

特约综述



本实验室在朱永官研究员的带领下主要从事土壤-微生物-植物系统中重金属、持久性有机污染物、抗生素等新型污染物的生物地球化学循环的生物学和生态学机制的研究,并在此基础上开展土壤污染控制与修复技术等方面的工作。

http://www.rcees.ac.cn/yjsjy/sssdj/201307/t20130725_3904804.html

多环芳烃(PAHs)微生物降解的原位表征方法

陈松灿¹ 段桂兰^{1*} 朱永官^{1,2*}

¹中国科学院生态环境研究中心土壤环境研究室,北京 100085;

²中国科学院城市环境研究所,城市环境与健康研究中心重点实验室,厦门 361021)

摘要 多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类在环境中广泛存在的持久性有机污染物,微生物降解是去除环境中多环芳烃污染的主要途径。传统的有关PAHs微生物降解的研究主要依靠分离培养技术,难以准确认识PAHs微生物降解的原位过程及机制。近年来发展起来的原位表征方法可以在基因及单细胞水平研究PAHs在复杂环境中的微生物降解过程,能够原位表征具有PAHs降解功能的微生物及其功能基因和代谢活性,是阐明PAHs原位降解过程及分子机制的强有力的手段。该文综述了宏基因组技术(meta-genomics)、稳定同位素探针技术(stable isotope probe, SIP)、荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、拉曼光谱技术(Raman spectra)以及二次离子质谱技术(secondary ion mass spectrometry, SIMS)等原位表征技术在PAHs微生物降解研究领域的应用及其存在的问题和发展趋势等。PAHs微生物降解过程及机制的原位表征将为缓解与修复PAHs污染提供科学基础。

关键词 多环芳烃; 微生物降解; 原位表征方法; 宏基因组技术; 稳定同位素探针技术; 荧光原位杂交技术; 拉曼光谱技术; 二次离子质谱技术

Approaches to *In Situ* Characterization of Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

Chen Songcan¹, Duan Guilin^{1*}, Zhu Yongguan^{1,2*}

(¹Department of Soil Environment Science, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; ²Key Laboratory of Urban Environment and Health Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2014CB441102)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62849328, E-mail: duangl@rcees.ac.cn; Tel: 010-62936940, E-mail: ygzhu@rcees.ac.cn

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2014CB441102)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62849328, E-mail: duangl@rcees.ac.cn; Tel: +86-10-62936940, E-mail: ygzhu@rcees.ac.cn

网络出版时间: 2015-01-20 10:11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150120.1011.002.html>

Abstract Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous in the natural environment, and most of them are persist in the ecosystem for many years owing to their low aqueous solubility and their absorption to solid particles. Bioremediation through microbial degradation could be an attractive technology for restoration of PAH-contaminated environment. Traditional researches on microbial degradation of PAHs concentrate on pure cultures, which are difficult to accurately recognize *in situ* process and mechanism of microbial degradation of PAHs. Recently, rapid development of *in situ* characterization technologies makes it feasible to investigate microbial degradation processes in complex environments, including characterization of functional microorganisms and genes involved in PAHs degradation at genetic and cellular levels. These technologies are powerful tools to promote the understanding of PAHs biodegradation processes and molecular mechanisms. More knowledge on the functions and interactions within microbial communities will optimize our efforts to sustainable decontamination/detoxification of PAHs polluted environments. In this review, we outline the application of current approaches to *in situ* characterization of PAHs biodegradation, including meta-genomics, stable isotope probe (SIP), fluorescence *in situ* hybridization (FISH), Raman spectroscopy and secondary ion mass spectrometry (SIMS), and discuss their applications and limitations.

Keywords PAHs; microbial degradation; *in situ* characterization; meta-genomics; SIP; FISH; Raman spectra; SIMS

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类具有两个或两个以上稠合苯环结构的典型持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)。由于大气的干湿沉降、污水灌溉、煤气和煤焦油的生产、废物焚烧以及石油泄漏等过程导致大气、土壤、水体等环境介质的PAHs污染日趋严重^[1]。据Zhang等^[2]的估算,我国每年向大气排放的PAHs总量超过25万吨;刘增俊等^[3]的研究表明,我国长江三角洲地区土壤已普遍受到PAHs污染,如苏州农田土壤中15种PAHs总量平均达312.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,最高达3 703 $\mu\text{g}/\text{kg}$,50%以上土壤受到PAHs污染(>200 $\mu\text{g}/\text{kg}$);另外,美国NRC(Nuclear Regulatory Commission)的调查显示,每年约有130万吨的石油被排放到海洋中,造成严重的海洋PAHs污染^[4]。由于PAHs生物富集率高及其潜在的致癌、致畸毒性^[5],环境介质中的PAHs污染将对人类健康和生态环境安全构成严重的威胁。因此,急需探明环境中PAHs的降解过程,开发经济、高效、安全的PAHs污染缓解与修复的实用技术,以保障生态环境安全。

微生物在PAHs的降解过程中起关键作用^[5],其能够以PAHs为碳源和能源,进行自身的新陈代谢并合成生命物质,从而达到降解PAHs的目的^[6]。因此,研究PAHs的微生物降解对于治理环境中PAHs污染具有重要的指导意义。目前,许多研究者利用纯培

养的技术分离得到了能够以PAHs为唯一碳源和能源生长的PAHs降解菌株^[7],并对单一微生物菌株的PAHs降解途径及分子机制有了较为深入的认识^[8]。然而,单纯依靠纯培养技术来研究PAHs的生物降解存在一定的缺陷,使研究结果难以直接应用于实际环境中PAHs的修复:其一,分离培养的降解菌株虽然在实验室控制条件下具有较强的PAHs降解功能,但是其在原位环境中的降解效果并不理想^[9-10];其二,在现有的技术条件下,可分离培养的微生物数量相对较少,只占微生物总数的0.1%~1.0%,而未分离培养的微生物对于原位环境中PAHs的降解更为重要^[11];其三,PAHs的原位降解可能涉及多种微生物的协同作用^[12],是微生物与自然环境长期互作的结果。因此,在群落水平研究PAHs在复杂环境中的微生物降解过程,原位表征具有PAHs降解功能的微生物及其代谢活性,能更准确地认知PAHs污染环境微生物多样性形成的机制及影响功能微生物发挥作用的驱动因子,可以使PAHs微生物降解作用在复杂环境中得以最大发挥。

近年逐步兴起的原位表征技术拓展了微生物学的研究思路与方法,可以绕过微生物菌种分离培养这一技术难关,在基因、细胞乃至个体水平上表征复杂环境样品中微生物群落的组成和代谢特征,能够用于探索在原位环境中PAHs降解的参与者以及PAHs微生物降解的分子机制,是研究PAHs降解功

能微生物的强有力手段。我们将对这些原位表征手段包括宏基因组技术(meta-genomics)、稳定同位素探针技术(stable isotope probe, SIP)、荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、拉曼光谱技术(Raman)以及二次离子质谱技术(secondary ion mass spectrometry, SIMS)等的原理及其在PAHs微生物降解等研究领域的相关应用、存在的问题和发展趋势等进行简要介绍。

1 宏基因组学(meta-genomics)技术

宏基因组学以复杂环境中全部微生物遗传信息为研究对象,通过重构微生物的代谢途径,在基因水平系统描述不同微生物在复杂环境中的生理过程及其相互影响的分子遗传机制^[13]。根据所用策略不同,宏基因组学研究可采用序列驱动的(sequence-driven)和功能驱动的(function-driven)技术^[14](图1)。序列驱动的宏基因组学技术包括3个主要步骤:从环境样品中提取微生物基因组(宏基因组);通过高通量测序技术对宏基因组DNA进行测序、拼接、注释,获得全基因组的信息;结合测序数据对微生物群落结构及功能基因进行分析^[15]。功能驱动的宏基因组学技术包括4个主要步骤:从环境样品中提取微生物基因组;将宏基因组DNA克隆于不同载体;再将重组载体转移到适宜的宿主以建立宏基因组文库;结合不同的筛选技术,从基因文库中筛选新的功能基因或功能物质^[16]。

宏基因组学技术能够高通量地发掘具有PAHs降解功能的新基因,为了解原位PAHs污染环境中的功能基因的多样性提供了大量的信息。Brennerova等^[17]从PAHs污染的土壤中提取DNA构建了大片段福斯(Fosmid)质粒基因库,利用儿茶酚2,3-双加氧酶(catechol 2,3-dioxygenase)能够催化无色的底物儿茶酚反应生成黄色的2-羟基糠酸半醛(2-hydroxymuconic semialdehyde)而显色的原理,从87 000个克隆子中筛选到235个具有双加氧酶催化活性的克隆子。对这235个克隆子中所包含的外二醇双加氧酶基因进行序列比对及其所表达的蛋白质进行酶学分析,发现不同物种来源的外二醇双加氧酶具有相似的底物催化活性,这暗示PAHs的原位降解过程可能涉及多种物种的协同作用。Sierra-Garcia等^[18]利用Fosmid质粒载体构建了油田环境基因组文库,对文库中的克隆子进行功能筛选并测序后,发现了一个新的PAHs降

解基因簇。Wang等^[19]构建了油污染地下水的宏基因组文库并筛选了对芳香烃具有响应的转录调控子的编码基因,这些转录调控子的研究将有助于构建基因工程菌株以实现宏基因组文库中PAHs降解基因的高通量筛选。随着测序技术的发展,序列驱动的宏基因组学技术逐步应用到新功能基因的发现中。Singleton等^[20]对苾富集培养体系中提取的DNA直接进行宏基因组测序,分析比对得到了6个新的环羟基化双加氧酶(ring hydroxylation dioxygenase, RHD)基因,将这6个基因在大肠杆菌中表达,发现其对2~5环PAHs具有降解能力。

随着宏基因组学研究的不断深入,以环境微生物样本中的总RNA或总蛋白质为研究对象的宏转录组学(metatranscriptomics)技术和宏蛋白质组学(metaproteomics)技术也开始运用到PAHs原位降解过程的研究中(图1)。de Menezes等^[21]在微宇宙环境下利用宏转录组学技术对土壤中菲的原位降解过程进行了研究,结果表明,在菲的降解过程中,土壤中双加氧酶基因、抗胁迫相关基因及解毒相关基因的表达量显著增加,这些转录产物主要来自于Actinobacteria纲的细菌。Yagi等^[22]利用宏转录组学技术在萘污染的地下水环境中检测到了与萘降解相关的双加氧酶基因的表达。Guazzaroni等^[23]运用宏蛋白质组学技术研究了生物强化(bio-stimulation)后的萘污染土壤中蛋白质的原位表达情况,发现生物强化使得238个直系同源蛋白簇(cluster of orthologous groups, COGs)的表达量显著提高,作者推测这些蛋白质的表达量增加可能使得生物强化的土壤适于萘的降解。这些研究说明,宏转录组学技术和宏蛋白质组学技术可以分别从mRNA水平和蛋白质水平研究各种相关功能基因的原位表达情况,能够将特定条件下的生物群落及其功能联系在一起,从而深化对PAHs原位降解过程的认识。

然而,宏基因组学技术目前仍存在许多技术难题。序列驱动的宏基因组学技术的难点在于数据分析。环境样品中微生物多样性极其丰富而数据库中已知的基因组信息有限,并且针对环境基因组的统计学算法和分析软件远远滞后于高通量测序技术的发展。因此,面对海量的测序数据,拼接、注释和进一步的分析具有相当大的挑战^[24]。功能驱动的宏基因组学技术难点在于功能基因的筛选。功能基因的筛选受制于外源基因在宿主细胞中的表达,并且因检测

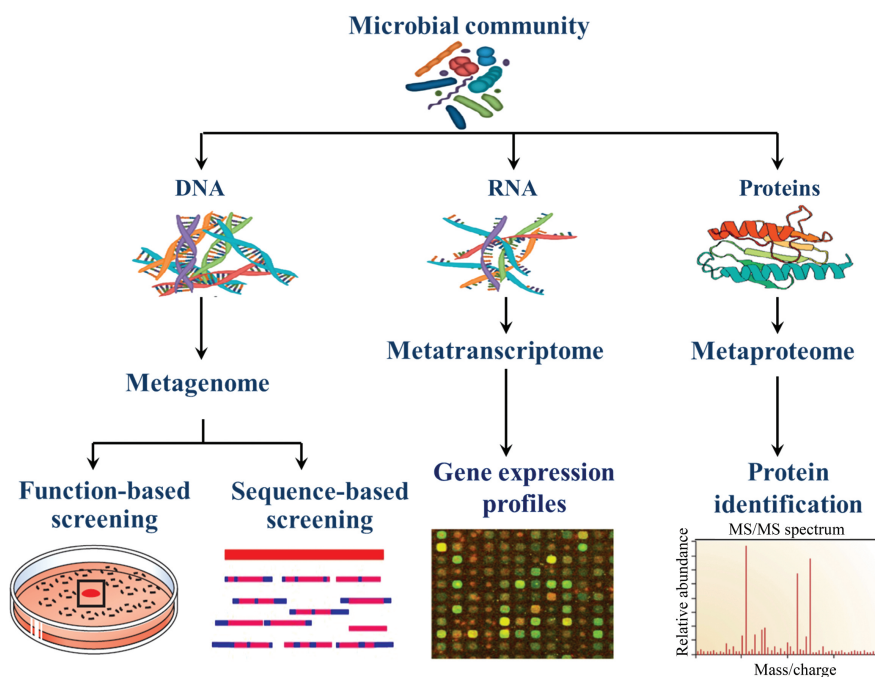


图1 宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学研究流程(根据参考文献[13]修改)

Fig.1 Research procedures of metagenomics, metatranscriptomics and metaproteomics (modified from reference [13])

手段的局限, 筛选工作量大、效率低, 往往分析大量克隆仅有几个具有活性。鉴于此, 发展高通量、高灵敏度、快速简便的筛选方法或体系十分必要^[25]。尽管如此, 随着测序技术、数据分析技术及功能基因筛选技术的发展, 宏基因组学技术在揭示 PAHs 原位降解过程中微生物之间、微生物与环境之间的相互作用以及全面认识微生物的生态特征和功能等方面具有广阔的应用前景。

2 稳定同位素探针(stable isotope probe, SIP)技术

稳定同位素探针技术是一种同位素示踪技术, 它通过向环境样品中添加同位素标记的目标化合物(如 PAHs), 再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(如 DNA、RNA 或者蛋白质)进行分析, 确定环境样品中的功能微生物^[26]。根据生物标志物的不同, SIP 技术可以分为 PLFA-SIP、DNA-SIP、RNA-SIP 和蛋白质-SIP 等。以 DNA-SIP^[27] 为例, 利用 SIP 技术进行 PAHs 生物降解原位表征的技术路线包括(图2): 用 ^{13}C 标记的 PAHs 培养土壤, 土壤中具有 PAHs 降解功能的微生物利用标记底物生长并合成 ^{13}C -DNA; 提取土壤微生物基因组总 DNA, 包括 PAHs 降解微生物的 ^{13}C -DNA 和没有利用 ^{13}C 的微生物 ^{12}C -DNA; 超高速

离心后形成氯化铯密度梯度区带, 获得由轻到重不同浮力密度的 DNA; 对重层 DNA (^{13}C -DNA) 开展针对性的分子生物学分析(如构建克隆文库等), 揭示参与标记底物代谢过程的微生物群落。

许多学者运用 DNA-SIP 技术对农田土壤、污染土壤、底泥、水体及生物反应器等环境中 PAHs(包括萘、葱、菲、芘以及苯并[a]芘等)生物降解功能菌进行了研究^[28], 发掘了许多相关功能微生物的信息, 极大地丰富了具有 PAHs 降解功能但目前尚不可分离培养的微生物资源。例如, Peng 等^[29] 利用 DNA-SIP 技术对堆肥过程中的芘降解菌进行鉴定, 发现未分离培养的变性菌门(Proteobacteria)及放线菌门(Actinobacteria)的微生物在芘的原位降解中起主要作用。另外, SIP 与宏基因组学的结合、mRNA-SIP 以及蛋白质-SIP 还能原位探查 PAHs 降解功能微生物的基因组信息及其在特定条件下的表达情况, 有助于对 PAHs 原位降解的分子机理进行深入研究。Wang 等^[30] 运用 SIP 和宏基因组技术研究了萘污染地下水体中萘降解菌和降解基因, 通过对 SIP 回收的 ^{13}C -DNA 进行宏基因组测序, 发现并证实了一个新的萘降解操纵子 *nag2*。Chemerys 等^[31] 用 ^{13}C 标记的菲培养土壤微生物, 利用 SIP 技术获得 ^{13}C -DNA, 对标记的 DNA 进行宏基因组测序, 发现了两个新的环羟基化双加氧酶基因。将这两个基因在大肠杆菌中表达, 发现其对 2~3 环

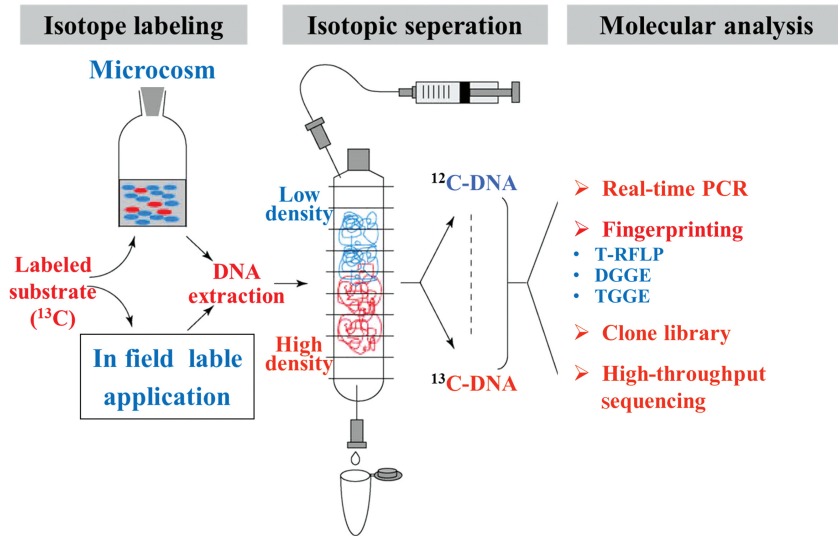


图2 DNA-SIP技术示意图(根据参考文献[26]修改)

Fig.2 Schematic diagram of DNA-SIP (modified from reference [26])

PAHs具有降解能力,而对4环PAHs不具有降解能力。Huang等^[32]利用 mRNA-SIP技术探查了地下水萘降解过程被转录的功能基因,结果表明, *Comamonas*-型的萘双加氧酶基因表达量显著提高,因而在萘的原位降解过程中发挥重要作用。Herbst等^[33]在微宇宙培养的条件下,利用蛋白质-SIP技术对地下水中的萘降解过程进行研究,发现了具有萘降解功能的微生物以及参与萘原位降解的蛋白质,其中萘降解相关蛋白质中的¹³C丰度达到50%,表明萘降解微生物80%的碳源来自于萘的降解。

SIP技术应用于PAHs生物降解研究的一个难点在于确定合理的底物浓度及培养时间^[34]。通常,培养体系中添加的外源¹³C标记底物越多,产生的目标微生物¹³C标记的生物标志物就越多,越有可能分离获得功能微生物的相关信息。然而,原位研究微生物在自然环境的生理代谢过程要求样品尽可能保持原始状态,降低外来干扰。因此,理想的培养实验是采用尽可能少的¹³C标记底物培养环境样品,但这可能导致微生物标志物中¹³C的标记量过低而难以分离获得。目前,只有PLFA-SIP技术能够分离较少含量的¹³C标记物,而DNA/RNA-SIP技术难以成功分离获得低¹³C标记量的核酸^[35]。另外,确定合理的培养时间对SIP技术的成功应用也十分关键。延长培养时间虽然可以增加生物标志物中¹³C的含量,但是在培养过程中,某些代谢微生物有可能通过同化PAHs降解微生物产生的¹³C标记的代谢物而被¹³C标记,即交叉取食(cross feeding)^[36],从而导致SIP的结果出现

假阳性。因此,在进行SIP实验之前,一般需要通过预实验监测底物及其代谢产物的变化规律,针对不同实验目的,优化培养条件。此外,通过破坏性采样,比较不同培养时间下标记微生物的变化规律,也可以显著提高SIP实验的可信度^[27]。可以预见,未来SIP技术将在定向发掘PAHs污染环境不能分离培养但能降解PAHs的功能微生物及其降解过程的分子机制等方面发挥重要作用。

3 拉曼光谱-荧光原位杂交(Raman-FISH)技术

荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是20世纪70年代发展起来的一种原位杂交技术^[37],它以荧光染料标记的寡核苷酸(DNA或RNA)作探针,通过原位杂交的方法,将特定的DNA或者RNA序列在细胞内显示出来,可以在保持细胞形态完整性的条件下,检测样品中特定的核酸序列的存在、数目和定位^[38]。在环境微生物学领域,FISH技术可以用来鉴定环境样品中微生物的种类、数目及空间分布等^[39-40]。其原理是:微生物的16S rDNA、23S rDNA以及它们的间隔区的核苷酸序列具有稳定的种属特异性^[41],以这些区域的核苷酸序列为模板,设计特定微生物种属的寡核苷酸探针,就可以原位检测特异微生物种群的存在、丰度及分布^[42]。

拉曼(Raman)光谱技术是研究样品分子结构与组成的一种光谱方法,它能够记录样品分子振动所引起的光的吸收和散射信息并成图,通过对谱图中特征

吸收峰的判别及归属,可以判断出样品表面分子的基本结构^[43]。在微生物学的研究中,Raman光谱技术不仅可以作为一种化学分析的方法收集完整菌体细胞中细胞组分(如核酸、蛋白质、碳水化合物及脂质等)的分子振动信息来鉴别微生物^[44-46],而且还能够对微生物细胞代谢功能进行原位表征^[47]。利用Raman光谱进行微生物细胞代谢功能研究的基本原理为:在原位或者微宇宙条件下,将环境样品或微生物样品暴露在富含重同位素(¹⁵N或¹³C等)基质的环境中,具有代谢功能的微生物能够将重同位素吸收到体内,同化了重稳定同位素的微生物细胞的Raman吸收峰相较于未标记的细胞将发生“红移”(波长增加)^[43,48]。因此,通过对微生物细胞的Raman光谱分析可以原位识别具有底物代谢功能的微生物。

Raman技术与FISH技术联用(Raman-FISH)可以原位表征PAHs降解过程中目标微生物种群的分布和代谢特征(图3)。Huang等^[49]在萘污染的地下水样品中加入¹³C标记的萘,于14 °C培养72 h后,首先运用FISH技术对假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)微生物的空间分布进行检测,之后再选取具有荧光信号的*Pseudomonas*细胞进行Raman分析。结果显示,*Pseudomonas*细胞的Raman光谱中苯基丙氨酸吸收峰发生显著红移,这说明*Pseudomonas*属的微生物细胞内的¹³C含量显著增加,从而证实了*Pseudomonas*具有原位降解萘的功能。Huang等^[49]的进一步分析还发现,*Pseudomonas*属的微生物在个体水平具有不同的萘代谢活性,这表明Raman-FISH还可以用于微生物种内表型异质性的研究。另外,一些研究利用Raman-FISH技术验证了未分离培养的微生物可能对PAHs的原位降解更加重要^[32,49]。Huang等^[32]首先利用SIP技术发现,不可分离培养的嗜菌属(*Acidovorax*)微生物可能参与地下水中萘的原位降解过程。之后他们又运用Raman-FISH技术直观有力地证明了在低浓度萘(3.8 μmol/L)的地下水环境中,*Acidovorax*对萘的降解起主要作用,而在高浓度萘(300 μmol/L)的地下水环境中,*Acidovorax*与*Pseudomonas*在萘的原位降解过程中发挥同等重要的作用。这些研究说明,将Raman技术和FISH技术联合使用,是分析复杂微生物群落单细胞结构与功能的新工具,能够在原位直接识别和量化微生物对PAHs的代谢过程,并探索新的生态学机制。

Raman-FISH技术用于PAHs原位降解的表征尚

处于起步阶段,其灵敏度仍不足以识别¹³C含量较低的微生物细胞^[49]。但随着光谱技术的发展,该技术缺陷将被克服。另外,运用Raman-FISH技术所获得的关于微生物细胞结构、化学组成以及代谢过程等信息,将有助于分离具有PAHs降解功能的微生物,并进一步揭示未分离培养的功能微生物的遗传多样性、原位功能活性及生理生态作用^[50]。

4 二次离子质谱(SIMS)技术

二次离子质谱技术(second ion mass spectrometry, SIMS)是当今灵敏度最高的一种表面分析技术,它以初级离子束(Cs⁺或O⁻)轰击固体薄片样品表面(微生物细胞),再将从样品表面溅射出来的二次离子(如¹²C⁻、¹³C⁻、¹²C¹⁴N⁻、¹²C¹⁵N⁻等)引入磁场质量分析器,不同质荷比的二次离子在磁场中被分离开,经质谱检测仪器记录并成像,得出被分析样品表面的同位素的丰度、分布及组成信息^[51]。应用SIMS技术进行原位环境中微生物种类和功能表征的主要步骤为^[52]:在实验微宇宙培养或者原位条件下,用稳定同位素或者放射性同位素标记的底物(如PAHs)培养环境样品或者可培养的微生物,经过短期的同位素暴露过程后,将样品制备成表面平整、符合仪器真空条件的薄片样品进行SIMS分析。根据SIMS分析得到的样品表面同位素丰度的信息可以原位识别具有代谢功能的微生物细胞及其空间分布特征,再结合荧光原位杂交(FISH)、催化报告沉积荧光原位杂交(catalyzed reporter deposition fluorescent *in situ* hybridization, CARD-FISH)、卤素原位杂交(halogen *in situ* hybridization, HISH)等技术所获得的目标微生物空间分布信息,就能够在单细胞成像水平实现特定的物质代谢过程与复杂环境样品中的微生物群落组成的耦合(图3)。

SIMS技术具有极高的灵敏度和空间分辨率,可以对单细胞的代谢过程进行定量表征,在PAHs原位生物降解的研究中显示出巨大的潜力。DeRito等^[53]在土壤中加入¹³C标记的苯酚培养12 d后,利用SIMS对原位土壤样品进行分析,发现在¹³C-苯酚处理的土壤中,微生物¹³C的信号强度(¹³C¹⁴N⁻)相较于未标记苯酚处理的土壤提高了10~40倍,说明土壤中的功能微生物确实能够将¹³C同化到自身体内。该项研究显示SIMS技术在定性表征土壤中降解微生物方面的巨大可能性^[54]。Pumphrey等^[55]利用SIMS技术对一株

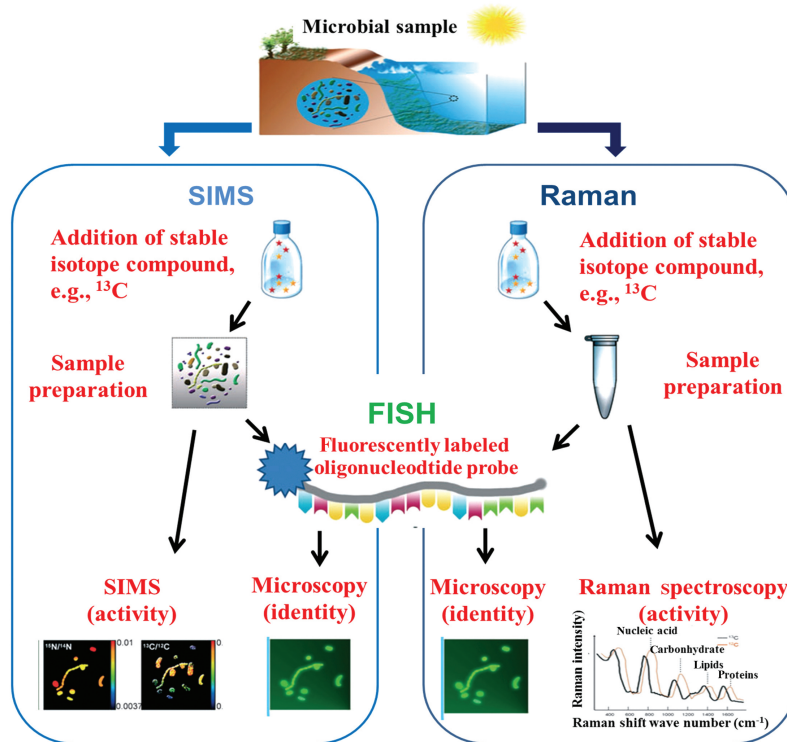


图3 SIMS-FISH、Raman-FISH技术示意图(根据参考文献[52]修改)

Fig.3 Schematic diagram of SIMS-FISH and Raman-FISH (modified from reference [52])

PAHs降解菌(*Pseudomonas putida* NCBI 9814-6)进行研究,发现SIMS成像图中 ^{13}C 的信号强度与纯菌细胞中 ^{13}C 的丰度呈显著的正相关关系,利用这种线性关系就可以根据 ^{13}C 的信号强度来预测未知样品(如土壤)中 ^{13}C 的丰度,进而可以计算单细胞对底物的代谢速率^[56]。因此,SIMS技术还可能应用于原位土壤中降解微生物代谢功能的定量分析^[57-58]。而且,随着SIMS技术的发展,最新的动态二次离子质谱Nano-SIMS 50L相较于传统的SIMS具有更高的分辨率及空间分辨率^[59],可以更为精确地对单细胞代谢功能进行定量测定。另外,通过SIMS技术与FISH技术结合的方法,人们还可能原位表征PAHs降解过程中的不同微生物类群的种间关系^[4,60]以及目标微生物类群的代谢途径^[61]等,实现微生物种群与代谢功能的直接耦合。

虽然SIMS技术在PAHs的原位生物降解研究中显示出前所未有的优势和重要的应用前景,但其仍存在很多问题^[62]:(1)样品制备困难。在制备可供SIMS分析的样品时,固定和脱水等过程可能导致待分析的元素发生转移、流动并影响微生物细胞的同位素组成,从而影响微生物功能的正确分析;(2)微生物识别困难。首先,由于SIMS技术往往与同位素

标记技术联合使用,标记过程中微生物交叉取食和同位素被稀释的风险可能造成微生物类群的错误识别。其次,虽然在SIMS分析之前可以利用FISH技术来识别环境样品中的微生物类群,但是将FISH技术获得的图像与SIMS分析的图像正确地联系在一起非常困难。尽管存在这些问题,未来基于SIMS技术的研究仍将有助于揭示自然环境中丰度较低但在PAHs降解过程中发挥重要功能的微生物种群。

5 结语与展望

宏基因组技术(meta-genomics)、稳定同位素探针技术(SIP)、拉曼光谱技术(Raman)、荧光原位杂交技术(FISH)以及二次离子质谱技术(SIMS)等表征方法的发展为研究PAHs的原位降解过程及分子机制提供了极大的可能性(表1)。但PAHs微生物降解过程的原位表征仍处于起步阶段,本质的揭示尚需要大量的实验探索:(1)虽然许多研究利用SIP技术发现了大量具有PAHs降解功能但难以分离培养的微生物类群,但目前对这些功能类群的遗传代谢通路、生理生态功能、PAHs降解机理等知之甚少。运用SIP技术与宏基因组技术结合的方法,从群落水平破译复杂环境中PAHs降解功能微生物全基因组信息,

表1 不同原位表征方法概览

Table 1 Overview of different *in situ* approaches

方法 Method	获取的信息 Information obtained	缺点 Disadvantage
Metagenomics	Identification of novel functional genes; Information on whole genome of collective members in microbial community	Assembling, annotation and data analysis is challenging due to massive datasets produced by sequence-based metagenomics; Screening techniques of novel genes are limited for screen-based metagenomics
Stable isotope probe (SIP)	Information on phylogeny of functional microbes	Determination of suitable substrate concentrations and incubation times is challenging; Cross feeding may occur during incubation
Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH)	Information on the abundance, identity and distribution of phylogenetically defined microbial populations and functional genes in the environment	Application to complex matrix (e.g., soil) is difficult
Raman spectroscopy (Raman)	Identifying microorganisms based on their cellular constituents (e.g., nucleic acids, proteins and lipids); Detection and visualization of metabolically active individual cells	Sensitivity is too low to detect the microbial cells with low metabolic activity
Second ion mass spectrometry (SIMS)	Detecting and quantifying microbial metabolic activity and metabolites at the single-cell level	Sample preparation is difficult; Identification of microorganisms is challenging

将成为研究难培养微生物生理代谢分子机制的有力工具; (2)虽然Raman-FISH、NanoSIMS-FISH技术能够在单细胞成像水平原位表征代谢活跃的微生物细胞及其系统分类信息,但目前较为成功的应用主要集中在微生物群落复杂性较低的环境样品中,而原位表征更为复杂的环境基质(如土壤)中的PAHs降解过程将成为Raman、NanoSIMS技术的发展方向; (3)未来,Raman、NanoSIMS技术与单细胞分离技术^[63]、全基因组扩增技术^[64]以及单细胞测序技术^[65]等的联合,将可能高通量地获得具有代谢功能的微生物细胞的全基因组信息,为研究单一细胞生理生化、遗传和演化规律的分子调控机理奠定基础; (4)随着各种原位表征技术的发展,今后的研究将更加关注环境因子如pH、水分、温度等对功能菌群的结构特征及空间分布的影响,进而为优化微生物降解功能的执行效率提供理论依据。综上,发展高灵敏度和高选择性的原位分析方法及表征技术,将为深入研究PAHs的原位降解过程及其分子机制以及实施PAHs污染缓解与修复提供科学基础。

参考文献 (References)

- Bamforth SA, Singleton I, Manning DA, Younger PL, Johnson KL. The role of minerals in catalysing manganese removal from mine water. *Geochim Cosmochim Acta* 2005; 69(10): 772.
- Zhang YX, Tao S, Cao J, Coveney RM. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons in China by county. *Environ Sci Technol* 2007; 41(3): 683-7.
- 刘增俊, 滕应, 黄标, 李振高, 骆永明. 长江三角洲典型地区农田土壤多环芳烃分布特征与源解析. *土壤学报*(Liu Zengjun, Teng Ying, Huang Biao, Li Zhengao, Luo Yongming. Distribution and sources analysis of PAHs in farmland soils in areas typical of the Yangtze river delta, China. *Acta Pedologica Sinica*) 2010; 47(6): 1110-7.
- McGenity TJ, Folwell BD, McKew BA, Sanni GO. Marine crude-oil biodegradation: A central role for interspecies interactions. *Aquat Biosyst* 2012; 8(1): 10.
- Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN, Perry R. A review of atmospheric polycyclic aromatic-hydrocarbons-sources, fate and behavior. *Water Air Soil Poll* 1991; 60: 279-300.
- Lu XY, Zhang T, Fang HHP. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl Microbiol Biot* 2011; 89(5): 1357-71.
- Heitkamp MA, Freeman JP, Miller DW, Cerniglia CE. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of ring oxidation and ring fission-products. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54(10): 2556-65.
- Habe H, Omori T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci Biotech Bioch* 2003; 67(2): 225-43.
- El Fantroussi S, Agathos SN. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol* 2005; 8(3): 268-75.
- Thompson IP, van der Gast CJ, Ciric L, Singer AC. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol* 2005; 7(7): 909-15.

- 11 Witzig R, Junca H, Hecht HJ, Pieper DH. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: Links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(5): 3504-14.
- 12 de Lorenzo V. Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotech* 2008; 19(6): 579-89.
- 13 Vanwonderghem I, Jensen PD, Ho DP, Batstone DJ, Tyson GW. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr Opin Biotech* 2014; 27: 55-64.
- 14 Cowan D, Meyer Q, Stafford W, Muyanga S, Cameron R, Wittwer P. Metagenomic gene discovery: Past, present and future. *Trends Biotechnol* 2005; 23(6): 321-9.
- 15 Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 2004; 304(5667): 66-74.
- 16 Daniel R. The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotech* 2004; 15(3): 199-204.
- 17 Brennerova MV, Josefiova J, Brenner V, Pieper DH, Junca H. Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environ Microbiol* 2009; 11(9): 2216-27.
- 18 Sierra-Garcia IN, Correa Alvarez J, de Vasconcellos SP, Pereira de Souza A, dos Santos Neto EV, de Oliveira VM. New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs. *PLoS One* 2014; 9(2): e90087.
- 19 Uchiyama T, Miyazaki K. Metagenomic screening for aromatic compound-responsive transcriptional regulators. *PLoS One* 2013; 8(9): e75795.
- 20 Singleton DR, Hu J, Aitken MD. Heterologous expression of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes from a novel pyrene-degrading Betaproteobacterium. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(10): 3552-9.
- 21 de Menezes A, Clipson N, Doyle E. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environ Microbiol* 2012; 14(9): 2577-88.
- 22 Yagi JM, Madsen EL. Diversity, Abundance, and consistency of microbial oxygenase expression and biodegradation in a shallow contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(20): 6478-87.
- 23 Guazzaroni ME, Herbst FA, Lores I, Tamames J, Pelaez AI, Lopez-Cortes N, *et al.* Metaproteogenomic insights beyond bacterial response to naphthalene exposure and bio-stimulation. *ISME J* 2013; 7(1): 122-36.
- 24 Chistoserdova L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnol Lett* 2010; 32(10): 1351-9.
- 25 Simon C, Daniel R. Metagenomic analyses: Past and future trends. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(4): 1153-61.
- 26 Uhlík O, Jecná K, Leigh MB, Macková M, Macek T. DNA-based stable isotope probing: A link between community structure and function. *Sci Total Environ* 2009; 407(12): 3611-9.
- 27 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* (Jia Zhongjun. Principle and application of DNA-based stable isotope probing—A review. *Acta Microbiologica Sinica* 2011; 51(12): 1585-94.
- 28 宋孟珂, 江龙飞, 王 琰, 罗春玲, 张 干. 稳定同位素探针技术在有机污染物生物降解中的应用. *微生物学通报* (Song Mengke, Jiang Longfei, Wang Yan, Luo Chunling, Zhang Gan. Application of stable isotope probing in biodegradation of organic pollutants. *Microbiology China*) 2014; 41(4): 699-711.
- 29 Peng JJ, Zhang Y, Su JQ, Qiu QF, Jia ZJ, Zhu YG. Bacterial communities predominant in the degradation of ¹³C₄-4,5,9,10-pyrene during composting. *Bioresour Technol* 2013; 143: 608-14.
- 30 Wang Y, Chen Y, Zhou Q, Huang S, Ning K, Xu J, *et al.* A culture-independent approach to unravel uncultured bacteria and functional genes in a complex microbial community. *PLoS One* 2012; 7(10): e47530.
- 31 Chemerys A, Pelletier E, Cruaud C, Martin F, Violet F, Jouanneau Y. Characterization of novel polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenases from the bacterial metagenomic DNA of a contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(21): 6591-600.
- 32 Huang WE, Ferguson A, Singer AC, Lawson K, Thompson IP, Kalin RM, *et al.* Resolving genetic functions within microbial populations: *In situ* analyses using rRNA and mRNA stable isotope probing coupled with single-cell Raman-fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(1): 234-41.
- 33 Herbst FA, Bahr A, Duarte M, Pieper DH, Richnow HH, von Bergen M, *et al.* Elucidation of *in situ* polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by functional metaproteomics (protein-SIP). *Proteomics* 2013; 13(18/19): 2910-20.
- 34 Neufeld JD, Wagner M, Murrell JC. Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age. *ISME J* 2007; 1(2): 103-10.
- 35 Neufeld JD, Vohra J, Dumont MG, Lueders T, Manefield M, Friedrich MW, *et al.* DNA stable-isotope probing. *Nat Protoc* 2007; 2(4): 860-6.
- 36 Uhlík O, Jecna K, Leigh MB, Mackova M, Macek T. DNA-based stable isotope probing: A link between community structure and function. *Sci Total Environ* 2009; 407(12): 3611-9.
- 37 ML P, JG G. Molecular hybridization of radio active DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64(4): 600-4.
- 38 Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6(5): 339-48.
- 39 EF D, GS W, NR P. Phylogenetic stains: Ribosomal RNA based probes for the identification of single microbial cells. *Science* 1989; 65: 5554-63.
- 40 Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR. Phylogenetic group-specific oligo-deoxynucleotide probes for identification of single microbial-cells. *J Bacteriol* 1988; 170(2): 720-6.
- 41 Schmid M, Schmitz-Esser S, Jetten M, Wagner M. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Implications for phylogeny and *in situ* detection. *Environ Microbiol* 2001; 3(7): 450-9.
- 42 Oerther DB, Perenthaler J, Schramm A, Amann R, Raskin L. Monitoring precursor 16S rRNAs of *Acinetobacter* spp. in activated sludge wastewater treatment systems. *Appl Environ Micro-*

- biol 2000; 66(5): 2154-65.
- 43 Wagner M. Single-cell ecophysiology of microbes as revealed by raman microspectroscopy or secondary ion mass spectrometry imaging. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63: 411-29.
- 44 Escoriza MF, Vanbriesen JM, Stewart S, Maier J. Studying bacterial metabolic states using Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2006; 60(9): 971-6.
- 45 Schuster KC, Urlaub E, Gapes JR. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: Spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *J Microbiol Meth* 2000; 42(1): 29-38.
- 46 Jarvis RM, Brooker A, Goodacre R. Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria. *Faraday Discuss* 2006; 132: 281-92.
- 47 Haider S, Wagner M, Schmid MC, Sixt BS, Christian JG, Hacker G, *et al.* Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of chlamydiae. *Mol Microbiol* 2010; 77(3): 687-700.
- 48 Huang WE, Griffiths RI, Thompson IP, Bailey MJ, Whiteley AS. Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Anal Chem* 2004; 76(15): 4452-8.
- 49 Huang WE, Stoecker K, Griffiths R, Newbold L, Daims H, Whiteley AS, *et al.* Raman-FISH: Combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence *in situ* hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environ Microbiol* 2007; 9(8): 1878-89.
- 50 Orphan VJ. Methods for unveiling cryptic microbial partnerships in nature. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12(3): 231-7.
- 51 Winograd N. Imaging mass spectrometry on the nanoscale with cluster ion beams. *Anal Chem* 2015; 87(1): 328-33.
- 52 Musat N, Foster R, Vagner T, Adam B, Kuypers MM. Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(2): 486-511.
- 53 DeRito CM, Pumphrey GM, Madsen EL. Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(12): 7858-65.
- 54 Herrmann AM, Clode PL, Fletcher IR, Nunan N, Stockdale EA, O'Donnel AG, *et al.* A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 2007; 21(1): 29-34.
- 55 Pumphrey GM, Hanson BT, Chandra S, Madsen EL. Dynamic secondary ion mass spectrometry imaging of microbial populations utilizing C-labelled substrates in pure culture and in soil. *Environ Microbiol* 2009; 11(1): 220-9.
- 56 Finzi-Hart JA, Pett-Ridge J, Weber PK, Popa R, Fallon SJ, Gunderson T, *et al.* Fixation and fate of C and N in the cyanobacterium *Trichodesmium* using nanometer-scale secondary ion mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(24): 6345-50.
- 57 Kuypers MM, Jorgensen BB. The future of single-cell environmental microbiology. *Environ Microbiol* 2007; 9(1): 6-7.
- 58 Lechene C, Hillion F, McMahon G, Benson D, Kleinfeld AM, Kampf JP, *et al.* High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry. *J Biol* 2006; 5(6): 20.
- 59 Guerquin-Kern JL, Wu TD, Quintana C, Croisy A. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Bba-Gen Subjects* 2005; 1724(3): 228-38.
- 60 Behrens S, Losekann T, Pett-Ridge J, Weber PK, Ng WO, Stevenson BS, *et al.* Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(10): 3143-50.
- 61 Ho DP, Jensen PD, Batstone DJ. Methanosarcinaceae and acetate-oxidizing pathways dominate in high-rate thermophilic anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(20): 6491-500.
- 62 胡行伟, 张丽梅, 贺纪正. 纳米二次离子质谱技术(NanoSIMS)在微生物生态学研究中的应用. *生态学报*(Hu Hangwei, Zhang Limei, He Jizheng. Application of nano-scale secondary ion mass spectrometry to microbial ecology study. *Acta Ecologica Sinica*) 2013; 33(2): 348-57.
- 63 Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von Caron G. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24(4): 429-48.
- 64 Woyke T, Xie G, Copeland A, González JM, Han C, Kiss H, *et al.* Assembling the marine metagenome, one cell at a time. *PLoS One* 2009; 4: e5299.
- 65 Rusk N. Cheap third-generation sequencing. *Nat Methods* 2009; 6(4): 244-5.
- 66 VerBerkmoes NC, Denev VJ, Hettich RL, Banfield JF. Systems biology: Functional analysis of natural microbial consortia using community proteomics. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(3): 196-205.