

稳定性同位素探针技术在土壤功能微生物原位鉴定的应用

蔺 中, 孙礼勇, 陈 昊, 孙迎韬, 白 婧, 李永涛*

(华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

摘 要:新近发展起来的稳定性同位素探针技术(SIP)与分子生物学方法结合,能够定向发掘复杂环境中参与特定生态过程的微生物资源,是土壤功能微生物原位鉴定的有效手段,具有广阔的应用前景。其原理是环境样品中的功能微生物代谢同化同位素标记的底物,通过对其生物标志物(即 DNA、RNA、PLFA 等)进行提取、分离、鉴定和比对分析,以此获取介导土壤物质转化和循环过程的功能微生物的直接信息。本文在分别介绍 SIP 技术在土壤功能微生物原位鉴定过程中的各种前处理方法、生物标志物选择及后续鉴定方法的基础上,综述了 SIP 技术在研究驱动土壤有机污染物生物降解、碳氮循环等过程的功能微生物原位鉴定的应用进展,展望了 SIP 技术在土壤微生物基因组学方面的应用前景。

关键词:土壤;稳定性同位素探针技术;原位鉴定;功能微生物

中图分类号:S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)01-0001-06

Application of Stable Isotope Probing on *In-situ* Identification of Soil Functional Microorganism

LIN Zhong, SUN Li-yong, CHEN Hao, SUN Ying-tao, BAI Jing, LI Yong-tao*

(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Utilization of stable isotope probing(SIP) coupled with molecular biology method, can explore microorganisms source responsible for specific process in natural environment, and has a broad application prospects for soil functional microorganism *in situ* identification. The principle of the SIP technique is as follows. Functional microorganisms in soil samples, that metabolize the SIP-labeled substrates and assimilate SIP-labeled biomarkers, e.g., DNA, RNA and PLFA, can be identified by extraction, separation and analysis of these SIP-labeled biomarkers, and then information of soil functional microorganisms responsible for transformation and cyclic process of substrate in soil can be obtained directly as a result. With introduction of pre-treatment technology, SIP-labeled biomarker selection, and subsequent microorganisms' identification method, this study illustrates the research progress of SIP technique in *in-situ* identification of functional microorganisms involving in the soil organic pollutants degradation, carbon and nitrogen cycle. It will provide a comprehensive reference for the application and exploration of SIP-based *in-situ* identification of soil microbial genomics in future.

Keywords: soil; stable isotope probing; *in-situ* identification; functional microorganism

传统的功能微生物鉴定方法是在含有特定碳源培养基上对目标微生物进行富集、分离与纯化,由于实验室可培养的微生物只占微生物总数的 0.1~1%^[1],因此以纯培养技术为代表的鉴定方法存在很大局限性。20 世纪后半叶,以分子生物学为特色的现代土壤微生物研究方法取得突破性进展,包括以磷脂脂肪酸

(PLFA)技术为代表的生物化学方法,以 BIOLOG 技术为代表的生理学方法和基于 DNA 多态性的微生物群落结构和功能多样性的分子生态学技术,如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、限制性片段长度多态性(RFLP)、末端限制性酶切片段长度多态性分析(T-RFLP)和实时荧光定量 PCR 技术(RT-PCR)等。上述技术提高了人们对土壤微生物群落结构组成的认识,但仍难提供有关微生物间相互作用及代谢功能微生物的直接信息^[1-2]。例如,DGGE 和 T-RFLP 等分子指纹图谱方法只能检测环境样品中的优势微生物群落,但具有特定生态和环境功能的微生物通常在数量上

收稿日期:2011-12-29

基金项目:国家自然科学基金(40871152, 41171210)

作者简介:蔺 中(1982—),男,山东淄博人,博士研究生,主要从事土壤有机污染与修复研究。E-mail: linzhong18@163.com

* 通讯作者:李永涛 E-mail: yongtao@scau.edu.cn

并不占优势^[3]。因此,功能微生物很难被这些分子指纹图谱方法所鉴别^[2]。据估算,每克土壤含有约 100 亿个微生物个体,包括 100 万种不同的微生物种群。利用上述技术,从这些难以计数的土壤微生物中原位鉴别特定生态过程的微生物驱动者是难以想象的^[4]。

近年来得到广泛关注的稳定性同位素探针技术与现代分子生物学相结合,可以在相对未受干扰的环境样品中培养功能微生物,利用稳定性同位素示踪复杂环境中的功能微生物核酸(DNA/RNA)或 PLFA^[5],在分子水平鉴定生态系统重要过程的微生物驱动者。其基本原理是在土壤中添加含有稳定性同位素标记的代谢底物,土壤中利用该标记底物的微生物细胞在其生长繁殖过程中同化合成含标记元素的生物标志物。通过对生物标志物进行提取、分离、鉴定和比对分析,鉴别土壤中驱动特定生态过程的功能微生物。该方法可以准确获得功能微生物的目的基因,避免了从浩瀚基因库里一个个筛选目的基因的烦劳工作,已成为原位鉴定功能微生物的重要手段。

1 土壤功能微生物 SIP 鉴定技术流程

SIP 技术是耦合微生物遗传多样性与代谢多样性最有力的工具之一,该技术以复杂的原位或微宇宙土壤样品为研究对象,采用稳定性同位素原位标记土壤样品中特定微生物的 DNA、RNA 或 PLFA。目前绝大多数研究采用 ^{13}C 标记底物培养土壤,利用 ^{13}C -底物的微生物细胞不断分裂、生长、繁殖,合成含 ^{13}C 标记的 DNA 或 RNA 等生物标志物。提取土壤样品中 ^{13}C -核酸和 ^{12}C -核酸总混合物,用超高速离心技术将 ^{13}C -核酸与 ^{12}C -核酸分离,利用分子生物学手段对生物标志物进行分析,以鉴别土壤功能微生物。近年来,以 ^{15}N 和 ^{18}O 为基础的 SIP 技术也被成功应用于微生物驱动的土壤生态过程研究^[6]。

1.1 土壤 SIP 技术前处理方法选择

SIP 技术前处理包括标记底物的培养和特定微生物核酸或磷脂脂肪酸提取两个步骤。培养方式主要包括添加营养液富集培养和仅添加标记底物培养等方式。添加营养液富集培养法可以为微生物生长提供相对稳定的环境,并促进微生物的生长,以获得足够的核酸或磷脂脂肪酸提取量^[7]。

土壤 DNA/RNA 的提取方法主要包括试剂盒提取法和液氮研磨法等。试剂盒法操作简单,提取纯度高,但提取量较低,费用高。液氮研磨法可以较好保证 DNA/RNA 的完整性,提取量相对较高,且操作费用

低,时间短,但需纯化后才能满足 RT-PCR 等后续分子生物学要求^[8]。土壤 PLFAs 提取方法主要为两种:一种是 PLFAs 法,即先通过氯仿-甲醇单相萃取浸提土壤微生物脂肪酸,再经硅胶柱纯化以及酯化作用得到活体细胞膜结合态 FAME,提取的脂肪酸种类仅有 EI-脂肪酸,多为细菌所特有。另一种是 TSFAMEs 法,即通过碱甲醇分解法提取总土壤 FAMEs。提取的脂肪酸种类包括酯连接和非酯连接 PLFAs,多为真菌所特有^[9]。

1.2 土壤 SIP 技术中生物标志物的选择

土壤 SIP 技术中特定微生物的生物标志物为 PLFA、DNA 和 RNA 3 种。PLFA-SIP 法是将 PLFA 从重稳定性同位素(如 ^{13}C)标记过的环境样品中提取出来,通过 PLFA 图谱分析微生物群落的结构和多样性,再通过气相色谱-燃烧-同位素比率质谱联用法测定各种 PLFA 中 ^{13}C 的丰度^[7]。PLFA-SIP 的标记底物浓度要求较低,灵敏度较高,但存在一些缺点:(1)对于未知 PLFA 分子图式的不可培养微生物,或者土壤中的某种特殊脂肪酸无法与特定种类的微生物相对应,该方法就无法鉴定功能微生物。(2)该方法在很大程度上依赖于标记脂肪酸来确定土壤微生物群落结构,标记上的变动将导致群落估算上的偏差。(3)细菌和真菌生长条件的改变或环境胁迫都能导致脂肪酸类型的改变^[9]。

同 PLFA-SIP 法相比,DNA-或 RNA-SIP 可获得更直接的功能微生物遗传信息。DNA-SIP 的优点是:标记的 ^{13}C -DNA 一定来自新产生的子代微生物细胞,是证明微生物原位生长并驱动生态过程的最直接证据。另外,DNA 完美的双链结构保证了遗传物质的稳定^[10]。DNA-SIP 的缺点是:自然环境中能被微生物利用的底物浓度通常很低,微生物大量分裂繁殖的可能性低,常需使用较高浓度的标记底物来刺激目标微生物的分裂繁殖,可能导致研究结果与原位自然环境的实际情况不相吻合^[6,11]。RNA-SIP 在一定程度上能克服上述缺点。自然环境中特定功能微生物发挥作用的同时,即使没有大量增殖生长,但具功能基因得到表达并在核糖体内合成蛋白质,获得标记的 ^{13}C -RNA 则表明微生物可能具有较强的活性。因此,RNA-SIP 能够采用更低的标记底物浓度培养环境样品,研究结果更接近原位状况^[12]。但因 mRNA 半衰期短、降解速度快,mRNA-SIP 的实际应用仍存在较大的技术难度^[13]。DNA-SIP 和 RNA-SIP 的结合将会大大提升 SIP 技术的潜力。

1.3 土壤 SIP 分离后的分析方法

^{13}C -核酸与 ^{12}C -核酸分离后,可以利用分子生物学手段对功能微生物的 DNA/RNA 进行分析,以鉴别土壤中重要生态过程的微生物驱动者。目前的主要分析方法包括分子指纹图谱法、实时定量 PCR 法和 454 高通量测序法等。

(1)分子指纹图谱法是目前进行功能微生物的 DNA/RNA 分析的广泛使用的快捷方法,但分子指纹图谱分析方法的灵敏度较低。环境样品中微生物通常数以百万计,采用古菌或细菌通用引物的 DGGE 和 T-RFLP 只能检测环境样品中数量上占优势的微生物^[14]。具有较为重要的生态和环境功能目标微生物通常在数量上不占优势。因此,目标微生物同化利用 ^{13}C -底物后发生的微小变化很难被分子指纹图谱法所鉴别。

(2)实时定量 PCR 法直接针对目标微生物的功能基因,采用高度灵敏的实时定量 PCR 测定不同密度层级中目标微生物的数量,显著提高了 SIP 技术的可靠性。然而,采用特异引物定量研究目标微生物存在一定难度。土壤中数量众多的微生物基因组 DNA 可能被 ^{13}C 标记,很难采用单一的功能基因或 16S rRNA 基因特异引物,同时研究众多目标微生物在不同密度层级中的分布规律。我们无从得知哪一种微生物可能利用稳定性同位素标记底物,无法设计特异的功能引物,只能通过选择性定量目标微生物,明确目标微生物在不同密度层级中的分布规律,同时判定 SIP 技术的可靠性^[13,15]。

(3)454 高通量测序法是通过检测各浮力密度层中微生物 16S rRNA 基因组成,分析目标标记微生物占该层总微生物的比例,从而鉴别前所未知的重要功能微生物。该技术可规避 PCR 扩增,直接对标记 ^{13}C -RNA 测序,每次分析可获得大约 100 万 16S rRNA 基因序列,显著增强了重浮力密度层中 ^{13}C -标记微生物 DNA 序列的检测灵敏度。高通量测序可全面分析微生物群体的物种、基因功能组成,最大程度地认识未培养微生物的遗传组成和生命活动,是目前最准确的方法^[16]。但该方法目前测试费用较高,后续数据处理复杂,但随着技术发展必将成为功能基因组学研究的主流技术。

1.4 构建克隆文库

超高速密度梯度离心分离并鉴别 ^{13}C -DNA/RNA 后,通常采用建立基因克隆文库,构建遗传系统发育树的方法分析 ^{13}C -RNA 和 ^{12}C -RNA 的微生物群落组

成,并比较二者的差别,鉴定被 ^{13}C 底物所标记的微生物群落。

2 SIP 技术在土壤功能微生物鉴定中的应用

目前 SIP 技术在土壤分子生态学研究领域主要应用在原位鉴定介导有机污染物生物降解和碳氮循环过程的功能微生物方面。有机污染物生物降解研究多集中于单环芳烃、PAHs 和 PCBs 的研究,碳氮循环研究多集中于植物-微生物相互作用对陆地生态系统中碳氮转化、土壤中碳氮周转速率、稻田产甲烷机理及产甲烷菌的研究。

2.1 SIP 技术在土壤有机污染物生物降解研究中的应用

在有机污染物生物降解的微生物生态学研究中,SIP 技术可以帮助了解在复杂原位土壤环境中,参与各个降解过程和途径中功能微生物种类。Hanson 等首次使用 PLFA-SIP 技术研究甲苯的生物降解,总共提取发现的 59 种 PLFAs 中有 16 种出现 ^{13}C 标记^[17]。Christopher 等在对农田土壤中苯酚降解菌的研究中,对 ^{13}C 标记苯酚的 DNA 进行 18S-28S 内转录间隔区的 PCR 扩增,T-RFLP 分析,成功分离出一种白色细状的真菌,并证实该真菌能加速苯酚的降解^[18]。Sueoka 等^[19]利用 RNA-SIP 技术对 ^{13}C 标记苯酚的 RNA 反转录 PCR 和 T-RFLP 分析,新发现了 3 种苯酚降解菌。罗春玲、Xie 等^[20-22]利用 DNA-SIP 技术研究了甲苯、苯和间二甲苯的降解菌,对分离出的 ^{13}C -DNA 进行 T-RFLP 分析、克隆文库的构建,获得了相应的降解菌,并首次报道了 TM7 门对甲苯具有降解作用。Woods 等使用 H_2^{18}O -DNA-SIP 技术鉴定甲苯退化细菌,鉴定出一株已知的甲苯降解菌 RHA1^[23]。

Padmanabhan 等在 Collamer 地区的田间试验中,向受试的粉砂壤土供应 ^{13}C 标记的葡萄糖、咖啡因、萘和苯酚,通过 GC/MS 监控土壤中释放的 $^{13}\text{CO}_2$ 浓度,以此估测底物降解速率,并将分离得到 ^{13}C -DNA 用通用引物对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,最终得到 29 个完整的 DNA 序列^[24]。Maiysha 等利用 DNA-SIP 技术,研究了土壤中具有降解萘、菲和芘等 6 种多环芳烃功能的微生物群落,将 ^{13}C 作为标记元素,构建 ^{13}C -DNA 的 16S rRNA 克隆文库和 RT-PCR 分析,结果表明不可培养菌 PG2 不仅可以降解芘,还能降解荧蒽和苯并[A]蒽,从而说明 PG2 菌对四环 PAHs 有着良好的降解效果^[6]。

Tillmann 等设计了一个 PLFA-SIP 微宇宙实验,将 PCBs 高度污染土壤暴露于 ^{13}C -2,2'-二氯联苯

中,采用 GC-C-IRMS 测定不同 PLFA¹³C 的丰度,结果表明非优势菌在 PCBs 好氧降解过程中的主导作用^[25]。Shahid 等在对五氯酚降解菌的研究中,比较了 DNA/RNA-DGGE 和 DNA/RNA-SIP-DGGE 技术的鉴定效果,结果表明 RNA-SIP 技术可以更好反映功能微生物群落的变化趋势^[11]。Sul 等将 DNA-SIP 和宏基因组技术结合,对 ¹³C-联苯-DNA 中芳烃双加氧酶基因片段 PCR 扩增,得到两串与 *bphA* 相似的序列组,构建 1568 粘粒克隆文库,发现除含 *bphAE* 基因外,还含有属于 γ -变形菌纲的未知基因片段,该片段的 G+C 含量和 *bphAE* 相近,可能由于 *bphAE* 基因水平转移而形成的^[26]。

2.2 SIP 技术在土壤 C 循环中的应用

土壤 C 转化是微生物主导的生物地球化学过程,SIP 技术能够很好地将微生物群落与其功能联系起来,加深人们对陆地生态系统重要 C 循环过程的认识。Boschker 等最先使用 PLFA-SIP 技术进行甲烷营养菌的研究^[7],随后,DNA-SIP 技术被用于研究土壤中甲烷氧化菌的活性功能种群。Hutchens 等在微宇宙中用 ¹³CH₄ 对取自罗马尼亚 Movile Cave 地下水系统的样品进行短期培养,以 DNA-SIP 技术为前提确定了 3 类含有编码甲烷单氧化酶基因的甲烷营养菌,并通过与非甲烷营养菌比对证明了交叉取食的存在^[27]。Cebren 等在研究养分添加对甲烷营养菌多样性的影响时,人工添加养分在一定程度上可避免交叉取食,改进了 DNA-SIP 方法^[28]。Bengtson 等研究了松树林土壤中的甲烷营养菌群落结构组成与 CH₄ 氧化率的联系,并简短讨论了 DNA/RNA-SIP 的局限性^[29]。Borodina 等用 DNA-SIP 法考查了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,并将卤化甲烷的全球循环同一组目前已知的卤化甲烷营养菌特征群联系了起来^[30]。

Radajewski 等最先使用 DNA-SIP 技术进行甲醇营养菌的研究,通过 ¹³CH₃OH 培养森林土壤,证明被 ¹³C 标记的细菌 16S rRNA 基因序列与已知可培养的甲醇营养菌及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^[6]。Feng 等利用 DNA-SIP 技术证明了稻田土壤中,甲酸盐中的 C 首先被光营养的初级和次级生产者利用,随后产生的有机物被其他微生物利用^[31]。

陆雅海等用 ¹³CO₂ 对水稻进行脉冲标记培养,利用 RNA-SIP 技术与 T-RFLP 分析,获得水稻根际的

产甲烷菌,并通过厌氧和好氧条件的对比,表明根际环境和降解过程的多相性^[32,33]。该团队还利用 PLFA-SIP 描述了水稻根际微生物活性的空间变化,提出在根际革兰氏阴性菌和真核微生物在同化根派生碳过程中最活跃,同时描述了围绕根际的活性群落的空间系统变化^[9]。

2.3 SIP 技术在土壤 N 循环中的应用

¹⁵N 作为生物体内大分子合成的组成元素,可结合 SIP 技术研究土壤中氮循环过程各类微生物功能群及其相互作用。Georg 等利用标记和未标记的 N 进行纯微生物培养,结果显示 ¹⁵N-DNA-SIP 技术是可行的,但存在一定局限性,如可视条带需要大量的 DNA,¹⁵N-DNA 的理想丰度要求大于 50% 等^[33]。Buckley 等通过改变基因 G+C 含量来增加 ¹⁵N-DNA 的浮密度,增加了 ¹⁵N-DNA 的分离强度,为原位追踪利用 N 的微生物群落提供了新的研究方法,并采用 ¹⁵N₂-DNA-SIP 原位鉴定了独立生存的固氮微生物,通过分析 ¹⁵N 标记 DNA 的 16S rRNA,发现了 3 组新固氮微生物^[34-35]。

贾仲君等采用 SIP 技术示踪农田土壤氨氧化微生物 DNA,发现相对于古菌,细菌是土壤硝化过程的主要驱动者^[36]。贺纪正等对农田土壤生态系统中氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)进行一系列研究,得出二者在根际土壤中的丰度、组成对环境的响应占主导作用^[37],并发现土壤中硝化作用伴随着古菌 *amoA* 的基因丰度和多样性变化,进一步证明了氨氧化古菌可同化 CO₂,属于自养型微生物^[38]。Jennifer 等结合 RNA-SIP 和 DNA-SIP 技术,再次证明 AOA 可通过两种途径固定 CO₂,并在泉古菌(*Crenarchaeota*)中得到验证,进而强调了 AOA 在硝化和 CO₂ 固定过程中的重要性^[39]。Karen 等以北美黄松林为研究对象,应用 H₂¹⁸O-SIP 技术调查土壤中氨氧化微生物的生长与死亡情况,发现人工添加氨可刺激 AOB 的生长,与此同时 AOA 的死亡数量增加,而 AOB 则不受影响^[40]。

Ishii 等在研究 N₂O 在水稻土中的消减过程时,用 ¹³C 标记的琥珀酸盐作为电子供体,鉴定了同化琥珀酸盐的微生物,指出大多数 N₂O 消减微生物属于草螺菌属和固氮螺菌属。并证明前者消减速度大于后者,在水稻土 N₂O 的减少过程中发挥重要作用^[41]。

3 研究展望

SIP 技术能有效降低环境微生物群落分析的复杂度,获得功能微生物的目的基因,已成为原位分离

功能微生物的重要手段。随着新一代454高通量测序技术的发展,SIP技术可最大程度地认识不可培养微生物的遗传组成和生命活动,获取其功能基因,优化并人工合成在原位环境中具有高效同化或降解作用的新基因。结合土壤化学等方面知识,共同探讨土壤环境中功能微生物的代谢途径和同化过程,挖掘微生物基因资源,鉴别土壤关键元素循环的微生物驱动机制等,将是未来研究发展的热点和重点。

参考文献:

- [1] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil[J]. *Science*, 2005, 309: 1387–1390.
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, 59: 143–169.
- [3] Salles J F, DeSouza F A, VanElsas J D. Molecular method to assess the diversity of Burkholderia species in environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 1595–1602.
- [4] Schmidt T M. The maturing of microbial ecology[J]. *International Microbiology*, 2006, 9: 217–223.
- [5] 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.
- [6] Maiysha D J, Douglas W C, David R S, et al. Stable-isotope probing of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial guild in a contaminated soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(10): 2623–2632.
- [7] Boschker H T S, Nold S C, Wellsbury P, et al. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C -labelling of biomarkers[J]. *Nature*, 1998, 392(6678): 801–805.
- [8] Lu Y H, Abraham W R, Conrad R. Spatial variation of active microbiota in the rice rhizosphere revealed by *in situ* stable isotope probing of phospholipid fatty acids[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 474–481.
- [9] Drenovsky R E, Elliott G N, Graham K J, et al. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(11): 1793–1800.
- [10] Friedrich M W. Stable-isotope probing of DNA: Insights into the function of uncultivated micro-organisms from isotopically labeled metagenomes[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(1): 59–66.
- [11] Shahid M, Graeme I P, James I P. Cultivation-independent *in situ* molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1349–1360.
- [12] Lu Y H, Rosencrantz D, Liesack W, et al. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(8): 1351–1360.
- [13] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 294–321.
LIN Xian-gui. Soil microbial research principle and method [M]. Beijing: Higher education press, 2010: 294–321.
- [14] Schwartz E. Characterization of growing microorganisms in soil by stable isotope probing with H_2^{18}O [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 73(8): 2541–2546.
- [15] Xia W W, Zhang C X, Zeng X W, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. *ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226–1236.
- [16] Rothberg J M, Leamon J H. The development and impact of 454 sequencing[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10): 1117–1124.
- [17] Hanson J R, Macalady J L, David H. Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5403–5408.
- [18] Christopher M D, Eugene L M. Stable isotope probing reveals trichosporon yeast to be active *in situ* in soil phenol metabolism[J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2009, 3(4): 477–485.
- [19] Sueoka K, Satoh H, Onuki M, et al. Microorganisms involved in anaerobic phenol degradation in the treatment of synthetic coke-oven wastewater detected by RNA stable-isotope probing[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 291(2): 169–174.
- [20] Luo C L, Xie S G, Sun W M, et al. Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the candidate phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(13): 4644–4647.
- [21] Xie S G, Sun W M, Luo C L, et al. Stable Isotope Probing Identifies Novel m-Xylene Degradors in Soil Microcosms from Contaminated and Uncontaminated Sites[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2010, 212(1–4): 113–122.
- [22] Xie S G, Sun W M, Luo C L, et al. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing[J]. *Biodegradation*, 2011, 22(1): 71–81.
- [23] Woods A, Watwood M, Schwartz E. Identification of a toluene-degrading bacterium from a soil sample through H_2^{18}O DNA stable isotope probing [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 5995–5999.
- [24] Padmanabhan P, Padmanabhan S, DeRito C, et al. Respiration of ^{13}C -labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ^{13}C -labeled soil DNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1614–1622.
- [25] Tillmann S, Strompl C, Timmls K N, et al. Stable isotope probing reveals the dominant role of Burkholderia species in aerobic degradation of PCBs[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(2): 207–217.
- [26] Sul W J, Park J, Quensen J F, et al. DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5501–5506.
- [27] Hutchens E, Radajewski S, Dumont M G, et al. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(2): 111–120.

- [28] Cebbron A, Bodrossy L, Stralis P N, et al. Nutrient amendments in soil DNA stable isotope probing experiments reduce the observed methanotroph diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 798–807.
- [29] Bengtson P, Basiliko N, Dumont M G, et al. Links between methanotroph community composition and CH₄ oxidation in a pine forest soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(3): 356–366.
- [30] 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 methylchloride–utilizing bacteria in soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1318–1328.
- [31] Feng Y Z, Lin X G, Zhu J G, et al. A phototrophy–driven microbial food web in a rice soil[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(2): 301–311.
- [32] Lu Y H, Lueders T, Friedrich M W, et al. Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 326–336.
- [33] Georg C, Espana M, Causey R, et al. Technical considerations for the use of ¹⁵N–DNA Stable–isotope probing for functional microbial activity in soils[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(11): 1424–1428.
- [34] Buckley D H, Huangyutitham V, Hsu S F, et al. Stable isotope probing with ¹⁵N achieved by disentangling the effects of denome G+C content and isotope enrichment on DNA density[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3189–3195.
- [35] Buckley D H, Huangyutitham V, Hsu S F, et al. Stable isotope probing with ¹⁵N₂ reveals novel noncultivated diazotrophs in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3196–3204.
- [36] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658–1671.
- [37] He J Z, Shen J P, Zhang L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia–oxidizing bacteria and ammonia–oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long–term fertilization practices[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364–2374.
- [38] Zhang L M, Offre P R, He J Z, et al. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17240–17245.
- [39] Jennifer P, Marc G D, Ralf C. Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(10): 4170–4175.
- [40] Karen A, Egbert S. Stable isotope probing with (18)O–water to investigate growth and mortality of ammonia oxidizing bacteria and archaea in soil[J]. *Methods in Enzymology*, 2011, 486: 155–169.
- [41] Ishii S, Ohno H, Tsuboi M, et al. Identification and isolation of active N₂O reducers in rice paddy soil[J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2011, 5: 1936–1945.