

# 稳定性同位素探测技术在微生物生态学研究中的应用

葛 源, 贺纪正\*, 郑袁明, 张丽梅, 朱永官

(中国科学院生态环境研究中心 系统生态国家实验室, 北京 100085)

**摘要:**稳定性同位素标记技术同分子生物学技术相结合而发展起来的稳定性同位素探测技术(stable isotope probing, SIP),在对各种环境中微生物群落组成进行遗传分类学鉴定的同时,可确定其在环境过程中的功能,提供复杂群落中微生物相互作用及其代谢功能的大量信息,具有广阔的应用前景。其基本原理是:将原位或微宇宙(microcosm)的环境样品暴露于稳定性同位素富集的基质中,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,参与各类物质如核酸(DNA 和 RNA)及磷脂脂肪酸(PLFA)等的生物合成,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,从而将微生物的组成与其功能联系起来。在介绍稳定性同位素培养基质的选择及标记方法、合适的生物标志物的选择及提取分离方法的基础上,举例阐述了此项技术在甲基营养菌、有机污染物降解菌、根际微生物生态、互营微生物、宏基因组学等方面的应用。

**关键词:**稳定性同位素探测技术;微生物生态;微生物功能;应用

文章编号:1000-0933(2006)05-1574-09 中图分类号:Q93.3;Q938.1 文献标识码:A

## Stable isotope probing and its applications in microbial ecology

GE Yuan, HE Ji-Zheng\*, ZHENG Yuan-Ming, ZHANG Li-Mei, ZHU Yong-Guan (State key Laboratory of Systems Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5):1574 ~ 1582.

**Abstract:** Stable isotope probing (SIP), a combination of isotope labeling with molecular biological approach, is a technique that is used to identify microorganisms in environmental samples, and at the same time, to examine microbial functions during the biogeochemical processes operating in various environmental systems. The method has the potential for wide applications in the future, since it can provide abundant information about microbial interactions and metabolic functions in complex communities. The rationale of the SIP technique is as follows. Environmental samples in situ or in microcosm are exposed to substrates labeled with stable isotopes. Some microorganisms in these samples can metabolize the stable isotope-enriched substrates as their carbon or nitrogen resource for growth. The stable isotope assimilated by these microorganisms is then used to synthesize cellular components such as nucleic acids (DNA and RNA) and phospholipid fatty acids (PLFA). As a result, the microbial identity can be linked to their functions by extracting and analyzing these stable isotope-labeled biomarkers in the microbial communities. Here, with introduction to the range of stable isotope enriched substrates, the labeling techniques of such substrates to microorganisms, and the selection criteria of appropriate biomarkers and the methods for extracting and analyzing the biomarkers, we illustrate the applications of SIP in the functional analyses of methylotrophs, bacteria of organic pollutants degradation, rhizosphere-microorganism ecology, syntrophic microorganisms and metagenomics.

**Key words:** stable isotope probing; microbial ecology; microbial function; application

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(40571082);科技部 973 课题资助项目(2005CB121105)

**收稿日期:**2005-12-05; **修订日期:**2006-03-17

**作者简介:**葛源(1977~),男,河南南阳人,博士生,主要从事环境微生物分子生态学研究. E-mail:geyuan19@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail:jzhe@rcees.ac.cn

**Foundation item:** The project was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No. 40571082) and the National Basic Research Program of China (Grant No. 2005CB121105)

**Received date:** 2005-12-05; **Accepted date:** 2006-03-17

**Biography:** GE Yuan, Ph.D. candidate, mainly engaged in soil microbial ecology. E-mail:geyuan19@163.com

在环境微生物生态学的研究中,如何将微生物类群与其功能联系起来,是一个倍受关注的科学问题。对这一问题的探讨,可以丰富人们对微生物功能多样性的认识并在农业、工业、环境和医药等领域有着广泛的应用前景。过去,人们通常采用实验室培养的方法分离并鉴定具有特定功能的微生物,但实验室可培养的微生物只占微生物总数的0.1%~1%<sup>[1]</sup>,大量有关微生物功能的信息并不为人所知。分子生物学技术在微生物生态学中的应用,如基于微生物群体DNA的聚合酶链反应(PCR)、梯度凝胶电泳(DGGE/TGGE)和荧光原位杂交(FISH)等方法,使人们对微生物遗传多样性的认识大大提高。但这样取得的结果仍难以提供有关微生物间相互作用及其代谢功能的直接信息。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结合起来的稳定性同位素探测技术(SIP),为人们提供了解决这一问题的的重要途径。

长期以来,稳定性同位素标记技术是研究全球气候变化及森林管理对土壤碳(C)、氮(N)动态影响的有力手段,是加深对陆地生态系统重要C、N循环过程认识的重要工具。将稳定性同位素标记技术应用于土壤生物学研究,已经使人们在理解土壤微生物过程在调节陆地生态系统C、N循环方面取得重大进展。随着稳定性同位素标记技术的发展,并与分子生物学技术相结合,形成了崭新的稳定性同位素探测技术,可很好地将微生物类群与其功能联系起来。近来的研究已经确立了一些积极参与特殊代谢过程的微生物类群<sup>[2,3]</sup>。

稳定性同位素探测技术是一系列技术的总称,包括稳定性同位素富集基质的选择、合适生物标志物的选择、环境样品的标记、被标记生物标志物的提取分离和纯化检测等。其基本原理和技术路线为:将原位或微宇宙(microcosm)的环境样品暴露于稳定性同位素富集的基质中,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,从而将微生物的组成与其功能联系起来(图1)。这样,不通过常规培养就能将环境中的微生物与其功能结合了起来,以加深对不同环境中微生物功能及其参与的特定生物地球化学过程的认识。本文拟就稳定性同位素探测技术及其在环境微生物生态学领域的有关应用、优势和不足及发展动态等加以阐述。

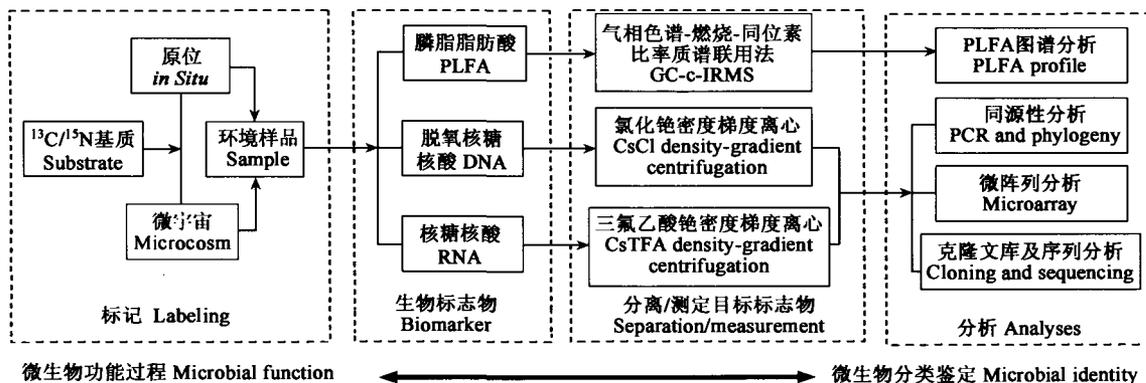


图1 稳定性同位素探测技术的技术路线示意图

Fig.1 Schematic approach of stable isotope probing technique for linking microbial identity to function

## 1 稳定性同位素

原子序数(质子数)相同而质量数不同(中子数不同)的元素被称为同位素,可分为稳定性同位素和放射性同位素。在微生物生态学研究中,也有利用放射性同位素将微生物的非培养鉴定与其代谢功能相结合的方法,如荧光原位杂交-显微放射自显影(FISH-MAR)技术和同位素阵列(isotope array)技术,通过对放射性同位素放射活性或被放射性同位素标记的特异性生物大分子的检测,确定微生物群落中的功能活性成员<sup>[4]</sup>。放射性同位素法灵敏度高,便于检测,但易造成环境危害并影响人体健康,损伤被测微生物而造成实验偏差,因而限制了其在微生物生态学中的应用。而稳定性同位素是天然存在的不具放射性的一类同位素,可以使研究定量

化并且是在没有干扰的情况下进行的,很好地克服了放射性同位素使用过程中的上述不足。

现有的 SIP 实验中,多采用重稳定性同位素如 $^{13}\text{C}$ 作为标记元素。一是由于轻、重同位素间较大的自然丰度差异,轻同位素的丰度远远大于重同位素的丰度(表 1);二是由于其原子量较大,由其参与合成的生物标志物如核酸具有较大的浮力密度(buoyant density, BD),可以通过密度梯度离心从 $^{12}\text{C}$ -核酸中分离出来进行后续分析<sup>[2, 5]</sup>。事实上,参与生物体内大分子如核酸、磷脂脂肪酸合成的其它稳定性同位素,如 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^2\text{H}$ 均有作为 SIP 实验标记元素的潜力(表 1)。尤其是 $^{15}\text{N}$ ,可用来研究氮生物地球化学循环过程各类微生物功能群及其相互作用<sup>[6]</sup>。

表 1 可用作 SIP 标记物的元素及其自然丰度<sup>[6]</sup>

Table 1 Elements that can be applied in SIP and their natural abundance<sup>[6]</sup>

|                              |                 | 同位素自然丰度 Isotope natural abundance(%) |                 |       |                 |       |              |       |
|------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|-------|-----------------|-------|--------------|-------|
| 轻稳定性同位素 Light stable isotope | $^{16}\text{O}$ | 99.76                                | $^{14}\text{N}$ | 99.63 | $^{12}\text{C}$ | 98.93 | $^1\text{H}$ | 99.99 |
| 重稳定性同位素 Heavy stable isotope | $^{17}\text{O}$ | 0.04                                 | $^{15}\text{N}$ | 0.37  | $^{13}\text{C}$ | 1.07  | $^2\text{H}$ | 0.01  |
|                              | $^{18}\text{O}$ | 0.20                                 |                 |       |                 |       |              |       |

现有 SIP 实验使用的 $^{13}\text{C}$ -基质主要有三大类: $^{13}\text{CO}_2$ 、 $^{13}\text{C}$ -甲基化合物( $^{13}\text{CH}_4$ 、 $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ 、 $^{13}\text{CH}_3\text{Br}$ 和 $^{13}\text{CH}_3\text{Cl}$ )和 $^{13}\text{C}$ -多碳化合物( $^{13}\text{C}$ -乙酸、 $^{13}\text{C}$ -葡萄糖、 $^{13}\text{C}$ -咖啡因、 $^{13}\text{C}$ -萘、 $^{13}\text{C}$ -菲、 $^{13}\text{C}$ -甲苯、 $^{13}\text{C}$ -苯酚、 $^{13}\text{C}$ -丙酸盐)。 $^{13}\text{C}$ -基质的选择,可根据研究目的而定。 $^{13}\text{CO}_2$ 多用于植物-微生物相互作用对陆地生态系统碳循环、土壤中碳周转速率、稻田产甲烷机理及产甲烷菌的研究; $^{13}\text{C}$ -甲基化合物多用于甲基营养菌(甲烷营养菌、甲醇营养菌、卤化甲烷营养菌)的研究; $^{13}\text{C}$ -多碳化合物多用于多氯联苯(PCBs)、多环芳烃(PAHs)等有机污染物的生物降解过程和机理的研究(表 2)。

表 2 已使用过的 $^{13}\text{C}$ -基质及其应用

Table 2  $^{13}\text{C}$ -substrates and their applications

| 已使用过的 $^{13}\text{C}$ -基质 $^{13}\text{C}$ -substrates            |  | 应用 Applications   |
|--|--|---|
| $^{13}\text{CO}_2$ 类   | $\text{CO}_2$  | 植物-微生物相互作用对陆地生态系统碳循环、土壤中碳周转速率的影响、稻田产甲烷机理及产甲烷菌的研究 Effect of plant-microorganism interactions on carbon cycling in terrestrial ecosystem and turnover rate of carbon in soil, study of mechanism and microorganisms of methane producing in paddy field |
| $^{13}\text{C}$ -甲基化合物类<br>$^{13}\text{C}$ methylic compounds    | 甲烷 Methane、甲醇 Methanol、氯化甲烷 Methyl chloride、溴化甲烷 Methyl bromide  | 甲基营养菌(甲烷营养菌、甲醇营养菌、卤化甲烷营养菌)的研究 Study in methylotrophs  |
| $^{13}\text{C}$ -多碳化合物类<br>$^{13}\text{C}$ multicarbon compounds | 苯酚 Phenol、水杨酸 Salicylate、萘 Naphthalene、菲 Phenanthrene、2,2'-二氯联苯 Dichlorobiphenyl、丙酸盐 Propionate、乙酸 Acetate、葡萄糖 Glucose、咖啡因 Caffeine、甲苯 Toluene | 有机污染物的生物降解研究 Study of biodegradation of organic pollutants  |

## 2 生物标志物 (biomarker)

在微生物生态学的 SIP 研究中,常采用的生物标志物有三大类: PLFA、DNA 和 RNA。它们既可以指示特定的稳定性同位素基质在生物体内的存在,又包含大量微生物分类遗传学信息<sup>[7]</sup>。

SIP 实验中最先使用的特异性生物标志物是 PLFA<sup>[8]</sup>。将 PLFA 从用重稳定性同位素(如 $^{13}\text{C}$ )标记过的环境样品中提取出来,通过 PLFA 图谱分析来反映微生物群落的结构和多样性;然后通过气相色谱-燃烧-同位素比率质谱联用法(gas chromatograph-combustion-isotope ratio mass spectrometry, GC-c-IRMS)测定提取出的各种 PLFA 中 $^{13}\text{C}$ 的丰度( $\delta^{13}\text{C}$ ),则那些 $^{13}\text{C}$ 富集的 PLFA 所代表的微生物就是参与了 $^{13}\text{C}$ -基质代谢的微生物。利用 PLFA 作为生物标志物的不足之处在于,对于那些不可培养的微生物,我们并不知道其 PLFA 分子图式,或者测得的某些 PLFA 分子图式并不具有特异性,因而可能无法作出正确判断<sup>[9]</sup>。

同 PLFA 相比,DNA 和 rRNA 含有更丰富的信息,通过对 DNA 和 rRNA 的同源遗传性分析,可提供大量的

有关微生物遗传多样性和分子生态学方面的信息<sup>[4]</sup>。从重稳定性同位素标记过的环境样品中提取总 DNA(或 rRNA),由于<sup>13</sup>C标记过的核酸分子的浮力密度大于未被标记过的核酸分子,可通过 CsCl(或三氟乙酸铯, CsTFA)密度梯度离心将两者分开,并通过注射器吸取或分馏法将之分别收集起来作进一步研究。<sup>13</sup>C-核酸分子(DNA 和 rRNA)可用作 PCR(或反转录 PCR)的模板,采用一般的引物即可扩增大多数已知细菌、古菌、真菌的 rRNA(或 cDNA)基因。对 rRNA(或 cDNA)基因 PCR 产物的同源性分析,可以使我们确定哪些微生物同化吸收了<sup>13</sup>C-基质<sup>[2, 3, 10, 11]</sup>。同时,对那些研究较深入的微生物如甲基营养菌,一些编码甲醇和甲烷氧化酶的基因已经被人们所了解,除了定位 16S rRNA 基因外,还可对定位功能基因进行分析<sup>[12-14]</sup>。以 DNA 作为生物标志物的主要不足是<sup>13</sup>C进入 DNA 合成和 DNA 复制需要较长的时间,因此在密度梯度中形成紫外光下可见的<sup>13</sup>C-DNA 条带所需要的培养时间较长。这样就产生了两个问题:一是<sup>13</sup>C-基质消耗量的增加,而这些<sup>13</sup>C-基质往往比较昂贵,进而增加实验成本;二是在较长时间培养条件下,<sup>13</sup>C-基质初级消费者可能被其它生物取食或死亡后残体被其它微生物分解,使一些<sup>13</sup>C-基质转移到其它微生物体内,引起实验偏差。而 RNA 的合成要比 DNA 的合成快得多,从而能够在较短的培养时间内取得足够量的<sup>13</sup>C对于 DNA-SIP 实验中长达几十天的培养时间, RNA-SIP 培养 8h 后即可收集足够量的 RNA 进行分析<sup>[6]</sup>。不过,在最近进行的 DNA-SIP 研究中,已经将培养时间缩短,并收集到<sup>13</sup>C-DNA 进行研究<sup>[12, 15, 16]</sup>。例如, Singleton 等对 PAHs 降解菌的研究表明,实验期内(7d)基本上不会发生<sup>13</sup>C-基质的二级利用问题<sup>[16]</sup>。

将 RNA-SIP 和 DNA-SIP 结合起来,会大大提升这项技术的潜力。Lueders 等的研究是将这两项技术结合使用的一个很好的例子。他们分析了水稻土表层样品微宇宙中功能微生物群在 42d 内对<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH 中碳同位素的吸收情况<sup>[10]</sup>。RNA-SIP 由于其独特的灵敏性,可以在只有少量的<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH 被代谢时,就监测到微宇宙中最先起作用的甲基营养种群,而 DNA-SIP 则用于深入了解参与甲醇代谢的微生物群落在培养期间内的动态及其与微食物网中真菌和原生动物的相互作用。<sup>13</sup>C富集的核酸片断测序结果表明,<sup>13</sup>C也在真菌和原生动物 DNA 中富集,表明它们或者同化吸收了<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH 或<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH 代谢产物,或者捕食了被标记过的甲基营养菌<sup>[10]</sup>。这些基于 SIP 的时间序列实验有可能获得关于环境中微生物相互作用以及微食物网的有用信息<sup>[10]</sup>。核酸-SIP 是一项有力的技术手段,并且随着轻、重核酸纯化和分离技术的发展,其应用也将日益广阔<sup>[17]</sup>。

### 3 标记方法

在微生物生态学的 SIP 研究中,对目的微生物的标记方法主要有两大类:直接用<sup>13</sup>C-基质培养微生物和通过用<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>标记植物而标记微生物。所谓微生物直接标记法就是将环境样品直接暴露于重稳定性同位素富集的基质中,以考查那些可直接以这些基质作为碳源和氮源满足自身生长需要的微生物类群。可使用气态、液态和固态的重稳定性同位素标记的基质,包括用<sup>13</sup>C-甲基化合物对各类甲基营养菌的研究<sup>[2, 12-14]</sup>和用<sup>13</sup>C-多碳有机化合物对 PAHs、PCBs 等持久性有机污染物(POPs)分解菌的研究<sup>[16, 18-20]</sup>。植物(间接)标记法多用于根际微生物生态学研究,特别是用于追踪碳在植物-微生物-土壤体系中的流动,以评价环境条件对碳流的影响,并确定此过程中的关键微生物功能种群<sup>[3, 21]</sup>。这类标记多使用气态的<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>作为标记基质。植物会将地上部分(茎叶)的光合碳同化产物传输到地下部分(根部),一部分还会以根分泌物的形式从根部释放出来,为根际微生物所吸收同化并影响根际微生物群落结构<sup>[22, 23]</sup>。因此研究者就可将植物作为对某些微生物进行标记的媒介,先将植物暴露于重稳定性同位素富集的<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>基质中,使植物通过光合作用吸收<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>产生的同化产物的一部分从地上部转移到地下部再分泌到根际土壤中,那些参与<sup>13</sup>C-根分泌物代谢的微生物的分类学、功能、多样性等生态学特征就可通过对这些微生物特定的生物标志物如 PLFA、DNA 或 RNA 的分析而获得。图 2 是陆雅海和 Conrad 利用<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>作为标记基质对水稻根际产甲烷古菌进行研究时所采用的微宇宙示意图<sup>[3]</sup>。采用这一植物间接标记法的潜在不足是,对细菌核酸的标记可能是无效的,因为根际微生物只能利用植物新产生同化产物的 6%,并且这部分被利用的同化产物也只有约三分之一会以生物量碳的形式在微生物体内贮存,其余部分则通过呼吸作用消耗掉,从而难以追踪到从植物到根际微生物的<sup>13</sup>C流<sup>[24]</sup>。

不论是采用微生物标记法还是植物标记法,均可以是原位标记<sup>[11, 19, 25]</sup>或“培养”标记<sup>[3, 13]</sup>。原位标记就

是在野外自然环境条件下用气态、液态或固态的重稳定性同位素基质标记环境样品中的微生物类群,从而在纯自然条件下将某种微生物与特定的生物地球化学过程和功能过程相联系。“培养”标记则是在尽量模拟自然环境条件的微宇宙中,将环境样品暴露于特定的重稳定性同位素富集的基质,从而对参与重稳定性同位素基质转化的微生物群落进行标记。在微宇宙中对环境样品进行培养标记,可控制培养条件并避免重稳定性同位素基质流失,有利于量化研究功能微生物对特定基质的降解机理及不同功能种群之间的生态关系和功能地位,但可能会与真实环境条件下的特定生物地球化学过程存在差距。而采用原位标记,则有可能因为复杂环境条件下的多种影响因素而掩盖特定微生物功能种群与特定过程之间的真实关系。研究者可根据自身的研究目的进行选择或结合起来使用。

#### 4 应用

##### 4.1 甲基营养菌

SIP 技术最早在对甲基营养菌(甲烷营养菌和甲醇营养菌)的研究中得到应用<sup>[2, 8]</sup>。此类细菌以甲烷、卤化甲烷和甲醇等单碳化合物为唯一碳源,因此在<sup>13</sup>C-基质培养过程中,可有效防止吸收入体内的<sup>13</sup>C 被环境中其它<sup>12</sup>C-基质稀释,采用 SIP 技术对其进行研究具有天然的优势<sup>[4, 26]</sup>。

Boschker 等最先使用 PLFA-SIP 技术进行甲烷营养菌的研究<sup>[8]</sup>。随后, DNA-SIP 技术被用于研究土壤中甲烷氧化菌的功能活性种群<sup>[27]</sup>。Hutchens 等在微宇宙中用<sup>13</sup>C-甲烷对取自罗马尼亚 Movile Cave 地下水系统的样品进行短期培养(10d),提取总 DNA 并分离出<sup>13</sup>C-DNA,通过 16S rRNA 分析和功能基因(编码甲烷单氧化酶 MMO 的基因)分析,确定了三类甲烷营养菌。这三类甲烷营养菌均含有编码 MMO 的基因,而在非甲烷营养菌(不含有编码 MMO 的基因)中也发现有<sup>13</sup>C-DNA,表明了交叉取食的存在,并推测可能正是由于甲烷营养菌将甲烷转化成复杂的有机化合物,从而维持了 Movile Cave 这样封闭生态系统的微生物群落多样性<sup>[12]</sup>。

Radajewski 等最先使用 DNA-SIP 技术进行甲醇营养菌的研究<sup>[2]</sup>。他们用<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH 培养森林土壤,并通过气相色谱检测<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH 的消耗量。当消耗掉 2.4mmol 基质时,从土壤中分离总 DNA 并进行 CsCl 密度梯度离心,采用对细菌、古菌和真菌 rRNA 基因及 *mxoF* 基因(编码一组甲醇脱氢酶的基因)具有特异性的引物,以分离出的<sup>13</sup>C-DNA 作为模板进行 PCR。对 PCR 产物的分析表明,被<sup>13</sup>C 标记的细菌 16S rRNA 基因序列与已知可培养的甲醇营养菌相似,并且与从北部泥炭湿地分离到的嗜酸甲烷氧化菌相似,首次表明此类细菌还存在于森林土壤中<sup>[2]</sup>。Ginige 等的研究表明了 SIP 与其它技术结合所产生的巨大潜力<sup>[28]</sup>。在他们的研究中,被<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH 标记过的 DNA 被用作模板进行 16S rRNA 的 PCR 扩增,与甲醇营养菌 *Methylophilales* 密切相关的 16S rRNA 序列在<sup>13</sup>C-DNA 中具有较高的丰度,用这些序列数据设计 FISH 探针进行荧光原位杂交的研究结果表明,活性污泥微生物群落的反硝化能力与 SIP 实验鉴定到的甲醇营养菌的丰度呈显著相关,反而与一些已知的反硝化细菌的丰度无相关性,结合显微放射自显影技术,认定 SIP 实验中所鉴定到的甲醇营养菌 *Methylophilales* 同时也是活性污泥中重要的反硝化菌<sup>[28]</sup>。

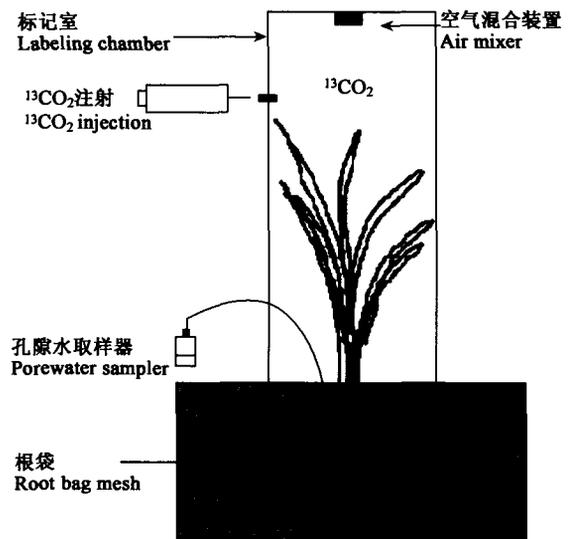


图2 植物标记法微宇宙示意图<sup>[3]</sup>

Fig. 2 Schematic diagram of microcosm applied in stable isotope labeling through plants<sup>[3]</sup>

根袋内装有 60g(干基)水稻土,网眼大小为 24 $\mu$ m,保证营养物质可自由交换而根不能伸出根袋,根袋内土壤定义为根际土;上部气室容量为 10L,7d 标记期内,每天通过注射器分 7 次注入纯度为 99% 的<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>共 35ml。The root bag containing 60 g (dw) of paddy soil had a mesh size of 24  $\mu$ m, which allowed the nutrients passing freely while roots were prevented from penetrating out from the root bag; The soil inside the root bag was defined as rhizosphere soil. For <sup>13</sup>C labeling, a 10 L chamber was placed on the top of the plants, 35 ml of <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (99% of <sup>13</sup>C atom) was injected into the chamber at a frequency of 7 times a day and a period of 7 days

Miller 等用 $^{13}\text{CH}_3\text{Br}$  和 $^{13}\text{CH}_3\text{Cl}$  培养土壤,并对提取的 $^{13}\text{C}$ -DNA 进行 16S rRNA 基因和 *cmuA* 基因(编码催化卤化甲烷降解第一步反应的甲基转移酶的基因)分析,发现了新的卤化甲烷营养菌(以前并不认为其参与卤化甲烷降解)<sup>[13]</sup>。Borodina 等用 DNA-SIP 和功能基因 *cmuA* 考查英国不同陆地生态系统土壤中氯化甲烷营养菌的多样性,通过与培养分离法的结果比较,揭示出土壤中仍存在大量不可培养的卤化甲烷营养菌,这样,就将卤化甲烷的全球循环同一组目前所知有限的细菌(卤化甲烷营养菌)特征群联系了起来<sup>[14]</sup>。

#### 4.2 有机污染物降解菌

在有机污染物生物降解的微生物生态学研究中,使用 SIP 技术可以帮助了解在复杂环境如土壤中,是哪些微生物参与了有机污染物的降解,以及微生物间复杂的相互作用是如何影响有机污染物生物降解过程的<sup>[29]</sup>。

此类研究包括对可降解苯酚<sup>[5]</sup>、PAHs<sup>[16, 18, 19]</sup> 和 PCBs<sup>[20]</sup> 等有机污染物的微生物种群的研究。Jeon 等和 Padmanabhan 等使用原位 SIP 技术,分别在受到萘污染和未受萘污染的土壤中发现了新的可降解 $^{13}\text{C}$ -萘的微生物种群<sup>[18, 19]</sup>。Singleton 等使用 SIP 技术,研究了用于处理 PAHs 污染土壤的好氧生物反应器中的活性微生物种群<sup>[16]</sup>。 $^{13}\text{C}_6$ -水杨酸、[U- $^{13}\text{C}$ ]-萘和[U- $^{13}\text{C}$ ]-菲被添加到此反应器中,分别培养 2d(水杨酸和萘)和 7d(萘和菲)后,提取总 DNA, CsCl 密度梯度离心分离轻、重组 DNA,通过对 $^{13}\text{C}$ -DNA 的 DGGE 和 16S rRNA 克隆文库分析表明,可降解 $^{13}\text{C}_6$ -水杨酸、[U- $^{13}\text{C}$ ]-萘的活性种群表现出相似的 DGGE 特征,并且其 16S rRNA 克隆文库主要由 *Pseudomonas* 属和 *Ralstonia* 属的序列构成;而暴露于[U- $^{13}\text{C}$ ]-菲的微生物群落则显示出明显不同的 DGGE 特征,其 16S rRNA 克隆文库由与 *Acidovorax* 属相关的序列组成<sup>[16]</sup>。Tillmann 等设计了一个 PLFA-SIP 微宇宙实验,将来自沼泽地的 PCBs 高污染土壤暴露于[U- $^{13}\text{C}$ ]-2,2'-二氯联苯中,培养 5 周后,采用气相色谱-燃烧-同位素比率质谱联用法(GC-c-IRMS)测定不同 PLFA  $^{13}\text{C}$  的丰度,结果表明, $^{13}\text{C}$ 在特征指示 *Burkholderia* 菌的 PLFA(16:0, 17:0cycloω7c, 18:1ω9c, 19:0cycloω8c)中大量富集,而在数量最多的 *Methylobacterium* 菌的特征 PLFA(18:1ω7)中,只有少量的 $^{13}\text{C}$ 富集,说明了 *Burkholderia* 菌在高度污染土壤 PCBs 好氧降解过程中的主导作用<sup>[20]</sup>。

#### 4.3 根际微生物生态

SIP 的另一个重要应用是根际微生物生态的研究。根际是土壤中植物根周围的生物活性区域,在这一区域发生着许多重要而复杂的植物-微生物-微动物相互作用,但许多过程和机制尚不清楚。研究这些相互作用的方法之一是用 $^{13}\text{CO}_2$ 标记植物,然后从根际土壤中提取 PLFA<sup>[21, 25]</sup>、核酸<sup>[3, 11]</sup>等生物标志物进行分析。提取的 PLFA 可通过 GC-c-IRMS 测定其不同类型中 $^{13}\text{C}$ 的相对丰度,进而考查 C 流在根际微生物区系中的分配情况,确定关键功能微生物类群。Butler 等和 Lu 等较早将 PLFA-SIP 技术用于根际微生物生态研究<sup>[30, 31]</sup>。Butler 等采用 $^{13}\text{CO}_2$ 脉冲标记法,利用 $^{13}\text{C}$ -PLFA 图谱分析研究了与根际碳循环有关的微生物在黑麦草不同生长时期的群落动态<sup>[30]</sup>。Lu 等用 $^{13}\text{CO}_2$ 对水稻进行脉冲标记,通过 $^{13}\text{C}$ -PLFA 图谱分析探讨 $^{13}\text{C}$ 在水稻根际微生物群落中的分配,表明不同根际微生物对植物光合作用产物有不同的吸收特征<sup>[31]</sup>。Johnson 等利用 $^{13}\text{CO}_2$ 原位脉冲标记法,研究了土壤中食真菌无脊椎动物(弹尾目昆虫 *Protaphorura armata*)对草原植物地上部光合作用产物通过根系分泌后在菌根圈(mycorrhizosphere)中流动过程的影响<sup>[25]</sup>。他们分别采用 IRMS 和 GC-c-IRMS 法测定了 $^{13}\text{C}$ 标记前后根际周围菌根圈呼吸产生的 $^{13}\text{CO}_2$ 以及菌根圈分离出的不同类型 PLFA 的 $^{13}\text{C}$ 丰度。 $^{13}\text{CO}_2$ 的测定表明,标记前,*P. armata* 存在和不存在时,根际周围 $^{13}\text{CO}_2$ 的丰度并无显著差异;而标记后,*P. armata* 存在时由菌根圈呼吸产生的 $^{13}\text{CO}_2$ 的丰度增加量(atom excess %  $^{13}\text{C}$ )比其不存在时减少了 32%,两者之间有显著性差异。这反映出 C 流进入菌根圈的路径被打乱。PLFA 的 $^{13}\text{C}$ 丰度测定表明,*P. armata* 不存在时 $^{13}\text{C}$ -PLFA(16:1ω5)在菌根圈中显著富集,而 *P. armata* 存在时这种 PLFA 并未显著富集。由于 PLFA(16:1ω5)是一种特异的反映环境中丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)存在的磷脂脂肪酸,这就表明食真菌无脊椎动物 *P. armata* 的加入引起的菌根圈呼吸产生的 $^{13}\text{CO}_2$ 增加量的减少,主要是由于 *P. armata* 的取食及其它活动对 AMF 菌丝(光合碳同化产物由植物根系进入土壤的通道)而不是腐生真菌菌丝的破坏而产生的<sup>[25]</sup>。

从土壤中分离的 $^{13}\text{C}$ -DNA(或 $^{13}\text{C}$ -RNA)可用作 PCR(或反转录 PCR)的模板进行扩增,扩增产物通过克隆文库、DGGE/TGGE/T-RFLP 或微阵列(microarray)进行 16S rRNA 基因或功能基因的遗传多样性和同源分析,这样就可获得参与植物根分泌物中碳代谢的微生物种群的信息。Lu 和 Conrad 将在微宇宙中生长的水稻暴露在大气浓度的 $^{13}\text{CO}_2$ 中,从根际土壤中提取总 RNA,密度梯度离心分离 $^{13}\text{C}$ -RNA 和 $^{12}\text{C}$ -RNA 后,采用专性古菌引物 Ar109f/Ar912r 进行荧光定量 PCR 扩增,进行终端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析,结果表明, $^{13}\text{C}$ 的终端限制性片段(T-RF)中富集,表明是 394-bp 的 T-RF 所对应的微生物菌群同化吸收了通过水稻进入土壤的 $^{13}\text{C}$ 。进一步的轻组(LrhA)和重组(HrhA)克隆文库同源性的分析表明,这两个文库的最大不同在于一组产甲烷古菌(Rice Cluster I, RC-I)在 HrhA 中的丰度(26%)远大于在 LrhA 中的丰度(8%);RNA 序列分析表明,394-bp 的 T-RF 正好与 RC-I 古菌相对应,这就证明了正是这组古菌 RC-I 利用流经植物体内进入根际的 $^{13}\text{C}$ 产生了甲烷<sup>[3]</sup>。Rangel-Castro 等利用 RNA-SIP 检验施用石灰对参与根分泌物代谢的根际微生物群落结构的影响<sup>[11]</sup>。他们在英国丘陵草原土壤中成功实施了 $^{13}\text{CO}_2$ 脉冲标记野外实验,并通过 CsTFA 密度梯度离心分离出 $^{13}\text{C}$ -RNA,通过对分离出的 $^{13}\text{C}$ -RNA 的 DGGE 分析表明,同不施石灰的土壤相比,施用石灰土壤中可利用根分泌物的微生物群落结构更为复杂,并且更倾向于利用新产生的 $^{13}\text{C}$ -根分泌物<sup>[11]</sup>。

#### 4.4 互营微生物

SIP 技术另一有应用潜力的领域是对厌氧环境中互营微生物的研究。微生物间的互营关系,是指一种微生物的生长依赖或得益于与它一起生长的另一种微生物所创造的环境条件或提供的生长物质。将 FISH 与二级离子质谱法(secondary ion mass spectrometry, SIMS)相结合,Orphan 等在冰冷的缺氧沉积物中检测到极低的 $^{13}\text{C}$ -甲烷自然丰度(同其它含碳化合物相比),这表明这些沉积物中存在一组与 *Methanosarcinales* 相关的可氧化甲烷的古菌,这些古菌与硫酸还原菌形成共生体,参与甲烷的厌氧氧化<sup>[32]</sup>。丙酸盐是许多有机物厌氧降解的关键中间产物,其在厌氧条件下进一步降解为乙酸、 $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2$  是一个高度吸热的过程,但是当环境中互营的丙酸盐氧化产乙酸菌和耗氢产甲烷菌(使环境中保持较低的  $\text{H}_2$  分压)同时存在时,可使这一微生物参与的过程轻易突破环境热动力学条件的限制而得以持续进行<sup>[33]</sup>。但是,由于对环境条件要求苛刻,互营丙酸盐氧化产乙酸菌分离培养的难度较大;并且由于其同源性不强,在系统发育树上的位置比较分散,缺乏合适的分子标志物去检测此类细菌,因此互营丙酸盐氧化产乙酸菌的生态和多样性特征很少为人们所了解。Lueders 等将 $^{13}\text{C}$ -丙酸盐加入厌氧水稻土样品中,7 周后通过对提取分离的 $^{13}\text{C}$ -RNA 的 T-RFLP 和克隆分析表明, $^{13}\text{C}$ 在 3 类细菌(*Syntrophobacter* spp.、*Smithella* spp. 和 *Pelotomaculum* spp.) 和三类古菌(*Methanobacterium*、*Methanosarcina* spp. 和一组尚未培养的“Rice Cluster I”)的 rRNA 中富集,说明上述细菌是参与产甲烷条件下丙酸盐互营氧化的活性微生物,而古菌则通过与细菌的互营联系推动了这一过程<sup>[33]</sup>。使用 SIP 技术,可以帮助研究者弄清热力学条件限制下生长的微生物功能群及互营菌的同源多样性,在探讨环境中微生物的互营或其它形式的营养关系进而探讨微生物群落的结构-功能关系方面具有广阔的应用前景。

#### 4.5 宏基因组学(Metagenomics or ecogenomics)

宏基因组学,或者叫微生物群落的非培养基因组学,是一个日益发展的新领域,使人们可以更好地认识不可培养微生物的遗传多样性及其与环境之间的关系<sup>[34, 35]</sup>,并且有广阔的应用前景<sup>[36]</sup>,已经有从土壤<sup>[37]</sup>、海水<sup>[38]</sup>和酸性矿水<sup>[39]</sup>中构建宏基因组文库的成功例子。

要从由复杂群落构建的宏基因组文库中找到特定的目的基因,需要筛选和测序成千上万的克隆。通过 SIP 实验使参与特定代谢过程(例如甲烷氧化)的生物基因组富集,克隆从 SIP 实验中获得的 $^{13}\text{C}$ 标记的核酸,从而构建一个因吸收了特定的基质而在特定的环境过程中执行特定代谢功能的环境微生物的功能宏基因组文库,就可重建一个较小的目标微生物群基因组,从而极大地减少需要筛选的基因克隆数量<sup>[40]</sup>。如 Radajewski 等在对甲醇营养菌的研究中,根据 PCR 扩增所用引物的不同,利用 $^{13}\text{C}$ -DNA 扩增产物构建了两个分别包括 100 个克隆(细菌 16S rRNA)和 50 个克隆(*mxnF*)的文库<sup>[2]</sup>。Lu 和 Conrad 在对水稻根际产甲烷菌的研究中,以 pGEM-T 为载体构建了轻/重两个 RNA 克隆文库 LrhA 和 HrhA<sup>[3]</sup>。他们都是先将分离出的 $^{13}\text{C}$ -核酸进行 PCR 扩

增,再构建克隆文库。同时也可直接利用分离出的 $^{13}\text{C}$ -核酸直接构建克隆文库,例如 Dumont 等在一个验证性实验中,利用从 $^{13}\text{CH}_4$  标记的森林土壤样品中提取纯化的 $^{13}\text{C}$ -DNA,用限制性酶切割后插入细菌人工染色体(BAC)载体,构建了一个中型的包括 2300 个克隆的宏基因组文库;通过与 *pmoA* 基因杂交对文库进行筛选,对其中一个可与探针杂交的 BAC 克隆的测序分析表明,其序列大小为 15.2kb,包含一个完整的 *pMMO* 基因操纵子和几个侧翼基因(编码一些在单碳化合物上生长所必须的酶的基因)<sup>[4]</sup>。这表明,通过 SIP 实验直接克隆 $^{13}\text{C}$ -DNA,以及在一个较小的克隆文库中获取目的基因也是可行的。

## 5 问题与展望

使用 SIP 技术存在的主要问题是:(1)对于多碳源利用方式的微生物,用来标记的 $^{13}\text{C}$ 在细胞内会被稀释,但现在仍不清楚要有多少 $^{13}\text{C}$ 被引入微生物体内才能从复杂群落中将 $^{13}\text{C}$ -DNA 分离出来;(2)大多数 SIP 实验在微宇宙中进行,因此并不能完全代表微生物生长的实际环境条件;(3)在培养过程中可能存在交叉取食的风险,即通过取食或目标微生物死体的分解而使 $^{13}\text{C}$ 转移到其它微生物体内<sup>[4]</sup>。当然,正如在前面所谈到的,最近的一些 SIP 实验已通过优化培养条件和分离技术、缩短培养时间等手段,以减少上述不利因素的影响。关于交叉取食问题,一些研究者也从另一种思路通过在培养过程中的多次取样,以及 DNA-SIP 和 RNA-SIP 的联合使用,追踪 $^{13}\text{C}$ 在微生物群落中的流动过程,及微生物群落的结构演替和功能演替,化不利为有利。

SIP 是一项具有重要应用前景的技术,已在根际微生物生态学、环境微生物生态学、甲基营养菌群落研究等领域得到应用,提供了许多关于微生物多样性和功能的有用信息。因其在微生物的种类鉴定和功能鉴定间建立了直接的联系,将来会在功能宏基因组学、厌氧环境中互营微生物生态学、确定参与重要地球化学循环过程的关键微生物功能种群、及人体肠道内微生物群落生态学等方面得到更广阔的应用。

## References:

- [ 1 ] Davis K E R, Joseph S J, Janssen P H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 826 ~ 834.
- [ 2 ] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, *et al.* Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403(6770): 646 ~ 649.
- [ 3 ] Lu Y, Conrad R. In situ stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere. *Science*, 2005, 309(5737): 1088 ~ 1090.
- [ 4 ] Dumont M G, Murrell J C. Stable isotope probing-linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 499 ~ 504.
- [ 5 ] Manefield M, Whiteley A S, Griffiths R I, *et al.* RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5367 ~ 5373.
- [ 6 ] Radajewski S, McDonald I R, Murrell J C. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(3): 296 ~ 302.
- [ 7 ] Manefield M, Whiteley A S, Bailey M J. What can stable isotope probing do for bioremediation? *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, 54(2-3): 163 ~ 166.
- [ 8 ] Boschker H T S, Nold S C, Wellsbury P, *et al.* Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$ -labelling of biomarkers. *Nature*, 1998, 392(6678): 801 ~ 805.
- [ 9 ] Singer A C, Thompson I P, Bailey M J. The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implications for phytoremediation. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(3): 239 ~ 244.
- [ 10 ] Lueders T, Wagner B, Claus P, *et al.* Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 60 ~ 72.
- [ 11 ] Rangel-Castro J I, Killham K, Ostle N, *et al.* Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(6): 828 ~ 838.
- [ 12 ] Hutchens E, Radajewski S, Dumont M G, *et al.* Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(2): 111 ~ 120.
- [ 13 ] Miller L G, Warner K L, Baesman S M, *et al.* Degradation of methyl bromide and methyl chloride in soil microcosms: use of stable C isotope fractionation and stable isotope probing to identify reactions and the responsible microorganisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, 68(15): 3271 ~ 3283.
- [ 14 ] Borodina E, Cox M J, McDonald I R, *et al.* Use of DNA-stable isotope probing and functional gene probes to investigate the diversity of methyl chloride-utilizing bacteria in soil. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1318 ~ 1328.

- [15] Lin J-L, Radajewski S, Eshinimaev B T, *et al.* Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikalian soda lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(10): 1049 ~ 1060.
- [16] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1202 ~ 1209.
- [17] Lueders T, Manefield M, Friedrich M W. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 73 ~ 78.
- [18] Jeon C O, Park W, Padmanabhan P, *et al.* Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for *in situ* biodegradation in contaminated sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(23): 13591 ~ 13596.
- [19] Padmanabhan P, Padmanabhan S, DeRito C, *et al.* Respiration of  $^{13}\text{C}$ -labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of  $^{13}\text{C}$ -labeled soil DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1614 ~ 1622.
- [20] Tillmann S, Strömpl C, Timmis K N, *et al.* Stable isotope probing reveals the dominant role of *Burkholderia* species in aerobic degradation of PCBs. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(2): 207 ~ 217.
- [21] Treonis A M, Ostle N J, Stott A W, *et al.* Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(3): 533 ~ 537.
- [22] Wardle D A, Bardgett R D, Klironomos J N, *et al.* Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 2004, 304(5677): 1629 ~ 1633.
- [23] Johnson D, Ujdo M, Genney D R, *et al.* How do plants regulate the function, community structure, and diversity of mycorrhizal fungi? *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(417): 1751 ~ 1760.
- [24] Griffiths R I, Manefield M, Ostle N, *et al.*  $^{13}\text{CO}_2$  pulse labelling of plants in tandem with stable isotope probing: methodological considerations for examining microbial function in the rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58(1): 119 ~ 129.
- [25] Johnson D, Krsek M, Wellington E M H, *et al.* Soil invertebrates disrupt carbon flow through fungal networks. *Science*, 2005, 309(5737): 1047.
- [26] McDonald I R, Radajewski S, Murrell J C. Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. *Organic Geochemistry*, 2005, 36(5): 779 ~ 787.
- [27] Bull I D, Parekh N R, Hall G H, *et al.* Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature*, 2000, 405(6783): 175 ~ 178.
- [28] Ginige M P, Hugenholtz P, Daims H, *et al.* Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence *in situ* hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 588 ~ 596.
- [29] Wackett L P. Stable isotope probing in biodegradation research. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(4): 153 ~ 154.
- [30] Butler J L, Williams M A, Bottomley P J, *et al.* Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6793 ~ 6800.
- [31] Lu Y, Murase J, Watanabe A, *et al.* Linking microbial community dynamics to rhizosphere carbon flow in a wetland rice soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48(2): 179 ~ 186.
- [32] Orphan V J, House C H, Hinrichs K-U, *et al.* Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, 2001, 293(5529): 484 ~ 487.
- [33] Lueders T, Pommerenke B, Friedrich M W. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5778 ~ 5786.
- [34] Daniel R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 470 ~ 478.
- [35] Tringe S G, von Mering C, Kobayashi A, *et al.* Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 2005, 308(5721): 554 ~ 557.
- [36] Lorenz P, Eck J. Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 510 ~ 516.
- [37] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2541 ~ 2547.
- [38] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667): 66 ~ 74.
- [39] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428: 37 ~ 43.
- [40] Wellington E M, Berry A, Krsek M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(3): 295 ~ 301.