

海洋厌氧氨氧化细菌分子生态学研究进展

舒青龙^{1,2,3*} 焦念志² 汤坤贤²

(1. 江西中医学院基础医学院 江西 南昌 330004)

(2. 厦门大学环境科学中心 近海海洋环境国家重点实验室 福建 厦门 361005)

(3. 湘南学院化学与生命科学系 湖南 郴州 423000)

摘要: 厌氧氨氧化细菌是能在厌氧的条件下将氨氧化为氮气的一类细菌,这类细菌执行着以前未被人们所认知的一个独特的过程——厌氧氨氧化过程,据估计厌氧氨氧化过程对于海洋氮气的形成有 30%~50% 的贡献率;海洋厌氧氨氧化细菌能与氨氧化细菌及氨氧化古菌存在潜在的耦合作用,对于海洋氮循环复杂机制的阐述有着非常重要的意义;同时海洋厌氧氨氧化细菌独特的细胞和基因组结构,也成为了解海洋细菌进化重要的模式微生物之一。本文综述了近年来国内外厌氧氨氧化细菌分子生态学方面的进展,并结合作者的工作对未来的研究进行展望。

关键词: 厌氧氨氧化细菌, 海洋, 分子生态学

Progress of Molecular Ecological Research on Marine Anammox Bacteria

SHU Qing-Long^{1,2,3*} JIAO Nian-Zhi² TANG Kun-Xian²

(1. School of Basic Medicine Sciences, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

(2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

(3. Chemistry and Life Science department, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China)

Abstract: Anammox bacteria can perform anaerobic ammonium oxidation, a long missing process which contributes 30%~50% to dinitrogen gas in marine nitrogen cycling. The potential role of anammox bacteria coupling with ammonium oxidizing bacteria and archaea will benefit to elaborate the complex mechanism of marine nitrogen cycling. Furthermore, the unique cell and genomic characteristics make anammox bacteria an important model microorganism to explore the bacterial evolution. Here we reviewed the current status of molecular ecology of marine anammox bacteria and give a perspective into the future based on our understanding of the literature and our own work.

Keywords: Anammox bacteria, Marine, Molecular ecology

1 厌氧氨氧化细菌概述

厌氧氨氧化细菌(Anammox bacteria)的发现是继聚球藻、原绿球藻、好氧不产氧光合异养菌之后

海洋微型生物生态学研究的又一个重大发现,对于重新认识海洋氮循环有着非常重要的意义^[1]。

现在已知的厌氧氨氧化细菌都属于浮霉菌(*Planctomycetes*),为革兰氏阴性细菌,在电子显微

基金项目: 近海海洋国家重点实验室青年访问基金(厦门大学, No. 0904)

* 通讯作者: Tel: 86-791-7118921; ✉: shuqinglong@gmail.com

收稿日期: 2009-04-20; 接受日期: 2009-07-09

镜下显示为不规则的形态, 厌氧氨氧化细菌富聚物一般呈红色, 细胞色素含量高, 在 470 nm 处有一较强的吸收峰^[2]。厌氧氨氧化细菌有着非常独特的细胞结构和生理特征: 具“厌氧氨氧化体 (Anammoxosome)”这种特殊的“类细胞器” (Compartment)、核酸附着于厌氧氨氧化体上、分裂生长缓慢(7 d/代~14 d/代)、含有非常独特的环丁烷组成的梯形醚状脂质及与独特的羟胺氧化还原酶等^[2,3]。

厌氧氨氧化细菌最先是 Delft 的 Gist-Brocades 公司发现的, 为 *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”菌^[3], 随后德国和瑞士几个污水处理厂的生物膜反应器中相继发现了具有厌氧氨氧化的能力的 *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”菌、*Candidatus* “*Scalindua brodae*”, *Candidatus* “*Scalindua Wagneri*”等^[4,5]; 几乎与此同时, 在黑海的厌氧水柱中发现了海洋厌氧氨氧化细菌 *Candidatus* “*Scalindua sorokinii*”^[6,7]; 2007 年 Kartal 等在德国的 SBR (Sequence Batch Reactor, SBR) 反应器生态系统中发现另一厌氧氨氧化细菌的新菌株——*Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*”^[8]。厌氧氨氧化细菌包括 4 个属, 1 个海洋属, 3 个淡水属, 分别为 *Scalindua* 属(海洋属)、*Kuenenia* 属、*Brocadia* 属及 “*Anammoxoglobus propionicus*”属(后 3 个均为淡水属)^[2-4]。

厌氧氨氧化细菌具有与其他微生物不同的生理功能: 最为明显的特征是这类细菌能在厌氧的条件下将氨氧化为氮气($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 \uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$), 称为厌氧氨氧化过程 (Anammox processes), 在厌氧氨氧化过程中, 还伴随胨这一特殊的中间产物的产生^[2,3,8]; 基因组和脂质同位素的结果显示, 厌氧氨氧化细菌在进行厌氧氨氧化过程的同时还可以耦合 CO_2 的固定; 此外, 厌氧氨氧化细菌能合成自然界中非常独特的由四碳环丁烷组成的醚状脂质。同时, 厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 序列差异较大, 有时在 16S rRNA 上只有 85% 的同源性, 显示与其他细菌复杂的进化关系等^[9]。

2 海洋厌氧氨氧化细菌研究意义

随着其在海洋水体中的发现, 厌氧氨氧化细菌成为了海洋微生物学家关注的一个焦点。这是因为厌氧氨氧化细菌所执行的厌氧氨氧化过程, 是过去长期未被人们认知的一个重要生物地球化学循环过程, 打破了人们长期以来海洋氮循环的传统认识,

对于海洋环境具有重要的生态学意义。如反硝化和厌氧氨氧化可除去海洋中 67%~80% 的含氮化合物, 既能缓解水域富营养化, 也会引起初级生产的氮限制, 某些情况下还会加剧温室效应, 由反硝化和厌氧氨氧化所引起的氮损失对海洋氮收支有着重要的意义^[3,5]。据估计, 海洋厌氧氨氧化过程对于海洋氮循环中氮损失有 30%~50% 的贡献率, 或在 OMZs (Oxygen minimum zones) 中, 厌氧氨氧化过程的作用为 80 Tg N/yr~150 Tg N/yr^[4,5,10]。通过脂质 $\delta^{13}\text{C}$ 的分析表明, 能执行厌氧氨氧化过程的厌氧氨氧化细菌也许代表了微生物的一个古老的分支, 且这种细菌在过去的地质年代中可能对于原始大气的形成都起着非常重要的作用^[9]。最后, 作为海洋浮霉菌的一个成员, 在细菌进化及分类的研究上, 它也很具有代表性, 如形态上类似于其他的代表性的浮霉菌属 (如 *Pirellula*、*Planctomyces*、*Gemmata* 和 *Isosphaera*), 也具有“类细胞器”, 但在 16S rRNA 基因上又和它们相差甚远, 它们之间的进化关系也是非常有趣的研究领域。

可以预见, 随着厌氧氨氧化细菌的分子生态学的深入研究, 对于我们认知海洋厌氧氨氧化细菌的生理生态作用、了解海洋微生物之间的进化规律、海洋细菌与原始大气的形成、海洋细菌的适应策略和耦合机制都将产生积极的影响。

3 海洋厌氧氨氧化细菌研究方法

厌氧氨氧化细菌的研究中, 目前最常用的技术是 ^{15}N 示踪技术和分子生物学技术。 ^{15}N 示踪技术是研究海洋厌氧氨氧化过程的最为直接的技术之一, 已经广泛应用于海洋沉积物样、水柱等多种海洋环境中。同时, 由于分子生物学技术可以直接分析环境样品、不需纯化培养、灵敏度高、简便快捷等特点, 且可以利用现有的大量的数据进行对照, 因而成为海洋厌氧氨氧化细菌生态学研究不可缺少的工具之一。现在主要应用于厌氧氨氧化细菌检测的主要分子生物学技术有: 16S rRNA-PCR、16S rRNA-PCR-DGGE、16S rRNA-Real time-PCR、基于 16S rRNA 和 16S-23S rDNA 间隔子序列的 FISH 技术和类脂分析技术等, 这些分子生物学的方法为认识海洋厌氧氨氧化细菌的多样性、分布、进化及定量提供了的技术基础。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

4 海洋厌氧氨氧化细菌研究进展

从发现至今,厌氧氨氧化细菌研究手段有了较大的发展、研究的环境也多种多样,尤其是 *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”基因组的解码,更是将厌氧氨氧化细菌的研究推进至基因组和后基因组时代。目前厌氧氨氧化细菌的进展主要涉及细胞结构、功能基因组、醚状脂质、产 N_2 速率及影响因素、海洋环境的自然分布等。

4.1 模式厌氧氨氧化细菌研究进展

早期发现的菌株 *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”和 *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”是目前研究厌氧氨氧化细菌的模式菌株^[5],通过对这些模式菌株的研究,发展了一系列适合厌氧氨氧化细菌研究的方法并取得了很多新的认识。如2001年, Schmid等在 *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”和 *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”中发现一个以前被忽略了大约20 bp左右的一个插入子(起始于 *E. coli* 157位)。对于这个插入子,通过新设计的ISR探针可以进行原位监测不同氧气抑制的细胞中厌氧氨氧化细菌的活性变化;2002年, Damste等在厌氧氨氧化细菌的“厌氧氨氧化体”上发现了由环丁烷组成的醚状酯质,这种非常致密的醚状酯质是厌氧氨氧化细菌重要的保护机制之一,可以使其免受中间产物胨的伤害,由于它广泛存在于厌氧氨氧化的4个属中,醚状脂质也已经广泛的应用于厌氧氨氧化细菌的鉴别和定量中^[11];2007年 Tsushima等发现RDR(Rotating Disk Reactor)中的和 *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”具有16S rRNA基因92%同源性的厌氧氨氧化细菌,并应用Real time PCR技术进行了定量研究^[11]。通过对这些模式浮霉菌的研究,已经发展了如ITS探针、醚状脂质、Real time PCR技术等一系列适应于厌氧氨氧化细菌研究的技术手段。

厌氧氨氧化细菌 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”的基因组的完成,是浮霉菌门的基因组研究中最重要成果之一,其基因组序列发表在2006年《Nature》杂志上^[8]。方法学上,它是首度以环境样品(富含 $73\% \pm 5\%$ 的 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”细菌)而不是以纯系中得出单个细菌基因组序列,为基因组的研究提供了新的视角,这也是微生物基因组研究中的一个特例。基因组学上,解密

了厌氧氨氧化细菌独特的代谢过程和进化地位,包括:发现了厌氧氨氧化细菌固定 CO_2 的完整代谢途径(其他细菌对此过程推测的基因或缺失或不全);最为重要的是,发现了与中间产物胨相关酶基因的2个操纵子和与醚状脂质合成相关酶基因的3个操纵子,为诠释厌氧氨氧化细菌独特的生理功能和独特的醚状脂质提供了最为直接的分子证据。

此外,模式厌氧氨氧化细菌的蛋白质研究也取得了初步的进展,研究的较多的是HAO蛋白(Hydroxylamine oxidoreductase, HAO)和细胞色素C蛋白,已经有研究提纯和分离这些蛋白质,并对 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”细菌的细胞色素C基因进行了克隆表达研究^[13]。但厌氧氨氧化细菌的蛋白研究工作也存在很多困难,如溶解的细菌提取物常常会因为蛋白与蛋白或是蛋白与多糖之间形成聚合物而使得提取工作无法开展。

4.2 海洋环境厌氧氨氧化细菌的研究进展

基于 ^{15}N 技术的厌氧氨氧化过程的测定是重新评估海洋氮循环最重要的工作之一,也为认知典型海洋环境的厌氧氨氧化细菌的活力及分布提供了信息。如2002年Thamdrup等在2个典型的大陆坡的许多站位,发现厌氧氨氧化过程对氮损失有24%~67%的贡献率,有时甚至比反硝化的贡献率还高,且厌氧氨氧化的贡献率和站位的水深成正比^[14];2003年Dalsgaard等在Golfo Dulce的厌氧水柱中通过 ^{15}N 的示踪技术发现了厌氧氨氧化的存在,由厌氧氨氧化过程对于氮损失的贡献大约是19%~35%^[7];随后,Thamdrup等对南太平洋的东部热带海域的水柱研究发现:在一些硝化作用缺少时的海域,厌氧氨氧化作用对于氮损失是非常重要的一个过程^[14];此外,在北极的海洋环境(如海洋沉积物及海冰等)等也发现厌氧氨氧化过程参与了氮循环中氮气的生成^[15]。

随后的工作,则主要是针对能执行厌氧氨氧化的海洋细菌而展开的(表1)。如2003年Kuypers等在黑海(世界上最大的厌氧海区,特点为溶解营养盐较高),通过 ^{15}N 示踪技术、醚状脂质技术、FISH、16S rRNA基因技术等证实了厌氧氨氧化过程和厌氧氨氧化细菌的存在。随后Schubert等在坦桑尼亚的坦噶尼喀淡水湖(世界上第二大淡水湖)中发现厌氧氨氧化细菌的存在并获得了相关的序列(其16S rRNA序列与 *Candidatus* “*Scalindua brodae*”16S

rRNA 基因序列的同源性为 95.7%), 通过 FISH 计数知道厌氧氨氧化细菌的数量大约为 13000 cell/mL^[6]。同时近年来基于 16S rRNA 基因的调查数据则为认识厌氧氨氧化细菌的分布提供了大量的信息, 如 2006 年 Kirkpatrick 等对黑海中心漩涡的浮霉菌进行了 16S rRNA 多样性的研究, 获得了部分厌氧氨氧化细菌相关的序列^[16]; 2006 年 Penton 等通过新设计的引物 Brod541F 和 Brod1260R、An7F 和 An1388R 等分别在 11 个不同地理分布的淡水和沉积物中获得了厌氧氨氧化细菌的 16S rRNA 基因相关序列^[17]; 作者也以 pla-46F 和 1392R 为引物在南海 MD2896 站位 0.1 m 层的厌氧氨氧化细菌相关的 16S rRNA 基因序列^[18]。此外, 一些针对海洋总细菌的调查也常常提供厌氧氨氧化菌 16S rRNA 相关序列, 已经成

为厌氧氨氧化细菌进化树分析和同源性分析的最重要的参考序列之一; 如 1999 年 Li 等在 Izu-Bonin 海沟获得的 1 条厌氧氨氧化细菌沉积物中获得了相关的序列^[18]; 2003 年 Bowman 等在南极大陆架获得的 3 条厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因相关序列^[14]; 另外, Mills 等对东北太平洋的深海沉积物的脂质研究发现了厌氧氨氧化细菌独特的醚状脂质。现有的研究表明, 厌氧氨氧化细菌是一类存在于厌氧环境的细菌, 广泛存在于海洋的多种典型环境中, 如河口沉积物、上升流、海冰、热带淡水环境及海洋其他氧值最小区等^[6,15,18,20]。

根据 Kuypers 等人的估计, 厌氧氨氧化过程对于海洋氧值最小区氮损失的贡献大约是 30%~50%, 但这种估计也存在很大的争议^[21]。最近的研究表明

表 1 海洋厌氧氨氧化细菌分子生态学最近调查
Table 1 Recent investigations on molecular ecological research on marine anammox bacteria

地点 Sites	典型站位经纬度 Latitudes and longitudes of the typical sites	环境类别 Environment types	检测手段 Methods	相关 16S rRNA 基因序列 Anammox related 16S rRNA gene sequences
Izu-Bonin Trench	30°55'N, 141°49'E	Sediment	16S rRNA PCR	AB015552*
Black sea(站位 S7605 和 7620)	42°30.71'N, 30°14.69' E, 42°55.56'N, 30°03.65'E	Water column	FISH, ¹⁵ N lipid analysis	AY257181*
Golfo Dulce, Costa Rica (Station A 和 B)	8°34.15'N, 83°14.69'W, 8°37.99'N, 83°20.62'W	Water column	¹⁵ N	-
Antarctic Continental Shelf	66°31.86'S, 143°38.30'E	Sediment	16S rRNA PCR	AF424468, AF424477, AF424463
Inner harbor of Baltimore	39°16.8'N, 76°36.1'W	Sediment	DGGE, FISH, ¹⁵ N	AY250882*, AY266450*, AY360082*, AY266449*
Benguela current system (M182 和 M202)	13.8~14.1°W, 22~23°S	Upwelling	FISH, ¹⁵ N lipid analysis	-
Lake Tanganyika,	5°05'S, 29°31'E	Freshwater	FISH, ¹⁵ N Lipid analysis	DQ444400*
Wintergreen Lake,	42°23'56"N, 85°22'59"W	Freshwater	16S rRNA-PCR	DQ870142, DQ870154, DQ870144, DQ870143 DQ870090, DQ870115
Sheriff's Marsh	42°25'19"N, 85°30'58"W	Marsh	16S rRNA-PCR	DQ870093, DQ870098, DQ870114
Barrow Canyon sediment, Alaskan margin	-	Sediment	16S rRNA-PCR	DQ869384*, DQ869385*
East Hanna Shoal Chuckchi Sea 160	72°38'13"N, 158°40'01"W	Sediment	16S rRNA-PCR	DQ869865, DQ869899, DQ869893, DQ869896
Turning Basin	47°03'08"N, 122°54'27"W	Sediment	16S rRNA-PCR	DQ870047, DQ870078, DQ870077
Shallow Bud Inlet	47°04'59"N, 122°54'07"W	Sediment	16S rRNA-PCR	DQ870014
Juan de Fuca Ridge	46°47'00"N, 133°40_00"W	Sediment	16S rRNA-PCR	DQ869978
Florida Everglades Water Conservation Area site F1	26°21'59"N, 80°22'23"W	Sediment	16S rRNA-PCR	DQ870182, DQ870175, DQ870174, DQ870179
Florida Everglades Water Conservation Area site U3	26°17'24"N, 80°25'08"W	Sediment	16S rRNA-PCR	DQ869945, DQ869955, DQ869958
Marine recirculating aquaculture filtration system	-	Waste sludge	DGGE, FISH	DQ146408, DQ146409
Black Sea's central gyre	42°30.79' N, 30°59.60'E	Water column	16S rRNA PCR	DQ368204 ~ DQ368250
South China Sea	(8°49.54 'N, 111°26.28' E)	Sediment	16S rRNA PCR	DQ996944*, DQ996945*

注: *标记的序列号表示该序列长度大于 1200 bp.

Note: The sequences accession numbers marked with * means the sequences > 1200 bp.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

厌氧氨氧化细菌所执行的厌氧氨氧化过程,往往还和其他氨氧化微生物有关,越来越多的证明表明,氨氧化古菌和一些其他细菌如 *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidete* 和 *Alphaproteobacteria*, 很可能和厌氧氨氧化细菌一起在硝化-反硝化过程中发挥着重要的作用,一种可能的解释是,海洋氨氧化古菌可能为海洋厌氧氨氧化细菌的厌氧氨氧化过程提供 NO_2^- 的反应底物;其具体的机理尚有待于进一步的证据^[22]。

5 海洋厌氧氨氧化细菌研究面临的困难

虽然模式厌氧氨氧化细菌发展了许多适用于海洋环境厌氧氨氧化细菌的研究方法和手段,但依然面临许多研究的困难。最大的困难是很多能适用于其他海洋环境微生物的方法和手段(如 16S rRNA 基因技术和 FISH 技术)有时无法有效的检测和应用,主要的原因是: 1) 厌氧氨氧化细菌在海洋环境中生长慢、丰度低、极难分离培养; 2) 海洋环境的厌氧氨氧化细菌相关的基因序列过少,而其在基因组上又往往与已知的一些基因序列相差较大,导致理论设计和验证的困难。如曾成功用于 *Candidatus* “*Scalindua brodae*”检测且现在仍广泛被应用的 FISH 探针 S*-Amx-0368-a-A-18(CCTTTCGGGCATTGCGAA) 在 RDP 数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/>)进行比对时居然可以和较多古菌的序列完全匹配,由此所得到的丰度结果有待于进一步核实^[6];再如,根据作者实验的经验,在针对厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因扩增中,常常会扩增到非目的序列,使得检测海洋环境厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因的工作效率十分低^[17]。综合目前的海洋厌氧氨氧化细菌的研究进展,其丰度、多样性、进化、原位活性、分离培养等都是我们拟加强的分子生态学的若干方

向(见图 1),这些又急需我们找到更为有效和有针对性的技术手段。

6 海洋厌氧氨氧化细菌研究展望

在海洋氮循环过程中(主要包括生物固氮、氨化、硝化、反硝化及同化等),生物固氮、氨化、硝化及反硝化是微生物的特有过程。长期以来由硝化-反硝化细菌所引起的硝化反硝化被认为是海洋氮素损失的重要机制之一,而厌氧氨氧化过程的发现,赋予海洋氮循环新的环节,尤其是厌氧氨氧化细菌在海洋溶氧最小区和沉积物中普遍存在,有必要对海洋氮循环进行重新评估。然而,结合前人海洋厌氧氨氧化细菌的工作,个人认为以下方面是海洋厌氧氨氧化细菌今后研究的一些重点。

6.1 海洋厌氧氨氧化细菌的自然生态学研究的加强

虽然已经在多种海洋环境中证实了厌氧氨氧化细菌的存在,但现有的生态信息还是有限的,如深海占海洋总体积的 87%,是海洋氮循环最大的场所,海洋中 60% N_2 的生成来源于沉积物^[23],而对于深海沉积物的厌氧氨氧化细菌的生态调查则非常的有限,大大限制了我们对评估厌氧氨氧化过程在海洋氮循环中的贡献。由此,厌氧氨氧化细菌的大规模生态调查是我们真正了解海洋厌氧氨氧化生态作用的基础。

要大规模的调查厌氧氨氧化细菌的生态分布,除前面提到常规手段外,新技术和新策略的应用将提高研究厌氧氨氧化细菌的效率。如: 16S rRNA 技术结合功能基因[如以厌氧氨氧化细菌独特的 *HAO*、*SAM* 基因(S-adenosylmethionine radical enzyme gene)、细胞色素 C 基因作为生物标记]等纯分子生物学的手段将是一种新的尝试,它能十分简洁、

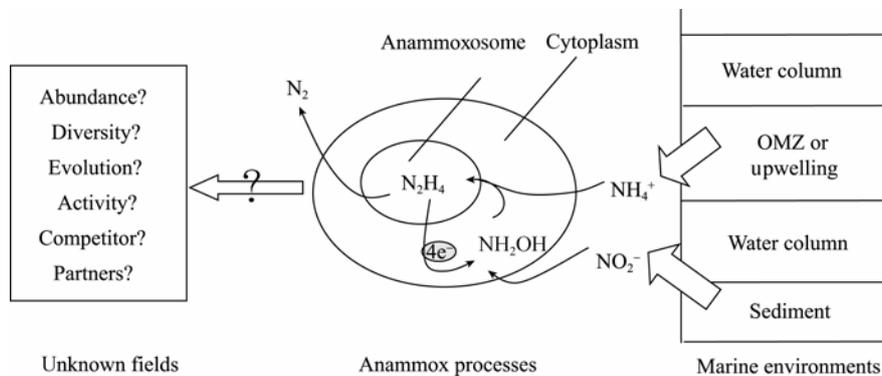


图 1 海洋厌氧氨氧化细菌拟加强的若干方向

Fig. 1 Some tropics on marine anammox bacteria should be emphasized in the future

快捷地对环境样品进行调查。作者对于南海沉积物样品做过这方面的尝试, 但未能成功, 原因是现在的数据库中只有一个淡水属 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”的基因组序列^[9], 而没有任何其他的海洋属的相关序列可以参考, 导致引物设计非常困难。再如自然环境中的丰度低已经成为厌氧氨氧化细菌研究的瓶颈, 传统的富集培养虽然是一个方法, 但常常无法模拟海洋自然环境的特点, 如果能将流式细胞仪的技术用于分选富集厌氧氨氧化细菌, 将是一个新的尝试。

6.2 海洋厌氧氨氧化细菌生理过程研究的深入

SBR 等反应器是我们认识厌氧氨氧化细菌的“摇篮”, 也是厌氧氨氧化细菌的许多技术的试验场^[10]。要充分利用 SBR 等特殊培养环境所提供的厌氧氨氧化细菌的富集物, 能进一步揭示 SBR 反应器中厌氧氨氧化细菌更为详细的生理过程、有针对性的发展更多的应用性更广的分子生物技术, 将能更深层次地揭示海洋厌氧氨氧化细菌的生态功能。*Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”基因组的解密, 使得厌氧氨氧化细菌在基因组及后基因组的水平上诠释成为了可能; 2007 年 Huston 等进行了 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”的细胞色素 C 基因的克隆表达的研究^[24], Shimamura 等也对厌氧氨氧化富聚物中的羟胺氧化还原酶进行了纯化^[25], 为我们认识厌氧氨氧化细菌特殊蛋白的生理功能及应用拉开了序幕, 但这种后续的工作还不够深入, 所揭示的信息还十分有限^[24]。这也使得厌氧氨氧化细菌相关的功能基因组、转录组、蛋白质组等诸多方面的工作成为今后研究的一个重点, 许多与厌氧氨氧化细菌相关的特殊生理功能的阐述也有待于这些工作的开展和深化。

6.3 海洋厌氧氨氧化细菌的进化地位的确定

对于厌氧氨氧化细菌的进化关系, 要回答 2 个问题: 首先是浮霉菌在细菌界中的进化地位问题; 其次是厌氧氨氧化细菌在浮霉菌门中的进化地位问题。现在浮霉菌的基因组的测序工作中, 已经完成包括 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”和 *Rhodopirellula baltica*、正在测序的 *Gemmata Obscuriglobus* 和 *Blastopirellula marina*, 这些基因组的数据提供了一定的基因进化及基因水平转移的信息。对于浮霉菌在细菌界的进化之树, 历来是微生物学家争论的焦点, 有 2 个观点, 一是认为浮霉菌

是在细菌进化树树根的祖先之一, 一是认为浮霉菌应该是替代 hyperthermophiles 的一个分支, 但进化很快。基因组比对显示: *Rhodopirellula baltica* 和古菌及真核细胞基因组的相似性都大大高于其他细菌的相关结果, 很明显支持第一种观点; 但 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”和其他浮霉菌基因组比对的结果却不支持这个观点^[26]。同时, 浮霉菌缺少肽聚糖而和真核细胞相似, 而 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”基因组的结果却显示其含有肽聚糖合成的基因, 由此使得浮霉菌的进化之树扑朔迷离。对于厌氧氨氧化细菌在浮霉菌的进化之树, 从 16S rRNA 或 5S-16S-23S rRNA 基因显示所有的厌氧氨氧化细菌都属于浮霉菌^[9], 这一点已经得到证实。但 *Candidatus* “*Kueneia stuttgartiensis*”基因组的数据显示: 和浮霉菌其他属(如 *Gammata* 和 *Pirellula*)相比, 只含较少的真核同源基因而含有较多的古菌基因, 显示厌氧氨氧化细菌基因转移的独特性; 甚至有学者认为厌氧氨氧化细菌应该是比 *Gammata* 和 *Pirellula* 更古老的分支^[26]。海洋是生命的摇篮, 地球上约 35 亿年前出现了所有生命祖先的微生物, 27 亿年前出现光合作用, 27~25 亿年前发现真核细胞膜的特征组分——甾醇^[27]。虽然我们尚无法推测厌氧氨氧化细菌具体的进化历程, 但可以想象厌氧氨氧化细菌在高 CO₂、高氨气、高甲烷、无氧的环境下将氨直接氧化为氮气的过程, 对大气演变贡献重大; 厌氧氨氧化细菌包括乙酰辅酶 A 途径所需的几乎完整基因, 而其他细菌此代谢过程的基因或缺失或不全^[8], 这是固碳作用进化的重要信息; 同时, 厌氧氨氧化细菌独特的“类细胞器”——厌氧氨氧化体(核酸附在其上面)^[2,3], 对于真核细胞及细胞核的起源进化也是非常好的研究材料。总之, 作为浮霉菌门中最有特点的模式微生物, 厌氧氨氧化细菌在进化和分类上的重要性不言而喻, 但需要更多深入和针对性的工作。

6.4 厌氧氨氧化细菌与其他氮循环相关微生物的相互作用

海洋占地球面积的 71%, 是各种元素生物地球化学循环最重要的场所之一, 氮循环是其中最重要的循环之一。在海洋氮循环中, 铵盐是海洋中氮元素存在的一种主要形式, 涉及氮氧化的细菌有厌氧氨氧化细菌、 β -变形菌纲氨氧化细菌、 γ -变形菌纲的氨氧化细菌及氮氧化古菌等, 但各种氨氧化微生物

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

氧化的机理、需要的条件也是各不一样,当这些微生物共同作用于同一环境的氨氧化时,它们之间的关系会是怎样,竞争还是协同^[28]?研究表明,很少在SBR这样一个人工生态系统中发现同时存在不同属的厌氧氨氧化细菌,在自然环境中是不是也如此^[5]?同时, Kuypers 等报道了厌氧氨氧化细菌在海洋环境中多样性偏低,那具体的原因又是什么呢^[28-30]?总之,氮循环中氨氧化微生物之间的耦合机制将是厌氧氨氧化未来研究有趣的领域之一。

6.5 海洋厌氧氨氧化细菌在污水处理的潜在应用
工业污水处理器中,厌氧氨氧化细菌所参与的新型脱氮技术——厌氧氨氧化工艺,已经有了初步的应用。相对于传统污水处理中的硝化-反硝化生物脱氮工艺,厌氧氨氧化过程具有无需外加碳源、产泥量省、不消耗氧气等优点,其潜在的工业利用价值不可估量^[31]。已经有厌氧氨氧化细菌在污水处理中的研究和初步应用的报道,但都是仅限于淡水属的厌氧氨氧化细菌,而作为海洋属的厌氧氨氧化细菌的应用尚未见报道。可以预见,随着海洋厌氧氨氧化细菌分离纯化及生理生化工作的深入,海洋厌氧氨氧化细菌也必将为成为参与污水处理器中厌氧氨氧化工艺过程的重要的新成员。

参 考 文 献

- [1] 焦念志. 海洋微型生物生态学. 北京: 科学出版社, 2006, pp.14-24.
- [2] Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, *et al.* The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev*, 1998, **22**(5): 421-437.
- [3] Damste JSS, Strous M, Rijpstra WIC, *et al.* Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, 2002, **419**(6908): 708-712.
- [4] Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microb*, 1999, **65**(7): 3248-3250.
- [5] Schmid M, Walsh K, Webb R, *et al.* *Candidatus* "Scalindua brodae", sp. nov., *Candidatus* "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 2003, **26**(4): 529-538.
- [6] Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 2003, **422**(6932): 608-611.
- [7] Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, *et al.* N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, 2003, **422**(6932): 606-608.
- [8] Kartal B, Rattray J, van Niftrik LA, *et al.* *Candidatus* "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 2007, **30**(1): 39-49.
- [9] Strous M, Pelletier E, Manganot S, *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, **440**(7085): 790-794.
- [10] Hamersley MR, Lavik G, Woeckel D, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr*, 2007, **52**(3): 923-933.
- [11] Damste JSS, Strous M, Rijpstra WIC, *et al.* Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, 2002, **419**(6908): 708-712.
- [12] Tsushima I, Kindaichi T, Okabe S. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Res*, 2007, **41**(4): 785-794.
- [13] Schmid MC, Hooper AB, Klotz MG, *et al.* Environmental detection of octahem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environ Microbiol*, 2008, **10**(11): 3140-3149.
- [14] Thamdrup B, Dalsgaard T, Jensen MM, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile. *Limnol Oceanogr*, 2006, **51**(5): 2145-2156.
- [15] Bowman JP, McCuaig RD. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microb*, 2003, **69**(5): 2463-2483.
- [16] Kirkpatrick J, Oakley B, Fuchsman C, *et al.* Diversity and distribution of *Planctomycetes* and related bacteria in the suboxic zone of the Black Sea. *Appl Environ Microb*, 2006, **72**(4): 3079-3083.
- [17] Penton CR, Devol AH, Tiedje JM. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl Environ Microb*, 2006, **72**(10): 6829-6832.
- [18] Shu QL, Jiao NZ. Profiling *Planctomycetales* diversity with reference to anammox-related bacteria in a South China Sea, deep-sea sediment. *Marine Ecology-an Evolutionary Perspective*, 2008, **29**(4): 413-420.
- [19] Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiver Conserv*, 1999, **8**: 659-677.
- [20] Schubert CJ, Durisch-Kaiser E, Wehrli B, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system(Lake Tanganyika). *Environ Microbiol*, 2006, **8**(10): 1857-1863.

- [21] Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 2005, **437**(15): 349–355.
- [22] Woebken D, Fuchs BA, Kuypers MAA, *et al.* Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. *Appl Environ Microb*, 2007, **73**(14): 4648–4657.
- [23] Tanaka T, Guo LD, Deal C, *et al.* N deficiency in a well-oxygenated cold bottom water over the Bering Sea shelf: Influence of sedimentary denitrification. *Continental Shelf Research*, 2004, **24**: 1271–1283.
- [24] Huston WM, Harhangi HR, Leech AP, *et al.* Expression and characterisation of a major c-type cytochrome encoded by gene *kustc0563* from *Kuenenia stuttgartiensis* as a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Express Purif*, 2007, **51**(1): 28–33.
- [25] Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, *et al.* Isolation of a multiheme protein with features of a hydra-zine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Appl Environ Microb*, 2007, **73**(4): 1065–1072.
- [26] Fuchsmann CA, Roca G. Whole-genome reciprocal BLAST analysis reveals that *Planctomycetes* do not share an unusually large number of genes with Eukarya and Archaea. *Appl Environ Microb*, 2006, **72**(10): 6841–6844.
- [27] 钱迈平. 地球早期生命环境的演化. *资源调查与环境*, 2003, **24**(1): 62–68.
- [28] Schmidt I, Sliekers O, Schmid M, *et al.* Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners? *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **39**(3): 175–181.
- [29] Schmid MC, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J, *et al.* Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Appl Environ Microb*, 2007, **9**(6): 1476–1484.
- [30] Woebken D, Lam P, Kuypers MAA, *et al.* A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ Microbiol*, 2008, **10**(11): 3106–3119.
- [31] Van de Graaf AA. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microb*, 1995, **6**: 1246–1251.

征订启事

2010年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月4日出版), 单价55.00元, 全年定价660元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月25日出版), 单价65.00元, 全年定价780元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月20日出版), 单价48.00元, 年价576元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月15日出版), 单价80元, 全年定价480元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUA E。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路1号院3号中科院微生物所B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>