

稳定同位素探针技术在有机污染物生物降解中的应用

宋孟珂¹ 江龙飞^{1,2} 王琰¹ 罗春玲^{1*} 张干¹

(1. 中国科学院广州地球化学研究所 广东 广州 510640)

(2. 南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095)

摘要: 稳定同位素探针技术(Stable isotope probing, SIP)是稳定同位素标记技术和各种分子生物学手段相结合的一系列技术总称。将其应用于探查污染物降解的功能微生物,实现了不经过分离培养直接把微生物的代谢功能、微生物间相互作用与微生物种群结合起来,从而克服了传统分离培养的缺陷,扩大了微生物资源的利用空间,具有广阔的发展前景。本文介绍了稳定同位素探针技术的基本原理和技术路线,对常规 PLFA-SIP、DNA-SIP、RNA-SIP 的特点进行了阐述和对比;综述了 SIP 在有机污染物——苯系物、多环芳烃、多氯联苯生物降解方面的研究进展,提出 SIP 应用于根际研究是今后该技术在生物降解研究中的一个发展方向。

关键词: 稳定同位素探针技术, 苯系物, 多环芳烃, 多氯联苯, 生物降解

Application of stable isotope probing in biodegradation of organic pollutants

SONG Meng-Ke¹ JIANG Long-Fei^{1,2} WANG Yan¹ LUO Chun-Ling^{1*} ZHANG Gan¹

(1. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

(2. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Stable isotope probing (SIP) is a series of techniques by combining stable isotope labeling with molecular methods. SIP links microbial function and interactions with identity without isolated culture, which avoids the drawback of pure culture and extends the available boundary of microbial resources. The application of SIP to identify functional microorganisms in organic pollutant biodegradation has a bright prospect. This review introduces the fundamental principal and procedure of SIP, the characteristic of PLFA-SIP, DNA-SIP and RNA-SIP, and the application of SIP in biodegrading organic pollutants (Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene (BTEX); Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); Polychlorinated biphenyls (PCBs)). Future prospect of SIP in rhizospheric biodegradation is also presented.

Keywords: SIP, BTEX, PAHs, PCBs, Biodegradation

芳香烃及其衍生物类污染物是环境中广泛存在的致癌、致畸毒性,对人类健康和生态环境安全构成很大威胁。多氯联苯(PCBs)、多环芳烃(PAHs)在的一类有机污染物,由于其生物富集率高及潜在

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金项目(No. U1133004); 国家自然科学基金面上项目(No. 41173082)

*通讯作者: Tel: 86-20-85290290; Fax: 86-20-85290706; ✉: cluo@gig.ac.cn

收稿日期: 2013-05-11; 接受日期: 2013-09-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

和苯系物(BTEX: 苯、甲苯、二甲苯、乙苯)作为普遍存在于各种环境介质(如大气、水体、土壤、沉积物和生物体)中的芳香族类有机污染物,种类繁多,难降解且与人类生活息息相关,从而成为众多学者研究的对象。PAHs 是一类含有两个或两个以上苯环化合物的统称,通常来源于化石燃料、植被和其他有机物的不完全燃烧。美国环保局和欧盟已经将 PAHs 列为优先控制的持久性有机污染物^[1]。多氯联苯(PCBs)又称氯化联苯,是另一类优先控制的持久性有机污染物。PCBs 是一类人工合成有机氯化物,具有高度的化学稳定性和难降解性,能在大气中长距离迁移,易于在生物体内富集并通过食物链传递^[2]。环境中 PCBs 主要来源于其生产和使用过程以及含 PCBs 废弃物的不恰当处理、处置。苯系物(简称 BTEX),主要来源于原油或石油产品以及制药、塑料和纤维合成等化工行业。相对于汽油中的其他组分,BTEX 具有更强的挥发性和溶解性,在生产、储存和运输过程中,容易进入大气、水体、土壤等环境介质。减少环境中这类污染物的含量十分必要。生物降解由于成本低、环境友好等特点而备受青睐。生物降解主要指环境中的微生物以污染物为碳源和能源,进行自身新陈代谢并合成生命物质,从而达到降解污染物的目的。将微生物的种类和特定的功能联系起来,将有助于了解影响功能微生物发挥作用的因子,对功能微生物进行针对性调控,使其生物降解作用得以最大发挥。

传统研究 PAHs、PCBs、BTEX 生物降解的方法主要依靠分离培养技术,迄今报道的降解菌株整体而言数量相对较少、降解效果也不太理想,很大程度上是由传统分离培养技术本身的缺陷所致:其一,实验室可培养的微生物数量相对较少,只占微生物总数的 0.1%–1.0%;其二,PAHs、PCBs、BTEX 生物降解经加氧、开环等多个步骤,各个步骤可能涉及多种微生物的协同作用。分离所得的菌株可能只是对目标污染物有较强的耐受性,或者只是参与了降解过程中的某个步骤,所以单独用作降解实验

时,降解效率不一定高。从这个意义上讲,将微生物群落作为一个功能单位来研究显得十分必要。

随着分子生物学技术如多聚酶链式反应(PCR)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)、荧光原位杂交技术(FISH)等方法在微生物生态学中的广泛应用,近年发展起来的稳定同位素探针技术(SIP)将稳定同位素标记技术和分子生物学手段相结合,改变了传统研究微生物个体和群落的方法,实现了直接把微生物间相互作用及其代谢功能与微生物种群结合起来的。不经过分离培养便可了解在复杂环境如土壤中,是哪些微生物参与了有机污染物的降解,以及微生物间复杂的相互作用是如何影响有机污染物生物降解过程的,成为探索有机污染物降解功能微生物的强有力手段^[3-4]。本文将简要介绍 SIP 的基本原理和技术路线,综述 SIP 和其他分子生物学手段相结合在 PAHs、PCBs 和 BTEX 生物降解研究中的应用状况,展望 SIP 在有机污染物生物降解研究中的发展方向。

1 SIP 概述

稳定同位素探针技术通过向环境样品中添加同位素标记的目标化合物,随后运用分子生物学手段对能够提供生物分类学信息并被稳定同位素标记的生物标志物进行分析,确定环境样品中的功能微生物。该技术可以追踪稳定同位素在微生物群体和个体之间的流动,将微生物群落和功能联系起来。1998 年, Boschker 等^[5]首次用稳定同位素探测技术分析同位素标记的生物标志物 PLFA,鉴别出河流底泥中对温室气体甲烷有氧化作用的微生物。2000 年, Radajewski 等^[3]以 $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ 为目标化合物,以 ^{13}C 标记的 DNA 为生物标志物分析土壤中能够代谢甲醇的功能微生物,并首次提出 SIP 一词,此时 SIP 特指 DNA-SIP。2002 年, Manefield 等^[6]首次证明同位素标记的 RNA 可以作为示踪物用于研究土壤中碳循环。SIP 起初被提出时只特指 DNA-SIP,随着研究的不断深入,SIP 的概念逐渐发展为囊括 PLFA、DNA、RNA 为生物标志物的

稳定同位素探测技术。最初该技术主要用来研究单碳化合物的代谢,现已涉及到丙酸盐、甲苯、菲等多碳脂肪烃,单环和多环芳香族化合物^[7]。

SIP 技术是一系列技术的总称,包括稳定性同位素富集基质的选择、合适生物标志物的选择、环境样品的标记、被标记生物标志物的提取分离和纯化检测等^[8]。如图 1 所示,基本的技术路线包括:首先将原位或微宇宙的环境样品暴露于含有稳定同位素标记的污染物基质中培养;随后样品中利用标记底物的微生物在生长繁殖过程中同化合成含有标记元素的生物标志物如核酸(DNA 和 RNA)及磷脂脂肪酸(PLFA)等;最后通过对生物标志物进行提取、纯化、分离、鉴定以及对比分析,鉴别环境

样品中对特定生态过程进行驱动的功能微生物^[9-10]。根据生物标志物的不同,SIP 技术可以分为 PLFA-SIP、DNA-SIP 和 RNA-SIP 三大类^[11]。三种方法各有优缺点,在具体的操作方法、所用仪器、分析方法等方面存在诸多不同。

1.1 PLFA-SIP

在鉴定微生物种类、微生物群落结构和多样性方面 PLFA-SIP 是一种相对成熟的技术。在 PLFA-SIP 中,环境样品暴露于同位素标记基质中,一段时间后,样品中总 PLFA 被提取,进行 PLFA 图谱分析,确定样品中微生物的种类和群落结构,然后用气相色谱-燃烧-同位素比值质谱仪(GC-c-IRMS)进行同位素丰度分析,鉴别出功能微

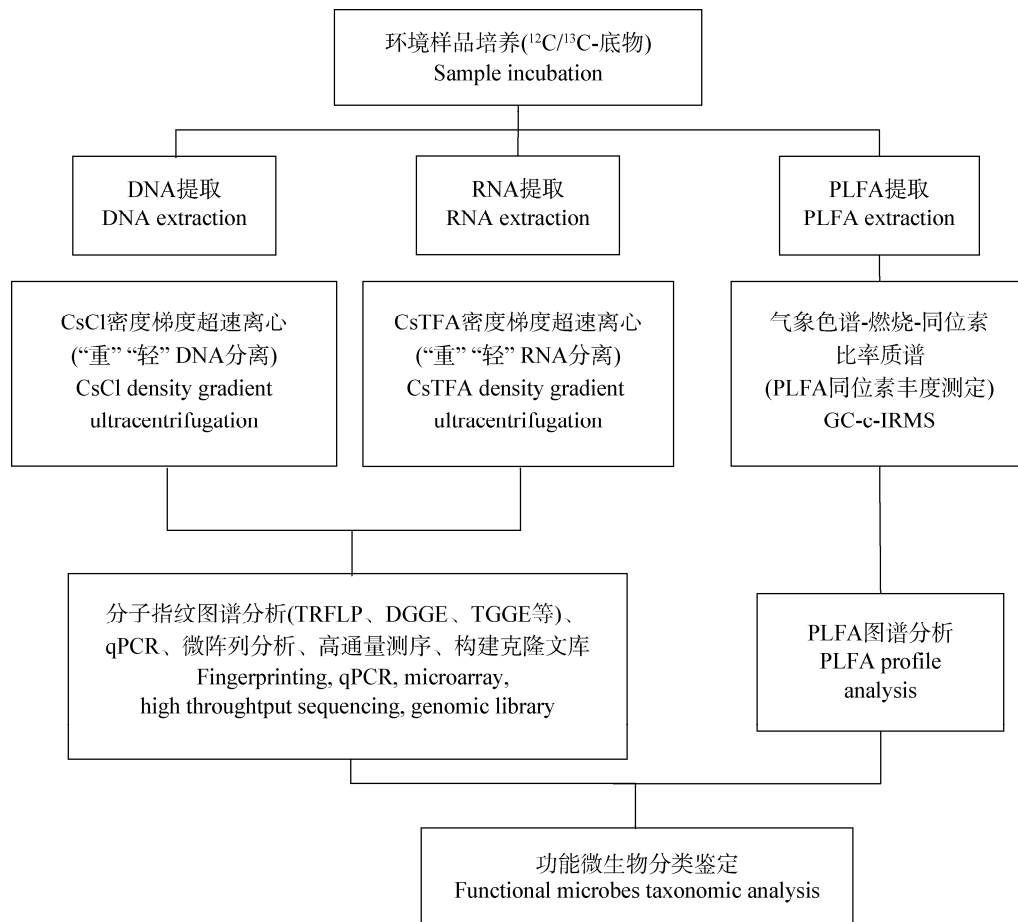


图 1 SIP 技术路线图
Figure 1 Schematic approach of SIP

生物。而在核酸-SIP (DNA/RNA-SIP)中,环境样品中总核酸被提取出后需进行密度梯度离心,同位素标记的重核酸和未标记的轻核酸被分离后才能进行下游分析,因此 PLFA-SIP 可以减少操作过程中样品的损失。GC-c-IRMS 对 ^{13}C 同位素丰度的分辨率可达到千分之一,即使很小的 ^{13}C 含量的差别也可以通过此方法分辨开^[12]。较少的操作步骤、GC-c-IRMS 的高分辨率赋予了 PLFA-SIP 高度敏感性的优点。因此,在进行 PLFA-SIP 过程中,环境样品中只需加入少量标记基质,或者样品中功能微生物只需吸收少量标记基质就可以满足分析要求,而不用考虑核酸 SIP 中经常遇到的两个重要问题:富集偏差和由于样品中天然存在的 ^{12}C 化合物对目标基质的稀释而影响“重”、“轻”核酸分离及重核酸(同位素标记的核酸)回收。然而,PLFA-SIP 也有两个重要的缺陷:(1) PLFA 特异性不高。不同种类的微生物可以合成相同的 PLFA,并且同一种微生物在不同的环境条件中产生的 PLFA 也可能不同;(2) 对于缺乏 PLFA 图谱的微生物无法获知其具体的微生物种类。PLFA-SIP 需要通过对实验所得 PLFA 图谱和已知微生物 PLFA 图谱进行比对,确定微生物种类。因而对于缺乏标准图谱的微生物,无法得知其分类的种群信息。基于 PLFA-SIP 以上特点,该技术较适用于环境样品中功能微生物数目少,生长速率低、只能同化吸收少量标记基质的情况,如:山地土壤微生物对大气中甲烷的利用、细胞数目较少,导致碳吸收利用率低的水体环境中微生物群落的研究^[12]。

1.2 DNA-SIP

在核酸稳定同位素探针实验中,将环境样品暴露于同位素标记基质中培养一段时间后,提取总 DNA 或者 RNA,随后在氯化铯溶液(DNA)或者三氟乙酸铯(RNA)中进行密度梯度离心。由于含有 ^{13}C 核酸的浮力密度比普通核酸的浮力密度大,经过密度梯度离心后,重轻核酸因浮力密度不同分布在不同层中而被分离开, ^{13}C 标记的核酸将在重层中浓缩。离心后,收集不同浮力密度的 DNA 或者

RNA,用 16S rDNA 或者 rRNA 的通用引物进行 PCR 或者反转录 PCR (RT-PCR)对分离出的核酸进行扩增,并对扩增产物进行分子指纹图谱分析。

DNA-SIP 最大的吸引力在于可以从环境样品中回收功能微生物的同位素标记片段,从而使对 DNA 下游的一系列分析成为可能。同时,由于 DNA 含有丰富的信息,通过 DNA-SIP 可以获得更多、更准确的关于样品中功能微生物生物分类学和功能基因等方面的信息。在 DNA-SIP 中如何获得足够用于满足密度梯度离心的同位素标记 DNA,以保证分离成功是极为关键的一个问题。由于实验所提供的环境不一定是样品中功能微生物生存的最佳条件,因此会影响功能微生物的繁殖和细胞分裂,从而使合成的 DNA 减少,不能达到成功密度梯度分离同位素标记 DNA 的要求。对此,通常有以下几个解决办法:(1) 增加同位素标记底物的浓度。如:利用全标记的 ^{13}C 化合物作为基质加入培养环境样品。如果标记化合物为环境样品中微生物的唯一碳源,细胞每分裂一次 DNA 中含 ^{13}C 的部分会增加 50%,细胞分裂的次数越多,DNA 中 ^{13}C 所占的比例越大,密度梯度离心分离重轻 DNA 的可能性也越大。但是此种方法会产生一种副作用——富集偏差,即不能反映自然状态下目标污染物的代谢途径。研究表明,SIP 实验中,环境样品中 ^{13}C 的浓度为 $50\text{ }\mu\text{mol/g}$ (土壤或沉积物) $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ (水溶液)就可以将同位素标记 DNA 从背景中分离出来^[13]。(2) 延长 SIP 实验的培养时间。延长培养时间虽然可以增加 DNA 中 ^{13}C 的含量,但是有可能出现交叉喂食的情况。(3) 向 CsCl 梯度溶液中加入合成或者天然 ^{13}C 载体 DNA (酵母菌或者古菌),增加 ^{13}C 标记 DNA 检测的灵敏度。Callagher 等^[14]通过向 CsCl 梯度溶液中加入 ^{13}C 载体古菌 DNA,在较短的时间内检测到了 ^{13}C 标记的目的基因。

1.3 RNA-SIP

虽然 DNA-SIP 比 PLFA-SIP 有更高的分辨率,但是在离心后重 DNA 的成功分离很大程度上依赖于同位素在 DNA 中的富集程度。例如:DNA 中

必需含有 15%–20% 的 ^{13}C 才能通过浮力密度差别被分开^[3]。由于 DNA 的合成同微生物的繁殖和细胞的分裂相关联,在较短的时间内不能够获得符合要求的同位素标记 DNA。在 RNA-SIP 中, RNA 可以独立于细胞分裂而进行复制,因此可以在较短的时间内灵敏的反映环境样品中功能微生物对同位素标记基质的利用状况,从而克服在 DNA-SIP 中同位素富集不足的问题。2002 年 Manefield 等^[6]首次证实了 RNA-SIP 在探查苯酚(Phenol)降解功能微生物方面的应用。Manefield 等^[6]从 ^{13}C -Phenol 培养的环境样品中分离出 DNA 和 RNA,发现 ^{13}C -RNA 合成的速度比 ^{13}C -DNA 快十倍,并且 ^{13}C -RNA 的合成与 ^{13}C -Phenol 降解关系密切。自 RNA-SIP 被发现以来,已经被成功的应用于技术上更有挑战性的土壤环境以及植物-微生物联合作用的研究中^[15-16]。尽管 RNA-SIP 对环境样品中基质被同位素标记的程度以及浓度要求没有 DNA-SIP 高,研究结果更接近原位状况,但是 RNA 在环境中存在的条件比较苛刻,其较短的半衰期和较低的含量限制了 RNA-SIP 的实际应用。DNA-SIP 和 RNA-SIP 联合应用可以相得益彰,在探查环境中功能微生物方面具有很大的潜力。

2 稳定同位素探针技术在有机污染物生物降解研究中的应用

最初, SIP 更多的应用于甲基营养菌的研究。甲基营养菌以单碳化合物为唯一碳源,可以避免生物体吸收同化的 ^{13}C 被环境样品中的 ^{12}C 所稀释,用 SIP 研究甲基营养菌具有很大优势。随着分子生物技术的出现并日益成熟, SIP 被越来越多的应用于多碳化合物的研究,特别是有机污染物如 PAHs、PCBs、BTEX 等的生物降解。

2.1 稳定同位素探针技术在 BTEX 生物降解中的应用

BTEX 属于单环芳香烃类化合物,生物降解相对容易,关于 SIP 用于此方面的报道较多(见表 1)。

2.1.1 好氧生物降解: 在有氧条件下,好氧降解菌对 BTEX 的降解速率较快,且能将污染物彻底转

化为二氧化碳和水。因此,运用稳定同位素探针技术探查 BTEX 的好氧降解微生物对于修复土壤和地下水中长期滞留的 BTEX 具有重要意义。1999 年, Hanson 等^[17]对加入 ^{13}C -甲苯的农田土进行研究。应用 GC-c-IRMS 法对提取出的 PLFA 进行分析, PLFA 图谱结果显示在提取出的 59 种 PLFA 中只有 16 种 PLFA 被 ^{13}C 标记,并且 ^{13}C 标记 PLFA 的种类和通过纯培养分离得到的甲苯降解菌的 PLFA 种类相同。Hanson 等^[17]用同样的土壤以相同的方法对其中的葡萄糖降解菌进行研究,发现土壤中 90% 的 PLFA 都被 ^{13}C 标记,说明利用 PLFA-SIP 探查复杂环境中特定化合物的降解代谢是可行的。最近,陆续有学者应用 DNA-SIP 技术研究环境中 BTEX 降解菌。Xie^[18-19]、Luo^[20]、Sun^[21]等通过 T-RFLP 查明同位素标记的目标片段,并对其构建克隆文库,鉴定出了土壤中苯、甲苯、二甲苯降解菌。Luo 等^[20]首次报道了来自 TM7 门的细菌直接参与了土壤中甲苯的降解。Xie 等^[19]的实验结果证实通过分离培养得到的降解菌不一定是环境中真正起作用的苯降解菌。RNA-SIP 也被 Aburto 等用于研究 BTEX 污染地下水中的苯降解微生物。结果表明,在好氧条件下, 60%–70% 的苯很快被降解。对 DGGE 主要条带进行测序分析,发现嗜酸菌属(*Acidovorax*)和 *Malikia* 属是降解苯的主要参与者^[22]。

2.1.2 厌氧生物降解: 虽然 BTEX 的好氧降解速率较快,但在水体及底泥中,由于氧气有限,对 BTEX 的生物降解起作用的主要是厌氧微生物。石油烃类(PHC)污染水体和底泥中含有较多的 BTEX 污染物,成为研究厌氧苯系物降解菌的热点。Pelz 等^[23]分别用 PLFA-SIP 和 16S rRNA 定向基因探针技术研究厌氧脱氮条件下 PHC 污染水体和底泥中甲苯降解菌的存在状况。两种方法所得结果一致,表明内生固氮菌 *Azoarus* 是主要的甲苯降解菌。Pelz 等^[24]又用相同的方法探查 PHC 污染水体和底泥中硫酸还原条件下类似脱硫杆菌属(*Desulfobacter*)可以同化代谢 ^{13}C 标记的甲苯。将

表 1 SIP 在 BTEX 生物降解中的应用						
Table 1 The application of SIP in BTEX biodegradation						
厌氧/好氧 Anaerobic/ Aerobic	化合物 Compound	电子受体 Electron acceptor	环境介质 Media	生物标志物 Biomarker	研究方法 Method	降解菌 Functional bacteria
好氧 Aerobic	甲苯	O ₂	玉米地农田土 ^[20]	DNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	TM7
		O ₂	休耕农田土 ^[17]	PLFA	GC-c-IRMS	—
		O ₂	BTEX 污染土壤 ^[21]	DNA	qPCR、T-RFLP、克隆 文库 16S rRNA 测序	<i>Polaromonas</i>
	苯	O ₂	汽油污染土壤、农田土 ^[19]	DNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Polaromonas</i> 、 <i>Acidobacterium</i> 、TM7、 <i>Sphingomonadaceae</i>
		O ₂	BTEX 污染水体 ^[22]	RNA	DGGE、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Acidovorax</i> 、 <i>Malikia</i>
	二甲苯	O ₂	汽油污染土壤 ^[18]	DNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Proteobacteriaor</i> 、 Bacilli
厌氧 Anaerobic	甲苯	SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	苯、甲苯污染水体 ^[25]	PLFA	GC-c-IRMS	—
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	焦油污染水体底泥 ^[30]	DNA	qPCR、焦磷酸测序	<i>Desulfobulbaceae</i>
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	BTEX 污染水体 ^[27]	PLFA	GC-c-IRMS	—
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	BTEX 污染水体底泥 ^[28]	RNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Deltaproteobacteria</i>
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	汽油污染土壤、农田土、 活性污泥 ^[29]	DNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序, qPCR	<i>Desulfobulbaceae</i> 、 <i>Desulfosporosinu</i> 、 <i>Syntrophobacteraceae</i>
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	焦油污染水体底泥 ^[30]	DNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Clostridia</i>
		NO ₃ ⁻ (硝酸 还原)	PHC 污染水体底泥 ^[23]	PLFA	GC-c-IRMS	<i>Azoarus</i>
		NO ₃ ⁻ (硝酸 还原)	汽油污染土壤、农田土、 活性污泥 ^[29]	DNA	qPCR、T-RFLP、克隆 文库 16S rRNA 测序	<i>Comamonadaceae</i> 、 <i>Thauera</i>
	苯	Fe ³⁺ (铁还原)	焦油污染水体底泥 ^[36]	DNA	qPCR、焦磷酸测序	<i>Betaproteobacteria</i>
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	BTEX 污染水体 ^[26]	PLFA	GC-c-IRMS	—
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	苯污染土壤 ^[31]	DNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Peptococcaceae</i> 、 <i>Epsilonproteobacteria</i>
		SO ₄ ²⁻ (硫酸 还原)	Guaymas 盆地底泥 ^[33]	DNA	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Deltaproteobacteria</i>
		NO ₃ ⁻ (硝酸 还原)	厌氧汽油污染水体 ^[34]	DNA、RNA	DGGE、克隆文库 16S rRNA 测序	<i>β-Proteobacteria</i>
		Fe ³⁺ (铁还原)	BTEX 污染土壤 ^[37]	PLFA、DNA	GC-C-IRMS、T-RFLP、 克隆文库 16S rRNA 测序	<i>Peptococcaceae</i>
		有机污染物中 间代谢产物 (产甲烷条件)	莲花土壤 ^[32]	DNA	qPCR、DGGE、克隆 文库 16S rRNA 测序	<i>Deltaproteobacteria</i>

一些生物装置和稳定同位素标记化合物结合,应用于探查水体中特定功能微生物,不仅可以简化操作,并且可以提高研究的准确性。Geyer 等^[25]用 ^{13}C 标记的甲苯和苯修正过的生物捕获装置对原位水体中的活性微生物进行分析,通过对总脂肪酸中 ^{13}C 丰度和被同位素标记 PLFA 图谱分析,得出水体中土著微生物能降解和转化两种化合物,并且降解苯和甲苯的活性物种存在较大差别。随后,有研究也运用 PLFA-SIP 证明原位环境中存在能够利用 ^{13}C 标记甲苯和苯的微生物^[26-27]。但是由于 PLFA 的分辨率不高,在很多情况下不能鉴别出环境中的活性微生物,更多的学者应用核酸 SIP 技术对污染物的降解菌进行研究。最近, Bombach、Sun、Winderl 分别对多种厌氧条件下甲苯降解菌进行探究,发现硫酸还原条件下主要的降解菌来自互营杆菌科(Syntrophobacteraceae)和 Desulfobulbaceae 科;硝酸还原条件下主要的降解菌来自陶厄氏菌属(*Thauera*) 和 丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)^[28-30]。迄今为止,有 7 篇文献报道应用核酸 SIP 技术鉴定出厌氧条件下能够转化苯的细菌,包括甲烷条件下的 δ 变形菌纲(δ -Proteobacteria)^[31-32],硫酸还原条件下的冻球菌属(*Peptococcaceae*)和 ϵ 变形菌纲(ϵ -Proteobacteria)及脱卤杆菌科(Desulfobacteraceae)^[31,33],硝酸还原条件下的 β 变形菌纲(β -Proteobacteria)^[34-35]以及铁还原条件下的 *Thermincola*^[34,36-37]。

2.2 稳定同位素探针技术在 PAHs 生物降解中的应用

由于 PAHs 在土壤和沉积物中广泛分布,许多能够以 PAHs 为唯一碳源的微生物已经被成功分离^[38]。表 2 列出了 SIP 在探查 PAHs 生物降解功能菌方面的应用状况。

2.2.1 萘: 萘是分子量最小的 PAHs,由于其结构简单、水溶性较高、容易从自然界分离获得其降解菌株等原因,常被用作 PAHs 生物降解的模式化合物。许多学者运用稳定同位素探针技术对不同环境中萘功能降解菌进行了研究。2003 年,Jeon 等^[39-40]

用 ^{13}C -萘作为基质在原地条件下对污染水体底泥中的萘降解微生物进行探查。通过回收 ^{13}C -DNA、PCR 扩增、构建克隆文库并进行 16S rRNA 基因测序,鉴别出样品中一种新型萘降解菌,并发现此种细菌含有众多萘降解菌存在的萘双加氧酶基因^[39-40]。最近, Gutierrez 等^[41]以海湾中的海藻花为研究对象,首次证实以全标记萘为基质运用 DNA-SIP 技术可以从海水中鉴定出萘降解菌。Padmanabhan 等^[42]应用 DNA-SIP 对原位沙土中葡萄糖、咖啡因、萘和苯酚进行研究,成功分离出 29 个完整的相关降解菌基因序列,其中 3 种为萘降解菌。

随着分子生物学的发展,新技术不断涌现并和 SIP 联合应用。Chang 和 Kung^[43]将 DNA-SIP 和 Real-time-T-RFLP 结合建立了一种探查微生物群落结构和功能的新技术 Q-FAST,该技术综合 q-PCR、T-RFLP、DNA-SIP 于一体,兼备定性定量测定微生物群落中活性微生物的功能。Chang 和 Kung 成功应用该技术从实验土壤中鉴定出 8 种萘降解细菌,同时给出各种功能细菌在总萘活性降解菌中所占比例^[43]。SIP 结合宏基因组技术直接将同位素标记基质的生物代谢和作用微生物联系起来,该方法可以提高功能微生物的检测率,在对环境中功能微生物的探查方面,比传统的以测序为基础的宏基因组学更有优势^[13]。Wang 等运用 SIP,宏基因组和一种基因传感器(BGT)研究萘污染水体中萘降解菌和降解基因,通过对 SIP 回收的 ^{13}C -DNA 的宏基因组测序,发现 *Acidovorax* 是主要的功能微生物,同时发现和证实了一种与萘生物降解相关的新功能基因簇^[44]。目前 DNA-SIP 试验中总 DNA 的提取一般是采用商业化试剂,但有时 DNA 的提取效果不佳。Jone 等^[45]利用经过改进的商用 DNA 提取方法增加了 DNA 的提取量,而对功能微生物的种类没有影响。

2.2.2 菲: 菲分子结构中含有 3 个苯环,是具有 PAHs 典型结构特征——K 区域和湾结构的最小结构单元,因此也常被用作 PAHs 生物降解的模型化合

表 2 SIP 在 PAHs 生物降解中的应用 Table 2 The application of SIP in PAHs biodegradation				
化合物 Compound	环境介质 Media	研究方法 Method	生物标志物 Biomarker	降解菌 Functional bacteria
萘 Naphthalene	农田土 ^[42]	克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	<i>Pseudomonas</i> 、 <i>Acinetobacter</i> 、 <i>Variovorax</i>
萘 Naphthalene	污染水体底泥 ^[49]	克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	β -Proteobacteria
萘 Naphthalene	PAH 污染水体 ^[44]	宏基因组、基因传感器	DNA	<i>Acidovorax</i>
萘、菲 Naphthalene、 Phenanthrene	处理 PAH 污染土壤生物反应器 污泥 ^[53]	DGGE、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	<i>Pseudomonas</i> (萘)、 <i>Ralstonia</i> (萘)、 <i>Acidovorax</i> (菲)
萘 Naphthalene	土壤 ^[43]	Real-time-T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	<i>Pseudomonas putida</i> G7
菲、芘 Phenanthrene、 Pyrene	处理 PAH 污染土壤生物反应器 污泥 ^[52]	DGGE、qPCR、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	<i>Mycobacterium</i> <i>vanbaalenii</i> 、 <i>Mycobacterium</i> 、 <i>Acidovorax</i>
蒽 Anthracene	底泥 ^[49]	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	β -Proteobacteria
萘 Naphthalene	土壤 ^[45]	DGGE、qPCR、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	Sphingomonadales、 <i>Pigmentiphaga</i>
菲 Phenanthrene	老化 PAH 污染土壤 ^[47]	TTGE、Real-time-PCR、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	<i>Pseudoxanthomonas</i> 、 <i>Microbacterium</i> 、 <i>Arthrobacter</i> 、 <i>Pseudomonas</i>
萘、菲、芘、蒽 蒽、苯并[a]蒽 Naphthalene、 Phenanthrene、 Pyrene、 Fluoranthene、 Benzo [a] anthracene	PAH 污染土壤 ^[55]	qPCR、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	γ -Proteobacteria (蒽)
菲 Phenanthrene	污染土壤 ^[48]	qPCR、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	<i>Acidovorax</i> 、 <i>Rhodoferrax</i> 、 <i>Hydrogenophag</i> 、 <i>Rhodocyclaceae</i>
芘 Pyrene	处理 PAH 污染土壤生物反应器 污泥 ^[54]	qPCR、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	Betaproteobacteria
萘、菲 Naphthalene、 Phenanthrene	海藻花 ^[41]	克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	Rhodobacteraceae
	农田土、公路边腐殖质富集肥沃 土、重金属和烃类复合污染土 ^[46]	GC-c-IRMS	PLFA	<i>Sphingomonas</i>

物。Johnsen 等^[46]对 4 种土壤进行原位试验，根据实验所得 PLFA 图谱找出了土壤中能够代谢菲的细菌。根系分泌物能够改变土壤的性质，从而对土壤中有机污染物的微生物降解产生重要影响。2011 年，Cebon 等^[47]通过向老化 PAHs 污染土壤中添加根系分泌物研究其对菲降解菌的影响。TGGE、q-PCR 结果显示，根系分泌物可以增加土壤中细菌

多样性，同时提高 PAH-RHD α 基因的含量^[47]。进行 SIP 实验时，环境样品中同位素标记基质的浓度对微生物群落产生的影响也受到一些研究者的关注。Martin 等^[48]用 DNA-SIP 技术研究了 ¹³C-菲的初始浓度对样品中微生物的影响。q-PCR 及 16S rRNA 克隆文库分析表明，在 14 d 的培养时间内，¹³C-菲初始浓度高的样品中降解菌的数量变化

较大^[48]。

2.2.3 蒽、芘及混合污染物: 随着 SIP 技术的日益成熟及对 PAHs 认识的增加,人们开始对结构更为复杂的 PAHs 进行研究并探讨共代谢物对生物降解的影响,以及不同污染物功能降解菌之间的联系。2011 年,Zhang 等^[49]应用 DNA-SIP 从污染水体底泥中鉴定出 3 种蒽降解菌。由于自然环境中多种 PAHs 往往共存,因此很有必要对污染环境多种 PAHs 的降解功能菌同时进行探究。Singleton 课题组对处理 PAHs 污染土壤的生物反应器中的多种 PAHs 降解微生物以及相关基因进行了较为系统的研究。发现水杨酸作为萘的中间代谢产物及共代谢的激发物,某些情况下可以引导菲的共代谢。Singleton 等^[50]证实该反应器中降解水杨酸和萘的细菌相同,而与菲降解菌不同。¹³C-水杨酸以不同方式加入,可对生物反应器中微生物的种类和¹⁴C-PAHs 矿化效率产生不同影响。水杨酸一次性加入可使属于 β 变形菌纲(β-Proteobacteria)的罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)得到富集,同时增加萘的矿化速度。水杨酸多次加入状况下,萘、菲、苯并芘的矿化速率没有变化^[51]。在同位素标定的菲、芘单独和混合加入的体系中,应用 DGGE 和 qPCR 技术进一步了解了功能微生物代谢底物的特异性,同时对其代谢调控因子进行优化,为功能菌的高效利用以及分离培养提供了依据^[52]。为了更加深入认识这些降解微生物,2009 年,Singleton 课题组从生物反应器中富集培养萘降解菌嗜酸菌属(*Acidovorax*),并发现了位于该降解菌拟核上的菲降解基因簇^[53]。Singleton 等在生物反应器中鉴定出芘降解菌^[54]后又富集培养得到了芘降解菌,并鉴定得到 6 种 RHD 基因,将 6 种基因在大肠杆菌中表达并检测了其 2-5 环多环芳烃的降解能力^[55]。

2.3 稳定同位素探针技术在 PCBs 生物降解中的应用

PCBs 是环境中广泛分布的一类污染物,现已分离出几种能够在联苯或植物分泌物存在时共代谢 PCBs 的微生物^[56-58]。据报道一些好氧细菌对联苯和 PCBs 的降解途径相同,并且联苯降解基因(*bph* 基因)控制表达的酶能够催化代谢 PCBs,虽然 *bph* 基因表达产生的酶活性对 PCBs 同系物的选择性不同,但是这些不同好氧细菌中的功能基因具有高度的一致性,因此有学者通过研究 PCBs 污染土壤中能够代谢联苯的细菌来寻找可能的 PCBs 降解菌,相关研究见表 3^[59-60]。(氯代)联苯首先被 *bph* 操纵子控制表达的酶转化为(氯代)苯酸盐和五碳的

表 3 SIP 在 PCBs 生物降解中的应用 Table 3 The application of SIP in PCBs biodegradation				
化合物 Compound	环境介质 Media	研究方法 Method	生物标志物 Biomarker	降解菌 Functional bacteria
联苯 Biphenyl	PCBs 污染土壤、 山葵根际土壤 ^[2]	T-RFLP、克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	<i>Hydrogenophaga</i> (根际)、 <i>Paenibacillus</i>
联苯 Biphenyl	PCBs 污染土壤松树根际 ^[63]	Geochip、宏基因组	DNA	<i>Pseudonocardia</i> 、 <i>Kribella</i> 、 <i>Nocardioides</i> 、 <i>Sphingomonas</i>
联苯 Biphenyl	PCBs 污染河流底泥 ^[64]	qPCR、宏基因组	DNA	<i>Achromobacter</i> 、 <i>Pseudomonas</i>
联苯 Biphenyl	潮汐海滩底泥 ^[65]	焦磷酸测序、 克隆文库 16S rRNA 测序	DNA	Betaproteobacteria、 <i>Bacilli</i>
联苯 Biphenyl	PCBs、芳香烃污染土壤 ^[62]	克隆文库 16S rRNA 测序、 宏基因组	DNA	Proteobacteria
2,2'-二氯联苯 2,2'-Dichlorobiphenyl	PCBs 污染物处理生物膜 ^[61]	GC-c-IRMS	PLFA	<i>Burkholderias</i>

磷脂脂肪酸,后者被进一步代谢为乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环,(氯代)苯酸盐被转化为儿茶酚从而继续被降解。对 PCBs 的研究主要集中在降解联苯微生物的分离、PCBs 的降解途径、联苯双加氧酶对 PCBs 氧化作用等方面,将 SIP 应用于 PCBs 土著微生物的研究历史较短。

最初 PLFA-SIP 以及 DNA-SIP 被应用于探查 PCBs 降解菌的研究。Tillmann 等^[61]应用 PLFA-SIP 和 ^{13}C 全标记二氯联苯研究处理 PCBs 污染物生物膜中的 PCBs 降解功能菌,通过分析比对 ^{13}C 标记 PLFA 图谱发现,能够同化吸收二氯联苯的细菌为伯克氏菌属(*Burkholderia*),而不是该体系中数量最多的甲基杆菌属(*Methylobacterium*)微生物。已被证实根际分泌物会对环境中的 PCBs 降解微生物产生影响,Uhlik 等^[2]运用 DNA-SIP 技术对 PCBs 污染土壤及山葵根际的微生物进行研究,探查到其中能够代谢 ^{13}C 标记联苯的微生物,16S rRNA 和 T-RFLP 结果表明,PCBs 污染土壤和山葵根际土壤中 ^{13}C 标记联苯降解菌种类不同。由于环境中多种污染物复合污染的情况较为普遍,这些污染点中的降解菌可能具有降解多种有机污染物的功能。Uhlik 等^[62]运用 DNA-SIP 技术对受 PCBs 和芳香烃复合污染土壤进行研究,发现土壤中的联苯降解菌或者苯甲酸盐降解菌同样能够代谢萘。

基于宏基因组自身的优势,将 SIP 和宏基因组联合已经越来越多的被应用于污染物降解功能微生物的研究。2006 年,Leigh 等^[63]首次将 DNA-SIP 和 Geochip 技术相结合,对生长在 PCBs 污染土壤的松树根际微生物进行研究。16S rRNA 测序表明,75 种不同属的细菌对 ^{13}C -联苯有降解功能,但是并没有发现通过纯培养分离得到的联苯降解菌红球菌属(*Rhodococcus*)。 ^{13}C 标记 DNA 的 Geochip 数据发现了 27 种相关的降解基因,包括一种新型 ARHD 基因^[63]。Sul 等^[64]以 ^{13}C 标记联苯为基质,采用 DNA-SIP 和宏基因组相结合的手段,探索 PCBs 污染河流底泥中的功能基因,从中发掘了 PCBs 降解菌并得到一种新型联苯双加氧酶基因

(*bphAE*),充分证明以 DNA-SIP 为基础的宏基因组技术在回收 PCBs 功能基因方面的作用。

最近,新出现的分子生物学技术——焦磷酸测序被应用于 PCBs 功能微生物的研究。Lee 等^[65]将基因定向的焦磷酸测序和以 ^{13}C 标记联苯为基质的 DNA-SIP 结合,从高盐分、硫酸盐丰富的潮汐泥滩底泥中鉴定出 PCB 降解菌及 ARHD 基因。 ^{13}C 标记 DNA 的 16S rRNA 序列表明主要的功能菌来源于变形菌纲(Betaproteobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)和一些未分类的细菌。

3 展望

SIP 技术由于其独特的优势,在过去十几年中得到了快速发展,显著拓展了微生物生态学研究领域。目前该技术联合其他分子生物学技术已成功应用于 BTEX、PAHs、PCBs 等有机污染物的降解研究,发掘了许多相关功能微生物和一些功能基因方面的信息,促进了有机污染物生物修复的生物资源利用和生物降解机理研究^[44,63-64]。当然,SIP 在有机污染物降解研究中也有一定的局限性,主要表现在:(1)可以利用的同位素标记底物相对有限;(2)同位素标记底物的成本相对较高;(3)对于并非以同位素标记底物为单一碳源或者不优先利用该底物的功能微生物,探查难度较大。另外,传统分离培养技术可以充分认识微生物的生理和遗传等方面的特征,对于 SIP 探查到的降解菌最终得以实际应用,具有不可替代的作用。

mRNA-SIP 拥有 DNA-SIP 和 rRNA-SIP 的优点,将 mRNA-SIP 用于有机污染物的生物降解,不但能找出降解功能微生物,还能探查出在降解过程中被表达的基因,有助于对降解机理进行深入研究。SIP 与宏基因组学结合可以将微生物的特性与其特殊新陈代谢联系在一起,不仅可以从宏基因组库里检测到低含量的微生物,显著改进基因探测的成功率,而且可以加速对新的酶类和其他生物活性物质的发现,降低寻找新酶类的花费。mRNA-SIP 以及 SIP 和宏基因组结合应用于有机污染物降解研究是今后一重要发展方向。

植物根际是土壤有机污染物降解最为旺盛的区域, 对有机污染物在自然界的消减有重要作用, 是今后有机污染物降解的重点研究领域。SIP 与各种分子生态技术结合用于根际功能微生物的探究具有广阔的应用前景。已被证实根系分泌的酶类如多酚氧化酶、脱氢酶等能降解 PAHs^[66-67], 根系分泌的某些碳水化合物对 PAHs 具有共代谢作用^[68]。Cebren 等^[47]应用 DNA-SIP 研究植物根系分泌物对老化 PAHs 污染土壤中菲降解菌的影响, 发现根系分泌物可以提高土壤细菌多样性和 PAH-RHD α 含量。此外, 根际周围的微生物通常是非根际的几十到几千倍, 很多有机物高效降解菌株是由植物根际分离所得的。在根际, 有机污染物的降解通常是多种微生物的联合作用^[69-70]。SIP 可以探查到根际环境中植物、细菌、真菌以及土壤动物在污染物降解中的综合作用^[15,71-72], 对揭示根际环境功能微生物群落和污染物降解机理有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Samanta SK, Singh OV, Jain RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(6): 243-248.
- [2] Uhlik O, Jecna K, Mackova M, et al. Biphenyl-metabolizing bacteria in the rhizosphere of horseradish and bulk soil contaminated by polychlorinated biphenyls as revealed by stable isotope probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(20): 6471-6477.
- [3] Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology[J]. *Nature*, 2000, 403(6770): 646-649.
- [4] Radajewski S, McDonald IR, Murrell JC. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(3): 296-302.
- [5] Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, et al. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers[J]. *Nature*, 1998, 392(6678): 801-805.
- [6] Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, et al. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5367-5373.
- [7] Lueders T, Pommerenke B, Friedrich MW. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5778-5786.
- [8] 葛源, 贺纪正, 郑袁明, 等. 稳定性同位素探测技术在微生物生态学研究中的应用[J]. *生态学报*, 2006, 26(5): 1574-1582.
- [9] Dumont MG, Neufeld JD, Murrell JC. Isotopes as tool's for microbial ecologists-editorial overview[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(1): 57-58.
- [10] 贾仲君. 稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 原理与应用[J]. *微生物学报*, 2011, 51(12): 1585-1594.
- [11] Neufeld JD, Chen Y, Dumont MG, et al. Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1526-1535.
- [12] Boschker HTS, Middelburg JJ. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 40(2): 85-95.
- [13] Chen Y, Murrell JC. When metagenomics meets stable-isotope probing: progress and perspectives[J]. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(4): 157-163.
- [14] Gallagher E, McGuinness L, Phelps C, et al. ¹³C-carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5192-5196.
- [15] Lueders T, Wagner B, Claus P, et al. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 60-72.
- [16] Manefield M, Whiteley AS, Bailey MJ. What can stable isotope probing do for bioremediation?[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2004, 54(2/3): 163-166.
- [17] Hanson JR, Macalady JL, Harris D, et al. Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5403-5408.
- [18] Xie S, Sun W, Luo C, et al. Stable isotope probing identifies novel m-xylene degraders in soil microcosms from contaminated and uncontaminated sites[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2010, 212(1/4): 113-122.
- [19] Xie S, Sun W, Luo C, et al. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing[J]. *Biodegradation*, 2011, 22(1): 71-81.
- [20] Luo C, Xie S, Sun W, et al. Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the candidate phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(13): 4644-4647.
- [21] Sun W, Xie S, Luo C, et al. Direct link between toluene degradation in contaminated-site microcosms and a *Polaromonas* strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3): 956-959.
- [22] Aburto A, Ball AS. Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in a BTEX-impacted aquifer[J].

- Revista Internacional de Contaminacion Ambiental, 2009, 25(3): 147-156.
- [23] Pelz O, Chatzinotas A, Zarda-Hess A, et al. Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using ^{13}C -incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 38(2/3): 123-131.
- [24] Pelz O, Chatzinotas A, Andersen N, et al. Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations[J]. Archives of Microbiology, 2001, 175(4): 270-281.
- [25] Geyer R, Peacock AD, Miltner A, et al. *In situ* assessment of biodegradation potential using biotrap amended with ^{13}C -labeled benzene or toluene[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(13): 4983-4989.
- [26] Stelzer N, Büning C, Pfeifer F, et al. *In situ* microcosms to evaluate natural attenuation potentials in contaminated aquifers[J]. Organic Geochemistry, 2006, 37(10): 1394-1410.
- [27] Kästner M, Fischer A, Nijenhuis I, et al. Assessment of microbial *in situ* activity in contaminated aquifers[J]. Engineering in Life Sciences, 2006, 6(3): 234-251.
- [28] Bombach P, Chatzinotas A, Neu TR, et al. Enrichment and characterization of a sulfate-reducing toluene-degrading microbial consortium by combining *in situ* microcosms and stable isotope probing techniques[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 71(2): 237-246.
- [29] Sun W, Cupples AM. Diversity of five anaerobic toluene-degrading microbial communities investigated using stable isotope probing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 972-980.
- [30] Winderl C, Penning H, Netzer F, et al. DNA-SIP identifies sulfate-reducing *Clostridia* as important toluene degraders in tar-oil-contaminated aquifer sediment[J]. The ISME Journal, 2010, 4(10): 1314-1325.
- [31] Herrmann S, Kleinstaub S, Chatzinotas A, et al. Functional characterization of an anaerobic benzene-degrading enrichment culture by DNA stable isotope probing[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(2): 401-411.
- [32] Sakai N, Kurisu F, Yagi O, et al. Identification of putative benzene-degrading bacteria in methanogenic enrichment cultures[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(6): 501-507.
- [33] Oka AR, Phelps CD, McGuinness LM, et al. Identification of critical members in a sulfidogenic benzene-degrading consortium by DNA stable isotope probing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(20): 6476-6480.
- [34] Kasai Y, Takahata Y, Manefield M, et al. RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3586-3592.
- [35] Liou JS, Derito CM, Madsen EL. Field-based and laboratory stable isotope probing surveys of the identities of both aerobic and anaerobic benzene-metabolizing microorganisms in freshwater sediment[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(8): 1964-1977.
- [36] Pilloni G, von Netzer F, Engel M, et al. Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 78(1): 165-175.
- [37] Kunapuli U, Lueders T, Meckenstock RU. The use of stable isotope probing to identify key iron-reducing microorganisms involved in anaerobic benzene degradation[J]. The ISME Journal, 2007, 1(7): 643-653.
- [38] Rezek J, in der Wiesche C, Mackova M, et al. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil[J]. Chemosphere, 2008, 70(9): 1603-1608.
- [39] Jeon CO, Park W, Padmanabhan P, et al. Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for *in situ* biodegradation in contaminated sediment[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(23): 13591-13596.
- [40] Jeon CO, Park W, Ghiorse WC, et al. *Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 93-97.
- [41] Gutierrez T, Singleton DR, Aitken MD, et al. Stable isotope probing of an algal bloom to identify uncultivated members of the rhodobacteraceae associated with low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21): 7856-7860.
- [42] Padmanabhan P, Padmanabhan S, DeRito C, et al. Respiration of ^{13}C -labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ^{13}C -labeled soil DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1614-1622.
- [43] Yu CP, Chu KH. A quantitative assay for linking microbial community function and structure of a naphthalene-degrading microbial consortium[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(24): 9611-9619.
- [44] Wang Y, Chen Y, Zhou Q, et al. A culture-independent approach to unravel uncultured bacteria and functional genes in a complex microbial community[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47530.
- [45] Jones MD, Singleton DR, Sun W, et al. Multiple DNA extractions coupled with stable isotope probing of anthracene degrading bacteria in contaminated soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 2984-2991.
- [46] Johnsen AR, Winding A, Karlson U, et al. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ^{13}C -labeled cell lipids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6106-6113.
- [47] Cebron A, Louvel B, Faure P, et al. Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(3): 722-736.
- [48] Martin F, Torelli S, Le Paslier D, et al. Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene[J].

- Environmental Pollution, 2012, 162: 345-353.
- [49] Zhang S, Wan R, Wang Q, et al. Identification of anthracene degraders in leachate-contaminated aquifer using stable isotope probing[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2011, 65(8): 1224-1228.
- [50] Singleton DR, Powell SN, Sangaiah R, et al. Stable isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1202-1209.
- [51] Powell SN, Singleton DR, Aitken MD. Effects of enrichment with salicylate on bacterial selection and PAH mineralization in a microbial community from a bioreactor treating contaminated soil[J]. Environmental Science and Technology, 2008, 42(11): 4099-4105.
- [52] Singleton DR, Hunt M, Powell SN, et al. Stable isotope probing with multiple growth substrates to determine substrate specificity of uncultivated bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(1): 180-187.
- [53] Singleton DR, Ramirez LG, Aitken MD. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene degrading *Acidovorax* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2613-2620.
- [54] Singleton DR, Sangaiah R, Gold A, et al. Identification and quantification of uncultivated proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(10): 1736-1745.
- [55] Singleton DR, Hu J, Aitken MD. Heterologous expression of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes from a novel pyrene-degrading betaproteobacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(10): 3552-3559.
- [56] Gilbert ES, Crowley DE. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(5): 1933-1938.
- [57] Kalinowski T, Halden RU. Can stress enhance phytoremediation of polychlorinated biphenyls?[J]. Environmental Engineering Science, 2012, 29(12): 1047-1052.
- [58] Crowley DE, Park JW, Yi H. Detection and quantification of bacterial dioxygenase genes responsible for biodegradation of PCBs and PAHs in the plant rhizosphere[J]. International Journal of Phytoremediation, 2004, 6(2): 187-187.
- [59] Vezina J, Barriault D, Sylvestre M. Diversity of the C-terminal portion of the biphenyl dioxygenase large subunit[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008, 15(2/3): 139-151.
- [60] Villaceros M, Whelan C, Mackova M, et al. Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2687-2694.
- [61] Tillmann S, Strompl C, Timmis KN, et al. Stable isotope probing reveals the dominant role of *Burkholderia* species in aerobic degradation of PCBs[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 52(2): 207-217.
- [62] Uhlik O, Wald J, Strejcek M, et al. Identification of bacteria utilizing biphenyl, benzoate, and naphthalene in long-term contaminated soil[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40653.
- [63] Leigh MB, Pellizari VH, Uhlik O, et al. Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs)[J]. The ISME Journal, 2007, 1(2): 134-148.
- [64] Sul WJ, Park J, Quensen JF 3rd, et al. DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(17): 5501-5506.
- [65] Lee TK, Lee J, Sul WJ, et al. Novel biphenyl-oxidizing bacteria and dioxygenase genes from a Korean tidal mudflat[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3888-3891.
- [66] Ding K, Luo Y. Remediation of phenanthrene contaminated soil by growing *Lolium multiflorum lam*[J]. Soils, 2002, 34(4): 233-236.
- [67] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 黑麦草对菲污染土壤修复的初步研究[J]. 土壤, 2002(4): 233-236.
- [68] Rentz JA, Alvarez PJJ, Schnoor JL. Benzo[a]pyrene cometabolism in the presence of plant root extracts and exudates: implications for phytoremediation[J]. Environmental Pollution, 2005, 136(3): 477-484.
- [69] Boonchan S, Britz ML, Stanley GA. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1007-1019.
- [70] Xu C, Xia B. Research progress in rhizoremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil[J]. Ecology and Environment, 2007, 16(1): 216-222.
- [71] Rangel-Castro JI, Killham K, Ostle N, et al. Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(6): 828-838.
- [72] Prosser JI, Rangel-Castro JI, Killham K. Studying plant-microbe interactions using stable isotope technologies[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(1): 98-102.