

# 稳定同位素技术在污染环境生物修复研究中的应用\*

刘慧杰<sup>1</sup> 田蕴<sup>1</sup> 郑天凌<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>厦门大学生命科学院应用与环境微生物研究所; <sup>2</sup>近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361005)

**摘要** 稳定同位素技术主要应用于地球化学,它是将人工合成的同位素标记特定的化合物,追踪标记物在生命活动中的变化规律,目前该项技术也广泛应用于环境微生物学、生态学、生物医学等领域.生物修复是利用存在于土壤、地下水和海洋等环境中的生物特别是微生物将有毒、有害的污染物降解为二氧化碳和水,或转化为无害物质,从而使污染的生态环境修复为正常生态环境的过程.这些降解微生物都来自于小部份可培养微生物,对于大部份未可培养降解微生物,通常在实验室条件下很难得到.而利用稳定同位素技术,如<sup>13</sup>C标记底物,收集利用该底物的微生物核酸,就可以得到具有降解作用的功能微生物,为环境污染生物修复提供重要的菌源和功能基因.环境中的许多物质都可以用SIP来标记,这些标记物主要有 PLFA - SIP, DNA - SIP, RNA - SIP等,它们都可以用来在复杂样本中进行有特殊代谢功能微生物的鉴定和分析,在利用微生物进行生物修复中具有重要的意义.图 2表 1参 42

**关键词** 稳定同位素; 环境污染; 生物修复; 未可培养微生物

CLC X172 X505

## Application of Stable Isotope Probing in Bioremediation of Polluted Environment\*

LU Huijie<sup>1</sup>, TAN Yun<sup>1</sup> & ZHENG Tianling<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, <sup>2</sup>State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen 361005, Fujian, China)

**Abstract** Stable isotope probing (SIP) has been widely applied in geochemistry, which uses special organic chemicals having been labeled by man-made SIP to explore diversifications of the labeled compounds in life process. At present, SIP is also used in many fields, such as environmental microbiology, ecology and biological medicine. Bioremediation is a process that the polluted ecological environment is remediated into normal ecological environment, and the toxic and harmful pollutants are degraded into carbon dioxide and water, or transformed into harmless compounds by organisms, especially the microorganisms existing in soil, underground water, sea water and so on. These microbes capable of degrading organic pollutants only come from a small portion of cultivable microbes, but a large portion of uncultured ones cannot be obtained easily under lab conditions. If SIP, such as <sup>13</sup>C labeled substrates, is used, the correlated degrading genes can be obtained by collection of nucleic acid in microbes utilizing those substrates, and at the same time, the important microbial sources and their functional genes can be provided for the bioremediation of the pollutants. Many materials in the environment can be labeled with SIP, including PLFA - SIP, DNA - SIP and RNA - SIP. All the methods can be used to identify and analyze functional microbes, and they are greatly significant for bioremediation. Fig 2, Tab 1, Ref 42

**Keywords** stable isotope probing; environmental pollutant; bioremediation; uncultured microbe

CLC X172 X505

近年来,人工合成的化合物从种类和数量上都日趋增加,但某些有毒、有害的化合物对环境造成了污染,由此对人体健康和生态系统产生危害.部份化合物具有持久性、生物富集性和毒性(致癌、致畸、致突变),被称为持久性有机污染物(Persistent organic pollutants, POPs),已成为一个新的全球性环境问题,引起了各国科学家的极大关注.国际上许多国家尤其是美国、英国、法国、德国、日本、挪威、澳大利亚、奥地利等一些西方国家相继投入大量的人力和物力,对 POPs 的污染现状、环境

迁移及转化行为、生态毒性、污染源控制策略以及污染治理途径等各个方面已经开展了基础研究和应用研究.我国近年来也开展了对城市空气、自来水和主要河流中有机污染物的调查,如长江主要排污口、丹江口水库、三峡库区、污水灌溉区等,发现包括 POPs 在内的有机物污染形势相当严峻.国家环保总局于 1989 年 4 月通过了“水中优先控制污染物黑名单”,包括有毒化学污染物 14 类 68 种,有机污染物 58 种,其中有很多是 POPs 物质.它们主要来自农药、石化、印染、制药、塑料橡胶等行业,包括酚类、卤代有机物、多环芳族、硝基化合物、某些元素化合物(如有机磷、有机汞等)、硫醚、砷类、某些杂环化合物、含双键三键或叔季碳原子碳架化合物等<sup>[1]</sup>.多环芳烃、多氯联苯、二噁英和有机氯农药等高危险降解有机污染物<sup>[2]</sup>对人类及其居住环境具有破坏性的影响,危害极大,成为人们关注焦点.因此, POPs 的处理研究一直是环保领域中的热点和

收稿日期: 2006-02-27 接受日期: 2007-04-29

\*国家自然科学基金(No. 40576054, 40476047)和长江学者和创新团队发展计划(40521003)资助项目. Supported by the National Natural Science Foundation of China and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team of Xiamen University

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn & microzh@xmu.edu.cn)

难点,对其特点、危害以及治理方法进行研究,具有重大意义<sup>[3,4]</sup>。

POPs大都由人工合成,不易降解,常规方法处理难以奏效。其处理方法主要有物化处理和生物处理。物化处理一般具有处理成本高、矿化不完全、易产生二次污染等缺点,故常采用生物处理,以提高可生化性。生物处理投资小,处理成本较低,矿化完全,同时亦是自然环境中消除污染的最佳途径,因此日益受到关注。人们通过对降解菌种寻找、筛选、驯化和反应工艺改进与优化来提高有机污染物的降解效率,收到了较好的效果。因此,生物修复是去除 POPs行之有效的方法<sup>[5,6]</sup>。

## 1 生物修复研究的现状及技术关键

在环境中积累并引起污染的许多合成有机化合物,最初能抵抗微生物袭击,难以被降解。当环境条件发生变化后,某些微生物通过自然突变形成新的菌种,更多的是可能通过形成诱导酶系具备了新的代谢功能,从而可降解或转化外来化合物。故只要选择适当的微生物群落,创造和保持最佳环境条件,几乎所有的有机物都能找到使之降解或转化的微生物。目前,对于生物修复的研究就是要寻找相应污染物的生物降解菌,并对这些降解菌进行鉴定和降解条件的优化。国内外学者对这方面的研究已有大量的文献报道。微生物降解是环境中去除多环芳烃 (PAHs) 的主要途径,是 PAHs 生物修复的重要基础<sup>[7]</sup>。张杰等<sup>[8]</sup>通过选择性富集培养,从辽河油田石油污染土壤中分离到一株 PAHs 降解菌 ZL5,它能以菲和芘为唯一碳源生长,但是不能利用萘。16S rDNA 核苷酸序列分析表明,ZL5 属于变形细菌 A 亚类中的鞘氨醇单胞菌属,对该菌株质粒进行研究后,发现鞘氨醇单胞菌 ZL5 降解 PAHs 的功能和质粒有关。徐虹等<sup>[9]</sup>在厦门石油码头采集水样,以芘、菲、蒽、芘为碳源和能源筛选、分离 PAHs 降解的菌,得到 14 株能降解利用 PAHs 的菌株,通过 HPLC 分析,发现 10 号菌的降解能力最强,并对其降解性能进行了测定。同时经生理生化鉴定和 16S rDNA 序列对比分析,确定 10 号菌株属于假单胞菌属,命名为 *Pseudomonas* sp. FAPIQ。余水静等<sup>[10]</sup>从南昌钢铁公司焦化污水处理厂的活性污泥中分离出 64 株能降解苯酚的细菌,通过耐受性试验从中筛选出 2 株降解活性较高的苯酚降解菌,编号为 F-38 和 F-

64。经研究 F-38 和 F-64 都为 G<sup>-</sup> 菌,它们对苯酚降解适宜条件为温度 30℃,pH 值 8~9,通气有利于苯酚的降解。MacGillivray 等<sup>[11]</sup>对分离得到的 13 株酵母菌的转化菲实验表明,它们降解活力范围较宽,120 h 的降解率为 0.15~8.15 μmol/g,相当于每个细胞降解 8.04 × 10<sup>-10</sup>~10.80 × 10<sup>-12</sup> μmol 菲,与报道的菲降解菌的降解率相当。不少有机物,特别是生物难降有机物,仅用单一菌株不能完成降解或只能微弱进行,必须借助两种或两种以上微生物的共生和互生作用共同完成<sup>[12,13]</sup>。在纯培养条件下不能明显降解的物质常能在混合培养条件下降解或转化,微生物的共代谢作用仍是污染物降解的主要机制<sup>[14]</sup>,混合菌培养技术在生产实际中也具有重要意义。

由以上研究可知,对于生物修复的研究主要是在受污染地区寻找污染物降解菌,但目前寻找的降解菌株都是基于压力筛选并在实验室纯培养条件下得到的,且得到的微生物多为单一污染物降解菌。大量研究表明,传统的微生物培养方法只能获得环境样品中不到实际 1% 的微生物<sup>[15]</sup>,而它们对环境污染物的生物修复的贡献却无法估量。由此可见,寻找研究未可培养的降解微生物是重要的发展方向,采用新技术成为寻找未可培养降解微生物进行污染物生物修复的关键。目前,对于该领域的研究报道尚不多见<sup>[16]</sup>。本文论述了采用稳定同位素技术寻找、分离未可培养的功能微生物及其降解基因,为环境污染物的生物修复提供重要菌源和降解基因。

## 2 生物修复研究的新思路——应用稳定同位素技术寻找未可培养 POPs 降解微生物

### 2.1 稳定同位素简介

同位素是指原子序数相同(即质子数目相同)而中子数不同的元素形式,具有相同原子序数但不同中子数目且不具放射性的元素称为稳定同位素 (Stable isotope probing, SIP)。地球上几乎所有具有生物学意义的元素均存在两种或两种以上的稳定同位素形式。例如,碳有<sup>12</sup>C 和<sup>13</sup>C 两种稳定同位素,氧有<sup>16</sup>O、<sup>17</sup>O 和<sup>18</sup>O 三种稳定同位素。核酸中部份原子的含量及其同位素的天然丰度见表 1。

表 1 核酸中部分原子的含量及其同位素的天然丰度<sup>[17]</sup>

Table 1 Content of elements in nucleic acid and natural abundance of isotopes<sup>[17]</sup>

Elements that constitute nucleic acids and some properties that are important for SIP					
Nucleotide unit	H	C	N	O*	P
Number of atoms per nucleotide unit in DNA					
D-2-deoxyribose backbone	7	5	0	5	1
(A) Deoxyadenylate	11	10	5	5	1
(G) Deoxyguanylate	11	10	5	6	1
(T) Deoxythymidylate	12	10	2	7	1
(C) Deoxycytidylate	11	9	3	6	1
Isotope natural abundance (atom, %)*					
Light stable isotope	( <sup>1</sup> H) 99.99	( <sup>12</sup> C) 98.93	( <sup>14</sup> N) 99.63	( <sup>16</sup> O) 99.76	( <sup>31</sup> P) 100
Heavy stable isotope (s)	( <sup>2</sup> H) 0.01	( <sup>13</sup> C) 1.07	( <sup>15</sup> N) 0.37	( <sup>17</sup> O) 0.04, ( <sup>18</sup> O) 0.20	

\* In RNA there is one additional oxygen atom present in each ribonucleotide

稳定同位素无放射性,具有安全、准确及不干扰自然等优点,还具有综合长期生物和地球化学过程和联系不同系统成分的能力,起着在时间、空间上联络的作用,在地球化学和生态学

研究中具有独特的应用价值。

稳定同位素技术的应用包括两方面:自然丰度测定和作为示踪物。作为示踪原子,稳定同位素比放射性同位素更具有优

点: 没有放射性; 常用的碳、氢、氧、氮都没有生物毒性; 用质谱可直接测定出稳定核素标记的原子在化合物中的位置. 稳定同位素技术起源于地球化学, 现可用于生态学、生物化学等领域, 特别是在环境微生物学领域具有较好的应用前景, 在生物降解和生物修复研究中具有潜在的应用价值.

## 2.2 稳定同位素技术在环境微生物学研究中的应用原理

稳定同位素标记法主要是应用  $^{13}\text{C}$  标记营养底物来培养

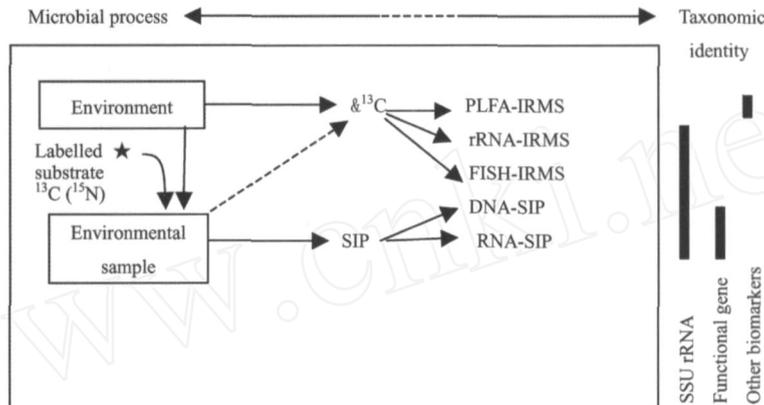


图 1 稳定同位素标记法的应用<sup>[17]</sup>

Fig 1 Application of stable isotope probing<sup>[17]</sup>

## 2.3 稳定同位素标记法在生物修复中的应用

### 2.3.1 磷脂脂肪酸稳定同位素标记法 (PLFA - SIP)

磷脂是构成生物细胞膜的主要组分, 约占细胞干重的 5%, 在细胞死亡时, 细胞膜很快被降解, 磷脂脂肪酸被迅速地代谢掉, 因此它只在活细胞中存在, 十分适合于微生物群落的动态监测<sup>[18]</sup>. 另一个重要因素是脂肪酸具有属的特异性, 特殊的甲基脂肪酸已经被作为微生物分类的依据. PLFA 分析法首先将磷脂脂肪酸部分用 Bligh 和 Dyer 法提取出来<sup>[19]</sup>, 然后用气相色谱分析, 得出 PLFA 谱图, 分析群落的微生物结构发生变化<sup>[20]</sup>. 磷脂脂肪酸 (PLFA)、脂肪酸以及甲基脂肪酸酯在群落动态分析上的应用十分广泛. Wilkinson 等<sup>[21]</sup>用 PLFA 谱图法找出了微生物群落结构与树木根系的关系. Langworthy 等<sup>[22]</sup>利用 PLFA 谱图分析了多环芳香碳化合物 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 在环境中的微生物降解.

Boschker 等<sup>[23]</sup>报道了在淡水底泥沉积物中, 应用稳定同位素技术鉴定了氧化作为温室效应之一的  $\text{CH}_4$  的微生物. 将稳定同位素标记的  $\text{CH}_4$  混入底泥沉积物中, 这些标记物进入到吸收甲烷的微生物中的极性脂肪酸中 (PLFA), 抽提这些微生物的极性脂肪酸, 应用同位素比率质谱仪, 分离和分析  $^{13}\text{C}$  的富集情况, SIP 富集标记 PLFA 的某种微生物是主要应用甲烷做为碳源的优势菌, 通过对标记的 PLFA 进行鉴定, 认为利用甲烷的两株菌为 *Methylobacter* 和 *Methylobacterium*. 最后较肯定地得出结论, 这些微生物与环境中的甲烷的氧化有重要的关系.

Hanson 等<sup>[24]</sup>首次使用 PLFA - SIP 技术, 采用  $^{13}\text{C}$  标记甲苯分析 PLFA 中富集的  $^{13}\text{C}$ , 研究甲苯的生物降解, 探讨了微生物在强化自然界中甲苯生物修复中的作用. Pelz 等<sup>[25]</sup>在 2001 年报道了应用 PLFA - SIP 技术在石油烃污染水体的底泥沉积物中进行甲苯的生物降解性研究. Alexandrino 等<sup>[26]</sup>在 2001 年

生物样本, 根据标记  $^{13}\text{C}$  与未标记的  $^{12}\text{C}$  在密度梯度离心介质中的重力不同, 将  $^{13}\text{C}$  标记的样本与未标记的  $^{12}\text{C}$  样本分离, 选择性地回收  $^{13}\text{C}$  标记的 DNA, 在鉴定微生物的同时研究其代谢功能. 环境中的许多物质都可以用 SIP 来标记, 这些标记物主要有磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acid - SIP, PLFA - SIP)、DNA - SIP、RNA - SIP 等, 它们都可以用来在复杂样本中进行有特殊代谢功能微生物的鉴定和分析 (图 1)<sup>[17]</sup>, SIP 对于未可培养微生物的分离和功能基因的鉴定, 在利用微生物进行生物修复中具有重要的意义.

也报道了应用 PLFA - SIP 技术鉴定苯乙烯降解微生物: 利用 SIP 标记苯乙烯的气体处理生物滤膜, 在该滤膜上富集并寻找鉴定降解微生物; 与其它研究方式所不同的是, 他们应用  $^2\text{H}$  而不是  $^{13}\text{C}$  标记底物, 这也是首次应用 SIP 技术对工业污染进行生物修复研究.

### 2.3.2 DNA 稳定同位素标记法 (DNA - SIP)

由于稳定同位素标记的原子与未标记的原子在浮力密度上存在差异, 因此向 DNA 片段中参入高比例的天然丰度很低的稳定同位素能够增加标记与未被标记的 DNA 片段的浮力密度差异, 使其在密度梯度离心中得到分离, 如图 2 所示.

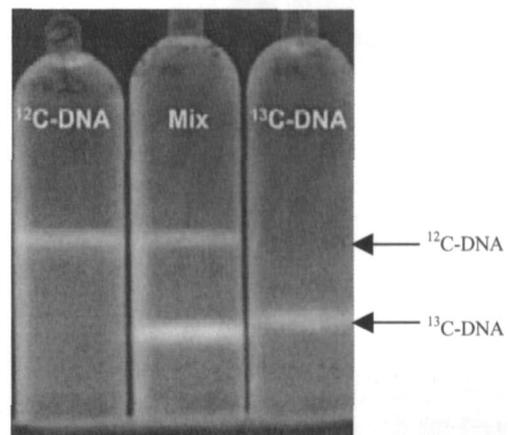


图 2 稳定同位素标记  $^{13}\text{C}$  与未标记  $^{12}\text{C}$  的  $\text{C}_5\text{Cl}_4/\text{EB}$  密度梯度离心效果<sup>[27]</sup>

Fig 2 Equilibrium centrifugation of isotopically labeled DNA of  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  in  $\text{C}_5\text{Cl}_4/\text{ethidium bromide}$  gradients<sup>[27]</sup>

Radajewski 等<sup>[27]</sup>用  $^{13}\text{C}$  标记甲醇后, 将标记底物投加到橡树林土壤中, 培养一段时间后, 经密度梯度离心分离  $^{13}\text{C}$  标记

的 DNA 带,经 16S rRNA 扩增后,鉴定出这些微生物是可利用甲醇做为碳源的微生物种群,为寻找甲醇的生物降解菌提供了依据。Morris 等<sup>[28]</sup>应用 DNA - SIP 技术在泥炭土壤中鉴定了可利用甲烷的微生物。Whitby 等<sup>[29]</sup>在淡水沉积物中应用 DNA - SIP 技术寻找到氨氧化微生物。DNA - SIP 技术在生物修复中对于微生物的寻找和鉴定起着重要的作用。

**2.3.3 RNA 稳定同位素标记法 (RNA - SIP)** RNA - SIP 与 DNA - SIP 的根本不同在于前者用的是活跃的微生物“转录组”,因此,其重要优点是微生物活跃的 RNA 是生物合成的,而不是用 PCR 等方法体外合成的。并且,在微生物高密度生长的生物反应器中 RNA 被  $^{13}\text{C}$  标记的速度比 DNA 快得多,表明 RNA - SIP 可能比 DNA - SIP 具有更高的灵敏性。在 RNA - SIP 中,有可能减小底物的量或浓度,可以缩短培养时间,它们都与微生物功能和分类鉴定有关,比 DNA - SIP 有更大的优势。最近,Manfield 等<sup>[30]</sup>在运转的工业苯酚降解的生物反应器中寻找鉴定降解苯酚的微生物,用  $^{13}\text{C}$  标记苯酚,在生物修复过程中利用 RNA - SIP 技术,结果表明,在好氧生物反应器中 *Thauera* 菌种是主要的苯酚降解菌种。

2005 年,我国学者陆雅海在 Science 杂志上对 SIP 技术的应用进行了研究报道<sup>[31]</sup>:用  $^{13}\text{C}$  标记  $^{13}\text{CO}_2$ ,原位处理进行光合作用的水稻,提取其根围土壤总 RNA,结果发现, $^{13}\text{C}$  进入到甲烷古菌的 RNA 中,表明水稻田中的  $\text{CH}_4$  是由甲烷古菌产生。同时对其总 DNA 构建文库,应用 16S rRNA 扩增进行系统发育分析,发现了目前尚未培养的古菌<sup>[32]</sup>。

### 2.3.4 原位荧光杂交和二次离子质谱仪 (FISH - SMS)

Ophan 等<sup>[33, 34]</sup>在 2001 年采用了稳定同位素原位荧光杂交和二次离子质谱仪 (Fluorescence *in situ* hybridization and secondary ion mass spectrometry, FISH - SMS) 技术研究群落功能,用  $^{13}\text{C}$  标记的甲烷混入海洋沉积物,通过 FISH 方法进行鉴定,最后应用 SMS 分析标记的  $^{13}\text{C}$  的含量。天然  $^{13}\text{C}$  的丰度是非常低的,测定结果表明  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  比例明显增高。实验结果发现了特殊性分解甲烷的厌氧菌甲烷八叠球菌目 (Methanosarcinales) 古菌,它耗尽了  $^{13}\text{C}$  标记的甲烷,通过 FISH - SMS 方法分析,表明在深海沉积物中消耗海洋甲烷的是甲烷古菌。目前应用 FISH - SMS 进行生物修复研究尚未得到推广。

**2.3.5 小亚基核糖体 RNA 同位素比率质谱仪 (SSU rRNA - RMS)** 小亚基核糖体 RNA (Small - subunit rRNA, SSU rRNA) 有特殊的微生物系统发生信息,应用同位素比率质谱仪 (RMS) 测定 SIP 标记的 SSU rRNA,对研究种间关系具有重要的作用。MacGregor 等<sup>[35]</sup>应用生物素标记的耙序列磁珠探针与特殊功能的 rRNA 分子杂交,捕获 SSU rRNA 分子,该方法对研究实验室条件下生长培养的微生物具有潜在的作用。SSU - RMS 技术所面临的关键点和难点在于分离到足够的 SIP 标记的 rRNA,期望今后在生态学和生物修复研究领域能得到广泛应用。

## 3 展望

稳定同位素技术在生物修复过程中的研究方法多样,不同的方法各有优势。PLFA 虽然能提供微生物的鉴定信息,但关于菌种间发育信息相对较低,它对于研究可培养的微生物具有较大的优势。DNA - SIP 比 PLFA 可能提供更多的系统发育信

息,但应用该技术需要 SIP 高度富集,如进行密度梯度离心时, DNA 上一定要有 15% ~ 20% 的  $^{13}\text{C}$  标记的原子才能被离心分开<sup>[27]</sup>,大部份 DNA 复制合成的环境在自然条件下并不是最优化的,用 SIP 标记的底物被菌体利用进入菌体 DNA 的效率并不高。当采用 RNA - SIP 技术时,被标记的 RNA 又有较高的降解率。虽然 SIP 生物标记的方法很多,但对于解决不同的生物修复问题应选用不同的方法。当需要解决的问题是“是哪一种微生物可以利用底物?”,可以选择 PLFA、DNA 和 RNA - SIP 等方法;当需要解决的问题是“这些微生物利用这些底物了吗?”,可以选择 FISH - SIP 和 SSU - RMS 等方法。目前认为,进行生物修复的主要手段是寻找功能微生物进行生物降解,使用稳定同位素进行标记的分子生物学方法为生物修复的研究提供了较好的技术支持。

本实验室前期研究表明,在研究石油污染的生物修复过程,多环芳烃 (PAHs) 降解菌的数量与污染物的污染程度呈正相关<sup>[36, 37]</sup>。因此,在生物修复研究中,传统的方法是在污染较重的环境中用压力梯度法寻找其降解功能菌,但这些方法所寻找的微生物都是局限于实验室条件下可培养的微生物,而对于自然界中数量更大 (99% 以上)<sup>[38]</sup>、功能更强的未可培养微生物的寻找方面就具有明显的局限性,使用 SIP 技术在研究未可培养微生物及功能微生物的代谢过程则存在着明显的优势,可以将具有生物修复作用微生物的功能基因分离,这些功能基因包括可培养和未可培养微生物的功能基因。SIP 技术在生物修复研究中为人们寻找功能微生物和降解基因提供重要的菌源,对于环境生物修复的研究和应用有着重要的意义。

稳定同位素技术在生物修复研究中对于寻找功能基因和未可培养微生物虽比传统方法更具有优势,但 SIP 技术在生物修复中的应用目前正处于起步阶段。目前国内将 SIP 技术主要应用于目标测试物的追踪<sup>[39, 40]</sup>,或是作为污染源示踪原子进行分析上<sup>[41, 42]</sup>。SIP 技术凭借其强大优势,在未可培养微生物的寻找、功能基因筛选、生化代谢途径的研究、蛋白功能等方面存在着巨大潜能,在生物修复研究中将会得到更广泛的应用。

## References

- 1 Yu G (余刚), Huang J (黄俊), Zhang PY (张彭义). Persistent organic pollutants: one of the important global environmental problems. *Environ Prot* (环境保护), 2004, 4: 37 ~ 39
- 2 Rossini P, Guerzoni S, Matteucci G, Gattolin M, Ferrari G, Raccanelli S. Atmospheric fall-out of POPs (PCDD - Fs, PCBs, HCB, PAHs) around the industrial district of Porto Marghera, Italy. *Sci Total Environ*, 2005, 349 (1 ~ 3): 190 ~ 200
- 3 Lu YL, Giesy JP. Science-based decision-making to reduce risks from persistent organic pollutants (POPs). *Chemosphere*, 2005, 60 (6): 729 ~ 730
- 4 Tieyu W, Yonglong L, Hong Z, Yajuan S. Contamination of persistent organic pollutants (POPs) and relevant management in China. *Environ Int*, 2005, 31 (6): 813 ~ 821
- 5 Murdock LM, Lin CA. Searching for microbes and other bioremediation tools. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1997, 214: 10
- 6 Li YP (李玉平), Cao HB (曹宏斌), Zhang Y (张懿). Biological treatment of biorefractory organic pollutants. *Mod Chem Ind* (现代化

- 工), 2004, **24** (4): 56~59
- 7 Tian Y (田蕴), Zheng TL (郑天凌), Hu Z (胡忠). Advances on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine environment *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, **9** (4): 439~443
- 8 Zhang J (张杰), Liu YS (刘永生), Feng JX (冯家勋), Bai XL (柏学亮), Zhang ZZ (张忠泽). Isolation and identification of PAHs-degrading strain ZL5 and its degradative plasmid *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, **9** (4): 433~435
- 9 Xu H (徐虹), Zhang J (章军), Liu CL (刘陈立), Shao ZZ (邵宗泽). Isolation and identification of PAHs-degrading strains and their degradation capability *Mar Environ Sci* (海洋环境科学), 2004, **23** (3): 61~64
- 10 Yu SJ (余水静), Li JQ (李杰庆), Song QH (宋秋华), Guo YH (郭燕华). Isolation and degrade characterization of two phenol-degrading bacteriums *Biotechnology* (生物技术), 2005, **15** (3): 62~64
- 11 MacGillivray AR, Shiaris MP. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (5): 1613~1618
- 12 Trzesicka MD, Ward OP. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil *Can J Microbiol*, 1995, **41** (6): 470~476
- 13 Ko SH, Lebeault JM. Effect of a mixed culture on co-oxidation during the degradation of saturated hydrocarbon mixture *J Appl Microbiol*, 1999, **87** (1): 72~79
- 14 Zheng TL (郑天凌), Zhuang TC (庄铁城), Cai LZ (蔡立哲), Tian Y (田蕴), Guo CL (郭楚玲), Xu MZ (徐美珠), Li SQ (李少菁). The role of microbes in bioremediation of marine polluted environment *J Xiamen Univ Nat Sci Ed* (厦门大学学报自然科学版), 2001, **40** (2): 524~534
- 15 Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms *Microbiol & Mol Biol Rev*, 2004, **68** (4): 669
- 16 Huang X (黄栩), Luo YR (骆苑蓉), Hu Z (胡忠), Tian Y (田蕴), Zheng TL (郑天凌). Recent advance in the study of persistent organic pollutants bioremediation *Acta Sci Circumst* (环境科学学报), 2006, **26** (3): 1~9
- 17 Radajewski S, McDonald R, Murrell JC. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14** (3): 296~302
- 18 Fouchard S, Abdellaoui MZ, Boulanger A, Liopiz P, Neunlist S. Influence of growth conditions on *Pseudomonas fluorescens* strains: a link between metabolite production and PLFA profile *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **251** (2): 211~218
- 19 Mills CT, Dias RF, Graham D, Mandernack KW. Determination of phospholipid fatty structures and stable carbon isotope composition of deep-sea sediments of the Northwest Pacific, ODP site 1179. *Mar Chem*, 2006, **98** (2~4): 197~209
- 20 Evershed RP, Crossman ZM, Bull D, Mottram H, Dungait JA, Maxfield PJ, Brennan EL.  $^{13}\text{C}$ -Labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17** (1): 72~82
- 21 Wilkinson SC, Anderson JM. Spatial patterns of soil microbial communities in a Norway *Microb Ecol*, 2001, **42** (3): 248~255
- 22 Langworthy DE, Stapleton RD, Saylor GS, Findlay RH. Lipid analysis of the response of a sedimentary microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbons *Microb Ecol*, 2002, **43** (2): 189~198
- 23 Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, Bos D, de Graaf W, Pel R, Pardes RJ, Cappenberg TE. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$ -labelling of biomarkers *Nature*, 1998, **392** (6678): 801~805
- 24 Hanson JR, Macalady JL, Harris D, Scow KM. Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil *Appl & Environ Microbiol*, 1999, **65** (12): 5403~5408
- 25 Pelz O, Chatzinotas A, Zarda-Hess A, Abraham WR, Zeyer J. Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using  $^{13}\text{C}$ -incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **38**: 123~131
- 26 Alexandrino M, Knief C, Lipski A. Stable-isotope-based labelling of styrene-degrading microorganisms in biofilters *Appl & Environ Microbiol*, 2001, **67** (10): 4796~4804
- 27 Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology *Nature*, 2000, **403** (6770): 646~649
- 28 Morris SA, Radajewski S, Willison TW, Murrell JC. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing *Appl & Environ Microbiol*, 2002, **68** (3): 1446~1453
- 29 Whitby CB, Hall H, Pickup R, Saunders JR, Ineson P, Parekh NR, McCarthy A.  $^{13}\text{C}$  incorporation into DNA as a means of identifying the active components of ammonia-oxidizer populations *Lett Appl Microbiol*, 2001, **32** (6): 398~401
- 30 Manefeld M, Whiteley AS, Ostle N, Ineson P, Bailey MJ. Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function *Rapid Commun Mass Spectrometry*, 2002, **16** (23): 2179~2183
- 31 Lu YH, Conrad R. *In situ* stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere *Science*, 2005, **309** (5737): 1088~1090
- 32 Lu YH, Lueders T, Friedrich MW, Conrad R. Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing *Environ Microbiol*, 2005, **7** (3): 326~336
- 33 Ophan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF. Methane-consuming Archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis *Science*, 2001, **293** (5529): 484~487
- 34 Ophan VJ, House C, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, **99** (11): 7663~7668
- 35 MacGregor BJ, Buchert V, Fleischer S, Amann R. Isolation of small-subunit rRNA for stable isotopic characterization *Environ Microbiol*, 2002, **4**: 451~464
- 36 Tian Y (田蕴), Zheng TL (郑天凌), Wang XH (王新红), Luo YR (骆苑蓉), Zhang Y (张勇). Contamination characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons and bioremediation strategy in sediments of Western Xiamen Harbor and its adjacent sea area *J Oceanogr Taiwan Strait* (台湾海峡), 2003, **22** (2): 192~200
- 37 Tian Y, Zheng TL, Wang XH. PAHs contamination and PAH-degrading bacteria in Xiamen Western Sea *Chin Spec & Bioavail*, 2003, **14**: 25~33

- 38 Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (8): 4748 ~ 55
- 39 Peng L (彭林), Bai ZP (白志鹏), Zhu T (朱坦), Xu YC (徐永昌), Li J (李剑), Feng YC (冯银厂). Origin of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Chinese cities using compound-specific stable carbon isotopic analysis *Environ Sci (环境科学)*, 2004, **25**: Sup, 16 ~ 20
- 40 Sun YA (孙雨安), Liu BX (刘保霞), Cheng DX (程定玺), Yang JZ (杨冀州), Xie B (谢冰). Stable isotope and its application in healthy laboratory technology. *Chin J Health Lab Technol (中国卫生检验杂志)*, 2002, **37** (1): 67 ~ 69
- 41 Zhang D (张东), Yin GX (尹国勋), He YX (贺玉晓). Application of stable isotope methods to tracing the pollution source of groundwater *J Jiaozuo Inst Technol Nat Sci (焦作工学院学报自然科学版)*, 2004, **23** (2): 140 ~ 142
- 42 Yuan JP (苑金鹏), Zhong NN (钟宁宁), Wu SP (吴水平). Stable carbon isotopic composition of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and its implications for the pollutants tracing *Acta Sci Circumst (环境科学学报)*, 2005, **25** (1): 81 ~ 85

www.cnki.net