

## 利用 $^{13}\text{C}$ -DNA-SIP 法示踪根际和菌丝际活性解磷细菌

### $^{13}\text{C}$ -DNA-SIP Method for Tracing Rhizosphere and Hyphosphere Phosphate Solubilizing Bacteria

周家超<sup>1</sup>, 冯固<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>资源与环境学院, 中国农业大学, 北京

\*通讯作者邮箱: [fenggu@cau.edu.cn](mailto:fenggu@cau.edu.cn)

**摘要:** 在群落水平上研究微生物参与元素循环的生物化学过程及调控途径, 将为深入理解复杂环境中微生物多样性维持机制和功能多样性提供支撑。自然环境中微生物的生理代谢功能是与其它生物及自然环境长期相互作用的结果。与纯培养体系相比, 土壤环境中微生物具有极其丰富的多样性, 在整体水平上清楚认知复杂环境中微生物群落生理代谢过程的分子机制具有较大难度。就微生物数量而言, 现有技术条件下, 每克土壤最多含有  $10^{10}$  个微生物细胞, 而且 99% 以上的微生物种类目前难以培养。通过传统方式获得的某种特定功能细菌可能无法准确反映环境中微生物分布的真实情况, 也不能预测功能微生物对底物的同化代谢水平。自然界中几乎所有的元素均有 2 种或更多的稳定性同位素。一般而言, 微生物对轻重同位素组成的化合物的利用没有偏好性。 $^{13}\text{CO}_2$  标记植物地上部后, 植物合成含有  $^{13}\text{C}$  的光合作用产物并通过植物的根系和 AM 真菌的根外菌丝释放到土壤中被微生物所利用, 并合成  $^{13}\text{C}$ -DNA, 微生物基因组总 DNA 通过超高速密度梯度离心将  $^{13}\text{C}$ -DNA 与  $^{12}\text{C}$ -DNA 分离后, 进一步采用分子生物学技术分析  $^{13}\text{C}$ -DNA, 揭示复杂的根际和菌丝际环境中利用分泌物的活性微生物的种类和数量。在自然生态系统中同一宿主植物往往被多种 AM 真菌所侵染, 利用分根培养体系可以研究同时侵染在同一植物根系的不同种类 AM 真菌菌丝际的解磷细菌数量和群落组成, 从而揭示根际和定殖在同一宿主植物根系的不同 AM 真菌的菌丝际环境中利用根系和菌丝分泌物的解磷细菌的群落组成和数量。

**关键词:** 同位素示踪, DNA-SIP, 解磷细菌, 分根体系, 菌丝际

### 材料与试剂

1. 各种型号的移液枪和枪头

- 30 2. 2 ml 离心管
- 31 3. PVC 板
- 32 4. 30  $\mu\text{m}$  孔径尼龙膜
- 33 5. 亚克力板
- 34 6. 凡士林
- 35 7. 水管
- 36 8. 温度计
- 37 9. 2 mm, 80  $\mu\text{m}$  和 30  $\mu\text{m}$  孔径筛子
- 38 10. 50 ml 注射器
- 39 11. 橡皮塞 ( $\varnothing=1\text{ cm}$ , 海佳硅橡胶制品有限公司, 浙江, 中国)
- 40 12. 直径 1 mm 玻璃珠
- 41 13. 中速定量滤纸
- 42 14. 1 L 烧杯
- 43 15. 玻璃棒
- 44 16. 8.9 ml 离心管 (Beckman)
- 45 17. 10 ml 注射器及其针头
- 46 18. 土壤 DNA 提取试剂盒 (MP, 美国)
- 47 19. 氯化钙
- 48 20.  $^{13}\text{CO}_2$  和  $^{12}\text{CO}_2$  (tm 99 %, 明尼克科技有限公司, 北京, 中国)
- 49 21. 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$
- 50 22. 三氟乙酸铯 (CsTFA) (GE, Healthcare Limited Compony, The UK)
- 51 23. KCl
- 52 24.  $\text{EDTA-Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 53 25. Tris base
- 54 26. 37 % HCl
- 55 27. q-PCR SYBR Mix (Biomad, 北京, 中国)
- 56 28. 异丙醇
- 57 29. 无水乙醇
- 58 30. ddH<sub>2</sub>O
- 59

## 仪器设备

1. 半导体制冷片
2. 风扇
3. 水泵
4. 散热器
5. CO<sub>2</sub> 同位素检测仪 (Los Gatos Research, 美国)
6. Deltaplusxp 质谱仪 (Thermo Scientific, Bremen, 德国)
7. 元素分析仪 (Flash EA 1112, CE Instruments, Wigan, 英国)
8. Nano drop 核酸蛋白检测仪
9. 折光仪 (Reichert AR2000 Digital Refractometer)
10. 蠕动泵 (master flex C/L)
11. -80 摄氏度冰箱
12. 荧光定量 PCR 仪

## 软件和数据库

1. Greengene 数据库 (<http://greengenes.secondgenome.com/>)

## 实验步骤

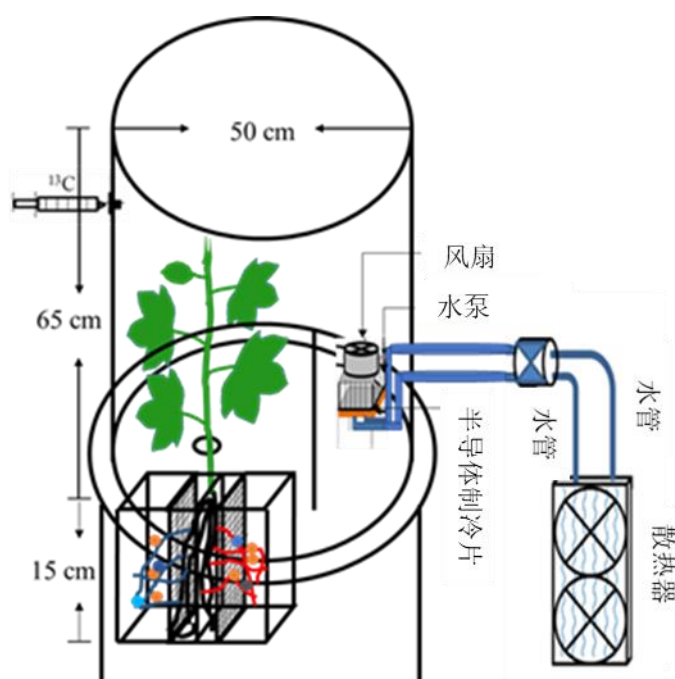
### 一、试验设计

1. 不接种 AM 真菌的对照 NM;
2. 两侧根室分别接种 *Rizophagus intraradices* (*R.i*) 和 *Gigaspora margarita* (*G.m*)。后续试验中会进行 <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 脉冲标记, 用于活性微生物组群落结构和功能的测定。分别进行 <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 标记和 <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> 标记 (对照处理), 每个处理设 3 次重复, 完全随机排列。

### 二、供试装置

为了达到在同一植物根系上接种两种不同 AM 真菌的目的, 试验采用分根培养的根盒。另外, 为了能够得到不受根系影响的菌丝, 我们将根室和菌丝室之间用 30 μm 的尼龙网分隔, 使根系限制在根室中生长, 而 AM 真菌的菌丝可以穿过该尼龙网,

在菌丝室中生长，从菌丝室的土壤中吸收养分。因此，试验装置用 PVC 板制作，包括根室（中间两个）和菌丝室（两侧）两部分（图 1）。收获前一周，对棉花植株进行  $^{13}\text{CO}_2$  同位素脉冲标记，为了防止  $^{13}\text{CO}_2$  本身对土壤  $^{13}\text{C}$  丰度和土壤微生物的影响，使用如图 1 所示的装置将地上部和土壤分离，脉冲标记室中只有地上部。另外为防止温度过高影响植物光合作用，需要添加降温装置，降温装置由半导体制冷片、风扇、水泵及散热器组成，使得标记过程中标记室内的温度不超过  $35^\circ\text{C}$ 。



**图 1. 分根培养系统和二氧化碳同位素脉冲标记装置**

注：培养体系由 4 个分室组成，中间有两个根室，另外两个为菌丝室。每个分室为  $5\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 12\text{ cm}$ ，由 PVC 板组合而成。使用  $30\text{ }\mu\text{m}$  尼龙网将根室和菌丝室隔开，防止根系生长进入菌丝室，但允许菌丝生长到菌丝室中。脉冲标记设备包括支架、标记室和冷却系统。支架高度为  $15\text{ cm}$ ，由透明亚克力板制成。支架中间有一个  $5\text{ cm}$  直径的孔，上端有一个  $5\text{ cm}$  高的水槽。罩子也用透明亚克力板制成，并用水槽中的水密封。冷却系统由半导体、风机、水泵、散热器和两根水管组成。利用散热器用水来交换热量以便于控制温度。

### 三、供试土壤

土壤风干并过筛 ( $2\text{ mm}$ )。此外，土壤的一部分过  $30\text{ }\mu\text{m}$  筛，用于后续菌丝的收集。具体方法为：将土壤放到足量的水中（土：水 = 1:5）充分搅拌后，过  $30\text{ }\mu\text{m}$  筛

子，保留过筛的水土混合物，丢弃掉不能过筛的部分，沉淀后小心倒掉上层水分，剩下的土壤于烘箱中 70 °C 烘干，用粉碎机粉碎待用。另外，将直径 1 mm 的玻璃珠用 1 % 盐酸酸化，然后用去离子水清洗，直到其 pH 值变为中性。土壤和玻璃珠在使用前经过  $\gamma$  射线辐照以杀死土壤中的土著微生物群落 (25 kGy, 60 Co  $\gamma$ -射线，中科院原子能研究所，房山，北京)。辐照后的材料在使用前存放 7 天，使土壤中各元素恢复到稳定状态。

#### 四、土壤原始细菌群落

为保持土壤原始细菌群落的一致性，在移栽过程中要向根室和菌丝室灭菌土壤中分别加入 5 ml 土壤滤液。土壤滤液是通过将 30 g 未经灭菌的新鲜土壤放入 300 ml 无菌水中，搅拌均匀，六层定量滤纸 (Whatman 中速滤纸) 过滤后获得，这样既能允许普通土壤微生物通过，又能有效过滤掉 AM 真菌的孢子和菌丝 (Wang 等，2016)。另外，为了消除菌种本身所携带微生物对根室土壤原始细菌群落的影响，同样需要制备菌种滤液，两种供试菌剂 *R.i* 和 *G.m* 各 30 g，分别放入 300 ml 无菌水中搅拌，六层中速滤纸过滤，得到菌种滤液，移栽过程中，在接种 *R.i* 的根室加入 *G.m* 菌种滤液 5 ml，在接种 *G.m* 的根室加入 *R.i* 菌种滤液 5 ml，不接种真菌的对照处理加入两种 AM 真菌菌种滤液各 5 ml。接种 *R.i* 的根室需要加入 5 ml 土壤滤液，另外还需要加入 5 ml *G.m* 的菌种滤液。接种 *G.m* 的根室需要加入 5 ml 土壤滤液和 5 ml *R.i* 的菌种滤液。对于不接种的对照处理，两个根室需要加入 5 ml 土壤滤液以及两种菌种滤液各 5 ml。

#### 五、种子萌发和育苗

供试植物选用棉花 (*Gossypium herbaceum* L.)，品种为“新陆早 32”。挑选重量一致的棉花种子，将种子用 10 %  $H_2O_2$  表面消毒 10 min，用去离子水彻底清洗 8 次以洗净种子表面  $H_2O_2$ ，然后将种子放在潮湿的滤纸上 (40x20 cm)，26 °C 黑暗中发芽 2 天。然后将种子放在新的潮湿滤纸顶部 5 cm 处，并将胚根朝下。将滤纸卷成圆柱形，并置于水培系统中 (12 h 光照/12 h 黑暗，26 °C) 培养 17 天，以使根系伸长。

## 六、移栽及培养过程

育苗结束后，挑选长势一致，且有 7 条根系的棉花幼苗用于后续的试验。移栽时首先在两侧根室分别加入 580 g 过 2 mm 筛的供试土壤，剪掉棉花幼苗的主根后将侧根平均分配到两侧根室，加入 20 g 相应的 AM 真菌接种剂，约 600 个孢子 (对照处理接种 20 g 灭菌的菌剂)，5 ml 土壤滤液，5 ml 相应的菌种滤液，然后将水补齐到 108 ml 使土壤含水量达到 18 % (约为田间持水量的 70 %)，再将剩余的 100 g 土壤铺到最上层。需要注意的是在接种一种 AM 真菌时，需要严格密封另一侧根室和菌丝室，防止交叉污染。在两侧菌丝室分别加入 600 g 土壤与玻璃珠的混合物 (300 g 过 30  $\mu\text{m}$  筛子的土壤和 300 g 直径 1 mm 的玻璃珠) 以及 5 ml 土壤滤液和 103 ml 的无菌去离子水。试验在中国农业大学资源与环境学院温室中进行。每天上午浇水至含水量的 18 %，每周随机变换根盒位置，7 周后进行  $^{13}\text{CO}_2$  标记。

## 七、 $^{13}\text{CO}_2$ 标记

播种 7 周后，在如图 1 密闭的标记室中进行  $^{13}\text{CO}_2$  (atm> 99 %) 脉冲标记处理并以  $^{12}\text{CO}_2$  (atm> 99 %) 脉冲标记作为对照。标记室 (体积约 127000  $\text{cm}^3$ ) 包含一个透明亚克力罩和一个底部托盘。底部托盘的外缘设置一个水槽用于标记室密封，植物地上部穿过托盘中央的孔进入标记室，并用凡士林密封，以防止标记期间标记室内气体泄漏或环境中  $\text{CO}_2$  的影响。在脉冲标记过程中，植物密封在标记室内，并在其中放置一个风扇，以循环空气。采用半导体散热片、风机、水泵、水管和散热器组合的冷却设备，将标记室温度控制在 35  $^{\circ}\text{C}$  以下 (在 35  $^{\circ}\text{C}$  时棉花的光合作用处于较高水平)。标记时间从 9:00 到 17:00，这是白天光合作用最强的时间段，利于标记气体的同化。每小时使用注射器向标记室内注入 100 ml 气体，并通过二氧化碳同位素检测仪 (Los Gatos Research, 美国) 实时测定标记室内的  $\text{CO}_2$  浓度，每天 16:00 最后一次注入二氧化碳，待标记室内的二氧化碳消耗完后，打开标记室，第二天标记时再重新密封标记室，并检查标记装置是否密封完好。持续标记 7 d。为了避免二氧化碳标记期间植物蒸发产生的蒸汽在标记室内壁形成水珠影响标记装置的透光性，将三袋氯化钙 (每袋 100 g) 放在标记室内。每天在晚上标记结束后，取出氯化钙在 105  $^{\circ}\text{C}$  的烘箱中干燥 2 h 以重复使用。



## 八、样品收获

标记结束后的第二天，拆除标记装置，破坏性取样，地上部分用去离子水洗净，吸水纸擦干，地下部分首先用抖根法收集菌根际土壤，一部分存储于室温用于  $\delta^{13}\text{C}$  的测定，另一部分于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  存储用于测定细菌 16S rDNA 和解磷功能基因的群落多样性。菌丝际基质一部分保存于室温条件下，用于  $\delta^{13}\text{C}$  的测定。另一部分储存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，用于菌丝的收集和 DNA 的提取。具体方法为室温融化后，菌丝室土壤和玻璃珠的混合物用无菌水（ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，30 min 灭菌）经  $30\text{ }\mu\text{m}$  筛网冲洗，过滤掉土壤，菌丝会缠绕在玻璃珠上，然后将菌丝体和玻璃珠混合物全部转移到烧杯中，用玻璃棒搅拌，将漂浮在水面的菌丝挑出并收集到无菌的离心管中待用。通过这种方法，只有紧密地附着在菌丝上的细菌才能留存下来。

## 九、 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定

菌根际土壤和菌丝际土壤  $^{13}\text{C}$  丰度用  $\delta^{13}\text{C}\text{ ‰}$  表征。土壤样品风干，研磨，并过  $80\text{ }\mu\text{m}$  筛。在中国农业大学资源与环境学院稳定同位素实验室，使用 Deltaplusxp 质谱仪 (Thermo Scientific, Bremen, 德国) 和元素分析仪 (Flash EA 1112, CE Instruments, Wigan, 英国) 以连续流动模式测定土壤样品的碳同位素丰度。元素分析仪的燃烧温度为  $1020\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。 $\delta^{13}\text{C}\text{ ‰}$  以 V-PDB (维也纳-佩迪-贝勒姆尼) (Deniro 等, 1978) 为标准计算，方程式如下：

$$\delta^{13}\text{C}\text{ ‰} = (R_{\text{样品}}/R_{\text{标准品}} - 1) \times 1000$$

式中， $\delta^{13}\text{C}$  为样品碳同位素比值，单位为千分之一 (‰)， $R_{\text{样品}}$  和  $R_{\text{标准品}}$  分别为样品和标准品的  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  比值。 $\delta^{13}\text{C}$  测量值的 SD 应该小于  $0.15\text{ ‰}$ 。

## 十、DNA 提取、密度梯度离心及 q-PCR 分析

根据生产商的说明书，使用 FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, CA, 美国) 试剂盒提取  $^{13}\text{CO}_2$  标记和  $^{12}\text{CO}_2$  标记的菌根际土壤和菌丝样品的 DNA，并通过三氟乙酸铯 (CsTFA) 密度梯度离心分离不同密度梯度的 DNA，离心梯度从下到上分成 16 层。具体方法为：

1. 将提取纯化后的 DNA 用 nano-drop 测定其浓度，保证用 Beckman 超速离心

机离心时的 DNA 质量 (3-5 µg):

2. 在已灭菌的 10 ml 离心管中配置混合液: 5 ml 三氟乙酸铯 (CsTFA), DNA 样品和 GB 缓冲液的体积为 3.9 ml, 将混合液混匀;
3. 先用折光仪 (Reichert AR2000 Digital Refractometer) 测定灭菌超纯水的折光率 (nD-TC 模式), 加入约 150 µl 水, 经验数值为  $1.3333 \pm 0.0002$ , 将水吸干, 测定混合液的折光率, 加入混合液约 75 µl, 若超过  $1.3610 \pm 0.0002$  的范围, 则用 CsTFA 或 GB 调整;
4. 将调整好的混合液加入到 8.9 ml 的离心管 (Beckman) 中配平 (无误差);
5. 45400xg, 转子型号为 Ti90, 离心 36-40 h 后关闭离心机, 待转速降为 0 后打开离心机盖, 去除转子轻放于水平实验台上。
6. 将蠕动泵 (master flex C/L) 的流量调节好, 流速调节为 550 µl/30 s, 泵的一端连接灭菌超纯水, 另一端用针头接到离心管上方接近管口处; 在离心管底部扎孔, 打开泵, 开始计时, 底部离心液用 2 ml 离心管接住, 30 s 换一个离心管, 8.9 ml 的离心液大约分成 16 个片段;
7. 用折光仪先测定 ddH<sub>2</sub>O 折光率, 再从低密度到高密度测定各个片段的折光率, 以估算浮力密度, 浮力密度计算公式为:  $y = 384.44060 \cdot x^2 - 1031.00836 \cdot x + 692.65494$ 。其中 y 为浮力密度, x 为折光率 (nD-TC)。
8. 在各个片段中加入 500 µl 异丙醇, 混匀配平, -80 °C 放置 1 h 后以 14000xg, 4 °C 离心 1 h (放置离心管的方向便于抽取溶液); 将上清液转移至新的 2 ml Tube 中, -20 °C 保存 (此步骤是为了防止 DNA 未沉淀好, 可留作再次离心使用); 在有 DNA 沉淀的 2 ml 离心管中加入 150 µl 70 %乙醇, 用移液枪吹打冲壁洗涤, 14000xg, 4 °C 离心 30 min; 弃上清液, 吹干乙醇; 加入 30 µl ddH<sub>2</sub>O 溶解 DNA, 分装后在 -20 °C 保存。

## 十一、定量 PCR 检测

将制备好的标准物与样品 DNA 同时进行定量 PCR 检测。具体步骤为: 首先配制足量的混合液, 每个样品混合液由 12.5 µl Biomed q-PCR SYBR Mix, 1.0 µl BSA, 1.0 µl 引物 (Ba519f/Ba907r), 7.5 µl ddH<sub>2</sub>O 组成。引物序列为: Ba519f (5'-CAGCMGCCGCGGTAA-NWC-3')-Ba907r (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTT -3')<sup>[3]</sup>。



每个样品及标准物均准备 3 个技术平行。另外为了保证混合液足够，多准备 5 个样品的混合液。然后将混合液离心混匀后，向定量 PCR 板的每个孔中准确加入 23  $\mu\text{l}$  的混合液，然后再加入 2  $\mu\text{l}$  的标准物或样品 DNA。封膜后放入定量 PCR 仪 q-Tower (Jena, 德国) 中检测，反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  下预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 从第二步开始循环 40 次，每次循环后检测荧光，收集溶解曲线。以标准物拷贝数的 Log 值及 Ct 值绘制标准曲线，并根据标曲计算每个样品中的 DNA 拷贝数<sup>[4]</sup>。密度梯度离心后 DNA 拷贝数在不同分层的分布如图 2 所示。

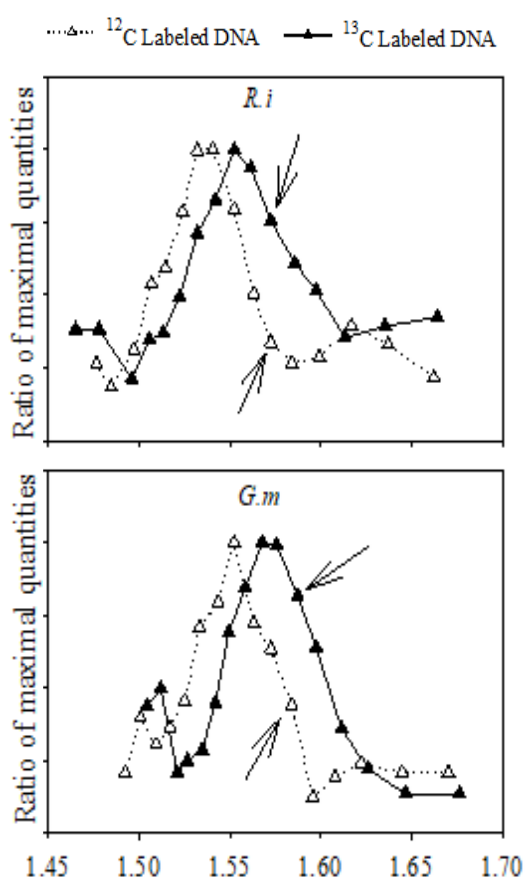


图 2. 密度梯度离心后 *R.i* 和 *G.m* 菌丝际 DNA 在不同浮力密度分层中的分布

## 十二、高通量测序

根据密度梯度离心后每一层 q-PCR 结果，每个处理挑选浮力密度约为 1.58 的那一层 DNA 样品进行高通量测序，将 DNA 样品送往生物技术公司，利用 Illumina MiSeq PE-300 平台，进行 16S rDNA V3-V4 区测序和解磷功能基因（以编码碱性磷酸酶 *alp* 的基因 *phoD* 为例）的测序，所用引物为 338f (5'-

ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806r (5'-GGACTACHVGGTWTCTAAT-3')<sup>[5]</sup>; *phoD*-F733 (5'-TGGGAYGATCAYGARGT-3') 和 *phoD*-R1083 (5'-CTGSGCSAKSACRTTCCA-3')<sup>[6]</sup>。得到测序原始数据后, 用 QIIME (v1.8.0) 对所得数据进行分析。简而言之, 根据 Barcode 序列区分样品序号, 剔除掉低质量的序列, 用 FLASH 软件合并两端序列。去除嵌合体后, 按照 97 % 的标准划分可操作分类单元 (OTUs), 使用 UCLUST 默认参数从每个 OTU 中选择一个代表性序列<sup>[7]</sup>。根据 Greengene 数据库对所选取的代表性序列进行 BLAST 分类, 匹配度最高的即为该 OTU 所属的分类群<sup>[8]</sup>。

### 十三、解磷功能基因片段拷贝数分析

根据密度梯度离心后每一层 q-PCR 结果, 每个处理挑选浮力密度约为 1.58 的那一层 DNA 样品进行功能基因拷贝数定量 PCR 检测, 以编码碱性磷酸酶 *alp* 的 *phoD* 基因为例: 定量 PCR 体系和程序同步步骤 11, 引物为 *phoD*-F733 (5'-TGGGAYGATCAYGARGT-3')- *phoD*-R1083 (5'-CTGSGCSAKSACRTTCCA-3')<sup>[6]</sup>。

### 溶液配方

#### 1. GB 缓冲液配方:

配 1L GB 所需: KCl: 7.455 g, EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 0.372 g, Tris base: 12.114 g, 37 % HCl: 2.43 ml

## 致谢

该方法是在王菲 (河南科技学院, 副教授)和石宁(山东省农业科学院, 助理研究员) 两位老师的博士论文基础上改进的, 在此一并感谢。同时, 本工作受到了国家自然科学基金联合基金重点支持项目“灰漠土磷养分高效利用相关的生物肥力性状演变过程及培育机制” (U1703232) 的资助。

## 参考文献

1. Wang, F., Shi, N., Jiang, R. F., Zhang, F. S., Feng, G. (2016). [In situ stable isotope probing of phosphate-solubilizing bacteria in the hyphosphere](#). *J Exp Bot.* 67(6): 1689-1701.
2. Deniro, M. J., Epstein, S. (1978). [Carbon isotopic evidence for different feeding patterns in two hyrax species occupying the same habitat](#). *Science*. 201: 906-908.
3. Stubner, S. (2002). [Enumeration of 16S rDNA of Desulfotomaculum lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection](#). *J Microbiol Methods*. 50: 155-164.
4. Tellmann, G. (2008). [The E-Method: a highly accurate technique for gene-expression analysis](#). *Nat Methods*. 3:1–2.
5. Xu, N., Tan, G., Wang, H., Gai, X. P. (2016). [Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure](#). *Eur J Soil Bio.* 74: 1-8.
6. Sato, K., Suyama, Y., Saito, M., Sugawara, K. (2005). [A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis](#). *Grassl Sci.* 51: 179-181.
7. Edgar, R.C. (2010). [Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST](#). *Bioinformatic.* 26: 2460-2461.
8. DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. (2006). [Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB](#). *Appl*

303      *Environ Microbiol.* 72:5069-5072.

304