

反硝化功能基因——检测反硝化菌 种群结构的分子标记

梁丽华^{1,2*} 左剑恶¹

(1. 清华大学环境科学与工程系 北京 100084)
(2. 西北大学环境科学系 陕西 西安 710069)

摘要: 反硝化菌种类繁多, 且分属多个分类学上的不同种属, 故不能利用常规的 16S rRNA 测序方法对其进行研究。利用编码反硝化酶的功能基因作为分子标记, 可以有效研究环境样品中反硝化菌的种群结构、数量以及活性等。本文重点介绍了主要的反硝化功能基因以及常用的扩增引物, 分析了反硝化功能基因与 16S rRNA 系统发育之间的关系, 比较了 *nirS* 和 *nirK* 基因菌的群落分布特征, 对目前反硝化功能基因的研究和应用现状进行了综述, 讨论了研究中发现的新问题, 期望为研究复杂微生物的生态特征提供参考。

关键词: 反硝化菌, 功能基因, 种群结构

Denitrifying Functional Genes—the Molecular Marker for Detection of Denitrifying Community Structure

LIANG Li-Hua^{1,2*} ZUO Jian-E¹

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)
(2. Department of Environmental Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract: Denitrification is carried by a diversity of bacteria belonging taxonomically to the various genus, which precludes the use of 16S rRNA-based routine methods to study denitrifiers. However, as a molecular marker, the functional genes of encoding denitrifying enzyme can be employed to investigate the community structure, abundance and activity of denitrifying bacteria in environmental samples. In this review, we introduced the denitrifying functional genes and their amplifying primers, compared the phylogenetic relationship of the denitrifying functional genes with 16S rRNA genes and community distribution of *nirS* denitrifiers with *nirK* denitrifiers. The article also summarized the studies and applications recently of denitrifying functional genes, discussed the problems unresolved in researches, which would be expected to be a reference for studying complex microorganisms.

Keywords: Denitrifying bacteria, Functional genes, Community structure

反硝化作用是指在缺氧条件下微生物将硝酸盐或亚硝酸盐还原成 N_2 或 N_2O 的过程。研究参与这一过程的微生物对于废水生物脱氮、土壤肥分的保持和减少臭氧层破坏气体 N_2O 的排放均具有重要意义。但由于自然环境中多数微生物不可培养,同时反硝化菌种类非常繁多,导致长期以来对反硝化菌的研究不够系统和深入。近年来,分子生物学技术的发展为解决这一问题提供了契机,然而常规的基于16S rRNA测序的方法研究反硝化菌也存在着极大困难,因为研究表明,反硝化菌不能按传统的分类学方法被划分为某些特定种群,即脱氮显型不能从系统发育进行推断^[1],目前已经发现有超过50个属的细菌具有反硝化功能。因此,需要利用编码反硝化酶的功能基因来作为分子标记对反硝化菌进行研究。与相对保守的16S rRNA相比,功能基因具有更多的序列变化,利用功能基因可以区分生态功能不同但亲缘相近的微生物种群,但更重要的是利用功能基因可以鉴定生态功能相同但亲缘较远的微生物种群,如反硝化菌。本文在介绍主要反硝化功能基因的基础上,重点对利用某些反硝化功能基因作为分子标记,研究各种环境样品中反硝化菌的菌群结构、数量和功能的最新进展进行综述。

1 反硝化功能基因

通常认为,反硝化过程由以下4个步骤组成,分别由硝酸还原酶Nar、亚硝酸还原酶Nir、一氧化氮还原酶Nor和一氧化二氮还原酶Nos催化,如图1所示。

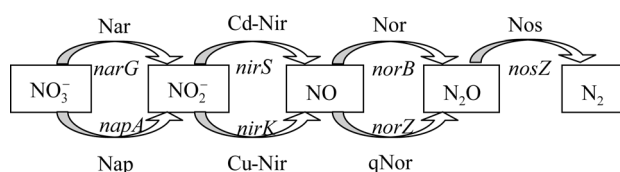


图1 反硝化功能酶和功能基因^[2]

Fig. 1 Denitrifying functional enzyme and functional genes^[2]

1.1 硝酸盐还原酶 Nar

硝酸盐还原酶有两种存在形式,一种镶嵌于细胞膜内,称为膜结合硝酸盐还原酶Nar,另一种游离于细胞膜外周质中,称为周质硝酸盐还原酶Nap。这两种酶生理学作用不同,一般Nar在厌氧条件下优先表达,且仅在厌氧状态下发挥作用;而Nap则在

有氧条件下优先表达,且在有氧或无氧条件下均能发挥作用^[1]。有些微生物2种酶都可以表达^[3]。Nar由3个亚基组成:1)催化 α 亚基,由narG基因编码,含有一个钼辅因子;2)可溶性 β 亚基,由narH基因编码,含4个[4Fe-4S]中心;3) γ 亚基,由narI基因编码,含有2个b型血红素。Nap是由2个亚单位(NapA, NapB)组成的二聚体,分别由napA和napB基因编码,NapA包含钼辅因子催化亚基和一个[4Fe-4S]中心,NapB是一种细胞色素c^[4]。也有研究发现了不含钼的硝酸盐还原酶^[5]。

1.2 亚硝酸盐还原酶 Nir

亚硝酸盐还原酶Nir有2种:Cu型亚硝酸盐还原酶和细胞色素cd1型亚硝酸盐还原酶,它们分别由nirK和nirS基因编码,一般认为这2种基因不会同时存在于一个菌株中出现,却可存在于同属但不同种的菌株中^[6],然而也有人发现了能同时含这2种基因的菌株^[7]。Cu型Nir存在于细胞周质中,是一种同源三聚体,每个单聚体有2个Cu离子。细胞色素型Nir通常是一个可溶性的二聚体,由2个相同亚基组成,每个亚基均含有一个血红素c和一个血红素d1。

1.3 一氧化氮还原酶 Nor

Paracoccus halodenitrificans、*Pseudomonas* spp.、*Alcaligenes faecalis*和*Rhodobacter sphaeroides*等菌种的一氧化氮还原酶Nor由norC和norB基因编码的2个亚基组成,norC基因编码膜结合的c型细胞色素,norB基因编码具有12个跨膜区的细胞色素b亚基^[4]。这种酶可以用c型细胞色素作为电子供体,称为cNor。在*Ralstonia eutropha*中发现norC基因编码的亚基缺失,这种NorB单亚基酶从氢醌(Quinol)得电子,被称为qNor,编码基因为qnorB(也称为norZ^[4])。但一些非反硝化菌为了在缺氧环境中生存或解除NO的毒性,也具有一氧化氮还原酶Nor^[8]。

1.4 一氧化二氮还原酶 Nos

一氧化二氮还原酶由含有8个Cu离子的2个相同亚基组成,编码一氧化二氮还原酶的nos基因由3个转录单元组成:nosZ、nosR和nosDFYL,其中nosZ基因编码催化亚基^[4]。

2 反硝化功能基因的 PCR 引物

可靠的PCR (Polymerase chain reaction)引物对于研究和考察环境样品中微生物群落至关重要^[9]。

自从Ward首先设计以*nirS*为靶基因的PCR引物以来, 了一些引物的序列、长度或位置。还有研究者反硝化功能基因引物的设计陆续展开, 表 1 列举出

表 1 某些常用扩增反硝化功能基因片段的引物序列
Table 1 Primer sequences and length/positions used to amplify fragments from functional genes in the denitrification pathway

功能基因 Functional gene	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增序列长度/位置 Length/position of amplified sequence	参考文献 References
<i>narG</i>	narGf narGr	GA[C/T]ATGCA[C/T]CC[A/C/G/T]TT A[C/T]CCA[A/G]TC[A/G]TT[A/G]TC	1008 bp	[10]
	1960m2f 2650m2r	TA(CT) GT(GC) GGG CAGGA(AG) AAA CTG CGTAGA AGA AGC TGG TGC TGT T	110 bp	[11]
	narG1960f narG2650r	TAYGTSGGSCARGARAA TTYTCRTACCABGTBGC	650 bp	[12]
	narG T37b f narG T39b r	CAY GGN GTN AAY TGY ACN GG TAR TGN GGC CCA NCC NCC NCC	1690 bp	[13]
	narG W9b f narG T38b r	MGN GGN TGY CCN MGN GGN GC ACR TCN GTY TGY TCN CCC CA	500 bp	[14]
<i>napA</i>	napA V16c f napA V17c r	GCN CCN TGY MGN TTY TGY GG RTG YTG RTT RAA NCC CAT NGT CCA	1040 bp	[15]
	napA V66c f napA V67c r	TAY TTY YTN HSN AAR ATH ATG TAY GG DAT NGG RTG CAT YTC NGC CAT RTT	385 bp	[14]
	Fnapd Rnapd	TTYTNNHNSAARATHATGTAYGG TGYTGRTTTAAANCCCATNGTCCA	890 bp	[3]
<i>nirS</i>	Heme 832F Heme 1606R	TA(C/T) CAC CC(C/G) GA(A/G) CCG CGC GT AGKCGT TGA ACT TKC CGG TCG G	774 bp	[15]
	nirS1F nirS6R	CCT A(C/T)T GGC CGC C(A/G)C A(A/G)T CGT TGA ACT T(A/G)C CGG T	890 bp	[6]
	cd3aF R3cd	GT(C/G) AAC GT(C/G) AAG GA(A/G) AC(C/G) GG GA(C/G) TTC GG(A/G) TG(C/G) GTC TTG A	425 bp	[9]
<i>nirK</i>	Cunir3 Cunir4	CGT CTA (C/T)CA (C/T)TG CGC (A/C/G)CC GCC TCG ATC AG(A/G) TT(A/G) TGG	540 bp	[16]
	F1aCu R3Cu	ATC ATG GT(C/G) CTG CCG CG GCC TCG ATC AG(A/G) TTG TGG TT	473 bp	[9]
	Copper583F Copper909R	TCATGGTGCTGCCGCGYGANGG GAA CTT GCC GGT KGCCCA GAC	326 bp	[15]
	nirK1F nirK3R nirK5R	GG(A/C) ATG GT(G/T) CC(C/G) TGG CA GAA CTT GCC GGT (A/C/G)G(C/T) CCA GAC GCC TCG ATC AG(A/G) TT(A/G) TGG	526~542 898~918 1023~1040	[6]
	qnorB2F qnorB5R qnorB7R	GGN CAY CAR GGN TAY GA ACC CAN AGR TGN ACN ACC CAC CA GGN GGR TTD ATC ADG AAN CC	1204~1220 1466~1444 1841~1822	[8]
<i>cnor</i>	cnorB1F cnorB2F cnorB6R cnorB7R	GAR TTY CTN GAR CAR CC GAC AAG NNN TAC TGG TGG T GAA NCC CCA NAC NCC NGC TGN CCR TGN GCN GCN GT	364~380 553~571 942~925 1007~991	[8]
<i>nosZ</i>	nosZ-F nosZ1622R	CG(C/T) TGT TC(A/C) TCG ACA GCC AG CGC (G/A)A(C/G) GGC AA(G/C) AAG GT(G/C) CG	453 bp	[9]
	nosZ661b nosZ1773b	CGG (C/T)TG GGG (C/G)(A/C)(A/T) (T/G)AC CAA AA(C/T) GA(A/G/C/T) CA(G/A) (T/C)TG ATC CG(T/C) AT	1112 bp	[9]
	nosLb nosRb	CCC GCT GCA CAC C(A/G)C CTT CGA CGT CGC C(C/G)G AGA TGT CGA TCA	300 bp	[9]
	nosZ-F-1181 nosZ-R-1880	CGCTGTTCITCGACAGYCAG ATGTGCAKIGCRTGGCAGAA	700 bp	[17]
	nosZf nosZr	AACGACAAG[G/A/T][C/T]CAA A[G/T][G/C]GC[A/G]TGGCAGAA	1433 bp	[10]

为了某些特殊目的专门设计了一些特别引物,如 Delorme 等人^[10]设计了专门扩增 *Pseudomonas narG* 基因的引物; Lo'pez-Gutie'rrez 等人^[11]针对 Cheneby 等人发现的未知 *narG* 菌簇,设计了两对引物以扩增这些 *narG* 片段; Throbäck 等人^[9]特别为 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 筛选设计了小于 500 bp 的 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 引物。应用这些引物,可方便地检测出环境样品中含某种功能基因的反硝化菌,从而对这些反硝化菌的多样性及组成进行研究。

3 反硝化功能基因与 16S rRNA 基因的关系

16S rRNA 被广泛用于建立原核生物的系统发育关系,但反硝化菌分布广泛,通常分散在 16S rRNA 系统发育树的不同簇,因此最近一些研究致力于发现反硝化功能基因与 16S rRNA 之间的对应关系,希望能利用某个功能基因直接推断反硝化菌的系统发育。

Gregory 等人^[3]对 *narG* 基因 PCR 扩增并建立了 *narG* 基因发育树,发现含有 *narG* 基因的细菌分散在不同亚簇,与 16S rRNA 分类的结果并不一致,因此认为不能直接用 *narG* 基因对硝酸盐代谢菌进行分类。但 Petri 等人^[18]对比研究一些细菌的 *narH* 和 16S rRNA 系统发育树,发现二者对于大部分细菌均高度相似。Heylen 等人^[19]发现很多可培养反硝化菌的 *nirS* 基因与 16S rRNA 系统发育关系除个别菌株之外在科、属水平上较为一致,而 *nirK* 与 16S rRNA 的系统发育关系则差别较大,同时还发现同一环境中的 *nirK* 基因常常同源性较高,即不同种属的反硝化菌可能有 100% 的 *nirK* 序列相似性,这很可能是反硝化基因种间水平传递的结果,因此他认为 *nir* 功能基因的多样性不能代表亚硝酸盐还原菌的多样性。Heylen 等人^[8]在分析了 *norB* 基因的系统发育后发现 *cnorB* 和 *qnorB* 可以将含 Nor 的细菌分成两个明显的簇,但两者都与 16S rRNA 系统发育不一致。Dandica 等人^[20]从马铃薯耕地上分离了 31 株反硝化菌,发现 *nosZ* 基因在所有菌株中都存在,90% 的菌株含 *cnorB* 基因,剩下的含 *qnorB* 基因,比较 *Pseudomonas* 属细菌的 *nosZ*、*cnorB* 和 16S rDNA 基因的系统发育树,发现大部分是相似的,但是一些 *Pseudomonas* 属的隔离菌株分组因分析基因而异。

Delorme 等人^[10]用 PCR-RFLP 分析了不同 *Fluorescent pseudomonads* 菌株的 *narG*、*nosZ* 和 16S rRNA 基因的多样性,发现这些菌株的 *narG* 和 *nosZ* 的相似性比较低(0.04~0.8),而 16S rRNA 的相似性较高(0.77~0.99),表明功能基因和 16S rRNA 的进化速度不同。

基于上述研究可以推断,由于功能基因存在种间转移,并且与 16S rRNA 进化速度不同,大部分反硝化功能基因与 16S rRNA 的系统发育关系存在较大差异,这也进一步解释了无法从系统发育关系上推断反硝化微生物的原因。

4 *nirK* 基因菌和 *nirS* 基因菌的关系

研究反硝化菌种群结构最常用的功能基因是 *nirK* 和 *nirS* 基因,因为由亚硝酸盐到一氧化氮这一气体产生过程是反硝化途径中的关键步骤。许多研究希望能够找到 *nirK* 和 *nirS* 基因所代表的菌群之间的关系,从而对反硝化菌有更深入了解。通常认为 *nirS* 菌分布较多,而 *nirK* 菌仅占反硝化菌的 30%,但出现在到更广泛的生理类群中。Hallin 等人^[21]的研究表明投加甲醇后中试反硝化装置中 *nirK* 基因的多样性降低, *nirS* 基因的多样性增加, *nirS* 基因类型总比 *nirK* 基因类型丰富。投加外加碳源对菌群结构的影响主要体现在 *nirS* 反硝化菌上, *nirK* 反硝化菌更稳定一些。Yan 等人^[15]推测硝酸盐浓度可能改变 *nirK* 和 *nirS* 反硝化菌在地下水中的比例, *nirK* 基因的多样性与 *nirS* 基因的多样性相互影响。Cole 等人^[22]对膜曝气生物膜反应器的研究表明含 *nirK* 和 *nirS* 基因的菌群适合不同的小生境,稍高的氧浓度和较低的有机物浓度适合含 *nirK* 基因的菌群生长。通过对这 2 类反硝化菌的比较,我们对反硝化菌的分布特征和生理习性都有一定程度的了解,但是反硝化由 4 个步骤组成,至少由 Nar、NaP、Cu-Nir、cd1-Nir、cNor、qNor、Nos 这 7 种酶催化,要了解:1) 另外几对功能相同的不同酶之间的关系;2) 哪些细菌使用何种组合的酶系催化整个反硝化反应;3) 哪些细菌只能催化其中某几步反应,而不能催化其他反应等问题都需要进一步探讨。

5 反硝化功能基因的应用

通过对反硝化功能基因的 PCR 产物进行指纹图谱分析或克隆测序等,可研究环境样品中反硝化微生物的群落结构,并发现可能的新菌种,如 Tsuneda

等人^[23]克隆一个SBR反应器中的*nirS*片段并进行T-RFLP分析,发现其中的反硝化聚磷菌与*Rhodocyclus*相关。利用定量PCR(如MPN-PCR、竞争PCR和实时PCR技术还可对含某种功能基因的反硝化菌进行定量研究。Dandie等人^[24]针对*Pseudomonas mandelii*及相关菌属的*cnorB_p*基因、*Bradyrhizobium*及相关菌属的*cnorB_p*基因设计了引物,采用实时PCR对土壤中这2类反硝化菌的功能基因进行定量。Michotey等人^[25]设计定量*nirS*基因的引物,采用MPN-PCR和竞争PCR方法对海水和沉积物中的*nirS*反硝化菌进行定量,发现比传统MPN计数法多10到1000倍。有研究通过检测某种反硝化功能基因的mRNA,进而发现表达某种催化活性的反硝化菌,如Nogales等人^[26]利用RT(reverse transcription)-PCR分析了河口沉积物中反硝化菌功能基因(*narG*、*napA*、*nirS*、*nirK*和*nosZ*)的表达,仅检测到*nirS*和*nosZ*基因的mRNA,表明在取样时*nirS*和*nosZ*基因具有较好活性。识别活性反硝化菌更有效的方法是直接标记反硝化酶, Metz等人^[27]利用寡核苷酸探针EUB338,再利用异化Cu型亚硝酸盐还原酶(DnirK)的特异性单克隆抗体,可以从环境样品中识别表达DnirK的反硝化菌,结合共聚焦扫描电镜和流式细胞仪,可将表达DnirK的反硝化菌从其他未被标记的细胞中分选出来。总之,反硝化功能基因作为最直接的分子标记已经广泛应用到反硝化菌群落结构分析、定量和活性检测中。

6 问题与展望

随着对反硝化功能基因研究的深入,越来越多的研究揭示出更为复杂、多变的反硝化功能基因特征,了解这些特性对于深入了解反硝化微生物,进而优化污(废)水生物脱氮工艺、防止土壤流失以及降低N₂O的排放均具有重要意义。通过大量研究,人们已经发现并确定反硝化功能基因存在某些共性,但不少新研究也发现反硝化功能基因还存在一些例外情况。

6.1 引物和探针

Heylen等人^[19]发现227个菌株中有一半不能由以前设计的任何*nir*引物得到扩增,这是因为以前报道的引物设计可能只是基于当时可得到的序列并偏向保守,对于环境中的功能基因不能完全扩增,因此反硝化功能基因的PCR引物需要重新评价,补充

进大量不同分类位置的序列,目前当务之急是针对这些不能得到扩增的序列设计出新引物。反硝化菌功能基因的探针设计也是如此。

6.2 反硝化功能基因在细胞中的位置

Powell等人^[28]对南极土壤中的*nosZ*细菌进行了分析,发现有一些*Pseudomonas*菌的*nosZ*基因在质粒DNA中为阳性,而在16S rRNA中为阴性,也就是说*nosZ*基因可能独立于染色体仅存在于质粒上,在*Rhizobium meliloti*、*Rhodobacter sphaeroides*都发现过位于质粒上的*nosZ*基因,*nir*基因也曾出现在质粒上,对于*Ralstonia eutropha*,整个反硝化基因簇都在大质粒pHG1上。上述发现都为反硝化功能基因的种间水平转移提供了证据,是否可以利用这一特性建立反硝化基因工程菌非常值得研究。

6.3 功能基因归属的单一性

Etchebehere等人^[29]在一株*Thauera*中发现同时存在两种*nirS*序列,一个是*Thauera mecherni-chensis*的*nirS*序列,另一个序列与*Pseudomonas stutzeri*、*Azoarcus species*、*Alcaligenes faecalis*以及另一种*Thauera*的*nirS*基因相似。Heylen等人^[8]也发现一株*Pseudomonas* sp. (R-25208)同时具有*cnorB*基因和*qnorB*基因,这些可能是反硝化功能基因在种间水平传递的结果,而Cramm报道过在*Cupriavidus necator* H16中发现2个同源性*qnorB*基因,一个在染色体上,一个在质粒pHG1,则很可能是基因复制的结果。但以往研究均是基于一种菌株中只有一种反硝化功能基因的假设,在一个菌株发现了两种或以上反硝化功能基因序列,表明以往研究高估了反硝化菌的多样性,因此,如何根据反硝化功能基因准确反映其多样性还需要更深入的研究。

6.4 反硝化功能基因的表达

Etchebehere等人^[29]对上述*Thauera*菌株的两种*nirS*基因的mRNA进一步研究,发现2个基因可以同时表达,对2种基因的mRNA实时定量PCR后有了意外发现,前一基因的表达与硝酸盐有关,而后一基因无论好氧、厌氧或有无硝酸盐都能高度表达,这表明即使不执行反硝化功能,仍有可能检测到反硝化功能基因的表达。Chèneby等人^[30]发现一些具有*nosZ*基因的反硝化菌不能还原N₂O,相反,另一些不含*nosZ*基因的反硝化菌却能够还原N₂O产生氮气,表明一些反硝化菌的*nosZ*基因没有得到表达,并且可能有不同的N₂O还原酶序列在反硝化菌

中存在。总之,具有 $nosZ$ 序列不能很好的预测细菌还原 N_2O 的能力。Metz等人^[27]用*Ochrobactrum anthropi*菌株研究 N_2O 产生和DnirK表达之间的关系,发现当 N_2O 合成速度最高时DnirK表达最大,但是 N_2O 产量降低时表达DnirK的酶数量没有减少,由此可以得出一个结论:即功能酶的表达与功能的执行可能不具有同步性,功能酶也不能及时反映微生物活性的变化。

7 结语

通过标记功能基因反映微生物的多样性、数量和功能已经成为研究复杂微生物的一个主要手段,但由于功能基因自身的复杂性,使之快速、准确的反映微生物的生理性状还有待进一步研究。但今后的研究可以利用反硝化菌作为模型菌,开发新技术、发现新机理,探寻解决这一微生物生态学难题的途径。

参 考 文 献

- [1] 叶姜瑜, 罗固源. 污水生物处理功能微生物的多样性. 重庆大学学报(自然科学版), 2005, **28** (10): 119–123.
- [2] Philpott L, Hallin S. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current opinion in microbiology*, 2005, **8**: 234–239.
- [3] Gregory L, Philpott L, David J, *et al.* Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene ($narG$) as a functional marker. *Microbiology*, 2003, **149**: 229–237.
- [4] Philpott L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1577**: 355–376.
- [5] Antipov A, Morozkina E, Sorokin D, *et al.* Characterization of molybdenum-free nitrate reductase from haloalkalophilic bacterium *halomonas* sp. Strain AGJ 1-3. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, **70**(7): 799–803.
- [6] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes ($nirK$ and $nirS$) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(10): 3769–3775.
- [7] Priemé A, Braker G, Tiedje M. Diversity of nitrite reductase ($nirK$ and $nirS$) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4): 1893–1900.
- [8] Heylen K, Vanparys B, Gevers D, *et al.* Nitric oxide reductase ($norB$) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (nir) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 2007, Brief report.
- [9] Throback N, Enwall K, Jarvis A, *et al.* Reassessing PCR primers targeting $nirS$, $nirK$ and $nosZ$ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *Microbiology Ecology*, 2004, **49**: 401–417.
- [10] Delorme S, Philippot L, Edel-Hermann V, *et al.* Comparative genetic diversity of the $narG$, $nosZ$, and 16S rRNA genes in fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(2): 1004–1012.
- [11] Lo'pez-Gutiérrez C, Henry S, Hallet S, *et al.* Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **57**: 399–407.
- [12] Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, *et al.* Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(12): 6121–6128.
- [13] Gregory L, Karakas-Sen A, Richardson D, *et al.* Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. *Microbiology Letter*, 2000, **183**(2): 275–279.
- [14] Hwang C, Wu WM, Gentry T, *et al.* Changes in bacterial community structure correlate with initial operating conditions of a field-scale denitrifying fluidized bed reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006, **71**: 748–760.
- [15] Yan TF, Fields MW, Wu LY, *et al.* Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments ($nirK$ and $nirS$) from nitrate- and uranium-contaminated ground-water. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(1): 13–24.
- [16] Casciotti K, Ward B. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 2213–2221.
- [17] Rich J, R Heichen, P Bottomley, *et al.* Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(10): 5974–5982.
- [18] Petri R, Imhoff JF, Podgorsek L. The relationship of nitrate reducing bacteria on the basis of $narH$ gene sequences and comparison of $narH$ and 16S rDNA based phylogeny. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, **23**(1): 47–57.
- [19] Heylen K, Gevers D, Vanparys B, *et al.* The incidence of $nirS$ and $nirK$ and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 2006, **8**(11): 2012–2021.
- [20] Dandrea C, Burton D, Zebbartha B, *et al.* Analysis of denitrification genes and comparison of $nosZ$, $cnorB$ and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato

- cropping systems. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, **30**(2): 128–138.
- [21] Hallin S, Throback I, Dicksved J, *et al.* Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(8): 5445–5452.
- [22] Cole A, Semmens M, LaPara T. Stratification of activity and bacterial community structure in biofilms grown on membranes transferring oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 1982–1989.
- [23] Tsuneda S, R Miyauchi, T Ohno, *et al.* Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene. *Biosci Bioeng*, 2005, **99**: 403–407.
- [24] Dandie C, Miller M, Burton D, *et al.* Nitric-oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(13): 4250–4258.
- [25] Michotey V, Mejean V, Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd1*-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(4): 1564–1571.
- [26] Nogales B, Timmis KN, Nedwell DB, *et al.* Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(10): 5017–5025.
- [27] Metz S, Beisker W, Hartmann A, *et al.* Detection methods for the expression of the dissimilatory copper-containing nitrite reductase gene (*DnirK*) in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, **55**: 41–50.
- [28] Powell S, Ma W, Siciliano S. Isolation of denitrifying bacteria from hydrocarbon contaminated Antarctica soil. *Polar Biology*, 2006, **30**: 69–74.
- [29] Etchebehere C, Tiedje J. Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(9): 5642–5645.
- [30] Chèneby D, Hartmann A, Hénault C, *et al.* Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N_2O in two soils. *Biol Fertil Soils*, 1998, **28**: 19–26.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“精品教学”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!