

分子生物学与系统生物学技术在土壤污染微生物生态研究中的应用*

涂 晨¹ 骆永明^{1,2†} 马露瑶² 章海波¹ 滕 应² 李振高²

(1 中国科学院海岸带环境过程重点实验室(烟台海岸带研究所), 山东烟台 264003)

(2 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008)

摘 要 综述了当前国内外应用于土壤污染生态研究中的各种分子生物学和系统生物学技术,包括核酸杂交和 DNA 指纹图谱分析技术以及宏基因组学、宏蛋白质组学和代谢组学等“组学”技术。阐述了这些技术方法的原理、应用以及各自的优势和局限性,并对这些新兴生物技术在土壤污染生态学中的应用前景作一展望。

关键词 污染土壤;微生物多样性;核酸杂交;DNA 指纹图谱;宏基因组学;宏蛋白质组学;代谢组学

中图分类号 Q89 **文献标识码** A

随着工业化、城市化、农业集约化的快速发展,人们对农业资源的高强度开发利用,造成环境发生日益严重的显性或潜性复合污染,已成为当今世界及社会关注的焦点^[1]。人们对污染问题的普遍重视也极大地促进了污染生态学的发展。随着分子生物学、系统生物学以及各种高新检测技术的发展,许多新兴的分子生物学和“组学”研究方法与技术逐渐被引入到污染生态学的研究中。这些技术的引入揭示了许多污染生态学中的重要机理,同时也为环境监测、污染治理与生物修复等领域提供了更为科学和灵敏的方法,从而极大地推进了污染生态学的理论和实践的发展^[2-3]。

应用于污染土壤微生物生态的分子生物学技术大致可分为两类:一类是核酸杂交技术,包括原位杂交技术(In situ Hybridization, ISH)及由其发展而来的荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH);另一类是基于 PCR 的 DNA 指纹图谱分析技术,包括扩增核糖体 DNA 限制性分析(Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)、末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(Temperature gra-

dient gel electrophoresis, TGGE)以及单链构象多态性分析(Single strand conformation polymorphism, SSCP)等^[4]。这些技术在污染土壤微生物多样性的研究中已经得到了较为广泛的应用。进入 21 世纪以来,随着新一代高通量测序技术的发展,宏基因组学研究极大地扩展了对土壤微生物群落的基因组组成、意义以及遗传变异性等方面的知识。然而,如何将污染土壤中微生物的多样性与其功能联系起来,仍然是污染生态学研究中的一个倍受关注的科学热点问题。随着蛋白质组学技术和生物信息技术的发展,宏蛋白质组学和代谢组学的出现扩展了对土壤微生物遗传和功能多样性的认知范围。这一系列“组学”(-Omics)的研究,逐步把分子生物学时代推向系统生物学时代。

本文分别综述了分子生物学和系统生物学中主要技术的原理、优缺点及其在土壤污染微生物生态学研究中的应用进展。

1 分子生物学技术在污染土壤微生物生态学中的应用

土壤中存在的大量微生物对整个生态系统产

* 科技部 863 计划重大项目(2012AA06A204)、国家自然科学基金项目(40921061, 40701080)、中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-YW-Q02-06)和江苏省自然科学基金项目(BK2009016)资助

† 通讯作者, E-mail: ymluo@yic.ac.cn

作者简介:涂 晨(1982—),男,江苏高邮人,博士,助理研究员,主要研究领域为土壤污染过程与生物修复。E-mail: ctu@yic.ac.cn

收稿日期:2012-08-11;收到修改稿日期:2012-11-22

生着重要的影响,土壤微生物多样性是调节陆地生态系统功能的至关重要因素。然而,随着工业化、城市化、农业集约化的快速发展,大面积土壤环境受到严重污染,在污染的胁迫下可能导致土壤微生物群落多样性和结构的变化。研究土壤微生物多样性的方法很多,目前大致可分为以下几类^[5]:(1)传统的微生物平板分离培养方法;(2)基于微生物碳源利用的 Biolog 微平板分析法;(3)磷脂脂肪酸分析法;(4)分子生物学分析方法;(5)其他方法,如用于微

生物生物量测定的氯仿熏蒸法、用于测定土壤酶活性的分析方法等(图 1)。其中,基于核酸分析的分子生物学方法克服了传统的微生物分离培养技术的局限,可以从分子水平揭示土壤微生物生物多样性和群落结构,因此正日益成为学术界的研究热点之一。本节主要综述了核酸杂交技术和基于 PCR 的 DNA 指纹图谱分析技术等分子生物学方法的原理、优缺点及其在污染土壤微生物生态学研究中的应用现状与发展前景。

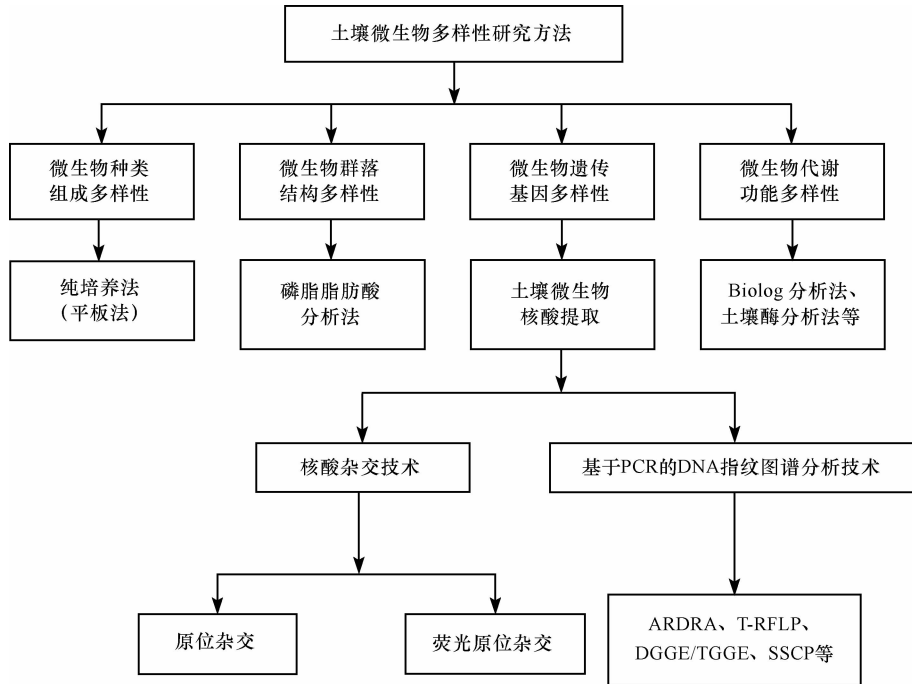


图 1 土壤微生物多样性的研究方法

Fig. 1 Research methods of soil microbial diversity

1.1 核酸杂交分析技术

1.1.1 原位杂交技术 (ISH) 1988 年, Giovanni 等首次将原位杂交技术引入细菌学的研究,使用放射性标记 rRNA 寡核苷酸探针,特异性探针进入待测样品细胞内与 DNA 或 RNA 杂交,以确定探针的互补序列在细胞内的定位,进而分析目标微生物在样品中的构成与分布情况^[6]。由于该技术的高度特异性和灵敏性,近年来被广泛应用于土壤环境微生物多样性的研究。用于土壤微生物多样性研究的常用探针包括:rRNA 基因探针、抗性基因探针、代谢酶基因探针等^[7]。其中,具有种属特异性的 16S rRNA 或 23S rRNA 基因探针是核酸杂交技术中最常用的探针。目前已针对不同种属的微生物设计出多种特异性 rRNA 基因探针,包括细菌 EUB338 探针、古细菌 ARCH915 探针、 α 变形菌

ALF1b 探针、 β 变形菌 BET42a 探针等^[8]。应用抗性探针对于污染土壤特别是重金属污染土壤样品进行杂交也是检测污染土壤微生物群落的有效方法之一,目前研究和应用较为广泛的抗性探针包括抗 Hg 基因 *merA* 探针、抗铜基因 *cop* 探针、抗 Cr 基因 *chr* 探针等^[9-11]。此外,还有文献报道针对编码特异污染物降解酶基因的探针,如分别利用编码石油、四氯乙烯以及三氯乙烯降解酶的基因探针研究土壤中污染物降解菌的组成与分布^[12-14]。

1.1.2 荧光原位杂交技术 (FISH) 1989 年, De-Long 等首次在核酸杂交技术中引入荧光标记的寡核苷酸探针,将细胞原位杂交技术和荧光技术有机结合形成了新技术——荧光原位杂交 (FISH) 技术^[15]。由于与放射性探针相比,荧光探针更安全、方便、实用,从而在环境微生物监测中得到了广泛

应用。该技术主要包括以下几个步骤:(1)样品固定;(2)样品的预处理;(3)预杂交;(4)探针和样品变性;(5)杂交;(6)漂洗去除未结合的探针;(7)检测杂交信号。通过在环境样品上直接原位杂交,不仅可测定不可培养微生物的形态特征及丰度,而且可原位分析它们的空间及数量分布^[16]。Yang 和 Zeyer^[17]采用 FISH 方法检测了四氯乙烯(PCE)污染地区降解菌 *Dehalococcoides* 的丰度。Matturro 等^[18]采用酶联荧光原位杂交(Catalyzed reporter deposition-FISH, CARD-FISH)联合实时定量 PCR 技术,对含氯溶剂污染场地中有机氯降解菌的分布与活性作了定性与定量研究,证实了该污染场地中脱氯菌群及其还原脱氯活性的存在。

FISH 技术在环境微生物学应用中也存在一些局限性,如荧光信号弱、清晰度不够高等。要解决这些问题,必须将 FISH 技术与其他分析技术相结合,如酶联荧光原位杂交(CARD-FISH)和酪胺信号放大(Tyramide signal amplification, TSA)技术等^[19]。相信随着分子生物学技术和其他科学仪器设备研制技术的不断发展,FISH 技术将为污染生态学研究提供更为广阔的应用前景。

1.2 基于 PCR 的 DNA 指纹图谱分析技术

1.2.1 扩增核糖体 DNA 限制性分析(ARDRA)

ARDRA 是基于 PCR 技术,对 rRNA 基因片段选择性扩增产物进行分析的一种简便有效的方法。其主要原理是对微生物 rRNA 的 PCR 扩增产物用限制酶进行切割,然后再对酶切产物进行电泳鉴定并进行限制性片段长度多态性分析。由于此方法不受菌株是否纯培养的限制,不受宿主的干扰,具有特异性强、效率高的特点,因此被广泛用于研究微生物的生物多样性。ARDRA 方法的缺点在于工作量较大,对于大量样品的分析,此方法显得费时费力。

Smit 等^[20]采用 ARDRA 方法研究了 Cu 污染对土壤微生物群落多样性的影响,结果表明 Cu 污染土壤中的微生物多样性明显减少,并且微生物群落结构发生很大变化,但是 Cu 污染对氨氧化菌的多样性没有影响。夏月等^[21]对不同 Cd 和 Pb 污染水平的土壤微生物进行了群落水平上的 ARDRA 分析,结果表明,5 mg kg⁻¹ Cd 和 500 mg kg⁻¹ Pb 污染对土壤微生物群落组成有一定影响,但低于该浓度值的重金属对土壤微生物群落的多样性却没有显著性影响。

1.2.2 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP) T-

RLFP 是对现有的 ARDRA 技术的延伸,其操作过程同 ARDRA 技术基本相同,所不同的是在 PCR 扩增 16S rRNA 基因的过程中,其中一个引物用荧光标记,PCR 产物经限制性内切酶进行消化后以 DNA 测序仪分离,通过激光扫描得到荧光标记端片段的图谱,图谱中条带(或波峰)的多少表明了群落的复杂程度,峰面积的大小代表了该片段的浓度,即相应群落的相对数量^[22]。与其他指纹图谱技术相比,T-RFLP 技术具有分析高通量、快速灵敏、重复性好且结果数据化等特点,对分析复杂群落的结构较其他指纹技术更具有明显优势。但是,T-RFLP 技术所产生的末端限制性片段(TRFs)在数据库中的匹配不够精确,无法鉴定至种甚至属的水平。

Liu 等^[23]首先将 T-RFLP 技术应用于微生物群落分析中,通过计算机模拟与实际群落分析比较表明,T-RFLP 技术是用于评价并比较不同生态条件下微生物群落结构多样性的有力工具。Tom-Petersen 等^[24]采用 T-RFLP 技术研究了铜污染土壤中的细菌群落结构多样性,结果表明,铜的添加能够显著改变整个土壤细菌群落结构,并对土壤中的根瘤菌-土壤农杆菌以及嗜胞菌类微生物的多样性产生影响。Kaplan 和 Kitts^[25]采用 T-RFLP 技术对石油污染土壤的修复过程中微生物群落动态学进行了研究,在修复进行的前 3 周,污染土壤中的石油被迅速降解,但在随后的 21 周内降解速度变慢;TRFs 显示土壤中细菌群落结构的变化与石油降解速度的变化相一致。对不同修复时期的 TRFs 序列进行比对后可知,在石油快速降解期,黄杆菌属(*Flavobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)为土壤中的优势微生物类群,而在修复后期降解速度变慢后,这两个优势 TRFs 数量降低并逐渐被另外 4 个 TRFs 所代替。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE) DGGE 是特殊的聚丙烯酰胺凝胶电泳,可以分辨分子量相同或相近、碱基序列有差异的 DNA 片段。在 DGGE 凝胶中含有浓度线性递增的变性剂(尿素和甲酰胺),电泳中核酸片段在相应的变性剂浓度下发生空间构型变化,导致迁移率的不同,进而使核酸片段得以分离^[26-28]。DGGE 的分辨率极高,理论上可分辨一个碱基的差异。由于 DGGE 具有可靠性强、重现性高、方便快捷等优点,近十年来已经成为微生物群落遗传多样性和动态分析的强有力工具,被广泛用于土壤微生物多样性变化的研究^[29]。然而,该技术也有着大多数分子技术的缺点,如分析的片段较小($\leq 1\text{kb}$)、条带的共迁问题以及 PCR 导致的突

变等。

Tu 等^[30]采用 PCR-DGGE 技术分析比较了在植物修复多氯联苯 (PCBs) 污染农田土壤过程中土壤细菌群落结构与多样性的变化动态。在种植紫花苜蓿修复 2 年后的处理中发现许多新增的 DGGE 条带,经测序鉴定与信息比对发现,这些新增条带分别与已知的联苯降解菌 *Actinobacteria*、*Chloroflexi* 以及 *Proteobacteria* 属的微生物具有较高的同源性,提示紫花苜蓿的种植可显著改变植物根际土壤的微生物群落结构与多样性,促进联苯降解菌的生长与活性。张晶等^[31]采用 PCR-DGGE 方法,研究了土壤微生物群落多样性对生物表面活性剂强化的植物-微生物联合修复多环芳烃污染土壤的响应。结果表明,在鼠李糖强化紫花苜蓿-菌根真菌-降解菌联合修复过程中,土壤细菌群落多样性的组成和结构发生了不同程度变化,细菌群落中的优势及特征性条带分别与芽孢杆菌、鞘氨醇单胞菌和假单胞菌等种属对 PAHs 的降解密切相关。

2 系统生物学技术在污染土壤微生物生态功能中的应用

微生物群落本身是一个复杂系统,对单个微生物的研究已经不能满足人类对于微生物了解的需要,解答环境微生物生态学的关键问题需要系统的方法学。系统生物学 (Systems biology) 是研究一个生物系统中所有组成成分 (基因、mRNA、蛋白质等) 的构成,以及在特定条件下这些组分间的相互关系,并通过计算生物学建立数学模型来定量描述和预测生物功能、表型和行为的学科^[32]。系统生物学的研究包括基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学、相互作用组学和表型组学等,它们分别构成了生命信息传递的几个层次,在 DNA、mRNA、蛋白质和代谢产物水平检测和鉴别各种分子并研究其功能^[33]。下面分别介绍土壤宏基因组学、宏蛋白质组学以及代谢组学这几个新兴“组学”技术的原理及其在污染土壤环境微生态功能中的应用。

2.1 宏基因组学

自 1991 年 Pace 首次提出环境基因组学的概念并在同年构建了第一个通过克隆环境样品中 DNA 的噬菌体文库以来,有关环境基因组学 (也称微生物环境基因组学 (Microbial Environmental Genomics), 宏基因组学、元基因组学 (Metagenomics), 生态基因组学 (Ecogenomics)) 的研究一直受到广泛

关注^[34]。

土壤宏基因组一般指土壤中所有细菌、真菌、古细菌、单胞藻、小型或微型原生生物的基因组总和。土壤基因组学的研究以基因组学技术为依托,其主要的程序包括从土壤中直接提取 DNA 并克隆至合适的载体中,再将载体转化到宿主细菌建立土壤宏基因组文库并对得到的文库进行分析和筛选^[35-36]。该方法应用之初是为了开发和利用土壤中那些不可培养的微生物资源,筛选新的生物活性物质和功能基因。近年来,土壤宏基因组学技术正逐渐渗透到农业、工业、食品、医药、能源和环境等各个领域。其中,土壤宏基因组学技术在环境保护和污染修复领域的应用主要包括两个方面:一是挖掘污染物降解基因和功能菌株,进行生物修复;二是分析微生物种群多样性,监测和评价环境健康^[37]。

Sul 等^[38]采用宏基因组学与 DNA 稳定性同位素标记相结合的方法,从受 PCBs 污染的沉积物中筛选具有 PCBs 降解功能的土著微生物及联苯降解基因。通过构建沉积物中土著细菌的¹³C-16S rRNA 基因文库发现,沉积物中的优势微生物群落为不动杆菌和假单胞菌;同时对¹³C-DNA 中的苯环双加氧酶基因进行 PCR 扩增并构建宏基因组文库,随后从该文库中分别筛选到两组与睾酮假单胞菌 B-356 菌株以及红球菌 RHA1 菌株有着较高相似度的联苯双加氧酶 *bphAE* 基因簇。研究结果提示,尽管许多联苯降解微生物尚不可在实验室条件下培养,但自然界中与联苯代谢相关的双加氧酶基因是普遍存在的。

Liang 等^[39]采用基于 GeoChip 基因芯片的土壤宏基因组学技术,比较了来自我国五个不同油田的受石油污染土壤中的微生物群落结构与功能基因多样性。研究结果表明,土壤中微生物群落的总体结构聚类与油田的地理分布有关,在所有的五个受污染的油田土壤中均能检测到高丰度的有机物降解基因,其中以烷烃和芳烃的单加氧酶和双加氧酶基因丰度最高。主成分分析结果表明,不同油田土壤中功能微生物的分布与当地土壤的基本性质,如石油污染物浓度、土壤氮磷含量、土壤含盐量以及土壤 pH 等因素有关。这一结果对阐明污染条件下土壤微生物的结构与功能变化有着重要意义,并为石油污染土壤的生物修复提供理论依据。

2.2 宏蛋白质组学

1994 年,澳大利亚学者 Wilkins 和 Willhams 提

出了蛋白质组 (Proteome) 的概念,即一个基因组所表达的所有蛋白质,或细胞、组织或机体在特定时空所表达的全部蛋白质^[40]。2004 年,Rodríguez-Valera 根据宏基因组学的概念提出了宏蛋白质组 (Metaproteome,或称元蛋白质组学),指环境混合微生物群落中所有生物的蛋白质组总和^[41]。尽管宏基因组学技术在微生物种群结构和生态环境功能的研究中取得了很大的成功,但其弊端也逐渐显现出来:由于重复基因的存在、基因表达的时空特异性和蛋白质修饰作用等原因,复杂环境条件下环境微生物基因特异性表达及其功能并不能通过宏基因组学的研究得到揭示,而这种信息往往是生态环境中最重要的部分^[42]。宏蛋白质组学的出现弥补了这个弊端,它能够通过检测某些蛋白质是否存在、相对丰度和蛋白质的修饰状态,直接测量功能基因的表达情况。通过对具有关键酶活性蛋白质的鉴定,可以使人们进一步认识在环境污染胁迫条件下微生物的代谢过程^[43-44]。然而,利用蛋白质组学研究复杂的微生物群体目前还存在一定的挑战,例如环境样品中蛋白质的有效分离,目前还没有统一的蛋白提取方法。在得到感兴趣的目标蛋白后,如何阐述其在生态环境中的功能动态也将是今后研究的热点之一。

Singleton 等^[45]采用宏蛋白质组学的方法比较研究了镉污染土壤中微生物量与土壤蛋白质表达响应。研究表明,受镉污染的土壤中,土壤总蛋白含量显著低于未受污染的对照,SDS-PAGE 电泳分析表明,在镉污染土壤中明显存在大量小分子量蛋白的表达,提示镉胁迫可诱导土壤微生物合成表达低分子量应激蛋白(如金属硫蛋白)。此外,与微生物生物量法相比,宏蛋白质组学技术在研究土壤微生物生态功能中更敏感、更精确。

Li 等^[46]采用 SDS-PAGE、2D-PAGE、MALDI-TOF-MS 等技术,从蛋白质组学水平阐释了铜耐性/修复植物海州香薷对铜吸收累积与耐性解毒的分子机理。研究表明,海州香薷适应缺铜和高铜胁迫时,均能够诱导一些功能蛋白(如氧化还原调控、细胞信号转导、转录与翻译调控、能量代谢调控、细胞壁代谢与细胞骨架调控、离子转运等相关蛋白)的差异表达,但这些蛋白在两种胁迫时处理 Cu 离子的机理不尽相同。

2.3 代谢组学

代谢组学 (Metabolomics) 诞生至今不到 10 年,但发展非常迅速,现已成为系统生物学研究的一个

重要组成部分。随着基因组学研究的深入,功能基因组开始研究基因组、转录组以及蛋白组的数据与表型之间的关系;而细胞内的全部代谢物最接近于表型,从而产生了研究全部代谢物的要求,代谢组 (Metabolome) 的概念由此诞生^[47]。后续研究过程中,代谢组被定义为给定的生物系统在给定的条件下合成的所有的代谢产物。代谢组学的分析是对一个生物系统中所有的低分子量的代谢物质的全面的、定性的和定量的分析。通过考察生物体系受到刺激或扰动后,其代谢产物的变化或其随时间的变化来研究生物体系的代谢途径^[48]。

代谢组学分析中,对于不同类型的代谢产物,往往要采取不同的分析方法进行研究。目前,代谢组学通常采用红外光谱法 (IR)、核磁共振 (NMR)、质谱 (MS)、高效液相色谱 (HPLC) 以及各种技术的耦联,如 GC-MS 和 LC-MS 来分析研究代谢物并为其绘制图谱^[49]。随着基因组学的研究向环境微生物学中的渗透,代谢组学也逐渐被应用到微生物生态学的研究领域中,用于研究微生物群落多样性与微生物生态功能间的关系^[50]。

微生物降解是修复环境中污染物的主要途径,深入了解污染物在微生物体内的代谢途径,将有助于人们优化微生物降解的条件,从而实现快速高效的生物修复。Luan 等^[51]利用固相微萃取衍生化技术与 GC-MS 联用同时测定多种 PAHs 代谢产物的分析方法,开展了细菌和微藻降解 PAHs 的降解机理和代谢物动力学变化等研究。从单一菌株和混合菌群的培养基中以及菌体内,同时检测到 PAHs 多种单氧化和双氧化及其开环的代谢产物,发现多种 PAHs 降解过程中存在复杂的代谢物动力学过程;通过研究标志性代谢产物的组成与动态变化,揭示了代谢物水平上的微生物共代谢 PAHs 的降解机制。Mckelvie 等^[52]采用核磁共振和 GC-MS 等技术,研究了化学杀虫剂污染土壤中爱胜蚓的代谢组学响应机制。研究表明,在 DDT 和硫丹暴露下,爱胜蚓的代谢产物麦芽糖、亮氨酸和丙氨酸的比例发生变化。当丙氨酸和甘氨酸的比例为 1.5:1 时,可作为评价土壤受 DDT 和硫丹污染的潜在生物标志物。

稳定性同位素探测技术 (Stable isotope probing, SIP) 是近期发展起来的将稳定性同位素标记技术与分子生物学方法相结合的代谢组学新技术。SIP 技术的基本原理和技术路线为:将环境样品暴露于稳定性同位素标记的基质中,这些样品中存在的某些

微生物能够以基质中的稳定性同位素为碳源或氮源进行物质代谢并满足其自身生长需要。基质中的稳定性同位素被吸收同化进入微生物体内,参与某些特定物质如核酸(DNA 和 RNA)及磷脂脂肪酸(PLFA)等的合成,通过提取、分离、纯化、分析这些微生物体内稳定性同位素标记的生物标志物,从而将环境中的微生物与其功能结合起来,以加深对环境中微生物功能及其所参与代谢的特定生物地球化学过程的认识^[53]。

在研究苯酚、PAHs 和 PCBs 等有机污染物微生物降解的过程中,使用 SIP 技术可以帮助了解在复杂的土壤环境中,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^[54-57]。目前,SIP 技术存在的主要问题包括:¹³C 标记浓度的确定以及微生物在培养过程可能存在的交叉取食风险。最近的一些 SIP 研究已通过优化培养条件和分离技术、缩短培养时间等手段来减少上述不利因素的影响。SIP 技术凭借其在不可培养微生物(降解菌)的寻找、功能基因(污染物降解基因)的筛选、生化代谢途径的研究、蛋白功能等方面存在的巨大潜能和优势,在污染土壤生物修复的研究中将会得到更广泛的应用。

3 研究展望

尽管随着现代生物技术的飞速发展,人类对污染生态学认识程度已经有了很大的进步,但仍然有很多重要信息尚未明确。以分子生物学为主的新兴生物技术的发展及其在土壤污染生态和环境生物学研究中的应用,打破了传统的研究方法与技术局限,加速了土壤污染生态学的发展,为土壤微生物多样性的研究提供了更为广泛和有力的工具。但是,任何一种分子生物学技术均有其特定的优点和局限性,在污染生态学的研究中,应根据样品的不同特性选择和摸索最为合适的方法,并不断探索不同技术的联合使用,使各种方法技术之间相互补充、相互印证。

此外,随着人类基因组测序工作的完成,人们对生命过程研究的热点转移到了基因的功能及几个“组学”中,如基因组、蛋白质组和代谢组学的研究。在环境生物学与污染生态学中,宏基因组学提供环境中总 DNA 的信息,宏蛋白质组学可以提供实时状况下环境功能的信息,宏代谢组学提供最后的

环境代谢产物的总体信息^[58]。然而,现有的“组学”研究还相对独立,高通量实验方法的发展促使大量的“组学”数据积累,多种问题的存在给不同“组学”之间数据的链接与集成带来了很大的困难。系统生物学中数据整合技术的发展有待于实验科学、生物学、数学和计算机科学的全面进步,最终有效地整合多种“组学”数据^[59],从而对污染环境中的微生物生态与功能进行全面的解读。

参考文献

- [1] 骆永明. 污染土壤修复技术研究现状与趋势. 化学进展, 2009, 21(2/3): 558—565. Luo Y M. Current research and development in soil remediation technologies (In Chinese). Progress in Chemistry, 2009, 21(2/3): 558—565
- [2] Cheng Z, McConkey B J, Glick B R. Proteomic studies of plant-bacterial interactions. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(10): 1672—1684
- [3] 吕意华, 田蕴, 郑天凌. 生物组学在污染环境微生物修复研究中的应用. 微生物学报, 2011, 51(5): 579—585. Lv Y H, Tian Y, Zheng T L. Application of “omics” in bioremediation-A review (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(5): 579—585
- [4] Saito A, Ikeda S, Ezura H, et al. Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent Methodologies. Microbes and Environments, 2007, 22(2): 93—105
- [5] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述. 土壤, 2004, 36(4): 346—350. Zhang J E, Cai Y F, Gao A X, et al. Review on laboratory methods for soil microbial diversity (In Chinese). Soils, 2004, 36(4): 346—350
- [6] 邢德峰, 任南琪, 李建政. FISH 技术在微生物生态学中的研究及进展. 环境科学研究, 2003, 16(3): 55—58. Xing D F, Ren N Q, Li J Z. Application and progress of fluorescence in situ hybridization (FISH) in environmental microbiology (In Chinese). Research of Environmental Sciences, 2003, 16(3): 55—58
- [7] 李慧, 陈冠雄, 张颖, 等. 分子生物学方法在污染土壤微生物多样性研究中的应用. 土壤学报, 2004, 41(4): 612—617. Li H, Chen G X, Zhang Y, et al. Application of molecular biotechniques in the study on microbial diversity in polluted soils (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(4): 612—617
- [8] Sandaa R A, Torsvik V, Enger O, et al. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30(3): 237—251
- [9] 曾艳, 陈强, 王敏, 等. 一株高抗汞细菌的分离鉴定及其抗性基因的克隆与表达. 微生物学报, 2009, 49(12): 1628—1633. Zeng Y, Chen Q, Wang M, et al. Isolation and identification of a bacterial strain KHg2 with high resistance to mercury and cloning and expression of its *merA* gene (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(12): 1628—1633
- [10] 王雪峰, 林建群, 韩梅, 等. 细菌铜抗性机制研究进展. 湖

- 北农业科学, 2009, 48(1): 218—223. Wang X F, Lin J Q, Han M, et al. Advances in copper resistant mechanisms of bacterium (In Chinese). Hubei Agricultural Science, 2009, 48(1): 218—223
- [11] 周围, 李友国, 程国军, 等. 1 株抗重金属铬细菌的分离、鉴定及抗性基因型的初步研究. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 248—250. Zhou W, Li Y G, Cheng G J, et al. Isolation, identification and genotypic analysis of a bacterium strain with resistance to chromium (VI) (In Chinese). Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(2): 248—250
- [12] 张玲妍, 白玉兴, 杨雪莲, 等. 荧光原位杂交技术对土壤石油降解菌的检测. 生态学杂志, 2009, 28(6): 1123—1127. Zhang L Y, Bai Y X, Yang X L, et al. Detection of soil petroleum-degrading bacteria with fluorescence in situ hybridization technique (In Chinese). Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(6): 1123—1127
- [13] Bunge M, Kleikemper J, Miniaci C, et al. Benzoate-driven dehalogenation of chlorinated ethenes in microbial cultures from a contaminated aquifer. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(6): 1447—1456
- [14] Hazen T C, Chakraborty R, Fleming J, et al. Use of gene probes to assess the impact and effectiveness of aerobic in situ bioremediation of TCE. Archives of Microbiology, 2009, 191(3): 221—232
- [15] DeLong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science, 1989, 243(4896): 1360—1363
- [16] 孙寓蛟, 王勇, 黄霞. 荧光原位杂交技术在环境微生物生态学解析中的应用研究. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(11): 14—20. Sun Y J, Wang Y, Huang X. Application of fluorescence in situ hybridization in analysis of environmental microbial ecology (In Chinese). Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2004, 5(11): 14—20
- [17] Yang Y, Zeyer J. Specific detection of dehalococoides species by fluorescence in situ hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2879—2883
- [18] Matturo B, Aulenta F, Majone M, et al. Field distribution and activity of chlorinated solvents degrading bacteria by combining CARD-FISH and real time PCR. New Biotechnology, 2012, 30(1): 23—32
- [19] Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 3094—3101
- [20] Smit E, Leeftang P, Wernars K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 23(3): 249—261
- [21] 夏月, Sardar K, 贺纪正, 等. 限制性片段长度多态性分析 (ARDRA) 方法对重金属污染土壤中细菌群落多样性的研究. 环境科学学报, 2007, 27(6): 953—960. Xia Y, Sardar K, He J Z, et al. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis to study microbial diversity in soils impacted by heavy metals (In Chinese). Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(6): 953—960
- [22] 任南琪, 赵阳国, 高崇洋, 等. TRFLP 在微生物群落结构与动态分析中的应用. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39(4): 552—556. Ren N Q, Zhao Y G, Gao C Y, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism: A powerful technique for characterizing microbial community structure and dynamics (In Chinese). Journal of Harbin Institute of Technology, 2007, 39(4): 552—556
- [23] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4516—4522
- [24] Tom-Petersen A, Leser T D, Marsh T L, et al. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 46(1): 53—62
- [25] Kaplan C W, Kitts C L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1777—1786
- [26] Kawasaki A, Watson E R, Kertesz M A. Indirect effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination on microbial communities in legume and grass rhizospheres. Plant and Soil, 2012, 358(1/2): 162—175
- [27] Qu J J, Ren G M, Chen B, et al. Effects of lead and zinc mining contamination on bacterial community diversity and enzyme activities of vicinal cropland. Environmental Monitoring and Assessment, 2011, 182(1/4): 597—606
- [28] 钟文辉, 王薇, 林先贵, 等. 核酸分析方法在土壤微生物多样性研究中的应用. 土壤学报, 2009, 46(2): 334—341. Zhong W H, Wang W, Lin X G, et al. Application of nucleic acid-based methods in the study of soil microbial diversity (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2009, 46(2): 334—341
- [29] 辜运富, 张小平, 涂仕华. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术在土壤微生物多样性研究中的应用. 土壤, 2008, 40(3): 344—350. Gu Y F, Zhang X P, Tu S H. Application of denaturing gradient gel electrophoresis to the study of soil microbial diversity (In Chinese). Soils, 2008, 40(3): 344—350
- [30] Tu C, Teng Y, Luo Y M, et al. PCB removal, soil enzyme activities, and microbial community structures during the phytoremediation by alfalfa in field soils. Journal of Soils and Sediments, 2011, 11(4): 649—656
- [31] 张晶, 林先贵, 刘魏魏, 等. 土壤微生物群落对多环芳烃污染土壤生物修复过程的响应. 环境科学, 2012, 33(8): 2825—2831. Zhang J, Lin X G, Liu W W, et al. Response of soil microbial community to the bioremediation of soil contaminated with PAHs (In Chinese). Environmental Science, 2012, 33(8): 2825—2831
- [32] 王川. 系统生物学——后基因组时代的生物学. 生物学通报, 2006, 41(1): 19—21. Wang C. Systems biology: The biology of the post-genomic period (In Chinese). Bulletin of Biology, 2006, 41(1): 19—21

- [33] 郭茹珍, 谢春娅. 微生物区系的功能基因组研究方法学. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7345—7347. Guo R Z, Xie C Y. Functional genomics research method of microbial communities (In Chinese). Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(16): 7345—7347
- [34] 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. 环境科学学报, 2008, 28(2): 209—218. He J Z, Zhang L M, Shen J P, et al. Advances and perspectives of metagenomics (In Chinese). Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(2): 209—218
- [35] Dinsdale E A, Edwards R A, Hall D, et al. Functional metagenomic profiling of nine biomes. Nature, 2008, 452(7187): 629—632
- [36] 贺纪正, 袁超磊, 沈菊培, 等. 土壤宏基因组学研究方法与进展. 土壤学报, 2012, 49(1): 155—164. He J Z, Yuan C L, Shen J P, et al. Methods for and progress in research on soil metagenomics (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2012, 49(1): 155—164
- [37] 张薇, 高洪文, 张化永. 宏基因组技术及其在环境保护和污染修复中的应用. 生态环境, 2008, 17(4): 1696—1701. Zhang W, Gao H W, Zhang H Y. Metagenomic technology and its application in environmental protection and bioremediation (In Chinese). Ecology and Environment, 2008, 17(4): 1696—1701
- [38] Sul W J, Park J, Quensen J F, et al. DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(17): 5501—5506
- [39] Liang Y, van Nostrand J D, Deng Y, et al. Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China. The ISME Journal, 2011, 5(3): 403—413
- [40] Graves P R, Haystead T A. Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(1): 39—63
- [41] Rodríguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? FEMS Microbiology Letters, 2004, 231(2): 153—158
- [42] 郝纯, 刘庆华, 杨俊仕, 等. 宏蛋白质组学:探索环境微生态系统的功能. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 270—275. Hao C, Liu Q H, Yang J S, et al. Metaproteomics: Exploration of the functions of microbial ecosystems (In Chinese). Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2008, 14(2): 270—275
- [43] 于仁涛, 高培基, 韩黎, 等. 宏蛋白质组学研究策略及应用. 生物工程学报, 2009, 25(7): 961—967. Yu R T, Gao P J, Han L, et al. Strategy and application of metaproteomics (In Chinese). Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(7): 961—967
- [44] 牛泽, 杨慧, 刘芳, 等. 元蛋白质组分析——研究微生物生态功能的新途径. 微生物学通报, 2007, 34(4): 804—807. Niu Z, Yang H, Liu F, et al. Metaproteome—A new approach for studying microbial ecology functions (In Chinese). Microbiology, 2007, 34(4): 804—807
- [45] Singleton I, Merrington G, Colvan S, et al. The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. Applied Soil Ecology, 2003, 23(1): 25—32
- [46] Li F, Shi J Y, Shen C F, et al. Proteomic characterization of copper stress response in *Elsholtzia splendens* roots and leaves. Plant Molecular Biology, 2009, 71(3): 251—263
- [47] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C, et al. Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function. Nature Reviews Drug Discovery, 2002, 1(2): 153—161
- [48] 周宏伟, 谭凤仪, 钟音, 等. 代谢组学及其在微生物领域的研究进展. 分析化学, 2007, 35(2): 309—314. Zhou H W, Tan F Y, Zhong Y, et al. Recent development of metabolomics and its applications in microbiology (In Chinese). Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35(2): 309—314
- [49] 郑卉, 李良智, 葛志强, 等. 代谢物组学及其在微生物研究中的应用. 中国生物工程杂志, 2005, 25(5): 6—9. Zheng H, Li L Z, Ge Z Q, et al. Metabolomics and its application to microbial study (In Chinese). China Biotechnology, 2005, 25(5): 6—9
- [50] Bundy J G, Davey M P, Viant M R. Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. Metabolomics, 2009, 5(1): 3—21
- [51] Luan T G, Yu K S H, Zhong Y, et al. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Chemosphere, 2006, 65(11): 2289—2296
- [52] Mckelvie J R, Yuk J, Xu Y, et al. ¹H NMR and GC/MS metabolomics of earthworm responses to sub-lethal DDT and endosulfan exposure. Metabolomics, 2009, 5(1): 84—94
- [53] Dumont M G, Murrell J C. Stable isotope probing-linking microbial identity to function. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(6): 499—504
- [54] 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. 生态学报, 2006, 26(5): 1574—1582. Ge Y, He J Z, Zheng Y M, et al. Stable isotope probing and its applications in microbial ecology (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(5): 1574—1582
- [55] 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. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(20): 6471—6477
- [56] 贾仲君. 稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 原理与应用. 微生物学报, 2011, 51(12): 1585—1594. Jia Z J. Principle and application of DNA-based stable isotope probing—A review (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1585—1594
- [57] Li Y, Lee C G, Watanabe T, et al. Identification of microbial communities that assimilate substrate from root cap cells in an aerobic soil using a DNA-SIP approach. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(9): 1928—1935
- [58] Desai C, Pathak H, Madamwar D. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. Bioresource

Technology, 2010, 101(6): 1558—1569

[59] 刘伟, 朱云平, 贺福初. 系统生物学研究中不同组学数据的整合. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(12): 971—

976. Liu W, Zhu Y P, He F C. Integration of various 'omics' data in biological systems (In Chinese). Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23(12): 971—976

APPLICATIONS OF MOLECULAR AND SYSTEMATIC BIOLOGICAL TECHNOLOGIES IN POLLUTED SOIL MICROBIAL ECOLOGY RESEARCHES

Tu Chen¹ Luo Yongming^{1,2†} Ma Luyao² Zhang Haibo¹ Teng Ying² Li Zhengao²

(1 Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

(2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract This paper reviews the current applications of molecular and systematic biological technologies in polluted soil microbial ecology researches. These approaches include nucleic acid hybridization, DNA fingerprints, metagenomics, metaproteome and metabolomics. The mechanisms, applications, advantages and limitations of these approaches were discussed respectively, and the potential applications of these biological technologies were also discussed.

Key words Polluted soil; Microbial diversity; Nucleic acid hybridization; DNA fingerprints; Metagenomics; Metaproteome; Metabolomics

(责任编辑:陈德明)