

反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展

郭丽芸 时飞 杨柳燕*

(污染控制与资源化研究国家重点实验室 南京大学环境学院 江苏 南京 210093)

摘要: 由微生物推动的反硝化作用是地球氮素循环的重要分支, 尽管已被发现广泛存在于细菌、真菌和古生菌中, 其功能基因的研究仍仅限于很少几个物种。现代分子生物学的发展为研究环境微生物提供了行之有效的办法, 以反硝化功能基因作为分子标记的分子生态学研究迅猛发展。综述近年来国内外微生物反硝化功能基因研究及以其为标记的分子生态学研究进展。

关键词: 反硝化细菌, 功能基因, 分子生态学

Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers

GUO Li-Yun SHI Fei YANG Liu-Yan*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

Abstract: Denitrification, a microbial process, is a major branch of the geography nitrogen cycle. Although the denitrifying ability has been widely found in bacteria, fungi and Archaea, the genes encoding the denitrifying reductases have been studied in few species. Modern molecular biology techniques provide effective methods to study the microbial ecosystem, and important knowledge has been accumulated on using functional genes for molecular techniques in the case of denitrification. Recent investigations on functional genes and molecular ecology in denitrifiers have been summarized.

Keywords: Denitrifiers, Functional genes, Molecular ecology

反硝化作用是氮素循环中的一个重要生物过程, 在整个氮循环中占有重要地位。反硝化作用与人类生产生活密切相关, 它能使江河湖海脱除氮素富营养化而得以净化, 也能使农田氮肥流失造成重大经济损失。同时, 反硝化作用也产生大量温室效

应气体, 如 NO 和 N₂O, 引起全球气候变暖并破坏臭氧层结构。因此, 研究江河湖海以及农田土地等生境的反硝化微生物, 对治理水体氮素富营养化、减少农田氮肥损失和温室气体排放, 以及改善我国城镇居民饮用水质量均有重大意义。

反硝化微生物不断从土壤、沉积物和水体环境中分离得到,证明了这一途径的广泛存在。由于反硝化微生物是一大类生理类群,已被发现存在于细菌、真菌及古菌中^[1-3],经典的16S rRNA方法不适合反硝化细菌的生态学研究,因此反硝化酶编码基因常被选作分子探针和引物设计的模板用于海洋、土壤等多种生境下微生物体系与种群结构的分析^[4]。而对于反硝化功能基因的研究则有助于新的引物、探针的设计及新的分子生态学手段的研发^[5]。本文综述了反硝化功能基因的部分研究结果,及近年来以这些基因为标记研究反硝化微生物群落结构的分子生态学研究进展。

1 反硝化作用及微生物

反硝化作用(Denitrification)被定义为微生物以氮氧化物为电子受体产生能量的过程^[6]。氮素通过化学或生物固氮进入生物圈,继而由反硝化作用重新回到大气中去,实现整个自然界的氮素循环。我们常说的反硝化作用主要是指异化性反硝化作用,其过程为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$, 分别由硝酸盐还原酶(Nitrate reductase, Nar)、亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, Nir)、氧化氮还原酶(Nitric oxide reductase, Nor)和氧化亚氮还原酶(Nitrous oxide reductase, Nos)进行催化^[7], 相应编码基因分别为 *nar*、*nir*、*nor*、*nos*。

自1886年第一次分离到反硝化微生物已有120多年了,在这期间,研究者们致力于反硝化步骤分子机理的研究。总体来说,反硝化过程可以表示为以下还原反应: $2\text{NO}_3^- + 10\text{e}^- + 12\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ ^[8]。

反硝化过程在传统意义上被认为是在无氧或微氧条件下进行的。但20世纪80年代,研究者发现在好氧条件下也能实现反硝化,即同时利用氧气和硝酸盐作为电子受体进行产能代谢,称为好氧反硝化(Aerobic denitrification)。好氧反硝化作用得以实现是因为此类微生物含有不被氧气抑制的周质硝酸盐还原酶(Nap)。

反硝化作用最初在细菌中发现,包括假单胞菌(*Pseudomonaceae*)、芽孢杆菌(*Bacillaceae*)、根瘤菌

(*Rhizobiaceae*)、红螺菌(*Rhodospirillaceae*)、噬纤维菌(*Cytophagaceae*)等^[9]。后来在真菌、放线菌、酵母菌,甚至一种深海有孔虫 *Globobulimina pseudospinescens*^[10]中均有反硝化现象发现。但到目前为止,好氧反硝化作用仅在细菌中发现,在放线菌、真菌中尚没有报道^[11]。好氧反硝化细菌主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、副球菌属(*Paracoccus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)等,属于好氧或兼性好氧异养微生物。

2 反硝化作用酶系及其编码基因

2.1 硝酸盐还原酶(Nitrate reductase, Nar)

硝酸盐还原酶催化硝酸盐到亚硝酸盐的反应。根据细胞内定位不同可分为:膜结合硝酸盐还原酶(Membrane-bound nitrate reductase, Nar)和周质硝酸盐还原酶(Periplasmic-bound nitrate reductase, Nap)。长期以来对硝酸盐还原酶的研究大多数是针对 γ 变形杆菌的非反硝化细菌 *Escherichia coli* 的 Nar。Nar 结构基因最早完成测序是在 *E. coli*、*Bacillus subtilis* 和 *P. fluorescens* 中。Nar 由3个亚基组成:(1)催化亚基 α ,由 *narG* 基因编码;(2)可溶性 β 亚基,由 *narH* 基因编码;(3) γ 亚基,由 *narJ* 基因编码^[6]。Nar 基因簇由 *narXLDKFHJI* 基因组成。其中 *narG*、*narH*、*narJ*、*narI* 为结构基因,分别编码组成 Nar 的 α 、 β 、 γ 、 δ 4个亚基。NarGHI 排列在2个结构域: α 、 β 亚基组成细胞质结构域; γ 亚基组成膜结构域,从而完成 α 、 β 亚基锚定在靠近细胞质侧的细胞膜上。*narL* 和 *narX* 基因编码蛋白组成一个二元调控系统,分别负责信号的传递和接收,从而激发 *narG* 等基因的转录。*narL* 和 *narX* 的功能推测与硝酸盐及亚硝酸盐运输有关。*narG* 基因是编码 Nar 的最大结构基因,通常有3600 bp。由 *narG* 编码的 α 亚基是硝酸盐还原的作用位点及活性中心。由 *narI* 编码的 δ 亚基负责整个硝酸盐还原酶的装配。基因 *narGHJI* 通常在一个操纵子内。

膜内 Nar 的生理功能是在厌氧及低氧条件下进行硝酸盐呼吸,对氧分子敏感,在厌氧反硝化生物脱氮中发挥主要作用。目前, *Pseudomonas fluores-*

cens、*Pseudomonas aeuginosa*、*Thermus thermophilus* 及 *Staphylococcus carnosus* 等细菌的膜内 Nar 基因已经被分离、鉴定并测序^[12]。

周质硝酸盐还原酶 Nap 定位于细胞周质中,该酶的表达对氧分子不敏感,因此其生理功能可能与好氧反硝化有关。目前已经从 *Rhodospseudomonas sphaeroides*、*Paracoccus pantotropha* 和 *Alcaligenes eutrophus* 等细胞中分离纯化得到 Nap。该酶有大小 2 个亚基,分别由 *napA*、*napB* 基因编码。大亚基 NapA 为催化亚基,小亚基 NapB 含有细胞色素 *c*。还有一类 Nap 是单亚基,只有一个 NapA^[13]。除了 *napA*、*napB* 基因外,*nap* 基因操纵子中尚有一个 *napC* 基因,编码含有 4 个血红素的膜锚定细胞色素 *c*,其功能可能与从细胞膜醌至周质硝酸盐还原酶复合体(NapAB)的电子转移有关。

Nap 编码基因可能位于染色体上,如 *A. eutrophus* H16^[14],也可能位于质粒上,如 *R. sphaeroides*^[15]。除此之外,不同微生物中,*nap* 基因的表达情况也有所不同,如 *E. coli* 的 *nap* 为诱导型,受厌氧条件及硝酸盐诱导;*R. sphaeroides* 和 *R. capsulatus* 的 *nap* 受硝酸盐诱导,但与氧气存在与否无关;而 *R. eutropha* 的 *nap* 为非诱导型,其表达不受硝酸盐及氧气的影响。

大部分好氧反硝化细菌可同时拥有 *nar* 及 *nap* 基因,在厌氧或缺氧条件下 *nar* 及 *nap* 同时表达,而在好氧条件下,仅 *nap* 可表达。2 种硝酸盐还原酶的编码基因 *narG* 及 *napA* 也均可作为分子标记用于反硝化菌分子生态学的研究。但也有研究者认为硝酸盐还原酶不是反硝化过程独有的步骤,因此利用该酶的编码基因作为分子标记研究反硝化微生物其可行性仍存在一定的争议。

2.2 亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, Nir)

由亚硝酸盐转化为氧化氮的过程,是反硝化作用有别于其他硝酸盐代谢的标志性反应,是反硝化过程中最重要的限速步骤,亚硝酸盐还原酶(Nir)是催化此反应的限速酶,*nir* 基因也是在反硝化菌功能基因中研究最多的基因,并作为反硝化菌的分子标记用于研究其种群结构及多样性^[4]。Nir 分布于细胞膜外周质中,有 2 种类型:一种是可溶性含铜酶

(Cu-Nir),为同源三聚体,每个亚基含有一个 I 型 Cu (T1Cu)催化中心和一个 II 型 Cu (T2Cu)催化中心^[8],称为 Cu 型亚硝酸盐还原酶,由 *nirK* 基因编码^[16],催化产物是 NO 和 N₂O 混合物;Cu-Nir 为可溶性周质蛋白,每个亚基分子量约为 40 kD。尽管由于纯化及储存方法的不同,在不同微生物酶中所得到的 Cu 原子数量不同,目前在所有已知酶晶体结构中均可发现 6 个 Cu 原子。亚硝酸盐结合在 T2Cu 上,T1Cu 则负责把电子从可溶性电子受体传递到活性位点^[17]。另一种是细胞色素还原酶(*cd₁*-Nir),是一种 20 kD 的二聚体 Nir,含有细胞色素 *c* 和 *d₁*,称为 Cyt *cd₁* 型 Nir,由 *nirS* 编码^[18],催化产物是 NO 和 N₂O 混合物。*nirS* 是反硝化过程中一个极其重要的基因,同样也是反硝化细菌检测的一个重要靶基因^[4,19]。这两种酶功能相同,但结构及催化位点不同,且不能共存于同种细胞中。大部分已报道的反硝化菌含有 *cd₁*-Nir,但更有研究证明 Cu-Nir 存在于为数更多的细菌种类中。

nirS 及 *nirK* 基因是最早用来研究反硝化菌分子生态学的功能基因。早在 2000 年,Braker 等人已利用 *nirS* 及 *nirK* 基因来研究海洋沉积物中反硝化微生物的多样性^[4]。这一研究也为利用功能基因研究同一生理类群微生物的群落结构提供了方法和模式,极大地促进了现代分子生态学的发展。

2.3 一氧化氮还原酶(Nitric oxide reductase, Nor)

一氧化氮还原酶 Nor 是一种膜结合的细胞色素 *bc* 型酶,通过对 Nor 一级结构和空间结构的研究揭示,Nor 可以分为 2 种,一种为 cNor^[20],是异源二聚体寡聚酶,由 2 个亚基组成,大亚基 NorB 是催化亚基,呈疏水性,具有 12 个跨膜的 α 螺旋,能与 *b* 型血红素结合,小亚基 NorC 与 *c* 型血红素结合,一个 N-末端的区域固定在细胞膜上,其大小亚基编码基因分别为 *cnorB* 和 *cnorC*。在多种反硝化细菌中,基因转录从 *norC* 开始。另一种为 qNor,是单体酶,发现于 β 变形杆菌 *Ralstonia eutropha*。同源性分析显示,其多肽链与 cNor 有很高的同源性,但它的电子供体是醌(Quinol),也不能氧化细胞色素 *c*。该酶由 *qnorB* 基因编码^[21]。研究表明^[22],相对于 *cnorB* 基因,*qnorB* 基因表现出更高多样性。序列比对结果表

明无论是 *cnorB* 基因还是 *qnorB* 基因都来自于 α 、 β 或 δ 变形杆菌纲(*Proteobacteria*), 这说明 *norB* 基因可能是由变形杆菌纲进化而来。目前第 3 种 *Nor* 在 *Bacillus azotoformans* 中被发现, 该酶既能合成生物能量, 又具有解毒功能^[23]。*Nor* 酶已在施氏假单胞菌、脱氮副球菌等细菌中被分离提纯^[24], 但是该酶很不稳定。*Nor* 对 NO 具有很高的亲和力^[9], 可使 NO 浓度维持在极低的水平, 从而消除 NO 对细胞的毒害作用。

目前有研究利用 *norB* 基因检测环境中反硝化微生物的存在及丰度, 但相对 *narG*、*nirS* 及 *nirK* 等基因来说, *norB* 作为分子标记的研究起步较晚。

2.4 一氧化二氮还原酶(Nitrous oxide reductase, Nos)

一氧化二氮还原酶(Nos)催化由 N_2O 至 N_2 的过程。Nos 是一种含铜蛋白, 位于膜外周质中, 是分子量为 67 kD 的同型二聚体, 含有 2 个 Cu 活性中心, 其中一个与氧化酶的 CuA 中心很相似, 用于从 Cyt c 接收电子。根据氧化还原特性和光谱学分析可分为 I 型(Purple 型)和 II 型(Pink 型), 其中第一个 II 型 Nos 是从 *P. stutzeri* 中提纯的。

以往研究认为, Nos 活性受 O_2 抑制, 这一观点与通常认为的细菌在有氧条件下不能还原 N_2O 这一观点一致。但 Bell 等^[25]则认为 Nos 对氧气不敏感, 在氧气存在条件下脱氮副球菌细胞 Nos 具有活性, 能将 NO、 N_2O 两种气体同时还原。Berks 等^[26]从好氧反硝化微生物脱氮副球菌细胞中提纯了 Nos, 发现其在分子特性上与从厌氧反硝化微生物中提取的 Nos 具有相似之处。该酶可被 1% 的乙炔和 0.112 5 mmol/L 的氰化物完全抑制。

不同反硝化菌之间 *nos* 基因簇变化不大, 在 *P. stutzeri* A1501、*P. aeruginosa* PAO1、*P. fluorescens* 3 株细菌中, *nos* 基因簇都是由 *nosL*、*nosY*、*nosF*、*nosD*、*nosZ*、*nosR* 6 个基因组成, 其中 *nosZ* 基因为最大的结构基因。6 个基因在染色体上的排列顺序及转录方向也是完全相同^[12]。在某些含有 *nir* 和 *nor* 基因的细菌和古菌中, *nos* 基因往往缺失, 使反硝化过程终产物为 N_2O 而非 N_2 。研究表明约有 1/3 的反硝化菌缺失 *nos* 基因。另外, *nosZ* 基因仅在 α 、 β 、 γ

变形杆菌中发现, 在革兰氏阳性菌中尚未发现。Christopher 等^[27]发现了一个有趣的现象, 即 *nirS* 型反硝化菌往往携带 *nosZ* 基因(*Cupriavidus eutropha* JMP134 例外), 而 *nirK* 型反硝化菌则无规律可循。

因为该酶催化的是反硝化作用的最后一步, 因此 *nosZ* 基因也常被作为分子标记用于检测可进行完全反硝化作用(终产物为 N_2)的微生物。总之, 就目前的报道而言, 反硝化过程的 4 种还原酶, 其编码基因都有用于分子生态学研究的实例, 且大部分研究中均利用 2 种以上功能基因相结合的方法, 相互辅证, 更加充实研究结果, 使其更加真实可信。

3 以反硝化功能基因为标记的分子生态学研究

3.1 分子生态学的新发展

目前通过人工培养所获得的微生物只占自然环境中很小一部分(0.001%–15%), 因此传统培养方法不能真实体现环境样品微生物的多样性。1992 年, 《Molecular Ecology》发刊词上首次提出了分子生态学的概念, 提出分子生态学技术包括探针、序列和引物, 并指出分子生态学是应用分子生物学技术为生态学和种群生物学各领域提供革新见解的学科, 从而确立了分子生物学技术在微生物学研究中的应用。此后, 分子生物学和现代生物技术的迅猛发展极大地推动了环境微生物生态学的发展。现代分子生物学方法避免了不可培养的缺陷, 人们可直接从环境样品中获得非可培养微生物的基因及其序列, 迅速对微生物进行鉴定, 并可对微生物之间的系统进化关系进行分析。因此, 分子生态学能够动态地对微生物群落多样性进行研究, 能够更真实地反映微生物的存在状态。基因文库法、限制性片段长度多态性分析(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、变性梯度凝胶电泳技术(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH)、末端限制性片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、微阵列技术(Microarray)、反转录 PCR (Real-time PCR)及定量 PCR (QPCR)等现代分子生物学手段均

被应用于环境反硝化微生物的研究当中^[28]。

3.2 反硝化菌的分子生态学研究

功能基因多样性的分析有助于对不同环境微生物及生物地球化学循环的理解^[29]。由于反硝化细菌的多样性及其对氮素循环的重要性,反硝化基因为功能基因进化关系的研究提供了良好的素材。1998年,Braker等^[20]通过序列比较和反复试验,研究出了可以用来扩增亚硝酸盐还原酶 *nirK*、*nirS* 基因特异性片段的引物,找到了通过 PCR 扩增 *nirK*、*nirS* 基因的方法,成功从 *Blastobacter denitrificans*、*Alcaligenes xylosoxidans* 和 *Alcaligenes* sp. DSM 30128 扩增到了 *nirK* 基因;从 *Alcaligenes eutrophus* DSM 530 和 IFAM3698 扩增得到 *nirS* 序列。之后,*narG*、*napA*、*norB*、*nosZ* 等结构基因也被应用到反硝化菌的分子生态学研究中,同时分子生物学手段也被陆续应用到反硝化菌的生态学研究中,环境中反硝化菌丰度及其群落结构的调查研究不断取得新的进展,近3年来的部分研究成果如表1所示。由表1可见,多种方法包括分子生物学方法、传统培

养法及物理化学方法等的结合使用有利于更加准确地检测反硝化菌及其基因的多样性和丰度。海洋低氧区(OMZ)、沉积物、水稻田及土壤均是反硝化菌集中的生境;各种生境中的反硝化菌其功能基因多样性程度较高,在研究过程中,研究者通常可获得大量新的不可培养微生物的功能基因序列,且新的反硝化菌种不断被发现。此外,通过这些研究,我们可以获取更多对于反硝化菌的认识,如农田的施肥、植物根际分泌物、土壤的湿度等环境因素均可影响反硝化菌的多样性及不同微生物的群落结构和丰度。同时,由于反硝化是产生 N₂O 等温室气体的主要途径,反硝化功能基因 *nosZ* 等除了应用到分子生态学外,还可用于检测农田土壤温室气体 N₂O 的排放,通过 QPCR 的方法,利用其基因丰度作为温室气体排放量的衡量指标。除了对自然生境中反硝化菌的群落结构及多样性研究外,对污水处理厂、活性污泥等人工管理的环境中反硝化菌的多样性研究也取得了重大进展,为更好地发挥反硝化菌活性、更有效去除水体氮素提供了理论指导。

表1 近3年反硝化菌分子生态学研究进展
Table 1 Advances in molecular ecology of denitrifiers in recent three years

序号 No.	研究目的及结论 Aims and conclusions	技术方法 Methods	反硝化基因 Functional genes	文献来源 References
1	农田反硝化菌丰度、反硝化基因 mRNA 水平及 N ₂ O 释放特性	QPCR	<i>nirS</i> , <i>nosZ</i>	[30]
2	施肥在短期内显著改变了小麦田土壤中 <i>nirS</i> 型反硝化菌群落结构构成	克隆文库, RFLP	<i>nirS</i>	[31]
3	应用新技术检测纯培养及环境样品中的 <i>nirK</i> 基因	RING-FISH	<i>nirK</i>	[32]
4	海洋低氧区(OMZ)反硝化菌群落结构随反硝化进程而改变	克隆文库	<i>nirK</i> , <i>nirS</i>	[33]
5	土壤 pH 对 N ₂ O 和 N ₂ 释放,反硝化活性及反硝化菌群落大小的影响	¹⁵ N 示踪法, QPCR	<i>narG</i> , <i>napA</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i> , <i>nosZ</i>	[34]
6	澳大利亚北昆士兰富饶土壤水及农田地下水中细菌及反硝化菌丰度	PCR-DGGE, 克隆文库, QPCR	<i>nirS</i> , <i>nirK</i>	[35]
7	通过调查湿地 <i>nirS</i> 基因的丰度及多样性从而研究氮去除效率	克隆文库, QPCR	<i>nirS</i>	[36]
8	稻田反硝化菌种类及丰度随土壤环境均有所变化	克隆文库, QPCR	<i>nirK</i> , <i>nirS</i>	[37]
9	沿海水产养殖地土壤中硝化与反硝化菌的检测及其多样性分析	克隆文库	<i>norB</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ</i>	[38]
10	利用反硝化基因检测农田温室气体释放与土壤状态的关系	QPCR	<i>nirS</i> , <i>nosZ</i>	[39]
11	原始森林土壤中温度和湿度对硝化与反硝化菌影响显著, <i>nirK</i> 丰度与土壤湿度呈线性关系	Real-time PCR	<i>nirK</i>	[40]

4 存在的问题

4.1 功能基因引物的设计与选择

目前数据库中的反硝化功能基因序列尚不是很多,例如研究最多的 *nirK*、*nirS* 基因,其引物的设计主要针对变形杆菌门有限的几个属。对于其他反硝化菌来说,*nir* 基因在多大程度上可以被有效扩增尚属未知。另外,不同的 *nir* 基因引物可能会对特定环境的反硝化菌 *nir* 基因扩增有效。因此,PCR 引物的选择对环境中微生物的检测有着重要的影响,在采用以 PCR 相关分子生物学技术进行反硝化菌生态学研究时,应格外注意引物的设计和选择。Throback 等人^[29]对 11 条正向、5 条反向 *nirS* 引物;3 条正向、3 条反向 *nirK* 引物;5 条正向、6 条反向 *nosZ* 引物进行分析,选择合适的引物组合后,对 28 株反硝化菌(*nirS* 型、*nirK* 型菌各 14 株)及 6 个环境样品的相应基因进行扩增。结果显示,扩增 *nirS* 基因的 20 对引物中,获得阳性扩增最多的(13/14 菌株,6/6 环境样品)引物对为 cd3aF、R3cd,扩增 *nirK* 基因的 9 对引物中,得到阳性扩增最多的(10/14 菌株,6/6 环境样品)引物对为 FlaCu、R3Cu,扩增 *nosZ* 效果最好的(25/28 菌株,6/6 环境样品)引物对为 nosZ-F、nosZ1622R。同时,经反复试验和优化 PCR 条件后,仍有 14 对 *nirS* 引物、4 对 *nirK* 引物、2 对 *nosZ* 引物,至少对 2/3 的环境样品不能扩增出正确条带。作者在对江苏省太湖、骆马湖、洪泽湖等 9 个淡水湖泊水样中亚硝酸盐还原酶基因的 PCR 扩增中发现,引物对 cd3aF、R3cd 及引物对 nirS1F、nirS6R 均可得到 *nirS* 基因片段;引物对 FlaCu、R3Cu 可扩增得到 *nirK* 基因片段。而引物对 nirK1F、nirK5R 可扩增斯氏假单胞菌(*P. stutzeri*)的 *nirK* 基因,但在水样的 *nirK* 基因扩增中未得到相应条带。

4.2 分子生物学技术的缺陷性

现代分子生物学的发展在一定程度上加速了反硝化菌微生态的研究,但 DGGE、RFLP、TRFLP 等技术均是建立在 DNA 提取及 PCR 的基础上,不同 DNA 提取技术所得 DNA 片段大小、质量及纯度均有较大差别,影响 DGGE 等技术所获得信息量的大小^[41]。PCR 过程不可避免地造成群落中不同菌种

DNA 的差异性扩增,以及目标 DNA 在菌种间拷贝数的差异等,导致分析结果难以准确反映自然群落的多样性及物种间的相对丰度信息^[42]。PCR 过程中出现的假阳性及假阴性易造成菌种的增加或缺失,巢式或半巢式 PCR 也仅能在一定程度上解决该问题。除此之外,每种分子指纹技术均有自己的不足之处,例如构建基因文库法对所分析的克隆数目要求必须足够才能较为完整地认识种群组成情况,造成工作量较大;T-RFLP 技术检测带荧光标记的末端限制性片段,理论上每个 T-RF 有可能对应几个近缘菌种,且该技术对于大片段(500 bp 以上)的检测分辨率不够,造成对群落多样性的低估^[43-44];DGGE 技术理论上可分离点变异 95%以上的 500 bp 内含 GC 堆积的 rDNA,但实际上来自一种微生物的 DNA 量不到样品 DNA 量 1%时,肉眼很难检测到其条带。且不同序列 DNA 片段有可能在同一位置形成条带,这些都会影响 DGGE 的分离和检测效果^[45],造成对环境微生物种群多样性的低估;RFLP 技术由于限制性内切酶水解不完全或酶切片段相近,也对其应用造成了一定的障碍^[46]。

4.3 反硝化菌分子生态学尚存的争议点

在研究过程中,通过对微生物 *nar*、*nir*、*nor* 及 *nos* 基因进行系统发育分析,发现其结果与 16S rRNA 系统发育分析结果不尽相同^[47-48],因此对于以功能基因代替 16S rRNA 为分子标记分析反硝化菌群落结构是否可行,很多学者持怀疑态度。但造成不一致的部分原因已得到证实,例如 *nirK* 基因又分为结构不同的 I 型 *nirK* 和 II 型 *nirK*^[49],目前发表的 *nirK* 引物均是针对 I 型 *nirK* 设计^[29],因而造成与 16S rRNA 分析的不一致性。但很多其他原因尚无定论,有待证实。由于反硝化体系十分复杂,利用单个或某几个功能基因研究反硝化菌群落结构也许还存在着很多缺陷,但目前以功能基因作为分子标记仍是研究环境样品反硝化菌生态结构最行之有效的手段之一。

5 展望

总体来说,对于细菌分子生态学的研究,每种

方法都有其优势和局限性,因此多种技术的结合将更有利于环境样品微生物群落结构多样性的分析和研究。而以多种结构基因作为分子标记,也可提高对不同生境反硝化微生物多样性及群落结构的认识。在今后的发展中应更加注重对反硝化功能基因的深入研究,为研发新技术、提供新方法打下基础;采用多种分子技术、传统培养方法相结合的方式,取长补短相互完善,提高检测的灵敏度,尽可能地避免由于环境因素所造成的影响,才能更好地对反硝化微生物的分子生态进行深入了解。

参 考 文 献

- [1] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61(4): 533-616.
- [2] Verbaendert I, De Vos P, Boon N, et al. Denitrification in Gram-positive bacteria: an underexplored trait[J]. Biochemical Society Transactions, 2011, 39: 254-258.
- [3] Chèneby D, Philippot L, Hartmann A, et al. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 34(2): 121-128.
- [4] Braker G, Zhou JZ, Wu LY, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5): 2096-2104.
- [5] Bothe H, Jost G, Schloter M, et al. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 1176: 1-8.
- [6] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1577(3): 355-376.
- [7] 郑平. 环境微生物学[M]. 第2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2010: 114.
- [8] Tavares P, Pereira AS, Moura JGG, et al. Metalloenzymes of the denitrification pathway[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, 100(12): 2087-2100.
- [9] 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 41.
- [10] Risgaard-Petersen N, Langezaal AM, Ingvarsdén S, et al. Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer[J]. Nature, 2006, 443(7107): 93-96.
- [11] 王薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 等. 好氧反硝化菌的研究进展[J]. 应用生态学报, 2007, 18(11): 2618-2625.
- [12] Philippot L, Mirleau P, Mazurier S, et al. Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1571(3): 436-440.
- [13] Arnoux P, Sabaty M, Alric J, et al. Structural and redox plasticity in the heterodimeric periplasmic nitrate reductase[J]. Nat Struct Biol, 2003, 10(11): 928-934.
- [14] Siddiqui RA, Warnecke-Eberz U, Hengsberger A, et al. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16[J]. J Bacteriol, 1993, 175(18): 5867-5876.
- [15] Schwintner C, Sabaty M, Berna B, et al. Plasmid content and localization of the genes encoding the denitrification enzymes in two strains of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. FEBS Microbiol Lett, 1998, 165(2): 313-321.
- [16] Casciotti KL, Ward BB. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(5): 2213-2221.
- [17] Butler CS, Richardson DJ. The emerging molecular structure of the nitrogen cycle: an introduction to the proceeding of the 10th annual N-cycle meeting[J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33(1): 113-118.
- [18] Hasegawa N, Arai H, Igarashi Y. Two *c*-type cytochromes, *nirM* and *nirC*, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(5): 1223-1230.
- [19] Braker G, Feseldt A, Wizel KP. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3769-3775.
- [20] Tsai YL, Olson BH. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(7): 2292-2295.
- [21] Büsch A, Friedrich B, Cramm R. Characterization of the *norB* gene, encoding nitric oxide reductase, in the non-denitrifying Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(2): 668-672.
- [22] Braker G, Tiedje JM. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3476-3483.
- [23] Suharti, Strampraad MJF, Schröder I, et al. A novel copper containing menaquinol NO reductases from *Bacillus azotoformans*[J]. Biochemistry, 2001, 40(8): 2632-2639.
- [24] 李平, 张山, 刘德立. 细菌好氧反硝化研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(1): 60-64.

- [25] Bell LC, Richardson DJ, Ferguson SJ. Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiostphaera pantotropha*: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification[J]. FEBS Letters, 1990, 265(1/2): 85–87.
- [26] Berks BC, Baratta D, Richardson DJ, et al. Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphtrera pantotropha*[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 212(2): 467–476.
- [27] Jones CM, Stres B, Rosenquist M, et al. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification[J]. Mol Biol Evol, 2008, 25(9): 1955–1966.
- [28] 孙建光, 高俊莲, 马晓彤, 等. 反硝化微生物分子生态学技术及相关研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2007(2): 7–12.
- [29] Throbäck, IN, Enwall K, Jarvis Å, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. Fems Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401–417.
- [30] Henderson SL, Dandie CE, Patten CL, et al. Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues[J]. Appl Environ Microbio, 2010, 76(7): 2155–2164.
- [31] 莫旭华, 麻威, 史荣久, 等. 氮肥对小麦田土壤 *nirS* 型反硝化细菌多样性的影响[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1203–1208.
- [32] Pratscher J, Stichternoth C, Fichtl K, et al. Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductases genes (*nirK*) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(3): 802–810.
- [33] Jayakumar A, O'Mullan GD, Naqvi SWA, et al. Denitrifying bacterial community composition changes associated with stages of denitrification in oxygen minimum zones[J]. Microb Ecol, 2009, 58(2): 350–362.
- [34] Čuhel J, Šimek M, Laughlin RJ, et al. Insights into the effect of soil pH on N₂O and N₂ emissions and denitrifier community size and activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1870–1878.
- [35] Wakelin SA, Nelson PN, Armour JD, et al. Bacterial community structure and denitrifier (*nir*-gene) abundance in soil water and groundwater beneath agricultural land in tropical North Queensland, Australia[J]. Soil Research, 2011, 49(1): 65–76.
- [36] Chon K, Kim Y, Chang NI, et al. Evaluating wastewater stabilizing constructed wetland, through diversity and abundance of the nitrite reductase gene *nirS*, with regard to nitrogen control[J]. Desalination, 2010, 264(3): 201–205.
- [37] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, et al. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41(10): 2044–2051.
- [38] Krishnani KK. Detection and diversity of nitrifying and denitrifying functional genes in coastal aquaculture[J]. Aquaculture, 2010, 302(1/2): 57–70.
- [39] Morales SE, Cosart T, Holben WE. Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils[J]. The ISME Journal, 2010, 4(6): 799–808.
- [40] Szukics U, Abell GCJ, Hödl V, et al. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 395–406.
- [41] Tang XM, Gao G, Zhu LP, et al. DNA extraction procedure affects organic-aggregate-attached bacterial community profiles from a shallow eutrophic lake[J]. Can J Microbiol, 2009, 55(6): 776–782.
- [42] 余素林, 吴晓磊, 钱易. 环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措施[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 861–868.
- [43] 贾俊涛, 宋林生, 李筠. T-RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 64–68.
- [44] Marsh TL, Saxman P, Cole J, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3616–3620.
- [45] 王小芬, 王伟东, 高丽娟, 等. 变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(5): 1–7.
- [46] 王晓丹, 李艳红. 分子生物学方法在水体微生物生态研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 777–781.
- [47] Dandie CE, Burton DL, Zebarth BJ, et al. Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems[J]. Syst Appl Microbiol, 2007, 30(2): 128–138.
- [48] Heylen K, Vanparys B, Gevers D, et al. Nitric oxide reductases (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductases (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers[J]. Environ Microbiol, 2007, 9(4): 1072–1077.
- [49] Nojiri M, Xie Y, Inoue T, et al. Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(11): 4315–4320.