

微生物非培养技术在环境污染控制领域的应用

马放^{1,2}, 蔡蕊^{1,2}, 李昂^{1,2}, 崔迪^{1,2}, 王继华³, 庞长淦^{1,2}, 邱天^{1,2}, 杨基先^{1,2}

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨; 2. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨; 3. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 150025 哈尔滨)

摘要: 微生物非培养技术, 如 DNA 指纹技术、焦磷酸测序、分子杂交技术、宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学、代谢组学等的飞跃发展和广泛应用, 有助于快速、准确地鉴定自然界或人工生境中微生物种群, 为揭示生物修复过程中微生物群落结构、功能及修复机理提供了重要方法, 提高了生物修复技术的检测效能。主要介绍分子生物学及“组学”等微生物非培养技术在解析污染区域中微生物群落结构、功能及动力学等方面的应用。

关键词: 生物修复; 宏基因组学; 宏蛋白质组学; 代谢组学

中图分类号: X703.1

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2012)08-0031-08

Application of microbial culture-independent technology in environment contamination control

MA Fang^{1,2}, CAI Rui^{1,2}, LI Ang^{1,2}, CUI Di^{1,2}, WANG Ji-hua³, PANG Chang-long^{1,2}, QIU Tian^{1,2}, YANG Ji-xian^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;
2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;
3. School of Life Science and Technology, Harbin Normal University, 150025 Harbin, China)

Abstract: Microbial culture-independent technology, such as DNA fingerprinting technology, pyrosequencing, molecular hybridization technology, metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics, metabolomics and so on, has developed rapidly and been applied extensively in many fields, which could assist in the identification of microbial species from natural or anthropogenic environment rapidly and accurately. The microbial culture-independent technology has provided crucial in-sights for revealing microbial community structures, functions and remediation mechanism during bioremediation process and improving the detection efficiency of bioremediation. This review is mainly focused on the advanced applications of molecular biology and microbial culture-independent technology of “-omics” in gauging microbial community structures, functions and dynamics at contaminated areas.

Key words: bioremediation; metagenomics; metatranscriptomics; metabolomics

复杂多变的自然环境造就了微生物的多样性, 包括代谢多样性、结构多样性、行为多样性、生态多样性和进化多样性等。传统的纯培养技术对不同生境微生物的可培养性较低, 99% 以上的微

生物的多样性由于不可培养而丢失^[1], 因此, 纯培养技术的局限性成为了研究微生物多样性的瓶颈。微生物非培养技术, 避开了纯培养的微生物分离方法, 即运用分子生物学手段从 DNA 水平上研究未培养微生物的多样性及微生物群落动态变化、相对丰度及分布, 检测微生物群落对人为干扰的承载能力^[2]。微生物非培养技术包括 DNA 指纹技术、分子杂交、生物芯片、基因组学以及宏基因组学、宏转录组学等“组学”技术, 这些技术已经应用到非培养微生物的生理特性及群落组成、结

收稿日期: 2011-12-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51108120; 51178139); 第46批中国博士后科学基金资助项目(20090460901); 第4批中国博士后科学基金特别资助项目(201104430).

作者简介: 马放(1963—), 男, 教授, 博士生导师.

通信作者: 李昂, li_ang1980@yahoo.com.cn;

王继华, wanghua333@sohu.com.

构变化研究,对污染区域的环境样品进行基因组测序,开发新的菌种、功能基因以及微生物资源等各个领域中.

生物修复技术主要是利用一种或多种微生物特有的分解有毒有害物质的能力,去除受污染环境 中 异 生 型 化 合 物 或 人 工 合 成 的 化 合 物,使 其 浓 度 降 低 或 完 全 无 害 化. 在 利 用 生 物 修 复 技 术 治 理 污 染 区 域 的 过 程 中,土 著 微 生 物 及 生 物 强 化 后 的 微 生 物 群 落 结 构、功 能、代 谢 及 动 力 学 等 是 影 响 生 物 修 复 效 能 的 主 要 因 素. 微 生 物 非 培 养 技 术 的 发 展 为 揭 示 生 物 修 复 区 域 中 微 生 物 群 落 结 构 及 功 能 提 供 了 强 有 力 的 工 具,本 文 主 要 介 绍 微 生 物 非 培 养 技 术 在 环 境 污 染 控 制 领 域 的 研 究 进 展.

1 环境样品中 DNA、RNA 和蛋白质的提取方法

1.1 环境样品中 DNA、RNA 的提取

提取 DNA、RNA 遵循的原则是首先保证核酸一级结构的完整性,其次要将蛋白质、糖类、脂类含量降低到最低程度并排除腐殖酸、富里酸和大量与 DNA、RNA 共沉淀的其他有机污染物、重金

属及化学杂质对分子多样性分析产生的干扰. 提取的 DNA 和 RNA 的产量及纯度主要取决于存在的杂质类型、样品来源和提取过程中使用的试剂. 传统的 DNA 提取方法见表 1. 从环境样品中直接提取 RNA 的方法与提取 DNA 的方法相似, RNA 的稳定性较差,易被 RNA 酶(RNase)切割水解,提取时需十分小心,实验用品也要进行严格的消毒灭菌,预防 RNase 污染. 目前常用的 RNA 提取方法见表 2. 市售的 FastDNA 和 FastRNA 试剂盒、FastPrep、UltraClean™等工具也广泛应用于 DNA、RNA 的提取.

1.2 环境样品中蛋白质的提取

根据不同原理,蛋白质的提取主要分为两类:一是利用不同组分分配率的差别进行提取,如结晶、有机溶剂提取、盐析和层析等方法;二是将混合物置于单一物相中,通过物理作用将不同组分分离,如超速离心、电泳、超滤等. 蛋白质易失活,在提纯过程中要注意温度、酸碱缓冲条件、水的纯度、洗涤剂等因素对蛋白质的影响. 常用的蛋白质分离方法见表 3.

表 1 传统的 DNA 提取方法

方法	优缺点
氯仿提取法	易操作,稳定可靠,污染蛋白 <2%,操作较麻烦
苯酚提取法	A 脱蛋白效果比氯酚提取法好,提取 DNA 较多,转化活性高,污染蛋白 <2%
苯酚氯仿混合柱层析法	脱蛋白效果最好,DNA 纯度高,具有氯仿提取法、苯酚提取法的优点
羚基磷灰石柱层析法	快速,只需 3 h,污染蛋白和 RNA <1%,适用少量样品 DNA 的提取
琼脂糖 4B 柱层析法	快速,省力,经济,适宜用氯仿提取法不易获得 DNA 的菌株
氯化铯(CsCl)密度梯度离心法	简单可靠,避免了有机溶剂的作用,但因国内 CsCl 试剂昂贵,很少使用
碱提取法	多用于分离质粒 DNA 和大肠埃希氏菌
十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取法	适宜植物细胞和某些革兰氏阴性菌

表 2 常用的 RNA 提取方法

方法	原理
TRIzol 提取法	提取总 RNA, RNA 由异丙醇沉淀分层来还原,样品量从几十毫克至几克,能够保持 RNA 的完整性
苯酚提取法	核酸溶于水相,被苯酚变性的蛋白溶于酚相而分离,但是分层不彻底,部分 RNA 易丢失
异硫氰酸胍-酚法	GIT 与 β-巯基乙醇共同作用抑制 RNase 的活性,GIT 与十二烷基肌氨酸钠(Sarcosyl)作用使蛋白质变性,从而释放 RNA,提取的 RNA 纯度高、完整性好,较适合纯化 mRNA、逆转录及构建 cDNA 文库
TRIzol LS 提取法	用于血清、血液、细胞培养液中病毒 RNA 的提取,由异丙醇沉淀分层,焦磷酸二乙酯(DEPC)使蛋白质变性,RNase 失活

表 3 常用的蛋白质分离方法

分类	方法	原理
根据蛋白质带 电性质不同	离子交换 层析法	使用阴(阳)离子交换剂,当被分离的蛋白质溶液流经离子交换层析柱时,离子交换剂吸附与其带相反电荷的蛋白质,通过改变 pH 值或离子强度的方法将吸附的蛋白质洗脱下来.
	凝胶电泳法	各种蛋白质在同一 pH 值条件下,因电荷数量和相对分子质量不同而在电场中的迁移率不同得以分开. 常用二维凝胶电泳技术,包括等电聚焦电泳和 SDS - PAGE 技术.
根据蛋白质 分子大小差别	凝胶过滤 层析法	也称尺寸排阻层析或凝胶渗透层析,是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一. 适宜对 pH 值、金属离子等敏感的生物分子提取蛋白质.
根据配体 特异性	亲和层析法	根据一些蛋白质与另一种称为配体(Ligand)的分子能特异而非共价地结合的原理,只需一步处理即可从复杂的蛋白质混合物中提取出高纯度的蛋白质. 常用的配体有酶、抗体、核酸、荷尔蒙、维生素等.
根据蛋白质 溶解度不同	等电点沉淀	蛋白质在等电点时溶解度达到最低而沉淀出来
	有机溶剂 提取	在一定温度、pH 值和离子强度下,与水互溶的有机溶剂(如甲醇、乙醇)能使一些蛋白质在水中的溶解度显著降低引起蛋白质沉淀

2 基于 16S rDNA 的微生物指纹技术

基于 16S rDNA 的微生物指纹技术是一种用于分析污染区域中微生物基因多样性和揭示微生物群落组成、活性及功能变化的非培养技术. 以聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术为基础,具有较高的精确性和稳定性,主要包括以下几种技术. 变性/温度梯度凝胶电泳(Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis, DGGE/TGGE)依据的原理是利用含有 50 bp GC 夹的引物、基于变性梯度发生化学或温度变化的聚丙烯酰胺凝胶的分离产物,从群落 DNA 中扩增 rRNA 或功能基因 PCR 产物^[3]. Li 等利用聚合酶链式反应 - 变性梯度凝胶电泳指纹技术(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR - DGGE)解析了受金属污染的土壤中微生物群落变化,探究了金属沉积物的污染区域中 dsrB 基因(异化的亚硫酸盐还原酶 β -亚基)的丰度^[4]. 自动核糖体基因间隔序列分析(Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA)是依据自动测序系统中,对 rRNA 基因间隔转录空间(Intergenic Transcribed Spacer, ITS)扩增产物的分离和检测,由荧光标记引物对微生物群落 DNA 进行 ITS 扩增^[3]. Qu 利用 ARISA 技术研究膜生物反应器中溴氨酸废水的微生物种群的动态变化^[5]. 长度异质性聚合酶链反应(Length Heterogeneity PCR, LH-PCR)是一种检测

微生物群落中不同小亚基(Small Subunit, SSU) rRNA 基因长度自然变化的方法. Connon 通过此方法确定了受三氯乙烯污染的地下水样品在丙烷持续的刺激下细菌群落的组成变化^[6]. 单链构象多态性(Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)方法即在非变性条件下分析单链 rRNA 基因的电泳迁移率,得到组合带型,区分出不同的微生物发育组群. Kiesel 利用 SSCP 技术检测地下水样品在无氧条件下持续氯苯降解过程中微生物群落的改变^[7]. 末端限制性片段长度多态性分析(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)技术是近十年引入微生物生态研究中的,此技术的主要优势是简便、自动化、可对计算机模拟的数据进行精确分析. T-RFLP 分析即利用荧光标记的引物,从微生物群落总 DNA 中扩增 SSU rRNA 基因后酶切扩增产物,产生 T - RFs,由毛细管电泳进行分离. 每个单独的 T-RF 对应唯一一个微生物发育系统或一个操作分类单元的群落指纹. 然后利用自动 DNA 测序仪器检测 T - RFs 的大小和相对丰度. 此外,还有扩增核糖体 DNA 限制性酶切分析技术(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA)、随机扩增多态性 DNA 分析(Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, RAPD)、扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP)分析、核糖体基因区间序列分析(Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, RISA)等技术.

3 基于功能基因的微生物指纹技术

基于功能基因的微生物指纹技术是由 DNA 指纹技术衍生而来. Pieper 研究小组利用扩增功能 DNA 限制性酶切分析 (Amplified Functional DNA Restriction Analysis, AFDRA) 对土壤微生物菌群的功能基因 (C23O 基因) 遗传多样性进行了实时监测, 揭示了土壤中功能基因的多态性及动态变化^[8-9]. 目前在微生物群落分析中应用较多的功能基因包括氨单加氧酶基因 (amoA), 反硝化代谢途径中的一系列基因 (narG、nirK、nirS 及 nosZ) 及苯酚羟化酶大亚基基因 (LmPH) 等^[10-12]. 在许多情况下, 用功能基因进行分类的分辨率能够达到比种更低的水平, 这是由功能基因序列在进化上的低保守性和较高的进化速率决定的.

4 其他非培养技术

4.1 荧光原位杂交技术 (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)

FISH 技术是一种由靶目标 rRNA 荧光染料标记的寡核苷酸探针与附着于膜过滤器或玻璃片上通透的微生物细胞核糖体的选择性杂交过程. 微生物细胞被靶目标 rRNA 探针染色, 通过荧光显微镜、共聚焦激光扫描显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 或流式细胞仪技术将其可视化或计数^[13]. 在 FISH 中, 可应用以原核和真核微生物类群为目标的多组特定 rRNA 探针, 实现环境样品中微生物种群的同步系统发育分类和量化. 传统的 FISH 技术具有一定的局限性, 为此研发了两种新的组合方法, 即催化报导沉积的荧光原位杂交技术 (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization, CARD-FISH) 和荧光原位杂交微生物放射自显影技术 (Fluorescence In Situ Hybridization-Microautoradiography, FISH-MAR).

4.2 稳定性同位素标记 (Stable Isotope Probing, SIP) 技术

稳定性同位素标记 (SIP) 是一种新型方法, 直接将微生物群落及其功能联系起来, 不需单独培养微生物, 弥补了分子指纹技术和测序方法的不足. SIP 技术是通过等密度梯度超速离心的方法为微生物群落及其核酸总细胞库的分离提供重同位素标记底物 (如 ^{13}C 标记的底物)^[14]. 提取出的总核酸会形成两个不同的离心分离区, 分别用 ^{13}C (高浮力密度) 和 ^{12}C 标记 (含核酸片段的低

浮力密度). 利用分子技术将被重同位素标记的功能性微生物群落从组合的 ^{13}C 标记的核酸片段中分离出来. 天然的含核酸片段的 ^{12}C 标记物在 SIP 实验中通常作为阴极控制, 来区分活跃的 (^{13}C 标记的) 和不活跃的 (含 ^{12}C) 微生物种群. Singleton 等将 ^{13}C 标记的萘、 ^{13}C 标记的水杨酸和非加入受 PAH 污染的土壤中, 来鉴定群落 DNA 中降解 PAHs 的菌种^[15].

4.3 分子生物传感器

环境生物传感器是利用高灵敏性的生物意识过程 (信号) 来测定特定化合物 (污染物) 与生物系统的相互作用, 在污染物的监控方面取得了显著成果. 分子传感器是由重组的质粒作为生物元件, 并有一个启动子, 对目标分子敏感, 通过报告系统产生信号. 启动子可随特定的分子开启或关闭, 在信号产生方面具有专一性. 在微生物生态学方面应用的生物传感器大多是基因工程生物, 其反应启动子与相应的报告基因融合, 包括适合 β -半乳糖苷酶的 lacZ 基因编码、荧光素酶系统的 lux 基因、绿色荧光蛋白 (GFP) 的 gfp 基因以及冰核蛋白质的 inaZ 基因等^[16].

4.4 DNA 微阵列

DNA 微阵列即用金属针 (接触印迹) 或墨水喷射 (非接触印迹) 的方法将探针储存或固定在玻璃表面. 根据靶目标 DNA 分子 (单细胞基因或群落基因) 与排列探针的杂交, 将每个靶目标探针杂交位点的荧光信号与本底值信号噪声比有关的每个信号位点的平均信号强度, 设计成定量检测, 并由商业化的图像分析软件测定^[17]. DNA 微阵列可用于复杂生态系统中微生物种群的快速、灵敏、量化及同步监控. 根据微阵列使用探针的不同可分为几种类型. 其中, 系统发育寡核苷酸阵列 (Phylogenetic Oligonucleotide Arrays, POA)、功能基因阵列 (Functional Gene Arrays, FGA) 和全基因阵列 (Whole Genome Arrays, WGA) 是生物修复研究中最常用的方法.

4.5 实时定量聚合酶链反应 (Real-time Quantitative PCR, qPCR) 技术

实时定量聚合酶链反应 (qPCR) 用于解析微生物群落变化或监控生态修复过程中物质的分解代谢活性, 是依据对每个扩增循环中分子的荧光性随 PCR 产物的积累而增强进行的实时检测. 需要使用校对工具在数据库序列中进行比对来设计探针和引物, 从而找到专门对应一种微生物或一个分解代谢基因的特征序列. Nyssonen 等证实了灵敏的实时 PCR 检测技术可对土壤样品中萘降

解菌的萘-羟基化双加氧酶 (nahAc) 基因进行定量分析,并监测萘的生物降解过程,对土壤浆液微观环境下的萘双加氧酶基因计数^[18].

5 宏基因组学技术

5.1 宏基因组学技术概述

宏基因组学技术这一概念是基于环境微生物(基因组学)中基因同步分析和环境样品(宏基因组学)中所有微生物基因分析提出的,突破了纯培养方面的一些限制. 1991 年, Pace 等首次提出环境基因组学 (Environmental genomics) 的概念,并利用构建的宏基因组文库筛选出 15 种新的菌种^[19]. 1998 年, Handelsman 等提出以环境样品中微生物群体基因组为研究对象,通过序列和功能基因的筛选方式建立宏基因组文库,定义了宏基因组 (Metagenome),即特定生境下全部微生物遗传物质的总和^[20]. 目前宏基因组学技术已广泛应用到海洋、土壤、人体肠道等多种环境中微生物多样性研究、特定功能基因筛选和新物种开发等.

表 4 常用的宏基因组文库筛选方法

方法	原理	优缺点
序列筛选法 (Sequence-based screening)	根据目的基因保守的 DNA 序列和已知的功能基因序列来设计 PCR 引物或探针,通过杂交或 PCR 扩增筛选阳性克隆子,从文库中获得目的基因	方法成熟可靠,但不能保证获得完整的基因,较难筛选出新的功能基因
功能筛选法 (Function-based screening)	以生物活性为线索,根据酶蛋白的功能,在功能平板上检测宿主菌出现的变化,获得具有生物活性的阳性克隆子,测序分析,得到基因结构	灵敏度高,可快速筛选出新基因,适合不存在同源序列而无法设计通用探针或 PCR 引物的编码酶或蛋白质基因的筛选. 外源基因的异源表达水平低或外源蛋白的活性低使阳性克隆率较低
底物诱导基因表达筛选法 (Substrate induced gene expression screening, SIGEX)	底物或代谢产物会诱导表达编码分解代谢途径的基因,由荧光活化细胞分选法 (FACS) 筛去 IPTG 诱导表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的细胞,再培养克隆子,结合 FACS 分离出携带了目的基因而表达 GFP 的克隆	快速经济,适宜需要利用底物诱导才能表达的分解代谢型基因的筛选,增强了外源基因的表达能力. 不能筛选出成型基因,目的基因与转录调控元件在基因组上相距较远时不能被筛选到

5.3 宏基因组测序

宏基因组测序即对环境中提取的总 DNA 进行全基因组测序,避免了传统微生物纯培养技术的弊端,提升了微生物资源可利用的空间. 该技术的产生和发展极大程度地揭示了环境样品中微生物群落中微生物多样性、功能多样性及代谢多样性,是评估环境样品中微生物组成结构的最精确方法之一. 到目前为止,已经有 210 多个不同环境,包括海洋、土壤、活性污泥及人体肠道等宏基因组样品被测序^[26]. 我国华大基因的研究者对人类肠道微生物进行了宏基因组测序,揭示了肠道微生物群落的结构、代谢及功能基因等信息,并以封面文章的形式发表与 Nature 杂志上^[27]. 在宏基

5.2 宏基因组文库

宏基因组文库是用一个适宜的载体(如质粒,噬菌体,福斯质粒,柯斯质粒或细菌人工染色体 BAC)将环境样品中提取 DNA 片段直接克隆,转移至合适的宿主菌株,并通过测序等筛选程序来分析克隆的 DNA 片段,确定具有特定功能的基因. 宏基因组文库资源丰富且复杂,需采用高灵敏度和高通量的方法对有用的基因进行筛选和鉴定,目前常用的筛选技术如表 4^[21-22]. Martin 构建了宏基因文库,通过确定全基因和优势菌群聚磷菌 Candidatus Accumulibacter phosphatis 中参与磷累积的基因,探究了生物除磷系统中微生物群落及其代谢功能,揭示出除磷的原因^[23]. Suenaga 从污泥样品中获取宏基因组 DNA 片段并构建了福斯质粒文库,使用邻苯二酚作为底物,产生了 91 个 EDO 阳极克隆,筛选出雌二醇双加氧酶 (EDO_s)^[24]. 吴杰构建了澳大利亚厚皮海绵的 Fosmid 宏基因组文库,是我国首次尝试用海绵丰富的基因资源研究宏基因组学^[25].

因组学领域的另一项创新技术是大规模平行焦磷酸测序,也称为宏基因组焦磷酸测序. 目前常用的是 Roche 454 GS-FLX Titanium 高通量测序系统,可同时对 30 多万个序列进行大规模平行焦磷酸测序,具有高读长、成本低、精度高、无偏性等优点.

6 宏转录组学技术

6.1 转录组学和宏转录组学

宏转录组学即通过直接提取环境微生物群落 mRNA,研究环境样品中微生物的物化、生物活性来获得全体微生物群落基因表达情况的技术. 宏转录组学分析的基本步骤为:总 mRNA 的提取和

扩充;cDNA 合成;cDNA 微阵列杂交或完整 cDNA 转录测序.

6.2 宏转录组测序

与宏基因组测序技术相比,宏转录组测序能够反映出微生物群落在特定条件下的基因表达情况,准确揭示群落真实的代谢活性.将宏转录组学与焦磷酸测序或 cDNA 微阵列结合使用,成为检测微生物群落转录活动的有利工具. Ulrich 等利用环境转录组学方法,首先提取出微生物群落总 RNA,随机反转录成 cDNA,将焦磷酸测序结果进行拼接注释后,发现 193 219 个与微生物分类相关的 rRNA 序列及 21 133 个与土壤微生物功能性相关的基因^[28].

7 宏蛋白质组学技术

1994 年, Wilkins 等提出了蛋白质组的概念,指一个基因组所表达的所有蛋白质,或细胞、组织、机体在特定时空所表达的全部蛋白质^[29]. 2004 年, Rodriguez - Valera 在蛋白质组和宏基因组基础上提出了宏蛋白质组 (Metaproteomics) 这一概念,即在一定条件下对微生物群落所有蛋白质的组成进行实时大规模的鉴定^[30]. 宏蛋白质组学是继宏基因组学之后在环境微生物学科中出现的又一新的研究方向,即从复杂的环境样品中总蛋白的水平,对不同物种间相互作用及整个微生物群落组成、功能等进行深入研究,进而掌握不同时空内的基因表达情况. 目前常采用两种研究路线:一是采用双向电泳、生物质谱联合的方法研究微生物群落中蛋白质的表达情况,二是采用多维色谱、生物质谱结合的方法,即鸟枪法^[31]. Wilmes 等对具有生物除磷功能的活性污泥系统展开了宏蛋白质组学的研究,探究了好氧/厌氧处理过程中微生物表达蛋白质的情况以及微生物的转变对除磷效果的影响,鉴定出与生物除磷相关的蛋白^[32]. Kim 等使用二维凝胶电泳的方法探究了可降解高相对分子量多环芳烃 (HMW - PAHs) 的菌株 PYR - 1 诱导产生的蛋白质,包括过氧化氢酶 - 过氧化物酶、假定单加氧酶等^[33]. 利用 2DE/MS 和标记裂解同位素联合蛋白质组学方法分析了恶臭假单胞菌 KT2440 中芳香烃的分解途径^[34]. Benndorf 等对 2,4 二氯苯氧基乙酸 (2,4 - D) 污染的土壤和氯苯污染的地下水中微生物群落进行了功能性宏蛋白质组学分析^[35].

8 微生物代谢组学

除了宏基因组学、宏转录组学和宏蛋白质组

学外,对微生物细胞内细胞代谢物全部功能的整体分析也是研究的重点,这一方向称为代谢组学. 当面对环境挑战或压力时,微生物细胞会释放低相对分子质量的初级和次级代谢物. 代谢组学是应用分离和分析技术对微生物细胞内的这些代谢产物进行功能角色的量化. 微生物代谢组学包含几种代谢方法,如代谢指纹和足纹法、代谢构造和靶目标分析,来确定和量化细胞代谢产物^[36]. Keum 等在非降解过程中对根瘤菌 C4 进行了相对代谢组学分析,研究了极性代谢物、脂肪酸和聚羟基脂肪酸酯等物质^[37]. 对一段时间内一个细胞中细胞分子/代谢物的实时通量分析称为代谢通量组学. Tang 等通过 GC - MS 和数据、生化及基因算法对希瓦氏菌藻进行了代谢组学分析,此菌对金属、放射性核素和卤化有机化合物的生物修复有共代谢途径,得出当希瓦氏菌藻适应不同碳源时可表现出相对灵活的代谢通量的结论^[38].

9 未来前景

不可培养微生物在新陈代谢途径、物种、生理生化反应、产物等各方面都具有丰富的多样性和新颖性,与可培养微生物相比,具有更广阔的微生物资源利用前景. 微生物非培养技术为不可培养微生物的研究提供了有利手段,尤其是宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学等“组学”技术的发展与应用,对不可培养微生物资源的开发利用发挥了越来越重要的作用. 宏基因组学提供了环境样品中总 DNA 的信息,宏转录组学反映了环境基因实时表达情况,宏蛋白质组学揭示了实时状况下环境微生物功能的变化,而代谢组学提供最后的环境代谢产物的总体信息,各种“组学”技术分别从不同水平对环境微生物的组成、结构及功能等进行了全面的描述,对研究功能基因多样性、了解微生物群落活性及其对生态系统功能的影响起到了推动作用. 从基因水平到代谢产物的研究,各种非培养技术有机的结合,形成一个完整、合理的研究体系,必将在环境微生物生态领域的研究中发挥越来越大的作用.

参考文献:

- [1] 曲媛媛,魏利. 微生物非培养技术原理与应用[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [2] DESAI C, PARIKH R Y, VAISHNAV T, *et al.* Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes[J]. Research in Microbi-

- ology, 2009, 160: 1–9.
- [3] NOCKER A, BURR M, CAMPER A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical Review [J]. Microbial Ecology, 2007, 54: 276–289.
- [4] LI Z, XU J, TANG C, *et al.* Application of 16S rDNA–PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils [J]. Chemosphere, 2006, 62: 1374–1380.
- [5] QU Y Y, ZHOU J T, WANG J, *et al.* Population dynamics in bioaugmented membrane bioreactor for treatment of bromoamine acid wastewater [J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 244–248.
- [6] CONNOR S A, TOVANABOOTR A, DOLAN M, *et al.* Bacterial community composition determined by culture-independent and-dependent methods during propane-stimulated bioremediation in trichloroethene contaminated groundwater [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7: 165–178.
- [7] KIESEL B, BALCKE G U, DIETRICH J, *et al.* Microbial community shifts as a response to efficient degradation of chlorobenzene under hypoxic conditions [J]. Biodegradation, 2008, 19: 435–446.
- [8] JUNCA H, PIEPER D H. Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55: 697–708.
- [9] SEI K, INOUE D, WADA K, *et al.* Monitoring behavior of catabolic genes and change of microbial community structures in seawater microcosms during aromatic compound degradation [J]. Water Research, 2004, 38: 4405–4414.
- [10] PURKHOLD U, POMMERENING-RÖSER A, JURITSCHKO S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (12): 5368–5382.
- [11] THROBACK I N, ENWALL K, JARVIS A, *et al.* Re-assessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community survey of denitrifying bacteria with DGGE [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49 (3): 401–417.
- [12] ZHANG X L, GAO P P, CHAO Q F, *et al.* Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp. from an activated sludges system [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 237 (2): 365–375.
- [13] ROGERS S W, MOOREMAN T B, ONGE S K. Fluorescent in situ hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil [J]. Soil Science Society of America Journal, 2007, 71: 620–631.
- [14] RADAJEWSKI S, INESON P, PAREKH N R, *et al.* Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology [J]. Nature, 2000, 403: 646–649.
- [15] SINGLETON D R, POWELL S N, 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: 1202–1209.
- [16] WATANBE K, HAMAMURA N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2003, 14: 289–295.
- [17] BAE J W, PARK Y H. Homogeneous versus heterogeneous probes for microbial ecological microarrays [J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24: 318–323.
- [18] NYSSONEN M, PISKONEN R, ITAVAARA M. A targeted real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment [J]. Microbial Ecology, 2006, 52: 533–543.
- [19] SCHMIDT T M, DELONG E F, PACE N R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173 (14): 4371–4378.
- [20] HANDELSMAN J, RONDON M R, BRADY S F, *et al.* Molecular biological accesses to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chemistry Biology, 1998, 5 (10): 245–249.
- [21] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 等. 宏基因组学 (Metagenomics) 的研究现状和发展趋势 [J]. 环境科学学报, 2008, 28 (2): 209–218.
- [22] 周丹燕, 戴世鲲, 王光华, 等. 宏基因组学技术的研究与挑战 [J]. 微生物学通报, 2011, 38 (4): 591–600.
- [23] MARTIN H G, IVANOVA N, KUNIN V, *et al.* Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities [J]. Nature Biotechnology, 2006, 24: 1263–1269.
- [24] SUENAGA H, TSUTOMU O, KENTARO M. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9: 2289–2297.
- [25] 吴杰, 李志勇, 张戎生. 海绵宏基因组文库构建及抗菌肽功能基因的初步筛选 [J]. 生物技术通报, 2006, 3: 95–103.
- [26] SIMON C, DANIEL R. Metagenomic analysis: past and future trends [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77: 1153–1161.
- [27] QIN J J, LI R Q, RAES J, *et al.* A human gut microbi-

- al gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464: 59–65.
- [28] URICH T, LANZEN A, QI J, *et al.* Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the metatranscriptome[J]. PLoS ONE, 2008, 3(e2527): 1–13.
- [29] GRAVES P R, HAYSTEAD T A. Molecular biologist's guide to proteomics[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(1): 39–63.
- [30] RODRIGUEZ-VALERA F. Environmental genomics, the big picture[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 231(2): 153–158.
- [31] 成妮妮, 郭春雷, 彭谦. 宏蛋白质组学: 研究微生物群落基因表达的新技术[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 347–349.
- [32] WILMES P, WEXLER M, BOND P L. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment[J]. PLoS ONE, 2008, 3(3): 1778.
- [33] KIM S J, JONES R C, CHA C J, *et al.* Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and de novo sequencing methods[J]. Proteomics, 2004, 4: 3899–3908.
- [34] KIM Y H, CHO K, YUN S H, *et al.* Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis[J]. Proteomics, 2006, 6: 1301–1318.
- [35] BENNDORF D, BALCKE G U, HARMS H, *et al.* Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater[J]. ISME Journal, 2007, 1: 224–234.
- [36] MAPELLI V, OLSSON L, NIELSEN J. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 26: 490–497.
- [37] KEUM Y S, SEO J S, QING X L, *et al.* Comparative metabolomic analysis of *Sinorhizobium* sp. C4 during the degradation of phenanthrene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 80: 863–872.
- [38] TANG Y J, MARTIN H G, DEHAL P S, *et al.* Metabolic flux analysis of *Shewanella* spp. reveals evolutionary robustness in central carbon metabolism[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102: 1161–1169.

(编辑 刘 彤)

(上接第 26 页)

- [4] WAN Wuyi. Study on unsteady flow in long-distance water diversion projects[D]. Tianjin: Tianjin University, 2004: 1–3.
- [5] NAIK K A, SRIKANTH P, CHANDEL A K. A novel governor control for stability enhancement of hydro power plant with water hammer effect[C]//Emerging Trends in Electrical and Computer Technology (ICETECT). Nagercoil: IEEE, 2011: 40–45.
- [6] ŠKULETIĆ S, RADULOVIĆ V. Analysis of surge protection performance in low-voltage AC systems with capacitive load[C]//Universities Power Engineering Conference (UPEC). Cardiff: IEEE, 2010: 1–6.
- [7] 金锥. 停泵水锤及其防护[M]. 2 版. 北京: 中国建筑工业出版社, 2004: 6–12.
- [8] FENG Wentao, YANG Jiandong. Study on the hydraulic impedance of surge tank[C]//Second International Conference on Mechanic Automation and Control Engineering (MACE). Inner Mongolia: IEEE, 2011: 2624–2627.
- [9] XU Yanyan. Study on water hammer protection using box type two-way surge tank in long distance water pipeline with high-lift and multi-fluctuation[D]. Xi'an: Chang'an University, 2008: 22–31.
- [10] YANG Yusi, MA Xiaoyun, LI Xiaoyan. Analysis the impact of wave velocity on the calculation of pressure boost in water hammer of long-distance water pipelines[C]//International Symposium on Water Resource and Environmental Protection (ISWREP). Xi'an: IEEE, 2011: 2943–2945.
- [11] ZHU Zuojin. Quasi-characteristic method for KDV-Burgers equations[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis of Science and Technology of China, 2004, 27(4): 8–12.

(编辑 刘 彤)