

石油烃厌氧生物降解代谢产物研究进展*

周蕾 MBADINGA Serge Maurice 王立影 刘金峰 杨世忠 牟伯中**

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 应用化学研究所 上海 200237)

摘要 石油烃厌氧生物降解代谢产物的分析对于石油烃厌氧降解机制的研究、功能微生物的筛选以及微生物活动的原位监测具有指示性作用. 综述了近年来石油烃厌氧生物降解代谢产物的研究进展. 石油烃厌氧降解的初始活化方式主要包括脱氢羟基化、加延胡索酸以及羧化等. 其中, 加延胡索酸是不同种类的微生物通常采用的代谢方式. 同时, 将代谢产物按照气体、无机离子和有机酸进行分类, 并针对各类物质特别是瞬时性、低浓度的有机酸类产物常采用的分析方法进行归纳. 通过实例强调了代谢产物作为潜在生物标记物的应用, 并对石油烃厌氧降解代谢产物分析方法的发展提出展望. 图3 参58

关键词 石油烃; 厌氧生物降解; 苯甲基琥珀酸; 烷基琥珀酸; 生物标记物; 初始活化
CLC X172

Recent Progress in Metabolites Formed During Anaerobic Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons*

ZHOU Lei, MBADINGA Serge Maurice, WANG Liying, LIU Jinfeng, YANG Shizhong & MU Bozhong**

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Applied Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract Detection of specific metabolites formed during anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons is of great importance to understand the mechanisms involved, to screen for functional microbes, and to monitor *in-situ* microbial activities. This paper focus on recent progress in metabolites formed during anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons. Distinct biochemical activation strategies include dehydrogenation and hydroxylation, fumarate addition and carboxylation. Among them, fumarate addition yielding succinic acid derivatives is likely the most widespread strategy in different microbial phylotypes. Metabolites formed are classified as gaseous, inorganic ions and organic acids. Their analytical methods, especially for transient and low concentrations of organic acids, are summarized. Case studies are presented to emphasize the application of specific metabolites as potential biomarkers, and the prospects for future research on the detection and characterization of signature metabolites resulting from the anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons are proposed. Fig 3, Ref 58

Keywords petroleum hydrocarbons; anaerobic biodegradation; benzylsuccinic acid; alkylsuccinic acid; biomarker; initial activation

CLC X172

石油烃在工业和生活中被广泛使用, 同时因被引入到环境而造成污染. 长期以来, 人们普遍认为石油烃的降解只有在氧气存在的条件下发生, 但最近研究发现, 在生物降解的油藏、油污染的地下蓄水层等环境, 石油烃的厌氧生物降解过程占主导地位^[1-2]. 油藏中石油烃的厌氧降解会导致烃含量减少, 石油密度、酸度、黏度、含硫度提高, 从而影响石油的品质; 但另一方面, 石油烃的厌氧降解则为油藏残余油生物气化开采提供了新思路^[3]. 同时, 油污染环境的治理过程中, 微生物修复是一种可行的方法, 检测油污染物厌氧降解的效果, 是评价微生物实际修复能力和限制的重要指标.

石油烃厌氧生物降解的研究正处于起步阶段. 虽然已有相关报道, 但降解机制仍不明确. 与好氧降解的生化机制不同, 石油烃厌氧降解是由特殊的酶催化发生的生化反应, 过程中产生了一些具有特征性的代谢产物. 以石油烃厌氧降

解代谢产物作为研究的切入点, 可以进一步推测厌氧降解机制. 将这些代谢产物作为原位监测的生物标记物, 对于了解油藏内部的厌氧降解过程、评估环境中微生物的修复速率以及区分生物或非生物因素引起的石油烃降解具有指示作用, 对于功能微生物的筛选也具有重要的实用价值. 但是, 由于微生物代谢体系复杂, 厌氧降解速率比较缓慢, 使得某些代谢产物含量低、存在时间短, 因此为代谢产物分析带来一定困难.

结合国内外研究以及作者实验室的工作基础, 本文综述了目前石油烃厌氧降解的研究进展, 并对厌氧降解过程中涉及的厌氧代谢方式、代谢产物类型及其分析方法进行系统总结. 同时, 强调了代谢产物作为潜在生物标记物的应用, 并对进一步的研究工作提出展望.

1 石油烃的厌氧生物降解

早在20世纪40年代, 石油烃厌氧生物降解已为人们所知^[4], 但直到80年代末, 这一过程才被明确证实^[46]. 此后的二十年间, 在厌氧环境中常见的电子受体(如 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 、 CO_2 等)存在下, 已有多具有厌氧降解能力的富集培养^[7-10]和纯培养^[11-14]陆续被报道, 对于代谢途径的研究也

收稿日期: 2010-08-13 接受日期: 2010-09-13

*国家“863”计划项目(No. 2009AA063503)资助 Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No. 2009AA063503)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: bzmu@ecust.edu.cn)

有进展^[11-15]。但至今为止,石油烃的厌氧降解机制仍不明确,还需要从分子生物学、酶学、化学等多学科进行深入研究。

目前,人们对于石油烃厌氧生物降解的研究主要集中于油藏和油污染环境。早在1926年,人们首次从油藏产出液中分离到厌氧细菌^[45],对于油藏内部是否存在微生物曾引起争议。随后几十年里,人们对油藏微生物的研究产生了浓厚的兴趣。通过分子生物学技术发现,油藏本源微生物可能为厌氧菌,具体包括发酵菌、铁还原菌、硝酸盐还原菌、硫酸盐还原菌和产甲烷菌^[46],油污染环境中也存在同样类型的厌氧菌^[47]。随着长链烷烃厌氧转化为甲烷的发现^[7],油藏残余油生物气已成为国际上研究的热点^[3]。对于石油烃厌氧降解产甲烷的过程,有研究发现是由共生互营菌和产甲烷菌协同作用的结果^[17,23-24],但其具体的降解机制尚不清楚。

石油烃厌氧降解微生物的研究通常基于实验室的厌氧培养,因此,培养的相关条件和操作对于所研究的微生物群落结构和功能具有很大的影响。厌氧培养中,常采用传统经典的Hungate技术^[52,54]进行厌氧操作,用无氧的高纯氮气或者二氧化碳和氮气的混合气体除去培养瓶中的氧气,即使是在普通的实验室条件,也可以保证厌氧培养的进行。如果条件允许,也可将Hungate技术与厌氧手套箱操作结合来进行分装、密封等。根据所要研究石油烃厌氧降解微生物的种类,一般需在无机盐培养基中加入不同的电子受体(如 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 、 CO_2 等),并以硫化钠或者硫化亚铁作为还原剂,用来除去培养样品中溶解的微量氧气。为了保证严格厌氧,需要使用专业厌氧培养的丁基橡胶塞^[54]。有研究发现,样品中的微生物类群均属于严格厌氧菌,从而也证明了整个培养体系一直处于严格厌氧状态^[53]。大部分的石油烃都是低水溶性的,以其作为底物进行培养,通常烃会分布于培养液上层,这样就限制了厌氧微生物对其利用,在培养瓶中适当加入吸附底物烃的Teflon滤膜^[7]、油藏岩芯^[23]、玻璃珠^[53]或者石英砂^[55]等,可以增加微生物与烃的接触面积,从而促进厌氧微生物对烃的利用。

2 石油烃的厌氧代谢方式

好氧降解的机制已经研究的比较清楚,由于烃类分

子中含有非极性的 σ 键,为了克服它本身的化学惰性,需要在加氧酶的作用下,将氧以羟基的形式引入到烃分子中,起到C—H键活化的作用^[11]。然而在厌氧条件下,微生物会利用除氧以外的其它物质作为电子受体,如 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 、 CO_2 等,进行烃的活化,因此其作用机制明显不同于好氧降解的机制。

石油的组分很复杂,是由芳香烃、烷烃、非烃和沥青质四部分构成,其中芳香烃和烷烃在石油中约占80%^[15],本文主要围绕芳香烃和烷烃(碳原子个数 ≥ 3)进行讨论。图1列出了一些芳香烃和烷烃C—H键裂解所需的能量。不同物质的C—H键离解能不同,这就需要由不同类型的酶催化,将烃按照不同的初始活化方式进行代谢。根据C—H键离解能的高低,将石油烃分成3类,并分别按照不同的方式进行活化:

1) $\leq 355 \text{ kJ mol}^{-1}$,如乙苯可以通过脱氢羟基化进行降解; 2) $355\sim 430 \text{ kJ mol}^{-1}$,包括乙苯、2-甲基萘、甲苯和一些烷烃,通常采用加延胡索酸的活化方式; 3) $>430 \text{ kJ mol}^{-1}$,萘和苯环上的C—H键离解能在烃类物质中属于较高的水平,至今为止其活化方式仍存在争议。

2.1 脱氢羟基化

关于乙苯脱氢酶,已有一些详细的研究,其具体的机制也被提出^[50]。乙苯侧链上C-2位置的C—H键离解能相对较低,在乙苯脱氢酶催化下,硝酸盐还原菌可将乙苯脱氢羟基化为1-苯基乙醇,再经一系列过程产生中间产物苯甲酰辅酶A^[12](图2)。

2.2 加延胡索酸

目前已知研究中,加延胡索酸是C—H键活化能在 $355\sim 430 \text{ kJ mol}^{-1}$ 范围中的石油烃常用的厌氧活化方式。作为甲苯厌氧降解的初始产物苯甲基琥珀酸,它的发现为石油烃厌氧C—H键活化提出了一种新类型的生化反应。在苯甲基琥珀酸合成酶(*bss*)的作用下,甲苯的烷基侧链与延胡索酸反应,产生苯甲基琥珀酸,再经 β -氧化转化为苯甲酰辅酶A^[12]。在硫酸盐还原条件下,乙苯也通过此类方式被降解,而非脱氢羟基化方式^[18]。这可能由于不同类型的厌氧菌利用烃时会放出不等的热量,使得所涉及的酶反应机制不同,因此在

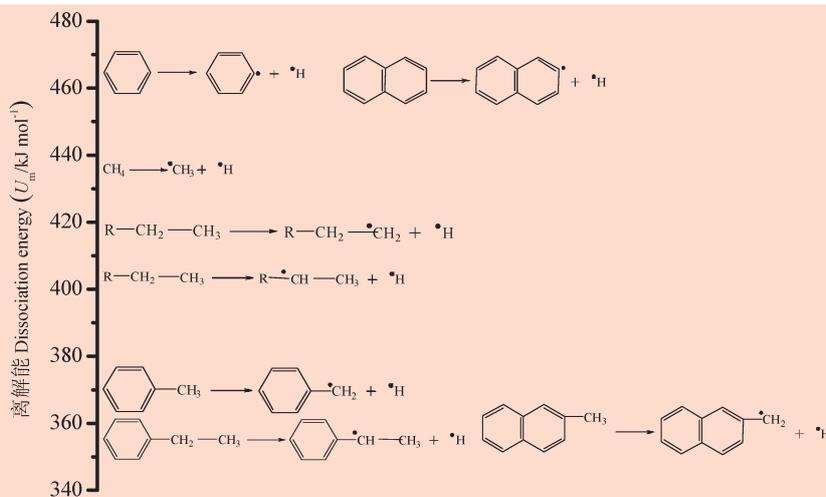


图1 一些烃的C—H键离解能^[15,48]

Fig.1 The C—H bond dissociation energy of some hydrocarbons^[15,48]

不同电子受体存在时,对同一物质会采用不同的活化方式.多环芳烃2-甲基萘也存在相似的活化过程,延胡索酸加到甲基上产生2-甲基萘基琥珀酸,转化成2-萘酸之后,发生两个苯环还原等过程^[19].代谢产物分析显示,在烷基琥珀酸合成酶(*ass*)的作用下,某些烷烃厌氧降解会发生加延胡索酸的反应,通常发生在烷烃的次末端碳上,产生1-甲基萘基琥珀酸,再经过碳骨架重排、失去羧基等过程,转化为脂肪酸类产物^[14,20](图2).

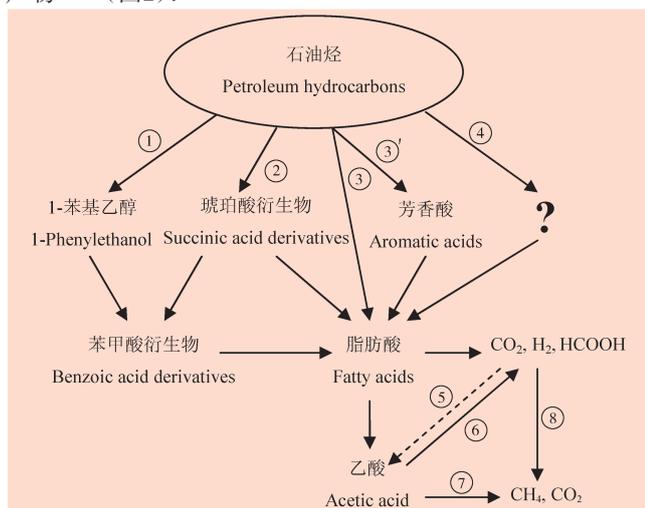


图2 烷烃和单环芳烃厌氧降解代谢途径的假设

Fig. 2 Proposed pathways of anaerobic degradation of alkanes and monoaromatic hydrocarbons

① 硝酸盐还原条件下脱氢羟化(EbN1、PbN1和EB1菌株)^[46]; ② 加延胡索酸(硫酸盐还原、硝酸盐还原、铁还原以及产甲烷条件)^[12, 14, 18~20, 56~57]; ③ 烷烃羧化(硫酸盐还原及硝酸盐还原条件)^[10, 22]; ③' 单环芳烃羧化(铁还原条件)^[58]; ④ 未知方式^[14]; ⑤ 同型产乙酸($\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{乙酸}$); ⑥ 共生互营乙酸氧化(乙酸 $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$); ⑦ 乙酸营养型产甲烷; ⑧ 氢营养型产甲烷及甲基营养型产甲烷

① Dehydrogenation and hydroxylation under nitrate-reducing condition (Strains EbN1, PbN1 and EB1)^[46]; ② Fumarate addition (sulfate-reducing, nitrate-reducing, iron-reducing and methanogenic conditions)^[12, 14, 18~20, 56~57]; ③ Carboxylation of alkanes (sulfate-reducing and nitrate-reducing conditions)^[10, 22]; ③' Carboxylation of monoaromatic hydrocarbons (iron-reducing condition)^[58]; ④ Unknown activation mechanisms^[14]; ⑤ Homoacetogenesis ($\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{acetate}$); ⑥ Syntrophic acetate oxidation (acetate $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$); ⑦ Acetoclastic methanogenesis; ⑧ Hydrogenotrophic methanogenesis and methylotrophic methanogenesis

2.3 假设和未知的方式

一株硫酸盐还原菌Hxd3降解烷烃的实验中发现,底物烷烃和细胞脂肪酸的奇偶碳数存在差异.基于同位素标记研究,我们提出烷烃可能采用另外一种方式进行活化,即在C-3位置上引入一个羧基.羧化产物再脱掉烷烃链末端的两个碳原子,生成脂肪酸类的中间产物^[22],这可能是烷烃厌氧活化的第二种方式.此类型活化方式也在硝酸盐还原条件下发生^[10].

由于苯和萘的C—H键离解能比较高,具体的初始活化方式目前仍存在争议.已提出苯的可能降解方式包括羟化、甲基化或羧化,再经过一系列的转化,生成单环芳烃共同的中间产物苯甲酰辅酶A.但是,羟化产物可能是由于在取样和分析过程中氧化造成的副反应产物,因此,对于羟化的推测需要谨慎^[21].萘是多环芳烃中唯一可以被纯培养厌

氧降解的物质,但代谢途径和基因分析还待进一步探索.在硫酸盐还原条件下,萘也可能通过与苯相似的3种方式进行氧化,转化成多环芳烃厌氧降解的主要产物2-萘酸,之后,与2-甲基萘按照同样的方式进一步代谢^[19, 49].然而,最近关于厌氧降解苯或萘的硫酸盐还原菌培养,通过对代谢产物的检测,分别排除了各自羟化和甲基化的方式^[5, 6].

有报道指出石油烃可以在厌氧条件下转化为天然气^[7, 8],即甲烷,虽然具体的代谢途径尚未明确,但有研究表明,这个过程是由共生互营菌和产甲烷菌协同作用的结果^[17, 23~24],因此其代谢机制可能涉及上述活化方式中的一种或者几种,也可能是其它未知的活化方式.

石油烃厌氧降解过程中,微生物可以将脱氢羟化、加延胡索酸、羧化等方式作为一种工具,通过这些反应的发生,进而帮助石油烃初始活化和连续降解不断进行下去.虽然有同位素代谢产物支持一些可能存在的活化方式,但是具体的化学机制和基因并不完全清楚.以上的代谢方式大多是在硫酸盐或硝酸盐作为电子受体时的纯培养或富集培养研究中,通过识别微生物的代谢产物以及同位素标记物推测出来的.同时,根据所检测到的特征产物,我们总结了关于烷烃和单环芳烃厌氧降解的代谢途径(图2).因此,石油烃厌氧生物降解代谢产物的分析,对于探索厌氧降解代谢途径、酶催化机制具有重要价值.

3 石油烃厌氧降解的代谢产物

厌氧条件下,微生物可按照不同的代谢方式将石油烃转化为各种类型的中间产物,最后完全氧化为二氧化碳或者二氧化碳和甲烷(图2).其中,一些代谢产物可以作为某些物质厌氧降解或者特定降解过程潜在的生物标记物(图3).

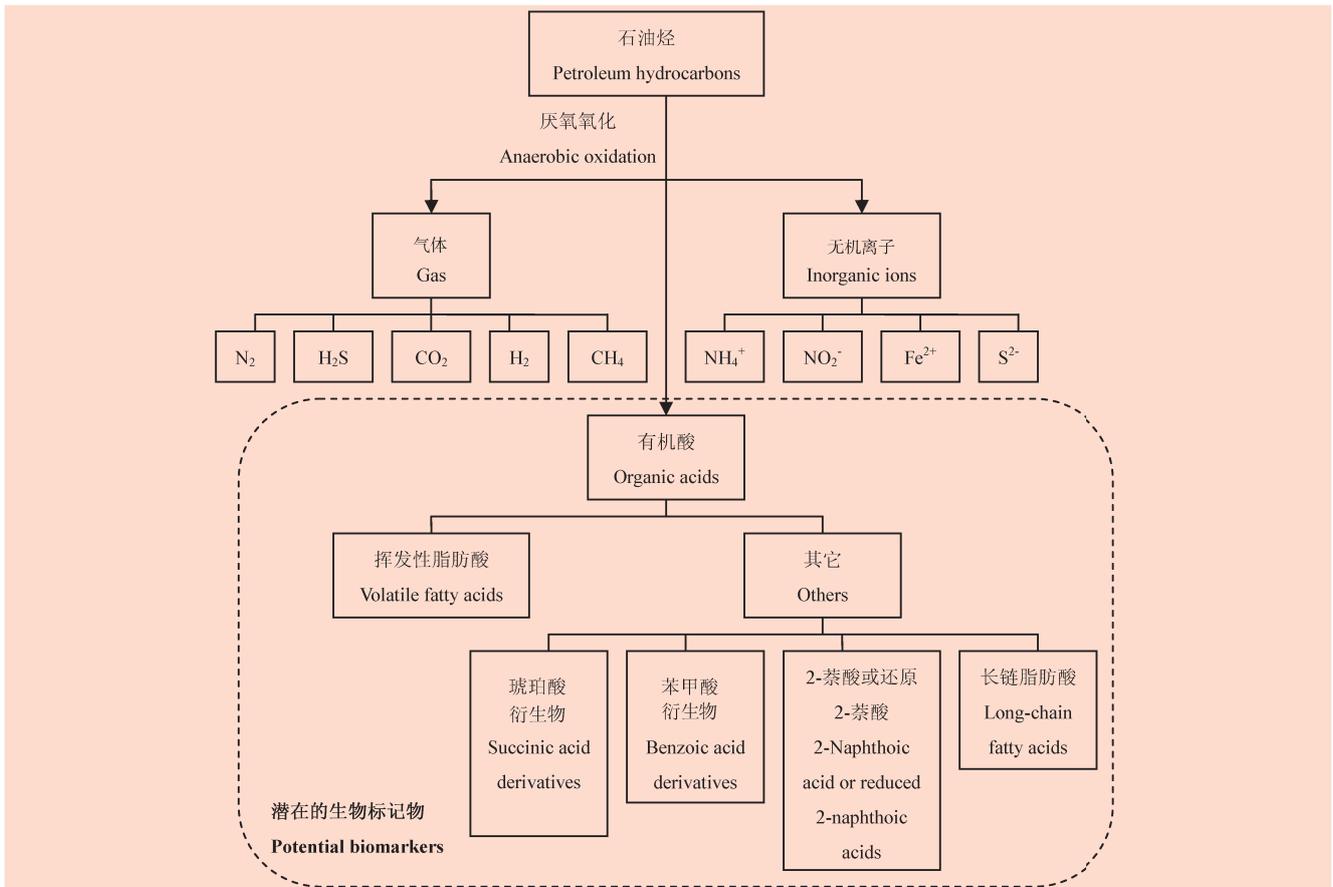
4 石油烃厌氧降解代谢产物的分析

石油烃厌氧降解的代谢产物以及相应同位素标记物的分析,对于推测石油烃厌氧降解机制、了解油藏内部的厌氧降解过程具有重要意义.石油烃厌氧降解的代谢产物分析一般采用常规的化学分析方法,然而,代谢产物的分离和检测仍存在一定的困难,这是由微生物代谢产物瞬时性、低浓度的限制引起的.石油烃是一类特殊的物质,以其作为厌氧降解的底物,降解速率要比其它物质降解更为缓慢,降解过程中产生的代谢产物瞬间被转化为下游产物,使得产物积累量比较少,浓度非常低.对于实验室研究而言,厌氧培养的样品非常宝贵,这就需要利用最少的样品,来获得最多的化学和分子生物学信息,因此必须要克服样品本身的限制,尽可能提高检测的灵敏度.以下针对石油烃厌氧降解中产生的不同类型代谢产物,分别对其分析方法进行综述.

4.1 气体

石油烃的厌氧降解过程中会产生各种气体,如氮气、二氧化碳、硫化氢、甲烷、氢气等,可利用密封性好的气体进样器采集.

氮气、二氧化碳、甲烷、氢气通常用气相色谱(GC)或者气相色谱-质谱联用(GC-MS)进行检测^[23~24, 28, 29],常配以Porapak Q柱或者PLOT毛细管柱,可以达到理想的分离检测

图3 石油烃厌氧生物降解的代谢产物^[12, 14, 19, 23, 25]Fig. 3 Metabolites formed during anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons^[12, 14, 19, 23, 25]

效果,并且具有快速、准确、操作方便等优点.定量分析常以色谱峰的峰面积或者峰高积分值来确定.还有报道指出,氢气定量时可以考虑用汞蒸气还原气体分析仪(Mercury vapor reduction gas analyzer),其灵敏度高,检测效果也比较理想^[29].

目前测定硫化氢的方法主要有碘量法、比色法、亚甲蓝法、色谱法等,其中亚甲蓝法^[6, 20]是测定硫化氢气体的经典方法,其本身具有灵敏度高,测定快速,选择性好等优点.但需要注意的是,在取样和分析的操作中可能会带入少量氧气,使得不稳定的 S^{2-} 被氧化,从而影响测定的准确性.我们从实验中发现,与未除氧的样品比较,用氮气吹掉容器内存留的氧气或者在厌氧手套箱内操作后,测得的硫化氢含量可提高21%~41%,因此,除氧过程对于硫化氢测定极其重要.

4.2 无机离子

电子受体不同时,所发生的氧化还原反应具有不同的氧化还原电位,并且吸收的能量也存在差异,从而影响了石油烃的厌氧降解速率.当以 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 作为电子受体时,厌氧降解过程中会伴随产生电子受体的无机离子产物,如 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 Fe^{2+} 、 S^{2-} .虽然无机离子的检测并不能直接证明石油烃发生了厌氧降解,但是可以根据物质间的化学计量关系来估测微生物的降解能力^[43].

无机离子的检测方法通常采用离子色谱法(IC),其具有广谱、高效等优点.IC分析 NO_2^- 时,可以得到方法检出限为

0.02 mmol L⁻¹^[42],利用高效液相色谱(HPLC)测定时,也可以达到理想的检测效果^[30]. S^{2-} 的分析方法同上述硫化氢的分析.除了IC法之外,阳离子也常用分光光度法进行分析, NH_4^+ 常采用靛酚蓝比色法来检测^[30], Fe^{2+} 的分析可以应用菲洛嗪分光光度法^[31, 32],这些方法都是通过测定显色物质的吸光度来确定离子浓度,是比较常用的检测手段.

4.3 有机酸

4.3.1 挥发性脂肪酸 挥发性脂肪酸通常是指从C1~C5极易挥发的短链脂肪酸,它是石油烃厌氧降解过程中的重要中间产物,特别在产甲烷过程中,乙酸是产甲烷的前体之一,其检测尤为重要.

分析挥发性脂肪酸多采用GC法^[23, 27~29, 33]、HPLC法^[34]、IC法^[29]、等速电泳法^[35]等,其中GC法和HPLC法应用最多,这是由于它具有快速、准确、简便的优点,并且适用于含有多组分的样品.挥发性脂肪酸的定性分析是通过与标准品的保留时间比较得到,定量方法较为常用的是总酸的酸碱滴定法以及对色谱峰峰面积或者峰高积分^[35].

根据样品的前处理方法,挥发性脂肪酸的分析可以分为酸化法和衍生化法.酸化法是将样品调至酸性,直接进样于GC分析^[27].该方法简单直接,减少了由其它操作引起的损失,但检出限较高,不适于低浓度样品的测定.衍生化法是将挥发性脂肪酸进行酯化或2-硝基苯吖化等方式处理,再通过GC或HPLC分析.尽管衍生化反应使得操作过程较繁琐,

并且检测效果易受到衍生化程度的影响, 但该法的灵敏度很高, 检测浓度可以低于 200 nmol L^{-1} [34]。

4.3.2 其它有机酸 石油烃的厌氧降解过程中, 同时也代谢一些挥发性脂肪酸以外的有机酸(图3)。这些有机酸是由不同种类的烃, 按照不同的初始活化方式, 经过一系列代谢过程(如 β -氧化等)产生的中间产物。对于单环芳烃而言, 无论采取哪种方式代谢, 都会产生共同的特征产物苯甲酸或其衍生物; 萘和2-甲基萘都会转化成2-萘酸及其还原产物; 烷烃的厌氧降解过程中, 也常会产生脂肪酸类物质。

为了支持实验室及现场研究, 这些有机酸的预处理和检测方法也在不断发展。早期, 常采用液-液萃取、衍生化处理(如甲酯化、三甲基硅烷化)、GC-MS分析的方法 [2, 9, 36-37] 来检测样品, 通过对质谱图的解析比较, 进而确定物质结构。有报道指出, 相比于甲酯化, 三甲基硅烷化对于环境样品分析是比较理想的衍生化方法, 此方式更有利于色谱峰的分选, 并提供了更多的有益于分析的特征碎片离子 [2]。但是, 以上预处理方法易增加实验误差。有研究提出, 用固相萃取(SPE)代替液-液萃取样品, 产物衍生化后进行GC-MS分析的方法 [1, 38-39]。Reusser和Field [39]利用此方法分析地下水样品, 得到方法的检出限为 $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 。但该方法仍需要进行衍生化处理, 操作比较繁琐。Beller [40]发展了一种有希望快速、可靠地分析单环芳烃代谢产物的方法, 过程中不需要萃取、浓缩, 只需直接进样于液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析即可, 方法的检出限可以达到 $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ 。在前人经验的基础上, Alumbaugh等 [41]提出SPE直接进样于LC-MS/MS分析的方法, 检出限范围可以降低至 $0.006\sim 0.029 \mu\text{g L}^{-1}$, 该法对于检测实际样品中低浓度的有机酸代谢产物及其下游产物具有更大帮助。

4.4 同位素标记物

与自然界存在的相应普通元素相比, 同位素具有相似的化学性质和生物学性质。为了深入研究石油烃厌氧降解的代谢机制, 常采用同位素示踪技术, 即加入同位素标记的初始物质, 通过追踪过程中的标记物质, 进而推测其代谢机制。放射性同位素和稳定性同位素都可作为示踪剂, 降解机制的研究中常用到碳同位素(^{13}C 、 ^{14}C)和氢同位素(氘、氚)。

对于石油烃厌氧降解中同位素标记的代谢产物, 多采用GC-MS、气相色谱-同位素比值质谱(GC-IRMS)等手段来分析, 样品的前处理方式基本同相应普通元素的化合物一致。由于同位素之间存在1或2个单位的质量差, GC-MS [9, 42]检测同位素化合物时, 主要是将普通元素化合物分子或离子的 m/z 值, 加上质量单位的差值, 来推测物质结构, 进而推测厌氧降解的代谢途径。在石油烃的厌氧降解过程中, 微生物首先利用质量轻的同位素化合物, 使得残余的石油烃富集了质量较重的同位素化合物, GC-IRMS [20, 24, 43]可以灵敏地检测到同位素比值的变化, 对于石油烃原位生物降解过程具有可靠的指示作用。

5 生物标记物的应用

生物标记物宏观上是指从分子水平上指示和评价正在进行的反应过程的生物学和化学指示剂, 其本身具有客观测定、标示和评价过程的作用, 生物标记物广泛地应用于药理学、医学、地质学等领域。生物标记物本身应是微生物代谢

后释放到胞外媒介的, 可以被微生物再利用; 对于初始物质而言是特有的; 具有稳定的生化性质; 无其它的商业或工业来源; 并且是水溶性的 [43]。基于这些特点, 使得生物标记物更便于进行检测和定量分析, 在原位监测中具有不可替代的价值。

实验室研究中, 已经检测到一些石油烃厌氧降解过程中特有的代谢产物。尽管它们大部分存在的时间短、浓度低, 但是由于它们对于厌氧降解过程具有针对性, 因此可以作为潜在的生物标记物(图3)来指示某些物质厌氧降解或者特定降解过程的发生。具体而言, 2-萘酸及其还原产物可以用来识别萘和2-甲基萘的原位厌氧降解 [1]; 其它带有分支的脂肪酸则是烷烃厌氧降解过程中常见的中间产物 [44]; 甲苯、乙苯、二甲苯和烷烃的厌氧降解中, 苯甲基琥珀酸、苯乙基琥珀酸、甲基-苯甲基琥珀酸以及烷基取代的琥珀酸分别是它们特有的初级代谢产物 [14, 37, 43]; 苯甲酸和烷基取代的苯甲酸它们是单环芳烃厌氧降解中重要的下游中间产物, 可以用来指示单环芳烃的原位降解, 但是与琥珀酸类产物相比, 它们对于起始物质并无特异性, 而且有商业来源, 不能起到很理想的生物标记物作用 [44]。

目前, 油藏和油污染环境深处厌氧降解的代谢途径仍存在争议, 可以利用这些特别的、并具有代表性的中间产物作为潜在的生物标记物, 用来追踪自然界中石油烃的厌氧降解过程。由于全球范围之内大部分的油藏都处于生物降解状态, Aitken等 [1]对77个来自全球海洋湖泊的已生物降解油样进行实验室分析, 分离并检测到2-萘酸、还原的2-萘酸等物质, 这些物质恰恰是多环芳烃厌氧降解的中间代谢产物; Duncan等 [51]在厌氧油田产出液中检测到了低分子量的烷基琥珀酸, 说明了低分子量的烷烃也发生了厌氧代谢, 从而证实了油藏中确实存在着石油烃的厌氧降解。另有研究表明在油污染环境中, 存在着烷烃、环烷烃、芳香烃厌氧降解的代谢产物, 如烷基琥珀酸、2-萘酸及其还原产物等 [2]。针对石油烃的生物修复, Gieg等 [26]在地下蓄水层中加入氘代烃来评估生物修复速率, 几小时甚至几天之内就可以检测到氘代的琥珀酸类型产物及其下游产物。这些物质的检测意味着石油烃在原位发生了降解, 同时也证明了它们作为内在的生物标记物用以指示厌氧降解过程的价值。

6 展望

石油烃的厌氧降解已经成为世界性关注的课题。分析降解过程中产生的代谢产物, 可以用于推测厌氧降解的代谢途径, 进而探测厌氧降解的机制。同时, 代谢产物的定量检测也有利于获得厌氧降解过程热力学和动力学的数据, 进而推测反应进行的速率和效率。由此, 可为微生物的功能调控(采油、残余油气化、生物修复等)提供理论依据, 使得石油烃厌氧降解朝着有利的方向进行。利用一些特征代谢产物作为厌氧降解过程中的生物标记物, 更便于跟踪监测自然界中石油烃的降解过程、以及微生物的代谢活动。石油烃厌氧降解机制的研究中, 还可以采用同位素示踪技术, 对于可能存在的代谢产物进行标记, 分步来推测整个过程的代谢途径。

石油烃厌氧降解的代谢产物分析方法不断地发展, 但目前仍存在一些限制, 我们认为进一步的研究重点需要集中

在以下两方面: 1) 在现有技术的基础上, 发展新的更适用于实际样品分析的预处理方法 (如原位衍生与萃取联用技术等) 和检测方法, 研发新型的衍生试剂和萃取技术, 以克服代谢产物浓度低、易挥发等缺陷; 2) 建立适用于环境样品分析的在线分析方法, 以解决一些瞬时性的代谢产物无法检测的困难。同时, 加强石油烃厌氧降解机制和代谢途径的研究, 可以清楚地解释实际环境中所检测到的代谢产物, 并对实际发生的厌氧降解过程进行推测。随着代谢产物分析方法的深入发展和应用, 并与其它分析手段 (如分子生物学方法等) 相结合, 不仅为石油烃厌氧降解的研究提供技术支持, 也会使人们对油藏内部降解以及微生物修复的了解更加透彻, 从而创造更大价值。

References

- Aitken CM, Jones DM, Larter SR. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature*, 2004, **431** (7006): 291~294
- Gieg LM, Suflita JM. Detection of anaerobic metabolites of saturated and aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated aquifers. *Environ Sci Technol*, 2002, **36** (17): 3755~3762
- Wang LY (王立影), Mbadinga SM, Li H (李辉), Liu JF (刘金峰), Yang SZ (杨世忠), Mu BZ (牟伯中). Anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons and enlightenment of the prospects for gasification of residual oil. *Microbiol China* (微生物学通报), 2010, **37** (1): 96~102
- Aeckersberg F, Rainey FA, Widdel F. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch Microbiol*, 1998, **170** (5): 361~369
- Musat F, Widdel F. Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. *Environ Microbiol*, 2008, **10** (1): 10~19
- Musat F, Galushko A, Jacob J, Widdel F, Kube M, Reinhardt R, Wilkes H, Schink B, Rabus R. Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environ Microbiol*, 2009, **11** (1): 209~219
- Zengler K, Richnow HH, Rosselló-Mora R, Michaelis W, Widdel F. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 1999, **401** (6750): 266~269
- Anderson RT, Lovley DR. Biogeochemistry: Hexadecane decay by methanogenesis. *Nature*, 2000, **404** (13): 722~723
- Callaghan AV, Gieg LM, Kropp KG, Suflita JM, Young LY. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72** (6): 4274~4282
- Callaghan AV, Tierney M, Phelps CD, Young LY. Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75** (5): 1339~1344
- Heider J, Spormann AM, Beller HR, Widdel F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **22** (5): 459~473
- Spormann AM, Widdel F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 2000, **11** (2/3): 85~105
- Widdel F, Boetius A, Rabus R. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E eds. *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. New York, USA: Springer, 2006. 1028~1049
- Grossi V, Cravo-Laureau C, Guyoneaud R, Ranchou-Peyruse A, Hirschler-Réa A. Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Org Geochem*, 2008, **39** (8): 1197~1203
- Widdel F, Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, **12** (3): 259~276
- Röling WFM, Head IM, Larter SR. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Res Microbiol*, 2003, **154** (5): 321~328
- Ficker M, Krastel K, Orlicky S, Edwards E. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (12): 5576~5585
- Kniemeyer O, Fischer T, Wilkes H, Glöckner FO, Widdel F. Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69** (2): 760~768
- Young LY, Phelps CD. Metabolic biomarkers for monitoring in situ anaerobic hydrocarbon degradation. *Environ Health Perspect*, 2005, **113** (1): 62~67
- Kniemeyer O, Musat F, Sievert SM, Knittel K, Wilkes H, Blumenberg M, Michaelis W, Classen A, Bolm C, Joye SB, Widdel F. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 2007, **449** (7164): 898~901
- Kunapuli U, Griebler C, Beller HR, Meckenstock RU. Identification of intermediates formed during anaerobic benzene degradation by an iron-reducing enrichment culture. *Environ Microbiol*, 2008, **10** (7): 1703~1712
- So CM, Phelps CD, Young LY. Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, Strain Hxd3. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69** (7): 3892~3900
- Gieg LM, Duncan KE, Suflita JM. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74** (10): 3022~3029
- Jones DM, Head IM, Gray ND, Adams JJ, Rowan AK, Aitken CM, Bennett B, Huang H, Brown A, Bowler BFJ, Oldenburg T, Erdmann M, Larter SR. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 2008, **451** (7175): 176~180
- Boll M, Fuchs G, Heider J. Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, **6** (5): 604~611
- Gieg LM, Alumbaugh RE, Field J, Jones J, Istok JD, Suflita JM. Assessing in situ rates of anaerobic hydrocarbon bioremediation. *Microb Biotechnol*, 2009, **2** (2): 222~233
- Colberg PJ, Young LY. Aromatic and volatile acid intermediates

- observed during anaerobic metabolism of lignin-derived oligomers. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49** (2): 350~358
- 28 Zinder SH, Koch M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch Microbiol*, 1984, **138** (3): 263~272
- 29 Jackson BE, McInerney MJ. Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. *Nature*, 2002, **415** (6870): 454~456
- 30 Rabus R, Widdel F. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol*, 1995, **163** (2): 96~103
- 31 Lovley DR, Phillips EJP. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51** (4): 683~689
- 32 Eriksson S, Hallbeck L. Indicators of petroleum hydrocarbon biodegradation in anaerobic granitic groundwater. *Geomicrobiol J*, 2006, **23** (1): 45~58
- 33 So CM, Young LY. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (7): 2969~2976
- 34 Albert DB, Martens CS. Determination of low-molecular-weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC. *Mar Chem*, 1997, **56** (1/2): 27~37
- 35 Bao MT (包木太), Mu BZ (牟伯中), Wang XL (王修林). Analysis of metabolites of microorganisms used for oil recovery. *Oilfield Chem* (油田化学), 2002, **19** (2): 188~192
- 36 Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ, Widdel F. Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. *J Bacteriol*, 2001, **183** (5): 1707~1715
- 37 Beller HR, Ding WH, Reinhard M. Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of in situ bioremediation. *Environ Sci Technol*, 1995, **29** (11): 2864~2870
- 38 Jones DM, Watson JS, Meredith W, Chen M, Bennett B. Determination of naphthenic acids in crude oils using nonaqueous ion exchange solid-phase extraction. *Anal Chem*, 2001, **73** (3): 703~707
- 39 Reusser DE, Field JA. Determination of benzylsuccinic acid in gasoline-contaminated groundwater by solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2002, **953** (1/2): 215~225
- 40 Beller HR. Analysis of benzylsuccinates in groundwater by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its use for monitoring in situ BTEX biodegradation. *Environ Sci Technol*, 2002, **36** (12): 2724~2728
- 41 Alumbaugh RE, Gieg LM, Field JA. Determination of alkylbenzene metabolites in groundwater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004, **1042** (1/2): 89~97
- 42 Ulrich AC, Beller HR, Edwards EA. Metabolites detected during biodegradation of $^{13}\text{C}_6$ -benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. *Environ Sci Technol*, 2005, **39** (17): 6681~6691
- 43 Bombach P, Richnow HH, Kästner M, Fischer A. Current approaches for the assessment of in situ biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86** (3): 839~852
- 44 Beller HR. Metabolic indicators for detecting in situ anaerobic alkylbenzene degradation. *Biodegradation*, 2000, **11** (2/3): 125~139
- 45 Bastin ES, Greer FE, Merritt CA, Moulton G. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. *Science*, 1926, **63** (1618): 21~24
- 46 Chakraborty R, Coates JD. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64** (4): 437~446
- 47 Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, Pace NR. Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (10): 3869~3877
- 48 Bauschlicher CW JR, Langhoff SR. Bond dissociation energies for substituted polycyclic aromatic hydrocarbons and their cations. *Mol Phys*, 1999, **96** (4): 471~476
- 49 Bedessem ME, Swoboda-Colberg NG, Colberg PJS. Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **152** (2): 213~218
- 50 Szaleniec M, Hagel C, Menke M, Nowak P, Witko M, Heider J. Kinetics and mechanism of oxygen-independent hydrocarbon hydroxylation by ethylbenzene dehydrogenase. *Biochemistry*, 2007, **46** (25): 7637~7646
- 51 Duncan KE, Gieg LM, Parisi VA, Tanner RS, Tringe SG, Bristow J, Suflita JM. Biocorrosive thermophilic microbial communities in Alaskan North Slope oil facilities. *Environ Sci Technol*, 2009, **43** (20): 7977~7984
- 52 Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Mol Bio Rev*, 1979, **43** (2): 260~296
- 53 Gige LM, Davidova IA, Duncan KE, Suflita JM. Methanogenesis, sulfate reduction and crude oil biodegradation in hot Alaskan oilfields. *Environ Microbiol*, 2010, **12** (11): 3074~3086
- 54 Balch WE, Wolfe RS. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl Environ Microbiol*, 1976, **32** (6): 781~791
- 55 Bregnard TPA, Häner A, Höhener P, Zeyer J. Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (5): 2077~2081
- 56 Kane SR, Beller HR, Legler TC, Anderson RT. Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation*, 2002, **13** (2): 149~154
- 57 Washer CE, Edwards EA. Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (4): 1367~1369
- 58 Laban NA, Selesi D, Rattei T, Tischler P, Meckenstock RU. Identification of enzymes involved in anaerobic benzene degradation by a strictly anaerobic iron-reducing enrichment culture. *Environ Microbiol*, 2010, **12** (10): 2783~2796

《应用与环境生物学报》征稿简则

一、本刊简介

由中国科学院主管,中国科学院成都生物研究所主办,科学出版社出版。中国科学院成都生物研究所所长吴宁担任主编,来自中国、美国、英国、加拿大、新西兰等国家的69位知名科学家和专家组成编委会、上千位相关领域的知名科学家和专家组成审稿队伍。

是中国精品科技期刊、中国科技核心期刊、中国核心学术期刊、中国期刊方阵双效期刊及四川省一级学术期刊,为国外CA、BA、CSA、ZR、EP、PJK等和国内CSTPCD、CSCD、中文核心期刊要目总览、CAJCED、CJFD等多个重要、核心、知名数据库收录。

是有关应用生物学和环境生物学基础研究、应用基础研究和应用研究的国内外公开发行的学术科技期刊(学报级),主要发表:(1)生物学及相关学科中的资源开发利用与可持续发展、环境污染评价及整治、退化生态系统的恢复与重建,以及在农、林、牧、医、能源、轻工、化工、食品等领域的生物学原始研究论文、研究快报和简报;(2)生物学相关新技术新方法研究论文;(3)生物学相关综述或述评。

二、本刊约定

采用网络在线投稿(网址: <http://www.cibj.com>),且稿件从投稿到发表整个流程通过网络在线完成。

编辑部在收到稿件后2个工作日内完成初审,并告知作者其稿件是否受理。要求作者就受理稿件办理版权协议(保证不涉及国家机密,无学术不端行为,无知识产权争议,允许本刊编辑和发表,同意随本刊整体进入收录本刊的所有中外数据库等),并酌收审稿费。在收到稿件后2个月内完成三审,并告知作者其稿件是否录用。对发表稿件,向作者酌收发表费,并酌付一次性稿费(不低于发表费的20%),同时赠送样刊2册、抽印本20份。

高创新性论文、重大学术价值论文以及优秀的国际论文、国际合作论文在本刊通过三审并录用后,优先发表。

三、稿件要求

稿件的文字、符号、计量、图表、参考文献等及其格式,依照国家有关标准、条例、法规和规范。本刊的相关要求如下:

- 中文稿件须附英文题名、作者、单位、摘要和关键词,国内英文稿件须附中文题名、作者、单位、摘要和关键词。稿件按书写顺序由题名、作者、单位、摘要、关键词、中图法分类号(CLC)、上述内容相应的英文部分(中文稿件)或中文部分(英文稿件)、正文(含图表)、致谢、文献、图版等组成。
- 题名须准确、简明。作者是稿件内容的主要责任者,中国作者的英译名用汉语拼音(见GB/T 16159-1996)。摘要具有独立引用的价值,第三人称行文,研究论文以“目—方法—结果—结论”顺序表述,中文稿件的英文摘要适当详于中文摘要,国内英文稿件的中文摘要适当详于英文摘要。关键词4~8个,具有规范性、主题性、代表性和检索性。
- 前言简要说明研究背景、存在问题和研究目的。材料与方法具有足够信息,并具重复操作性。重要结果用“原始数据”,一般性结果用“总结数据”(如平均值、标准偏差)或“转换数据”(如百分数),正确进行统计分析。结果、讨论与结论侧重点分别在于描述说明、比较阐释和论点前景。
- 图表应具有“自明性”,中文稿件的图表文字采用中、英文对照或直接使用国际通用符号。表采用Word或Excel表格形式(不用划线或图片形式)。线条图(如函数图、直方图、示意图、流程图等)采用Word、Excel或相关软件制作的矢量图(不用扫描图或抓图形式)。照片图要非常清楚,其中文字重新植入,以线段比例尺表示实际尺寸(不用“×1000”类似形式)。图表一般在文中第一次提及段落落后插入。
- 参考文献选用原则为充分必要、密切相关、公开出版、完整准确、亲自阅读,避免盲目多引、随意转引、过度自引、故意漏引等。采用“顺序编码制”,即按文献在文中出现先后编号和排序。未公开文献不进入参考文献,必要时可以脚注方式使用。各类参考文献著录格式如下:
 - 专著:著者.书名.版次(1版不著).出版地:出版者,出版年(页码)
 - 期刊论文:论文作者.论文题名.刊名,年,卷次(期):论文起页码~止页码
 - 论文集或专著析出论文:论文作者.题名.见(In):编者[加“编”或“ed(s)”.文集名或书名.出版地:出版者,出版年.论文起页码~止页码
 - 报纸析出文献:作者.题名.报纸名,年-月-日(版次)
 - 专利文献:专利申请者.专利题名.专利国别,专利文献种类,专利号.出版日期
 - 技术标准:(起草责任者)标准代号 标准顺序号-发布年 标准名称(出版地:出版者,出版年)
 - 学位论文:作者.题名:[博士或硕士学位论文].保存地:保存者,年份
 - 会议论文:作者.题名.会议名称,会址,会议年份

要求:①参考文献作者全部列出(不用“等”或“*et al.*”省略),且作者姓前名后,姓全称名简写,不用缩写点,注意分清国外作者的姓和名;②书名英文除专有名词外,首词、实词的首字母大写,论文题名英文除专有名词外,仅首词的首字母大写;③刊名英文斜体,按缩写规则缩写;④引用国内专著和期刊文献时,无论原文是中文还是英文,均采用英文数据著录(但原文无英文数据则保留中文,不必自行翻译),同时用“()”著录出作者中文姓名、中文刊名、中文地名和出版社名以与国外专著和期刊相区别。例:

Wu N (吴宁) ed in chief. *Restoration and Reconstruction of Degraded Mountain Ecosystem on the Upper Minjiang River. Chengdu, China: Sichuan Publishing House of Science & Technology (成都:四川科学技术出版社), 2007*

Liu L (刘琳), Deng GB (邓光兵), Yi L (易玲), Li L (李林), Zhao LD (赵柳笛), Long H (龙海), Pan ZF (潘志芬), Yu MQ (余懋群). *Transmission of chromosome 6M^r from Aegilops ventricosa in Sichuan wheat varieties. Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报), 2010, 16 (1): 50~53*

- 稿件依照《GB 3100~3102-93 量与单位》使用计量单位名称和符号。如:量符号用斜体,图表中尽量用“量符号/单位符号”表示数据,英文缩略语可在行文中使用,但一般不作量符号,故用正体;组合单位各成分间、数值与单位符号(包括℃)间都要空1格等。此外,表示物质构型、构象、旋光性、取代基位置的字母用斜体。拉丁学名中属及以下的如属名、种名、变种名用斜体,属名首字母大写,但属以上(不含属)的拉丁名、定名人、“var.”、“sp.”、“ssp.”、“spp.”等用正体;拉丁学名第一次出现时用全称,以后使用可简写属名为首字母,并加点。基因名称用斜体,限制性酶前3个字母用斜体。

四、联系方式

地址:四川省成都市人民南路4段9号 中国科学院成都生物研究所《应用与环境生物学报》编辑部

邮编:610041;电话:028-85237341, 85229903;传真:028-85237341;邮箱:biojaeb@cib.ac.cn;网址:<http://www.cibj.com>