头 3 个重组克隆子的酶切分析之后,两个丰度最高的 ARDRA 型(第 1 和 3 型)均已先后被检测到;分析至第 55 个克隆子时,所有 21 个 ARDRA 型当中已有 20 个被检测到;而 在剩下的 15 个克隆子中只检测到一个新的 ARDRA 型。由此判断,在完成对所有随机选出的 70 个克隆子 的分析之后,即使再增加对文库内其它克隆子的取样和酶切分析,发现新 ARDRA 型的机率已经降至很低 的水平。

3 讨论

最初从文库内随机挑选出来的 120 个具氨卡青霉素抗性、但缺失 β-半乳糖苷酶合成能力的克隆子中, 经古细菌 16S rRNA 通用探针杂交筛选后,证实其中仅有 70 个含有古细菌的 16S rDNA 片断。而后来进行 的双酶切实验表明,在这 120 个克隆子当中共有 90 个克隆子具有正确长度的外源片断,但显然其中的 20 个并不与古细菌探针杂交。设计具有百分之百类群特异性的 PCR 引物是很难的^[17],一些古细菌 16S rDNA 引物已被证实有时会扩增少量的真细菌片断,如 Godon 等^[9]利用同样的古细菌引物对(w002/w017)所建 立的厌氧消化器内古细菌群落的 16SrDNA 克隆文库中,有 20%左右的序列被证实是来自真细菌。同样,估 计本研究中这 20 个不与 Arch915 探针杂交的外源片断很可能也是源自真细菌(约占被克隆片断总数的 22%),它们并没有被包括在随后进行的 ARDRA 分析之内。

克隆文库内古细菌 16S rRNA 基因的多样性通过 ARDRA 的比较分析而得到。初步的结果显示,李坑 垃圾填埋场渗滤液内古细菌群落的 16S rDNA 包括 21 个不同的 ARDRA 型,当中主要以两个优势型为 主,两者共占所有被分析克隆子的 60%左右,而其余 19 个型的丰度均处于相对很低的水平。通过分析所累 计的 ARDRA 型的数目在 70 个古细菌 16S rDNA 克隆子中的分布(图 3),判断随机取样和分析的强度已 足以检测到克隆文库内古细菌 16S rDNA 的优势型,因为在完成所有这 70 个克隆子的分析之后,检测到新 ARDRA 型的机率已显著下降至一个很低的水平。

厌氧系统的表现与其内部微生物群落的结构密切 相关。一般认为,稳定的厌氧消化过程有赖于厌氧系统 内部各种生化条件和环境因子的优化、从而使四大微 生物代谢类群之间能进行有效地协作。考虑到产甲烷 古细菌在厌氧处理过程中的重要性,对其群落结构和



图 2 各 ARDRA 型在所分析的 70 个古细菌 16S rDNA 重组克隆子中的分布

Fig. 2 Distribution in ARDRA patterns of archaeal 16S rDNA clones from the archaeal community in landfill leachate

所有 ARDRA 型均严格按照其原来的检测次序给出

The ARDR方竹数据^{re shown} in order of initial detection



图 3 李坑垃圾填埋场渗滤液中古细菌群落的结构及 其多样性的初步估计

Fig. 3 Estimation of diversity in the archaeal community from landfill leachate

图中给出在 16S rDNA 克隆片断的限制酶切分析过程 中所累计的 ARDRA 型数目的情况。所有 16S rDNA 克 隆子的计数均严格按照原来的检测顺序进行,从而可以 认为完全是随机的 The sequential detection of cumulative ARDRA patterns following ARDRA analysis of 70 archaeal SSU rDNA clones is presented. The 16S rDNA clone numbers reflect the order of initial detection, which was assumed to be stochastic relative to the distribution of clones generated in the library 生态的了解将有助于对厌氧消化系统的运作进行有效的控制和优化。产甲烷细菌被认为是最难通过传统 微生物技术进行研究的微生物类群之一,在16S rRNA 基因序列比较分析的基础上,新兴的分子生物学技 术提供了一种不经培养而直接研究各种生境中微生物群落结构及其生态的强有力手段。本研究通过建立 16S rDNA 克隆文库及其 ARDRA 分析,初步了解垃圾填埋场内部处于高有机负荷及严格厌氧环境中的古 细菌群落的结构及其多样性。下一步,通过对每一 ARDRA 型内的16S rRNA 基因进行序列测定及其系统 发育分析,就能获得该特殊生境内部古细菌群落多样性的更加详细、准确的信息。虽然在细胞收集与裂解、 总 DNA 提取、16S rRNA 基因的 PCR 扩增以及克隆等步骤中不可避免地导入误差^[4,18~20],从而使 16S rDNA 序列在克隆文库中的相对丰度并不一定代表其相应的微生物种在原来生态系统中的相对丰度,但 如此所获得的结果显然可以作为未来作更深入研究的出发点。在此基础上,可以通过有目的地设计类群特 异性的寡核苷酸探针,经荧光标记及原位杂交分析,从而直接获得有关类群在该生态系统内的分布的信息。

参考文献

- [1] Archer D B and Kirsop B H. The microbiology and control of anaerobic digestion. In: Wheatley A ed. Anaerobic digestion: a waste treatment technology. Elsevier Science Publishing Ltd., London, 1990. 43~89.
- [2] Chynoweth D P and Pullammanappallil P. Anaerobic digestion of municipal solid wastes. In: Palmisano A C and Barlaz M A eds. *Microbiology of solid waste*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996.71~113.
- [3] Eastman J A and Ferguson J F. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. J. Water Pollut. Control Fed., 1981, 53: 352~366.
- [4] Amann R I, Ludwig W, and Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59(1): 143~169.
- [5] Giovannoni S J, Brischgi T B, Moyer C L, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacteraplankton. Nature (London), 1990, 345: 60~63.
- [6] Ward D M, Weller R, and Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature (London)*, 1990, 345: 63~65.
- [7] Wu J H, Liu W T, Tseng I C, et al. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. Microbiol., 2001, 147: 373~382.
- [8] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Syutsubo K, et al. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. Microbiol., 1998, 144: 2655~2665.
- [9] Godon J J, Zumstein E, Dabert P, et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63(7): 2802~2813.
- [10] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, et al. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. Extremophiles., 2001, 5: 23~33.
- [11] Vaneechoutte M R, Rossau R, De Vos P, et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiol. Lett., 1992, 93: 227~234.
- [12] Greenberg A E, Clesceri L S and Eaton A D. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, D. C, 1992.
- [13] Bond P L, Hugenholtz P, Keller J, et al. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 1910~1916.
- [14] Mead D A, Szczesna-Skorupa E and Kemper B. Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein. Eng.*, 1986, 1(1): 67~74.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- [16] Stahl D A and Amann R. Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E and Goodfellow M eds., Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, 1991. 206~248.
- [17] Tajima K, Nagamine T, Matsui H, et al. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. FEMS Micribiol. Lett., 2001, 200: 67~72.
- [18] Farrelly V, Rainey F A and Stackebrandt E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Micribiol.*, 1995, 61: 2798 ~2801.
- [19] Reysenbach A L, Giver L J, Wickham G S, et al. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. <u>Apple, Empiron. Microbiol.</u>, 1992, 58: 3417~3418.
- [20] Suzuk **为 万 款 据**ovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 625~630.