

堆肥未培养细菌的宏基因组文库构建及新的木聚糖酶基因的克隆和鉴定*

The Construction of A Metagenomic Library of Uncultured Bacteria from Compost and the Cloning and Identification of Novel Xylanase Genes

张鹏^{1,2,3}, 段承杰^{1,2,3}, 庞浩³, 封毅³, 靳振江³, 许跃强³, 莫新春³, 唐纪良^{1,2,3}, 冯家勋^{1,2,3*}

Zhang Peng^{1,2,3}, Duan Chengjie^{1,2,3}, Pang Hao³, Feng Yi³, Jin Zhenjiang³, Xu Yueqiang³, Mo Xinchun³, Tang Jiliang^{1,2,3}, Feng Jiaxun^{1,2,3}

(1. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室(广西大学), 广西南宁 530005; 2. 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室(广西大学), 广西南宁 530005; 3. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

(1. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization at Guangxi Univ., Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. The Key Laboratory of Ministry of Education for Microbial and Plant Genetic Engi. at Guangxi Univ., Nanning, Guangxi, 530005, China; 3. Coll. of Life Sci. and Tech., Guangxi Univ., Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要: 从自制堆肥样品中提取未培养细菌的总 DNA, 用柯斯质粒 pWEB: TN C 为载体构建宏基因组文库, 对文库进行筛选获得表达木聚糖酶活性的克隆, 再进行亚克隆、测序分析以及 Blastx 搜索 GenBank 分析木聚糖酶基因。结果构建得到一个包含约 5 万个克隆的宏基因组文库, 文库中外源 DNA 总容量约为 1.8×10^6 kb, 获得 2 个表达木聚糖酶活性的克隆: pGXN1050 和 pGXN1051, 鉴定分析表明: pGXN1050 上潜在的木聚糖酶基因 *umxyn11A* 具 1 个 771bp 的 ORF (Open Reading Frame), 可编码含 257 个氨基酸的蛋白质, 所编码产物与混合纤维弧菌 (*Cellvibrio mixtus*) 的内切-1, 4- β -木聚糖酶 (GenBank 索引号 Z48925.1) 的氨基酸序列有 46% 的一致性和 57% 的相似性; pGXN1051 上潜在的木聚糖酶基因 *umxyn11B* 具一个 723bp 的 ORF, 可编码含 241 个氨基酸的蛋白质, 编码产物与混合纤维弧菌的内切-1, 4- β -木聚糖酶 (GenBank 索引号 Z48925.1) 的氨基酸序列有 73% 的一致性和 80% 的相似性。木聚糖酶 *Umxyn11A* 和 *Umxyn11B* 都属于糖基水解酶家族 11 的成员。

关键词: 细菌 宏基因组文库 木聚糖酶基因

中图分类号: N242 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)04-0343-04

Abstract Metagenomic DNA of uncultured bacteria from self-made compost was extracted, end-blunted and ligated with cosmid vector of pWEB: TN C. A metagenomic library containing about 50,000 clones was constructed. The capacity of foreign DNA cloned in the library was 1.8×10^6 Kb. The library was screened for xylanase activity and two positive clones were isolated which were named as pGXN1050 and pGXN1051, respectively. The xylanase genes on the two clones were subcloned, sequenced and analysed. Results showed that the putative xylanase gene *umxyn11A* on pGXN1050 had a 771bp ORF, encoding a product with 257 amino acids sharing 46% identity and 57% similarity with endo-1, 4-beta-xylanase (GenBank accession No. Z48925.1) of *Cellvibrio mixtus*. The putative xylanase gene *umxyn11B* on pGXN1051 had a 723bp ORF, encoding a product with 241 amino acids sharing 73% identity and 80% similarity with endo-1, 4-beta-xylanase (GenBank accession No. Z48925.1) of *Cellvibrio mixtus*. *Umxyn11A* and *Umxyn11B* are members of family 11 glycosyl hydrolase.

Key words bacteria, metagenomic library, xylanase gene

收稿日期: 2005-04-18

修回日期: 2005-05-19

作者简介: 张鹏 (1977-), 男, 山西长治人, 研究生, 主要从事微生物研究工作。

* 国家 863 计划 (2004AA214140) 和国际科技合作重点项目计划 (2002AA217121) 资助项目。

** 通讯联系人。

木聚糖 (xylan) 是一种多聚五碳糖, 是植物半纤

纤维素的重要组分,它占植物碳水化合物总量的三分之一,在自然界中是继纤维素之后的第2个丰富的再生生物质资源^[1]。木聚糖酶(xylanase, E C3. 2. 1. 8)是一类能够特异降解木聚糖的酶类^[2]。木聚糖酶可广泛应用于食品、饲料、医药、能源、造纸、纺织等行业^[3]。目前,木聚糖酶在工业上的应用还存在酶产量不高或酶的耐受性不够等问题^[2],解决的方法主要有:(1)对现有的木聚糖酶进行遗传改造^[4]; (2)从极端环境筛选优良的木聚糖酶产生菌^[5]; (3)通过构建未培养微生物的宏基因组文库以获取优良理化性质的木聚糖酶基因^[6,7]。自然界中有95%~99%的微生物是不可培养的^[8],这是一个巨大的基因资源库^[9]。开发利用未培养微生物的基因资源的主要手段是通过构建和筛选未培养微生物的宏基因组文库^[10,11]。当前未见关于通过构建和筛选堆肥的未培养细菌的宏基因组文库并从中获取木聚糖酶基因的报道。本实验通过构建以松木屑、米糠为主要材料的自制堆肥的未培养细菌的宏基因组文库,克隆和鉴定了2个新的木聚糖酶基因,为进一步研究木聚糖酶的降解机理及其在生产中的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株和质粒

本实验所用细菌菌株和质粒见表1

1.1.2 培养基、培养条件和抗生素及其用量

大肠杆菌的培养基用Luria-Bertani(LB培养基)和LA培养基(LB+1.5%琼脂)。筛选培养基为含0.1%木聚糖的LA培养基。

液体培养于37℃摇床振荡培养(200rpm),平板培养是于37℃恒温箱倒置培养。

氯苄青霉素使用浓度100^μg/ml,氯霉素使用浓度12^μg/ml

1.1.3 酶和试剂

限制性内切酶购自NEB公司,文库构建试剂盒购自Epicentre公司,木聚糖Sephadex G200和PVPP购自Sigma公司,超纯琼脂糖购自Invitrogen公司。其它均为国产分析纯试剂。

1.1.4 自制堆肥的材料

松木屑、米糠、牛粪、猪粪、鸡粪、甘蔗渣、森林土(采自广西南宁青秀山公园)、菜园土(采自广西大学农场菜园)、酵母粉、尿素、水。

1.2 方法

1.2.1 自制堆肥的堆制和管理

堆肥化技术采用静态垛式强制通风堆肥系

表1 实验所用的细菌菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strains or plasmids	有关特性 Relevant attributes	来源 Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, end A1, gyr A46, thi, hsd r17, sup E44, rel A1 lac / F [pW AB+, lac Iq, lacZ M15: Tn10(tetr)]</i>	Stratagen e 公司 Stratagen e Co.
<i>Escherichia coli</i> EPI100	<i>recA1, end A1, F-, mcr AΔ (mrr-hsd R M5-mcr BC), Φ80lacZ M15, ΔlacX74, araD139, Δ(ara, leu) 7697, galU, galKΔ-, rps L, nup G</i>	Epicentre 公司 Epicentre Co.
Plasmids		
pW EB:: TNC	柯斯载体,具有氯苄青霉素和氯霉素抗性 Cosmid vector, Amp ^r , Cm ^r	Epicentre 公司 Epicentre Co.
pBluescript M13 KS(+)	克隆载体,具有氯苄青霉素抗性 Cloning vector Amp ^r	本实验室 保存 Stored in laboratory
pGXN1050	pW EB:: TNC上克隆有39 kb未培养细菌DNA,表达木聚糖酶活性 pW EB:: TNC harboring 39 kb DNA fragment from uncultured bacterium, expressing xylanase activity	本工作 This work
pGXN1050-1. 2	pBluescript M13KS(+)上克隆有pGXN1050的未培养细菌DNA的1.2 kb BamHI片段,表达木聚糖酶活性 pBluescript M13KS(+) harboring 1.2 kb BamHI fragment of pGXN1050, expressing xylanase activity	本工作 This work
pGXN1051	pW EB:: TNC上克隆有45 kb未培养细菌DNA,表达木聚糖酶活性 pW EB:: TNC harboring 45kb DNA fragment from uncultured bacterium, expressing xylanase activity	本工作 This work
pGXN1051-1. 5	pBluescript M13KS(+)上克隆有pGXN1051的未培养细菌DNA的1.5 kb EcoRI/XhoI片段,表达木聚糖酶活性 pBluescript M13 KS(+) harboring 1.5 kb EcoRI/XhoI fragment of pGXN1051, expressing xylanase activity	本工作 This work

统^[12]。室内自制1个1m³堆肥池,池中散布通风管道用于强制通风。堆制方法参照文献[13]。从堆肥堆制24h后,每天3次检查堆肥内部(深约50cm)温度,通过不定期强制通风控制堆肥温度为40~60℃,通过加水和通风使堆肥湿度保持在40%~65%。本试验采集第34、35、36天的堆肥样品混合,用于提取未培养细菌的总DNA。

1.2.2 堆肥未培养细菌总DNA的提取

取上述堆肥样品50g充分悬浮于100ml提取缓冲液(0.18mol/L磷酸钾缓冲液,pH值7.2;0.3%

PV PP (polyvinylpyrrolidone); 4mM mol/L CaCl₂) 中, 2000rpm 离心 10min 后收集上清液至另一新离心管中, 8000rpm 离心 20min, 收集菌体。再用 1ml 0.18 mol/L 的磷酸钾缓冲液 (pH 值 7.2) 悬浮, 加入溶菌酶至终浓度 5mg/ml, 37°C 反应 0.5h 后, 再加入蛋白酶 K 至终浓度 0.2mg/ml, 50°C 保温 1h 后加入 SDS 至终浓度 1%, 80°C 裂解细胞 5min, 冷却至室温, 加入 1/2 倍体积的 7.5M NH₄Ac, 混匀后, 冰浴 15min, 12000rpm 离心 5min 收集上清液至另一个新的 2ml 离心管, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 沉淀得 DNA 粗提物。

1.2.3 堆肥未培养细菌总 DNA 的纯化和回收

先用自制的 Sephadex G200 (含有 2% PV PP) 层析柱纯化 DNA, 用 TEN 缓冲液 (0.1mol/L Tris-Cl, pH 值 8.0; 0.01mol/L EDTA, pH 值 8.0; 0.01mmol/L NaCl) 进行洗脱, 分管收集沉淀 DNA, 溶解后再用电洗脱法回收适当大小的 DNA 片段, 供后续实验使用。

1.2.4 堆肥未培养细菌宏基因组文库的构建和筛选

堆肥未培养细菌宏基因组文库的构建参照 Epicentre 公司 pWEB⁺: TNC Cosmid Cloning Kit 试剂盒产品说明书。将回收的 DNA 片段末端平头化, 和试剂盒中的载体连接, 包装侵染宿主菌 EPI100, 侵染产物涂平板, 37°C 培养 12~16h, 即为该批样品的宏基因组文库。

将文库克隆影印到含 0.1% 木聚糖的 LA 平板 (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 12 μ g/ml 氯霉素) 上, 37°C 培养 20h 后, 用刚果红染色观察菌落周围是否有水解圈, 如有水解圈, 则对应文库平板, 挑取相应克隆接种用于提取质粒。提取的质粒按常规化学转化法转入感受态细胞 EPI100 之后点转化于筛选平板上鉴定是否有水解圈, 从而最后确定该质粒是否包含有木聚糖酶基因。

1.2.5 木聚糖酶基因的鉴定

参照文献 [14], 采用逐级亚克隆分析来确定木聚糖酶基因的位置。

由大连宝生物工程公司采用双脱氧核苷酸法对含木聚糖酶基因的最小 DNA 片段进行测序。

用 Blastx 搜索 GenBank, 分析木聚糖酶基因。

1.2.6 系统进化分析

对木聚糖酶的氨基酸序列与 GenBank 上登录的部分木聚糖酶 (表 2) 的氨基酸序列用 ClustalX 1.8 软件进行完全比对, 将比对结果用系统进化分析软件 Mega2.1 进行 Neighbor-joining (NJ) 分析, 绘制系统进化树。

2 结果与分析

2.1 文库的构建及筛选

采用本文所述的 DNA 制备方法, 1g 堆肥样品可得 0.6~1 μ g 适合文库构建要求的 DNA (图 1)。本工作构建得到 1 个合约 5 \times 10⁴ 个克隆的文库, 随机挑取 14 个文库克隆提取质粒, 用限制性内切酶 Bam HI 酶

表 2 用于系统进化分析的木聚糖酶

Table 2 Xylanases used for phylogenetic analysis

木聚糖酶 Xylanase	来源微生物 Source microorganisms	登录号 Accession No.
endo-beta-1, 4-xylanase	<i>Cellobacter japonicus</i>	Z48927
xylanase	uncultured <i>Cellobacter</i> sp.	AY225507
β -1, 4-xylanase (XynA)	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	AB063255
xylanase (XylA)	<i>Microbulbifer hydrolyticus</i>	AY646089
endo-1, 4-beta-D-xylanase (xyl11)	<i>Thermobifida fusca</i>	AY795559
xylanase A (XynA)	<i>Aeromonas punctata</i> ME-1	D32065
endo-1, 4 β -xylanase	uncultured bacterium	AY394562
xylanase A	<i>Pichia stipitis</i>	AF151379
xylanase D	<i>Caldicellulosiruptor</i> sp. Rt69B.1	AF036925
XynT	<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>	AJ543424
xylanase C	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	U01037
xylanase B	<i>Ruminococcus albus</i>	AB057588
XynB	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	AE012078
xylanase A	<i>Prevotella bryantii</i> B14	Z49241

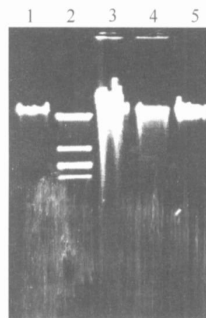


图 1 提取的堆肥未培养细菌总 DNA

Fig. 1 The extracted metagenomic DNA of uncultured bacteria from compost

1. λ DNA; 2. λ DNA/EcoRI; 3. 粗提的堆肥宏基因组 DNA; 4. 经 Sephadex G200 纯化的宏基因组 DNA; 5. 经电透析回收的宏基因组 DNA

1. λ DNA; 2. λ DNA/EcoRI; 3. the raw metagenomic DNA extracted from compost; 4. the metagenomic DNA purified by Sephadex G200; 5. the metagenomic DNA recovered by electroelution.

切,琼脂糖凝胶电泳分析表明所有质粒都有外源 DNA,最大为 45 kb,最小为 25 kb,平均大小为 35kb,文库中外源 DNA总容量约为 1.8×10^6 kb,14个质粒中没有一个酶切带型是完全相同的(图 2),说明文库克隆的 DNA片段随机性比较大。

筛选文库获得 2个阳性克隆。提取 2个阳性克隆的质粒后再次转化,再次转化的转化子在筛选平板上仍然显示木聚糖酶活性(图 3a),说明这两个阳性克隆确实是含有木聚糖酶基因,将这两个阳性克隆命名为 pGXN 1050 和 pGXN1051 质粒 pGXN1050 和 pGXN 1051分别包含有 39 kb和 45 kb的外源 DNA片段(图 3b)。

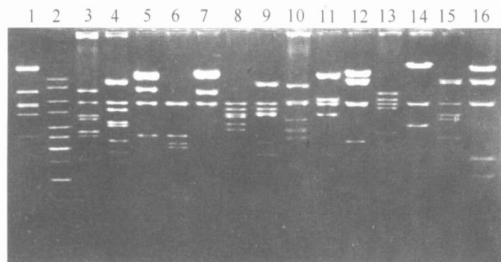


图 2 文库质粒的酶切分析

Fig. 2 The restriction analysis of plasmids from library 1. λ DNA / Eco RI; 2. 1kb DNA ladder; 3~ 16. 经 Bam HI 酶切的文库克隆的质粒。

1. λ DNA / Eco RI; 2. 1kb DNA ladder; 3~ 16. the library clones digested with Bam HI.

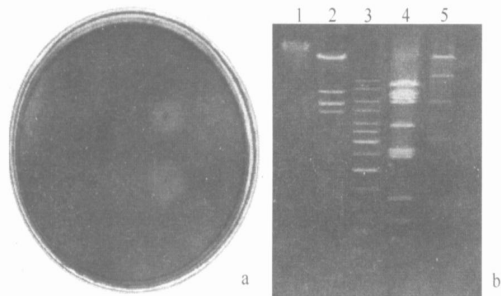


图 3 具有木聚糖酶活性的阳性克隆及其质粒的 Bam HI 酶切带型

Fig. 3 The two clones which show xylanase activity and the restriction pattern of plasmids digested with Bam HI

a. 具有木聚糖酶活性的阳性克隆 pGXN 1050 和 pGXN 1051 在含 0.1% 木糖的 LA 平板上,左边的克隆是阴性对照;右边的克隆是阳性克隆 pGXN 1050(右上)和 pGXN 1051(右下)的转化子; b. 阳性克隆 pGXN 1050 和 pGXN 1051 的限制性酶切图谱。

a. The xylanase expression clones pGXN 1050 and pGXN 1051 on the plate containing 0.1% xylan, the left clones are negative control; the right clones are transformants pGXN 1050 (up right) and pGXN 1051 (down right); b. The restriction pattern of pGXN 1050 and pGXN 1051

1. λ marker; 2. λ DNA / Eco RI; 3. 1kb DNA ladder; 4. pGXN 1050 / Bam HI; 5. pGXN 1051 / Bam HI.

2.2 木聚糖酶基因鉴定

对两个阳性克隆进行亚克隆分析,最终将 pGXN 1050 中的木聚糖酶基因定位在 1.2 kb Bam HI

片段上, pGXN 1051 中的木聚糖酶基因定位在 1.5 kb EcoRI/XhoI 片段上。用双脱氧核苷酸法测定 pGXN 1050 的 1.2 kb 亚克隆片段上的 1,040 bp,其上包含的木聚糖酶基因 umxyn 11A 的 ORF 由 771 个核苷酸组成;同样方法测定 pGXN 1051 的 1.5 kb 亚克隆片段上的 1388 bp,其上包含的木聚糖酶基因 umxyn 11B 的 ORF 由 723 个核苷酸组成。

umxyn 11A 的 ORF 起始密码子是 ATG,终止密码子是 TGA,可编码一个含 257 个氨基酸的蛋白质,预计分子量为 27260.90 道尔顿,等电点 pI 是 6.58 umxyn 11B 的 ORF 起始密码子是 ATG,终止密码子是 TAA,可编码 241 个氨基酸的蛋白质,预计分子量为 25980.59 道尔顿,等电点 pI 为 8.51 Blastx 分析得知 umxyn 11A 的编码产物与混合纤维弧菌的内切-1, 4 β -木聚糖酶 (GenBank 索引号 Z48925.1) 有 46% 的一致性和 57% 的相似性; umxyn 11B 的编码产物与混合纤维弧菌的内切-1, 4 β -木聚糖酶 (GenBank 索引号 Z48925.1) 有 73% 的一致性和 80% 的相似性。

用 SMART 软件分析由 umxyn 11A 和 umxyn 11B 的 DNA 序列推测的 Umxyn 11A 和 Umxyn 11B 的组件结构:木聚糖酶 Umxyn 11A 和 Umxyn 11B 都属于糖基水解酶家族 11 的成员, Umxyn 11A 从 N 端开始 1~ 28 个氨基酸是信号肽,40~ 249 个氨基酸为催化功能域; Umxyn 11B 从 N 端开始 1~ 33 个氨基酸是信号肽,41~ 230 个氨基酸为催化功能域。

2.3 系统进化分析

由分析系统进化树(图 4)可知, Umxyn 11A 和

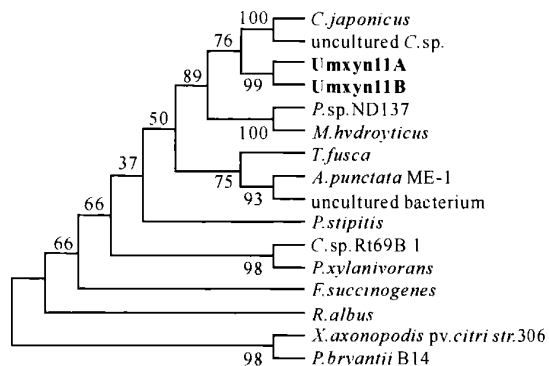


图 4 Umxyn 11A 和 Umxyn 11B 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the evolutionary position of Umxyn 11A and Umxyn 11B among the xylanase from other strains

分枝节点上所标注的数字是采用邻位相连法经过 1000 次 Bootstrap 法运算得到的百分数。

Bootstrap percentage values from 1000 replications of the dataset have been included at branch points. The numbers on the branch are from NJ analysis.

(下转第 352 页 Continue on page 352)

deposition of silicon in cucumber plants [J]. Plant Cell and Environment, 1991, (14): 485-492.

- [45] 胡瑞芝,方水娇,陈桂秋.硅对杂交水稻生理指标及产量的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2001,27(5): 335-338.
- [46] 冯东昕,李宝栋.可溶性硅在植物抵御病害中的作用[J].植物病理学报,1998,28(4): 293-297.
- [47] 张翠珍,邵长泉,孟凯,等.小麦吸硅特点及效果的研究[J].山东农业科学,1998,(4): 29-31.
- [48] 梁永超,沈其荣,张爱国,等.钙、硅对酸雨胁迫下小麦生长和养分吸收的影响[J].应用生态学报,1999,10(5): 589-592.
- [49] Wagner, Richard R B, Patricia A B. Soluble silicon its

role in crop and disease management of greenhouse crops[J]. Plant Disease, 1995, 4 329-336

- [50] Cherif M, Menxies J G, Bhret D L. Yield of cucumber infected with *Pythium aphanideruatum* when growth with soluble silicon [J]. Horticulture Science, 1994, 29(8): 236-242.
- [51] Cherif M, Masselin A, Belanger R R. Defense responses induced by soluble cucumber roots infects by *Pythium* spp [J]. Phytopathology, 1994, 84(3): 236-242.
- [52] 李发林,张锦元.云南省烟草施用硅肥试验研究[J].云南农业科技,1997,(2): 15-17.

(责任编辑:邓大玉 韦廷宗)

(上接第346页 Continue from page 346)

Umxyn11B与来源于纤维弧菌属的 *Cellvibrio japonicus* 以及 uncultured *Cellvibrio* sp. 的木聚糖酶同处在一组,而且 Blastx 分析 Umxyn11A 和 Umxyn11B 都与来自混合纤维弧菌 (*Cellvibrio mixtus*) 的木聚糖酶 (GenBank索引号 Z48925. 1) 的同源性最高,所以推断 umxyn 11A umxyn 11B 可能是来自未培养的纤维弧菌属的细菌。BLAST 2 SEQUENCES 比较 Umxyn11A 和 Umxyn11B 的氨基酸序列得知二者之间有 45% 的一致性和 59% 的相似性,而且进化树显示两者亲缘关系非常近,推测 umxyn 11A 和 umxyn 11B 可能是来自该属的两个亲缘关系较近的种。

3 结束语

Blastx 分析结果表明本工作获得的两个木聚糖酶基因,都是新的木聚糖酶基因,说明通过构建和筛选堆肥未培养细菌文库的方法可以得到新的木聚糖酶基因,这也是细菌木聚糖酶基因资源开发利用的一条新途径。umxyn 11A 和 umxyn 11B 可能都是来自未培养纤维弧菌属的细菌,二者之间亲缘关系近,但同源性较低。Umxyn 11A 和 Umxyn 11B 的组件结构相似,从 N 末端到 C 末端依次由信号肽和家族 1 糖基水解酶催化功能域组成。Umxyn 11B 与混合纤维弧菌的内切-1,4 β -木聚糖酶的氨基酸序列有较高的同源性,但它们的酶学性质可能不一样,这有待进一步的实验证实。

参考文献:

- [1] Prade R A. Xylanases from biology to biotechnology [J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1995, 13 100-131.
- [2] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases [J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23(4): 411-456.
- [3] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications a review [J]. Appl

Microbiol Biotechnol, 2001, 56 326-338.

- [4] Liu X, Qu Y, You F, et al. Studies on the key amino acid residues responsible for the alkali-tolerance of the xylanase by site-directed or random mutagenesis [J]. J Mol Catal, B Enzym, 2002, 18 307-313.
- [5] Miranda-Tello E, Fardtau M L, Thomas P, et al. *Petrogoga mexicana* sp nov, a novel thermophilic anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(1): 169-174.
- [6] Brennan Y, Callen W N, Christoffersen L, et al. Unusual microbial xylanases from insect guts [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 3609-3617.
- [7] Sunna A, Bergquist P L. A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4 β -xylanase isolated directly from an environmental DNA sample [J]. Extremophiles, 2003, 7: 63-70.
- [8] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59 143-169.
- [9] Cowan D A, Arslanoglu A, Burton S G, et al. Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalyst [J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32(2): 298-302.
- [10] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, et al. Cloning the soil metagenome a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(6): 2541-2547.
- [11] Steit W R, Schmitz R A. Matagenomics—the key to the uncultured Microbes [J]. Curr Opin Microbiol, 2004, 7 492-498.
- [12] 罗宇焯,张甲姚,马瑛.有害废物堆肥技术及堆肥生态系统研究进展 [J].上海环境科学,1999,18(10): 478-480.
- [13] 朴哲.高温堆肥体系的物质降解机理及微生物学特性 [D].武汉:华中农业大学,2001.
- [14] Sambrook J, Russel D W. Molecular Cloning a Laboratory Manual [M]. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 10-12, 25.
- [15] 陈世和.城市生活垃圾堆肥化处理 [J].上海环境科学,1985,7(4): 29-34.

(责任编辑:韦廷宗 邓大玉)