



微生物脱氮与希瓦氏菌异化硝酸盐还原途径抉择机制

刘亚琦^{1,2}, 魏贺红³, 戴景程⁴, 刘双元⁵, 邱东茹^{1*}

1 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 河北工程大学 能源与环境工程学院, 河北 邯郸 056038

4 武汉轻工大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430023

5 生态环境部珠江流域南海海域生态环境监督管理局, 生态环境监测与科学研究中心, 广东 广州 510000

刘亚琦, 魏贺红, 戴景程, 刘双元, 邱东茹. 微生物脱氮与希瓦氏菌异化硝酸盐还原途径抉择机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4656-4668.

LIU Yaqi, WEI Hehong, DAI Jingcheng, LIU Shuangyuan, QIU Dongru. Microbial nitrogen removal and the molecular mechanisms underlying modulation and switching of dissimilatory nitrate reduction pathways in *Shewanella* strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4656-4668.

摘要: 工业固氮和化学氮肥的广泛使用极大地提升了作物产量、缓解了粮食危机, 然而所造成的氮污染问题严重影响人类健康和生存环境。氮污染的净化主要依赖于微生物驱动的氮循环, 近30多年来, 先后发现了厌氧氨氧化、完全氨氧化和直接氨氧化等无机氮代谢新途径。希瓦氏菌属(*Shewanella*)是目前已知的所有细菌中呼吸系统最丰富的微生物类群之一, 且广泛分布于自然生境中, 在微生物燃料电池和环境生物修复方面均具有潜在应用价值。本文从希瓦氏菌的硝酸盐还原酶系统、第二信使环状腺苷酸(cyclic AMP, cAMP)受体蛋白(cAMP receptor protein, Crp)的调控以及硝酸盐还原途径的调控和抉择机制等方面出发阐述希瓦氏菌中反硝化脱氮(denitrification)和硝酸盐异化还原成铵(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)的分子调控机制, 旨在为理解水圈微生物驱动的氮循环机制和研发环境保护新工艺提供参考。

关键词: 微生物脱氮; 希瓦氏菌; 环状腺苷酸受体蛋白(Crp); 反硝化脱氮; 硝酸盐异化还原成铵(DNRA)

资助项目: 国家自然科学基金(91751106); 中国科学院中国-斯里兰卡水技术研究与示范联合中心项目(Y72Z261)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (91751106) and the Program of China-Sri Lanka Joint Research and Demonstration Center for Water Technology, Chinese Academy of Sciences (Y72Z261).

*Corresponding author. Tel: +86-27-68780215, E-mail: qiu@ihb.ac.cn

Received: 2024-11-12; Accepted: 2024-11-22

Microbial nitrogen removal and the molecular mechanisms underlying modulation and switching of dissimilatory nitrate reduction pathways in *Shewanella* strains

LIU Yaqi^{1,2}, WEI Hehong³, DAI Jingcheng⁴, LIU Shuangyuan⁵, QIU Dongru^{1*}

1 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 School of Energy and Environmental Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei, China

4 School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China

5 Eco-Environmental Monitoring and Research Center, Pearl River Valley and South China Sea Ecology and Environment Administration, Ministry of Ecology and Environment, Guangzhou 510000, Guangdong, China

Abstract: Although the large scale of industrial nitrogen fixation and chemical nitrogen fertilizer application have increased crop yields and alleviated food crisis, the excess discharge of nitrogen nutrients have affected the environment and human health. The treatment of nitrogen contamination is largely dependent on the nitrogen cycle driven by microorganisms. In the last three decades, researchers have discovered the inorganic nitrogen metabolism pathways such as anaerobic ammonia oxidation (Anammox), complete ammonia oxidation (Comammox), and direct ammonia oxidation (Dirammox). *Shewanella*, a genus of known bacteria with abundant respiration pathways, are ubiquitous in natural habitats and have potential applications in both microbial fuel cells and environmental bioremediation. In this review, we described the modulation mechanisms of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium pathways in *Shewanella* from the nitrate reductase systems, regulation of the cyclic AMP (cAMP) receptor proteins (Crp), and modulation and switching of nitrate reduction pathways, aiming to give insights into the microbial-driven nitrogen cycling mechanism in the hydrosphere and the development of novel biotechniques and bioreactors for the removal and mitigation of nitrogen pollution.

Keywords: microbial denitrification; *Shewanella*; cyclic AMP (cAMP) receptor proteins (Crp); denitrification; dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA)

氮元素是生命活动的基本元素，在自然界中有着广泛的分布和形态。自然界中不同形式的氮元素通过复杂的循环过程维持着全球生态系统的平衡和稳定^[1-2]。氮循环起始于氮的固定，在人类文明出现前生物固氮是地球上的主要固氮途径，估计每年为陆地上提供约 90–130 Tg (百万吨)氮营养元素^[3-5]。随着全球人口爆炸式地增长，自然固氮较低的效率满足不了全球对

氮元素的消耗，人工固氮技术(也称合成氨技术)发明以后，在全世界的推广应用极大地提高了作物的产量，为缓解粮食危机、满足全球日益增长的人口需求作出了巨大贡献^[6]。然而，工业固氮和氮肥的大量施用造成越来越多的活性氮(包括氨气、硝酸盐、氮氧化物等)向大气或水体中过量迁移，使自然界中固氮和脱氮作用间的原有平衡遭到破坏，氮循环也因此被严重

扰乱, 开始出现病态, 进而导致温室效应、水体富营养化及土壤酸化等一系列生态环境问题, 严重影响人类的生存^[7-9]。氮污染的去除主要依赖于微生物驱动的氮循环^[9]。希瓦氏菌属(*Shewanella*)是目前已知的所有细菌中无氧呼吸系统最丰富的微生物之一, 可以利用多种电子受体进行无氧呼吸, 在生态环境的生物修复中具有潜在的应用价值, 是研究微生物氮循环的理想材料^[10]。本文从多个方面对希瓦氏菌中的异化硝酸盐还原途径抉择的分子调控机制进行了阐述和总结, 旨在为生物脱氮及环境修复提供参考。

1 微生物与氮循环

1.1 微生物在氮循环中的作用

自然界中的微生物在氮循环中扮演着重要角色, 几乎所有的氮循环过程都有微生物的参与, 如固氮作用(nitrogen fixation)、硝化作用(nitrification)、反硝化作用(denitrification)、氨化作用(ammonification)、铵同化作用(assimilation of ammonium)等^[11-12](图 1)。自然界中的微生物

具有极高的生物多样性和无限潜力, 为适应复杂而多变的环境, 不同微生物进化出特有的代谢调控机制, 如完全氨氧化(complete ammonia oxidation, Comammox)菌的发现打破了 100 多年来氨(NH_4^+)氧化为硝酸盐(NO_3^-)需要氨氧化菌(ammonia-oxidizing archaea/bacteria, AOA/AOB)和亚硝酸盐氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)共同参与的认知^[13]。早在 2006 年, Costa 等^[14]预测可能存在完全氨氧化菌, 多年以后才被证实^[13,15], 这也表明只要一个化学反应过程在热力学上是可行的, 必然会有相应的微生物进化出相关机制进行代谢和生长。因此, 微生物必将在解决人类面临的环境和能源问题等方面发挥更大的作用。

1.2 微生物参与的脱氮途径

参与氮循环的微生物根据代谢途径的不同分为不同的功能类群, 如氨氧化菌、硝化细菌、反硝化细菌、固氮菌和厌氧氨氧化菌等, 这些功能微生物不仅是地球元素循环的驱动泵, 更是水环境处理工艺中除磷脱氮的主要角

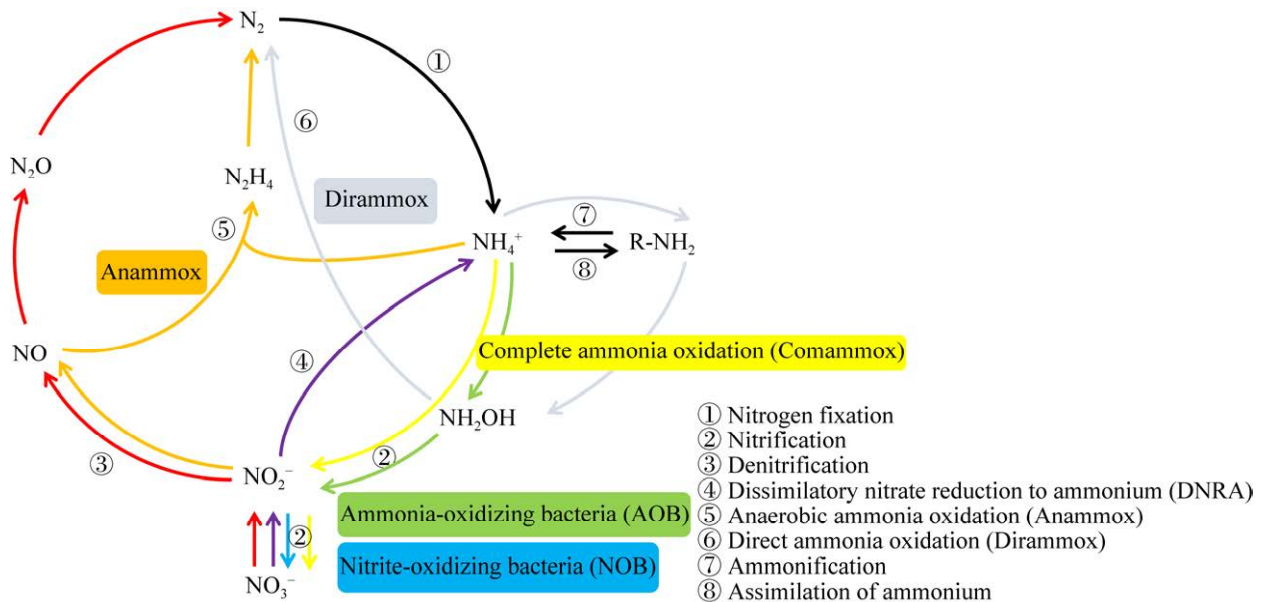


图 1 微生物驱动的氮循环途径

Figure 1 Nitrogen cycle pathways driven by microorganisms.

色^[11-12,16]。目前已知的微生物参与的脱氮途径主要有 3 种(图 2): 硝化-反硝化(nitrification-denitrification)脱氮途径、厌氧氨氧化(anaerobic ammonia oxidation, Anammox)途径和直接氨氧化(direct ammonia oxidation, Dirammox)途径。

硝化-反硝化脱氮途径是微生物最普遍的脱氮方法, 全球范围内城市污水处理厂广泛采用的厌氧(anaerobic)-缺氧(anoxic)-好氧(aerobic)生物化学处理工艺(简称 AAO 或者 A²O 工艺)就是基于活性污泥微生物驱动的硝化-反硝化脱氮途径, 既可脱氮, 又可除磷^[17]。该途径通常包括硝化细菌所介导的硝化作用和反硝化菌所介导的反硝化作用 2 个阶段。第 1 阶段的硝化反应通常在好氧条件下进行, 氨(NH₄⁺)先被氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, Amo)和羟胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, Hao)氧化为亚硝酸盐(NO₂⁻), 接着在亚硝酸盐氧化还原酶(nitrite oxidoreductase, Nxr)的催化下氧化为硝酸盐(NO₃⁻)^[18-19]。此阶段可由氨氧化菌(AOA/AOB)和亚硝酸盐氧化菌(NO₂)共同完成, 也可由完全氨氧化菌(Comammox)独立执行。第 2 阶段的反硝化作用通常在缺氧条件下进行, NO₃⁻在硝酸盐还原酶(nitrate reductase) Nap 和 Nar 催化下先被还原为 NO₂⁻, 然后在可溶性含铜亚硝酸还原酶(nitrite reductase) NirK 或者细胞色素 *cd1* 亚硝酸还原酶 NirS 催化下还原为一氧化氮(NO), 接着在一氧化氮还原酶系(nitric oxide reductase) NorB 和 NorC 的催化下还原为一氧化二氮(N₂O, 也叫氧化亚氮), 最后在一氧化二氮还原酶(nitrous-oxide reductase) NosZ 的催化下还原为氮气(N₂)^[20-22]。此外, 硝化反应所产生的中间产物 NO₂⁻可直接参与反硝化作用, 称之为短程硝化-反硝化(single reactor high activity ammonia removal over

nitrite, SHARON)^[23-24]。

早前认为硝酸盐/亚硝酸盐的还原只能在厌氧条件下进行, 氧气会抑制硝酸盐/亚硝酸盐的呼吸作用, 随着研究的深入, 研究人员发现有些菌在有氧条件下也可以进行硝酸盐/亚硝酸盐还原, 最典型的是利用氧气和硝酸盐进行呼吸的泛养硫球菌[(*Thiosphaera pantotropha*, 现改名为脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)]^[25-26]。这些好氧反硝化菌与厌氧反硝化菌不同, 前者是利用周质空间硝酸盐还原酶 Nap 系统进行有氧硝酸盐还原, 而后者是利用与细胞膜结合的 NarA 系统进行厌氧硝酸盐的还原^[27]。

第二种微生物脱氮途径是厌氧氨氧化(Anammox)途径。早在 1977 年就有科学家通过化学反应热力学计算预言微生物可能存在厌氧氨氧化现象^[28], 随后, 荷兰 Delft 理工大学 Kuenen 教授团队经过多年努力, 最终通过富集培养、流化床反应器以及同位素标记等手段证明了厌氧氨氧化现象的存在, 并成功培养了高产量的厌氧氨氧化菌^[29]。厌氧氨氧化是一种在无氧条件下, 以 NH₄⁺为电子供体, 以 NO₂⁻为电子受体, 将 NH₄⁺氧化为 N₂的过程(图 2)^[30], 其中一氧化氮(NO)和联氨(N₂H₄)是重要的反应中间体, NO 在联氨合成酶(hydrazine synthase, Hzs)的催化下将氨氧化为 N₂H₄, 后者在联氨氧化酶(hydrazine oxidoreductase, Hzo)的催化下转化为 N₂^[31-32]。厌氧氨氧化细菌不仅广泛分布于淡水湖泊和湿地中, 在海洋氮循环中也具有重要功能^[33-34], 尽管厌氧氨氧化在工艺和适用范围上存在巨大的困难, 但其工艺的研究和开发方兴未艾。

直接氨氧化途径(Dirammox)是近年来中国科学院微生物研究所在产碱菌属(*Alcaligenes*)中发现的一条新的脱氮途径, 即氨(NH₄⁺)先被

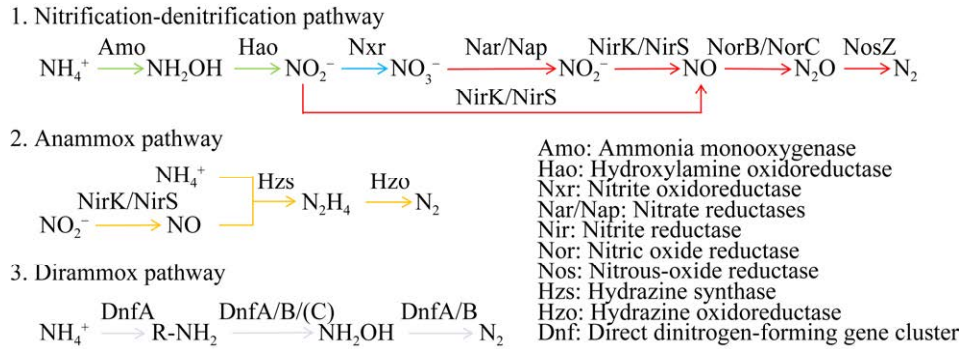


图 2 微生物参与的脱氮途径及其关键酶

Figure 2 Nitrogen removal pathways and key enzymes involved in microorganisms.

转化为有机氮化合物(R-NH_2), 然后被直接氨氧化(direct dinitrogen-forming, Dnf)基因簇氧化为羟胺(NH_2OH), 所产生的羟胺可被 *dnfAB* 基因直接催化氧化为 N_2 ^[35-36]。除产碱杆菌属以外, 直接氨氧化(Dirammox)现象也广泛存在于以假单胞菌属(*Pseudomonas*)为代表的 γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*)和以代尔夫特菌属(*Delftia*)为代表的 β -变形杆菌纲(*Betaproteobacteria*)中, 并受溶氧水平的调控^[37]。

相比于厌氧氨氧化和直接氨氧化途径, 存在于大多数微生物中的反硝化脱氮途径不仅可以减少水体中 NH_4^+ 含量, 还能减少水体中 NO_3^- 和 NO_2^- 含量, 更有利于环境氮循环的平衡。然而, 土壤或水体中的 NO_3^- 或 NO_2^- 还存在另一种异化还原途径, 即异化型硝酸盐还原成铵(dissimilatorily nitrate reduction to ammonium, DNRA)途径^[38]。DNRA 一般在厌氧条件下进行, NO_3^- 被硝酸盐还原酶催化还原为 NO_2^- 后, 未被 NirK/NirS 还原为 NO, 而是被细胞色素 *c* 亚硝酸还原酶(nitrite reductase) NrfA 催化还原为 NH_4^+ , 产生的 NH_4^+ 可以被微生物和藻类同化吸收(图 1)^[38]。DNRA 是缺氧条件下许多微生物进行无氧呼吸的主要途径, 与反硝化脱氮反应竞争 NO_3^- 和 NO_2^- 底物^[38]。具有反硝化脱氮或 DNRA 能力的菌群在自然界中广泛存在, 甚至

有些菌株同时存在这 2 种异化硝酸盐还原途径^[38]。揭示反硝化脱氮和 DNRA 途径间的竞争机制有利于实现人为控制反硝化脱氮。希瓦氏菌的呼吸系统具有多样性, 有的仅具有反硝化脱氮途径, 有的仅具有 DNRA 途径, 也有的同时具有反硝化脱氮途径和 DNRA 途径, 是研究反硝化脱氮和 DNRA 途径抉择机制的良好材料, 受到国内外专家学者的广泛关注^[10]。本课题组也对希瓦氏菌异化硝酸盐还原途径进行了大量研究。因此, 本文对希瓦氏菌异化硝酸盐还原的分子调控机制进行总结。

2 希瓦氏菌属中硝酸盐还原的分子机制研究

希瓦氏菌属(*Shewanella*)是一类广泛分布于海洋、淡水、沉积物和地层等多种环境的微生物, 它们以呼吸系统的多样性和嗜冷性而闻名, 既能在有氧气条件下利用氧气进行呼吸, 也能在厌氧条件下利用金属离子和各种有机物进行异化还原, 是目前已知的所有细菌中呼吸策略最丰富的微生物之一, 在生物电池的开发以及生物修复、降解中具有很高的研究价值^[10,39]。希瓦氏菌属菌株多为兼性厌氧微生物, 也是探究硝酸盐还原及其他氮代谢途径的理想材料。

2.1 希瓦氏菌中硝酸盐还原酶 Nap 系统的研究

硝酸盐还原为亚硝酸盐是硝酸盐异化还原反应的第一步,通常是在硝酸盐还原酶的催化下完成的。从已测序的希瓦氏菌的基因组分析和实验结果看,不同种类的硝酸盐还原系统差异较大^[40]。大多数希瓦氏菌属细菌基因组中含有 2 个编码周质空间硝酸盐还原酶的基因簇,即 NapEDABC (Nap α) 和 NapDAGHB (Nap β)^[40]。然而,也有些种类的硝酸盐还原酶系统简化,如奥奈达湖希瓦氏菌(*S. oneidensis*) MR-1 菌株仅拥有 Nap β ,脱氮希瓦氏菌(*S. denitrificans*) OS217 菌株仅拥有 Nap α ^[40]。

在奥奈达湖希瓦氏菌 MR-1 菌株中,NO₃⁻ 先被 NapA (由操纵子 NapDAGHB 和基因 *napF* 编码)催化还原成 NO₂⁻,接着被 NrfA 催化还原成 NH₄⁺^[41]。然而,反应过程中出现了 NO₂⁻ 的积累现象,有人猜测可能是因为 NrfA 对氧气敏感,使其表达晚于 NapA,但菌株 MR-1 中 NapA (唯一的硝酸盐还原酶)和 NrfA 是同时表达的。Gao 等^[42]研究发现,菌株 MR-1 基因组中的 CymA (*c* 型细胞色素的一种,负责将电子传递给末端还原酶)首选电子接受蛋白是 NapB,推测可能是 NapB 将电子挟持先传递到 NapA (因为敲除菌株 MR-1 的 *napB* 基因后 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 的还原发生耦联),然后再将电子传递给 NrfA,使 NapA 比 NrfA 更早地得到电子,因而产生 NO₂⁻ 积累的现象。与 MR-1 菌株不同,脱氮希瓦氏菌 OS217 菌株在厌氧条件下可以利用 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 为电子受体进行反硝化产生 N₂O 或者 N₂^[43]。在 OS217 菌株中,硝酸盐还原酶是由 NapEDABC 基因簇(Nap α)编码的,依赖于 NapC (一种膜锚定的四血红素 Nac/NirT 家族的 *c* 型细胞色素)传递电子至 NapB^[40]。

因此,有人推测依赖于 NapC 传递电子的 Nap α (NapEDABC)可能与反硝化途径耦联,而依赖于 CymA 获取电子的 Nap β (NapDAGHB)主要参与硝酸盐还原成铵途径(DNRA)^[40]。然而,Chen 等^[44]在同时拥有 2 个硝酸盐还原酶 Nap 基因簇的耐压希瓦氏菌(*S. piezotolerans*) WP3 菌株中发现 Nap α (NapEDABC)和 Nap β (NapDAGHB) 2 个操纵子均参与 DNRA 途径;2 种体系均在厌氧条件下被硝酸盐诱导表达,而在有硝酸盐的好氧情况下均不表达;此外,相较于野生型 WP3 菌株,敲除 Nap β 基因簇中 *napA* 基因的突变株在硝酸盐呼吸中更具优势。由此,Chen 等^[44]推测 Nap 的进化趋势可能为 Nap β (NapDAGHB)作为原型起初存在,后来获得 Nap α (NapEDABC)而形成 Nap β 和 Nap α 共同存在的状态,最后进化的方向可能是 Nap α 。

基因组分析显示腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*) W3-18-1 中同时拥有 Nap α 和 Nap β 基因簇^[40],Wei 等以该菌株为研究对象,发现在 W3-18-1 菌株中,虽然 NapC 和 CymA 是附着于细胞质膜的高度同源的 *c* 型细胞色素,负责将电子传递至其他细胞色素或末端还原酶,但两者在硝酸盐还原中的功能并不等同;NapC 和 CymA 两者都参与 DNRA,但前者只能将电子传递至 Nap α ,而后者可以将电子传递至 Nap α 、Nap β 和 NrfA^[45]。这与 Chen 等在菌株 WP3 中的研究结果一致,即在菌株 WP3 中,CymA 非特异性地传递电子给 Nap α 和 Nap β ,而 NapC 更倾向于将电子传递给 Nap α ,当硝酸盐被完全消耗后,CymA 直接将电子传递给 NrfA,CymA 是唯一传递给 NrfA 的电子传递蛋白^[44]。进一步研究发现,CymA 中的第 91 位的赖氨酸(Lys-91)残基、第 97 位的天冬氨酸(Asp-97)残基和第 166 位的天冬氨酸(Asp-166)

残基在硝酸盐和亚硝酸盐还原中起关键作用, Asp-166影响CymA的成熟, Lys-91影响CymA从醌库获取电子, 而Asp-97可能是影响CymA与NapB和NrfA的相互作用的关键因素之一, 这些结果说明同源性高的细胞色素在与其他蛋白质的相互作用方面存在差异, 其细胞功能的不同不仅取决于基因表达上的不同, 更取决于基因组成上的差异^[45]。

2.2 环状腺苷酸(cyclic AMP, cAMP)受体蛋白(cAMP receptor protein, Crp)在希瓦氏菌硝酸盐还原中的调控机制

第二信使环状腺苷酸(cyclic AMP, cAMP)是细胞内参与调节物质代谢和多种生物学功能的重要信号分子, 与细菌适应环境变化能力的调节密切相关^[46]。细菌cAMP通常与其受体蛋白(cAMP receptor protein, Crp)结合形成cAMP-Crp复合体来发挥转录调控功能^[46-47]。由于Crp或其同源蛋白广泛存在于不同细菌中, 因此cAMP-Crp的调控作用在细菌中具有普遍性^[46]。希瓦氏菌(*Shewanella*)利用硝酸盐作为电子受体进行呼吸时也受到第二信使环状腺苷酸(cAMP)受体蛋白Crp的调控^[48]。不同的微生物中通常含有2-4个编码Crp家族蛋白的基因, 大多数希瓦氏菌中通常存在的是编码Crp1 (b3357)和Crp3 (b1334)的相关基因^[49]。

Saffarini等^[50]在希瓦氏菌MR-1菌株中(仅拥有Nap β)发现环状腺苷酸(cAMP)受体蛋白Crp(SO_0624)的缺失会导致厌氧硝酸盐还原酶活性的丧失, 他们也在硝酸盐还原酶操纵子上找到了Crp结合位点, 这表明在无反硝化作用的希瓦氏菌MR-1菌株中, Crp在厌氧呼吸调节中发挥重要作用^[50]。在希瓦氏菌的染色体上, Nap α 操纵子上游区域缺乏Crp的结合位点, 而Nap β 操纵子和nrfA基因序列上游存在Crp结合位点^[50-51]。Chen等^[44]也发现耐压希瓦氏菌WP3

菌株中的Nap α 和Nap β 操纵子具有不同的控制机制。与菌株MR-1不同, 敲除crp(Sputw3181_3522)基因的W3-18-1突变株仍能进行硝酸盐还原。然而, 同时敲除crp基因和napa基因簇时, 双突变株的生长受到限制, 这表明napa基因簇的转录不受第二信使环状腺苷酸(cAMP)受体蛋白Crp的调控, 在微氧条件下硝酸根即可诱导其表达, 且要早于Nap β ^[51]。因此, 菌株W3-18-1的硝酸盐还原反应比仅拥有Nap β 基因簇的MR-1菌株相对提前, 前者在氧气未耗尽之前即可进行反应, 这种看似功能冗余的呼吸系统(拥有2个硝酸盐还原基因簇Nap α 和Nap β)使得菌株W3-18-1可以更好地适应氧气含量较高的环境, 不仅如此, 菌株W3-18-1比菌株MR-1含有更多的末端氧化酶、较少的c型细胞色素和末端还原酶, 这些基因簇的细小差异可能增强了希瓦氏菌株的生态适应性^[51]。

然而, 这些研究仅表明Crp家族蛋白在异化硝酸盐还原成铵(DNRA)途径中起到重要的调控作用, 但Crp家族蛋白在反硝化脱氮途径中的调控尚不清楚。因此, 本课题组在同时拥有Nap α 和Nap β 这2个异化硝酸盐还原成铵的基因簇, 以及编码有反硝化脱氮相关基因(即同时拥有DNRA和反硝化脱氮途径)的罗希海山希瓦氏菌(*S. loihica*)PV-4菌株中, 通过框内缺失敲除基因的方法, 构建crp缺失突变株(菌株PV-4中包含4个crp同源物)来研究Crp蛋白在异化硝酸盐呼吸途径抉择中的功能。研究发现, 在菌株PV-4及其他反硝化细菌中, crp1(Shew_0585)及其旁系同源基因crp2(Shew_3331)可能都参与2个竞争性的异化硝酸盐还原途径, 即Crp1可能参与DNRA途径的调节, 而Crp2可能参与反硝化脱氮途径。在罗希海山希瓦氏菌PV-4菌株中, 发现参与DNRA的相关基因簇如nap β (NapDABGH)、nrfA(编码将亚硝酸盐还原为铵

的亚硝酸盐还原酶)和 *cymA* 的转录水平可被 Crp1 上调, 而参与反硝化的 *nirK* (编码将亚硝酸盐还原为 NO 的亚硝酸盐还原酶)的转录则依赖于 Crp2。通过构建一系列缺失突变体, 也进一步发现 *crp1* 的缺失影响 *nrfA* 基因的转录, 而参与反硝化的 *nirK*、*norBC* 和 *nosZ* 基因的转录显著上调, 同时也加速了亚硝酸盐还原为一氧化氮(NO); *crp2* 的缺失不仅阻断了 NO 的产生, 也影响 *nirK* 基因的转录, 这表明 Crp1 对于反硝化途径并非必不可少, 它实际上抑制了 NO 和 N₂O 的产生, *crp1* 的缺失在关闭 DNRA 途径的同时也开启了反硝化途径; 而 Crp2 参与反硝化脱氮途径的转录调节^[49]。此外, 基因组分析发现, 具有反硝化作用的脱氮希瓦氏菌 OS217 菌株和亚马逊河希瓦氏菌 (*S. amazonensis*) SB2B 菌株等的基因组中也含有 *crp2*, 而大多数非反硝化菌中不存在 *crp2*, 这表明 Crp2 及 NirK/NirS 通常在反硝化菌中编码^[49]。

综上所述, Crp 家族蛋白参与调控希瓦氏菌中异化硝酸盐还原途径。大多数希瓦氏菌中含有 2 个编码 Crp 蛋白(Crp1 和 Crp3)的基因, 少数希瓦氏菌中含有 3-4 个编码基因。Crp1 几乎存在于所有的希瓦氏菌中, 主要参与 DNRA 途径, 调控 *napβ* 基因簇、*nrfA* 和 *cymA* 基因的表达; Crp2 仅存在于具有反硝化作用的希瓦氏菌中, 调控 *nirK*、*norBC* 和 *nosZ* 基因的表达。此外, *napa* 基因簇的表达不受 Crp 家族蛋白的调控。

2.3 希瓦氏菌中反硝化脱氮和异化硝酸盐还原成铵途径抉择的分子机制

Costa 等^[14]在对微生物的生长速率(growth rate)和生长量(growth yield)之间的权衡机制(trade-off)进行模拟时发现, 微生物的生长速率通常偏向于较短代谢途径(产生 ATP 的速率快, 因而生长速率快), 而其生长量通常偏向于较长代谢途径(ATP 生成步骤多, 产能量高,

因而生长量高)。由此推断, 在拥有不同氮代谢途径的环境微生物中, 硝酸盐还原中的 DNRA (2 步反应)可以提高 ATP 的生成速度, 进而提高生长速率, 反硝化脱氮途径则通过多个产能步骤(4 步反应), 最大限度地提高能量产量和生长量。理论计算也显示 DNRA 和反硝化脱氮这 2 种硝酸盐还原过程相应的自由能变化比有氧呼吸分别降低 35%和 7%, 似乎反硝化脱氮过程产生的 ATP 要远高于 DNRA^[52]。然而, Strohm 等^[52]用不同细菌种类进行的细胞纯培养实验结果表明, 脱氮副球菌(*P. denitrificans*) DSM 65^T 和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) DSM 5190^T 等反硝化细菌通过 ATP 转化的生长量不但远低于上述的理论计算值, 甚至低于产琥珀酸沃林氏菌(*Wolinella succinogenes*) DSM 1740^T 和德氏硫化螺旋菌(*Sulfurospirillum deleyianum*) DSM 6946^T 等通过 DNRA 所合成的细胞质量。与 Strohm 等用不同细菌种类所做的比较研究不同, Yoon 等^[53]以同时拥有反硝化脱氮和 DNRA 途径的罗希海山希瓦氏菌 PV-4 菌株为研究对象, 发现碳氮比(C/N)、温度、pH 等都会影响硝酸盐还原代谢途径的选择, 即高 C/N 时(NO₃⁻为限制条件), *nirK* 基因和 *nosZ* 基因(编码 N₂O 还原酶)的转录水平降低, 导致 DNRA 途径占主导地位; 低 C/N 时, 电子供体的限制不仅增加了 *nirK* 基因和 *nosZ* 基因的转录水平, 也降低了 *nrfA* 基因的转录水平, 使反硝化脱氮途径占优势; 在高温和高 pH (碱性)条件下, *nrfA* 基因表达水平上调, 更有利于 DNRA 途径, 而低温和低 pH (酸性)条件更有利于反硝化脱氮。

本课题组在前期工作中发现, 罗希海山希瓦氏菌 PV-4 菌株中 Crp1 参与 DNRA 途径的调控, 而 Crp2 参与反硝化脱氮途径^[49]。在此研究基础上, 分别敲除 DNRA 途径和反硝化脱氮途径相关基因, 比较这些来源于同一野生型菌株

具有相同遗传背景的突变株的生长速率和生长量,发现缺失 *crp1* 和 *nirK* 基因的 PV-4 双突变株因 NO_2^- 还原为 NH_4^+ 和 NO 均被阻断,几乎不能在硝酸盐为氮源和电子受体的培养基中生长。相比之下,在不同 C/N 和无氧条件下, PV-4 野生型菌株(具有 DNRA 和反硝化途径)和缺失 *nirK* 基因的 PV-4 突变株(只具有 DNRA 途径)最初的生长速度最快,而缺失 *crp1* 基因的 PV-4 突变株(只具有反硝化途径)最终的产量最高。也就是说,野生型和缺失 *nirK* 基因的单突变株的 DNRA 途径生长速率最高,但生长量略低,而缺失 *crp1* 基因的单突变株通过反硝化途径的生长速率较低,但生长量较高。在低 C/N 和高 C/N 的有氧条件下,这一趋势更加明显^[49]。Liu 等通过计算生物能量证实了这一结果(图 3),即低 C/N (碳源为限制性因子),反硝化途径中每摩尔乳酸氧化产生的自由能高于 DNRA 途径,前者占优势;高 C/N (氮源为限制性因子),反硝化途径中每摩尔硝酸盐还原产生的自由能低于 DNRA 途径,后者占优势^[49]。

3 总结与展望

自然界中的许多细菌可以同时拥有多种氮代谢和氮循环途径,而且催化同一步骤的酶或

酶系也不同,甚至还存在表面上看起来功能冗余的旁系同源基因。微生物的这些途径可响应不同的环境条件和营养水平而起作用,并且受到细菌信号转导途径的紧密调控,以充分利用限制性的碳源(电子供体)或者氮源(电子受体)来进行生长和繁殖,提高种群存活几率。

不同 C/N 不仅影响希瓦氏菌异化硝酸盐还原途径的抉择,也影响环境中具有异化硝酸盐还原能力的菌群的分布。研究表明高 C/N 更有利于经 DNRA 途径还原硝酸盐的微生物分布^[54]。此外,大分子碳水化合物(单糖)的水解也影响着环境中异化硝酸盐还原途径的选择,即当以葡萄糖(单糖)为碳源时, DNRA 途径优于反硝化途径;当以蔗糖(二糖)为碳源时, DNRA 效率降低,硝酸盐主要通过反硝化途径还原转化;当使用更难以降解的碳源纤维素(多糖)为底物时,几乎观察不到 DNRA 活性,这是由于缓慢可生物降解的底物提供更少的稳定碳源,导致反硝化作用比 DNRA 更受青睐^[55]。不仅如此,水环境中参与异化硝酸盐还原的菌群分布也受到沉积物中盐度和垂直深度的影响,即深层(30 cm 以上)和淡水沉积物中普遍存在 DNRA 优势,浅层(30 cm 以内)和咸水沉积物中反硝化占主导^[54,56]。

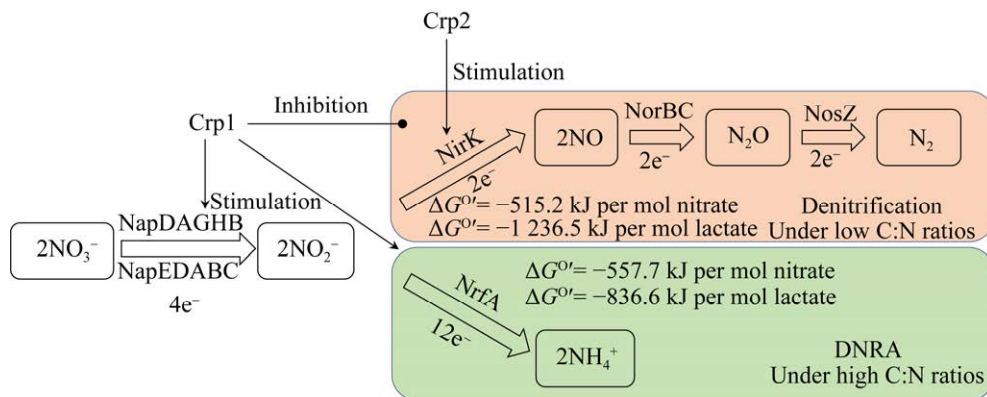


图 3 Crp 家族蛋白质调控异化硝酸盐还原成铵和反硝化途径的原理图(来自文献[49])

Figure 3 Schematic diagram of the regulation of Crp proteins on the dissimilatory nitrate reduction to ammonia and denitrification (adapted from literature [49]).

充分利用微生物驱动氮循环途径中的某些代谢过程, 有望减轻工业固氮和人类活动所造成的氮营养过量输入生态环境的不利影响, 有助于维持全球生态系统的平衡, 减少氧化亚氮等温室气体的释放。对于水环境而言, 利用微生物将硝酸盐、亚硝酸盐和铵盐等水溶性氮素通过硝化-反硝化、厌氧氨氧化和直接氨氧化等途径转化为气态分子氮逸出水体实现脱氮, 防止水质恶化^[57]。水环境中细菌的 DNRA 途径易造成亚硝酸盐的积累, 厌氧氨氧化途径同时需要铵根电子供体和亚硝酸根电子受体, 因此, DNRA 途径可与厌氧氨氧化途径进行耦联, 为后者提供丰富的电子受体^[58], 这种不同微生物的种间相互作用具有重要的生态学意义和应用潜力。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] VITOUSEK PM, ABER JD, HOWARTH RW, LIKENS GE, MATSON PA, SCHINDLER DW, SCHLESINGER WH, TILMAN DG. Technical report: human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences[J]. *Ecological Applications*, 1997, 7(3): 737.
- [2] 陈明昌, 张强, 杨晋玲, 雷震宇. 农业生态系统中氮素循环研究综述[J]. *山西农业科学*, 1993, 21(4): 53-59.
CHEN MC, ZHANG Q, YANG JL, LEI ZY. Studies on nitrogen cycling in agricultural ecosystems[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 1993, 21(4): 53-59 (in Chinese).
- [3] GALLOWAY JN, SCHLESINGER WH, LEVY H II, MICHAELS A, SCHNOOR JL. Nitrogen fixation: anthropogenic enhancement-environmental response[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 1995, 9(2): 235-252.
- [4] WOODS J, WILLIAMS A, HUGHES JK, BLACK M, MURPHY R. Energy and the food system[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2010, 365(1554): 2991-3006.
- [5] ZHU YG, PENG JJ, CHEN C, XIONG C, LI SL, GE AH, WANG ET, LIESACK W. Harnessing biological nitrogen fixation in plant leaves[J]. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(12): 1391-1405.
- [6] QIU WB, XIE XY, QIU JD, FANG WH, LIANG RP, REN X, JI XQ, CUI GW, ASIRI AM, CUI GL, TANG B, SUN XP. High-performance artificial nitrogen fixation at ambient conditions using a metal-free electrocatalyst[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3485.
- [7] SEBILO M, MAYER B, NICOLARDOT B, PINAY G, MARIOTTI A. Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(45): 18185-18189.
- [8] del GROSSO SJ, OGLE SM, NEVISON C, GURUNG R, PARTON WJ, WAGNER-RIDDLE C, SMITH W, WINIWARTER W, GRANT B, TENUTA M, MARX E, SPENCER S, WILLIAMS S. A gap in nitrous oxide emission reporting complicates long-term climate mitigation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(31): e2200354119.
- [9] 夏凤毅. 氮的污染及生物脱氮技术研究进展[J]. *温州师范学院学报(自然科学版)*, 2003, 24(5): 16-20.
XIA FY. Nitrogen pollution and recent developments of biodenitrification[J]. *Journal of Wenzhou Normal College (Natural Science)*, 2003, 24(5): 16-20 (in Chinese).
- [10] HAU HH, GRALNICK JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 237-258.
- [11] 郑静淇, 陈姗姗, 栾天罡. 以光催化材料构建的生物杂化体驱动氮循环的研究进展[J]. *微生物学报*, 2024, 64(11): 4119-4133.
ZHENG JQ, CHEN SS, LUAN TG. Research progress in nitrogen cycling driven by biohybrids constructed with photocatalytic materials[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(11): 4119-4133 (in Chinese).
- [12] KUYPERS MMM, MARCHANT HK, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276.
- [13] DAIMS H, LEBEDEVA EV, PJEVAC P, HAN P, HERBOLD C, ALBERTSEN M, JEHLICH 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[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504-509.
- [14] COSTA E, PÉREZ J, KREFT JU. Why is metabolic labour divided in nitrification?[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 213-219.
- [15] ZHU GB, WANG XM, WANG SY, YU LB, ARMANBEK G, YU J, JIANG LP, YUAN DD, GUO ZR, ZHANG HR, ZHENG L, SCHWARK L, JETTEN MSM, YADAV AK, ZHU YG. Towards a more labor-saving way in microbial ammonium oxidation: a review on complete ammonia oxidization (comammox)[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 829: 154590.
- [16] 陈彪, 邹龙, 黄运红, 龙中儿. 微生物氮代谢调控研究进展[J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 45(5): 493-502.
CHEN B, ZOU L, HUANG YH, LONG ZE. The research progress on the regulation of microbial nitrogen metabolism[J]. *Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science)*, 2021, 45(5): 493-502 (in Chinese).
- [17] 操泽贤, 杨长河, 张文强. 反硝化除磷脱氮机理及其工艺研究进展[J]. *水处理技术*, 2024, 50(8): 1-7.
CAO ZX, YANG CH, ZHANG WQ. Research progress on mechanism and technology of denitrification phosphorus and nitrogen removal[J]. *Technology of Water Treatment*, 2024, 50(8): 1-7 (in Chinese).
- [18] 张星, 林炜铁, 朱雅楠. 硝化细菌中亚硝酸盐氧化还原酶的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(11): 1806-1810.
ZHANG X, LIN WT, ZHU YN. Research progress of nitrite oxidoreductase in nitrobacteria[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(11): 1806-1810 (in Chinese).
- [19] SONG T, ZHANG XL, LI J, WU XY, FENG HX, DONG WY. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs)[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149319.
- [20] RICHARDSON DJ, BERKS BC, RUSSELL DA, SPIRO S, TAYLOR CJ. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(2): 165-178.
- [21] ZUMFT WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 533-616.
- [22] 王宝茹. 土壤中 *nirK* 型和 *nirS* 型反硝化细菌的分布特征及驱动机制的研究: 以沙洲土壤为例[D]. 衡阳: 南华大学硕士学位论文, 2022.
WANG BR. Distribution characteristics and driving mechanism of *nirK* and *nirS* denitrifiers in soils: a case study from the mid-channel bar[D]. Hengyang: Master's Thesis of University of South China, 2022 (in Chinese).
- [23] PENG YZ, ZHU GB. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(1): 15-26.
- [24] 彭永臻, 孙洪伟, 杨庆. 短程硝化的生化机理及其动力学[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(5): 817-824.
PENG YZ, SUN HW, YANG Q. The biochemical reaction mechanism and kinetics of partial nitrification[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(5): 817-824 (in Chinese).
- [25] ROBERTSON LA, KUENEN JG. Aerobic denitrification: a controversy revived[J]. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351-354.
- [26] ROBERTSON LA, KUENEN JG, KLEIJNTJENS R. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropha*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1985, 51(4): 445.
- [27] SPARACINO-WATKINS C, STOLZ JF, BASU P. Nitrate and periplasmic nitrate reductases[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(2): 676-706.
- [28] BRODA E. Two kinds of lithotrophs missing in nature[J]. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 1977, 17(6): 491-493.
- [29] MULDER A, van de GRAAF AA, ROBERTSON LA, KUENEN JG. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16(3): 177-183.
- [30] KUYPERS MMM, SLIEKERS AO, LAVIK G, SCHMID M, JØRGENSEN BB, KUENEN JG, SINNINGHE DAMSTÉ JS, STROUS M, JETTEN MSM. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea[J]. *Nature*, 2003, 422(6932): 608-611.
- [31] 沈李东, 郑平, 胡宝兰. 自然生态系统中的厌氧氨氧化[J]. *生态学报*, 2011, 31(15): 4447-4454.
SHEN LD, ZHENG P, HU BL. Anaerobic ammonium oxidation in natural ecosystems[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(15): 4447-4454 (in Chinese).
- [32] 孟庆功, 许达. 新型生物脱氮途径-厌氧氨氧化研究进展[J]. *中国资源综合利用*, 2010, 28(11): 35-37.
MENG QG, XU D. New style biological denitrification

- track-anaerobic ammonium-oxidation research headway[J]. *China Resources Comprehensive Utilization*, 2010, 28(11): 35-37 (in Chinese).
- [33] PENTON CR, DEVOL AH, TIEDJE JM. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6829-6832.
- [34] THAMDRUP B, DALSGAARD T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1312-1318.
- [35] WU MR, HOU TT, LIU Y, MIAO LL, AI GM, MA L, ZHU HZ, ZHU YX, GAO XY, HERBOLD CW, WAGNER M, LI DF, LIU ZP, LIU SJ. Novel *Alcaligenes ammonioxydans* sp. nov. from wastewater treatment sludge oxidizes ammonia to N₂ with a previously unknown pathway[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(11): 6965-6980.
- [36] LENFERINK WB, BAKKEN LR, JETTEN MSM, van KESSEL MAHJ, LÜCKER S. Hydroxylamine production by *Alcaligenes faecalis* challenges the paradigm of heterotrophic nitrification[J]. *Science Advances*, 2024, 10(23): ead13587.
- [37] 侯婷婷. 新型氨氧化途径 Dirammox 的活性与分布研究[D]. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2022.
HOU TT. Study on activity and distribution of Dirammox, a novel ammonia oxidation pathway[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2022 (in Chinese).
- [38] 万雨轩, 王鑫. 废水处理中异化硝酸盐还原为铵的研究进展[J]. *土木与环境工程学报(中英文)*, 2021, 43(6): 134-144.
WAN YX, WANG X. Research progress of dissimilatory nitrate reduction to ammonium in wastewater treatment[J]. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2021, 43(6): 134-144 (in Chinese).
- [39] YANG YG, XU MY, GUO J, SUN GP. Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 1707-1714.
- [40] SIMPSON PJL, RICHARDSON DJ, CODD R. The periplasmic nitrate reductase in *Shewanella*: the resolution, distribution and functional implications of two NAP isoforms, NapEDABC and NapDAGHB[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 2): 302-312.
- [41] CRUZ-GARCÍA C, MURRAY AE, KLAPPENBACH JA, STEWART V, TIEDJE JM. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(2): 656-662.
- [42] GAO HC, YANG ZK, BARUA S, REED SB, ROMINE MF, NEALSON KH, FREDRICKSON JK, TIEDJE JM, ZHOU JZ. Reduction of nitrate in *Shewanella oneidensis* depends on atypical NAP and NRF systems with NapB as a preferred electron transport protein from CymA to NapA[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(8): 966-976.
- [43] BRETTAR I, CHRISTEN R, HÖFLE MG. *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(Pt 6): 2211-2217.
- [44] CHEN Y, WANG FP, XU J, MEHMOOD MA, XIAO X. Physiological and evolutionary studies of NAP systems in *Shewanella piezotolerans* WP3[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(5): 843-855.
- [45] WEI HH, DAI JC, XIA M, ROMINE MF, SHI L, BELIAV A, TIEDJE JM, NEALSON KH, FREDRICKSON JK, ZHOU JZ, QIU DR. Functional roles of CymA and NapC in reduction of nitrate and nitrite by *Shewanella putrefaciens* W3-18-1[J]. *Microbiology*, 2016, 162(6): 930-941.
- [46] 张昕阳, 张雪, 农月娟, 郭伟鸿, 薛云新, 朱伟伟, 赵西林. 第二信使 cAMP 在细菌压力应激与毒力调节中的作用[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(10): 3859-3876.
ZHANG XY, ZHANG X, NONG YJ, GUO WH, XUE YX, ZHU WW, ZHAO XL. Roles of the second messenger cAMP in bacterial stress responses and virulence regulation[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(10): 3859-3876 (in Chinese).
- [47] ENDOH T, ENGEL JN. CbpA: a polarly localized novel cyclic AMP-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(23): 7193-7205.
- [48] CHARANIA MA, BROCKMAN KL, ZHANG Y, BANERJEE A, PINCHUK GE, FREDRICKSON JK, BELIAEV AS, SAFFARINI DA. Involvement of a membrane-bound class III adenylate cyclase in regulation of anaerobic respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(13): 4298-4306.
- [49] LIU SY, DAI JC, WEI HH, LI SY, WANG P, ZHU TB, ZHOU JZ, QIU DR. Dissimilatory nitrate reduction to

- ammonium (DNRA) and denitrification pathways are leveraged by cyclic AMP receptor protein (CRP) paralogues based on electron donor/acceptor limitation in *Shewanella loihica* PV-4[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(2): e01964-20.
- [50] SAFFARINI DA, SCHULTZ R, BELIAEV A. Involvement of cyclic AMP (cAMP) and cAMP receptor protein in anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(12): 3668-3671.
- [51] QIU DR, WEI HH, TU QC, YANG YF, XIE M, CHEN JR, PINKERTON MH Jr, LIANG YL, HE ZL, ZHOU JZ. Combined genomics and experimental analyses of respiratory characteristics of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(17): 5250-5257.
- [52] STROHM TO, GRIFFIN B, ZUMFT WG, SCHINK B. Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(5): 1420-1424.
- [53] YOON S, CRUZ-GARCÍA C, SANFORD R, RITALAHTI KM, LÖFFLER FE. Denitrification versus respiratory ammonification: environmental controls of two competing dissimilatory $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(5): 1093-1104.
- [54] FAN YJ, ZHOU ZY, LIU F, QIAN L, YU XL, HUANG FJ, HU RW, SU HL, GU H, YAN QY, HE ZL, WANG C. The vertical partitioning between denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium of coastal mangrove sediment microbiomes[J]. *Water Research*, 2024, 262: 122113.
- [55] TANVIR RU, LI YB, HU ZQ. Competitive partitioning of denitrification pathways during arrested methanogenesis: implications in ammonium recovery, N_2O emission, and volatile fatty acid production[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 401: 130717.
- [56] TEE HS, WAITE D, LEAR G, HANDLEY KM. Microbial river-to-sea continuum: gradients in benthic and planktonic diversity, osmoregulation and nutrient cycling[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 190.
- [57] 李宝, 黄强, 刘晓玲, 倪建梅, 郭圆, 郝立凯. 希瓦氏菌对污染物的去除机理及其潜在应用价值[J]. *地球与环境*, 2023, 51(6): 667-680.
- LI B, HUANG Q, LIU XL, NI JM, GUO Y, HAO LK. Mechanisms of *Shewanella* genus for pollutant removal and its potential applications: a review[J]. *Earth and Environment*, 2023, 51(6): 667-680 (in Chinese).
- [58] 赵硕, 汪超, 杨蒙, 乔森. 硝酸盐异化还原为铵耦合厌氧氨氧化处理含氮废水[J]. *中国环境科学*, 2024, 44(8): 4389-4399.
- ZHAO S, WANG C, YANG M, QIAO S. Treatment of nitrogen-containing wastewater by dissimilatory nitrate reduction to ammonium coupled with anaerobic ammonium oxidation[J]. *China Environmental Science*, 2024, 44(8): 4389-4399 (in Chinese).