



代谢工程强化脱氮副球菌 DYTN-1 去除氮素污染物

牛晓倩^{1,2}, 陶楠^{1,2}, 舒泉先³, 杨小雁³, 从瑞涛³, 周胜虎^{1,2,4*}, 邓禹^{1,2*}

- 1 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122
- 3 山东渤海油脂工业有限公司, 山东 滨州 256599
- 4 帝斯曼江山制药(江苏)有限公司, 江苏 靖江 214500

牛晓倩, 陶楠, 周胜虎, 邓禹. 代谢工程强化脱氮副球菌 DYTN-1 去除氮素污染物. 微生物学报, 2022, 62(10): 3932–3946.
Niu Xiaoqian, Tao Nan, Zhou Shenghu, Deng Yu. Metabolic engineering enhances the nitrogen removal by *Paracoccus denitrificans* DYTN-1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3932–3946.

摘要: 【目的】脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)是一种环境友好的 α -变形菌纲菌株, 在有氧条件下也可进行反硝化过程, 具有较好的脱氮能力。本研究以脱氮副球菌 DYTN-1 为底盘细胞, 筛选氮素诱导型启动子用于强化硝化和反硝化途径, 进而达到代谢工程强化脱氮副球菌 DYTN-1 去除氮素污染物的目的。【方法】通过接合转移的方法分别将过表达 *amoA*、*amoB*、*hao* 和 *nirS* 基因的重组质粒导入脱氮副球菌 DYTN-1 细胞中。经过荧光定量检测和氮素定量检测对脱氮副球菌 DYTN-1 的基因元件和氮去除能力进行表征。【结果】从基因组中挖掘了 6 个受 NO_2^- 、 NO_3^- 和 NH_4^+ 诱导的启动子, 诱导差异为 2–26 倍; 且过表达 *nirS* 的菌株用 2 g/L KNO_3 处理 24 h 后培养基中 NO_3^- 的残余量为野生型菌株的 67%。同时过表达 *hao* 和 *nirS* 基因的菌株在用 1 g/L NH_4Cl 和 2 g/L KNO_3 处理 12 h 后, 其 NO_3^- 的剩余量仅为野生型菌株的 50%, 且最终总氮的降解效率达 79.5%, 剩余总氮仅为野生型菌株的一半。【结论】上述研究表明, 利用筛选获得的启动子工具在 *P. denitrificans* DYTN-1 中进行代谢工程改造强化氮素污染物的去除具有可行性。

关键词: 诱导型启动子; 硝化途径; 反硝化途径; 脱氮副球菌 DYTN-1

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0905502); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP12056, JUSRP51705A); 中国博士后科学基金(2021M690533)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905502), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP12056, JUSRP51705A) and by the China Postdoctoral Science Foundation (2021M690533)

*Corresponding authors. ZHOU Shenghu, Tel: +86-510-85329031, E-mail: zhoush@jiangnan.edu.cn; DENG Yu, Tel: +86-510-85329031, Fax: +86-510-85918312, E-mail: dengyu@jiangnan.edu.cn

Received: 22 February 2022; Revised: 18 April 2022; Published online: 9 June 2022

Metabolic engineering enhances the nitrogen removal by *Paracoccus denitrificans* DYTN-1

NIU Xiaoqian^{1,2}, TAO Nan^{1,2}, SHU Quanxian³, YANG Xiaoyan³, CONG Ruitao³, ZHOU Shenghu^{1,2,4*}, DENG Yu^{1,2*}

1 National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Shandong Bohi Oils & Fats Industry Co., Ltd., Binzhou 256599, Shandong, China

4 DSM Jiangshan Pharmaceutical (Jiangsu) Company, Jingjiang 214500, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] *Paracoccus denitrificans* is an environment-friendly strain of α -Proteobacteria. It can also perform denitrification under aerobic conditions and has good denitrification ability. This study intended to use *P. denitrificans* DYTN-1 as the chassis cell to screen nitrogen inducible promoters for strengthening the nitrification and denitrification pathways, thus achieving the purpose of enhancing the removal of nitrogen pollutants by metabolic engineering. [Methods] Recombinant plasmids overexpressing *amoA*, *amoB*, *hao* and *nirS* genes were introduced into *P. denitrificans* DYTN-1 cells by conjugation. The gene elements and nitrogen removal ability of *P. denitrificans* DYTN-1 were characterized by fluorescence quantitative detection and nitrogen quantitative detection. [Results] Six promoters induced by NO_2^- , NO_3^- and NH_4^+ were obtained at 2 to 26-fold induction. The residual amount of NO_3^- in the medium of the *nirS* overexpressed strain was 67% of that of the wild-type strain after treatment with 2 g/L KNO_3 for 24 h. The strains overexpressing both *hao* and *nirS* had only 50% of the residual NO_3^- of the wild-type strain after treatment with 1 g/L NH_4Cl and 2 g/L KNO_3 for 12 h. Furthermore, the final degradation efficiency of total nitrogen reached 79.5% and the residual total nitrogen was only half of that of the wild-type strain. [Conclusion] It is feasible to carry out metabolic engineering with the aboved screened promoters to enhance the removal of nitrogen pollutants in *P. denitrificans* DYTN-1.

Keywords: inducible promoter; nitrification pathway; denitrification pathway; *Paracoccus denitrificans* DYTN-1

随着人类活动的日益频繁,高氮素含量的污水不断排入河流、湖泊和其他水体中,导致水质富营养化,不仅使环境生态失衡,而且产生饮用水安全问题^[1-2]。因此,为了应对这些挑战,氮素必须在污水系统中被快速脱除^[3]。目前,生物脱氮是最常用和最有效的处理方法^[4],而选择具有不同脱氮功能的菌株对复杂的污水治理很重要。然而,自然界存在的菌株在污水环境中通常生长速度较慢^[5],不能满足工业脱

氮的一般要求。以环境微生物为底盘细胞,利用合成生物技术和代谢工程强化脱氮功能,是突破上述挑战的重要方法。

目前,从活性污泥中分离出的几种环境友好型细菌,如假单胞菌和芽孢杆菌^[6],已被用作底盘来降解石油^[7]、农药污染物^[8]和富营养化污染物^[9-10]。在工程化改造这些微生物的过程中,标准的遗传操作方法和合成生物学工具,例如启动子、终止子、质粒和选择标记已得到

广泛开发^[11-13]。使用基于 *sacB* 的基因组修饰系统(包括 pK18mobsacB 和 pBBR1MCS3 质粒), Chen 等成功整合并敲除了从活性污泥中分离出的 *Comamonas testosteroni* CNB-1 菌株中的基因, 并鉴定了受 MarR 型调节因子(GenR)调控的苯甲酰辅酶 A 和 3-羟基苯甲酸诱导型启动子 P_{genA} ^[14]。基于这些基因表达系统, 上述环境友好型细菌可以作为脱氮途径基因表达的理想底盘系统。

与不具有脱氮功能的菌株相比, 使用具有脱氮功能的菌株具有更多的优势。主要是因为脱氮微生物自身具有丰富的脱氮酶系, 具有更好的脱氮效果。然而, 以脱氮微生物为底盘细胞, 通过代谢工程强化脱氮功能的研究却鲜有报道。从活性污泥中分离的脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)是一种环境友好的 α -变形菌纲菌株, 属于典型的异养硝化好氧反硝化菌株(heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacteria, HN-AD), 其打破了传统反硝化必须在厌氧条件下进行的界限。在有氧条件下, 好氧反硝化菌可同时利用环境中的 O_2 和 NO_3^- 或者在进行反硝化过程中产生的中间代谢物(如 NO 和 N_2O)作为反应所需的电子受体, 进行反硝化反应, 最终生成气态氮化合物并同时去除污水中的 COD, 具有较好的脱氮能力, 是代谢工程改造的理想底盘^[15-16]。代谢工程改造首先需要遗传操作工具, 如表达质粒和启动子等。目前关于 *P. denitrificans* 的遗传操作工具报道较少。2009 年, Ind 等发现质粒 pIND₄ 可在 *P. denitrificans* 中表达^[17], 其主要包含 pMG170 骨架^[18]、lacIq^[19] 和来自 pJBA24 的 IPTG 诱导型启动子^[20], 经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)诱导后, 在 pIND₄ 上过表达的 CheY6 蛋白表达水平比未诱导菌株高约 3 倍^[17]。然而, 这种较低的倍数并不能满足代谢工程的各种要求。Kaczmarczyk 等利用组成型合成启动子

cumate 响应性的 CymR 阻遏蛋白和 CymR 操纵位点, 开发了一种 cumate 诱导型基因表达系统, 从而实现了 4 700 倍的诱导变化^[21]。此外, 脱氮副球菌属于 α -变形菌纲, Tett 等在 α -变形菌纲中建立了具有不同拷贝数的质粒 pLMB51 (低拷贝)和 pLMB509 (高拷贝)及其牛磺酸诱导表达启动子 P_{tauA} , 为脱氮副球菌中的基因表达提供了工具^[22]。尽管在以前的研究中取得了重大突破, 但目前仍然缺乏可在 *P. denitrificans* 中应用的氮素诱导型启动子或组成型启动子, 这限制了代谢工程改造的实施。

本研究室从活性污泥中分离出 1 株脱氮副球菌 *P. denitrificans* DYT_N-1, 具有良好的脱氮效果^[23]。在本研究中, 测定了 *P. denitrificans* DYT_N-1 的全基因组序列, 并挖掘出了 6 个内源性启动子, 可被 NO_2^- 、 NO_3^- 和 NH_4^+ 诱导。随后, 以 *P. denitrificans* DYT_N-1 为底盘细胞, 使用代谢工程方法强化了氮素降解功能。

1 材料与方法

1.1 菌株和菌株的培养

大肠杆菌(*E. coli*) JM109、*P. denitrificans* DYT_N-1 和 *E. coli* S17-1 λ pir 分别作为质粒克隆宿主、基因表达宿主和接合转移的辅助菌。LB 培养基用于培养大肠杆菌和 *P. denitrificans* DYT_N-1, 模拟污水培养基^[24] [10 g/L 甘油、0.5 g/L NaCl、6.78 g/L Na_2HPO_4 、3 g/L KH_2PO_4 、1 g/L NH_4Cl (或 1 g/L $NaNO_2$ 或 2 g/L KNO_3)、0.24 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、11.1 mg/L $CaCl_2$]用于 *P. denitrificans* DYT_N-1 的氮素降解测定。根据需要向培养基中加入氨苄青霉素(100 μ g/mL)、壮观霉素(50 μ g/mL)、四环素(50 μ g/mL)、氯霉素(50 μ g/mL)和卡那霉素(50 μ g/mL)。氮素测定时, 将 8 mL *P. denitrificans* DYT_N-1 培养过夜的种子液加入含有 200 mL 模拟污水培养基的锥形瓶(500 mL)

中,并在 30 °C 和 150 r/min 条件下培养,每隔 12 h 进行取样,检测菌体生长情况以及氮源消耗情况。其中,以野生菌株作为对照,携带重组质粒 pKCE-P_{1851-amoA}、pKCE-P_{1851-amoB} 和 pKCE-P_{1851-hao} 的 *P. denitrificans* DYTN-1 在以 NH₄Cl (1 g/L) 为氮源的模拟污水培养基中培养,携带重组质粒 pKCE-P_{1746-nirS} 的 *P. denitrificans* DYTN-1 在以 KNO₃ (2 g/L) 为氮源的培养基中生长。携带重组质粒 pKCE-P_{1851-hao}-P_{1746-nirS} 的 *P. denitrificans* DYTN-1 在以 NH₄Cl (1 g/L) 和 KNO₃ (2 g/L) 为氮源的模拟污水培养基中培养。

1.2 接合试验

表达重组质粒的 *E. coli* S17-1 λ pir 作为供体菌株, *P. denitrificans* DYTN-1 作为受体菌株。将 *E. coli* S17-1 λ pir 和 *P. denitrificans* DYTN-1 分别接种到含有 5 mL LB 培养基的试管中,并在 37 °C 和 30 °C 下培养过夜。第 2 天,分别 5 000 r/min 离心 2 min 收集 10⁸ CFU/mL 细胞,并用 LB 培养清洗 2 次,再使用 3:10 的比例 (*E. coli* S17-1 λ pir:*P. denitrificans* DYTN-1) 将细胞转移到同一管中混合,37 °C 下培养 30 min。随后,剧烈摇晃试管以破坏供体菌和受体菌之间的性菌毛连接,从而停止基因转移。最后,将 0.1 mL 的接合菌液涂布在壮观霉素和卡那霉素的双抗琼脂平板上筛选阳性克隆。

1.3 基因组测序、组装与注释

P. denitrificans DYTN-1 基因组测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。采用全基因组扩增策略构建不同插入片段的文库,使用 Qubit 3.0 和 Agilent 2100 对文库质量进行检测。检测合格后基于 PacBio 测序平台对这些文库进行测序,采用 HGAP 软件和 Falcon 软件对纯三代数据进行组装。采用 Prodigal 软件对细菌基因组进行基因预测。编码蛋白质的基因通过与 NR (Non-redundant) 数据库、KEGG (Kyoto Encyclopedia

of Genes and Genomes)、COG (Cluster of Orthologous Groups of Proteins) 数据库和 GO (Gene Ontology) 数据库进行 BLAST 比对,筛选条件为 $e\text{-value} \leq 1e^{-5}$, 获取比对得分最高的结果,完成蛋白序列功能注释。

1.4 质粒构建

DNA 聚合酶和限制酶购自 TaKaRa。使用质粒 pJKR-H-cdaR 作为模板^[25],使用引物对 sfGFP-F/sfGFP-R 对绿色荧光蛋白(sfGFP)基因碱基序列进行 PCR 扩增,并克隆到 pIND₄ 的 Nco I/Hind III 位点,生成 pIND₄-sfGFP 质粒。然后,使用 *P. denitrificans* DYTN-1 基因组 DNA 作为模板,内源启动子 P_{rpsU}、P₀₈₉₃、P₁₇₄₆、P₁₈₄₅、P₁₈₅₁ 和 P₄₁₃₀ 通过引物对 rpsu-F/rpsu-R、0893-F/0893-R、1746-F/1746-R、1845-F/1845-R、1851-F/1851-R 和 4130-F/4130-R 扩增获得,这些诱导型启动子被克隆到 pIND₄-sfGFP 中 sfGFP 的上游以替换 P_{A1/04/03},产生以下质粒:pKCE-P_{rpsU}-sfGFP、pKCE-P₀₈₉₃-sfGFP、pKCE-P₁₇₄₆-sfGFP、pKCE-P₁₈₄₅-sfGFP、pKCE-P₁₈₅₁-sfGFP 和 pKCE-P₄₁₃₀-sfGFP。

使用引物对 nirS-F/nirS-R 从 *P. denitrificans* DYTN-1 基因组 DNA 中扩增 nirS 基因。分别合成来自 *Nitrosomonas europaea*、*Nitrosomonas europaea* 和 *Nitrosomonas* sp. ENI-11 的 amoA、amoB 和 hao 基因。将 amoA、amoB、hao 和 nirS 的 CDS 序列插入 pKCE-P₁₈₅₁-sfGFP、pKCE-P₁₈₅₁-sfGFP、pKCE-P₁₈₅₁-sfGFP 和 pKCE-P₁₇₄₆-sfGFP 的 Nco I/Hind III 位点,分别生成 pKCE-P₁₈₅₁-amoA、pKCE-P₁₈₅₁-amoB、pKCE-P₁₈₅₁-hao 和 pKCE-P₁₇₄₆-nirS 质粒。使用引物对 1746nirS-F/1746nirS-R 从 pKCE-P₁₇₄₆-nirS 扩增包含 nirS 基因和调控其表达的启动子 P₁₇₄₆,再以 pKCE-P₁₈₅₁-hao 为质粒载体通过同源重组方式得到质粒 pKCE-P₁₈₅₁-hao-P₁₇₄₆-nirS。所有菌株、质粒和引物序列见表 1 和表 2。

表 1 研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Name	Properties	Sources
Strains		
<i>P. denitrificans</i> DYTN-1	Wild type, for gene expression	Lab preserved
<i>E. coli</i> JM109	Wild type, for plasmid construction	Lab preserved
<i>E. coli</i> S17- λ pir	Wild type, plasmid transfer helper strain	Lab preserved
Plasmids		
pIND ₄	ColE1 ori, oriT, repA, Kan ^R	Lab preserved
pIND ₄ -sfgfp	pIND ₄ carrying the gene sfgfp, Kan ^R	This study
pKCE-P _{rpsU} -sfgfp	pIND ₄ backbone, P _{rpsU} controlling the expression of sfgfp, Kan ^R	This study
pKCE-P ₀₈₉₃ -sfgfp	pIND ₄ backbone, P ₀₈₉₃ controlling the expression of sfgfp, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₇₄₆ -sfgfp	pIND ₄ backbone, P ₁₇₄₆ controlling the expression of sfgfp, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₈₄₅ -sfgfp	pIND ₄ backbone, P ₁₈₄₅ controlling the expression of sfgfp, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₈₅₁ -sfgfp	pIND ₄ backbone, P ₁₈₅₁ controlling the expression of sfgfp, Kan ^R	This study
pKCE-P ₄₁₃₀ -sfgfp	pIND ₄ backbone, P ₄₁₃₀ controlling the expression of sfgfp, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₈₅₁ -amoA	pIND ₄ backbone, P ₁₈₅₁ controlling the expression of amoA, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₈₅₁ -amoB	pIND ₄ backbone, P ₁₈₅₁ controlling the expression of amoB, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₈₅₁ -hao	pIND ₄ backbone, P ₁₈₅₁ controlling the expression of hao, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₇₄₆ -nirS	pIND ₄ backbone, P ₁₇₄₆ controlling the expression of nirS, Kan ^R	This study
pKCE-P ₁₈₅₁ -hao-P ₁₇₄₆ -nirS	pIND ₄ backbone, P ₁₈₅₁ controlling the expression of hao, P ₁₇₄₆ controlling the expression of nirS, Kan ^R	This study

表 2 研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
sfgfp-F	CCATGGTGCGTATAGGTGAAGAACTG	<i>Nco</i> I
sfgfp-R	AAGCTTAGAACTGGCATGCATC	<i>Hind</i> III
rpsu-F	GAGCTTCATTTACGGAACACCCC	
rpsu-R	GGCACTCTCCTCATTCTTCATGCC	
0893-F	GATTCCTCGGCCGACAGC	
0893-R	GACCGGCAGAGCGGACAG	
1746-F	GTCCAGCGACAGCTCGCC	
1746-R	GTCGGTTCGTCCTTTTCCTTGTTCC	
1851-F	CATCCTCGAGCTGCTGGG	
1851-R	ACTGCTATCCTGCCGCGG	
4130-F	TGGCGCAGATCGCGCATG	
4130-R	GAAGGCACCTCGGTCGCC	
nirS-F	ATGAGACAAAGGACCCCATTCG	
nirS-R	TCAATAGGTGTCGGTCATAGTGTTG	
1746nirS-F	GTCCAGCGACAGCTCGCC	
1746nirS-R	TCAATAGGTGTCGGTCATAGTGTTG	

1.5 氮素的定量检测

硝酸盐采用百里酚分光光度法(GB/T5750.5—2006), 氨氮采用纳氏试剂分光光度法(HJ 535—2009), 总氮采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(HJ 636—2012)。其中, 为保证数据的准确性, 菌液需经 5 000 r/min 离心 6 min 后取上清液进行硝酸盐和氨氮的测定。总氮测定时则不需离心处理, 直接对含有菌体和培养基的样品进行测定, 以同时测定被菌体同化吸收的氮素和培养基中残余氮素。同时, 氮素的测定均采用标准品进行标准曲线的绘制, 再根据标准曲线计算样品氮素的含量。测量时使用试剂盒进行硝酸盐(连华 LH-NO₃)、氨氮(连华 LH-NH₄)和总氮(连华 LH-NT)检测。所有测试均严格按照制造商的说明进行。

1.6 诱导型启动子的筛选和表征

将含有需要表征启动子的菌株 *P. denitrificans* DYTN-1 过夜活化后, 以 2% 的接种量接种至含 2 mL 模拟污水培养基(4 g/L 的甘油作为碳源)的 48 孔板中培养。在接种的同时分别添加不同浓度的氮源(蛋白胨、铵盐、亚硝酸盐和硝酸盐)进行菌株培养并诱导启动子表达, 诱导培养 48 h 后取出菌液并用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释, 以确保 OD₆₀₀ 在 0.2–0.8 范围内。在室温下使用 BioTek HT 酶标仪(Winooski)在 (485±20) nm 激发波长和(528±20) nm 发射波长下测定荧光强度。以荧光强度和 OD₆₀₀ 的比值表征启动子强度。

2 结果与分析

2.1 *P. denitrificans* DYTN-1 来源的氮素诱导型内源启动子筛选

作为代谢工程的重要元件, 启动子具有调节基因表达的关键作用^[26]。通常, 化合物分解代谢途径的基因表达受到分解代谢底物或中间

产物诱导^[27–28]。为了了解氮素降解相关代谢途径和功能, 挖掘受氮素诱导的启动子用于后续代谢工程调控, 我们对 *P. denitrificans* DYTN-1 进行了全基因组测序。分析发现, 共有 3 765 个基因被分配到 6 个主要的 KEGG 途径和 40 个子途径中(图 1)。代谢是 6 种主要 KEGG 途径中最大的一类。在所有子途径中, 碳水化合物代谢(489 条基因, 占比 12.99%)是最大的类别, 其次是氨基酸代谢(471 条基因, 占比 12.51%)、全局和概览图(407 条基因, 占比 10.81%)、膜转运(349 条基因, 占比 9.27%)、能量代谢(270 条基因, 占比 8.50%)和细胞群落—原核生物(189 条基因, 占比 5.02%)。*P. denitrificans* DYTN-1 的基因功能注释为探索基因组研究中基因产物的特定生物过程、功能、亚细胞定位和途径提供了基础。

根据 Giannopoulos 等^[29]的报道, 泛醌生物合成蛋白 COQ9、粪卟啉原 III 氧化酶、细胞色素 c 过氧化物酶、核苷二磷酸激酶、细胞色素 c 氧化酶 cbb3 型亚基 III 和信号转导组氨酸激酶与氮素降解代谢密切相关。通过氨基酸比对发现, *P. denitrificans* DYTN-1 基因组中基因 *rpsU*、*1851*、*0893*、*1746*、*1845* 和 *4130* 与泛醌生物合成蛋白 COQ9、粪卟啉原 III 氧化酶、细胞色素 c 过氧化物酶、核苷二磷酸激酶、细胞色素 c 氧化酶 cbb3 型亚基 III 和信号转导组氨酸激酶同源性高达 100%。因此, 这 6 个基因上游启动子可能是受氮素诱导的启动子。选取基因 CDS 上游 400 bp 序列作为候选启动子^[29], 选定的启动子序列包括核心启动子区域(–10 区和–35 区)、5′-非翻译区(5′ untranslated region, 5′-UTRs)和核糖体结合位点(ribosome bind site, RBS)区域, 可直接克隆到靶基因 CDS 区域进行表达。

在 *P. denitrificans* DYTN-1 中, 利用 NH₄⁺、NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 作为诱导剂诱导 6 种启动子启动 sfGFP 蛋白的表达, 蛋白胨作为阴性对照, 研

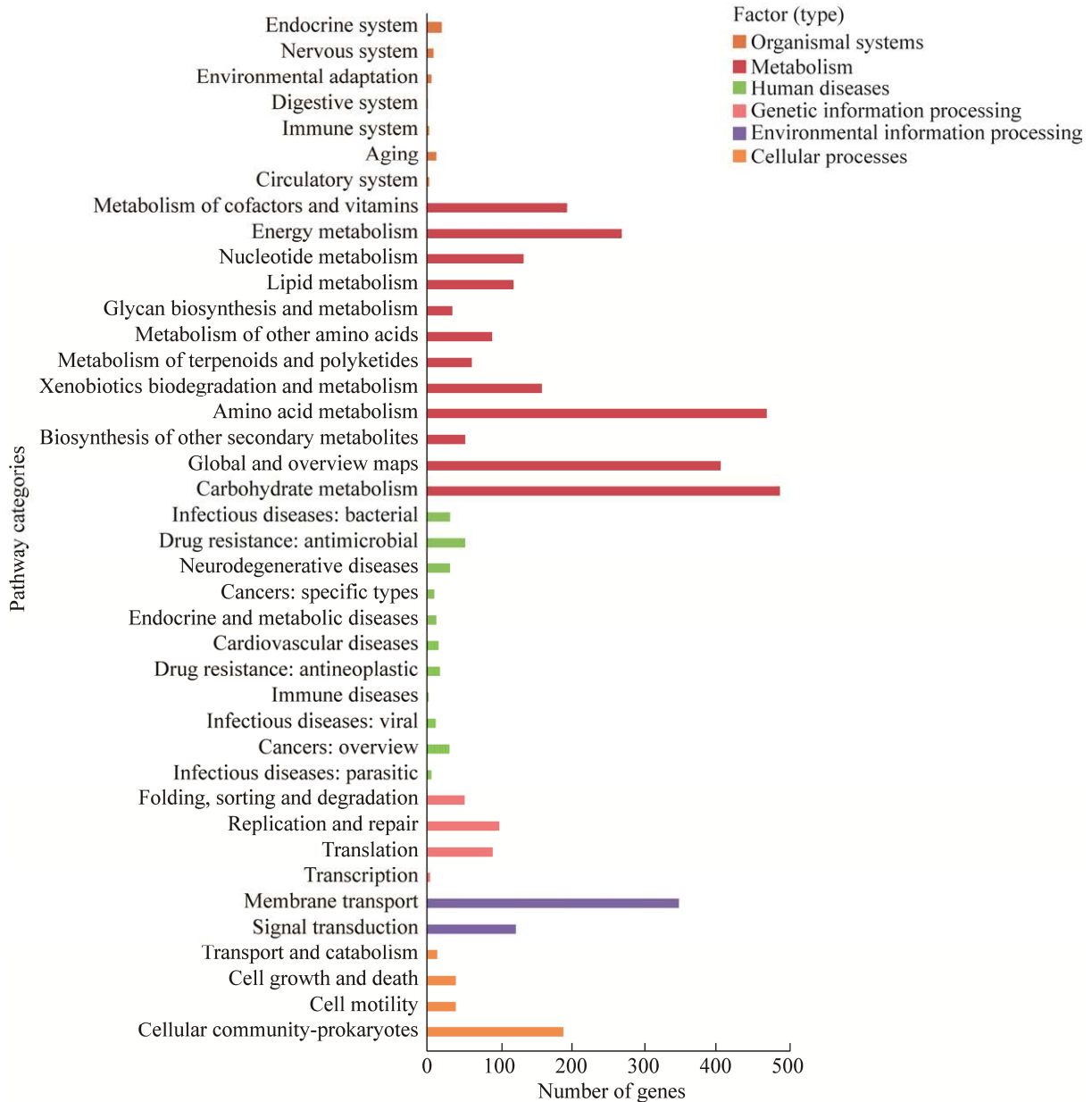


图 1 脱氮副球菌 DYTN-1 基因的 KEGG 通路富集分析

Figure 1 KEGG pathway enrichment analysis for the *Paracoccus denitrificans* DYTN-1 genes. A total of 3 765 genes were assigned to 6 major KEGG pathways and 40 sub-pathways.

究所选启动子对氮素的诱导性能。发现蛋白脲诱导后启动子启动的 sfGFP 蛋白表达水平非常低，而在无机氮存在下 sfGFP 表达水平较高。具体而言， P_{0893} 对 NO_2^- 、 NO_3^- 和 NH_4^+ 的有效响应范围分别为 250–2 000 mg/L、750–2 000 mg/L 和

500–750 mg/L (图 2A)。 NO_2^- 诱导产生 15 倍的表达差异，并且在 NO_2^- 浓度和诱导强度之间表现出线性关系，然而对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的反应相对较低。 P_{1851} 对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的有效响应范围为 250–2 000 mg/L 和 500–2 000 mg/L，分别产生

9 倍和 13 倍的诱导变化(图 2B)。P₁₇₄₆ 对 NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 的有效响应范围分别为 250–2 000 mg/L 和 100–2 000 mg/L, NO₂⁻ 只产生很低水平的表达差异。NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 的诱导分别产生了 19 倍和 16 倍的表达差异, NO₃⁻ 浓度和诱导强度之间

存在线性关系(图 2C)。P₄₁₃₀ 对 NO₂⁻、NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 的有效响应范围分别为 50–2 000 mg/L、50–2 000 mg/L 和 75–2 000 mg/L。其中, NH₄⁺ 浓度在 750–2 000 mg/L 之间的表达差异明显提高, 最终达到最高表达差异 11 倍(图 2D)。P₁₈₄₅

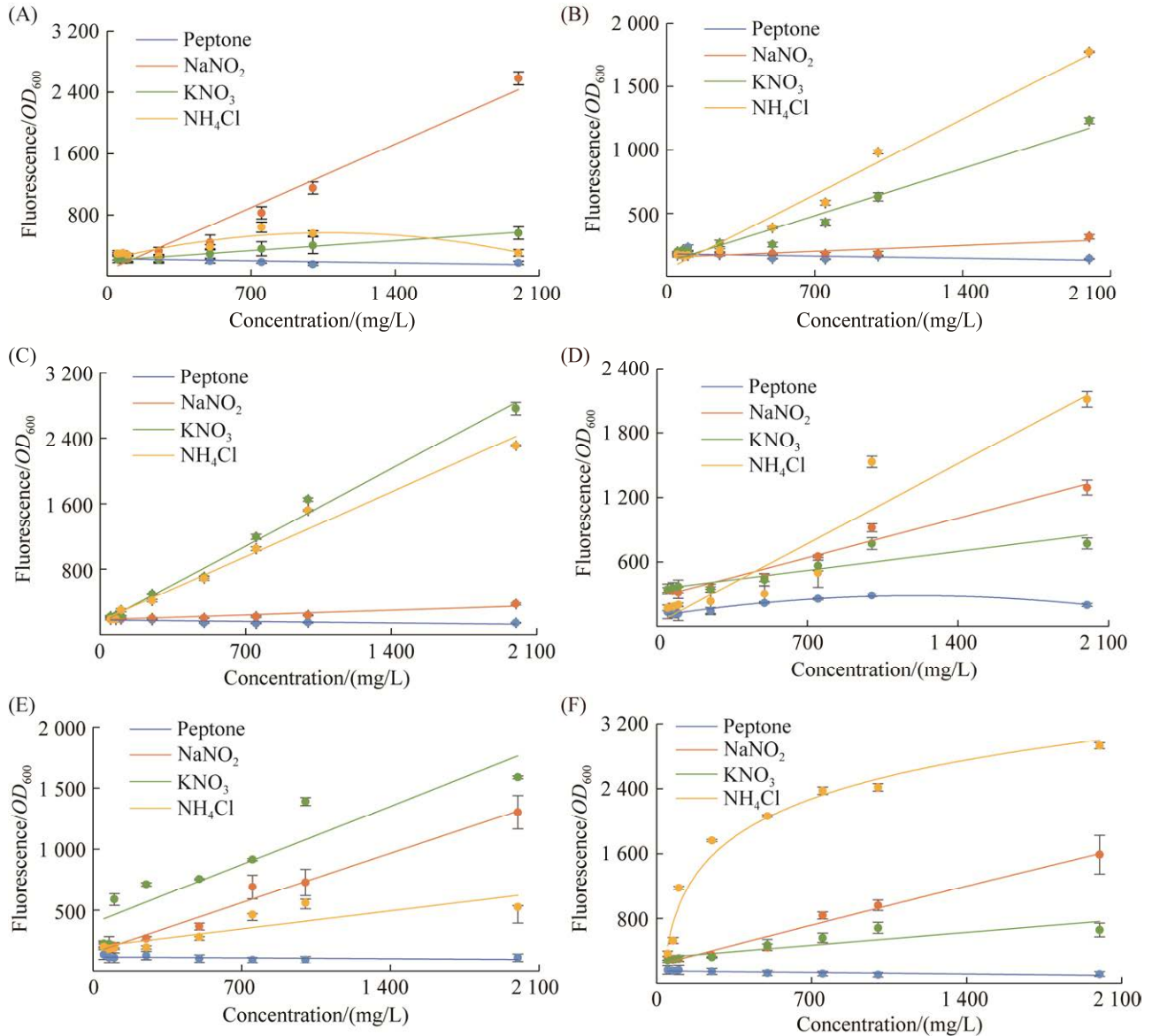


图 2 不同启动子受 NO₂⁻、NO₃⁻ 和 NH₄⁺ 诱导的剂量曲线

Figure 2 Induction dose curves of different promoters induced by NO₂⁻, NO₃⁻ and NH₄⁺. A–F: induction dose curves for P₀₈₉₃ (A), P₁₈₅₁ (B), P₁₇₄₆ (C), P₄₁₃₀ (D), P₁₈₄₅ (E), and P_{psU} (F) using different nitrogen induction sources. Peptone did not induce promoter expression and was used as a control. The inducer concentration range that could generate 1.5-fold to highest of induction fold change was defined as the effective response range. Data represents the mean and standard deviation for three replicates.

对 NO_2^- 、 NO_3^- 和 NH_4^+ 的有效响应范围分别为 50–2 000 mg/L、50–1 000 mg/L 和 75–1 000 mg/L。 NO_2^- 和 NO_3^- 的诱导分别产生 11 和 15 倍的诱导变化(图 2E)。 P_{rpsU} 对 NO_2^- 、 NO_3^- 和 NH_4^+ 的有效响应范围分别为 50–2 000 mg/L、50–1 000 mg/L 和 50–2 000 mg/L。其中, 低浓度的 NH_4^+ (50–2 000 mg/L) 明显提高了诱导强度, 表现出 NH_4^+ 浓度与表达差异的线性关系, 最终在 2 000 mg/L 时达到最高的表达差异, 为 26 倍(图 2F)。 P_{rpsU} 的有效响应下限为 50 mg/L, 远低于 P_{1851} 、 P_{0893} 、 P_{1746} 、 P_{1845} 和 P_{4130} 。因此, P_{rpsU} 启动子具有通过监测氨氮浓度变化来动态调节脱氮基因表达的潜力。

2.2 以 *P. denitrificans* DYTN-1 为底盘的代谢工程改造可行性研究

P. denitrificans DYTN-1 是从活性污泥中分离出来的天然菌株^[23], 其基因操作特性依然未知。为探究 *P. denitrificans* DYTN-1 作为底盘细胞的可行性, 首先研究了它的抗生素耐受性, 以确认接合过程的阳性克隆筛选标记。结果发现, *P. denitrificans* DYTN-1 对壮观霉素耐受, 但对氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素和四环素不耐受。相比之下, *E. coli* S17-1 λ pir 对所有测试的抗生素都敏感(图 3A)。同时, *P. denitrificans* DYTN-1 的生长几乎不受壮观霉素浓度的影响, 而 *E. coli* S17-1 λ pir 的生长受壮观霉素影响较大, 在壮观霉素为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可完全抑制 *E. coli* S17-1 λ pir 的生长(图 3B–C)。因此, 使用壮观霉素搭配氯霉素、卡那霉素、四环素或氨苄青霉素, 制备双抗生素琼脂平板, 用于在接合后筛选阳性 *P. denitrificans* DYTN-1 克隆。接合研究表明, pIND₄^[17] 成功转移到 *P. denitrificans* DYTN-1 中并产生了较高的接合效率(图 3D)和 70% 的阳性率(图 3E)。

异源质粒的遗传稳定性是另一个评估遗传

可操作性的关键指标。利用 *P. denitrificans* DYTN-1 的内源启动子 P_{rpsU} 控制 pIND₄ 质粒中 sfGFP 蛋白的表达, 并构建了 pKCE- P_{rpsU} -sfGFP 质粒。结果发现, pKCE- P_{rpsU} -sfGFP 质粒在 10 轮传代培养中保持高水平的稳定性(图 4)。根据荧光分析, pKCE- P_{rpsU} -sfGFP 在 *P. denitrificans* DYTN-1 中的荧光值离散系数稳定在 0.12 ± 0.02 。脱氮副球菌 DYTN-1 中稳定的 sfGFP 表达表明该质粒系统可在菌株中稳定复制和遗传表达, 从而表现出良好的遗传稳定性。总体而言, 上述研究表明 *P. denitrificans* DYTN-1 具有作为代谢工程底盘细胞强化氮素降解的潜力。

2.3 代谢工程强化 *P. denitrificans* DYTN-1 脱氮

氨单加氧酶(AMO)、羟胺氧化酶酶(HAO)、硝酸盐还原酶(NAR)、亚硝酸盐还原酶(NIRS)、NO 还原酶和 N_2O 还原酶是氨氮经硝化和反硝化作用转化为氮气的催化酶(图 5A)^[30]。其中, AMO 和 HAO 分别在催化 NH_4^+ 转化为 NH_2OH 和 NH_2OH 转化为 NO_2^- 的硝化作用中起着不可或缺的作用。此外, NirS 负责将 NO_2^- 还原为 NO。由于 NAR 的电子亲和力高于 NirS, 在反硝化过程中电子优先传递给 NAR 从而还原 NO_3^- , NO_2^- 还原受到 NirS 活性的限制。因此, NirS 是反硝化过程的限速步骤^[31]。为了强化 *P. denitrificans* DYTN-1 的脱氮功能, 以 pKCE- P_{1851} -sfGFP 为载体过表达 *amoA*、*amoB* 和 *hao*, 以 pKCE- P_{1746} -sfGFP 为载体表达 *nirS*。

为了构建高效脱氮菌株并加速脱氮过程, 分别选择受 NH_4^+ 和 NO_3^- 诱导型中等强度启动子 P_{1851} 和 P_{1746} 来控制 *amoA*、*amoB*、*hao* 和 *nirS* 的表达。从而当环境中 NH_4^+ 浓度过高时诱导启动硝化途径的基因表达, 在 NO_3^- 积累过高时诱导启动反硝化途径基因表达, 即可避免在没有 NH_4^+ 或 NO_3^- 污染时的基因过量表达给细胞造

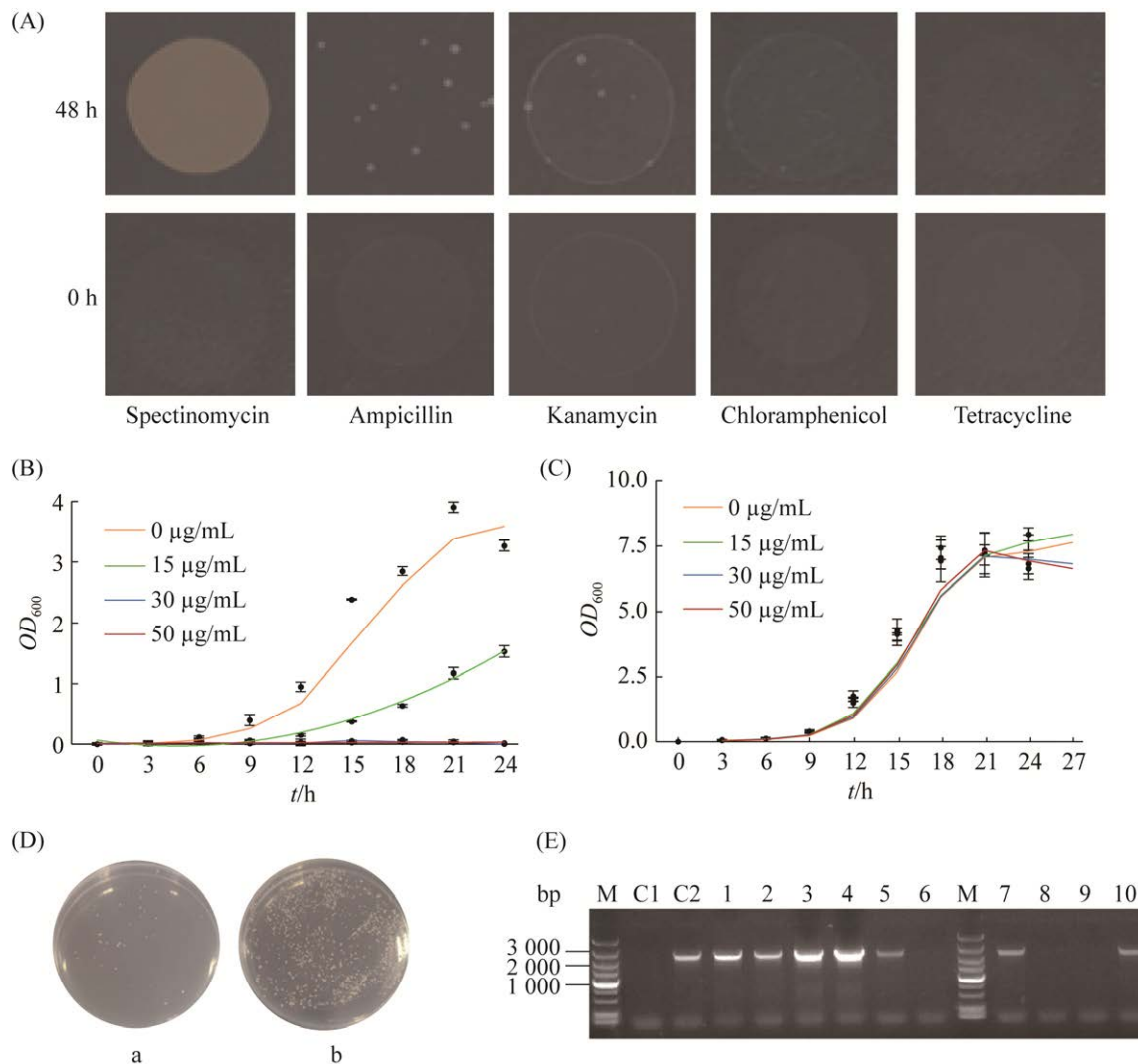


图 3 验证 *P. denitrificans* DYTN-1 接合的可行性

Figure 3 Testing *P. denitrificans* DYTN-1 conjugation feasibility. A: *P. denitrificans* DYTN-1 growth on different antibiotic plates. B: growth of *E. coli* S17-1λpir in media containing different concentrations of spectinomycin. Data represents the mean and standard deviation for three replicates. C: growth of *P. denitrificans* DYTN-1 in media containing different concentrations of spectinomycin. Data represents the mean and standard deviation for three replicates. D: the conjugative transformation efficiency of *P. denitrificans* DYTN-1. Empty and pIND₄ containing *E. coli* S17-1λpir cells were used for conjugative transformation. The dense colonies on the agar plate (right) show a high conjugation efficiency. a: *P. denitrificans* DYTN-1 growth on double antibiotic antibacterial plates (spectinomycin 30 $\mu\text{g/mL}$ and kanamycin 50 $\mu\text{g/mL}$), b: *P. denitrificans*-pIND₄ growth on double antibiotic antibacterial plates. *P. denitrificans*-pIND₄: *P. denitrificans* DYTN-1 strain carrying plasmid pIND₄. E: assessment the positive rate of conjugation transformation by colony PCR. M: marker. C1: negative control. C2: positive control. Target band is 2 485 bp. After colony PCR, we found 7 positive colonies in 10 candidates, thus indicating the positive rate is 70% (7/10).

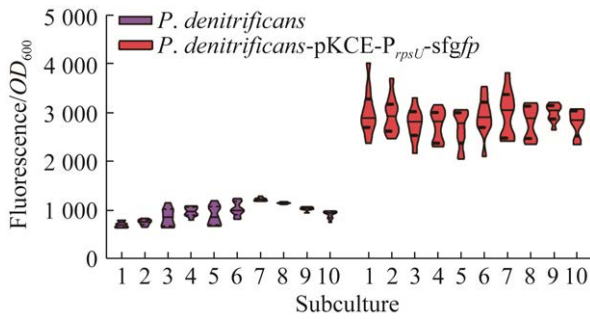


图 4 外源质粒的稳定性分析

Figure 4 Stability analysis of heterogeneous plasmids. The coefficient of dispersion (c) was the ratio of the standard deviation (σ) of a set of data to its corresponding mean (μ). This is a relative indicator for measuring the degree of data dispersion. It is mainly used to compare the degree of dispersion of different groups of data. $c = \sigma/\mu$. Each violin plot contains 10 parallel data.

成的代谢负担，也可实现脱氮副球菌对氮素污染的实时监控和强化降解。实验数据表明，在处理的前 20 h，工程菌株的氨氮去除率高于野生型(图 5B)。处理 20 h 后，残留氨氮水平约为 250 mg/L，低于启动子对 NH_4^+ 的有效响应下限，对启动子 P_{1851} 诱导作用减弱，将会导致 *amoA*、*amoB* 和 *hao* 表达水平降低。因此，20 h 后 *amoA*、*amoB* 和 *hao* 过表达与野生型菌株的脱氮率相似。最终，用过表达 *hao* 的工程菌处理后，培养基中 NH_4^+ 残留了 2.4 mg/L，是野生型菌株的 35%。

我们还利用 NO_3^- 诱导型启动子 P_{1746} 过表达 *nirS* 来增强反硝化作用。处理 24 h 后，*nirS* 过表达菌株中培养基中 NO_3^- 的残余量为野生型菌株的 67% (图 5C)。处理 36 h 后， NO_3^- 残留

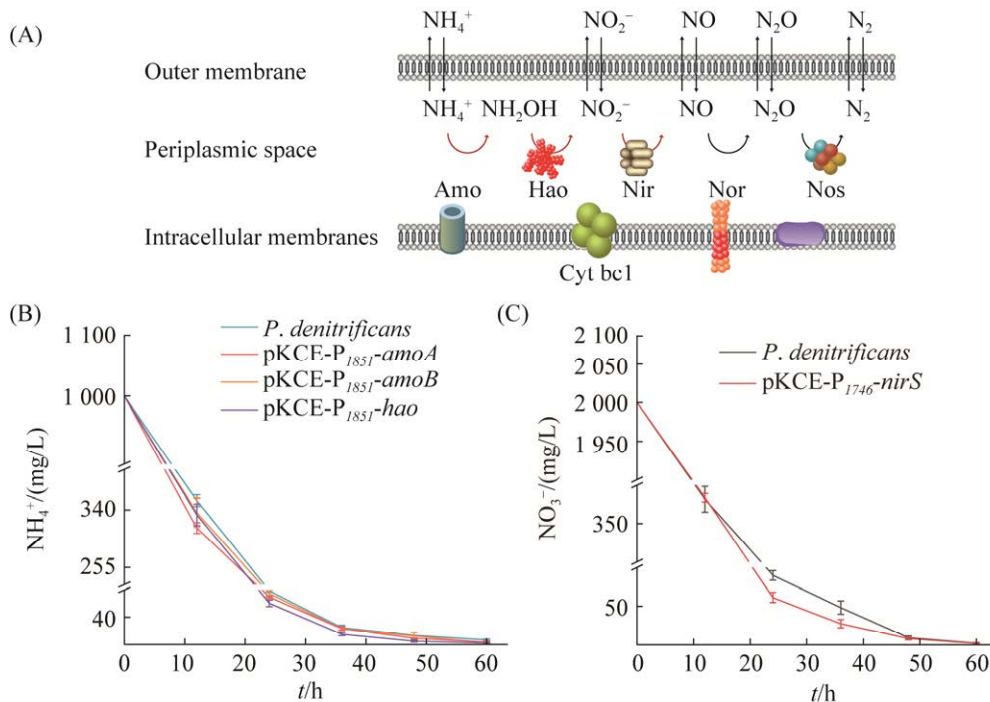


图 5 代谢工程强化 *P. denitrificans* DYTN-1 硝化和反硝化途径基因表达

Figure 5 Metabolic engineering enhances nitrification and denitrification pathway gene expression in *P. denitrificans* DYTN-1. A: metabolic engineering enhances the nitrogen metabolism pathway. NOR: nitric oxide reductase; NOS: nitrous oxide reductase; Cyt bc1: cytochrome bc1. Red arrows represent overexpressed genes. B: changes in NH_4^+ during treatment. Data represents the mean and standard deviation for three replicates. C: NO_3^- changes during treatment. Data represents the mean and standard deviation for three replicates.

量约为 25 mg/L, 低于 P_{1746} 启动子对 NO_3^- 的有效响应下限, 从而导致质粒上的 *nirS* 基因表达关闭, 仅有基因组的原生 *nirS* 基因表达, 工程菌株的反硝化速率降低到与野生菌相似。最终, 在处理 60 h 后, *nirS* 过表达的工程菌株培养基中的 NO_3^- 残余量为 1.9 mg/L。

在硝化反应进程中过表达 *hao* 的工程菌促进 NH_4^+ 降解效果较好。因此, 为了进一步加强氮素降解, 构建了质粒 pKCE- P_{1851} -*hao*- P_{1746} -*nirS*, 在 *P. denitrificans* DYTN-1 中同时过表达 *hao* 和 *nirS* 基因, 以达到同时促进硝化和反硝化反应的目的。处理 12 h 后, 培养基中 NH_4^+

和 NO_3^- 的残余率分别为 41.2% 和 11.5%, 其中 NO_3^- 残留量为 229.74 mg/L, 是野生菌株的一半, 且远小于仅单过表达 *nirS* 的工程菌处理 12 h 后 NO_3^- 的剩余量(图 6A-B)。最终, 同时过表达 *hao* 和 *nirS* 基因的重组菌株处理 60 h 后总氮(包含被细胞同化的氮素)残留了 113.9 mg/L, 是野生菌株的 51%, 处理前后的总氮减少了 437.9 mg/L, 降解效率达 79.5% (图 6C)。培养基中 NH_4^+ 和 NO_3^- 分别残余 83.8 mg/L 和 8.4 mg/L。

通过上述强化硝化和反硝化途径发现 NO_3^- 比 NH_4^+ 更容易降解, 这可能与 *amoA*、*amoB* 和 *hao* 均来自自养硝化菌有关。由于 *P. denitrificans*

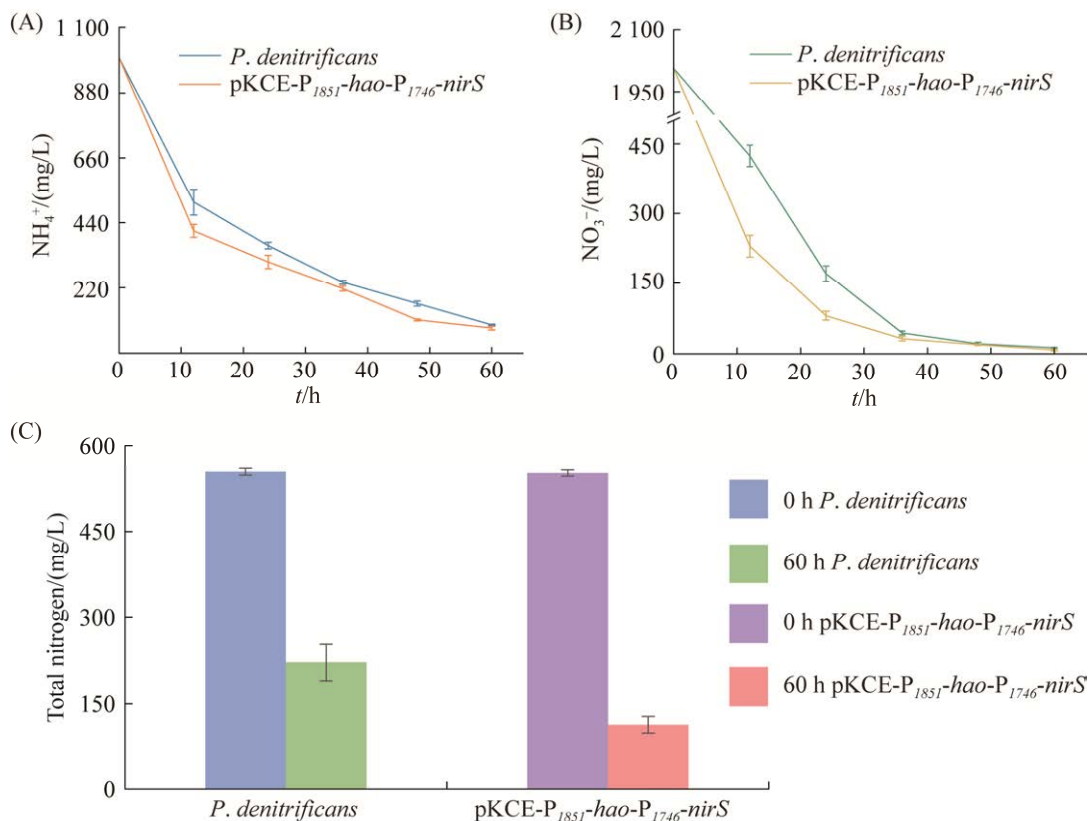


图 6 同时过表达 *hao* 和 *nirS* 强化 *P. denitrificans* DYTN-1 的脱氮能力

Figure 6 Simultaneous overexpression of *hao* and *nirS* genes enhanced the nitrogen removal ability of *P. denitrificans* DYTN-1. A: changes in NH_4^+ during treatment. B: NO_3^- changes during treatment. C: residual total nitrogen levels at 60 h of treatment in the *hao* and *nirS* overexpressed strain. Data represents the mean and standard deviation for three replicates. pKCE- P_{1851} -*hao*- P_{1746} -*nirS*: *P. denitrificans* DYTN-1 carrying plasmid pKCE- P_{1851} -*hao*- P_{1746} -*nirS*.

是一类经典的异养硝化好氧反硝化菌，在基因组中尚未发现与自养硝化菌的 *amoA*、*amoB* 和 *hao* 同源的基因，而 *amoA* 需要 *amoB* 等基因的协同以及电子传递链的配合才能行使氨氧化功能。因此单独过表达 *amoA* 或 *amoB* 对 NH_4^+ 的降解强化效果有限。

3 讨论与结论

P. denitrificans 是研究好氧反硝化的模型菌株，其优越的脱氮性能备受研究者们关注。然而，由于遗传操作困难和缺乏遗传操作工具，导致以 *P. denitrificans* 为底盘进行代谢工程改造的报道较少。本研究应用 *P. denitrificans* DYTN-1 作为底盘细胞，挖掘出 6 个不同氮素诱导的内源性启动子，并验证了遗传操作的可行性。最后，成功地强化了 *P. denitrificans* DYTN-1 的硝化和反硝化过程，脱氮能力显著增强。

目前，很少有研究构建脱氮副球菌的表达系统。基于 pIND_4 和 $\text{P}_{\text{Q5}}^{[21]}$ 质粒的 IPTG 和 *cumate* 诱导系统是目前 2 种可用的表达系统。 pIND_4 质粒来源于 *Rhodobacter blasticus* 内源质粒 pMG160 ，主要包括 *mobS*、*mobL* 和 *repA*，*mobS* 和 *mobL* 与接合质粒的细胞间穿梭有关，*repA* 与质粒复制密切相关。 pIND_4 的 IPTG 诱导仅产生 3 倍的诱导变化，不利于基因高强度表达。基于 P_{Q5} 的质粒具有显著的高诱导变化，但外源添加诱导剂无疑会增加环境的负担。本研究发现， pIND_4 具有较高的稳定性，然而这些质粒较大(7 500–10 900 bp)，限制了多个基因在同一质粒上的表达。因此，进一步进行质粒结构简化将有助于未来的应用。

NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 是水体中的主要氮污染物^[32]。因此，筛选响应这些无机盐的启动子对于优化脱氮相关基因的表达至关重要，可以用

于设计和构建复杂的动态脱氮途径^[33]。具体来说，当氮污染物在环境中积累过多时， NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 诱导型启动子开始表达，从而启动硝化或反硝化途径基因表达，强化氮素降解功能。当没有氮污染物积累时，可以降低表达水平以节省细胞的物质和能量。

目前，*P. denitrificans* 的研究主要集中在生理、生化和功能研究上。使用以 *P. denitrificans* 为底盘的代谢工程改造研究鲜有报道。本研究利用内源性启动子在氮素诱导条件下促进了硝化和反硝化过程，为进一步挖掘基因调控工具和强化氮素降解提供了方法和思路，也为环境废水中的基因工程菌株应用提供了参考。

参考文献

- [1] Eneji AE. Review of current status and research approaches to nitrogen pollution in farmlands. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(7): 843–849.
- [2] Schullehner J, Hansen B, Thygesen M, Pedersen CB, Sigsgaard T. Nitrate in drinking water and colorectal cancer risk: a nationwide population-based cohort study. *International Journal of Cancer*, 2018, 143(1): 73–79.
- [3] Zuo R, Chen XJ, Li XB, Shan D, Yang J, Wang JS, Teng YG. Distribution, genesis, and pollution risk of ammonium nitrogen in groundwater in an arid loess plain, northwestern China. *Environmental Earth Sciences*, 2017, 76(17): 1–16.
- [4] Ghafari S, Hasan M, Aroua MK. Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater—a review. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10): 3965–3974.
- [5] Wang SJ, Loh KC. New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol. *Water Research*, 2000, 34(15): 3786–3794.
- [6] Sun XW, Chen L, Liu C, Xu Y, Ma W, Ni H. Biodegradation of CP/TCP by a constructed microbial consortium after comparative bacterial community analysis of long-term CP domesticated activated sludge. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2020, 55(10): 898–908.

- [7] Fulekar MH. Microbial degradation of petrochemical waste-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, 4(1): 28.
- [8] Samanta S, Bhushan B, Jain R. Efficiency of naphthalene and salicylate degradation by a recombinant *Pseudomonas putida* mutant strain defective in glucose metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(5): 627–631.
- [9] Atkinson BW, Mudaly DD, Bux F. Contribution of *Pseudomonas* spp. to phosphorus uptake in the anoxic zone of an anaerobic-anoxic-aerobic continuous activated sludge system. *Water Science and Technology*, 2001, 43(1): 139–146.
- [10] Gabriel AG, Maurilio LF, Jesús Genaro SM, Angel Isidro CC, Antonio LG. The use of probiotics in aquatic organisms: a review. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(23): 4845–4857.
- [11] Guan CR, Cui WJ, Cheng JT, Zhou L, Liu ZM, Zhou ZM. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 66.
- [12] Weir SC, Lee H, Trevors JT. Effect of selected disinfectants on the persistence and movement of a genetically engineered *Pseudomonas* sp. in soil. *Systematic and Applied Microbiology*, 1996, 19(3): 421–427.
- [13] Merroun ML, Raff J, Rossberg A, Hennig C, Reich T, Selenska-Pobell S. Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5532–5543.
- [14] Chen DW, Zhang Y, Jiang CY, Liu SJ. Benzoate metabolism intermediate benzoyl coenzyme A affects gentisate pathway regulation in *Comamonas testosteroni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(13): 4051–4062.
- [15] Trögl J, Boušková A, Mrákota J, Pilařová V, Krudencová J, Měchurová J, Kříženecká S, Stloukal R. Removal of nitrates from simulated ion-exchange brines with *Paracoccus denitrificans* encapsulated in Lentikats biocatalyst. *Desalination*, 2011, 275(1/3): 82–86.
- [16] Zhang H, Li S, Ma B, Huang T, Qiu H, Zhao Z, Huang X, Liu K. Nitrate removal characteristics and ¹³C metabolic pathways of aerobic denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans* Z195. *Bioresource Technology*, 2020, 307: 123230.
- [17] Ind AC, Porter SL, Brown MT, Byles ED, De Beyer JA, Godfrey SA, Armitage JP. Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(20): 6613–6615.
- [18] Inui M, Nakata K, Roh JH, Vertès AA, Yukawa H. Isolation and molecular characterization of pMG160, a mobilizable cryptic plasmid from *Rhodobacter blasticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 725–733.
- [19] Graupner S, Wackernagel W. A broad-host-range expression vector series including a Ptac test plasmid and its application in the expression of the *dod* gene of *Serratia marcescens* (coding for ribulose-5-phosphate 3-epimerase) in *Pseudomonas stutzeri*. *Biomolecular Engineering*, 2000, 17(1): 11–16.
- [20] Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjørn SP, Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(6): 2240–2246.
- [21] Kaczmarczyk A, Vorholt JA, Francez-Charlot A. Cumate-inducible gene expression system for sphingomonads and other *Alphaproteobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(21): 6795–6802.
- [22] Tett AJ, Rudder SJ, Bourdès A, Karunakaran R, Poole PS. Regulatable vectors for environmental gene expression in *Alphaproteobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(19): 7137–7140.
- [23] Zhao Y, Lu W, Liu Y, Wang J, Zhou S, Mao Y, Li G, Deng Y. Efficient total nitrogen removal from wastewater by *Paracoccus denitrificans* DYT-1. *Letters in Applied Microbiology*, 2020, 70(4): 263–273.
- [24] Hahnke SM, Moosmann P, Erb TJ, Strous M. An improved medium for the anaerobic growth of *Paracoccus denitrificans* Pd₁₂₂₂. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 18.
- [25] Ding NN, Yuan ZQ, Zhang XJ, Chen J, Zhou SH, Deng Y. Programmable cross-ribosome-binding sites to fine-tune the dynamic range of transcription factor-based biosensor. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(18): 10602–10613.
- [26] Ren G, Jin W, Cui K, Rodriguez J, Hu G, Zhang Z, Larson DR, Zhao K. Ctf-mediated enhancer-promoter interaction is a critical regulator of cell-to-cell variation of gene expression. *Molecular Cell*, 2017, 67(6): 1049–1058.

- [27] Sun HH, Zhao HM, Ang EL. A new biosensor for stilbenes and a cannabinoid enabled by genome mining of a transcriptional regulator. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(4): 698–705.
- [28] Fernandez-López R, Ruiz R, De La Cruz F, Moncalián G. Transcription factor-based biosensors enlightened by the analyte. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 648.
- [29] Giannopoulos G, Sullivan MJ, Hartop KR, Rowley G, Gates AJ, Watmough NJ, Richardson DJ. Tuning the modular *Paracoccus denitrificans* respirome to adapt from aerobic respiration to anaerobic denitrification. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(12): 4953–4964.
- [30] Deng M, Zhao X, Senbati Y, Song K, He X. Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas* sp. DM02: removal performance, mechanism and immobilized application for real aquaculture wastewater treatment-science direct. *Bioresource Technology*, 2020, 322: 12455.
- [31] Hallin S, Lindgren PE. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65(4): 1652–1652.
- [32] Camargo JA, Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 2006, 32(6): 831–849.
- [33] Gupta A, Reizman IMB, Reisch CR, Prather KLJ. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(3): 273–279.