

石油烃污染及修复过程中的微生物分子生态学研究进展

唐景春^{1,2,3*} 吕宏虹¹ 刘庆龙¹ 朱文英⁴

(1. 南开大学 环境科学与工程学院 天津 300071)

(2. 环境污染过程与基准教育部重点实验室 天津 300071)

(3. 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室 天津 300071)

(4. 环境保护部环境规划院 北京 100012)

摘要: 针对环境中广泛存在的石油烃污染问题,从分子生态学的角度总结石油烃降解过程中的微生物生态学研究进展。着重介绍分子生态学的研究方法以及与石油烃降解相关的降解基因和基因芯片的最新研究进展,同时对存在的问题和今后的研究方向进行总结。

关键词: 石油烃, 微生物, 分子生态学, 降解基因

Recent review on the microbial molecular ecology during contamination and remediation of petroleum hydrocarbons

TANG Jing-Chun^{1,2,3*} LÜ Hong-Hong¹ LIU Qing-Long¹ ZHU Wen-Ying⁴

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Tianjin 300071, China)

(3. Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, Tianjin 300071, China)

(4. Chinese Academy for Environmental Planning, Beijing 100012, China)

Abstract: Targeting on the widely existed hydrocarbon pollution problems in the environment, this paper summarized the research progress on microbial ecology during microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the aspect of molecular ecology. The research methods on molecular ecology and degradation genes and gene chip related to petroleum hydrocarbon degradation were introduced, and at the same time, the existing problems and future research directions were summarized.

Keywords: Petroleum hydrocarbons, Microorganisms, Molecular ecology, Degrading genes

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 41473070, 31270544); 国家 863 计划重大项目(No. 2013AA06A205)

*通讯作者: ✉: tangjch@nankai.edu.cn

收稿日期: 2014-12-01; 接受日期: 2015-03-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-04

石油是国家发展的重要能源保障,但也存在突出的环境问题。石油的开采、运输、储存、加工及各种泄露渗漏事故的发生会对环境造成污染和破坏,威胁人类和其他生物的生存和发展,并已成为全球范围内亟待解决的重要问题。当今石油污染状况日趋严峻,全世界每年通过落地原油及事故泄漏等途径排入到环境中的石油污染物约为 8×10^6 t。我国是石油生产和消费大国,全国共有油井总量约为 2×10^5 口,每年约有 6×10^5 t 原油汇入环境,造成我国 3.3×10^6 hm^2 的土壤面积受到石油污染。每年因石油污染带来的环境污染和破坏造成约有 2 000 亿元的经济损失,是我国进行可持续发展战略的一大障碍^[1]。

伴随着石油污染生物修复技术的广泛应用,人们在污染生物修复领域逐渐认识到直接投加高效降解菌的效果难以长时间维持,而且由于土壤中 90%–99% 的微生物无法进行分离培养^[2],传统的分析技术无法反映污染物群落的真实情况,对不可培养的微生物在污染物生物降解中的作用也无法确认。随着分子生物学技术的发展,无论是 cDNA 基因文库的建立,还是多态性分析的进步,都为污染环境的生物修复提供了全新的技术支持。自 1985 年 Pace 等^[3]第一次利用 rRNA 测序技术分析环境中微生物群落以来,分子生物学手段在生物修复技术中的应用已成为一个研究热点。目前,分子生物学技术已逐渐广泛应用于提取、确认、测序功能基因和监测环境中微生物群落结构的动态变化等修复研究之中,特别是在石油烃修复研究中已逐渐从传统的分离培养向分子生物学技术转变^[4–9]。利用聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术可以更全面准确地获取样品中的遗传信息,开展降解机理的研究,在掌握降解基因的基础上可以构建降解基因工程菌株或降解途径互补的混合菌剂,提高生物修复效率。利用多态性研究方法,可以用来分析实际环境样品中微生物群落多样性、种群动态等,获得比传统培养法更完整和准确的信息。

1 环境中主要石油烃降解微生物及其特征

自然界中能够降解石油烃类化合物的微生物种类有数百种,七十多个属,主要是细菌、真菌和藻类三大类型的生物,多存在于土壤环境中和水体环境中^[10]。细菌在海洋生态系统中占主导地位,而在淡水和陆地生态系统中真菌则是更重要的微生物种类^[11]。水环境中能较好地降解石油烃的细菌有假单胞菌属、无色杆菌属、节杆菌属、微球菌属、诺卡氏菌属、不动杆菌属、短杆菌属、棒杆菌属、黄杆菌属,真菌有假丝酵母菌属、红酵母菌属、掷孢酵母菌属等^[12]。在受污染的水体中除细菌和酵母菌外,还有许多丝状菌。在土壤中,真菌的种属比细菌多,土壤中主要降解石油烃的降解菌除上述水体中的菌外,还有分枝杆菌属。藻类也是降解石油烃污染物的微生物种群之一,如颤藻属(*Oscillatoria*)等^[13]。这些藻类能对多种石油烃进行降解,包括苯、酚和萘等。张海荣等^[14]从大港油田区石油污染盐碱化土壤和油泥中筛选出 10 株耐盐碱石油烃降解菌,经鉴定分别为苍白杆菌属、葡萄球菌属、迪茨菌属、棒状杆菌属、无色杆菌属、微杆菌属、芽孢杆菌属,耐盐碱能力实验表明石油烃降解菌在不同微生物种属中广泛存在,并具有较好的耐盐碱特性。李兵等^[15]从辽河油田低温石油样品中筛选出一株低温石油降解菌 LHB16,经鉴定为嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*),LHB16 菌株能够有效地降解石油烃(尤其是长链烷烃)。Daane 等^[16]从污染的底泥以及高盐沼泽中分离出以多环芳烃为唯一碳源和能源的菌株,对石油烃具有较好的降解效果。Stauffert 等^[17]研究了反硝化细菌在石油污染降解中的作用,发现反硝化变形杆菌在石油污染中大量存在,沉积物生物扰动分析表明它们在石油烃的降解中起关键作用。也有报道了在硫酸还原菌 *Deltaproteobacterium* N47 中发现与多环芳烃降解相关的代谢基因^[18]。

自然环境中的微生物极其丰富,但没有受石油污染前,其自然群落结构或微生物种群并不适合石油污染环境。当其生存环境被污染后,微生物群落

结构会发生变化,能适应石油污染的种群继续发展,而一些不能适应石油污染的种群可能会受到抑制,或被完全淘汰。在未受石油污染的生态系统中,石油降解菌不足土壤中微生物总数的0.1%;而在受石油污染的生态系统中可达到100%,降解菌数升高几个数量级^[19]。微生物降解石油烃类化合物的能力取决于微生物群落和种属组成。研究表明,当菌群处于石油污染环境时,能降解和利用烃类化合物的微生物数量会急剧增长。Atlas^[20]报道在正常环境下石油降解菌一般只占微生物群落的1%。而当环境受到石油污染时,降解菌的比例可以提高到10%。石油污染能够诱导降解石油的微生物种群的生长,在受石油污染地区的降解菌的比例和数量明显上升,污染程度越重降解菌数量越多,说明石油污染能够使石油降解菌发生富集^[21]。

由于石油成分的复杂性,其降解需要多种微生物共同作用,一种微生物降解有机污染物产生的代谢产物可能是另一种微生物生长所需要的底物,这种混合微生物降解模式比单一微生物降解模式更具优势^[22]。Sathishkumar等^[23]从石油污染土壤中分离出57株石油降解菌,其中4株IOS1-7、BPS2-6、HPS2-5和BPS1-8分别属于芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* sp.)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)降解能力较强。将4株具有较强降解能力的细菌与57株降解菌组成的菌群一起研究它们在不同pH和温度条件下的降解效果,结果发现当温度为35℃、pH为7.0时各个菌株和菌群的降解效果最好,其中菌群的降解率最高(77%),其他4株纯菌(IOS1-7、BPS2-6、HPS2-5和BPS1-8)的降解率分别为69%、64%、45%和41%。说明对于原油这种复杂成分的有机污染物的降解,降解菌群较单菌具有优势。韩慧龙^[24]从河南中原油田长期石油污染土壤中,利用自主设计的土壤环流诱导驯化反应器,筛选得到可以具有石油降解能力的细菌13株,真菌2株以及酵母菌1株,针对石油为混合复杂化合物的特点,将分离得到的具有较强降解能

力的细菌阴沟肠杆菌和真菌刺孢小克银汉霉菌组合成真菌-细菌协同修复体系,提出了真菌-细菌协同修复的构想,证明真菌对复杂化合物具有较好的降解能力,产生的简单的代谢产物成为体系中细菌的降解底物进行进一步降解,达到彻底降解环境中石油污染物的目的。

2 微生物分子生态学研究方法

研究表明,一些条件下地理环境条件的差异对微生物群落的影响大于污染物的影响^[25]。但是由于微生物测定还存在很多问题,不可能对土壤中的微生物逐一培养和鉴定。现在,分子生物学技术可以直接从环境土壤中提取总DNA、克服传统细菌培养弊端,能在种、属或更高分类单元水平上对石油降解菌进行鉴定,可以在降解石油烃功能基因多样性和定量的分析、降解酶活性的测定、筛选和构建高效的石油降解工程菌等过程中发挥重要作用^[26]。

2.1 基于PCR的基因指纹图谱技术

2.1.1 变性/温度梯度凝胶电泳(DGGE/TGGE): 变性梯度凝胶电泳(Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)是由Lerman等在20世纪80年代初期发明的,起初主要用来检测DNA片段中的点突变^[27]。Muyzer^[28]在1993年首次将其应用于微生物群落结构研究,并证明该技术在揭示自然微生物的遗传多样性和种群异化方面具有独特的优越性,因此被广泛应用到分子微生物生态学研究领域。后来又发展出其衍生技术——温度梯度凝胶电泳(Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE),目前该技术已成为研究微生物群落结构的主要分子生物学方法之一^[29],广泛应用于海洋、土壤、高温热泉、琥珀、根际、沙丘等环境微生物生态的研究。

PCR-DGGE/TGGE在污染土壤修复领域应用十分广泛,该技术可以揭示微生物群落结构的动态变化,并给出相应的菌株信息。此外,该技术准确性高、重现性好。Gao等^[30]研究了不同土壤盐碱度和原油浓度下微生物的群落变化,通过DGGE分析

在盐渍化和原油污染土壤中活跃的细菌种类, 发现放线菌、 γ -变形菌、厚壁菌门、异常球菌-栖热菌门在降解石油烃过程中占主导地位。任瑞霞等^[31]采用 DGGE 和磷脂脂肪酸分析法两种方法对沈抚灌区水改旱田石油污染土壤的微生物群落结构进行了对比研究, 结果发现两种方法得出的结论一致。Bacosa 等^[32]研究了海啸沉积物中微生物降解多环芳烃的潜力和微生物群落结构, 结果表明 10 种微生物中有 7 种能够有效降解芴(去除率 100%)和菲(去除率 95%), 只有 4 种能够降解部分芘, PCR-DGGE 分析显示每个样品中微生物都由优势菌种主导, 包括可以降解多环芳烃的鞘氨醇单胞菌、假单胞菌属、鞘氨醇杆菌, 以及以前未知的降解菌(如藤黄单胞菌)。通过对切下条带进行序列分析或通过独特的探针杂交鉴定群落组成, 可方便地了解环境被干扰后的微生物群落变化或某种指示微生物的命运^[18]。

2.1.2 限制性片段长度多态性(RFLP): 限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism)分析就是利用限制性内切酶特性及电泳技术, 对特定 DNA 片段的限制性内切酶产物进行分析, 从而分析微生物的遗传多样性或用于微生物的种群分类。如何晶晶等^[33]以不依赖于培养的 16S rDNA-PCR-ARDRA 技术系统评价了我国最大的石油污水罐区-沈抚灌区污灌对土壤细菌遗传多样性的影响, 并对微生物群落中的优势菌群进行了研究。该技术的主要缺点是工作量偏大、重复性差, 不适宜大量土壤样品的高效性分析。

末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)又可称为 16S rRNA 的末端限制性片段分析技术, 它是 RFLP 方法的进一步发展^[34]。该技术已成功用于各种微生物群落分析比较、微生物群落多样性及结构特征等, 如丁晨^[35]采用 T-RFLP 技术和 16S rRNA 基因克隆文库技术检测产甲烷富集培养过程中古菌和细菌的群落结构变化趋势。Yuan 等^[36]使用 T-RFLP 技术分析了胜利油田注水井(S122ZHU)的微生物多样性, 基因 T-RFLP 图谱的 Shannon-Wiener 多样性

指数表明细菌与古菌在注水井中的种类数要比生产井中的高。Katsivela 等^[37]用 T-RFLP 检测石油污染土壤在 14 个月的生物修复中群落结构的变化, 发现肠杆菌属和苍白杆菌属在实验期内都有明显检出, 而产碱杆菌属仅在前 10 个月内有检出。Kaplan 等^[38]在对石油烃污染土壤的修复过程中, 利用 16S rRNA 末端限制性片段分析方法对微生物群落进行了跟踪。

2.1.3 单链构象多态性分析(SSCP): 单链构象多态性(Single strand conformation polymorphism, SSCP)就是指构成 DNA 双链之一的单个碱基发生变化影响到其空间构象, 进而影响到电泳图谱的现象^[39]。SSCP 分析技术可以用非变性聚丙烯酰胺凝胶区分相同大小但不同二级结构的 PCR 产物, 是对 16S rRNA 基因扩增产物进行分析的另一种简便有效的方法。Lee 等^[40]在 1996 年首次报道将 SSCP 技术应用到环境样品微生物群体多样性分析, 验证了不同菌株间条带的特异性。Holly 等^[41]用 SSCP 技术研究发现在植物根际土壤中大量存在古菌 Crenarchaeot, 该类微生物以往一直被认为只存在于极端嗜热环境中。Mnif 等^[42]采用 SSCP 技术结合克隆测序技术分析了突尼斯油田生产水域的微生物多样性, 发现随着时间变化, ASHTART47 和 ASHTART48 油田中微生物多样性发生了显著的变化, 而 DOULEB 油田微生物多样性较为稳定。

2.1.4 核糖体基因间隔序列分析(RISA): RISA 分析法对 *rrs* 和 *rrl* 基因(Intergenic spacer, IGS)之间间隔序列进行长度多态性分析, 间隔序列大小随种群而变化, 一般在 50 bp-1.5 kb 之间。引物目标区域在邻近区域内部, 因此 *rrs* 部分基因可以被共扩增, 随后对特定条带测序可以对种群某个种进行分类学鉴定^[43]。不同扩增的 IGS 片段可以根据大小用聚丙烯酰胺电泳分开。Petric 等^[44]采用 RISA 与实时 PCR 技术联用分析发现, 生物刺激和生物强化后多氯联苯污染场地的土壤中微生物群落结构发生明显改变, 放线菌、 α -和 γ -变形菌具有明显的群落优

势,其中放线菌的优势最为明显。然而 RISA 法灵敏度较低,可检测到的微生物种类多样性偏少,如 Rosano-Hernández 等^[45]采用 RISA 法研究墨西哥坎佩切海岸受石油污染底泥微生物群落结构,研究发现该技术可获得的微生物多样性较低,仅能检测到 5 个种群的 17 种菌。

研究表明,由于 16S rRNA 基因的异质性,可能会导致高估样品中微生物的种类^[46]。Pei 等^[47]发现在 883 个原核基因组(代表 568 个不同的物种)中,425 种物种的每个基因组含有 2-15 个 16S rRNA 基因的副本,235 种物种的基因组中发现了 16S rRNA 基因序列之间的差异。Sun 等^[48]对 2 013 组完整测序的细菌和古细菌的基因组进行分析,发现 952 组基因组(585 种物种)具有基因异质性。对 16S rRNA 基因异质性引起的微生物多样性过度估计进行评价,结果表明,在独特的水平,全长 16S rRNA 基因可以产生高达 123.7%高估;而在 3%的水平,16S rRNA 基因 V6 区域中的过度估计为 112.9%。进一步研究表明,基因异质性往往集中在特定区域,对细菌来说,V1 和 V6 区域多样性最高,相比之下,V4 和 V5 区域多样性程度最低。可见,由于 16S rRNA 的多样性,导致 PCR 扩增产生偏差,因此 16S rRNA 序列分析技术在应用时会使得测量的数值被人为的提高^[49]。

2.2 荧光原位杂交技术(FISH)

荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术是一种非放射性原位杂交方法,它采用特殊荧光染料标记核酸探针,在细胞内与特异的互补核酸序列杂交,通过激发探针的荧光来监测信号^[50]。该技术不依赖于 PCR,避免了 PCR 扩增造成的偏差,其精确性、特异性更高,而且还具有显微技术的可视性,能够监测和区分环境中不同的微生物,评价微生物群落结构的变化,同时提供形态学、数量、空间分布以及细胞环境方面的信息^[51]。

FISH 技术最初的应用是在微生物多样性较差

的体系,如原位鉴定细菌的共生体,或者鉴定有磁趋向性的便于分离的细菌。目前 FISH 技术被广泛用于废水生物处理过程中微生物群落以及特定微生物种群的动态^[52]。如 Zeng 等^[53]利用 FISH 技术对胜利油田采油厂回注水中硫酸盐还原原核生物(SRPs)进行检测,结果表明 SRPs 在胜利油田回注水中具有极高的种群多样性,广泛分布于 4 个细菌门和 1 个古菌门,其中优势菌属为脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)和脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*),同时也检测到了 *Archamglobus* 属的 SRPsA,证明了古菌类 SRPs 是回注水中一个不容忽视的硫酸盐还原微生物种群。Genovese 等^[54]模拟石油泄漏后石油烃在海底沉积物中埋藏,采用酶联-荧光原位杂交技术(CARD-FISH)、定量 PCR 和 16S rRNA 基因克隆库分析微生物变化,发现石油的添加影响土著专性好氧石油烃降解菌(OMHCB),1 个月以后食烷菌解环菌属和海杆菌生物群落增加了 1/3,最后沉积物中已观察不到土著 OMHCB。张君等^[55]采用 FISH 技术分析油藏中的产甲烷古菌的变化规律,研究表明在模拟油藏条件下,培养 30 d 后,产甲烷菌的含量逐渐升高,前期由其他微生物代谢产生的乙酸等产物作为产甲烷菌所需的代谢底物被消耗,培养 50 d 后,产甲烷菌的生长又促进了其他微生物的生长,总菌数增加。FISH 技术还可用于监测土壤中重金属污染、有机物污染及修复过程中微生物群落以及特定微生物种群的动态^[56-57]。

2.3 高通量测序技术(NGS)

高通量测序技术是对传统测序一次革命性的改变,一次对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,因此称其为下一代测序技术(Next generation sequencing, NGS),同时高通量测序使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能,所以又被称为深度测序(Deep sequencing)。其特点是高通量、低成本,可以同时多个单独的 DNA 分子进行测序,这一改进比起

每条序列需要单独分析的 Sanger 法提供了极大的方便^[58]。Lladó 等^[59]采用焦磷酸测序技术研究了工业木榴油污染土壤中真菌和细菌的生物多样性, 结果表明污染土壤中占主导作用的细菌群体是阿尔法变形杆菌, 镰刀菌属和足放线病菌属是主要的真菌。Hamady 等^[60]展示了一种可以平行同时分析多个样品的策略, 在对不同的样品进行 PCR 扩增时在引物的 5' 末端加上由 8 个碱基组成的标记 (Barcode), 再根据 Barcode 将不同来源的序列区分开来, 在同一次测序反应中同时分析了 286 个环境样品, 这一方法在分析多个环境样品微生物群落多样性领域得到了极为广泛的应用。

2.4 稳定同位素示踪技术(SIP)

稳定同位素示踪技术 (Stable-isotope tracer probing, SIP) 是近年来发展起来的一种研究石油烃生物降解作用机理的新方法, 它将人工合成的同位素标记特定的化合物, 追踪标记物的变化规律, 目前该项技术广泛应用于环境微生物学、生态学、生物医学等领域^[61]。Gutierrez 等^[62]采用 DNA-稳定同位素示踪技术研究了微生物对石油烃降解的作用机理, 确定了几种降解脂肪烃(食烷菌、海杆菌)和多环芳烃(类单胞菌、解环菌、嗜冷杆菌)的微生物。DNA-SIP 技术采用稳定性同位素如 ¹³C-标记底物培养环境样品, 之后提取环境微生物基因组总 DNA 并通过超高速密度梯度离心将 ¹³C-DNA 与 ¹²C-DNA 分离后, 进一步采用分子生物学技术分析 ¹³C-DNA, 将能揭示复杂环境样品中同化了标记底物的微生物作用者, 将特定的物质代谢过程与复杂的环境微生物群落物种组成直接耦合, 可以发掘重要功能基因, 揭示复杂环境中微生物重要生理代谢过程^[63]。

3 石油烃降解基因的研究

3.1 石油烃降解基因的测定及应用

石油烃生物降解的关键步骤是降解微生物功能基因的表达, 产生特异的降解石油烃的酶, 参与

石油类污染物的代谢转化。烷烃和芳香烃是复杂石油污染物的主要组成物质和造成生态毒性的主要来源, 对烷烃和芳香烃的降解是生物修复石油污染土壤的主要目标。编码烷烃和芳香烃降解酶的基因研究已成为国内外研究的热点。目前好氧降解的生物修复过程中主要涉及的烷烃降解基因为能编码降解 C5-C12 长度的烷烃单加氧酶基因 *alkB* 和细菌细胞色素 P450 基因^[64]; 对芳烃的降解基因有 *tmoA*-, C12O、C23O 类, 编码降解萘和菲的酶的 *nahAc* 和 *phnAc* 基因^[65]。微生物石油烃的厌氧降解中编码苯甲基琥珀酸合成酶的 α 、 β 、 γ 三个亚基的基因^[66]及编码烷基琥珀酸合成酶 (ASS) 的基因 *assA1* 和 *assA2*^[67] 成为目前厌氧降解的重点。石油降解基因通常作为生物标志物广泛被用于土壤、地下水、海水、沉积物, 甚至是恶劣极地环境下的降解基因的多样性分析, 并用来衡量该地区的土著微生物对石油烃生物降解潜能, 从而对石油烃的生物处理能力及自然降解过程做出很好的评价^[68-71]。

烷烃和芳香烃降解基因多样性的研究发展非常迅速, 主要集中在烷烃基因的结构形态、多样性、全长序列、表达调控研究方面。Adetutu 等^[72] 在研究澳大利亚一石油炼制厂区污染土壤 *alkB* 降解基因多样性和降解微生物降解潜能时, 采用焦磷酸测序的方式研究土壤降解微生物的丰度, 并设计针对噬油假单胞菌 GPo1、红球菌属、伯克氏菌、绿脓假单胞菌、不动杆菌扩增的特异性引物, 对扩增产物进行 DGGE 实验检测土壤中主要存在的菌属。Kao 等^[73] 采用实时聚合酶链反应, DGGE 技术联合生物培养技术对中国台湾南部环境样品中对编码苯酚羟化酶、甲苯单加氧酶、萘双加氧酶、甲苯单加氧酶、甲苯双加氧酶和联苯双加氧酶的基因进行了定量, 并对降解基因的 DGGE 群落分布进行分析。针对环境样品总 DNA 的 16S rDNA 和针对特定石油降解基因的特异性扩增 PCR 技术为基础的 DGGE、基因定量、克隆杂交测序在石油污染土壤中主要烷烃和芳香烃降解基因多样性及丰度研究上有重要

的应用价值和科研意义。

简并引物的设计和杂交技术的应用为综合评价石油污染土壤中降解菌的基因类型、检测新的石油降解基因提供了技术上的突破。石油降解基因的测定还存在很多问题,不同生物分类的石油降解基因的序列存在很大差异^[74],通常设计的引物只是针对某种菌属的微生物降解基因设计的特异性,难免对研究地区的石油降解基因的多样性分析不全面,如 Whyte 等^[75]只是针对恶臭假单胞杆菌 GPo1、红球菌 Q15、不动杆菌 ADP-1 设计特异性引物,采用群落杂交方法对南北极土壤中 *alkB* 降解基因多样性进行研究。作为一项重要进展, Kloos 等^[76]根据降解基因 *alkB* 的红素氧还蛋白的全部长度序列与 GenBank 上已知具有降解烷烃能力的微生物序列进行同源性的配对比对,设计了能够包含大多数降解烷烃降解基因 *alkB* 的简并引物,并对土壤样品 DNA 进行扩增引物的克隆和测序。van Beilen 等^[77]设计针对扩增降解烷烃基因 P450 简并性引物,并将其导入到恶臭假单胞菌 GPo12 中监测其在烷烃基质中的生长状况。Tuomi 等^[78]针对高度保守的萘降解基因 *nahAc* 设计简并引物,对芬兰南部 3 个受石油污染的土壤样品进行多样性检测。马迎飞^[79]根据双加氧酶的大亚基片段设计简并引物对降解菌株的 PAHs 降解基因进行检测,对双加氧酶的活性检测确定了极地地区的双加氧酶的活性受温度、石油浓度等条件的制约和诱导。

针对石油污染物的复杂成分和降解代谢基因的多样性,国内外目前使用的简并引物大都借鉴原有设计的引物进行扩增,对设计的简并引物是否都试用不同环境条件下的样品检测有待进一步确认。此外,在微生物石油降解基因的多样性分析中,假基因和引物二聚体的干扰作用也非常常见。如澳大利亚的 Wasmund 等^[80]研究地汶海域沉积物中 *alkB* 降解基因时采用简并引物进行扩增克隆,通过描述该地区 *alkB* 降解基因克隆数与蛋白操作单元之间的关系时发现简并引物扩增产物测序没有达

到任何文库的渐进线,说明样品中的 *alkB* 降解基因多样性高于测序所获得的结果。实时荧光定量 PCR 技术采用的多数为针对特定降解细菌种属的降解基因,在引物设计上难免会漏掉土壤中潜在的降解石油烃的微生物降解基因。简并引物的目的基因扩增主要应用于基因类型的多样性检测,但在基因的定量检测中应用很少。而且,设计合成的简并引物扩增产物长度大都满足不了定量 RCR 的使用条件。Park 等^[81]比对 33 种萘降解菌序列,设计 4 对针对萘降解基因 *NahAc* 扩增的简并引物用于研究受萘诱导下降解基因的多样性变化,并用定量 PCR 进行基因定量检测。发现简并引物只有 *nahAc-7F/R* 具有很好的扩增性。因此,如何设计包含更多降解微生物降解基因同源序列信息的简并引物,并且能用于实时荧光定量 PCR 的定量检测,来监测所研究地区的降解石油烃功能微生物多样性和降解基因的丰度,全面反映微生物的降解潜能是石油污染土壤的生物治理中需要进一步解决的一个难点。

我国在烷烃和芳香烃降解基因多样性研究方面也取得众多成果,第三海洋研究所的 Wang 等^[82]采用简并引物进行 *alkB* 基因扩增,随后将目的基因克隆,限制性内切酶切割测序的方法研究厦门海域 *alkB* 基因的多样性,并设计了 5 对针对主要烷烃降解菌的特异性引物进行定量 PCR,建立了降解基因克隆文库分析。常州大学 Liang 等^[83]基于杂交测序原理采用高通量的基因芯片技术设计包括能杂交检测烷烃、芳香烃及其他石油烃衍生的有机污染物降解基因的芯片,对我国 5 个主要油田的石油污染土壤中功能降解基因进行广度检测。目前虽然基因芯片技术在测定降解基因多样性上已经非常先进,但是对于那些功能调节依赖蛋白质磷酸化-去磷酸化等方式,而与其是否表达或表达量高低无关的代谢酶,核酸类基因芯片技术的应用就会失去意义。此外,对主要的降解基因的定量也无法用基因芯片技术来实现。因此,开发一种既能全面分析石油污染土壤中石油降解基因多样性,又能对该样品中微

生物降解潜能进行准确预测的技术非常必要。

3.2 基因芯片技术

DNA 微阵列技术(DNA microarray)又称 DNA 芯片(DNA chip)或基因芯片(Gene chip), 是利用单链 DNA 或 RNA 分子(目标分子)与固定在固体支撑物上的互补分子(探针)可以进行杂交而发展起来的技术^[84]。基因芯片是以玻璃片、尼龙膜或硅片为载体, 用高速机器人将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段有序、高密度地排列固定在载体上制成。这些被固定到载体上的已知序列的核苷酸片段就是探针。待测的样品核酸分子(未知序列, 称为目标分子或靶分子)经标记, 与固定在载体上的 DNA 阵列中的点按碱基配对原则进行杂交。通过放射自显影或激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描、检测杂交信号强度而获取所测样品分子的数量和序列信息, 最后用计算机软件进行数据的比较和分析, 获得目的材料中有关基因表达强弱的表达谱, 从而对基因的序列和功能进行大规模、高通量的研究^[85-87]。

微生物群落结构和种群鉴定所用到的芯片主要有 3 种: (1) 系统发育的寡核苷酸芯片(POAs), 芯片中含有用于分类的寡核苷酸探针(如 16S rRNA 基因), 该芯片主要是用于微生物群落组成和结构的系统发育分析; (2) 群落基因组芯片(CGAs), 芯片中含有不同菌株或种群的全基因组序列, 该技术可以根据可培养的成分描述微生物群落结构; (3) 功能基因芯片(FGAs), 芯片中含有编码特定生化过程关键酶的基因探针, 该技术可用于检测自然环境中微生物群落的生理状态和功能活动。Liang 等^[88]采用 GeoChip 芯片研究了东北地区石油污染土壤的微生物群落功能结构, 研究发现, 功能基因丰度和多样性随着污染物浓度的增加呈下降趋势。污染土壤的细菌、古细菌和真菌总量分别下降了 10%、40% 和 80%。一些功能基因(如 *pgl*、*rbcL*、*nifH* 和 *nor*)和纤维素酶、几丁质酶、漆酶等编码基因的丰度显著降低。相反, 一些编码降解邻苯二酚、联苯等酶的基因丰度显著增加。通过基因芯片的设计, 对我

国不同地区油田石油烃降解微生物的测定结果表明不同区域的降解微生物有显著不同, 微生物群落受石油烃污染程度、地理位置及土壤的地球化学性质影响^[83]。尽管目前针对 16S rRNA 的基因芯片还处在基础研究阶段, 但随着 16S rRNA、DNA 技术的广泛应用, 该技术在修复进程的快速检测、修复现场的信息化和标准化管理方面将具有广阔的应用前景。

4 总结与展望

分子生物学方法可以不依赖于培养直接获得微生物的信息, 为微生物群落结构的研究提供了一条新的途径。在自然界中存在大量可挖掘和利用的抗逆性、高降解能力等优异基因的微生物资源, 但通过传统方法却不能分离和检测, 而分子生物学技术可以克服此障碍, 检测到更多的微生物种群, 并可在分子水平对其生态功能进行分析、操作。

传统分子生物学方法存在 PCR 扩增偏差、引物偏向的缺陷, 尽管 FISH 方法不依赖于 PCR, 避免了 PCR 扩增造成的偏差, 然而引物的不匹配同样会造成对分析结果的错误估计; 高通量测序技术克服了传统 PCR 局限性, 为微生物分子生态学的研究提供了更广泛的应用前景。现代分子生物学技术在揭示功能微生物在生物修复中的作用机制、探索微生物之间的关系、阐明土壤修复机理等方面具有重要作用。

将传统的技术与不断完善的现代分子生物学技术结合, 探讨石油污染土壤微生物多样性, 对于了解在石油污染生物降解过程中起重要作用的微生物菌群以及理解、评价和进行原位生物修复具有重要意义。将微生物分子生态学技术应用于石油烃污染及修复中, 应注意以下几个方面:

(1) 石油降解微生物具有种类多、随环境变化大的特点, 实际污染区域所处的环境往往差异很大, 有必要在利用分子生物技术建立微生物种群动力学模式的同时, 进一步结合研究对象所在的地层或污染环境的地质及地球化学的相关情况, 完善技术方法同现场环境的接合性, 这样有助于提高实验

的稳定性及提供处理效率不佳时的解决方法。

(2) 应进一步加强对石油烃生物修复过程中功能基因的研究, 针对修复过程中的微生物变动十分复杂这一情况, 抓住降解基因这一解决问题的关键点, 通过对主要烷烃降解基因如 *alk*, 及新的降解基因如针对长链烃降解基因的研究, 结合 DGGE 分析及靛图谱分析等手段实现微生物群落的测定和对修复过程中功能基因即降解基因的追踪。

(3) 加强高通量测序技术和宏蛋白组学、代谢组学在石油烃污染修复中的研究, 从不同层次和角度全面分析微生物分子生态学的群落结构和功能代谢, 为石油污染微生物修复的应用提供更全面的科学依据。

参 考 文 献

- [1] Liu WX, Luo YM, Teng Y, et al. A survey of petroleum contamination in several Chinese oilfield soils[J]. *Soils*, 2007, 39: 247-251 (in Chinese)
刘五星, 骆永明, 滕应, 等. 我国部分油田土壤及油泥的石油污染初步研究[J]. *土壤*, 2007, 39: 247-251
- [2] Chen X, Schauder S, Potier N, et al. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing Boron[J]. *Nature*, 2002, 415: 545-549
- [3] Pace NR, Stahl DA, Lane DJ, et al. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences[J]. *ASM News*, 1985, 51: 4-12
- [4] Liu QL, Tang JC, Wan XT. Establishment of analysis method for detection of petroleum degrading genes *AlkB* and *Nah* in contaminated soil and its application[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(9): 1348-1353 (in Chinese)
刘庆龙, 唐景春, 万晓彤. 污染土壤中主要石油降解基因 *AlkB* 和 *Nah* 定量检测方法的建立和应用[J]. *分析化学*, 2014, 42(9): 1348-1353
- [5] Qin X, Tang JC, Zhang QM, et al. Isolation of two strains of fungi and their effect on bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-environment Science*, 2010, 29(10): 1999-2004 (in Chinese)
秦晓, 唐景春, 张清敏, 等. 两株真菌的分离及其在石油污染土壤修复中的作用[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(10): 1999-2004
- [6] Qin X, Tang JC, Li DS, et al. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55: 210-217
- [7] Tang JC, Niu XW, Sun Q, et al. Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms[J]. *Journal of Environmental Technology and Engineering*, 2010, 3(2): 80-86
- [8] Tang JC, Lu XQ, Sun Q, et al. Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2012, 149: 109-117
- [9] Wang XX, Han Z, Bai ZH, et al. Archaeal community structure along a gradient of petroleum contamination in saline-alkali soil[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(11): 1858-1864
- [10] Costa AS, Romão LPC, Araújo BR, et al. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 105: 31-39
- [11] Li L, Zhang LP, Zhang YL. Proceeding of degrading microorganisms of oil hydrocarbons[J]. *Microbiology China*, 2001, 28(5): 89-92 (in Chinese)
李丽, 张利平, 张元亮. 石油烃类化合物降解菌的研究概况[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(5): 89-92
- [12] Diya'uddeen BH, Daud WMAW, Aziz ARA. Treatment technologies for petroleum refinery effluents: a review[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2011, 89: 95-105
- [13] Xia BC. Biodegradation of Environmental Pollutants[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 176-177 (in Chinese)
夏北成. 环境污染物生物降解[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 176-177
- [14] Zhang HR, Tang JC, Sun KJ, et al. Isolation and identification of saline-alkaline tolerant hydrocarbon-degrading strains and study on their saline-alkaline tolerant characteristics[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015(1): 151-159 (in Chinese)
张海荣, 唐景春, 孙克静, 等. 耐盐碱石油烃降解菌的筛选、鉴定及其耐盐碱性研究[J]. *生物技术通报*, 2015(1): 151-159
- [15] Li B, Zhang QF, Dou SH, et al. Screening of a psychrotrophic oil-degrading strain LHB16 and its degradation characteristics[J]. *Biotechnology*, 2010, 20(5): 83-85 (in Chinese)
李兵, 张庆芳, 窦少华, 等. 低温石油降解菌 LHB16 的筛选及降解特性研究[J]. *生物技术*, 2010, 20(5): 83-85
- [16] Daane LL, Harjono I, Zylstra GJ, et al. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon egrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2683-2691
- [17] Stauffert M, Cravo-Laureau C, Duran R. Structure of hydrocarbonoclastic nitrate-reducing bacterial communities in bioturbated coastal marine sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 89: 580-593
- [18] Bergmann F, Selesi D, Weinmaier T, et al. Genomic insights into the metabolic potential of the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading sulfate-reducing *Deltaproteobacterium* N47[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5): 1125-1137
- [19] Wu ZJ. Application of microbial molecular ecological technology in the remediation of petroleum contaminated soil[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Tsinghua University, 2010 (in Chinese)
吴作军. 微生物分子生态学技术在石油污染土壤修复中的应用研究[D]. 北京: 清华大学博士学位论文, 2010
- [20] Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective[J]. *Microbiological Reviews*, 1981, 45(1): 180-189
- [21] Shen DZ. Bioremediation of Contaminated Environment[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002 (in Chinese)
沈德中. 污染环境的生物修复[M]. 北京: 化学工业出版社,

- 2002
- [22] Tzarkova EK, Groudeva VI. Bioremediation of petroleum-polluted soils by adsorptive immobilized *Corynebacterium* sp. RB-96[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2000, 14(1): 72-75
- [23] Sathishkumar M, Binupriya AR, Baik SH, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas[J]. *Clean-Soil Air Water*, 2008, 36(1): 92-96
- [24] Han HL. Enhanced remediation of petroleum contaminated soil by combination of fungi and bacteria[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Tsinghua University, 2008 (in Chinese)
韩慧龙. 真菌-细菌强化修复石油污染土壤的研究[D]. 北京: 清华大学博士学位论文, 2008
- [25] Córdova-Kreylos AL, Cao YP, Green PG, et al. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3357-3366
- [26] Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67: 503-549
- [27] Fisher SG, Lerman LS. DNA fragment differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory[J]. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 1983, 80: 127-141
- [28] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 317-322
- [29] Liu SF, Fu JJ. Mechanism, application and progress of DGGE[J]. *Foreign Medical Sciences*, 2002, 25(2): 74-76 (in Chinese)
刘上峰, 傅俊江. 变性梯度凝胶电泳的原理、应用及其进展[J]. *国外医学遗传学分册*, 2002, 25(2): 74-76
- [30] Gao YC, Wang JN, Guo SH, et al. Effects of salinization and crude oil contamination on soil bacterial community structure in the Yellow River Delta region, China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 86: 165-173
- [31] Ren RX, Zhang Y, Li H, et al. Pollutant components and microbial community structure of oil polluted soils after converted from paddy field to upland[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(5): 1107-1112 (in Chinese)
任瑞霞, 张颖, 李慧, 等. 石油污染土壤水改旱田后污染物组分及微生物群落结构的变化[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(5): 1107-1112
- [32] Bacosa HP, Inoue C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 283: 689-697
- [33] He JJ, Li H, Zhang Y, et al. A study on microbial diversity of petroleum contaminated soil in shenfu irrigation area[J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2008, 31(4): 33-37 (in Chinese)
何晶晶, 李慧, 张颖, 等. 沈抚灌区石油污染土壤微生物多样性的研究[J]. *新疆农业大学学报*, 2008, 31(4): 33-37
- [34] Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 323-327
- [35] Ding C. Molecular characterization of anaerobic Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbon at low temperature[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese)
丁晨. 低温石油烃降解产甲烷富集物的培养及微生物群落结构分析[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2013
- [36] Yuan SQ, Xue YF, Gao P. Microbial diversity in Shengli petroleum reservoirs analyzed by T-RFLP[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(2): 290-294 (in Chinese)
袁三青, 薛燕芬, 高鹏, 等. TRFLP 技术分析油藏微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2007, 47(2): 290-294
- [37] Katsivela E, Moore ERB, Kalogerakis N. Monitoring of the degradation activities and the diversity of the microbial community degrading refinery waste sludge[J]. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 2004, 4(4/5): 75-85
- [38] Kaplan CW, Kitts CL. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3): 1777-1786
- [39] Sun JY, Zhang LH, Fu GL, et al. Fingerprint study of Penis et Testis Cervi mtDNA with PCR-SSCP[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2014, 49(9): 721-725 (in Chinese)
孙景昱, 张丽华, 傅桂莲, 等. 聚合酶链式反应偶联单链构象多态性分析(PCR-SSCP)技术用于鹿鞭线粒体 DNA 指纹的研究[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(9): 721-725
- [40] Lee DH, Zo YG, Kim SJ. Nonradioactive methods to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(9): 3112-3120
- [41] Holly MS, Courtney EJ, Luke TB, et al. Cultivation of mesophilic soil crenarchaeotes in enrichment cultures from plant roots[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2005, 72(8): 4751-4760
- [42] Mnif S, Bru-Adan V, Godon JJ, et al. Characterization of the microbial diversity in production waters of mesothermic and geothermic Tunisian oilfields[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53: 45-61
- [43] Yu WW. Studies on genetic differentiation of different populations and mitochondrial and ribosomal genome of *Aleurodicus dispersus* (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2012 (in Chinese)
于卫卫. 螺旋粉虱种群分化及线粒体全基因组和核糖体基因序列分析[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2012
- [44] Petric I, Bru D, Udikovic-Kolic N, et al. Evidence for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term PCB-contaminated soil under bioremediation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 195(15): 254-260
- [45] Rosano-Hernandez MC, Ramirez-Saad H, Fernandez-Linares L. Petroleum-influenced beach sediments of the Campeche Bank, Mexico: diversity and bacterial community structure assessment[J]. *Journal of Environmental Management*, 2011, 95: S325-S331
- [46] Case RJ, Boucher Y, Dahllof I, et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73: 278-288
- [47] Pei AY, Oberdorf WE, Nossa CW, et al. Diversity of 16S rRNA

- genes within individual prokaryotic genomes[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(12): 3886-3897
- [48] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [49] Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, et al. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(9): 2629-2635
- [50] Lin XQ, Mao J, Lu X, et al. Applications and prospects of fluorescence *in situ* hybridization on plant molecular cytogenetics[J]. Sugarcane and Canesugar, 2012(1): 51-57 (in Chinese)
林秀琴, 毛钧, 陆鑫, 等. 荧光原位杂交技术(FISH)及其在植物分子细胞遗传学中的应用与展望[J]. 甘蔗糖业, 2012(1): 51-57
- [51] Moter A, Gobel UB. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 41(2): 85-112
- [52] Gaval G, Duchene P, Pernelle JJ. Filamentous bacterial population dominance in activated sludges subject to stresses[J]. Water Science and Technology, 2002, 46(1/2): 49-53
- [53] Zeng JH, Wu XL, Zhao GF, et al. Detection of SRPs in injection water of Shengli oil field by FISH[J]. Environmental Science, 2006, 27(5): 972-976
- [54] Genovese M, Crisafi F, Denaro R, et al. Effective bioremediation strategy for rapid *in situ* cleanup of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 162
- [55] Zhang J, Hou YB, Li JB, et al. Analysis of variation in methanogen with the application of fluorescence *in situ* hybridization under simulated reservoir conditions[J]. Petrochemical Industry Application, 2011, 30(4): 17-19,39 (in Chinese)
张君, 侯煜彬, 李建兵, 等. 应用 FISH 法分析模拟油藏条件下甲烷菌变化规律[J]. 石油化工应用, 2011, 30(4): 17-19,39
- [56] Richardson RE, Bhupathiraju VK, Song DL, et al. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques[J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(12): 2652-2662
- [57] Sandaa RA, Enger O, Torsvik V. Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal-contaminated soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3293-3297
- [58] Li XR, Luan JJ, Liu CJ. The research methods for molecular microbial ecology and their defects[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(2): 228-232 (in Chinese)
李晓然, 栾建军, 柳陈坚. 微生物分子生态学研究方法及其存在的缺陷[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 228-232
- [59] Lladó S, Covino S, Solanas AM, et al. Pyrosequencing reveals the effect of mobilizing agents and lignocellulosic substrate amendment on microbial community composition in a real industrial PAH-polluted soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 283: 35-43
- [60] Hamady M, Walker JJ, Harris JK, et al. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex[J]. Nature Methods, 2008, 5(3): 235-237
- [61] Lü H. Isotope geochemistry of biodegradation processes in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer[D]. Jilin: Master's Thesis of Jilin University, 2011 (in Chinese)
吕航. 地下水中石油烃生物降解的同位素地球化学研究[D]. 吉林: 吉林大学硕士学位论文, 2011
- [62] Gutierrez T, Singleton DR, Berry D, et al. Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP[J]. The ISME Journal, 2013, 7: 2091-2104
- [63] Jia ZJ. Principle and application of DNA-based stable isotope probing-A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1585-1594 (in Chinese)
贾仲君. 稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 原理与应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1585-1594
- [64] van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, et al. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment[J]. Oil & Gas Science and Technology, 2003, 58: 427-440
- [65] Hendrickx B, Junca H, Vosahlova J, et al. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64: 250-265
- [66] Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, et al. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glyceryl radical enzyme catalyzing the first step in anaerobic toluene metabolism[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28: 615-628
- [67] Callaghan AV, Wawrik B, Ni Chadhain SM, et al. Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 366: 142-148
- [68] Paisse S, Duran R, Coulon F, et al. Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92: 835-844
- [69] Powell SM, Bowman JP, Ferguson SH, et al. The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42: 2012-2021
- [70] Panicker G, Mojib N, Aislabie J, et al. Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2009, 97: 275-287
- [71] Wilson MS, Bankermans C, Madsen EL. *In situ*, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 80-87
- [72] Adetutu EM, Smith RJ, Weber J, et al. A polyphasic approach for assessing the suitability of bioremediation for the treatment of hydrocarbon-impacted soil[J]. Science of the Total Environment, 2013, 450/451: 51-58
- [73] Kao CM, Chen CS, Tsai FY, et al. Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting, and culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the control of petroleum-hydrocarbon plume[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 178: 409-416
- [74] Smits THM, Roëthlisberger M, Witholt B, et al. Molecular

- screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains[J]. *Environmental Microbiology*, 1999, 1: 307-317
- [75] Whyte LG, Schultz A, van Beilen JB, et al. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41: 141-150
- [76] Kloos K, Munch JC, Schloter M. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66: 486-496
- [77] van Beilen JB, Funhoff EG, van Loon A, et al. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 59-65
- [78] Tuomi PM, Salminen JM, Jørgensen KS. The abundance of *nahAc* genes correlates with the ¹⁴C-Naphthalene mineralization potential in petroleum hydrocarbon-contaminated oxic soil layers[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 51: 99-107
- [79] Ma YF. Study on PAHs-biodegrading bacteria in antarctic soil: isolation, characterization and degrading genes detection[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2004 (in Chinese)
马迎飞. 南极土壤中多环芳烃(PAHs)降解菌的研究: 分离、鉴定和降解基因的检测[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2004
- [80] Wasmund K, Burns KA, Kurtboke DI, et al. Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 7391-7398
- [81] Park JW, Crowley DE. Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72: 1322-1329
- [82] Wang W, Wang L, Shao Z. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60: 429-439
- [83] Liang Y, Van Nostrand JD, Deng Y, et al. Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China[J]. *The ISME Journal*, 2010, 5: 403-413
- [84] Zhou J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(3): 288-294
- [85] Xiong W. The research status and application prospect of gene chip technology in life sciences research[J]. *Life Science Instruments*, 2010(2): 32-36 (in Chinese)
熊伟. 基因芯片技术在生命科学研究中的应用进展及前景分析[J]. *生命科学仪器*, 2010(2): 32-36
- [86] Obeid I, Morizio JC, Moxon KA, et al. Two multichannel integrated circuits for neural recording and signal processing[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2003, 50(2): 255-258
- [87] Qiu MY, Li Y, Xie Y, et al. Microarray technique and its application[J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2001, 6: 534-537 (in Chinese)
裘敏燕, 李瑶, 谢毅, 等. 基因芯片技术及其应用[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 6: 534-537
- [88] Liang Y, Li G, Van Nostrand JD, et al. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 324-333