

· 综 述 ·

16S rRNA 基因技术在环境科学领域中的应用

乐毅全, 顾国维

(同济大学污染控制与资源化国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 随着分子生物学的发展, 16S rRNA 基因技术被逐渐应用到环境科学领域中。目前在环境保护和治理中, 该技术主要被用于鉴定污染物的生物降解菌和分析环境样品中的微生物群落多样性, 由于它不必将微生物培养分离出来, 也就避免了在培养过程中可能出现的微生物丢失的情况。本文对 16S rRNA 基因技术及其在环境科学领域中的应用现状和发展作了一简要介绍, 并对 16S rRNA 基因技术存在的不足进行了讨论。

关键词: 16S rRNA 基因序列; DNA 扩增; 多样性分析

中图分类号: Q 938

文献标识码: A

文章编号: 1001-3644(2003)06-0001-04

The Application of 16S rRNA Gene Technology on Environmental Sciences

L E Yi-quan, GU Guo-wei

(National Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: With the development of molecular biology, the 16S rRNA gene technique has been gradually used in environmental sciences. Now, this technique has been mainly applied to identify the pollutant - biodegradation bacteria and to analyse the diversity of microorganism community in environmental samples. Because it is unnecessary to culture the microorganisms by traditional methods, it can avoid the situation of losing the microorganisms during the culture. In this paper, it briefly introduces that the development and the use of 16S rRNA gene technique on environmental sciences. The disadvantage of 16S rRNA gene technique is also discussed.

Key words: 16S rRNA gene sequence; DNA amplification; diversity analysis

1 微生物体内的 16S rRNA 基因及其应用

核糖体存在于每个合成蛋白质的细胞中, 在原核微生物中, 核糖体是分散在细胞质中的亚微颗粒, 细菌的核糖体由三种相对分子量不同的 rRNA 组成, 分别为 5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA。其中 16S rRNA 的长度在 1475 - 1544 核苷酸之间, 含有少量修饰碱基, 16S rRNA 的结构十分保守。

Pace 等^[1]在 20 世纪 80 年代首先利用 rRNA 基因 (rDNA) 来确定环境中的微生物, 通过对 5S rRNA 基因的序列分析来研究微生物的生态和进化, 由于 5S rRNA 基因相对较小 (约 120 个核苷酸), 携带的信息较少, 而随后开展的 16S rRNA 基因序列可以携带更多的信息, 效率更高。

以 16S rRNA 基因为基础, 结合 DNA 扩增 (PCR) 技术, 近年来发展出一种新的分子生物学手段, 即通过对 16S rRNA 基因的 DNA 序列分析, 可以分析细菌的种类信息, 并且已经逐渐成为微生物分类和鉴定中非常重要而且有用的指标和手段。目前在生物学上, 有关 16S rRNA 基因的工作很多, 集中在以下两个方面:

1.1 对未知生物的分类鉴定

相对于传统的微生物形态、生理生化指标, DNA 由于其稳定性和保守性, 逐渐为人们所关注, 随着生物学研究手段的发展, 把生物的 DNA 信息作为生物分类鉴定的指标已经成为可能, 如 G + C %、DNA 杂交、DNA - rRNA 杂交和 16S rRNA 碱基顺序分析等。

rRNA 由于含量大, 已成为细菌系统分类学研究中最常用的方法, 其中 16S rDNA 序列的相对稳定而又高度保守, 可以为细菌鉴定提供相对稳定可靠的信息。目前, 已有 10000 种以上的细菌的 16S rDNA 序列被报道, 并且每年以很快的速度补充到 Genbank 中。利用特异的引物对未知的来自细菌的 DNA 样品

收稿日期: 2003-04-10

作者简介: 乐毅全 (1962 -) 男, 浙江宁波人, 现就读于同济大学环境工程专业博士研究生, 讲师。

进行 PCR 扩增, 构建 16S rDNA 基因文库, 通过测序, 再与已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较, 就可以对未知细菌进行鉴定。

1.2 系统发育 (亲缘关系) 的研究

根据 16S rDNA 序列的相似性, 可以构建细菌各个种属的系统发育树, 比较细菌种属之间亲缘关系的远近, 为研究细菌的系统发育提供有力的证据。

如链霉菌是一大类重要的放线菌群, 在自然界分布广泛, 但长期来, 其分类主要依据表型特征, 造成混乱。而分子生物学方法为改变这种状况带来可能。Rashidian 等人 (1999)^[2]以 16S rRNA 基因全序列作为分子指针对青色链霉菌 (*S. cranes*) 种群进行系统进化分析, 指出了前人在分类上的错误; 我国的徐平等^[3]用包含 16S rRNA 基因 V - 2 高变区在内的 120bp 长核苷酸序列, 对 300 多株已知该区段序列的链霉菌进行分析, 得到较为完整的系统进化树。

在其他种类的细菌分类研究中, 16S rRNA 基因分析, 同样得到广泛的应用。东秀珠等^[4]用 16S rDNA 的同源性揭示了双歧杆菌与有关细菌的关系。赵庆新等^[5]研究了鲤鱼科 8 种鱼中 9 种肠道菌群的分布, 并利用从 GenBank 中调取的这 9 种肠道细菌菌属的 43 个种或亚种的 16S rDNA 序列构建 NJ 树和 MP 树, 来研究它们的系统演化关系。另外, 根瘤菌的系统发育研究中, 16S rDNA 的基因测序, 也成为重要的手段^[6~8]。

16S rRNA 基因技术, 同样在微生物多样性的分析中得到广泛应用。如将该技术与 ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) 技术结合, 依据原核生物 rDNA 的保守性, 将扩增的 rDNA 进行酶切, 然后通过酶切图谱来分析菌间的多样性, 该法无需分纯试样, 简便、高效, 是一种很有发展前途的方法^[9~10]。应用该方法对非豆科植物共生的结瘤固氮放线菌 *Frankia* 菌的多样性进行研究, 从酶切图谱上可以看出在 *Frankia* 菌间存在极其丰富的遗传多样性^[11]。

2 16S rRNA 基因技术在环境科学领域中的应用

在环境科学研究工作中, 在很多情况下, 我们希望了解环境中存在的微生物, 包括其种类、组成及在环境中的变化动态。而传统的以培养为基础的微生物分离鉴定技术, 在这方面存在很大的局限, 不仅工作量大, 而且在环境中许多微生物至今无法被培养出

来。因此, 对于自然界各种生境中的微生物种类的信息, 我们所知甚少, 而这些信息对于环境保护和治理又是十分重要的。如何尽可能多地了解环境中的微生物信息, 甚至是全部的信息, 成为一个当前环境科学研究中的一个难点。而 16S rRNA 基因技术的出现, 可以有效地解决上述难题, 因此, 16S rRNA 基因技术正在被广泛应用到对环境样品中微生物的研究。

目前在环境科学领域中, 16S rRNA 基因技术的应用主要有以下两个方面:

2.1 鉴定生物降解菌

在环境保护和治理中, 我们需要得到在环境中对污染物质起降解作用的微生物种类信息, 这就需要对生物降解菌进行鉴定, 由于有些微生物难以培养, 传统的依赖于分离培养方法得到的微生物种类信息就有可能是不完全的。

Greiselbrecht 等 (1996) 用该技术对来自海洋沉积物的萘降解菌 N 3 - PA321 进行鉴定, 发现它与模式菌 *Cycloclasticus pugetii* 亲缘关系最近^[12]。陈亚丽等人 (2002) 利用 16S rDNA 序列分析, 对分离自土壤的甲基对硫磷降解菌进行鉴定, 结合生理生化特性, 鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp. WBC - 3)^[13]。刘涛等 (2002) 从炼油厂废水中分离得到苯酚高效降解菌 L68 菌株, 从形态、生理生化以及 16S rDNA 同源性等指标分析鉴定其为 *Burkholderia cepacia* (洋葱柏克霍尔德里氏菌)^[14]。

2.2 研究某一特定环境中微生物的区系组成, 进而了解其种群动态, 研究微生物的多样性

在环境保护研究工作中, 我们需要用细菌的多样性来指示环境污染, 或者是探索环境污染与细菌群落动态变化的关系等, 这些都需要得到环境微生物群落的结构和功能的多样性信息, 其中包括微生物在基因层次上的多样性和在种类组成上的多样性, 也就是要对环境中微生物的群落结构进行多样性分析, 利用微生物的 16S rDNA 信息, 我们可以不经过分离培养微生物, 而直接从环境中提取 DNA, 经过 PCR 扩增后, 通过对 16S rDNA 的序列分析, 而对环境中存在的微生物群落作出分析。

PCR - RFLP、PAPD 等方法也被经常用于对混合环境样品中的微生物的群落结构分析。这些方法的敏感性更高, 可以在群落水平上提供可信的基因型的信息。但对于复杂的微生物群落进行 DNA 分析时, 分辨率过高的方法会使得到的信息量太大, 不利于分析。从目前情况来看, DGGE 或 DNA 复性的方法, 在区

别不同种群的初步调查以及数量上占优势的微生物群落的鉴定中是十分有用的。

用 16S rRNA 对环境样品中的微生物多样性进行分析,可以采取不同的策略,目前采用的主要方法有:

方法一:从环境样品中提取微生物总 DNA,经过 PCR 扩增 16S rRNA 基因后,对扩增产物进行变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 或温度梯度凝胶电泳 (TGGE) 分析,直接观察其多样性;

方法二:提取 DNA 和经 PCR 扩增后,对扩增产物用限制性内切酶进行切割并电泳,然后用标记探针杂交,从而可以进行 RFLP 分析,用以分析微生物 RFLP 的多样性;

方法三:提取微生物总 DNA 后,建立 DNA 文库,用 16S rRNA 基因探针筛选 DNA 文库中的 rDNA 克隆,进行测序和比较,用以揭示微生物序列的多样性;

方法四:从环境样品中分离微生物菌落,对各单菌落分离微生物总 DNA,以 16S rRNA 基因探针进行杂交,用于研究微生物种的多样性。

上述第四种方法仍然需要对微生物进行传统的分离培养,其他几种方法则不必对微生物进行培养分离。事实上,在实际操作中,上述四种方法可根据研究的需要进行调整,从而衍生出分析 16S rRNA 基因多样性的其他方法。无论采取哪种方法,16S rRNA 基因序列水平的多样性为研究环境中微生物的多样性和分析其群落结构提供了全新的方法^[15]。

Murray (1996) 等用 PCR - DGGE 的方法对 San - Francisco 湾和 Tomales 湾的浮游细菌群落组成进行分析,证实正是它们在细菌种群上的差异,导致两个海湾在多环芳烃代谢能力上的差异^[16]。李志刚等 (2001) 对水环境中存在的细菌进行群落结构分析^[17]。戴欣等 (2001, 2002) 对海洋沉积物中的细菌类群分析^[18,19]。黄立南等人 (2002) 采用 16S rRNA - ARDRA 手段,对垃圾填埋场的渗滤液中的古细菌群落进行分析,来了解垃圾填埋场内处于高有机负荷及严格厌氧条件下的古细菌群落的结构及其多样性^[20]。陈灏等 (2002) 对不同土壤中存在的微生物不经培养,将抽提的总 DNA 中的微生物的 16S rDNA V3 序列信息进行 PCR 扩增和 DGGE 等,进行测序和生物学研究后,对农田微生物的分布做了初步研究^[21]。

对于特定的环境污染治理装置中的微生物群落组成多样性,同样可以采用 16S rRNA 基因分析的方法进行研究^[22~24]。

3 16S rRNA 基因技术的发展前景与存在的不足之处

作为一种全新的手段,16S rRNA 基因技术与 PCR、DGGE 等技术结合,其最大的优点是可以不经过分离培养微生物,克服了培养技术的限制,可以对环境样品进行客观的分析,可以得到在原始样品中存在的微生物不同种群的数量和种类分布信息,精确地揭示微生物种类和多样性信息。

随着分子生物学的发展,新的提取和分析手段不断出现,16S rRNA 技术也在不断发展之中。

3.1 结合其他 rDNA 片段的分析

在原核生物中,由于 16S rDNA 序列的高度保守性,对于相近种或同一种内不同菌株之间的鉴别分辨力较差。16S - 23S rDNA 间区 (Intergenic Spacer Region, ISR) 是指位于 16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因之间的间隔区域。与 16S 和 23S rRNA 基因比较,IGS 区域具有更高的变异性,表现出长度和序列上的多态性,没有特定的功能,进化速率比 16S rDNA 大 10 多倍。近年来已逐渐用于微生物种以下水平的鉴定、分类,通过对 PCR 产物的 RFLP 分析,可以达到鉴别菌种的目的,该方法具有快速、简单、准确及重复性好等的优点,成为细菌分类与鉴定的热点^[25,26]。

茅云翔等 (2001) 把 16S rRNA 基因与 16S - 23S rRNA 转录单元内间隔区序列分析应用到节旋藻和螺旋藻分类鉴定中,得到很好的结果^[27]。

3.2 结合其他分子生物学分析手段

将 16S rRNA 基因研究技术与分子生物学的其他技术手段相结合,可以有效地提高检测的精度,简化实验步骤,并且可以克服一些实验中存在的困难,这方面的发展可以说是日新月异。如在 16S rRNA 基因研究中应用荧光定量 PCR 方法,将荧光素直接加入 PCR 反应管中,可以直接探测 PCR 反应过程中荧光信号的变化以获得定量的结果,不需要 PCR 后处理或电泳检测,该方法可以克服 PCR 反应过程中因为污染造成假阳性等弊病^[28,29]。

以荧光标记的 rRNA 靶探针与流式细胞仪结合也可以对混合样品的微生物种群进行自动分析。而采用荧光原位杂交的方法,可以做到对单个微生物细胞进行鉴定,极大地提高检测的灵敏度。

3.3 16S rRNA 基因技术存在的不足之处

作为一种实验技术手段,16S rRNA 基因技术并

不是万能的,它同样存在一些先天不足,特别是当把它应用到环境保护和治理领域中时,我们必须看到它所存在的不足,这些缺点限制了它在环境科学领域中的应用。

目前看来,16S rRNA 基因技术在环境科学领域中的应用,主要受到以下几个方面因素的限制:

(1) 需要较高的代价,16S rRNA 基因技术需要较昂贵的仪器设备和药品配套,对实验人员要求有较好的分子生物学基础,这一点在许多一般的环境治理实验室中可能是无法满足的;

(2) 16S rRNA 基因技术本身在操作过程中,存在一些缺陷,如有可能发生基因丢失的情况,从环境样品中抽提的 DNA 的质量是成功的一个关键步骤,提取效率的低下或样品中其他物质的干扰,都会使实验结果发生偏差。

(3) 16S rRNA 基因技术在环境保护领域中应用所面临的最大的问题是,我们虽然可以获知环境中微生物存在的信息,却无法得到我们所检测的微生物菌株,这为后面在生产实际中应用带来困难,这也是 16S rRNA 基因技术不如传统的微生物分离培养方法的地方。

4 结 语

虽然存在种种不足,但这并不妨碍 16S rRNA 基因技术成为在环境科学领域中成为一种新的十分有用的技术手段,因为它毕竟能够使我们存在环境中存在的微生物信息能够有一个全面而细致的了解。而且随着分子生物学技术的进一步发展,有的问题也是有可能得到解决的,如我们通过 16S rRNA 基因技术了解在环境中存在的某些微生物种类,它们具有一些特殊的功能基因,可以考虑到将该基因分离出来,并克隆到其他微生物中,这样就可以解决我们得不到微生物菌株的问题。

总之,16S rRNA 基因技术的发展方兴未艾,有望在分析环境生物多样性、揭示污染的生物学效应和环境质量评价等环境科学研究领域得到广泛的应用。

参考文献:

- [1] Pace N R, Stahl D A, Lane D J, Olsen G J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequence[J]. *Advanced in Microbial Ecology*, 1986, (9): 1-55.
- [2] Rashidian E Q, Payne G, Ward A G. A Phylogenetic analysis of the *Streptomyces cyaneus* species - group[A]. 11th International Symposium on the Biology of Actinomycetes Abstracts[C]. Heraklion, GRT, 1999. 164.
- [3] 徐平,张利平,余利岩.应用 16S rRNA 基因 V - 2 高变区序列进行链霉菌分子分类[J]. *生物多样性*, 2001, 9(2): 129-137.
- [4] 东秀珠,沈德龙,辛玉华. 16S rDNA 同源性所揭示的双歧杆菌与有关细菌的亲缘关系[J]. *生物多样性*, 2000, 8(2): 146-152.
- [5] 赵庆新,谭远德.利用肠道菌群的分布和 16S DNA 序列研究鲤科肠道菌系统演化关系[J]. *遗传*, 2002, 24(4): 447-454.
- [6] 李颖,白雨,陈文新.沙坡头地区根瘤菌 DNA 同源性及其 16S rDNA 全序列[J]. *微生物学报*, 1999, 39(2): 95-99.
- [7] 汪恩涛,曲春枫,等. 16S rRNA 基因测序确定根瘤菌的系统发育[J]. *高技术通讯*, 1995, 5(11): 55-57.
- [8] 彭桂香,陈文新. 16S rDNA - RFLP 分析新疆快生大豆根瘤菌的分类地位[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(4): 237-241.
- [9] Vaneechoutte M, Roseau R, et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA - restriction analysis (ARDRA) [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, 93(2): 227-234.
- [10] Weidner S, W Arnold, et al. Diversity of Uncultured Microorganisms Associated with the Seagrass *Halophila stipulacea* estimated by Restriction Fragment length Polymorphism Analysis of PCR - Amplified 16S rRNA Genes[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(3): 766-771.
- [11] 刘忠,关少慧,等.应用 ARDRA 技术研究 *Frankia* 菌多样性[J]. *微生物学杂志*, 2001, 21(1): 20-23.
- [12] Greselbrecht A D, Herwig R P, Deming J W, et al. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon - degrading marine bacteria from Puget Sound Sediments [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(9): 3344-3349.
- [13] 陈亚丽,张先恩,刘虹,等.甲基对硫磷降解菌假单胞菌 WBC - 3 的筛选及其降解性能的研究[J]. *微生物学报*, 2002, 42(4): 490-497.
- [14] 刘涛,刘正学,等.苯酚高效降解菌 L68 菌株的分离及分类鉴定[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2002, 37(4): 369-372.
- [15] 杨永华,姚健,分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用[J]. *生物多样性*, 2000, 8(3): 337-342.
- [16] Murray A E, Hollibaugh J T, Orrego O. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(7): 2676-2680.
- [17] 李志刚,杨官品,朱艳红.水环境细菌 16S rDNA 限制性片段长度多型性及群落结构分析[J]. *水生生物学报*, 2001, 25(2): 111-115.
- [18] 戴欣,周惠,蔡创华,等.海洋沉积物中特有细菌类群的初步探讨[J]. *中山大学学报*, 2001, 40(6): 51-54.
- [19] 戴欣,周惠,陈月琴,等.中国南海南沙海区沉积物中细菌类 16S rDNA 多样性的初步研究[J]. *自然科学进展*, 2002, 12(5): 479-484.
- [20] 黄立南,周惠,陈月琴,等.垃圾填埋场渗滤液中古细菌 16S rRNA 基因的 ARDRA 分析[J]. *生态学报*, 2002, 22(7): 1085-1090.
- [21] 陈灏,唐小树,林洁,等.不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究[J]. *微生物学报*, 2002, 42(4): 478-483.
- [22] Gdon J J, Zumstein E, Dabert P, et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small - subunit rDNA sequence analysis[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(7): 2802-2813.

(下转第 16 页)

少塑料的添加剂类 EH 的危害。多食用绿色食品, 尽量少食或不吃罐头食品、方便面, 市场上加工过的半成品食品有的经过漂白、杀菌等处理, 也应尽量少买。不食生海鱼, 尽量不食近海鱼类及鱼的内脏, 防止通过食物链浓缩而积聚在海鱼体内的 EH 进入人体。服装和被褥尽量使用天然纺织产品, 对抗菌纺织品产品要清洗去掉异味再使用。室内装修材料要选用有国家安全标准的绿色环保产品, 不要长时间呆在新装修的房间里。不要私自焚烧垃圾, 特别是塑料和发泡材料, 避免产生二恶英。少用人工合成的激素类药物; 慎用化学合成化妆品。

参考文献:

- [1] 尤力群. 环境激素及其危害[J]. 化学教学, 2000, (8): 22-24.
- [2] 江田汉, 杨晓明, 赖玉平. 环境技术问题浅析[J]. 中国环境管理, 2001, (1): 43-44.
- [3] 孔昌俊. 环境激素对人类健康的影响[J]. 辽宁城乡环境科技, 2000, 20(6): 1-4.
- [4] 王毓秀, 张利民. 化学农药与环境激素[J]. 农村生态环境, 1999, 15(4): 37-41.
- [5] 李京东, 肖素荣. 环境激素—危险的环境污染物[J]. 生物学通报, 2001, 36(9): 17-18.
- [6] 日本环境厅. 环境ホルモン戦略计划[N]. SPEED '98, 1998-05.
- [7] 张虹. 终极杀手—环境激素[J]. 大自然探索, 2000, (1): 41-43.
- [8] 任仁. 环境激素种类和污染途径[J]. 大学化学, 2001, 16(5): 28-32.
- [9] 吴平华. 环境激素浅说[J]. 生物学杂志, 1999, 16(6): 46.
- [10] Munson L, Calzada N, Kennedy S, Sorensen T B. Luteinized ovarian cysts in Mediterranean striped dolphins[J]. Journal of Wildlife Diseases, 1998, 34(3): 656-660.
- [11] Brown R J, Conradi M, Depledge M H. Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) [J]. Science of the Total Environment, 1999, 223: 77-88.
- [12] 夏星辉, 杨居荣, 许嘉琳. 环境激素污染研究进展[J]. 上海环境科学, 2001, 20(2): 56-58.
- [13] Dodson S I, Merritt C M, et al. Low exposure concentration of atrazine increase mail production in *Daphnia pulex* [J]. Environ. Toxicol. Chem., 1999, 18(7): 1568-1573.
- [14] Zou E, Fingerman M. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea [J]. *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Sal., 1997, 38(3): 281-285.
- [15] 赵劲松, 袁星, 于书霞. 环境激素对水蚤的影响[J]. 环境污染与防治, 2001, 23(6): 314-316.
- [16] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatments works [J]. Chem. Ecol., 1994, (8): 275-285.
- [17] Howell W M, Black D A, Bortone S A. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis* hotbrookii, evidence for environmentally induced masculinization [J]. Copeia, 1980, (4): 676-681.
- [18] 赵劲松, 袁星. 环境激素对鱼的影响[J]. 环境科学研究, 2001, 14(3): 12-16.
- [19] 方昌阁, 张才乔, 等. 环境激素生殖毒性作用的研究进展[J]. 国外畜牧科技, 2000, 27(2): 31-34.
- [20] Leatherland J. Endocrine and reproductive function in Great Lakes salmon [A]. Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/ human connection [C]. New Jersey: Princeton Scientific Publishing Co. Inc., 1992. 129-145.
- [21] Tong Zhou, Judith S W, Henry B J A, et al. Thyroidal status of mummichogs (*Fundulus heteroditus*) from a polluted versus a reference habitat [J]. Environ. Toxicol. Chem., 1999, 18: 2817-2823.
- [22] 崔丽英, 肖美丽, 刘仙娜. 环境激素污染与无公害蔬菜[J]. 环境保护, 2001, (7): 43-44.
- [23] 郝明德, 刘晓宏. 环境激素与环境保护型农业[J]. 农业现代化研究, 1999, 20(4): 229-232.
- [24] 香山不二雄. 环境ホルモン问题とはか[J]. 化学同人, 1998, (11): 12-15.
- [25] Wolff MS, Toniolo PG, Lee Ew, et al. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(8): 648-652.

(上接第 4 页)

- [23] Skeiguchi Y, Kamagata Y, Syutsubo K, et al. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis [J]. Microbiol., 1998, 144(9): 2655-2665.
- [24] Wu J H, Liu W T, Tseng I C, et al. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system [J]. Microbiol., 2001, 147(2): 373-382.
- [25] Leblond-Bourget N, Philippe H, Mangin I, Decaris B. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intra-specific *Bifidobacterium* phylogeny [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(1): 208-218.
- [26] 焦振泉, 刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S-23S rDNA 间区 [J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 85-89.
- [27] 茅云翔, 杨官品, 张宝红, 等. 16S rRNA 基因与 16S-23S rRNA 转录单元内间隔区序列分析及其在节旋藻和螺旋藻分类鉴定中的应用 [J]. 高技术通讯, 2001, 11(6): 12-18.
- [28] Hiratsuka M. Rapid detection of CYP2C9 alleles by real time fluorescence PCR based SYBR Green [J]. Mol. Genet. Metab., 1999, 68(3): 357-362.
- [29] 沈永才, 袁佩娜. 16S rRNA 荧光定量 PCR 法检测双歧杆菌 [J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(2): 66-72.