

非典型氧化亚氮还原酶基因 *nosZ* II 研究进展

李冀 朱莹 张晓君\*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

**摘要:** 氧化亚氮( $N_2O$ )是一种强力温室气体,能够破坏臭氧层。微生物含有的 *nosZ* 基因能够编码氧化亚氮还原酶,该酶可还原  $N_2O$  成为无害的  $N_2$ ,因而对环境中 *nosZ* 基因的研究成为气候变化研究的一个热点。最近研究者对全基因组序列分析的结果揭示了一类新型 *nosZ* 基因(非典型 *nosZ* II 基因)存在于更为广泛和多样的氮代谢微生物当中,这类 *nosZ* 编码的蛋白能够起到氧化亚氮还原酶的作用,并且广泛存在于多样的自然环境中。然而,针对含有非典型 *nosZ* II 基因的微生物的相关研究还很不全面,这类微生物发挥作用的的环境条件以及在  $N_2O$  还原过程中的特性仍然未知。本文主要综述了非典型 *nosZ* II 基因与典型 *nosZ* I 的主要差异、在环境中的分布情况以及未来研究方向的展望等。

**关键词:** *nosZ* 基因, 氧化亚氮还原酶, 氧化亚氮, 非典型

## Researches on the atypical nitrous oxide reductase

LI Ji ZHU Ying ZHANG Xiao-Jun\*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Nitrous oxide ( $N_2O$ ) is a powerful greenhouse gas which can destroy the ozone layer. Nitrous oxide reductase coded by *nosZ* gene in microorganisms, can reduce  $N_2O$  to harmless  $N_2$ , thus the study on *nosZ* gene in the environments becomes a research hotspot. A recent study of genome sequence comparative analysis revealed that a new class of *nosZ* gene (atypical *nosZ* II gene) is present in diverse nitrogen metabolism microbes. This type of *nosZ* gene encodes a functional nitrous oxide reductase and is found in variety of natural environments. However, the research on microbes containing atypical *nosZ* II genes is still incomplete, and the environmental conditions in which these microorganisms act and characteristics of  $N_2O$  reduction process is still unknown. This paper reviews the differences between atypical *nosZ* II and typical *nosZ* I, and their distribution in environment. We also propose the direction of future research on the *nosZ* II gene.

**Keywords:** *nosZ* gene, Nitrous oxide reductase, Nitrous oxide, Atypical

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31670105, 41230856)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

**Received:** March 02, 2017; **Accepted:** June 05, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 08, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31670105, 41230856)

**\*通讯作者:** Tel: 86-21-34204878; E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

**收稿日期:** 2017-03-02; **接受日期:** 2017-06-05; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-06-08

近年来,温室气体的排放因导致全球变暖而受到越来越多的关注<sup>[1]</sup>。这些温室气体中影响显著的是  $\text{N}_2\text{O}$ ,它能够对臭氧产生清除作用,尽管大气浓度只有  $\text{CO}_2$  的千分之一,但其单位体积的增温潜能是  $\text{CO}_2$  的 300 多倍<sup>[2]</sup>,作用不容忽视。大气中的  $\text{N}_2\text{O}$  浓度在过去 100 年内增长了 20%,并且正在以每年 0.2%–0.3% 的速度继续增长,表明目前全球  $\text{N}_2\text{O}$  生成的“源(Source)”已经超过了  $\text{N}_2\text{O}$  吸收转化的“汇(Sink)”<sup>[3]</sup>。 $\text{N}_2\text{O}$  的来源很多,但超过三分之二的  $\text{N}_2\text{O}$  排放来自细菌和真菌的反硝化和硝化过程;而一些人类活动,如农业生产、畜牧业、污水处理等会促进微生物释放  $\text{N}_2\text{O}$ 。特别是目前普遍存在的一些不合理的氮肥施加策略会造成土壤氧化亚氮的大量排放,资料显示,全球每年因施用氮肥产生的  $\text{N}_2\text{O} > 1.5 \times 10^6 \text{ t}$ ,占人类活动向大气输入  $\text{N}_2\text{O}$ -N 量的 44% 和每年向大气输入  $\text{N}_2\text{O}$ -N 总量的 13% 左右,氮肥的施用量逐年增加已成为  $\text{N}_2\text{O}$  排放量逐年上升的最重要因素之一<sup>[4-5]</sup>。

## 1 反硝化与 *nosZ* 基因

在自然环境中的氮元素循环过程中,微生物的反硝化作用是土壤氧化亚氮的源,同时也是氧化亚氮的汇。当环境中的氧气含量受限时,有氧呼吸被无氧呼吸替代,硝酸盐作为电子受体首先被还原。狭义的反硝化作用是指反硝化微生物产生的各类酶, *Nar* 和/或 *Nap* ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ )、*Nir* ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ )、*Nor* ( $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ) 和 *Nos* ( $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ),将硝酸盐逐步转化为  $\text{N}_2$  的过程<sup>[6-7]</sup>。参与氮循环的微生物类群中能够产生  $\text{N}_2\text{O}$  的途径有很多,然而能够将氧化亚氮还原成为氮气的这一过程只有反硝化菌中的 *nosZ* 基因编码的氧化亚氮还原酶( $\text{N}_2\text{OR}$ )才能催化进行<sup>[8]</sup>。温室效应气体模型认为,氧化亚氮还原酶的作用减少了环境中  $\text{N}_2\text{O}$  向大气的排放,从而成为  $\text{N}_2\text{O}$  的“汇”。

*nosZ* 基因广泛分布在不同的微生物类群中,文献中极端古菌、光能和化能自养菌、病原菌、海洋微生物、嗜热和嗜冷菌以及降解污染物的细菌等都

有 *nosZ* 基因的报道。含有 *nosZ* 基因的微生物在森林、农田、湿地等不同的生态系统中都有较高的丰度和多样性,*nosZ* 基因的丰富度也影响着不同环境  $\text{N}_2\text{O}$  的释放潜力<sup>[9-10]</sup>。Yang 等通过研究集约管理的石灰性潮土中  $\text{N}_2\text{O}$  与功能基因丰度的关系,证实潮土年  $\text{N}_2\text{O}$  释放量与 *nosZ* 基因的丰度具有一定相关性<sup>[11]</sup>。而土壤微生物菌群培养实验显示,缺少 *nosZ* 基因的反硝化微生物的比例可能是决定不同土壤中  $\text{N}_2\text{O}$  释放潜力的关键因素<sup>[12-13]</sup>。1972 年,  $\text{N}_2\text{OR}$  最早是从 *Alcaligenes faecalis* 中被作为一种新型铜结合蛋白而分离出来<sup>[14]</sup>,但直到十年之后对来自 *Pseudomonas stutzeri* 具有和该酶相似可见光谱的蛋白的研究,才揭示了该酶的氧化亚氮还原酶活性<sup>[15]</sup>。随后对多株不同的反硝化细菌的研究,证实了  $\text{N}_2\text{OR}$  是位于细菌周质空间的一种可溶酶,该酶由两个含铜亚基组成,每个亚基由两个结构域组成,包括一个连接铜中心的电子传递结构域( $\text{CuA}$ )和一个连接铜-硫中心的催化结构域( $\text{CuZ}$ )<sup>[16]</sup>,其中  $\text{CuZ}$  区域会被  $\text{O}_2$  和反硝化的中间产物  $\text{NO}$  抑制,从而影响整个酶的活性<sup>[17]</sup>。

## 2 非典型 *nosZ* 基因的发现

迄今为止,环境中的氧化亚氮向氮气的还原都只归因于表达典型氧化亚氮还原酶的反硝化微生物<sup>[18]</sup>,然而,多篇文献报道指出基于 *nosZ* 基因的丰度和表达来预测  $\text{N}_2\text{O}$  的排放与实际检测的氧化亚氮排放存在明显偏差<sup>[19-20]</sup>。此外,Philippot 等发现环境中 *nir* 基因的丰度与 *nosZ* 基因在丰度上也具有较大偏差,甚至超过一个数量级<sup>[12]</sup>。这都预示着可能存在一类未被发现的具有功能的氧化亚氮还原酶基因。2012 年, Sanford 等<sup>[21]</sup>的研究第一次揭示了一类新型 *nosZ* 基因的存在,他们通过对从公共数据库中获取的 136 条 *nosZ* 基因的氨基酸序列进行比对,发现分为两种类型,除了已知典型的 *nosZ* (以下简称为 *nosZ* I),还存在一种新型的非典型的 *nosZ* (以下简称为 *nosZ* II)。随后 Jones 等<sup>[22]</sup>对 216 个含有 *nosZ* 基因的基因组分析也验证了相

似的结果,发现了一个独特的 *nosZ* 基因分支。

### 3 非典型 *nosZ* 基因的特点和生理功能

两类 *nosZ* 基因具有明显区别,首先,如表 1 所示,含有 *nosZ* I 的微生物主要分布于 Alpha-、Beta-和 Gamma-proteobacteria,而含有 *nosZ* II 的微生物在分类学上更为多样,还存在于 Firmicutes、Bacteroidetes、Chloroflexi 等门和 Delta-Proteobacteria 等。有少数 *nosZ* II 的携带微生物是完全反硝化微生物,更多的是非完全反硝化微生物,它们的反硝化基因链不完整,如缺少 *nirS/nirK* 基因,在此之前,完整反硝化菌被认为是主要的控制土壤和陆地来源的  $N_2O$  排放的关键功能类群。对于这类来自包括土壤环境在内的不同环境的新型 *nosZ* II 细菌功能类群的发现,表明一个更为广泛的微生物类群贡献了  $N_2O$  的消耗,这些微生物可能在全球  $N_2O$  还原过程中发挥重要作用。有些含有 *nosZ* II 的基因组同时含有 *nrf* 和 *nir* 基因,表明了反硝化过程和氨化过程可能可以同时存在于同一个基因组中。另外,在 *nosZ* 所处的 *nos* 基因簇结构上,*nosZ* II 所在的基因簇含有更多数目且更多样的基因,而 *nosZ* I 所在的基因簇在结构和组成上较为保守,所有的 *nosZ* II 基因簇都缺少 *nosR* 和 *nosX*,这两个基因元件被认为在完全反硝化菌中分别与 *nosZ* 表达和电子转移至  $N_2OR$  中相关。*nosZ* II 基因簇的另一个独特特性

是在其下游有一个编码未知功能的跨膜蛋白的基因(TM)<sup>[21]</sup>。两类 *nosZ* 编码的氧化亚氮还原酶在酶结构上也有一定区别,特别是全部 *nosZ* I 编码的酶都含有 Tat 型信号肽,而几乎所有 *nosZ* II 编码的酶都含有 Sec 型信号肽,两种类型信号肽跨膜所需的能量不同,这也暗示含有两类 *nosZ* 的微生物宿主的生存环境有一定差异<sup>[22]</sup>。

*nosZ* II 编码酶的功能的第一个证据来自对细菌 *Wolinella succinogenes* 和 *Campylobacter fetus* 的研究结果,即该酶使这两种菌能够以氧化亚氮作为唯一电子受体进行生长<sup>[23-24]</sup>。对广泛分布的 *Anaeromyxobacter* spp. 进行研究也证明了 *nosZ* II 编码的酶具有还原  $N_2O$  为  $N_2$  的生理功能。*Anaeromyxobacter dehalogenans* 中的 *nosZ* 与反硝化菌 *Bradyrhizobium japonicum* 中的典型的 I 型 *nosZ* 的氨基酸相似度仅有 33%,但生长实验表明以氧化亚氮作为唯一电子受体时, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 可将  $N_2O$  还原并进行生长,证实了其 *nosZ* II 基因能够编码有功能的氧化亚氮还原酶。与传统的反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* DCP-Ps1 菌株相比, *A. dehalogenans* 2CP-C 菌株在以  $N_2O$  为电子受体,以醋酸盐为电子供体时的细胞产量是 *Pseudomonas stutzeri* DCP-Ps1 菌株的 1.5 倍,预示着 *Anaeromyxobacter* 菌的 *nosZ* 编码酶与产能过程相关,并且可能比完全反硝化菌的呼吸产能过程的效率更高<sup>[21]</sup>。Yoon 等<sup>[25]</sup>通过几株含有 *nosZ* I 或 *nosZ* II 的菌株在  $N_2O$  下的生长状况,来比较两类 *nosZ* 携带菌的生理差异。实验结果发现通过生长曲线不能区分两类微生物,但它们的生长得率却具有明显的差异。另外对于  $N_2O$  的半饱和常数  $K_s$  也可以明显的区分两类微生物, *nosZ* II 微生物的  $K_s$  要明显低于 *nosZ* I 的  $K_s$ , 作者认为这可以解释为 *nosZ* II 微生物对  $N_2O$  更强的还原能力,含有更多 *nosZ* II 携带微生物的土壤控制  $N_2O$  排放的作用可能更为突出。

### 4 非典型 *nosZ* 基因的生态学

由于 *nosZ* I 与 *nosZ* II 序列的一致性小于 60%,

表 1 *nosZ* I 携带菌和 *nosZ* II 携带菌的主要类型  
Table 1 Phylogeny of *nosZ* I and *nosZ* II carrying bacteria

<i>nosZ</i> I 携带菌 <i>nosZ</i> I carrying bacteria	<i>nosZ</i> II 携带菌 <i>nosZ</i> II carrying bacteria
Alpha-proteobacteria	Alpha-proteobacteria
Beta-proteobacteria	Beta-proteobacteria
Gamma-proteobacteria	Gamma-proteobacteria
Archaea	Archaea
	Delta-proteobacteria;
	Epsilon-proteobacteria;
	Bacteroidetes; Chloroflexi;
	Firmicutes; Verrucomicrobia;
	Aquificae; Gemmatimonadetes;
	Spirochaetes;
	Deferribacteres

常用于检测 *nosZ* I 的引物不能有效扩增 *nosZ* II 基因, 因此, 过去对环境样品的 *nosZ* 基因的研究可能都低估了它的真实丰度与多样性。Jones 等针对 *nosZ* II 基因序列的保守区域设计了特异性引物, 实验证实该引物对可以特异性扩增土壤样品中的 *nosZ* II 序列片段。对 21 个环境样品的两类 *nosZ* 进行的定量检测, 表明 *nosZ* II 的相对丰度与 *nosZ* I 相当甚至更高, 并且两者的比例都随土壤环境类型的不同而变化很大, 如在耕地土壤, 比值大于 1, 在葡萄园土壤中 *nosZ* II 基因拷贝是 *nosZ* I 的 7 倍。相比堆肥、阿尔卑斯山土壤、水稻田土壤中该比值一般很低(一般<1)<sup>[22]</sup>。Orellana 等<sup>[26]</sup>对美国中部玉米种植带的砂土和砂粘土样品进行元基因组测序, 分析两类 *nosZ* 基因的丰度和多样性, 发现样品中超过 70% 的 *nosZ* 基因属于 *nosZ* II, 所有 *nosZ* 序列中大概 15% 在分类学上属于 *Anaeromyxobacter*。进一步对数据库中其它多个样品土壤元基因组数据进行分析, 发现 *nosZ* II 在环境中分布十分广泛并具有较高的丰度, 除了北方针叶林群落, 许多包括热带森林、热带沙漠、北极苔原和温带草原群落, *nosZ* II 序列的丰度均高于 *nosZ* I。Jones 等<sup>[27]</sup>通过对欧洲 47 处土壤的调查, 利用典型和非典型 *nosZ* 基因特异性引物对样品中目的基因进行扩增并进行焦磷酸测序, 结果也表明了 *nosZ* II 基因在环境中的丰富多样性, 并且 *nosZ* 群体的丰度和系统发育多样性与土壤转化  $N_2O$  能力显著相关, 特别是 *nosZ* II 的丰度和类型是土壤  $N_2O$  转化能力的关键。对废水反硝化反应器的菌群结构以及用 SIP 法测定的反硝化功能菌群的研究显示, 除了常见的反硝化细菌外, *Dechloromonas*、*Bacillus* 等属细菌在反硝化菌群中经常是优势细菌<sup>[28]</sup>, 这提示它们携带的 *nosZ* II 可能在反应器运行条件下发挥着重要的功能。这些研究表明, 在众多环境中 *nosZ* II 的丰度高于 *nosZ* I, 可能在氮转化过程中发挥更重要的作用。

研究者也发现两类 *nosZ* 具有明显的生态位分化(Niche differentiation), 如 Graf 在研究土壤类型和种植植物对土壤  $N_2O$  产生和还原相关基因影响时

发现, 在根相关菌群(Root-associated communities)中 *nosZ* I 的相对丰度要显著高于 *nosZ* II, 而在土壤样品菌群中 *nosZ* II 却具有更高的丰度<sup>[29]</sup>。也有研究者发现两类 *nosZ* 基因与不同的土壤因素相关, 在盐沼生态系统中, *nosZ* I 的丰度与土壤化学性质相关(如钠、SOM、硫酸盐、总氮、硝酸盐等), 而 *nosZ* II 的丰度与土壤物理性质相关(如沙、泥、粘土等), 并且两类 *nosZ* 的丰度都具有明显的季节差异性也暗示着它们具有生态位的分化。但是目前, 在土壤中各环境因子如何影响两类 *nosZ* 的分布还没有清晰的、统一的定论, 在不同的研究中甚至相互矛盾的结论<sup>[30-31]</sup>, 还需进一步深入研究。

在农田土壤、废水处理系统等高氮输入的生态系统中, 减少  $N_2O$  排放已经成为气候变化研究的热点。针对  $N_2O$  减排的任何管理策略, *nosZ* 都处于中心地位。但目前 *nosZ* 基因的研究主要集中于 *nosZ* I 基因及其宿主, 最近关于 *nosZ* II 多样性及其可能功能的报道, 已引起了高度的关注, 但是迄今对 *nosZ* II 基因功能的直接研究非常有限。研究主要集中在基于元基因组学的序列对不同生态环境样品中的 *nosZ* 基因的丰度和多样性进行简单的横向比较, 以及对两类 *nosZ* 基因与各类环境因子等的相关性研究, 难以对两类 *nosZ* 基因在  $N_2O$  转化中的作用与地位给出令人信服的结论。因为诸如 pH、碳氮源类型等都会对各类 *nosZ* 基因的表达与酶活性造成影响, 而不同环境中不仅生态条件差异显著, 菌群组成也千差万别, 这种多因素的作用结果, 不能简单地归因于菌群基因组成。所以, 如果在实验室环境因素可控条件下, 通过改变少数条件来研究菌群结构基因组成与功能的变化, 或许可以获得更可靠的结论。另外, 也有对于 *Wolinella succinogenes*、*Campylobacter fetus* 和 *Anaeromyxobacter* spp. 等少数几个菌株的 *nosZ* II 的酶学研究, 包括酶的催化能力和最适酶活条件等<sup>[24,32-33]</sup>, 这些研究也远不能说明 *nosZ* II 基因的生态意义。宿主的遗传多样性导致的生理差异, 难以对不同的 *nosZ* 基因的生态作用进行直接比较。如果可以在具有相似或相同的遗

传背景的细菌中比较两类 *nosZ* 基因的功能将更有说服力。

综上所述,近年来的研究表明 *nosZ* II 基因可能具有重要的生态学意义,但是对携带 *nosZ* II 基因的细菌菌株的生理学研究非常有限,生态学研究也完全只基于元基因组学的序列测定及相关性分析,还缺乏生理生态学的直接证据的支持。*nosZ* II 基因在环境氮转化中的地位还未被广泛认可,还需要对两类 *nosZ* 基因的生理生态学作用进行更多研究,以增加对  $\text{N}_2\text{O}$  还原微生物的多样性与功能关系的理解,拓展 *nosZ* II 基因在生物地化循环中生态意义的认识。

## 参 考 文 献

- [1] Montzka SA, Dlugokencky EJ, Butler JH. Non- $\text{CO}_2$  greenhouse gases and climate change[J]. *Nature*, 2011, 476(7358): 43-50
- [2] Lashof DA, Ahuja DR. Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming[J]. *Nature*, 1990, 344(6266): 529-531
- [3] Bouwman AF, van der Hoek KM, Olivier JGJ. Uncertainties in the global source distribution of nitrous oxide[J]. *Journal of Geophysical Research*, 1995, 100(D2): 2785-2800
- [4] Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(12/13): 1723-1732
- [5] Zou JW, Lu YY, Huang Y. Estimates of synthetic fertilizer N-induced direct nitrous oxide emission from Chinese croplands during 1980-2000[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(2): 631-635.
- [6] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 533-616
- [7] Tian H, Yang LQ, Cao WC, et al. Comparison of microbial communities and denitrifying gases emissions between the soils from a greenhouse and nearby farmland[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(5): 835-844 (in Chinese)  
田浩, 杨柳青, 曹文超, 等. 设施菜田与棚外粮田土壤菌群和反硝化气体产生的比较分析[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 835-844
- [8] Richardson D, Felgate H, Watmough N, et al. Mitigating release of the potent greenhouse gas  $\text{N}_2\text{O}$  from the nitrogen cycle-could enzymic regulation hold the key?[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(7): 388-397
- [9] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 283-290
- [10] Kirchman DL, Cottrell MT, Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1132-1143
- [11] Yang LQ, Zhang XJ, Ju XT. Linkage between  $\text{N}_2\text{O}$  emission and functional gene abundance in an intensively managed calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Scientific Report*, 2017, 7: 43283
- [12] Philippot L, Andert J, Jones CM, et al. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from soil[J]. *Global Change Biology*, 2011, 17(3): 1497-1504
- [13] Chapuis - Lardy L, Wrage N, Metay A, et al. Soils, a sink for  $\text{N}_2\text{O}$ ? A review[J]. *Global Change Biology*, 2007, 13(1): 1-17
- [14] Iwasaki H, Matsubara T. A nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*[J]. *Journal of Biochemistry*, 1972, 71(4): 645-652
- [15] Zumft WG, Matsubara T. A novel kind of multi - copper protein as terminal oxidoreductase of nitrous oxide respiration in *Pseudomonas perfectomarinus*[J]. *Febs Letters*, 1982, 148(1): 107-112
- [16] Charnock J, Dreusch AH, Körner H, et al. Structural investigations of the  $\text{Cu}_A$  centre of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri* by site-directed mutagenesis and X-ray absorption spectroscopy[J]. *The FEBS Journal*, 2000, 267(5): 1368-1381
- [17] Frunzke K, Zumft WG. Inhibition of nitrous-oxide respiration by nitric oxide in the denitrifying bacterium *Pseudomonas perfectomarina*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1986, 852(1): 119-125
- [18] Zumft WG, Körner H. Nitrous oxide reductases[M]//Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE. *Biology of the Nitrogen Cycle*. Amsterdam: Elsevier, 2007: 67-81
- [19] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(7): 2155-2164
- [20] 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
- [21] Sanford RA, Wagner DD, Wu QZ, et al. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(48): 19709-19714
- [22] Jones CM, Graf DRH, Bru D, et al. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(2): 417-426
- [23] Payne WJ, Grant MA, Shapleigh J, et al. Nitrogen oxide reduction in *Wolinella succinogenes* and *Campylobacter* species[J]. *Journal of Bacteriology*, 1982, 152(2): 915-918
- [24] Simon J, Einsle O, Kroneck PMH, et al. The unprecedented *nos* gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome *c* nitrous oxide reductase[J]. *FEBS Letters*, 2004, 569(1/3): 7-12
- [25] Yoon S, Nissen S, Park D, et al. Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I *NosZ* from those harboring clade II *NosZ*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3793-3800
- [26] Orellana LH, Rodriguez-R LM, Higgins S, et al. Detecting nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in soil metagenomes: method development and implications for the nitrogen cycle[J]. *mBio*,

- 2014, 5(3): e01193-14
- [27] Jones CM, Spor A, Brennan FP, et al. Recently identified microbial guild mediates soil N<sub>2</sub>O sink capacity[J]. *Nature Climate Change*, 2014, 4(9): 801-805
- [28] McIlroy SJ, Starnawska A, Starnawski P, et al. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(1): 50-64
- [29] Graf DRH, Zhao M, Jones CM, et al. Soil type overrides plant effect on genetic and enzymatic N<sub>2</sub>O production potential in arable soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 100: 125-128
- [30] Dini-Andreote F, de L.Brossi MJ, van Elsas JD, et al. Reconstructing the genetic potential of the Microbially-mediated nitrogen cycle in salt marsh ecosystem[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 902
- [31] Domeignoz-Horta LA, Spor A, Bru D, et al. The diversity of the N<sub>2</sub>O reducers matters for the N<sub>2</sub>O:N<sub>2</sub> denitrification end-product ratio across an annual and a perennial cropping system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 971
- [32] Teraguchi S, Hollocher TC. Purification and some characteristics of a cytochrome c-containing nitrous oxide reductase from *Wolinella succinogenes*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(4): 1972-1979
- [33] Liu XQ, Gao CX, Zhang AX, et al. The *nos* gene cluster from gram-positive bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 and functional characterization of the recombinant *nosZ*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 289(1): 46-52

~~~~~

(上接 p.1588)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>