

环境中的反硝化微生物种群结构和功能研究进展*

王 莹^{1,2} 胡春胜^{1**}

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心 石家庄 050021; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 反硝化作用是生态系统氮循环的重要组成部分,与地下水硝酸盐累积和温室气体排放密切相关。种类繁多的细菌、真菌和古菌参与反硝化过程,并在调控反硝化速率和反硝化气体产物比例等方面发挥重要作用。反硝化微生物的种群结构是一系列环境影响因素长期作用的结果,反硝化微生物种群对温度、水分、pH、O₂含量、资源可利用性和植被类型等因素产生不同的响应。环境因素通过对反硝化微生物的影响来调控反硝化速率和反硝化酶的生成。分子技术的应用为自然环境中反硝化微生物的研究开辟了广阔前景,并为进一步认识反硝化微生物种群结构和功能的相互关系提供了新的发展方向。本文总结了关于环境中反硝化微生物种群的研究结果,并为进一步研究反硝化微生物种群结构和功能的联系提供了总体框架。

关键词 反硝化过程 反硝化微生物 微生物种群结构 功能基因 分子技术

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2010)06-1378-07

Research advances on community structure and function of denitrifiers

WANG Ying^{1,2}, HU Chun-Sheng¹

(1. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Denitrification is an important part of N-cycling in ecosystem, and is closely associated with nitrate accumulation in groundwater and greenhouse gas emission. Various bacteria, fungi and archaea involved in denitrification play important roles in controlling rate and N₂O : N₂ ratio of denitrification. Populations of denitrifiers are structured by long-term environmental factors. They respond to temperature, moisture, pH, O₂ content, nutrient availability and vegetation in different ways. Environmental factors indirectly control denitrification rate and enzyme production through affecting denitrifiers. The molecular technology application facilitates the study on denitrifiers in natural environments, and shows new directions for further understanding of correlation between denitrifier population structure and their function. This paper summarized research achievers in denitrifier population, and advanced a framework for future studies about connections between denitrifier population structure and function.

Key words Denitrification, Denitrifiers, Microbial population structure, Functional genes, Molecular technique

(Received April 1, 2010; accepted May 26, 2010)

反硝化作用是生态系统氮循环的重要组成部分。反硝化作用是指氮氧化物作为末端电子受体,通过反硝化微生物的作用将硝酸盐还原为N₂O和N₂的过程^[1]。反硝化作用广泛存在于全球各种环境介质中,例如土壤、沉积物、海水、淡水及地下水等。反硝化作用一方面减少了环境中的硝酸盐累积,另一方面其气体产物又是生态系统中氮流失的重要途径之一,其气体产物之一的N₂O是一种重要的温室气体,并且对臭氧层有破坏作用。由于反硝化作用

对环境的潜在重要性,对其作用机制及所涉及酶和微生物的研究越来越引起广泛重视,从而引发了大量新试验方法的开发和应用。

早期的科学家们研究了反硝化作用的影响因素,以便能够更好地理解这一过程,多数研究都集中在硝酸盐可利用性、O₂含量和pH等因素对反硝化速率的调控作用上^[2-5]。这些影响因子通过一系列的反硝化微生物种群发挥其调控作用,而反硝化微生物的种群结构能够反映这些调控因子综合作用结果。

* 国家科技支撑计划课题(2006BAD17B05, 2007BAD87B04-03)资助

** 通讯作者: 胡春胜(1965~), 男, 博士, 研究员, 长期从事农业生态学及其相关领域的研究。E-mail: cshu@sjziam.ac.cn

王莹(1982~), 女, 博士研究生, 研究方向为土壤微生物生态学。E-mail: sweetwy@hotmail.com

收稿日期: 2010-04-01 接受日期: 2010-05-26

早期的研究由于试验条件和方法的限制, 及反硝化基因的广泛分布, 导致人们忽视了反硝化微生物的种群组成和多样性对反硝化过程的重要调控作用。事实上, 反硝化基因的存在并不意味着反硝化基因在环境中的必然表达, 并且反硝化基因表达的产物并不一定具有同等的反硝化功能。因此, 进行反硝化微生物应对环境条件变化和胁迫的不同响应机制, 以及反硝化微生物种群结构和功能之间的相互关系对于认识反硝化过程及其影响因素具有十分重要的意义。

1 反硝化过程中的酶和基因

反硝化过程包含 4 个由酶催化的还原反应, 分别是硝酸盐还原、亚硝酸盐还原、NO 还原和 N₂O 还原^[6]。催化反硝化过程的各种酶由几种特定基因来编码, 这些基因被用来作为研究反硝化微生物种群组成的靶序列。硝酸盐的还原与 2 种类似的酶有关, 即膜结合硝酸盐还原酶(Nar)和周质硝酸盐还原酶(Nap)。由于这 2 种酶同时也存在于反硝化微生物种群之外的微生物中, 所以编码这 2 种酶的基因 *narG* 和 *napA* 在研究反硝化微生物多样性方面未得到广泛应用^[6-8]。催化亚硝酸盐还原的 2 种酶是分别由 *nirK* 和 *nirS* 编码的 Cu 型亚硝酸盐还原酶和细胞色素 cd1 型亚硝酸盐还原酶。*nirK* 和 *nirS* 是最早用于反硝化微生物多样性研究的基因, 由于它们涉及的亚硝酸盐还原反应是反硝化过程中第 1 个有气体产生的步骤, 故这 2 个基因随后也成为反硝化微生物种群研究中最普遍使用的分子标记物^[9]。一些研究聚焦在由 *norB* 编码的 NO 还原酶(Nor)上, 由于这种酶催化形成 N-N 双键, 因此其在反硝化过程中发挥特殊作用^[10]。编码 N₂O 还原酶(Nos)的 *nosZ* 在反硝化微生物种群研究中应用也相当广泛^[11], 可能是由于这种酶催化还原 N₂O 的同时生成 N₂, 而 N₂O 是一种重要的温室气体, 其反应产物 N₂ 是大气的主要组成部分。

2 反硝化微生物的多样性和分布

反硝化是一个兼性厌氧的微生物过程。许多不同种类的微生物都具有反硝化能力, 如热袍菌门、产金菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌属和变形菌门等^[12], 此外, 某些真菌^[13-14]和古菌^[15]也具有反硝化的能力。由于许多反硝化微生物不能单独产生反硝化过程所需的所有酶, 它们是通过共同作用来完成整个反应过程的^[12], 因此, 反硝化过程也可以看做是不同种类微生物共同作用的结果。

随着分子生物学及其技术的快速发展, 对反硝化微生物的研究不仅局限于经过分离培养的反硝化

微生物, 更有很多科学家已经把目光集中在未分离培养的微生物多样性研究上^[8,16-19]。由于反硝化细菌广泛的分类学多样性, 将通用的靶 rRNA 基因用于反硝化微生物的研究是不现实的。因此, 多数关于反硝化微生物的研究将编码反硝化过程中相关酶的功能基因作为研究对象。反硝化微生物种群的微生物学研究多集中在细菌方面, 这是由于细菌被认为是大部分环境中的优势反硝化微生物种群。近年来, 真菌对于反硝化过程的贡献被重新认识^[13,20], 一些证据表明在草地土壤的反硝化过程中, 真菌的作用比细菌更加重要^[20]。真菌基因组中的反硝化功能基因与细菌的反硝化功能基因有很大不同^[21], 还需对其做进一步研究。嗜极古菌的反硝化能力早已被认识, 但非嗜极古菌的反硝化能力目前还不为人所知。在一些喜盐古菌上发现了编码亚硝酸盐还原酶的 *nirK* 基因, 但这些基因序列与细菌有很大差别^[22-23]。因此, 还需要大量针对性的研究来解释古菌对反硝化过程的重要性。

3 应用于反硝化微生物研究的方法和技术

反硝化微生物并不是分类学上的特定种群, 而是一系列不同种属微生物的集合。目前, 大量的反硝化微生物是不可分离培养的, 多种分子生物学新方法的应用为反硝化微生物的分类鉴定、种群组成和多样性研究、功能基因的定量分析等提供了新的发展方向。

3.1 反硝化微生物种群结构和多样性研究

3.1.1 T-RFLP 技术

末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)是一种相对高效的技术, 这种技术将经过 PCR 扩增的基因片段用限制性内切酶进行酶切, 然后通过凝胶电泳分离后, 再使用 DNA 序列测定仪测定酶切片段的长度^[24-25]。T-RFLP 技术能够定量检测优势基因片段的相对数量, 从而确定种群中的优势微生物。如, 以不同季节土壤样品中的 *nirK* 作为分子标记物, 应用 T-RFLP 技术可分析反硝化微生物种群结构, 并通过 *nirK* 的相对数量确定其中的优势种群^[26]。T-RFLP 技术在比较种群差异方面是一种有效的方法, 但它不能提供关于微生物种类鉴定的相关信息。

3.1.2 PCR-DGGE 技术

变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是一种广泛应用的 DNA 指纹图谱技术^[19,27]。这种方法根据 DNA 片段长度和 GC 含量的将经过 PCR 扩增后的 DNA 片段进行分离, 在凝胶上形成一系列的条带, 每一个条带代表一个

特定的基因片段, 同时代表一种特定的微生物。DGGE 是分析反硝化微生物种群多样性的重要方法。通过对不同耕作处理土壤中的 *nirK* 和 *nirS* 的 DGGE 图谱进行分析后, 发现传统耕作土壤和免耕土壤中的反硝化微生物的多样性指数 *H* 没有显著差异^[28]。DGGE 技术在定量分析上不如 T-RFLP 技术, 但能够提取完整的基因片段并进行测序, 从而可能提供更加详细的反硝化微生物种群结构系统发生学鉴定的相关信息。如, DGGE 技术被用来分析不同施肥土壤中的反硝化微生物的组成和种群结构, 通过对 DGGE 凝胶上的 *nosZ* 基因片段进行切胶测序, 建立系统发育树, 确定 *nosZ* 的同源性^[29]。

3.1.3 其他分子生物学技术

除了以上 2 种最常用的分子生物学技术外, 荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH)、微阵列(Microarray)、基因文库构建和分析等技术, 也可用于研究反硝化微生物种群。

FISH 技术是一种细胞水平上的原位菌落测定技术, 可避免核酸提取和 PCR 扩增过程中产生的偏差。应用 FISH 技术测定活性污泥中反硝化微生物种群组成, 结果表明, β -proteobacteria 是脱氮活性污泥系统中数量最丰富的优势菌群^[30]。应用微阵列技术研究美国切萨皮克湾水系统中的 *nirS*, 结果表明, 在环境因素影响下, 反硝化微生物种群之间存在明显差异^[31]。基因序列文库技术能够提供更多物种间和混合种群中基因变化的特定信息。具体方法是将环境样品中混合种群的核酸进行 PCR 扩增, 克隆全部基因片段并测序, 建立基因序列文库; 从中随机选择克隆子进行测序和排列, 对某一特定样品中扩增后的基因片段进行统计; 通过对大量克隆子详细序列信息的采集, 能够评估每个变异基因的相对比例, 测定总基因多样性和特定种群组成。这种技术能够提供关于种群结构的更加详尽的描述, 但是比以上几种技术更加昂贵。

3.2 反硝化微生物种群的定量研究

特定基因片段的相对数量可以通过定量 PCR (Real-time PCR) 来测定^[32-34]。应用 Real-time PCR 技术进行 *nirS* 基因在不同环境样品中的定量研究, 结果表明, 湖泊沉积物和地下水 *nirS* 数量较多, 分别达到 2.2×10^6 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ (DNA) 和 1.1×10^{11} 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ (DNA), 而海洋沉积物中的 *nirS* 数量较少, 为 1.0×10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ (DNA)^[32]。Henry 等^[33]应用 real-time PCR 技术研究土壤样品中 *nirK* 基因的数量, 灵敏度达到 10^2 , 结果表明, 6 种理化性质不同的土壤样品中 *nirK* 的数量范围是 $9.7 \times 10^4 \sim 3.9 \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \text{g}^{-1}$ (土样)。这种技术可以对目标基因进行精确

定量, 但不能提供任何关于种群组成的信息。

3.3 反硝化功能基因的表达

3.3.1 通过 mRNA 检测反硝化功能基因的表达

DNA 中反硝化基因的存在只表明这种生物具有反硝化的能力, 而 mRNA 中反硝化基因的存在才能表明这种生物正在进行反硝化基因的表达, 并产生相应的酶。环境样品中 RNA 的提取和保存十分困难, 目前有些实验室已经能够克服这些困难并为进一步研究提供更多可能性^[34-37]。例如, Nogales 等^[38]研究了河口沉积物中 5 种反硝化基因的表达情况, 结果表明, 在 DNA 中能够检测到 5 种基因, 但在 mRNA 中只检测到 *nirS* 和 *nosZ*, 说明 *nirS* 和 *nosZ* 的活性得以表达, 而不能确定存在于反硝化微生物中的其他基因是否表达。由此可见, 尽管反硝化能力广泛存在于微生物中, 但只能在特定的条件下被诱发而表达。

3.3.2 反硝化酶的测定

反硝化酶能够催化反硝化作用的发生, 是反硝化微生物活性的直接反映, 因此反硝化酶动力学是反硝化微生物活性的重要检测手段。通过对不同类型土壤中反硝化酶活性(Denitrification enzyme activity, DEA)进行测定, 结果表明, 牧场土壤中反硝化酶活性显著高于森林土壤^[39]。应用酶动力学方法研究不同国家农田土壤中的 N_2O 还原酶, 其半饱和速率常数显著增加的结果表明反硝化微生物的优势种群发生了变化^[40]。Metz 等^[41]应用寡核苷酸探针 EUB338 和异化 Cu 型亚硝酸盐还原酶基因(*DnirK*)的特异性单克隆抗体共同标记环境样品中的反硝化微生物, 通过流式细胞仪和扫描电镜检测, 将样品中能够表达 *DnirK* 的反硝化微生物识别出来; 并应用人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)进行 N_2O 产生速率和 *DnirK* 基因表达关系的研究, 结果表明, 当 N_2O 的产生速率最高时, *DnirK* 的表达量也达到最高, 当环境条件从有氧变为缺氧时, N_2O 的产生速率降低, 但同时 *DnirK* 的表达量却没有减少, 说明由于 Cu 型亚硝酸盐还原酶的稳定性使得 *DnirK* 的表达与反硝化功能的实现不同步。

4 反硝化微生物在反硝化过程中的作用

微生物生态学面临的一个突出问题是不同结构组成的微生物种群在功能上是否也存在差异。有证据表明不同反硝化微生物种群有不同的反硝化速率, 生成不同比例的气体产物。Cheneby 等^[42]发现 2 种反硝化气体产物 N_2O 和 N_2 比例不同的土壤中, 反硝化微生物种群组成存在显著差异, 以 N_2O 为主要气体产物的土壤中, 能够将 NO_3^- 还原为 N_2O 的反硝化

微生物数量更多。Holtan-Hartwig 等^[40]发现 3 个不同采样地的 NO_3^- 和 N_2O 还原酶动力学存在本质不同, 且土壤中的反硝化微生物种群组成能够影响 N_2O 生成。对 2 种不同类型土壤中 4 种反硝化酶活性和气体产物中 N_2O 比例分析的结果表明, 农田土壤中硝酸盐还原酶(Nar)、亚硝酸盐还原酶(Nir)和 NO 还原酶(Nor)的数量比自然土壤中更多, 与此相对, 自然土壤中的反硝化微生物具有更高的 N_2O 还原酶活性, 而自然土壤反硝化气体产物中的 N_2O 比例更高^[43-44]。Rich 等^[18]也发现, 将森林土壤和牧场土壤进行比较, *nosZ* 反硝化微生物种群结构与反硝化酶的潜活性间有密切关系。但是也有研究表明, 到目前为止反硝化微生物种群结构和功能间的关系还不能被确定。如 Rich 等^[45]发现尽管农田、河岸及河床土壤中的 *nosZ* 基因图谱和 N_2O 还原酶活性都发生变化, 但是二者变化方式不同, 表明农业生态系统中反硝化微生物种群活性和种群组成是非耦合关系。在 Boyle 等^[39]关于反硝化微生物种群组成和活性的相互关系研究中, 尽管反硝化酶活性受试验影响而发生变化, 但 *nosZ* 基因图谱未发生变化, 表明反硝化酶的相对活性有时受反硝化微生物种群组成的影响, 但在有些情况下, 也会受环境因素的影响。

综上所述, 反硝化微生物对反硝化速率和反硝化动态过程有一定影响, 但具体的影响程度和机制以及反硝化微生物种群结构与反硝化酶活性、反硝化速率、反硝化气体产物 N_2O 和 N_2 的比例之间的相互关系, 还需进一步的研究来解释和证明。

5 反硝化微生物的影响因素

自然生态系统中许多环境因素都可能对反硝化微生物种群结构和多样性产生不同程度的影响。到目前为止, 自然环境中反硝化过程的研究多数集中在土壤、河口沉积物和海洋沉积物上。多种方法的综合应用为研究环境因素对反硝化微生物的影响以及反硝化微生物种群对环境变化的响应提供了有力工具。

5.1 土壤环境中反硝化微生物的影响因素

土壤中的反硝化微生物种群有很高的多样性, 且不同土壤环境中的反硝化微生物种群组成变化很大。土壤中的反硝化微生物种群结构受有机碳含量、 NO_3^- 含量、pH、含水量、温度、季节和土地利用方式等多种因素影响。另外, 由于科学家对试验技术和 PCR 引物选择的不同, 使得这些因素对反硝化微生物种群多样性和结构影响的研究结果有一定差别。

通过对土壤中含 *nirK* 基因的反硝化微生物进行 T-RFLP 分析, Bremer 等^[26]发现植物根系分泌物能够直接影响微生物的种群组成, 但反硝化微生物种群组成同时受季节等多种因素的影响, 说明反硝化微生物种群结构的形成是土壤理化性质(包括全氮含

量、有机碳含量和 pH 等)、根系生物量、植被类型等多种因素共同作用的结果。Cavigelli 等^[43]通过对农田土壤和自然土壤中反硝化微生物种群进行分析, 发现 O_2 含量对农田土壤中反硝化微生物种群的抑制作用更加明显, 而自然土壤中的反硝化微生物种群对 pH 变化更加敏感。Prieme 等^[17]应用 T-RFLP 技术比较了树木丛生的高地和沼泽湿地中 *nirK* 和 *nirS* 基因片段多样性, 其中一个突出发现是 2 种土壤中 *nirK* 基因序列很少有重叠, 他们还发现湿地土壤中 *nirK* 基因库具有更高的多样性, 说明土壤含水量对含有 *nirK* 的反硝化微生物种群多样性有影响。Mergel 等^[46]在不同季节分别对土壤剖面不同深度的反硝化微生物数量进行分析, 结果显示, 在表层 0~5 cm 土壤中, 反硝化微生物种群数量最多, 随着土壤深度的增加, 反硝化微生物种群数量逐渐减少; 同时, 他们还分析了季节变化对反硝化微生物的影响, 发现反硝化微生物种群在秋季、冬季和早春季节数量多, 而在夏季数量较少。近年来, 人为氮沉降在全球许多地区日益严重, 很可能给陆地生态系统和水生生态系统的平衡带来风险。氮沉降可能提高反硝化速率和反硝化气体产物中 N_2O 的比例, 有研究发现农田土壤中氮肥的施用导致反硝化微生物种群结构的变化。Wolsing 和 Prieme^[47]应用 T-RFLP 技术对土壤中 *nirK* 基因片段的微生物种群组成进行分析, 发现施肥处理土壤中的种群组成与对照土壤存在明显不同; 但是不能把这些差异归因于单一影响因素, 因为反硝化微生物种群对于氮含量增加的响应可能是氮含量增加(直接效应)和其他环境因素(间接效应)共同作用的结果。尽管 NO_3^- 被认为是反硝化速率的重要控制因素, 但 Mergel 等^[48]应用 DNA 杂交技术, 发现酸性森林土的土壤剖面中 NO_3^- 含量与反硝化微生物种群数量有很小的相关性, 表明反硝化微生物的数量和种群结构是由多种因素调控。Stres 等^[49]应用 RFLP 技术分别对农田土壤和自然未开垦土壤中 *nosZ* 的数量和多样性进行分析, 结果显示, 农田土壤中的 *nosZ* 表现出更高的多样性, 数量也比自然土壤中更多, 同时 2 种土壤中 *nosZ* 种群组成存在明显差异, 说明耕作导致反硝化微生物种群多样性增加。不同的基因受到环境因素的影响程度也不同, 与 *nirK* 和 *nirS* 相比, *nosZ* 在不同环境间的差异较小。Rich 等^[18]应用 T-RFLP 技术进行检测, 发现尽管 *nosZ* 的相对数量有差异, 但相邻的森林和牧场土壤中 *nosZ* 的种类大体相同, 但各自在一些特定环境下有不同的基因型。Rich 等^[45]也发现相邻的农田土壤、河岸土壤及河流沉积物中的 *nosZ* 大体相同。这些研究表明相对于其他反硝化过程中的基因, *nosZ* 的分布更具普遍性, 且环境因素的影响也较小。

5.2 海洋和河流沉积物中反硝化微生物的影响因素

各种影响因素对土壤和沉积物中反硝化微生物种群的相对重要性不同, 这是由于土壤中的微生物一般受碳含量的限制, 而沉积物的氮含量是更重要的限制资源。Liu 等^[50]应用 PCR-克隆方法研究了墨西哥湾 O₂缺乏区域沉积物中的 *nirS* 和 *nirK*, 随环境梯度变化检测到截然不同的反硝化微生物种群; 对特定基因型的反硝化微生物种群相对数量进行主成分分析(PCA), 发现 NO₃⁻ 和 O₂ 水平是反硝化微生物种群分布的主要影响因素。分别对大西洋和太平洋大陆架沉积物中 *nosZ* 基因序列的分析显示, 2 种沉积物中的 *nosZ* 存在明显差异, 这种差异可能是由环境因素影响所造成, 也可能是特定种群长期进化的结果, 目前尚无定论^[51]。

以上关于环境因素影响反硝化微生物种群的研究表明, 单一的环境因素能够对反硝化微生物种群产生不同程度的影响, 但反硝化微生物多样性和种群结构的形成往往是多种环境因素共同起作用的结果, 而且影响程度和影响机制还需大量试验研究来验证。

6 反硝化微生物研究展望

反硝化过程在全球生态系统氮循环中发挥着十分重要的作用, 反硝化作用能够减少陆地和水环境中的硝酸盐累积, 产生 N₂O, 也能够将一部分 N₂O 转化为 N₂, 因此, 反硝化过程中微生物的研究对于大气环境、水环境污染防治及土壤养分保持等方面具有重要价值。但是由于反硝化微生物具有种类繁多、分布广泛和多数难以分离培养的特性, 使得关于反硝化微生物种群结构、多样性、生理学特性及其影响因素等的研究存在一定困难。随着科学的发展和新技术的出现, 关于反硝化微生物种群的研究无论在广度上还是在深度上都将有很大扩展, 主要体现在以下几方面:

更加完善的反硝化功能基因库的建立能够促进反硝化微生物分子生物学研究进一步发展。通常做法是为从环境样品中提取的功能基因序列建立一个系统发育树, 目的是确定物种的起源, 然而, 公开的基因库中只有很少一部分功能基因片段是已知生物的。而目前的技术只能根据已知的序列来设计引物和探针, 故急需不依赖于引物、并且能够覆盖未知反硝化基因序列的新技术。有 2 种技术能够提高反硝化基因序列的数量和多样性, 一种是已培养微生物的基因组测序, 另一种是全部种群的宏基因组测序。越多的微生物基因组被测序, 对反硝化过程中基因的生理机能和调控机制了解就越多。然而多

数反硝化微生物很难被培养, 因此, 仅仅对基因组进行测序对于测定反硝化基因的多样性是不充分的。宏基因组学能够重建未培养生物的基因组^[52-54]。宏基因组学的通常方法是从混合种群提取的核酸中随机挑选基因片段进行测序, 再应用精密生物信息学工具整合为基因组。完整的反硝化基因组能够带来反硝化功能基因的全长序列, 进而为引物和探针的设计提供帮助, 同时对功能基因进行系统发育鉴定。

应用现有的技术, 需要大量的资源来测定单一样品中反硝化微生物种群的多样性。仅有可用的高生产量种群分析方法是指纹图谱技术, 例如 DGGE 和 T-RFLP, 但它们不能提供关于反硝化微生物种群和基因序列鉴定的具体信息。功能基因的微阵列技术能够同步检测并定量数以千计的基因及基因突变, 目前被用于分析海洋沉积物中的反硝化微生物种群结构^[34,55]。虽然微阵列技术有很好的发展前景, 但其应用面临着很多技术上的挑战, 如敏感性、连贯性和量化^[56]。在未来更加完善的功能基因库建立的基础上, 微阵列技术将成为相对廉价并高效的评估基因多样性、数量及表达的方法。

在微生物生态学的研究中, 人们越来越关注特定微生物种群与其功能方面的研究。反硝化过程十分复杂, 反硝化微生物种群活性及其代谢功能的准确测定存在一定难度。最近发展起来的稳定性同位素探测技术(Stable isotope probing, SIP)将稳定性同位素标记技术与分子生物学技术相结合, 为解决这一问题提供了新的途径。应用 SIP 技术标记反硝化微生物的 DNA, 提取^{[13]C}DNA 并进行 Full cycle rRNA 分析, 发现^{[13]C}克隆文库中的 16S rRNA 基因优势种群为丛毛单胞菌科和红环菌科的细菌, 并结合 FISH 技术研究发现, 反硝化速率与这些种群的数量密切相关^[57]。

新技术的发展和基因库的完善将持续推动反硝化微生物种群的研究。然而, 一些关于反硝化微生物种群组成和功能的关系及微生物种群组成在调控反硝化速率和过程方面的作用的具体问题还需进一步探讨:

(1)微生物种群的反硝化基因库中的哪些基因能够被表达? 哪些因素控制了它们的表达?

(2)如何确定反硝化微生物功能基因的特殊存在形式? 如何利用功能基因作为分子标记物对反硝化微生物种群结构和多样性进行准确测定?

(3)其他环境因素(如碳有效性、微量营养元素、pH 等)如何控制反硝化微生物种群结构和影响基因的表达? 环境胁迫(如湿润/干旱、结冰/融化等)如何影响反硝化微生物种群结构? 土壤食物网动力学如

何影响反硝化微生物种群?

(4) 反硝化微生物种群结构如何对环境变化产生响应?

这些问题可能需要通过田间观察、实验室控制试验和基于过程的模型三者相结合来解决。在田间试验中,由于许多环境因素是相互关联、共同起作用的,所以研究环境因素在反硝化微生物种群结构调控中的作用及其相互关系非常困难。实验室控制试验可在机制水平上更好地解释这些调控的原理。但是由于很难控制微生物种群,所以对微生物多样性或种群组成在调控反硝化速率中的作用进行解释十分困难。而基于过程的模型研究中,影响微生物种群结构的参数很多,而模拟结果与试验测定结果存在一定偏差。

分子生物学新方法和技术的出现,以及多种方法和技术的结合应用,为反硝化过程和反硝化微生物的研究开辟了新的领域。尽管过去反硝化微生物种群结构的作用曾经被忽视,但现在已经认识到它是反硝化速率和反硝化产物比例的一个重要影响因素。通过对一系列生态系统中反硝化微生物种群、反硝化速率和环境因素的同步研究,将确定在何种条件下微生物在反硝化过程中发挥更大的影响,并将进一步说明影响反硝化微生物种群的因素。

参考文献

- [1] Wallenstein M D, Myrold D D, Firestone M, et al. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16(6): 2143–2152
- [2] Firestone M K, Smith M S, Firestone R B, et al. The influence of nitrate, nitrite and oxygen on the composition of the gaseous products of denitrification in soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1979, 43(6): 1140–1144
- [3] Davidson E A, Swank W T. Environmental parameters regulating gaseous nitrogen losses from two forested ecosystems via nitrification and denitrification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(6): 1287–1292
- [4] Weier K L, Doran J W, Power J F, et al. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, 57(1): 66–72
- [5] Thomas K L, Lloyd D, Boddy L. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 118(1/2): 181–186
- [6] Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, et al. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6121–6128
- [7] Cheneby D, Hallet S, Mondon A, et al. Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis[J]. *Microbial Ecology*, 2003, 46(1): 113–121
- [8] Cheneby D, Perrez S, Devroe C, et al. Denitrifying bacteria in bulk and maize-rhizospheric soil: Diversity and N₂O-reducing abilities[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(7): 469–474
- [9] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3769–3775
- [10] Braker G, Tiedje J M. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3476–3483
- [11] Scala D J, Kerkhof L J. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162(1): 61–68
- [12] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 533–552
- [13] Shoun H, Kim D H, Uchiyama H, et al. Denitrification by fungi[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 94(3): 277–281
- [14] Tanimoto T, Hatano K, Kim D H, et al. Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 93(2): 177–180
- [15] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 2002, 1577(3): 355–376
- [16] Scala D J, Kerkhof L J. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 1980–1986
- [17] Prieme A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1893–1900
- [18] Rich J J, Heichen R S, Bottomley P J, et al. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5974–5982
- [19] Throbäck I N, 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
- [20] Laughlin R J, Stevens R J. Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2002, 66(5): 1540–1548
- [21] Zhang L, Takaya N, Kitazume T, et al. Purification and cDNA cloning of nitric oxide reductase cytochrome P450nor (CYP55A4) from *Trichosporon cutaneum*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(11): 3198–3204
- [22] Inatomi K, Hochstein L I. The purification and properties of a copper nitrite reductase from *Haloflexax denitrificans*[J]. *Current Microbiology*, 1996, 32(2): 72–76
- [23] Ichiki H, Tanaka Y, Mochizuki K, et al. Purification, characterization, and genetic analysis of Cu-containing dissimilatory nitrite reductase from a denitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(14): 4149–4156
- [24] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4516–4522

- [25] Blackwood C B, Marsh T, Kim S H, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 926–932
- [26] Bremer C, Braker G, Matthies D, et al. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier communities in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 6876–6884
- [27] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695–700
- [28] Smith J, Wagner-Riddle C, Dunfield K. Season and management related changes in the diversity of nitrifying and denitrifying bacteria over winter and spring[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(2): 138–146
- [29] Enwall K, Philippot L, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8335–8343
- [30] Lee H W, Lee S Y, Lee J W, et al. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41(2): 85–94
- [31] Taroncher-Oldenburg G, Griner E M, Francis C A, et al. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 1159–1171
- [32] Gruntzig V, Nold S C, Zhou J Z, et al. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 760–768
- [33] Henry S, Baudoin E, Lopez-Gutierrez J C, et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 59(3): 327–335
- [34] Borneman J, Triplett E W. Rapid and direct method for extraction of RNA from soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, 29(11/12): 1621–1624
- [35] Hurt R A, Qiu X Y, Wu L Y, et al. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4495–4503
- [36] Sessitsch A, Gyamfi S, Stralis-Pavese N, et al. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: Evaluation of different extraction and soil conservation protocols[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 51(2): 171–179
- [37] Burgmann H, Widmer F, Sigler W V, et al. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1928–1935
- [38] Nogales B, Timmis K N, Nedwell D B, et al. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5017–5025
- [39] Boyle S A, Rich J J, Bottomley P J, et al. Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of Oregon[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(5): 870–878
- [40] Holtan-Hartwig L, Dorsch P, Bakken L R. Comparison of denitrifying communities in organic soils: Kinetics of NO_3^- and N_2O reduction[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(6): 833–843
- [41] 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[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(1): 41–50
- [42] Cheneby D, Hartmann A, Henault C, et al. Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N_2O in two soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 28(1): 19–26
- [43] Cavigelli M A, Robertson G P. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem[J]. *Ecology*, 2000, 81(5): 1402–1414
- [44] Cavigelli M A, Robertson G P. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(3): 297–310
- [45] Rich J J, Myrold D D. Community composition and activities of denitrifying bacteria from adjacent agricultural soil, riparian soil, and creek sediment in Oregon, USA[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(9): 1431–1441
- [46] Mergel A, Kloos K, Bothe H. Seasonal fluctuations in the population of denitrifying and N_2 -fixing bacteria in an acid soil of a Norway spruce forest[J]. *Plant and Soil*, 2001, 230(1): 145–160
- [47] Wolsing M, Prieme A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48(2): 261–271
- [48] Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, et al. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36(1): 33–42
- [49] Stres B, Mahne I, Avgustin G, et al. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 301–309
- [50] Liu X D, Tiquia S M, Holguin G, et al. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3549–3560
- [51] Scala D J, Kerkhoff L J. Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1681–1687
- [52] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, et al. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2541–2547
- [53] Handelsman J, Liles M, Mann D, et al. Cloning the metagenome: Culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world[J]. *Functional Microbial Genomics*, 2002, 33: 241–255
- [54] Rodríguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture?[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 231(2): 153–158
- [55] Zhou J Z, Thompson D K. Challenges in applying microarrays to environmental studies[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(3): 204–207
- [56] Tiquia S M, Wu L Y, Chong S C, et al. Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples[J]. *Biotechniques*, 2004, 36(4): 664–670
- [57] Ginige M P, Keller J, Blackall L L. Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8683–8691