

文章编号: 1000-5013(2008)02-0177-07

未培养微生物研究的两种新技术 及其寻找功能基因的应用

刘慧杰¹, 田 蕴¹, 熊小京², 郑天凌¹

(1. 厦门大学 生命科学院; 2. 厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 在微生物筛选过程中, 99% 的未培养微生物是用传统的方法无法分离的, 这极大地限制了微生物生态领域中的多样性和利用生物资源等方面的研究. 采用新技术成为研究未培养微生物的技术瓶颈. 综述应用于未培养微生物的两种新技术——宏基因组和稳定同位素, 探讨这两种新技术在寻找功能基因中的应用, 特别是在生态环境中寻找功能微生物. 探讨降解微生物及其功能基因对污染的生态环境进行的生物修复, 为进一步研究微生物生态多样性及其功能基因的开发应用打下基础.

关键词: 未培养微生物; 宏基因组; 稳定同位素; 功能基因; 微生物生态

中图分类号: Q 93-33

文献标识码: A

一般环境中, 占微生物总数仅为 1% 的可培养微生物往往被重复培养和筛选, 而占 99% 的未培养 (Non-Culturable) 微生物用传统的方法却无法分离^[1]. 未培养微生物对于自然界和人类的贡献是无法估量的, 这是一个极具潜力的群体, 所蕴藏着巨大的微生物资源是微生物学家和化学家研究的新领域^[2]. Stackebrandt 等^[3]将那些利用分子生物学技术能够检测到, 但还不能获得纯培养的微生物定义为“(至今)未培养微生物”. 当前, 探索未培养微生物的研究方法已作为微生物学的一个新挑战, 成为未培养微生物研究的技术瓶颈, 受到极大的关注. 近年来, 对于研究环境微生物的种类和数量, 发展了生物化学^[4]、生理学^[5]和分子生物学^[6-7]等不需传统培养的方法. 其中, 分子生物学方法是未来研究环境微生物生态学和未培养微生物的有力工具^[8]. 本文从研究未培养微生物的这一关键技术出发, 对宏基因组技术和稳定同位素技术这两种新方法在该领域的应用进行论述.

1 宏基因组技术

1.1 宏基因组简介

传统依赖培养的筛选方法其实损失了绝大部分微生物资源, 由于占群落中绝大部分的微生物不能培养, 使得科学家发展了一种新方法. 这种方法不需要预先培养就能开发这些微生物的基因组, 它能从各种环境中直接获得所有微生物总 DNA (包括存活的或已死亡的). 这研究领域被称为“宏基因组学 (Metagenomics)”^[9].

宏基因组 (Metagenome) 是由 Handelsman 等在 1998 年提出的新名词. 其定义为生境中全部微生物遗传物质的总和, 包含了可培养和未可培养的微生物基因, 避开了微生物分离、纯化、培养的问题, 扩大了微生物资源利用的空间. 该技术是直接提取特定环境中的总 DNA, 克隆到可培养的宿主细胞中以构建宏基因组文库, 从获得的克隆当中进行功能筛选和序列筛选分析. 这显示了它在开发和利用那些

收稿日期: 2007-12-18

作者简介: 刘慧杰 (1974-), 男; 通讯作者: 郑天凌 (1955-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事环境微生物学的研究. E-mail: microzh@xmu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40576054, 40476047); 福建省自然科学基金资助项目 (D0610021, 2005YZ1023)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

不可培养微生物的基因资源, 筛选新的功能基因等方面的潜力^[2, 10]. 采用宏基因组文库与传统培养途径的研究方法比较^[11], 如图 1 所示.

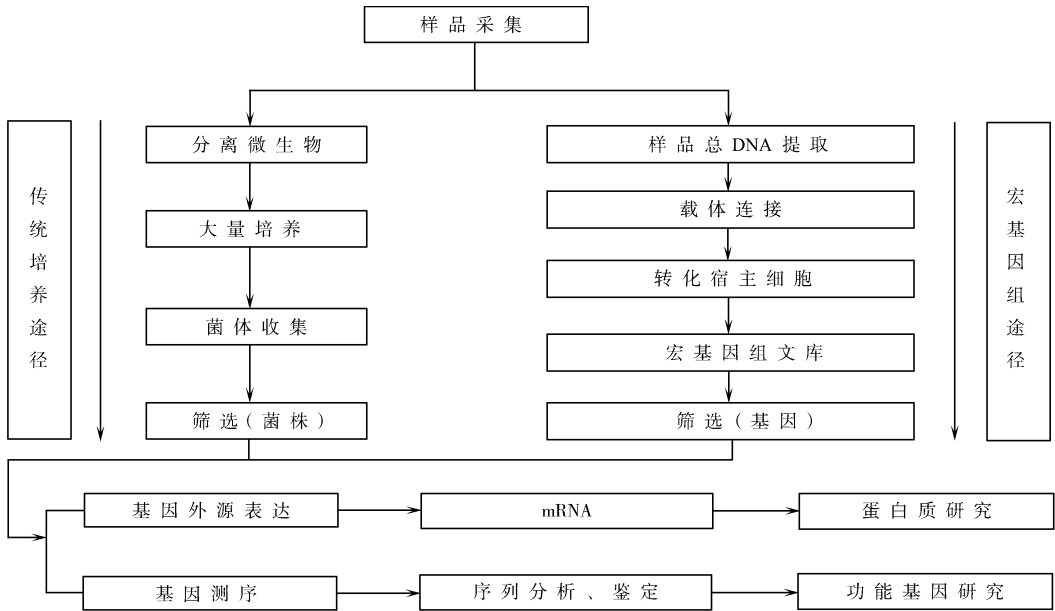


图 1 传统培养和宏基因组流程比较

Fig. 1 Comparasion of traditional method and metagenomic technology

1.2 宏基因组文库的构建

宏基因组文库的构建利用了分子克隆的基本原理和技术方法, 并根据具体情况采用了一些特殊的步骤和对策. 主要包括环境样品总 DNA 的提取, 与载体连接和克隆到宿主细胞中 3 个步骤^[2].

1.2.1 环境样品总 DNA 的提取 获得高质量的环境样品中的总 DNA 是宏基因组文库构建的关键之一, 既要尽可能地抽提出样品中的 DNA, 又要保持其较大的片段以获得完整的目的基因或基因簇. 如果样品中存在腐殖酸类物质强烈抑制分子克隆操作过程中多种酶的活性, 须尽量除去^[12]. 总 DNA 的提取可以分为两类: 一类是原位裂解法. 即将样品直接悬浮在裂解缓冲液中处理, 继而抽提纯化. 此法操作容易、成本低、DNA 提取率高、偏差小, 但由于机械剪切作用较强, 所提取的 DNA 片段较小(1~ 50 kbp), 且腐殖酸类物质也难以完全去除; 另一类是异位裂解法. 即先采用物理方法将微生物细胞从样品中分离出来, 然后采用较温和的方法抽提 DNA. 此方法可以获得大片段的 DNA(20~ 500 kbp), 且纯度高, 但操作繁琐、成本高. 有些微生物在分离过程中可能会丢失, 在温和条件下, 一些细胞壁较厚的微生物 DNA 抽提不出来.

1.2.2 载体 目的基因能否有效地转入宿主细胞, 并在其中维持原性性状和高效表达, 在很大程度上取决于载体. 因此, 载体在宏基因组技术中也处于重要的地位. 宏基因组文库多以质粒、细菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome, BAC)等为载体, 目前多采用细菌人工染色体(BAC)和粘粒(Cosmid)载体. 前者插入片段大(可达 350 kbp), 但克隆效率低; 后者插入片段中等(20~ 40 kbp), 克隆效率高. BAC 和 Cosmid 载体在宿主细胞中的稳定性高, 但拷贝数低, 宏基因的扩增困难, 表达量低. 为了提高宏基因的表达, 便于重组克隆子活性检测, 有研究者直接利用表达载体构建宏基因组文库. 表达载体可插入的宏基因片段一般小于 10 kbp, 适合于筛选单一基因或小的操纵子产物. 为提高和调控外源基因的拷贝数与表达量, 常需选用不同类型的载体. 但要注意是, 载体的选择主要针对有利于目标基因的扩增、表达, 以及在筛选细胞活性物质时表达量的调控等.

1.2.3 宿主 宏基因组文库多以细菌、酵母、链霉菌等为主的宿主菌株. 它的选择主要考虑转化效率、重组载体在宿主细胞中的稳定性、宏基因的表达、目标性状(如抗菌)缺陷型等. 不同的微生物种类所产生的活性物质类型有明显差异, 因此不同的研究目的应选不同的宿主菌株. 如 70% 的抗生素来源于放线菌, 若以寻找抗菌、抗肿瘤活性物质为目标, 选择链霉菌为宿主较理想; 而筛选新的酶, 则采用大肠杆菌为宜.

1.2.4 宏基因组文库的筛选 环境样品中微生物种类繁多,宏基因组文库容量一般较大,活性克隆子的筛选是新活性物质筛选的关键.根据研究目的的不同,可从生物活性水平、化合物结构水平,以及 DNA 序列水平设计不同的筛选方案.这些方案主要包括生物活性水平和化合物结构水平的筛选等^[2].

1.3 宏基因组技术在未培养微生物中的应用

2000 年,Rondon 等^[13] 构建了两个土壤环境总 DNA 的 BAC 基因组文库,文库中 DNA 片段总长超过 1 Gbp.通过 16s rRNA 构建系统发育树进行分析,发现文库中存在丰富的微生物多样性,包括 G+ C 含量低的微生物、革兰氏阳性嗜酸菌、亲细胞微生物和原核微生物等.筛选以 *E. coli* 做宿主的克隆子进行外源表达,发现它们有抗菌、脂肪酶、淀粉酶、核酸酶等活性.该文库分析土壤环境中微生物多样性的同时,也提供了许多未培养微生物的信息,为进一步分析土壤环境中未培养微生物的分类和功能信息,以及进行相关基因研究打下良好的基础.

Ranjan 等^[14] 为寻找分解脂肪的基因,在 2005 年构建了池塘水的宏基因组文库,文库应用质粒载体转化到 *E. coli* 宿主细胞中,文库中 DNA 片段总长大约为 532 Mbp.分离到 11 个有分解三丁酸甘油酯能力的克隆子,通过对分解脂肪的功能基因进行鉴定,其 DNA 中 G+ C 组成范围从 57% ~ 75%.这些有分解脂肪能力的基因有 7 个是已知的编码该蛋白家族的成员,有 1 个基因编码的蛋白是近期新鉴定的 BioH 蛋白,1 个克隆子编码 alpha/ beta 水解酶的基因是至今未被发现的新基因,它来自于池塘水中未培养的微生物.

赵广存等^[15] 通过构建牛瘤胃未培养细菌的宏基因组文库,共获得 1.2×10^4 个克隆.文库外源 DNA 总容量为 4.2×10^8 bp,筛选得到 9 个表达葡萄糖苷酶活性的克隆,并对其中的 1 个表达葡萄糖苷酶活性的克隆 pGXN1009 进行亚克隆,结果发现 1 个全长为 1.956 kbp 的开放读码框架(ORF),可能编码 1 个葡萄糖苷酶基因 umbg13A,其编码产物与 1 个来源于小鼠大肠未培养细菌的葡萄糖苷酶一致性为 63%,相似性为 79%;与哈氏噬纤维菌的葡萄糖苷酶的一致性为 50%,相似性为 67%.分析表明,umbg13A 基因可能是来自牛瘤胃微生物噬纤维菌属未培养的 1 个新种.

环境中的病毒种类呈现出更丰富的多样性,然而对于环境中病毒种类的鉴定是更复杂的,因为病毒存活所依赖的可培养宿主菌的数量不到总数的 1%.同时,对于所有病毒基因组而言,也没有唯一的保守基因序列,未培养病毒的多样性至今还不能像细菌 16s rDNA 一样被监测.可喜的是,应用宏基因组技术,对于研究未培养病毒种群的组成和结构突破了这个限制,为病毒研究也提供了一个新的思路^[16-17].

2 稳定同位素技术

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).

最早将 SIP 技术应用于微生物核酸分析的是 Meselson 和 Stahl.他们在 1958 年用¹⁵N 和¹⁴N 两种稳定同位素标记核酸,研究 DNA 在复制过程中亲链和子链的保留关系^[18],奠定了 DNA 半保留复制学说的基础.SIP 作为示踪物,主要是标记营养底物来培养生物样本,可培养与未培养和功能微生物均可利用 SIP 标记的底物做为营养物质.提取这些微生物的核酸,根据标记与未标记 SIP 的核酸在密度梯度离心介质中的重力不同,将利用标记有稳定同位素的功能微生物分离,通过核酸序列比对,寻找未培养微生物.

环境中的许多物质都可以用 SIP 来标记,这些核酸标记物主要有 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^[19],SIP 对于未培养微生物的分离和功能基因的鉴定研究具有重要的意义.SIP 对于未培养微生物的研究流程,如图 2 所示.

2.2 稳定同位素技术在未培养微生物中的应用

2.2.1 DNA 稳定同位素标记法(DNA-SIP) Borodina 等^[20] 在土壤环境中富集、分离、降解 CH₃Cl 的微生物.用稳定同位素¹³C 标记¹³CH₃Cl,分离到 7 株 CH₃Cl 降解菌.在所使用的培养方法中,*Hypho-*

microbium 是优势菌株, 对 ^{13}C 标记的 DNA-SIP 的分析过程中, 通过构建系统发育树, 发现 SIP 标记 *cmuA* 序列降解 CH_3Cl 的菌株是迄今为止未培养的新菌株.

Radajewski 等^[21] 用 ^{13}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, 提取其总 DNA. 密度梯度离心分离 ^{13}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依据. Morris 等^[22] 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^[23] 在淡水沉积物中, 应用 DNA-SIP 技术找到了氨氧化微生物. DNA-SIP 技术在功能微生物的寻找和鉴定方面起着重要的作用.

2.2.2 RNA 稳定同位素标记法(RNA-SIP) RNA-SIP 与 DNA-SIP 的根本不同在于, 它用的是活跃微生物的“转录组”. 因此, RNA-SIP 的重要优点在于活跃微生物的 RNA 是生物合成的, 而不是用聚合酶链式反应(PCR)等方法体外合成的. 并且, 在微生物生长浓密的生物反应器中, RNA 被 ^{13}C 标记的速度比 DNA 快得多, 表明 RNA-SIP 可能比 DNA-SIP 具有更大的灵敏性. 在 RNA-SIP 方法中, 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, Manefield 等^[24] 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. 研究者用 ^{13}C 标记苯酚, 利用 RNA-SIP 技术, 在好氧生物反应器中, 鉴定出 *Thauera* 菌种是苯酚降解的主要菌种.

在厌氧环境中, 丙酸酯是许多有机物降解过程中重要的中间产物, 然而该类化合物的降解受到热力学的限制, 目前对于通过纯培养的方式分离到的菌株很有限. Lueders 等^[25] 应用 SIP 标记丙酸酯, 密度梯度离心后收集 SIP-RNA, 通过构建系统发育树, 发现了迄今为止未培养的丙酸酯降解菌株.

2005 年, 陆雅海等^[26] 在《Science》上对 SIP 技术的应用进行了研究报道. 他们用 ^{13}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}C 进入到甲烷古菌的 RNA 中, 表明水稻田中的 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^[27].

3 稳定同位素与宏基因组技术的联合应用

应用稳定同位素技术可以得到环境中功能活性微生物的核酸, 对这些核酸可以构建宏基因组文库, 更有利于寻找未培养微生物的功能基因. 2006 年, Dumont 等^[28] 研究 *Methylotherophis* 功能基因, 用 ^{13}C 标记甲烷作为底物, 与红树林土壤微生物共同培养, 提取收集 ^{13}C 标记的土壤微生物总 DNA, 构建宏基因组 BAC 文库. 文库中有 2 300 个克隆子, 大多数的插入片段长度为 10~ 30 kbp, 文库包含所研究的大约为 15.2 kbp 的目标基因 *Methylotherophis*. 该基因含有完整的编码甲烷单加氧酶 *pmoCAB* 的操纵子. 通过对该基因鉴定和测序, 发现 *pmoA* 基因类似于以前应用 DNA-SIP 和 PCR 技术鉴定的未培养微生物 *Methylocystis* sp. 的基因.

4 结论与展望

应用传统的纯培养方法, 对于可培养微生物的分离、鉴定技术已经非常成熟^[29-34], 但对于未培养微生物目前研究还不广泛. 由于这类微生物在自然环境微生物群落中占有非常高的百分比(约为 99%), 无论是其物种类群, 还是新陈代谢途径、生理生化反应、产物等方面都存在着不同程度的新颖性和丰富的多样性, 因而其中势必蕴含着巨大的生物资源. 所以, 对自然环境中的各种微生物, 尤其是对未培养微生物进行广泛深入的研究, 不仅是微生物学基础理论研究的需要, 也是未培养微生物资源开发利用的基

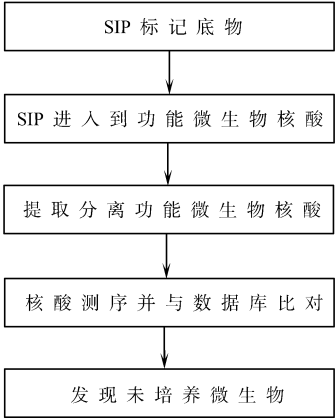


图 2 SIP 技术应用于未培养微生物的流程

Fig. 2 The flow chart of unclutured bacteria research with SIP technology

础^[35].

在未培养微生物的研究过程中,宏基因组技术和稳定同位素技术是近年来发展起来的.这两种新技术可以克服传统纯培养技术的不足,提供了一种探知微生物多样性结构和功能基因的新方法,是一条寻找新基因及其产物的新途径^[19, 35-37].两种技术对于未培养微生物研究具有独特的优势,但又有各自不同的特点.宏基因组学是一门崭新而又令人兴奋的学科,它在生物学和生物技术领域有着非常广泛的用途,通过对可培养和未培养微生物基因组的获得,可以进一步丰富微生物种群以用于生态学研究.目前,已从宏基因组中发现了大量令人感兴趣的基因,今后的工作需要进一步确定这些基因的功能,以及其产物能否应用于各种生物技术过程.但此技术的开发利用还有许多亟待解决的问题.如目前选用的高拷贝数的质粒,虽然易于操作,但其插入片段较小,对生物合成比较复杂的化合物,因其基因簇较大而无法完整克隆;细菌人工染色体(BAC)载体虽能容纳100 kbp以上的大插入片段,但其拷贝数少,使外源基因表达量较少,进而次级代谢产物的产量低.因此,寻找和开发更合适的表达载体,以及如何高效、高灵敏度地筛选活性克隆子,是应用该技术的关键问题.稳定同位素技术在功能微生物中的研究方法多样,主要包括不同DNA-SIP和RNA-SIP.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,存在着明显的优势,它可以将我们感兴趣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.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¹³C标记的原子才能被离心分开^[21].大部分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.宏基因组技术和稳定同素技术这两种方法的最大区别在于:宏基因组技术可以得到环境中可培养和未培养微生物的总DNA;而稳定同位素技术得到的是环境中可培养和未培养功能微生物的总DNA.根据不同的实验需要,可以选用不同的实验方法.两者对于未培养微生物的研究,都有较大的优势和能够提供很好的技术支持.

生物降解是去除环境污染物的主要手段之一.目前研究生物降解的化合物主要是POP_s类物质,包括多环芳烃(PAH_s)、多氯联苯(PCBs)、除草剂、杀虫剂、有机氯农药等.研究表明,从生态环境中虽然得到了许多基于可培养的,降解这类有机物的微生物,但分离得到的部分单菌降解效率不高,且很难在污染的生态环境中进行生物修复而得到广泛应用,在生物修复研究中的应用报道较少见.在未培养微生物中寻找高效降解微生物及功能基因,已成为当前研究热点.厦门大学微生物研究所的实验室基于在生态环境中寻找未可培养微生物及其降解基因出发,应用宏基因组技术构建文库,在寻找抑制赤潮藻类的相关基因及PAH_s高效降解基因已进行了大量研究并取得初步研究成果,并期望在未培养微生物中寻找高效功能基因应用于污染的生态环境治理.同时,在构建的宏基因组文库中,筛选得到了产纤维素的克隆子.

近年来,基因组学和现代分子技术的成熟,逐渐渗透到有关生命科学的整个领域,也为微生物生态学提供了新的研究方法和机遇.如何开拓利用未培养微生物新资源是微生物研究的重要课题,它对传统的微生物学、微生物学等研究均提出了新的挑战.宏基因技术和稳定同位素技术是近年来发展起来的新方法^[24, 38],随着科学技术的不断发展,这两种新技术凭借其强大的优势,在未可培养微生物的寻找、功能基因筛选、生态学研究等方面存在着巨大的潜能.今后,在未培养微生物资源的开发利用上,这两种新技术将会得到更广泛的应用,在环境微生物学、生态学领域中也必将发挥巨大的作用.

参考文献:

- [1] FERRARI M D. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and its application to the bioremediation of contaminated soils and sludges[J]. *Rev Argent Microbiol*, 1996, 28(2): 83-98.
- [2] 陆娟,任莉萍.宏基因组技术在环境微生物资源开发中应用的探索[J]. *阜阳师范学院学报*, 2005, 22(3): 35-42.
- [3] 崔晓龙,徐丽华,文孟良,等.未培养微生物资源[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 144-146.
- [4] SPIECK E, HARTWIG C, MCCORMACK I, et al. Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge[J]. *Environ Microbiol*, 2006, 8(3): 405-415.

- [5] 席劲瑛, 胡洪营, 姜 健, 等. 生物过滤塔中微生物群的代谢特性[J]. 环境科学, 2005, 26(4): 165-170.
- [6] PIRONE L, CHIARINI L, DALMASTRI C, et al. Detection of cultured and uncultured *Burkholderia cepacia* complex bacteria naturally occurring in the maize rhizosphere[J]. Environ Microbiol, 2005, 7(11): 1734-1742.
- [7] CHEN Y C, BANKS M K, SCHWAB A P. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soil[J]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2002, 224: U620.
- [8] 张汉波, 段昌群, 屈良鹄. 非培养方法在土壤微生物生态学研究中的应用[J]. 生态学杂志, 2003, 22(5): 131-136.
- [9] TRINGE S G, RUBIN E M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(11): 805-814.
- [10] STEELE H L, STREIT W R. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 247(2): 105-111.
- [11] 阎 冰, 洪 葵, 许 云, 等. 宏基因组克隆——微生物活性物质筛选的新途径[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 113-117.
- [12] 席 峰, 傅莲英, 王桂忠, 等. 海洋沉积物 DNA 提取前的简易脱腐方法研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16(5): 539-544.
- [13] 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[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(6): 2541-2547.
- [14] RANJAN R, GROVER A, KAPARDAR R K, et al. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(1): 57-65.
- [15] 赵广存, 段承杰, 庞 浩, 等. 牛瘤胃未培养细菌中一个 β -葡萄糖苷酶基因 *umbgl3A* 的克隆及鉴定[J]. 西南农业学报, 2005, 18(4): 472-476.
- [16] EDWARDS RA, ROHWER F. Viral metagenomics[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(6): 504-510.
- [17] BREITBART M, SALAMON P, ANDRESEN B, et al. Genomic analysis of uncultured marine viral communities[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 14250-14255.
- [18] MESELSON M, STAHL F W. The replication of DNA in *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, 44: 671-682.
- [19] RADAJEWSKI S, MC DONALD R, MURRELL J C. Stable-isotope probing of nucleic acids: A window to the function of uncultured microorganisms[J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14(3): 296-302.
- [20] BORODINA E, COX M J, MC DONALD 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[J]. Environ Microbiol, 2005, 7(9): 1318-1328.
- [21] RADAJEWSKI S, INESON P, PAREKH N R, et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology[J]. Nature, 2000, 403(6770): 646-649.
- [22] MPRROS S A, RADAJEWSKI S, WILLISON T W, et al. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(3): 1446-1453.
- [23] WHITBY C B, HALL G, PICKUP R, et al. ^{13}C incorporation into DNA as a means of identifying the active components of ammonia-oxidizer populations[J]. Lett Appl Microbiol, 2001, 32(6): 398-401.
- [24] MANEFIELD M, WHITELEY A S, OATLE N, et al. Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16(23): 2179-2183.
- [25] LUEDERS T, POMMERENKE B, FRIEDRICH M W. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: Syntrophic propionate oxidation in flooded soil[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(10): 5778-5786.
- [26] LU Ya-hai, CONRAD R. In situ stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere[J]. Science, 2005, 309(5737): 1088-1090.
- [27] LU Ya-hai, LUEDERS T, FRIEDRICH M W, et al. Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing[J]. Environ Microbiol, 2005, 7(3): 326-336.

- [28] DUMONT M G, RADAJEWSKI S M, MIGUEZ C B, et al. Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1240-1250.
- [29] 戴 欣, 陈月琴, 周 惠, 等. 海洋细菌的分子鉴定分类[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2000, 39(1): 68-71.
- [30] VAKKEROV-KOUZOVA N D. Isolation and study of azobenzene converting soil bacteria[J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2005, 41(2): 185-188.
- [31] 田 蕴, 郑天凌. 海洋环境中降解多环芳烃的微生物[J]. *海洋科学*, 2004, 28(9): 50-55.
- [32] 夏 颖, 闵 航. 一株多环芳烃降解菌的鉴定及 GST 基因克隆和序列分析[J]. *微生物学报*, 2003, 43(6): 691-697.
- [33] ALIAS Z, TAN I K. Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique[J]. *Bioresour Technol*, 2005, 96(11): 1229-1234.
- [34] BATISTA S B, MOUNTEER A H, AMORIM F R, et al. Isolation and characterization of biosurfactant/ bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites[J]. *Bioresour Technol*, 2006, 97(6): 868-875.
- [35] 叶姜瑜, 罗固源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(5): 111-115.
- [36] HANDELSMAN J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(4): 669-685.
- [37] STREIT W R, SCHMITZ R A. Metagenomics: The key to the uncultured microbes[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(5): 492-498.
- [38] SINGH A, WARD O P. Biodegradation and Bioremediation[M]. VARMA A. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004: 309.

Two Novel Methods for Uncultured Microorganisms Study and Their Application in Searching Functional Genes

LIU Hu-jie¹, TIAN Yun¹, XIONG Xiao-jing²,
ZHENG Tian-ling¹

(1. School of Life Sciences, Xiamen University;

(2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Based on the strategy to explore microbial resource from natural environment and the fact that the majority (about 99%) of microbes in diverse environments are unculturable till now by using traditional microbiological methods, scientists try hardrounding the bottleneck to set up novel techniques to culture and study those uncultured microorganisms. In this paper, two novel methods concerning metagenomics and stable isotope probing for above-mentioned study were introduced and the application of searching functional genes and functional microbes in ecological environment was also discussed. In addition, the suggestion of bioremediation of polluted environment with degrading microbes and their functional gene was proposed.

Keywords: uncultured microorganism; metagenome; stable isotope probing; functional genes; microbial ecology

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)