



## 海洋氮循环过程及基于基因组代谢网络模型的预测

张日钊<sup>1,3#</sup>, 李斐然<sup>2#</sup>, 袁倩倩<sup>3</sup>, 马红武<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

<sup>2</sup>Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden SE-412 58

<sup>3</sup>中国科学院天津工业生物技术研究所, 中国科学院系统微生物技术重点实验室, 天津 300308

**摘要:** 海洋氮循环在地球元素循环中充当着必不可少的角色。海洋氮循环是由一系列氧化还原反应构成的生物化学过程。固氮作用和氮同化作用为生态系统提供了生物可用氮(铵盐)。硝化作用可进一步将铵盐氧化为硝酸盐, 硝酸盐又可以通过反硝化作用转化为氮气。整个氮循环实现了海洋中不同含氮无机盐间的转换。微生物是海洋氮循环的重要驱动者, 海洋氮循环的研究可以帮助理解海洋生物与地球环境相互作用及协同演化的机制, 从而更好地保护地球生态环境。随着氮循环关键微生物基因组尺度代谢网络模型的发表, 研究者可以利用代谢网络模型来研究不同氮循环过程的效率、环境因子对氮循环过程的影响以及解析氮循环及生物网络的内在机理等, 从而帮助人们更深入地研究海洋氮转化机制。本文主要综述了海洋氮循环过程中各个转化过程的主要微生物, 以及基因组尺度代谢网络模型在分析氮循环中的应用。

**关键词:** 固氮过程, 硝化过程, 反硝化过程, 厌氧氨氧化过程, 异化硝酸/亚硝酸还原过程, 海洋氮循环

氮是蛋白质、核酸等关键生命元件合成的重要元素, 是生物初级生产力的限制因素之一<sup>[1]</sup>。地球上存在不同形态的氮, 大气中的氮气作为分布广泛的重要氮库存, 仅有一部分固氮细菌和古菌才能利用<sup>[2]</sup>。尽管环境中存在例如铵盐和硝酸

盐这种生物可利用的氮, 但是这些性质活泼的氮形态与氮气相比含量很少。位于陆地上的可自由获取的氮总量人们还并不了解, 但是海洋中的存量估计有 340 至 3600 Tg<sup>[2]</sup>。为了更好地利用氮, 海洋微生物可将各种不同的含氮代谢物进行互相

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901401); 中国科学院国际合作项目(153D31KYSB20170121); 国家自然科学基金(21908239)

#共同第一作者。

\*通信作者。Tel/Fax: +86-22-24828735; E-mail: ma\_hw@tib.cas.cn

收稿日期: 2020-01-04; 修回日期: 2020-04-09; 网络出版日期: 2020-05-08

转化<sup>[3-4]</sup>。海洋氮循环中起到了关键调控作用的两个转化过程是固氮过程和反硝化过程。此外,还包括氨同化吸收过程、硝化过程、异化硝酸/亚硝酸还原过程和厌氧氨氧化过程(如图 1 所示),上述 6 个过程形成了海洋氮循环的主体。随着人类对地球影响的加大,大量使用氮肥和燃烧化石燃料导致了海洋生态系统中氮输入量增加了一倍<sup>[2]</sup>,引发了水体营养化(赤潮等)、藻类暴发和生物多样性丧失等对地球生态系统的负面影响。因此,我们需要对海洋微生物氮转化机制进行深入研究,通过生物工程的方法保护海洋氮循环的健康和平衡。

随着基因组分析技术的不断进步,氮循环关

键微生物的基因组数据越来越多,利用已发表的数据可以构建氮循环关键菌株的基因组尺度代谢网络模型,借助代谢网络中的计量学方法如代谢通量平衡分析(flux balance analysis, FBA)<sup>[5]</sup>来分析海洋氮循环网络,包括预测氮循环过程与菌株生长间的关系、解释环境因子在氮循环过程中的影响、解析氮循环及生物网络的内在机理<sup>[6]</sup>等,从而更深入地了解整个海洋氮循环过程。在这篇综述中,我们结合已发表的和本课题组构建的海洋氮循环关键微生物的代谢网络模型进行总结分析,介绍基因组尺度代谢网络模型在研究海洋氮循环中的应用。希望可以借助代谢网络模型这一分析工具,为研究海洋氮循环提供新的思路。

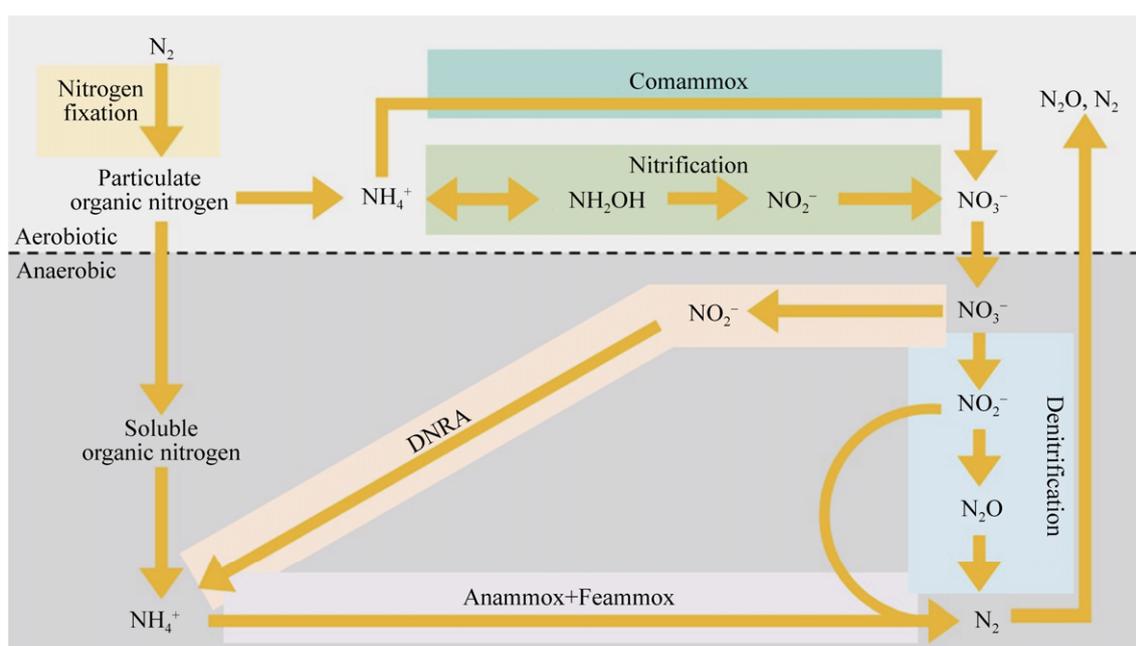


图 1. 氮循环主要过程

Figure 1. Main processes of the nitrogen cycle. The main microorganisms in the nitrogen fixing process: *Trichodesmium erythraeum*, UCNV-B (*Crocospaera watsonii*), etc.; the main microorganisms in the nitrification process: *Nitrosopumilus maritimus*, *Nitrosomonas europaea*, etc.; the main microorganisms in the denitrification process: *Rhodospseudomona sphaeroides*, *Pseudomonas stutzeri*, etc.; main microorganisms in the DRNA process: *Planctomycetales*, *Plantomycetales*; main microorganisms in the anammox process: *Candidatus Scalindua*, etc. Abbreviation: DRNA, dissimilatory nitrate reduction to ammonium.

## 1 固氮过程

海洋氮循环中固氮过程是必不可少的一环,它通过激活惰性的氮气,最终获得生物可利用的氮  $\text{NH}_4^+$ 。迄今为止,海洋生物年固氮量约为  $140 \text{ Tg N/yr}^{[7-8]}$ 。作为地球氮循环的第一步,通常只有具有金属固氮酶基因的细菌或古菌才具备固氮能力,它们在生物可利用氮缺乏时具有竞争优势。固氮菌主要有非异型丝状蓝细菌、异型丝状蓝细菌(可分为共生型,寄生型)以及单细胞蓝细菌三类<sup>[9]</sup>。

海洋固氮中最重要的微生物束毛藻 (*Trichodesmium* spp.), 是最具代表性的非异型丝状蓝细菌, 该种属含有扭束毛藻 (*T. contortum*)、纤束毛藻 (*T. tenue*)、铁氏束毛藻 (*T. thiebautii*)、红海束毛藻 (*T. erythraeum*)、汉氏束毛藻 (*T. hildebrandtii*)。由于其独特的生理生态特征,束毛藻一般均存在于寡营养盐环境的热带和亚热带海域水体,它可以借助水华迅速且大量地固氮,年固氮量在  $60\text{--}100 \text{ Tg}$  左右<sup>[7-10]</sup>。束毛藻一方面通过卡尔文循环吸收  $\text{CO}_2$  进行固碳,另一方面利用从光合作用获得的能量来固氮<sup>[11]</sup>。束毛藻固定的氮不仅会被用于合成生物质,其释放的代谢物还会供给其他生物。Glibert 等<sup>[12]</sup>推测束毛藻提供给其他生物的氮占其本身固定氮的  $30\%\text{--}50\%$ 。对于红海束毛藻 (*T. erythraeum*), 2017 年 Gardner 等<sup>[10]</sup>收集数据,构建出含有 971 个反应、986 个代谢物以及 647 个基因的基因组尺度代谢网络模型。通过模型模拟发现在最优生长速率条件下,该菌总固氮量中有  $29.4\%$  排放到环境中,这与文献报道的该菌每年释放其固氮的  $30\%\text{--}50\%$  这一实测数据接近<sup>[12]</sup>。

作为近年来才被发现和广泛研究的固氮菌,单细胞蓝细菌主要包括分布在大西洋与太平洋等海域的 UCNV-A 和 UCNV-B (*Crocospaera watsonii*)。单细胞蓝细菌在寡营养盐海域中数量为  $10^3\text{--}10^6$  个/L 海水。Martínez-Pérez 等发现热带北大西洋海域  $20\%$  的固氮量都来自于 UCNV-A 单细胞蓝细菌。这表明了 UCNV-A 单细胞蓝细菌对海洋氮循环有很大的影响<sup>[13]</sup>。2018 年,Harding 等<sup>[14]</sup>证明 UCNV-A 单细胞蓝细菌在寒冷高纬度水域中可以固氮,低温并不会影响其分布与活性。

异型丝状蓝细菌的主要种属包括项圈藻 (*Anabaena* spp.)、节球藻属 (*Nodularia* spp.) 和丝囊藻属 (*Aphanizomenon* spp.)。后两者在水华时异形胞可达  $10^4$  个/L 海水。异形丝状蓝细菌包含共生型和寄生型两类,例如和硅藻共生的胞内植生藻 (*Richelia intracellularis*)。在全球寡营养盐的热带和亚热带海域发生水华期间,这种共生体的异形胞为  $10^3$  到  $10^6$  个/L 海水,在许多海域中硅藻固氮共生菌的固氮能力仅次于束毛藻<sup>[15]</sup>。这种共生固氮菌可同时进行固碳和固氮,对“生物碳泵”过程和海洋氮循环都有十分重大的影响。

除上述三类主要固氮菌之外,海洋中还存在其他类型的固氮菌,如施氏假单胞菌,该菌既可以进行固氮作用又可以进行反硝化作用。为了对其进行系统的研究,Babaei 等<sup>[16]</sup>构建了此菌第一个基因组尺度代谢模型 iPB890。利用 iPB890 模型进行模拟,在微好氧缺  $\text{NH}_4^+$  条件下,施氏假单胞菌的固氮反应通量为  $1.64 \text{ mmol}/(\text{gDW}\cdot\text{h})$ ; 然而当  $\text{NH}_4^+$  供给充足时,固氮反应通量为  $1.11 \text{ mmol}/(\text{gDW}\cdot\text{h})$ 。该结果说明固氮酶的活性在  $\text{NH}_4^+$  充足下受到了抑制,Zhang 等<sup>[17]</sup>的实验结果证明了这一结论。除  $\text{NH}_4^+$  之外,环境中氧气浓度

也影响固氮效率, 模拟发现施氏假单胞菌在不同氧气浓度下固氮效率的变化, 发现从厌氧到微好氧环境下, 随着氧气吸收率的增加, 固氮反应通量也随之增加, 这一结果与上述的实验结果相符。产甲烷菌 *Methanococcus maripaludis* 也具有固氮的能力, Goyal 等<sup>[18]</sup>构建了此菌的基因组尺度代谢网络模型 iMM518, 利用该模型研究甲烷生成、固氮和其他代谢途径。他们利用 iMM518 模拟了氮对固氮酶操纵子的调控机制, 结果表明在富氮条件下会导致固氮酶表达活性增强, 结果与实验数据相近。

海洋中固氮微生物的固氮效率受到许多环境因子影响, 例如无机盐、CO<sub>2</sub>、氧气、温度、光照、盐度等。(1) 氮和磷这两种无机盐的浓度对于微生物的固氮速率会起到一定的影响。当环境中的氮磷比达到 Redfield 值时, 固氮菌的生长活性提高并且营养达到饱和。对于海洋生态系统中的固氮微生物, 氮的增加会限制微生物固氮效率, 而磷的增加会使得固氮效率提高。(2) 对于海洋蓝细菌来说, CO<sub>2</sub> 水平是蓝细菌固氮的主要限制因素之一。随着 CO<sub>2</sub> 水平的增长, 海洋蓝藻如 *Trichodesmium* 的固氮速率和生长速率随之上升。David 等<sup>[19]</sup>还发现长期生长在高 CO<sub>2</sub> 水平的环境中, 会不可逆地提高海洋蓝藻的固氮速率和生长速率, 适应了高 CO<sub>2</sub> 环境下的蓝细菌即使降低环境中的 CO<sub>2</sub> 水平, 菌株的固氮速率和生长速率仍会保持很高的水平。Levitan 等推测在光和养分(例如磷和铁)不受限制的环境条件下, 束毛藻细胞分裂速率会随着 CO<sub>2</sub> 浓度的增加而翻倍<sup>[20]</sup>。(3) 氧气。微耗氧环境下固氮菌株中的固氮酶表现出更高的活性。Yan 等<sup>[21]</sup>通过实验表明, 当环境中的氧气浓度从 0% 提到 1%, 固氮酶的活

性增加了大约 9 倍。(4) 固氮作用还受到温度、光照、盐度及微量金属的影响, 如海洋固氮蓝藻 *Calothrix* sp. strain (MCT1) 和 *Lyngbya* sp. strain (MCT6) 在 30 °C 时固氮活性远高于 20 °C, MCT1 在日间的固氮活性高于夜间, 而 MCT6 与之相反<sup>[22]</sup>。MCT1 的最适盐度范围为 10–48 g/L, 在盐度为 30 g/L 的环境下固氮活性最高; MCT6 对盐度变化敏感, 盐度的改变会引起固氮活性的大幅改变, 最适盐度为 24 g/L。这些影响因子并不是单独对固氮微生物产生影响, 不同环境因子间的协作会对固氮过程产生什么样的影响对于海洋生态系统来说十分重要, 所以不同环境影响因素间的互动机制是未来研究的方向之一。

综上, 微生物固氮作用在维持海洋氮平衡中起到了关键作用, 尤其对于寡营养盐的海域, 固氮微生物及固氮作用维持着海域中充足氮供给。借助模型我们可以模拟和研究这些环境因素的影响。当然有些环境因素仅基于代谢网络无法模拟, 如温度、pH 等, 需要在代谢模型中引入更高维度的约束, 如不同环境条件下的转录组数据, 这也是未来基于模型预测环境影响因素的新方向。除了海洋固氮菌以外, 另外一类与植物为共生关系的根瘤菌在环境中也能进行固氮过程, Resendis-Antonio 等构建了根瘤菌 *Rhizobium etli* 的第一个基因组尺度代谢网络模型 iOR363, 此模型中包含了固氮过程中的氧化磷酸化, 以提高固氮效率为目标进行基因敲除分析, 发现敲除 PHB 合成酶和糖原合成酶基因可以导致菌株固氮活性的增加。Zhao 等构建了根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 的第一个代谢网络模型, 通过模型预测共生固氮过程的必需基因, 预测结果表明在微需氧条件下有 112 个必需基因。借助这些非海洋固氮菌的模

型, 我们可以更进一步地了解固氮代谢途径的酶和基因, 对我们了解固氮途径和构建海洋固氮菌模型提供帮助<sup>[23-24]</sup>。

## 2 硝化过程

硝化过程包括两个阶段, 即  $\text{NH}_4^+$  转化为  $\text{NO}_2^-$  的氨氧化过程和  $\text{NO}_2^-$  转化为  $\text{NO}_3^-$  的亚硝酸盐氧化过程, 其中氨氧化过程经过一系列电子转移链释放电子最终生成能量, 这些能量用于固定  $\text{CO}_2$  形成生物质、维持细胞生长等重要的生命过程, 每年有 4620 Tg 的  $\text{NH}_4^+$  被氧化<sup>[25]</sup>。硝化过程可将有机物矿化得来的  $\text{NH}_4^+$  和反硝化过程相耦合<sup>[26]</sup>, 它是唯一能够实现  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  转换的途径, 改变了氮循环的形式, 对于海洋环境而言, 硝化菌可以对  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  等离子起到平衡作用。硝化菌的主要分类包括氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)和亚硝酸盐氧化菌(NO<sub>B</sub>)三类, 除了这三种类型以外还存在完全氨氧化菌(Comammox)。

作为自然界中最丰富的氨氧化生物, 海洋 AOA 主要包含的模式菌株有 *Nitrosopumilus maritimus*、*Cenarchaeum symbiosum* 以及新报道的 PS0、HCA1 与 *N. piranensis* 等<sup>[27-28]</sup>。与主要分布在近岸营养液浓度较高区域的 AOB 相比较, AOA 普遍分布在开阔大洋中, 此菌对铵有着极高的亲和性, 可以生长在铵浓度小于 10 nmol/L 的环境中, 在贫瘠的海洋环境中更具生长优势<sup>[29]</sup>。在过去的十几年中, 为了研究 AOA 中的氨氧化效率, 即每氧化一分子  $\text{NH}_4^+$  能够生成的 ATP, 人们提出了三种可能的氨氧化途径<sup>[30-34]</sup>。根据这三种推测的氨氧化途径可知氨氧化的理论氨氧化效率为 1.50–1.75 mol ATP/mol  $\text{NH}_4^+$ 。然而, 呼吸

链实际 ATP 生产效率往往小于理论值, 目前 AOA 实际的氨氧化效率尚未确定。为了进一步推测 AOA 的实际氨氧化效率, 本课题组构建了 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 菌株的基因组尺度代谢网络模型 NmrFL413<sup>[35]</sup>。首先, 利用 NmrFL413 模型计算生成 1 g 生物质所需要消耗的能量为 0.120 mol ATP/gDW, 然后查找文献数据, 计算每消耗 1 mol  $\text{NH}_4^+$  能生成的生物质为 0.698–1.20 gDW/mol  $\text{NH}_4^+$ , 由此可计算出氨氧化过程效率为 0.149–0.256 mol ATP/mol  $\text{NH}_4^+$ 。这一结果与氨氧化细菌的氨氧化效率 0.17 mol ATP/mol  $\text{NH}_4^+$  接近<sup>[35-36]</sup>, 比 AOA 理论氨氧化效率(1.50–1.75 mol ATP/mol  $\text{NH}_4^+$ ) 低近 10 倍, 该结果表明 SCM1 的产能效率较低。进一步利用 NmrFL413 模型模拟 AOA 固定 1 mol  $\text{CO}_2$  需要氧化 25 mol 的铵, 依此计算, 每年 AOA 若固定 160 Tg 的碳就需要氧化大约 4620 Tg 的铵, 这说明海洋 AOA 中产能能力限制了其固碳能力。Vuillemin 等<sup>[37]</sup>对整个北大西洋中的有氧海底沉积物进行研究, 发现为了提高产能效率, AOA 可将氨基酸(如谷氨酸)脱氨化, 然后用铵氧化提供的能量并直接吸收脱氨基所得的有机碳用于构建生物质和/或细胞维持过程, 这也说明了, 虽然 AOA 氨氧化效率低影响了其固碳效率, 但是该菌进化出了直接利用氨基酸中的氮和碳源能力, 尽管该菌的氨氧化效率较低, 但是也能够满足自身的需求, 并在整个氮循环中发挥作用。

海洋 AOB 包括亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)以及亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。海洋 AOB 可利用卡尔文循环的能量来固定  $\text{CO}_2$ 。另外 *Nitrosomonas eutropha* C91

和 *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 等可以将有机物作为电子供体、亚硝酸盐离子作为电子受体进行异养生长。Aggarwal 等构建了第一个氨氧化细菌 *Nitrosomonas europaea* 的基因组尺度代谢网络模型,其中包含了 651 个反应和 332 个基因,使用已报道的菌株生长和亚硝酸盐生产数据进行了验证。利用此模型在氨氧化速率受限、不限制碳输入条件下优化亚硝酸盐生成速率,结果表明丝氨酸作为碳源时,可以通过转化为丙酮酸和氨而代替氨作为氮源<sup>[38]</sup>。本课题组前期比较构建了氨氧化细菌 *Nitrosomonas eutropha* 和 *Nitrosomonas europaea* 的基因组尺度代谢网络模型(分别为 iFL684 和 iFL643 模型),并利用这两个模型模拟在有氧环境下限制  $\text{NH}_4^+$  时两株菌的生长情况,显示两模型都可准确地模拟厌氧异养生长<sup>[39]</sup>,这为之后的分析提供了更为方便的工具。

亚硝酸盐氧化菌(NO<sub>B</sub>)可以进一步将亚硝酸盐转化为硝酸盐,利用氧化亚硝酸盐获得的能量来固定  $\text{CO}_2$ <sup>[40]</sup>。NO<sub>B</sub> 主要包括硝化球菌属(*Nitrococcus*)和硝化刺菌属(*Nitrospina*)。二者差异主要体现于对底物亚硝酸的敏感性,硝化刺菌属对于亚硝酸敏感,在浓度超过 20 mmol/L 的亚硝酸环境下生长就会受到抑制,但是硝化球菌属在 60 mmol/L 亚硝酸浓度的环境下可正常生长。硝化球菌在好氧和厌氧条件下,可分别通过氧化亚硝酸盐获得能量而生长,可生存在海洋贫氧区中。硝化刺菌在海洋中广泛分布,存在于上表层至深层表层的贫营养水域和中营养地表水等环境中,是好氧化能自养细菌,具有微嗜氧性,和硝化球菌一样可生存在海洋贫氧区中<sup>[41-42]</sup>。

以前,研究者认为硝化过程只包括两个部分:AOA、AOB 完成的氨氧化过程以及 NO<sub>B</sub> 完成

的亚硝酸盐氧化过程。在 2015 年, Daim 等通过研究深油井<sup>[43]</sup>和水产养殖<sup>[44]</sup>发现了一种新的硝化过程,这种新过程与原来的氨氧化过程相比有着更高的产率和较低的生长速度,可以同时进行两个部分,它被称作完全氨氧化过程(comammox)。Daims 等发现在陆地和水生生态中最常见的完全氨氧化菌为硝化螺菌属(*Nitrospira*)<sup>[43-45]</sup>。Kits 等<sup>[46]</sup>的研究结果表明 Comammox 细菌中 *Nitrospira inopinata* 对于氨的亲合力高于 AOA。完全氨氧化过程的发现为人们提供了新的氮循环过程控制策略和管理硝化作用的新方法<sup>[47]</sup>。最新研究表明,Comammox 菌除了在农业土壤、污水和饮用水等环境中存在,也分布于淡水水域、河流沉积物和咸水湖沉积物中,但是对海洋宏基因组进行筛选并没有发现 Comammox 菌,这说明海洋中基本不存在 Comammox 菌,在海洋外的各种陆地水生环境中广泛分布<sup>[43]</sup>。

参与海洋硝化过程的 AOA、AOB、NO<sub>B</sub> 和 Comammox 这几种类微生物对于环境因子 pH 值、温度和溶解氧浓度等的影响会产生不同的响应。

(1) 温度。一般的 AOB 为中温菌,生活在 30 °C 左右的环境中,而 AOA 的菌株分布温度跨度极大,从 0.2 °C 的大洋深处到 97 °C 的高温区域都发现了 AOA 的存在。NO<sub>B</sub> 和 AOB 的适宜温度不同,在纯培养条件下,NO<sub>B</sub> 的最适温度有 38 °C。(2) pH。因为环境中 pH 值的减少会降低铵盐浓度,AOB 无法在低 pH 环境下生存,AOB 的最适 pH 值大于 8。在 6.0-8.5 的 pH 范围中,随着 pH 值的升高 AOB 的氨氧化速率也升高。但是,研究发现有一些 AOA 菌株可以生存在酸性环境下,正常进行生长代谢和氨氧化。NO<sub>B</sub> 与 AOB 类似,最适 pH 范围为 7.4-8.3。(3) 溶解氧。AOA 与 AOB 相

比对氧气有更强的亲和力, 所以即使在海洋贫氧区中也可以发现 AOA 的分布。当环境中氧气浓度降低时, AOA 的氨氧化活性增强而 AOB 的氨氧化活性下降。低氧气浓度对 NOB 的影响要强于 AOB, 当氧气浓度上升, NOB 和 AOB 两者的活性都会增强<sup>[48-49]</sup>。

对于 Comammox 来说, 作为新发现的硝化过程, 还没有足够的文献讨论环境因子对它的影响。余晨笛等的结果表明环境因子  $\text{NH}_4^+$  浓度对 Comammox 的影响较为显著, 发现 Comammox 菌具有较高的氨亲和力, 对氨的最小需求量也更低, 并且能够利用  $\text{NH}_4^+$  以外的物质。而其他环境因子对 Comammox 的影响还需要进一步的研究<sup>[50]</sup>。

作为海洋氮循环中重要的一环, 硝化微生物广泛分布于各个海域中, 一般的硝化过程可分为氨氧化和亚硝酸盐氧化两个过程, 对完全氨氧化过程的研究改变人们对海洋硝化过程的认知。不同环境因子对海洋硝化微生物的影响决定了它们的分布和硝化效率。为了更加方便地分析硝化途径, 别的研究者以及我们课题组构建了硝化菌的基因组尺度代谢网络模型, 通过模型分析我们可以加深对硝化代谢途径和调控机制的了解。

### 3 异化硝酸/亚硝酸还原过程(DNRA)

作为硝酸盐还原过程中的关键环节, 异化硝酸/亚硝酸还原过程(DNRA)可将  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  转化为  $\text{NH}_4^+$ 。海洋环境中进行此过程的菌株可分为化能异养和化能自养两类, 他们均具有收集电子受体的能力, 可以在胞内空泡中富集  $\text{NO}_3^-$ , 将  $\text{H}_2\text{S}$  等低价态代谢物作为电子供体, 通过氧化它们来还原  $\text{NO}_3^-$ , 经过氧化还原过程发挥 DNRA 功能<sup>[51]</sup>。

化能异养微生物主要为硝酸盐氨化细菌, 包括浮霉菌门(*Planctomycetales*)、厚壁菌门以及变形菌门下的多个纲; 化能自养微生物主要为硝酸盐铵化细菌, 包括辫硫菌属(*Thioploca*)和硫细菌贝扎托菌属(*Beggiatoa*)。一些厌氧氨氧化细菌也具有进行 DNRA 作用的能力, 但是它们只能在高  $\text{NH}_4^+$  浓度条件下才能执行 DNRA 过程, 而且发生的效率也很低<sup>[52-53]</sup>。

如今随着城市污水和工业污水的排放, 硝酸盐污染问题变得日益严重, 硝酸盐废水会引起水体富营养化, 破坏水体环境。可将硝酸盐转化为铵盐的 DNRA 过程在废水治理中起到了必不可少的作用<sup>[54]</sup>, 当在海洋和湖泊沉积物中电子供体数量较多时, DNRA 过程更优于反硝化过程。但是, 人们常低估 DNRA 过程的环境重要性。在调查研究了 55 个沿海位点后, Giblin 等发现其中近一半点位中通过 DNRA 过程在硝酸还原过程中占比超过 30%, 同时还发现 DNRA 过程在三分之一左右的取样位点中都充当还原硝酸的主要途径<sup>[55]</sup>。

DNRA 过程受到常见的环境影响因子如碳源、C/N、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  电子受体、pH、温度、盐度、硫化物和二价铁等的影响。(1) 碳源的氧化程度对 DNRA 菌的产铵效率产生影响, 氧化程度较弱的碳源(如丁二酸钠、无水乙酸钠)可促进 DNRA 菌的转化效果, 氧化程度较弱的碳源更适宜 DNRA 菌的生长<sup>[56]</sup>。(2) C/N。电子供体和电子受体之比是 DNRA 代谢途径的决定因素之一。于高 C/N 比环境下, DNRA 菌更适宜生长。(3)  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 。DNRA 菌对硝酸盐的亲和力高于亚硝酸盐, 所以当硝酸盐作为最终电子受体时, DNRA 过程强于反硝化过程<sup>[57]</sup>。(4) 温度、盐度和 pH。当处于

30 °C 的环境条件下, DNRA 过程的硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶活性较高<sup>[56]</sup>。在 DNRA 过程和反硝化过程的竞争中, DNRA 过程的活性和盐度成正比, 而反硝化过程活性与之相反。随着环境中 pH 的增高, DNRA 过程的活性会逐渐超过反硝化过程成为主导过程。(5) 硫化物和二价铁。硫化物和二价铁作为无机电子供体也能为 DNRA 过程提供能量, 对于 DNRA 过程来说, 硫化物和二价铁浓度的上升都可以提高 DNRA 的活性<sup>[54]</sup>。

DNRA 过程在硝酸盐废水治理方面被人们关注。与传统的利用反硝化过程和厌氧氨氧化过程治理硝酸盐废水相比, DNRA 过程可将硝酸盐转化为生物可利用的铵盐, 有益于维护海洋氮平衡。同时, 在有些水生生态系统中, 人们发现是由 DNRA 过程主导硝酸盐还原过程而不是反硝化过程, 可见此过程是海洋氮循环中不可或缺的一环。从环境因子对 DNRA 过程的影响上我们可以看出, 通过不同环境因子间的协作可以调整 DNRA 过程与反硝化过程的竞争关系。DNRA 至今的环境重要性往往被人们所低估, 与之相关的生理生化基因组信息的研究工作还较少。对于 DNRA 菌株很少有基因组尺度代谢网络模型构建相关工作发表出来, 所以对于 DNRA 在环境中的重要性以及其相关菌株的代谢网络模型有待更进一步研究。

## 4 反硝化过程

作为氮循环中将海洋中固定的氮元素返还到大气中的重要途径, 反硝化过程可将硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ )中的氮转化为 NO 与  $\text{N}_2\text{O}$  两种中间产物后最终还原为氮气( $\text{N}_2$ )。异养型反硝化菌是最主要的反硝化微生物, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢菌属

(*Bacillus*)是最普遍的反硝化菌, 另外还包括放线菌门、厚壁菌门、产水菌门(*Aquificae*)、异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)、变形菌门、拟杆菌门(*Bacteroides*)中的一些种类<sup>[51,58-59]</sup>。对于如今全球变暖的环境下, 人们推断随着海洋酸化, 海洋表层温度升高, 还有海岸富营养化等问题的加剧, 海洋释放的  $\text{N}_2\text{O}$  产量也会随之增多<sup>[60]</sup>。

海洋沉积物中和海洋贫氧区是反硝化过程最常见的区域, 这是因为几乎全部的异养反硝化菌都是兼性厌氧的<sup>[61]</sup>。对于海洋贫氧区中, 它的氮转化量推测为每年 90–150 Tg 左右, 25–50 Tg 是每年东热带北太平洋(ETNP)和南太平洋(ETSP)的反硝化氮转化量, 而在孟加拉湾贫氧区和西南非洲本吉拉海流这些区域中反硝化作用的氮转化量分别是每年 1.7 Tg 和 1.4 Tg<sup>[4,62-63]</sup>。早期由于数据不足, 人们对于反硝化作用在沉积物中的氮转化量推测在每年 100 到 400 Tg 之间<sup>[64-66]</sup>。随着可信的测量数据不断发表, 可以作出更准确的预测, 例如 Allen 等推测海洋沉积物中氮转化量至少约为每年 200 Tg, 接近 Gruber 等<sup>[67]</sup>按照质量平衡计算得出的 180 Tg 和 DeVries 等<sup>[68]</sup>利用模型分析得到的 164 Tg。海洋反硝化总量为海洋沉积物和海洋贫氧区的反硝化量之和, 近几年人们认可的海洋反硝化速率为 250 Tg/yr<sup>[2,69]</sup>, 从已报道的海洋向大气的  $\text{N}_2$  排放量数据可以看出, 除了反硝化过程可以释放  $\text{N}_2$  到大气中, 厌氧氨氧化过程也能产生  $\text{N}_2$ 。但是随着生物技术的进步, 人们可以检测得到更精确的反硝化过程的  $\text{N}_2$  排放量数据。希望随着对反硝化菌生理生化研究的深入, 借助越来越丰富的已报道数据, 人们可以改进已有的代谢网络模型和构建新的代谢网络模型, 使模型的预测结果更符合真实环境中菌株的变化。

随着对反硝化菌基因组信息研究的深入,反硝化菌的基因组尺度代谢网络模型也不断地发表出来。施氏假单胞菌除了能够固氮外,还被鉴定出可以进行反硝化过程。Babaei 等<sup>[16]</sup>利用构建的施氏假单胞菌的 iPB890 模型模拟了厌氧条件下施氏假单胞菌的硝酸盐呼吸过程,计算了厌氧情况下反硝化途径最小和最大通量。结果表明厌氧情况下反硝化途径通量为 33.0 mmol/(gDW·h),说明该途径在厌氧条件下具有很高的活性,对于生物质生产必不可少。铜绿假单胞菌也是一类重要的海洋氮循环反硝化菌,Oberhardt 等<sup>[70]</sup>基于铜绿假单胞菌的组学数据,构建了此菌第一个基因组尺度代谢模型 iMO1056。在厌氧条件下,通过模型模拟比较厌氧和好氧环境对反硝化过程的影响,结果表明在厌氧条件下菌体的比生长速率为 0.846 h<sup>-1</sup>,而在好氧情况下计算的菌体比生长速率为 1.048 h<sup>-1</sup>,这说明好氧呼吸链效率高于反硝化呼吸链。Rex 等<sup>[71]</sup>构建了 *Dinoroseobacter shibae* 的基因组尺度代谢网络模型 iDsh827,他们利用模型推测得出当在光照和碳源条件下,无论选择铵盐、尿素或硝酸盐中的哪一种氮源,此菌都可以利用两种电子受体进行好氧反硝化。同时他们为好氧反硝化过程提供了一种可行的解释。

影响海洋反硝化过程的环境因子包括电子受体、碳源、C/N、溶解氧、pH、温度、盐度和金属离子<sup>[72]</sup>。(1) 电子受体。作为电子受体的硝酸盐和亚硝酸盐是控制反硝化过程的最主要因素,有实验表明反硝化基因的表达会随着硝酸盐浓度的提高而增加。(2) 碳源。对于好氧反硝化过程来说,碳源含量是主要的限制因素,当在低碳浓度环境下,好氧反硝化细菌的生长量较低,但是在高碳浓度中反而会抑制它的生长,Robertson 等发现在

一定碳浓度范围内反硝化菌的反硝化速率随有机碳浓度升高而升高<sup>[58]</sup>。当以乙酸钠和丁二酸钠为碳源时,反硝化菌的亚硝酸盐转化率最高;而以乳酸、蔗糖作为碳源时,反硝化菌的活性相对较小。这表明反硝化菌对小分子碳源的利用率高于大分子碳源。(3) C/N。当环境中 C/N 提高时,反硝化速率也会上升。有实验结果表明,C/N 的降低会减弱反硝化基因的表达,导致菌体的生长和硝酸盐和亚硝酸盐的还原过程受到限制。(4) 溶解氧。在一定的 DO 值范围内反硝化速率受 DO 影响较小,但是当环境中的 DO 低于阈值后,反硝化速率和 DO 值成反比,如 Patureau 等<sup>[73]</sup>发现反硝化菌群在 0.35–6.30 mg/L 的 DO 值范围内其反硝化率处于 34.10–42.30 μmol N/(L·h),当 DO 值小于 0.35 mg/L 时反硝化速率迅速升高。(5) pH。环境中的 pH 值会影响微生物的生长和代谢酶的活性。对于反硝化菌的生长和反硝化酶的活性来说,最适 pH 值为中性或微碱性,但是当 pH 低于 5.0 时,微生物生长和反硝化过程的效率会迅速降低。环境中的 pH 值达到 4.0 时,会抑制菌株的生长和反硝化酶的活性,此时菌株的生长和反硝化的效率均为最差。(6) 温度。一般反硝化菌的最适温度范围是 25–35 °C,若温度高于此范围,菌株的生长和反硝化都会受到抑制。(7) 盐度。当盐度过高时,反硝化还原酶会受到抑制。例如安健等从对虾池塘筛选得到 1 株高效的好氧反硝化细菌,此反硝化菌的最适盐度范围为 5–15 g/L,若环境盐度高于 15 g/L,反硝化菌的亚硝酸盐转化率会大幅下降<sup>[74]</sup>。(8) 金属离子。金属离子对反硝化过程的影响十分显著,当环境中加入了 Fe<sup>3+</sup>和 Mo<sup>6+</sup>后,反硝化菌的硝酸还原酶的活性会随之增加<sup>[58–72]</sup>。

反硝化过程最终会产生 N<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub>O 并排出到大

气中, 是海洋的主要脱氮途径。反硝化过程主要发生在海洋贫氧区和海洋沉积物中, 对于反硝化速率的测量取决于探测方法的进步, 研究者们使用质量平衡法等测量方法会得出可信度较低的测量值, 使得人们无法得出准确的反硝化速率。但是最新的研究方法表明, 通过  $^{15}\text{N}$  同位素配对技术结合培养的方法可以区分出反硝化和厌氧氨氧化过程, 得出较为准确的反硝化速率和厌氧氨氧化速率<sup>[75]</sup>。随着新的测量方法得出的新的反硝化测量数据的发表, 人们可以构建海洋反硝化菌的基因组尺度代谢网络模型并借助数据对模型进行验证, 这样得到的高质量模型可以帮助人们更好地了解反硝化代谢途径和调控机制。除了海洋反硝化菌, 人们已经构建了许多陆地反硝化菌的基因组尺度代谢网络模型, 例如 *Agrobacterium tumefaciens* 和 *Rhodospirillum rubrum*, 借助这些陆地反硝化菌的代谢网络模型, 人们对反硝化代谢途径以及其中的酶和基因都有了更深入的了解<sup>[76-77]</sup>。反硝化过程作为重要的海洋脱氮过程, 对它的研究可以帮助人们制定更有效的污水生物治理和维护海洋环境的策略。

## 5 厌氧氨氧化过程

厌氧氨氧化过程(anammox)可在不需要有机电子供体条件下将亚硝酸盐和铵转化为氮气分子( $\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ ),  $\text{NO}$  和  $\text{N}_2\text{H}_4$  作为中间体。首先, 亚硝酸盐被亚硝酸盐还原酶(Nir)还原为  $\text{NO}$ 。 $\text{NO}$  与铵结合后通过脒合酶(HZS)使用 3 个电子形成脒。最终, 脒被脒脱氢酶(HDH)氧化成氮气, 释放出 4 个电子, 为之前的 2 个氧化还原反应提供动力<sup>[78]</sup>。还有另一种未经实验验证的假说认为  $\text{NH}_2\text{OH}$  作为中间体比  $\text{NO}$  更为合理<sup>[79]</sup>。迄今为

止, 研究表明厌氧氨氧化菌分布广泛, 一直以来影响着海洋和陆地表面水生生态系统氮损失及原始大气的形成。其主要分布在海洋贫氧区、海洋冰层和沉积物中, 主要种属为浮霉菌门(*Planctomycetales*)<sup>[80]</sup>。浮霉菌门中的厌氧氨氧化细菌的分类包括 5 个属: *Candidatus Scalindua*、*Candidatus Kuenenia*、*Candidatus Brocadia*、*Candidatus Anammoxoglobus*、*Candidatus Jettenia*<sup>[81]</sup>。

Ward 等<sup>[26]</sup>推测海洋总氮气输出中约 35%–50% 来自于厌氧氨氧化菌。Martin 等<sup>[82]</sup>推测在海洋贫氧区和沉积物中每年反硝化过程和厌氧氨氧化过程的氮产量约有 230–450 Tg。Dalsgaard 等<sup>[83]</sup>发现在缺氧水域中, 厌氧氨氧化过程保持低速率一直进行, 而反硝化过程一般以高速率间歇进行。因此, 相对于厌氧氨氧化过程, 在缺氧水域中很少检测到反硝化过程。Ward 等<sup>[84]</sup>推测这两个过程的氮气产量比例为 70:30, 此比例依据海洋缺氧区和沉积物中的有机物碳氮比(C:N=7.5)估算得到。

厌氧氨氧化作为沉积物中另一条脱氮途径, 分布在大部分大陆边缘的沉积物中。在英国和华盛顿州的大陆边缘沉积物中以及沿海深层半沉积物中都可检测到厌氧氨氧化过程的存在<sup>[85]</sup>。从近年来对于中国沿海沉积物中厌氧氨氧化菌丰度的研究数据可以看出, 厌氧氨氧化菌占胶州湾沉积物中总微生物量的 0.047%–0.210%, 占珠江口沉积物的 0.02%, 长江口以及邻近海域的沉积物的 0.26%–5.20%, 可以看出海洋环境中厌氧氨氧化菌的含量占比较少<sup>[86]</sup>。

近几年, 许多新的厌氧氨氧化细菌的发现改变了人们对于传统厌氧氨氧化过程的认识。铁氨

氧化过程(ferric ammonium oxidation, Feammox)就是一种与铁耦合的新的厌氧氨氧化作用过程,能够结合铵的氧化和  $\text{Fe}^{3+}$  的还原过程,主要分布在含水层沉积物中。Feammox 在美国新泽西州的森林河岸湿地上首次被发现<sup>[87]</sup>,它可氧化  $\text{NH}_4^+$  为  $\text{NO}_2^-$ ,将  $\text{Fe}^{3+}$  当作电子受体,还原为  $\text{Fe}^{2+}$ ,此过程仅在可生物利用的高浓度  $\text{Fe}^{3+}$  环境下才能完全反应。铁氨氧化过程作为一种新的氮转化途径,扩大了人们对于海洋氮循环的认识,并为治理地下水的氮污染物污染提供了新的思路<sup>[88]</sup>。

厌氧氨氧化菌虽然分布广泛,但是最近研究表明不同环境下主要的厌氧氨氧化菌的种类也不同,如海洋环境中主要是 *Candidatus Scalindua*,而在污水处理厂中主要为 *Candidatus Brocadia*。造成这种分布差异的主要原因就是环境因子,一般包含温度、溶解氧、pH、底物浓度和有机碳含量等。(1) 温度。从已报道的结果可以看出厌氧氨氧化菌对温度具有广泛适温性,存在很宽的适温范围。已发现的厌氧氨氧化菌的最低温生存环境为  $-2.5\text{ }^\circ\text{C}$  的北极海冰中,最高温生存环境为  $100\text{ }^\circ\text{C}$  的深海热液喷口处。陈曦等通过实验验证在污泥中厌氧氨氧化菌在  $30\text{ }^\circ\text{C}$  环境下活性最高<sup>[89]</sup>。然而在海洋环境中,Canion 等<sup>[90]</sup>的研究结果表明厌氧氨氧化菌更适宜生存在低温条件下,推测此菌具有嗜冷性。(2) 溶解氧。一般认为厌氧氨氧化菌只能生活在低氧或厌氧环境中,随着氧气浓度的降低厌氧氨氧化活性呈线性增加。但是 Daigger 等研究表明厌氧氨氧化过程需要少量氧的参与。同时也有人在有氧环境中发现了厌氧氨氧化细菌的存在<sup>[91-92]</sup>。(3) 底物浓度。当环境中的  $\text{NO}_2^-$  或  $\text{NO}_3^-$  浓度增加,厌氧氨氧化菌的厌氧氨氧化活性和菌体数量会随之提高<sup>[93]</sup>。(4) pH。在污水处理厂中,

当 pH 值处于 6.5–7.8 的范围内,厌氧氨氧化菌的氨氧化速率和 pH 值成正比,而当处于 7.8–9.0 范围内,pH 值的升高会导致氨氧化效率的降低,所以 7.8 为污泥中厌氧氨氧化过程的最适 pH。对于地表水环境来说,一般 pH 6.0–8.9 时,并没有呈现显著酸碱性的水体环境<sup>[94]</sup>。(5) 有机碳含量。张东声等对舟山群岛沿海沉积物进行了相关性分析后发现沉积物中有机碳含量与厌氧氨氧化菌多样性呈正比例关系<sup>[95]</sup>。

综上所述,研究者通过培养、基因测序等研究方法得到了越来越多的有关厌氧氨氧化过程的生理生化和基因组信息,对于此过程在海洋氮循环和整个生态系统中起到的作用有了更深入的了解。环境因子的影响和各种新发表的组学数据也为人们后续分析厌氧氨氧化过程奠定了基础,新的铁氨氧化过程的发现更是为人们提供了新的厌氧氨氧化途径。在收集了足够的数据库后,可以通过构建厌氧氨氧化菌株的基因组尺度代谢网络模型,从整体上分析厌氧氨氧化过程的代谢途径和调控机制,为优化和改造厌氧氨氧化代谢途径提供了方案。

## 6 展望

目前,在分析氮循环数据时,研究者仍然会遇到一些阻碍。如缺少各个氮循环过程中的主要参与微生物的信息;有哪几种主要固氮微生物参与固氮过程?它们之间的固氮量的比例?对于各个氮循环过程,不同研究组估计的氮元素转化数据的估计值相差很大,测量获得的氮转化数据无法与氮循环过程一一对应,例如无法分辨出 DNRA 过程和厌氧氨氧化过程对于还原亚硝酸盐的贡献各占多少。为了解决这些问题,我们可以

构建大量的海洋微生物的代谢网络模型, 通过对代谢途径进行分析来确定参与氮循环过程的主要微生物, 同时可以利用模型预测菌株主要参与的具体氮循环过程、氮循环过程的效率以及环境因子对其效率的影响等。另外, 我们对于海洋氮循环的复杂生态网络还缺少了解, 对于氮循环过程中的调节机制还缺乏认知。研究者已经通过构建基因组尺度代谢网络模型来进行研究氮循环中各个过程的互作机制以及环境因子对不同过程的影响。例如, 前文所述 Babaei 等<sup>[16]</sup>利用构建的施氏假单胞菌的 iPB890 模型模拟环境因子  $\text{NH}_4^+$  和氧气对施氏假单胞菌固氮作用的影响, 实际上可以通过设置二者不同的比例来研究两个环境因子协同作用的影响。

人们现如今提出了一些针对地球元素循环的数学模型分析方法, 构建的动态模型为了模拟氮循环中的氮转化数据需要大量的动力学参数和浓度数据, 如包含 5 类状态变量和 50 个参数的胶州湾-生物-物理耦合模型<sup>[96]</sup>。然而通过大量实验数据确定了参数取值后, 海洋生态系统的动力学模型一般只能模拟特定环境下的氮循环变化, 并不能分析全球规模的数据, 同样对于细胞代谢网络来说, 利用酶动力学数据所构建的动力学模型可以针对特定代谢途径进行分析。但是对于计量模型来说, 只需要来自于不同测量方法估计的氮转化数据, 还可以整合分析全球规模的各种氮转化数据。对于细胞代谢网络来说, 运用最新的自动化的方法和工具如 ModelSEED<sup>[97]</sup>、RAVEN<sup>[98]</sup>、CarveMe<sup>[99]</sup>, 人们可以简单方便地构建得到自己想要的计量学代谢网络模型, 之后经过文献校验、缺口填补等人工过程就可以进一步得到高质量模型。然而, 利用酶动力学数据所构建的动力学模

型具有可以针对特定代谢途径进行分析的优点。

在氮循环网络中加入模型结果中的定量关系, 可增加数据分析结果的可靠性。本文综述了代谢网络模型在氮循环研究中的应用, 例如红海束毛藻固氮菌和施氏假单胞菌、铜绿假单胞菌两种反硝化菌, 借助代谢模型分析该微生物节点联结的氮流间的关系。然而对于厌氧氨氧化过程和 DNRA 过程, 目前并未发表相关微生物的基因组尺度代谢网络模型, 但是已经有基因组序列发表。代谢网络模型可根据基因组中注释的酶基因信息和酶催化反应计量关系构建得到, 不需要调控和酶动力学等信息, 因此对基因组注释后就可较容易的构建得到。

经过多年的海洋微生物研究, 对于氮循环关键微生物, 人们通过培养, 生化、生理实验和基因组表征, 对于关键氮循环过程的了解也越来越清晰。目前已有上百个发表的代谢网络模型, 覆盖了真核、细菌、古细菌, 海洋氮循环中的微生物的模型也在逐渐增多。微生物代谢网络分析可以通过向氮循环网络中引入更多约束条件, 使氮流分析结果更为可靠, 这种微观微生物代谢网络分析数据与宏观氮流数据的结合可以更清晰地进行研究海洋氮循环。

## 参 考 文 献

- [1] Huang XF, Dong JD, Zhang YY, Ling J, Chen L. Relationships between marine nitrogen-fixing microorganisms and environmental factors: a review. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(4): 1028–1033. (in Chinese)  
黄小芳, 董俊德, 张燕英, 凌娟, 陈蕾. 海洋固氮微生物与环境因子关系综述. *生态学杂志*, 2012, 31(4): 1028–1033.
- [2] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*,

- 2018, 16(5): 263–276.
- [3] Liu Q, Mi TZ, Zhen Y, Wang HL, Yu ZG. Description of carbon fixation pathway based on *Skeletonema marinoi* transcriptome. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61(22): 2483–2493. (in Chinese)  
刘乾, 米铁柱, 甄毓, 王华龙, 于志刚. 基于玛氏骨条藻 (*Skeletonema marinoi*) 转录组的碳固定代谢途径分析. *科学通报*, 2016, 61(22): 2483–2493.
- [4] Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ. Nitrogen in the marine environment. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.
- [5] Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 2010, 28(3): 245–248.
- [6] Aderem A. Systems biology: its practice and challenges. *Cell*, 2005, 121(4): 511–513.
- [7] Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 2003, 154(3): 157–164.
- [8] Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130164.
- [9] Sohm JA, Webb EA, Capone DG. Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(7): 499–508.
- [10] Gardner JJ, Boyle NR. The use of genome-scale metabolic network reconstruction to predict fluxes and equilibrium composition of N-fixing versus C-fixing cells in a diazotrophic cyanobacterium, *Trichodesmium erythraeum*. *BMC Systems Biology*, 2017, 11: 4.
- [11] Mahaffey C, Michaels AF, Capone DG. The conundrum of marine N<sub>2</sub> fixation. *American Journal of Science*, 2005, 305(6/8): 546–595.
- [12] Glibert PM, Bronk DA. Release of dissolved organic nitrogen by marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(11): 3996–4000.
- [13] Martínez-Pérez C, Mohr W, Löscher CR, Dekaezemacker J, Littmann S, Yilmaz P, Lehnen N, Fuchs BM, Lavik G, Schmitz RA, LaRoche J, Kuypers MM. The small unicellular diazotrophic symbiont, UCYN-A, is a key player in the marine nitrogen cycle. *Nature Microbiology*, 2016, 1(11): 16163.
- [14] Harding K, Turk-Kubo KA, Sipler RE, Mills MM, Bronk DA, Zehr JP. Symbiotic unicellular cyanobacteria fix nitrogen in the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(52): 13371–13375.
- [15] Zhang R, Chen M. Advances in marine biological nitrogen fixation studies. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2010, 29(3): 428–433. (in Chinese)  
张润, 陈敏. 海洋生物固氮作用研究进展. *台湾海峡*, 2010, 29(3): 428–433.
- [16] Babaei P, Marashi SA, Asad S. Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(11): 3022–3032.
- [17] Zhang T, Yan YL, He S, Ping SZ, Alam KM, Han YL, Liu XD, Lu W, Zhang W, Chen M, Xiang WS, Wang XJ, Lin M. Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Research in Microbiology*, 2012, 163(5): 332–339.
- [18] Goyal N, Widiastuti H, Karimi IA, Zhou Z. A genome-scale metabolic model of *Methanococcus maripaludis* S2 for CO<sub>2</sub> capture and conversion to methane. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(5): 1043–1054.
- [19] Hutchins DA, Walworth NG, Webb EA, Saito MA, Moran D, McIlvin MR, Gale J, Fu FX. Irreversibly increased nitrogen fixation in *Trichodesmium* experimentally adapted to elevated carbon dioxide. *Nature Communications*, 2015, 6: 8155.
- [20] Levitan O, Rosenberg G, Setlik I, Setlikova E, Grigel J, Klepetar J, Prasil O, Berman-Frank I. Elevated CO<sub>2</sub> enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Global Change Biology*, 2007, 13(2): 531–538.
- [21] Yan YL, Ping SZ, Peng JP, Han YL, Li L, Yang J, Dou YT, Li Y, Fan HL, Fan Y, Li DH, Zhan YH, Chen M, Lu W, Zhang W, Cheng Q, Jin Q, Lin M. Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC Genomics*, 2010, 11: 11.
- [22] Zhang YY, Dong JD, Zhang S, Wang YS, Wang HK, Huang LM. Studies on nitrogen fixation physiology of marine cyanobacteria *Calothrix* sp. strain MCT1 and *Lyngbya* sp. strain MCT6. *Journal of Tropical Oceanography*, 2006, 25(4): 46–50. (in Chinese)

- 张燕英, 董俊德, 张偲, 王友绍, 王汉奎, 黄良民. 海洋固氮蓝藻 *Calothrix* sp. 与 *Lyngbya* sp. 固氮生理的研究. 热带海洋学报, 2006, 25(4): 46–50.
- [23] Resendis-Antonio O, Reed JL, Encarnación S, Collado-Vides J, Palsson BØ. Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. *PLoS Computational Biology*, 2007, 3(10): e192.
- [24] Zhao HS, Li M, Fang KC, Chen WF, Wang J. *In silico* insights into the symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti* via metabolic reconstruction. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31287.
- [25] Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Damsté JSS. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33): 12317–12322.
- [26] Ward BB. Significance of anaerobic ammonium oxidation in the ocean. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(9): 408–410.
- [27] Qin W, Amin SA, Martens-Habbena W, Walker CB, Urakawa H, Devol AH, Ingalls AE, Moffett JW, Armbrust EV, Stahl DA. Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(34): 12504–12509.
- [28] Bayer B, Vojvoda J, Offre P, Alves RJE, Elisabeth NH, Garcia JAL, Volland JM, Srivastava A, Schleper C, Herndl GJ. Physiological and genomic characterization of two novel marine thaumarchaeal strains indicates niche differentiation. *The ISME Journal*, 2016, 10(5): 1051–1063.
- [29] Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 2009, 461(7266): 976–979.
- [30] Kozłowski JA, Stieglmeier M, Schleper C, Klotz MG, Stein LY. Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and Thaumarchaeota. *The ISME Journal*, 2016, 10(8): 1836–1845.
- [31] Poughon L, Dussap CG, Gros JB. Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 72(4): 416–433.
- [32] Schleper C, Nicol GW. Ammonia-oxidising archaea—physiology, ecology and evolution. *Advances in Microbial Physiology*, 2010, 57: 1–41.
- [33] Stahl DA, de la Torre JR. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 83–101.
- [34] Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pineda N, Arp DJ, Brochier-Armanet C, Chain PSG, Chan PP, Gollabgir A, Hemp J, Hügler M, Karr EA, Könneke M, Shin M, Lawton TJ, Lowe T, Martens-Habbena W, Sayavedra-Soto LA, Lang D, Sievert SM, Rosenzweig AC, Manning G, Stahl DA. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(19): 8818–8823.
- [35] Li FR, Xie W, Yuan QQ, Luo H, Li PS, Chen T, Zhao XM, Wang ZW, Ma HW. Genome-scale metabolic model analysis indicates low energy production efficiency in marine ammonia-oxidizing archaea. *AMB Express*, 2018, 8(1): 106.
- [36] Hollocher TC, Kumar S, Nicholas DJ. Respiration-dependent proton translocation in *Nitrosomonas europaea* and its apparent absence in *Nitrobacter agilis* during inorganic oxidations. *Journal of Bacteriology*, 1982, 149(3): 1013–1020.
- [37] Vuillemin A, Wankel SD, Coskun ÖK, Magritsch T, Vargas S, Estes ER, Spivack AJ, Smith DC, Pockalny R, Murray RW, D'Hondt S, Orsi WD. Archaea dominate oxic seafloor communities over multimillion-year time scales. *Science Advances*, 2019, 5(6): eaaw4108.
- [38] Aggarwal S, Lyn CP, Karimi IA. Improved strains for biological treatment of wastewater. *Computer Aided Chemical Engineering*, 2012, 31: 895–899.
- [39] 李斐然. 氨氧化微生物基因组尺度代谢网络模型构建及分析. 天津大学硕士学位论文, 2017.
- [40] Sorokin DY, Lüscher S, Vejmolkova D, Kostrikina NA, Kleerebezem R, Rijpstra WIC, Damsté JSS, Le Paslier D, Muyzer G, Wagner M, van Loosdrecht MCM, Daims H. Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum *Chloroflexi*. *The ISME Journal*, 2012, 6(12): 2245–2256.
- [41] Füssel J, Lam P, Lavik G, Jensen MM, Holtappels M, Günter M, Kuypers MMM. Nitrite oxidation in the Namibian oxygen minimum zone. *The ISME Journal*, 2012, 6(6): 1200–1209.
- [42] Lüscher S, Nowka B, Rattei T, Spieck E, Daims H. The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 27.

- [43] Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A, Kirkegaard RH, von Bergen M, Rattei T, Bendinger B, Nielsen PH, Wagner M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 2015, 528(7583): 504–509.
- [44] van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, den Camp HJMO, Kartal B, Jetten MSM, Lückner S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 2015, 528(7583): 555–559.
- [45] Daims H, Lückner S, Wagner M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699–712.
- [46] Kits KD, Sedlacek CJ, Lebedeva EV, Han P, Bulaev A, Pjevac P, Daebeler A, Romano S, Albertsen M, Stein LY, Daims H, Wagner M. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 2017, 549(7671): 269–272.
- [47] Hu HW, He JZ. Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(12): 2709–2717.
- [48] 刘帅. 典型生境中氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的微生物生态学研究. 浙江大学博士学位论文, 2015.
- [49] Li TT, Zhang YK, Cao TH, Liu QH. Research progress of control factors of partial bio-nitrification bacterium group. *Technology of Water Treatment*, 2013, 39(1): 19–23. (in Chinese)  
李婷婷, 张宇坤, 曹天昊, 刘泉宏. 短程生物脱氮过程菌群调控影响因素研究进展. *水处理技术*, 2013, 39(1): 19–23.
- [50] 余晨笛. 长江河口沉积物全程氨氧化微生物的富集及多样性分析. 华东师范大学硕士学位论文, 2018.
- [51] Gong J, Song YJ, Zhang XL. Phylogenetic and functional diversity of nitrogen cycling microbes in coastal sediments. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 433–444. (in Chinese)  
龚骏, 宋延静, 张晓黎. 海岸带沉积物中氮循环功能微生物多样性. *生物多样性*, 2013, 21(4): 433–444.
- [52] Kartal B, Rattray J, van Niftrik LA, van de Vossenberg J, Schmid MC, Webb RI, Schouten S, Fuerst JA, Damsté JS, Jetten MSM, Strous M. *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(1): 39–49.
- [53] Kartal B, Kuypers MMM, Lavik G, Schalk J, Op den Camp HJ, Jetten MSM, Strous M. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3): 635–642.
- [54] 卜翠娜. 异化硝酸盐还原菌(DNRA)的环境分布及富集培养研究. 山东大学硕士学位论文, 2018.
- [55] Giblin AE, Tobias CR, Song B, Weston N, Banta GT, Rivera-Monroy VH. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. *Oceanography*, 2013, 26(3): 124–131.
- [56] 韦宗敏. 微好氧环境中硝酸盐异化还原成铵的影响研究. 华南理工大学硕士学位论文, 2012.
- [57] Kraft B, Tegetmeyer HE, Sharma R, Klotz MG, Ferdelman TG, Hettich RL, Geelhoed JS, Strous M. The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration. *Science*, 2014, 345(6197): 676–679.
- [58] Wang W, Cai ZC, Zhong WH, Wang GX. Research advances in aerobic denitrifiers. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(11): 2618–2625. (in Chinese)  
王薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 王国祥. 好氧反硝化菌的研究进展. *应用生态学报*, 2007, 18(11): 2618–2625.
- [59] Fan JF, Chen JY, Chen LG, Guan DM. Research on denitrifying bacteria quantification and diversity in Liaohe Estuary sediments. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(3): 94–102. (in Chinese)  
樊景凤, 陈佳莹, 陈立广, 关道明. 辽河口沉积物反硝化细菌数量及多样性的研究. *海洋学报*, 2011, 33(3): 94–102.
- [60] Codispoti LA. Interesting times for marine N<sub>2</sub>O. *Science*, 2010, 327(5971): 1339–1340.
- [61] Tiedje JM. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium//Zehnder AJB. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York: John Wiley and Sons, 1988: 179–244.
- [62] Bristow LA, Callbeck CM, Larsen M, Altabet MA, Dekazemacker J, Forth M, Gauns M, Glud RN, Kuypers MMM, Lavik G, Milucka J, Naqvi SWA, Pratihary A, Revsbech NP, Thamdrup B, Treusch AH, Canfield DE. N<sub>2</sub> production rates limited by nitrite availability in the Bay of Bengal oxygen minimum zone. *Nature Geoscience*, 2017, 10(1): 24–29.
- [63] Kuypers MMM, Lavik G, Woebken D, Schmid M, Fuchs BM, Amann R, Jørgensen BB, Jetten MSM. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(18): 6478–6483.

- [64] Middelburg JJ, Soetaert K, Herman PMJ, Heip CHR. Denitrification in marine sediments: a model study. *Global Biogeochemical Cycles*, 1996, 10(4): 661–673.
- [65] Codispoti LA. An oceanic fixed nitrogen sink exceeding 400 Tg N a<sup>-1</sup> vs the concept of homeostasis in the fixed-nitrogen inventory. *Biogeosciences*, 2007, 4(2): 233–253.
- [66] Gruber N, Sarmiento JL. Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. *Global Biogeochemical Cycles*, 1997, 11(2): 235–266.
- [67] Gruber N. The dynamics of the marine nitrogen cycle and its influence on atmospheric CO<sub>2</sub> variations//Follows M, Oguz T. *The Ocean Carbon Cycle and Climate*. Dordrecht: Springer, 2004: 97–148.
- [68] DeVries T, Deutsch C, Primeau F, Chang B, Devol A. Global rates of water-column denitrification derived from nitrogen gas measurements. *Nature Geoscience*, 2012, 5(8): 547–550.
- [69] Gruber N, Galloway JN. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 2008, 451(7176): 293–296.
- [70] Oberhardt MA, Puchałka J, Fryer KE, Dos Santos VAM, Papin JA. Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 2008, 190(8): 2790–2803.
- [71] Rex R, Bill N, Schmidt-Hohagen K, Schomburg D. Swimming in light: a large-scale computational analysis of the metabolism of *Dinoroseobacter shibae*. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(10): e1003224.
- [72] Li WF, Zheng JJ, Zhang XP, Deng B. Progress in studies on denitrification enzymes and environmental impact factors. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 166–170. (in Chinese)  
李卫芬, 郑佳佳, 张小平, 邓斌. 反硝化酶及其环境影响因子的研究进展. *水生生物学报*, 2014, 38(1): 166–170.
- [73] Patureau D, Bernet N, Delgenès JP, Moletta R. Effect of dissolved oxygen and carbon–nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(4): 535–542.
- [74] An J, Song ZF, Yang XL, Hu K, Lu HD, She LR. Characteristics of aerobic denitrifying strain YX-6 and identification. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 561–569. (in Chinese)  
安健, 宋增福, 杨先乐, 胡鲲, 路怀灯, 余林荣. 好氧反硝化细菌 YX-6 特性及鉴定分析. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 561–569.
- [75] Xu H, Zhang L, Shang JG, Dai JY, Fan CX. Denitrification and anammox on the sediment-water interface in the Meiliang Bay of Lake Taihu. *Journal of Lake Sciences*, 2009, 21(6): 775–781. (in Chinese)  
徐徽, 张路, 商景阁, 代静玉, 范成新. 太湖梅梁湾水土界面反硝化和厌氧氨氧化. *湖泊科学*, 2009, 21(6): 775–781.
- [76] Kampschreur MJ, Kleerebezem R, Picioreanu C, Bakken L, Bergaust L, de Vries S, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. Metabolic modeling of denitrification in *Agrobacterium tumefaciens*: a tool to study inhibiting and activating compounds for the denitrification pathway. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 370.
- [77] Risso C, Sun J, Zhuang K, Mahadevan R, DeBoy R, Ismail W, Shrivastava S, Huot H, Kothari S, Daugherty S, Bui O, Schilling CH, Lovley DR, Methé BA. Genome-scale comparison and constraint-based metabolic reconstruction of the facultative anaerobic Fe(III)-reducer *Rhodospirillum rubrum*. *BMC Genomics*, 2009, 10: 447.
- [78] Peeters SH, van Niftrik L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 49: 45–52.
- [79] Stein LY, Klotz MG. The nitrogen cycle. *Current Biology*, 2016, 26(3): R94–R98.
- [80] Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield DE. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology*, 2005, 156(4): 457–464.
- [81] Huang PB, Jiao NZ, Feng J, Shu QL. Research progress on Planctomycetes' diversity and ecological function in marine environments. *Microbiology China*, 2014, 41(9): 1891–1902. (in Chinese)  
黄佩蓓, 焦念志, 冯洁, 舒青龙. 海洋浮霉状菌多样性与生态学功能研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(9): 1891–1902.
- [82] Martin TS, Casciotti KL. Nitrogen and oxygen isotopic fractionation during microbial nitrite reduction. *Limnology and Oceanography*, 2016, 61(3): 1134–1143.
- [83] Dalsgaard T, Thamdrup B, Farías L, Revsbech NP. Anammox and denitrification in the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Limnology and Oceanography*, 2012, 57(5): 1331–1346.
- [84] Ward BB. How nitrogen is lost. *Science*, 2013, 341(6144): 352–353.
- [85] Devol AH. Denitrification, anammox, and N<sub>2</sub> production in marine sediments. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7: 403–423.

- [86] Fu LL, Li SQ, Zhen Y, Mi TZ. Comparison study on the primers used for anammox bacterial molecular ecology research from marine sediments. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(9): 77–88. (in Chinese)  
付璐璐, 李思琦, 甄毓, 米铁柱. 用于海洋沉积物中厌氧氨氧化细菌分子生态研究的引物比较. *中国海洋大学学报*, 2019, 49(9): 77–88.
- [87] Clément JC, Shrestha J, Ehrenfeld JG, Jaffé PR. Ammonium oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron under anaerobic conditions in wetland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(12): 2323–2328.
- [88] Jiang Y, Xi BD, Li R, Li MX, Xu Z, Yang YN, Gao SB. Advances in Fe(III) bioreduction and its application prospect for groundwater remediation: a review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2019, 13(6): 89.
- [89] Chen X, Cui LF, Du B, Si YA. Study on influencing of temperature and pH to anaerobic ammonium oxidation microbial activity. *Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition)*, 2006, 24(3): 5–8. (in Chinese)  
陈曦, 崔莉凤, 杜兵, 司亚安. 温度和pH值对厌氧氨氧化微生物活性的影响分析. *北京工商大学学报(自然科学版)*, 2006, 24(3): 5–8.
- [90] Canion A, Kostka JE, Gihring TM, Huettel M, Van Beusekom JEE, Gao H, Lavik G, Kuypers MMM. Temperature response of denitrification and anammox reveals the adaptation of microbial communities to in situ temperatures in permeable marine sediments that span 50° in latitude. *Biogeosciences*, 2014, 11(2): 309–320.
- [91] Hamersley MR, Lavik G, Woebken D, Rattray JE, Lam P, Hopmans EC, Damsté JSS, Krüger S, Graco M, Gutiérrez D, Kuypers MMM. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnology and Oceanography*, 2007, 52(3): 923–933.
- [92] Daigger GT. Oxygen and carbon requirements for biological nitrogen removal processes accomplishing nitrification, nitrification, and anammox. *Water Environment Research*, 2014, 86(3): 204–209.
- [93] Dalsgaard T, Thamdrup B. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3802–3808.
- [94] Fu BB, Liu JW, Gao MH, Zhang XH. Progress in study on response of anammox bacterial species composition to environmental factors. *Advances in Marine Science*, 2014, 32(3): 427–434. (in Chinese)  
富冰冰, 刘吉文, 高铭鸿, 张晓华. 厌氧氨氧化细菌物种组成对环境因子响应的研究进展. *海洋科学进展*, 2014, 32(3): 427–434.
- [95] Zhang DS, Liu ZS, Zhang HF, Wang XG, Wang CS. Diversity of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in marine sediments from the Zhoushan Islands. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(19): 6250–6258. (in Chinese)  
张东声, 刘镇盛, 张海峰, 王小谷, 王春生. 舟山群岛海域沉积物厌氧氨氧化细菌多样性. *生态学报*, 2015, 35(19): 6250–6258.
- [96] 石洪华, 丁德文, 郑伟. 海岸带复合生态系统评价、模拟与调控关键技术及其应用. 北京: 海洋出版社, 2012.
- [97] Dejongh M, Formsma K, Boillot P, Gould J, Rycenga M, Best A. Toward the automated generation of genome-scale metabolic networks in the SEED. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 139.
- [98] Agren R, Liu LM, Shoaie S, Vongsangnak W, Nookaew I, Nielsen J. The RAVEN toolbox and its use for generating a genome-scale metabolic model for *Penicillium chrysogenum*. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(3): e1002980.
- [99] Machado D, Andrejev S, Tramontano M, Patil KR. Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(15): 7542–7553.

# Marine nitrogen cycle and prediction based on genome-scale metabolic network model

Rizhao Zhang<sup>1,3#</sup>, Feiran Li<sup>2#</sup>, Qianqian Yuan<sup>3</sup>, Hongwu Ma<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Tianjin University of Science and Technology, College of Bioengineering, Tianjin 300457, China

<sup>2</sup>Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden SE-412 58

<sup>3</sup>Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of System Microbiology Technology, Tianjin 300308, China

**Abstract:** The marine nitrogen cycling is one major component in Earth's element cycle. The marine nitrogen cycling is a biochemical process composed of a series of redox reactions. Nitrogen fixation and nitrogen assimilation supplies critical bioavailable nitrogen (ammonium) to ecosystems. Nitrification can further convert ammonium into nitrates, while denitrification can convert nitrate into nitrogen. Different nitrogen forms are converted through the nitrogen cycle in the ocean. Studying marine nitrogen cycling could help understand the mechanism of interaction and co-evolution between marine organisms and Earth environment. It may also better protect the Earth's ecological environment. By employing the published genome-scale metabolic network models based on key microorganisms involved in nitrogen cycling, researchers can study the efficiency of different nitrogen cycle processes and their influencing environmental factors, and disclose the mechanism of the nitrogen cycle and biological network, so as to help further study the mechanism of marine nitrogen conversion. This article mainly reviews the main microorganisms involved in each transformation process in the marine nitrogen cycle and applications of genome-scale metabolic network models in the analysis of the nitrogen cycle.

**Keywords:** nitrogen fixation, nitrification, denitrification, anaerobic ammonia oxidation, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, marine nitrogen cycle

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901401); by the International Partnership Program of Chinese Academy of Sciences (153D31KYSB20170121) and by the National Natural Science Foundation of China (21908239)

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-24828735; E-mail: ma\_hw@tib.cas.cn

Received: 4 January 2020; Revised: 9 April 2020; Published online: 8 May 2020

**马红武**, 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员, 中科院系统微生物技术重点实验室副主任。2001年在天津大学获得生物化工博士学位。后分别在德国和英国从事研究工作。2011年底回国任中科院天津工业生物技术研究所研究员。主要研究方向包括代谢网络分析和途径设计、代谢工程、计算生物学软件开发等, 在相关领域取得了在国际上具有重要影响的研究成果, 在 *Bioinformatics*、*Molecular Systems Biology* 等刊物发表学术论文 40 余篇, SCI 引用千余次, 2014 年获汤森路透高被引科学家奖。兼任中国生物工程学会生物资源专业委员会副主任委员。

