

专论与综述

Nar 与 Nap 结构生物学的研究进展

王静蕾^{1,2}, 向兰欣^{1,2}, 王义东¹, 薛冬梅^{*1}

1 天津师范大学 天津市水资源与水环境重点实验室, 天津 300387

2 天津师范大学 地理学部, 天津 300387

王静蕾, 向兰欣, 王义东, 薛冬梅. Nar 与 Nap 结构生物学的研究进展[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1371-1385.

WANG Jinglei, XIANG Lanxin, WANG Yidong, XUE Dongmei. Research progress in structural biology of nitrate reductases Nar and Nap[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1371-1385.

摘要:硝酸盐是全球氮循环的关键组成部分, 同时也是植物有效氮的重要来源。研究硝酸盐的转化过程对于生态系统生产力的提高有重要意义, 而自然环境中硝酸盐的转化主要是硝酸盐的异化还原。同时, 硝态氮的大量输入导致了诸多环境生态问题, 引起人们广泛关注。反硝化反应是环境中硝态氮去除的主要过程。硝酸盐异化还原是反硝化过程硝态氮去除的第一步, 可以为后续的还原反应提供反应底物。研究硝酸盐还原过程还可以加深对微生物脱氮的理解。硝酸盐异化还原由膜结合硝酸盐还原酶(Nar)和周质型硝酸盐还原酶(Nap)共同催化, 但二者在结构、细胞定位、反应机理以及基因调控等方面存在差异, 并且二者对于环境因子的响应也不尽相同, 因此可能在催化硝酸盐还原过程中存在一定的差异性。本文系统论述了硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 在上述几方面的异同, 以提升对系统中硝酸盐发展动态的认识。

关键词:硝酸盐还原酶; 结构; 反应机理; 基因调控; 环境因子

Research progress in structural biology of nitrate reductases

Nar and Nap

WANG Jinglei^{1,2}, XIANG Lanxin^{1,2}, WANG Yidong¹, XUE Dongmei^{*1}

1 Tianjin Key Laboratory of Water Resources and Environment, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

2 Geography Faculty, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

Abstract: Nitrate is a key component of the global nitrogen cycle and an important source of available nitrogen for plants. It is of great significance to study the transformation process of

资助项目: 国家自然科学基金(41973017, 42361144860)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41973017, 42361144860).

*Corresponding author. E-mail: xuedongmei@tjnu.edu.cn

Received: 2024-06-18; Accepted: 2024-10-27; Published online: 2024-12-02

nitrate to improve the productivity of ecosystems, and dissimilatory nitrate reduction is the main path of nitrate transformation in the natural environment. At the same time, the large input of nitrate nitrogen has led to multiple eco-environmental problems, garnering increasing attention. Denitrification is the main process of nitrate nitrogen removal in the environment. Dissimilatory nitrate reduction as the first step in denitrification provides substrates for subsequent reduction reactions. Studying nitrate reduction processes can deepen the understanding of microbial denitrification. Dissimilatory nitrate reduction is co-catalyzed by membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap), which showcase differences in structure, cellular localization, reaction mechanism, gene regulation, and responses to environmental factors. Therefore, the two enzymes may have differences in the catalysis of nitrate reduction. This paper systematically compares Nar and Nap in the above aspects, aiming to improve our understanding of the development dynamics of nitrate in the system.

Keywords: nitrate reductase; structure; reaction mechanism; gene regulation; environmental factors

硝酸盐是全球氮循环的关键组成部分,也是生物有效氮的主要来源^[1]。硝酸盐的有效性对于植物生产力提高具有积极作用^[2]。因此研究硝酸盐的动态转化过程对于生态系统生产力的提高有重要意义,而自然环境中硝酸盐的转化主要是硝酸盐的还原过程(图 1)。同时,人口数量的递增、农业和工业活动的加剧以及城市化进程的加快,促使生物圈中硝态氮的人为负荷空前增加,环境生态问题层出不穷,包括水体富营养化、近岸赤潮暴发、溶氧锐减、生态系统酸化和生物多样性丧失等方面^[3-4]。反硝化作用是生物地球化学循环中的一个关键环节,也是维持氮平衡的重要途径。该作用一般是指反硝化细菌在厌氧或缺氧的环境下,氧化有机物作为能量来源,以硝酸盐或亚硝酸盐为无氧呼吸的电子受体而实现无机氮去除^[5-6]。硝酸盐异化还原是反硝化过程硝态氮去除的第一步,可以为后续的还原反应提供反应底物,该步骤由硝酸盐异化还原酶催化完成(图 1)^[7-8]。

硝酸盐异化还原酶按照细胞定位、活性位点结构及功能的不同可以分为膜结合硝酸盐还原酶(membrane-bound nitrate reductase, Nar)和

周质硝酸盐还原酶(periplasmic nitrate reductase, Nap)^[8]。Nar 广泛存在于具有硝酸盐呼吸功能的微生物之中,锚定在细胞膜上并朝向细胞质侧,仅在缺氧或者厌氧条件下催化硝酸盐的还原,同时能够产生质子动力势(proton-motive force, pmf)并用于腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的合成^[9-10]。传统观点认为反硝化反应只能够在缺氧或者厌氧条件下发生,但实际上反硝化反应也能够发生在好氧条件下进行^[11],硝酸盐可由 Nap 催化还原为亚硝酸盐。Nap 位于细胞周质,其本身不能够产生 pmf,只有与质子转位酶结合时才能够形成 pmf,但其产生的 pmf 似乎也不足以支撑 ATP 的合成^[12]。还原酶 Nap 优先在好氧条件下表达,但也能在厌氧呼吸中发挥作用,例如在假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) strain G179 与反硝化类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*)中, Nap 是参与厌氧反硝化唯一的硝酸盐还原酶^[10]。

Nar 与 Nap 这 2 种还原酶在结构、细胞定位、反应机理及基因调控等方面存在差异,并且二者对于环境因子的响应也不尽相同。本文系统论述了硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 在上述几

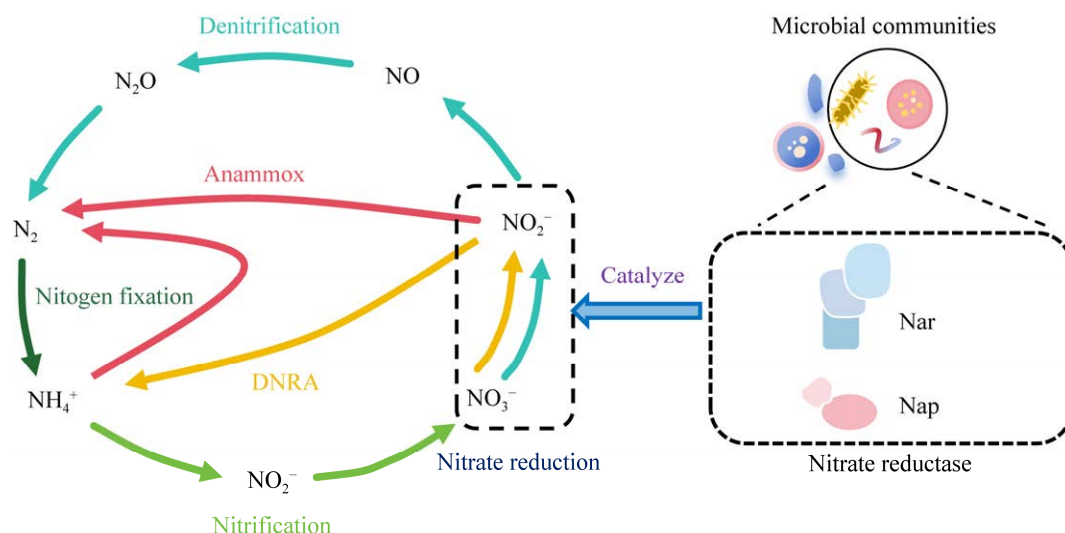


图1 氮循环过程示意图 氮循环过程中,微生物利用硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐。DNRA: 硝酸盐异化还原成铵。

Figure 1 Schematic diagram of the nitrogen recycling process. During the nitrogen cycle, microorganisms catalyze the reduction of nitrate to nitrite using nitrate reductases Nar and Nap. DNRA: Dissimilatory nitrate reduction to ammonium.

方面的异同,旨在加深对硝酸盐还原为亚硝酸盐这一反应步骤的理解,有利于进一步推动研究者和决策者认识生态系统中硝酸盐的发展动态和生态环境效应,制定相关的环境保护规划及控制措施。

1 硝酸盐还原酶结构与反应机理

硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 都属于含钼的二甲基亚砷还原酶家族(dimethyl sulfoxide reductase family, DMSOR)^[13],都能够将硝酸盐还原成亚硝酸盐,二者在结构上皆为多亚基的蛋白复合体(图2),由催化亚基以及电子传递亚基组成。然而,Nar 与 Nap 在催化亚基活性位点、底物通道、细胞定位以及反应机理等方面存在差异。

1.1 硝酸盐还原酶结构

硝酸盐还原酶 Nar 和 Nap 催化亚基分别为 NarG 和 NapA,二者都包含一个由 Mo 原子结

合两个钼喋呤鸟嘌呤二核苷酸(molybdopterin guanine dinucleotide, MGD)形成的钼辅因子(Mo-bisPGD cofactor)活性位点以及一个铁硫簇([4Fe-4S]),前者在硝酸盐还原过程中起主要的催化作用,后者作为电子传递链的一部分^[13]。催化亚基 NarG 与 NapA 都被组织成 4 个结构域,活性中心皆是由 Mo 原子与 6 个配体以扭曲的三棱柱几何构型配位,二者皆有 4 个硫配体并由 2 个 MGD 提供^[13-14]。在 NarG 中,Mo 原子剩下的 2 个配体则是由天冬氨酸残基的羧酸侧链和 1 个氧基配位或是天冬氨酸侧链的 2 个氧原子均与 Mo 原子形成配位;硝酸盐还原过程中天冬氨酸的羧酸侧链会发生去质子化并旋转形成双齿配位,阻碍硝酸盐与活性位点的结合^[14-15]。在 NapA 中,另外 2 个硫配体则来自半胱氨酸残基与硫化物基团;同时,这 2 个配体之间还能够形成部分二硫键,构成伪喋呤环,对活性中心起到一定的保护作用^[14,16]。Nar 与

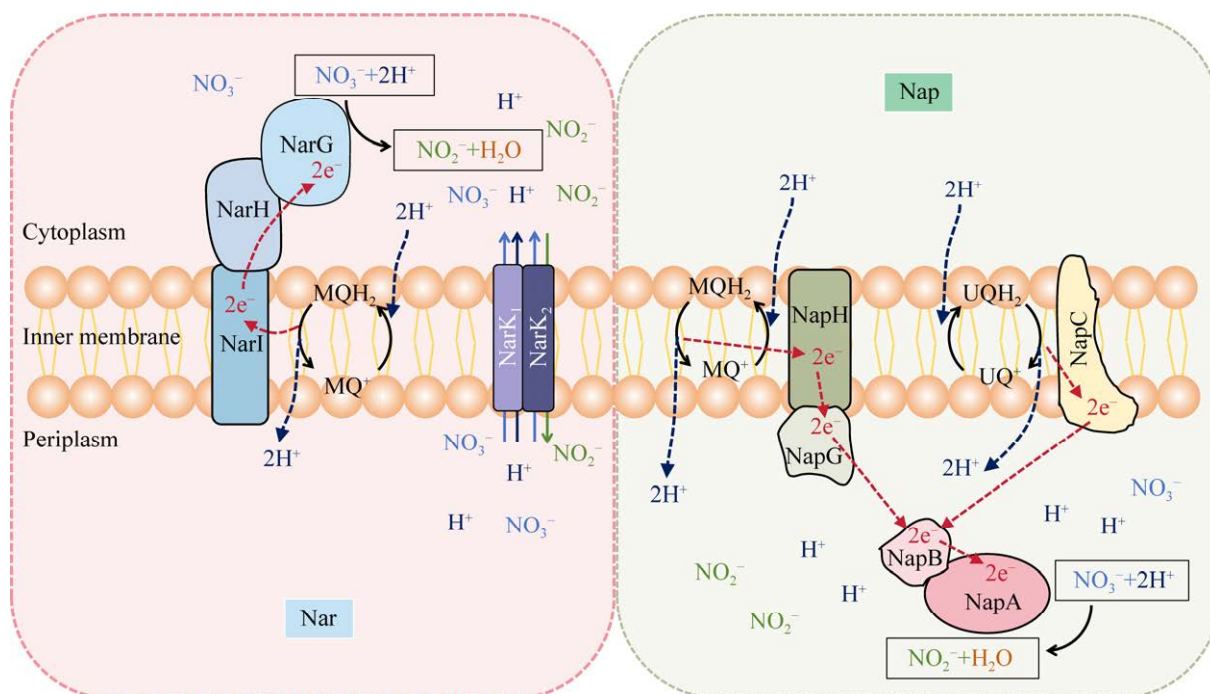


图2 硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of the structure of nitrate reductase Nar and Nap.

Nap 都需要通过底物通道将硝酸盐底物引导至活性位点,但二者底物通道所带电荷不同:还原酶 Nar 指向活性中心的底物通道带有负电荷;而还原酶 Nap 底物通道的氨基酸残基带正电荷^[14]。此外, Nar 还原酶的活性位点是非特异性的,能够还原不同构型的阴离子,例如硝酸盐、氯酸盐、高氯酸盐等;但是, Nap 还原酶活性位点对于底物的选择却相对专一,其对硝酸盐分子高度特异^[16]。

还原酶 Nar 除了催化亚基 NarG 还包括 NarH 和 NarI 这 2 个电子传递亚基。NarH 由 4 个铁硫中心组成, NarI 由 2 个 b 型血红素组成^[13]。除了电子传递, NarI 还负责将复合物 NarGH 固定在膜的细胞质侧,并且提供生理电子供体氧化的结合位点^[14]。在硝酸盐还原过程中,电子经 NarI、NarH 到达 NarG (图 2)。还原酶 Nap 一般还包括电子传递亚基 NapB,该亚基由

2 个 c 型血红素组成,其通过保守的酪氨酸侧链与 NapA 相连^[13]。某些菌株中 Nap 可能仅以单体形式存在,不含 NapB 亚基,例如菌株 *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 与 *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774^[8,13]。同时,还原酶 Nap 还需要辅助蛋白作为电子传递链的一部分,例如蛋白 NapC,该蛋白负责生理电子供体到 NapB 的电子传递;若细菌不能编码蛋白 NapC 时,该功能则由铁氧还蛋白 NapG 与 NapH 代替(图 2)^[8]。

另外, Nar 与 Nap 细胞定位不同(图 2),因此二者在硝酸盐吸收过程中也存在差异。Nar 的催化位点位于细胞质,需要依靠硝酸盐转运蛋白(NarK₁与 NarK₂)将硝酸盐从细胞周质运输到胞质,该过程需要消耗硝酸盐还原的能量; Nap 位于细胞周质,硝酸盐可以沿着浓度梯度扩散进入细胞周质^[17-19]。

1.2 硝酸盐还原酶反应机理

催化硝酸盐还原时, Nar 可以氧化生理电子供体甲萘酚(menaquinol, MQH₂)并获得电子, 经 NarI、NarH 将电子传递给 NarG^[8]; Nap 存在两条电子传递路径, 一是将 MQH₂ 氧化成甲萘醌(menaquinone, MQ⁺)并获得电子, 经 NapH、NapG 以及 NapB 传递给 NapA, 另一条则是将生理电子供体泛醇(ubiquinol, UQH₂)氧化成泛醌(ubiquinone, UQ⁺)获得电子, 经 NapC、NapB 传递给 NapA^[10] (图 2)。硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 催化硝酸盐还原存在相似之处, 二者均可概括为 3 步: (1) 利用具有醌氧化活性的膜蛋白从醌池获得电子; (2) 利用氧化还原辅助酶蛋白将电子传递到钼活性位点; (3) 钼活性位点与底物结合, 完成氧化还原反应, 释放产物^[13]。但 Nar 与 Nap 在催化步骤的顺序有所不同, 下面将详细介绍。

1.2.1 硝酸盐还原酶 Nar 反应机理

硝酸盐还原酶 Nar 依靠活性位点中 Mo 原子价态的变化催化硝酸盐还原。还原酶 Nar 的反应机理主要是基于酶动力学、电子顺磁共振以及蛋白膜伏安法提出^[20-21]。该机理认为在催化过程中, 硝酸盐只能与 Mo(IV)或者 Mo(V)结合再被还原, 由此提出了两条反应路径(图 3): 一条路径是 Mo(VI)先被还原成 Mo(V), 再与硝

酸盐结合; 另一条路径则是 Mo(VI)直接被还原成 Mo(IV), 然后与硝酸盐结合, 途径的选择取决于底物的可用性^[13]。Mo(V)对硝酸盐的亲合力比 Mo(IV)高, 因为后者存在更多的负电荷与硝酸盐产生静电排斥, 但 Mo(IV)对应着较快的酶周转速率^[21]。当硝酸盐浓度较低即底物受限时, 催化过程需要尽可能利用硝酸盐, 因此底物与 Mo(V)结合更加有利; 当硝酸盐浓度较高时, 硝酸盐与 Mo(IV)结合, 以较高周转速率的替代途径成为主导^[22]。Nar 催化顺序为先进行电子的转移, 再与底物结合, 接着消耗 2 个质子, 最后释放底物(图 3)。

1.2.2 硝酸盐还原酶 Nap 反应机理

硝酸盐还原酶 Nap 的作用机理是硝酸盐与 Mo 原子直接结合, 其中涉及钼和硫的氧化还原化学^[23]。首先, 硝酸盐与 Nap 活性位点相互作用, 使活性位点发生构象重排, 最终半胱氨酸残基配体与 Mo 原子之间的共价键断开, 但是通过与另一个硫化物配体形成的部分二硫键与 Mo 原子间接相连^[13]。此时, Mo 原子为五配体, 存在自由位置, 硝酸盐中的 1 个氧原子通过共价键与 Mo 原子形成配位, 接着 Mo 原子的 1 个硫配体被氧化, 将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 产物释放后, Nap 活性位点接收电子和质子, 释放 1 个水分子, 自由位置再次可用^[13](图 4)。若此

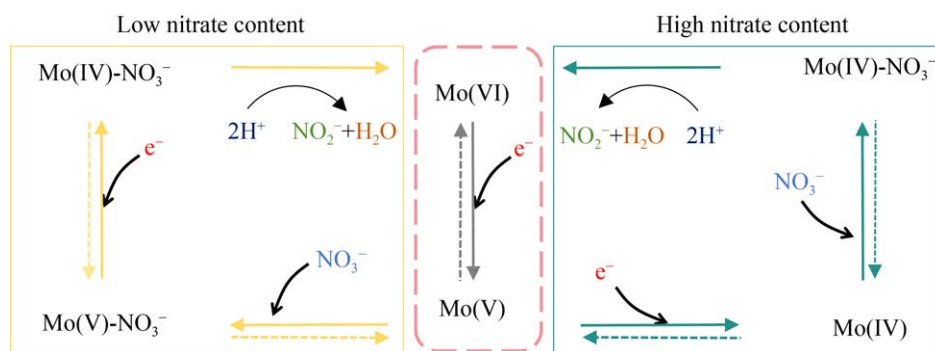


图 3 硝酸盐还原酶 Nar 催化过程示意图^[13]

Figure 3 Schematic diagram of the nitrate reductase Nar catalyzed process^[13].

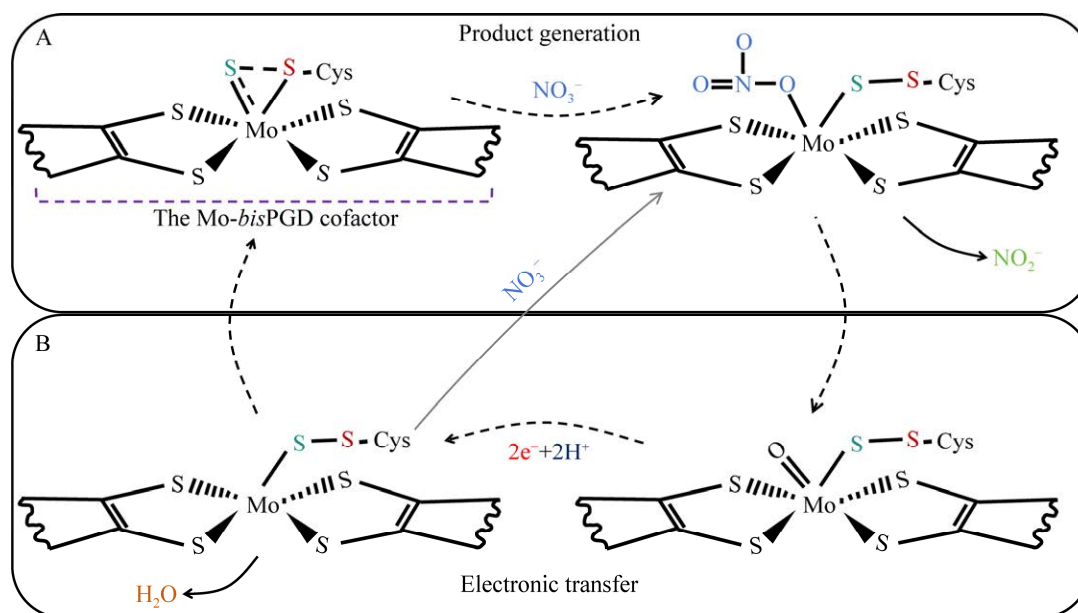


图4 硝酸盐还原酶 Nap 催化过程示意图^[13] Nap 催化过程中, 先生成并释放产物(A)再进行内部的电子转移(B)。

Figure 4 Schematic diagram of the nitrate reductase Nap catalyzed process^[13]. In the process of Nap catalyzed process, the product (A) is formed and released first, and then the internal electron transfer (B) happens.

时底物足够, 便可以与 Mo 原子快速结合进行新的氧化还原反应; 若底物受限, Nap 的活性位点便会恢复到六配位体的构象^[23](图4)。Nap 催化过程中, 底物与活性位点的结合早于外部电子的转移^[19], 换句话说 Nap 是先生成亚硝酸盐产物, 再进行电子、质子的转移。

总的来说, Nar 催化时需要先进行内部电子转移, 将 Mo(VI)还原成 Mo(IV)或者 Mo(V), 然后与硝酸盐结合, 这可能是其还原过程中的限速步骤; 而在 Nap 催化过程中, 硝酸盐直接与活性位点结合, 还原生成亚硝酸盐后迅速释放^[19]。

2 硝酸盐还原酶基因调控

2.1 硝酸盐还原酶操纵子的基因组成

硝酸盐还原酶 Nar 和 Nap 分别由 nar 与 nap 操纵子编码, 这 2 个操纵子都包含编码结构亚

基以及辅助蛋白的基因^[8]。还原酶 Nar 由 narGHJI 操纵子编码, 该操纵子相对保守, 在多个菌种中都有发现(表1), 其中组成操纵子的基因 narGHI 分别编码对应的结构亚基, 基因 narJ 所编码的伴侣蛋白 NarJ 并不直接参与硝酸盐的还原, 而是在 Nar 的组装、成熟过程中发挥重要作用^[38]。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 还存在额外的 Nar 操纵子 narZWYV, 可能在厌氧条件下发挥缓冲细胞呼吸的作用^[39]。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中操纵子 narZWYV 具体功能还有待研究^[10,25]。

还原酶 Nap 以及硝酸盐还原过程中需要的辅助蛋白由 nap 操纵子编码^[8]。与 nar 操纵子不同, nap 操纵子基因的组成及排列表现出显著的多样性, 目前共发现 11 个 nap 基因。除了 napA 基因外, 又相继发现了多个 nap 基因, 这些基因在不同的生物体内具有不同的排列组

表 1 硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 操纵子的基因组成

Table 1 Genes composition of nitrate reductase Nar and Nap operon

Nitrate reductase	Operon	Microorganism	Source
Nar	<i>narGHJI, narZWYV</i>	<i>Escherichia coli</i>	[24]
	<i>narGHJI, narZWYV</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	[25]
	<i>narGHJI</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	[26]
	<i>narGHJI</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	[10]
	<i>narGHJI</i>	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	[27]
	<i>narGHJI</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[28]
	<i>napFDAGHBC</i>	<i>Escherichia coli</i>	[29]
Nap	<i>napKEFDABC</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	[30]
	<i>napEDABC</i>	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	[31]
	<i>napEDABC</i>	<i>Wautersia eutropha</i>	[32]
	<i>napEDABC</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	[33]
	<i>napEFDABC</i>	<i>Starkeya novella</i>	[30]
	<i>napEFDABC</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[34]
	<i>napAGHBLD</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	[35]
	<i>napAGHBFLD</i>	<i>Wollinella succinogenes</i>	[36]
	<i>napAGHBFLSD</i>	<i>Thiomicrospira (formerly Sulfurimonas) denitrificans</i> DSM 125	[30]
	<i>napCMADGH</i>	<i>Thermovibrio ammonificans</i>	[37]

合方式, 其中最常见的组合方式是 *napEDABC*, 有的 *nap* 操纵子还包括 *napFGHKL* 基因^[30]。*napA* 与 *napD* 这 2 个基因在含有硝酸盐还原酶 Nap 的微生物中是广泛存在的, 前者负责编码催化亚基 NapA, 后者编码的辅助性蛋白 NapD 并不直接参与硝酸盐的还原, 而是在催化亚基 NapA 的合成以及成熟过程中发挥重要作用^[40]。基因 *napF* 所编码的非血红素铁硫蛋白(non-heme iron sulfur protein) NapF 与 NapD 功能相似, 同样与催化亚基 NapA 的成熟有关^[30]。基因 *napB* 也出现在几乎所有 *nap* 操纵子中, 负责编码周质硝酸盐还原酶一般结构中的电子传递亚基 NapB^[8]。基因 *napC* 编码膜结合的醌氧化酶蛋白 NapC, 负责从醌池到还原酶 Nap 的电子传递^[30]。*nap* 操纵子中的 *napGH* 基因分别编码 2 个铁硫(Fe-S)蛋白 NapG 和 NapH, 蛋白复合体 NapGH 在不编码 NapC 蛋白的微生物中, 负责醌池到还原酶 Nap 的电子传递^[13,30]。*napM* 所编码的

NapM 也是电子传递蛋白^[30]。剩余基因 *napEKLS* 编码相应的蛋白质, 但不直接参与硝酸盐还原过程, 具体功能仍待继续研究^[8]。

2.2 硝酸盐还原酶操纵子的转录调控

硝酸盐还原酶 Nar 和 Nap 由对应操纵子编码, 而操纵子的表达是通过转录因子(transcription factor, TF)在转录水平上进行调控的。转录因子能够接收并整合环境信号的变化, 诱导或抑制硝酸盐还原酶的表达^[41]。一般在厌氧且硝酸盐存在的条件下, 硝酸盐还原酶才会表达, 因此氧含量和硝酸盐是调控硝酸盐还原酶操纵子表达的关键因素^[32]。

还原酶 Nar 与 Nap 主要有 2 种感知氧含量的转录因子^[42]。第一种是富马酸硝酸盐还原酶(fumarate and nitrate reductase, FNR)及其同源蛋白, 该转录因子可以响应环境中氧含量的变化^[43]。转录因子 FNR 中含有对氧气敏感的铁硫簇, 在缺氧或厌氧的条件下, 该结构保持稳定,

并且可以与 *nar* 和 *nap* 操纵子的基因序列结合, 激活参与无氧代谢的基因, 同时抑制参与有氧代谢的基因转录^[44-45]。FNR 同源蛋白厌氧调节精氨酸脱亚胺酶和硝酸还原酶 (anaerobic regulator of arginine deiminase and nitrate reductase, ANR)、富马酸盐和硝酸盐还原蛋白 (fumarate and nitrate reduction protein, FnrP) 等也能响应氧含量的变化^[44]。另外, FNR 及 FNR 同源蛋白还可以响应其他环境信号的变化, 调动多种代谢途径, 以便细菌能够快速适应缺氧环境^[10]。第二种则是由组氨酸激酶蛋白 FixL 与其同源反应调节蛋白 FixJ 构成的双组分调控系统响应环境氧含量的变化并调控硝酸盐还原酶基因的表达, 该系统主要存在日本慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 等根瘤菌中^[45]。

反硝化微生物中同样存在多种响应硝酸盐变化的转录因子, 例如 NarXL、NarQP 和 NarR。NarXL、NarQP 属于双组分调控系统, 其中 NarX 和 NarQ 是膜结合的组氨酸激酶蛋白, 可以响应环境中硝酸盐浓度的变化; 而 NarL 与 NarP 分别是 NarX 和 NarQ 同源的反应调节蛋白^[40,42]。环境中存在硝酸盐时, 组氨酸激酶蛋白 NarX 与 NarQ 便可发生磷酸化, 分别激活反应调节蛋白 NarL 和 NarP, 进而诱导硝酸盐还原酶操纵子的表达^[46]。当微生物中不含有转录因子 NarXL 和 NarQP 时, 硝酸盐还原酶调节因子 (nitrate reductase regulator, NarR) 则会启动相应功能, 响应环境中硝酸盐浓度的变化^[47]。

反硝化反应中生成的中间产物例如亚硝酸盐和一氧化氮也是调控硝酸盐还原酶操纵子表达的重要因素^[48]。响应硝酸盐变化的转录因子 NarXL、NarQP 以及 NarR, 同样能够响应环境中亚硝酸盐的变化来调控硝酸盐还原酶的表达^[10]。转录因子蛋白 NsrR、FnrP 以及 DNR 等能够响应环境中一氧化氮的变化进而调控硝酸

盐还原酶的表达^[48]。除此之外, 细胞氧化还原状态的变化也能够调控硝酸盐还原酶基因的表达, 但具体的转录因子与转录调控机制还有待更加深入地研究^[43]。

硝酸盐还原过程是转录因子响应多个环境信号综合调控的结果, 如图 5 所示。在脱氮假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 中 (图 5A), *nar* 操纵子在厌氧以及硝酸盐存在条件下由 FNR 同源蛋白 FnrP、NarR 共同激活: FnrP 能够感知环境中氧含量与一氧化氮的变化; NarR 则感知环境中硝酸盐的变化^[47]。*E. coli* 中 (图 5B) 存在 FNR、NarQP、NarXL 以及 NsrR 这 4 种转录因子负责硝酸盐还原的转录调控: *narGHJI* 操纵子由蛋白 FNR 与 NarL 激活, *napFDAGHBC* 操纵子则由蛋白 FNR 与 NarP 激活, 同时 *nap* 操纵子还受到蛋白 NsrR 的抑制^[10]。厌氧条件下, 在铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中 (图 5C), *narGHJI* 操纵子由 FNR 同源蛋白 ANR、DNR 以及双组分调控系统 NarXL 激活, 其中蛋白 ANR 还能够促进编码蛋白 DNR 与 NarXL 的基因 *dnr* 及 *narXL* 的表达, 而 NarL 直接抑制 *nap* 操纵子的表达^[10]。

硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 的操纵子都可以响应氧含量、硝酸盐、亚硝酸盐、一氧化氮以及细胞氧化还原状态的变化, 但是二者的受调控方式不同^[44,47]。还原酶 Nar 是硝酸盐还原的主要呼吸酶, 其操纵子高度保守, 在厌氧且存在硝酸盐的条件下, *nar* 操纵子表达上调^[16]。相较于还原酶 Nar, 还原酶 Nap 操纵子的基因组成和排列显著多样, 调控方式更加复杂^[10]。此外, Nap 基因的转录还受到催化亚基 NapA 中钼辅因子与铁硫聚簇合成的影响, 钼辅因子合成受到钼酸盐响应转录调节蛋白 (molybdate responsive, ModE) 的调节, 铁硫聚簇合成则由铁硫聚簇调控因子 (iron-sulfur cluster regulator, IscR)

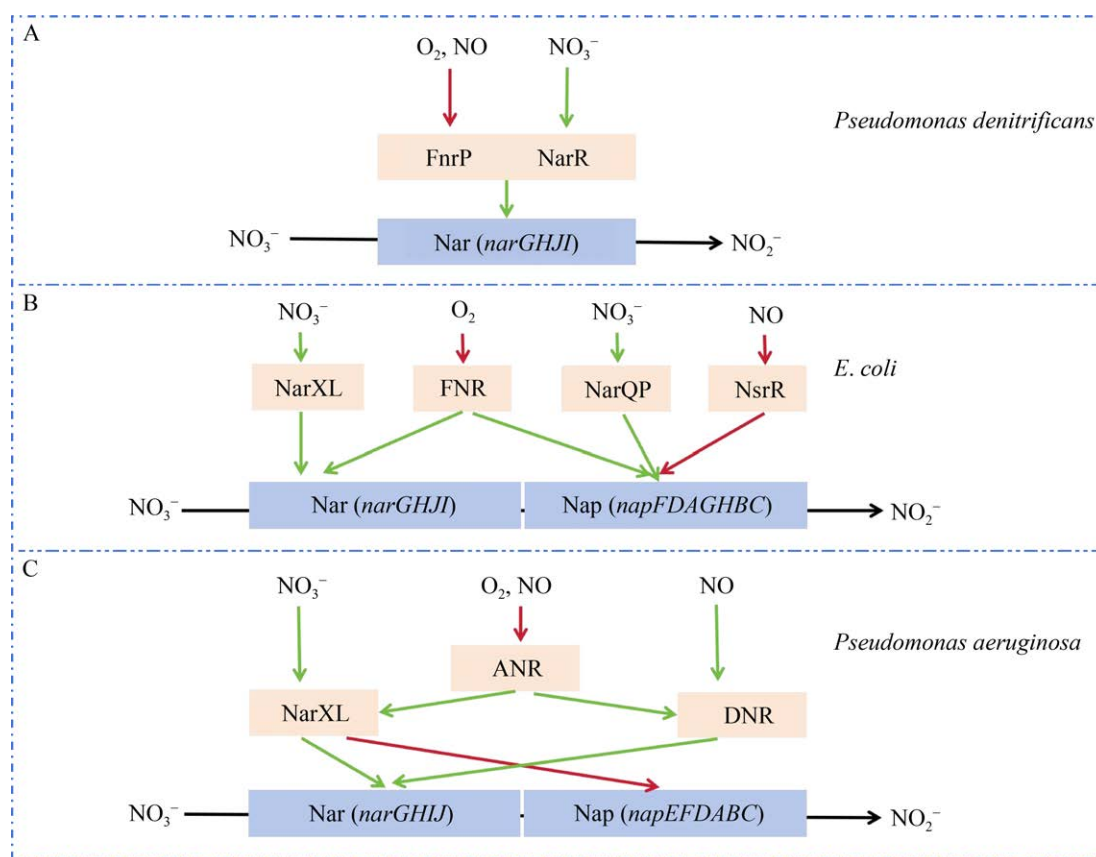


图5 脱氮假单胞菌(A)、大肠杆菌(B)以及铜绿假单胞菌(C)硝酸盐还原酶的基因调控图 由上往下, 每一层分别是环境信号、转录因子以及硝酸盐还原酶(操纵子)。红色箭头代表抑制, 绿色箭头代表激活和促进。

Figure 5 Gene regulation of nitrate reductase in *Pseudomonas denitrificans* (A), *E. coli* (B), and *Pseudomonas aeruginosa* (C). From top to bottom, each layer is the environmental signal, the transcription factor, and the nitrate reductase (operon). The red arrows represent inhibition, and the green arrows represent activation and facilitation.

调节, 因此蛋白 ModE、IscR 也能够影响还原酶 Nap 的表达^[30]。

3 环境因子对硝酸盐还原酶的影响

3.1 电子供体

电子供体为反硝化菌提供所需要的电子和能量, 因此对于硝酸盐的还原过程至关重要^[49]。反硝化菌主要利用有机化合物作为电子供体, 包括低分子量有机物(如乙酸、丙酸、丁酸、乙

醇、甲醇、葡萄糖、苯、甲烷等)和高分子量有机物(如纤维素、聚乳酸、聚己内酯等)^[49-50]。

对于还原酶 Nar 来说, 具有简单代谢途径的碳源可以带来更高的电子产生效率, 有利于其活性的提高和表达^[50]。Wei 等^[50]研究碳源对解芳樟醇索氏菌(*Thauera linaloolentis*)反硝化的影响, 发现以乙醇、乙酸等具有简单代谢途径的有机物作为碳源时, Nar 活性较高。Strong 等^[51]同样发现乙醇、乙酸作为碳源添加时能够有效提高硝酸盐的去除效率。Zhang 等^[52]在对

比不同碳源添加的脱氮效率时,发现乙酸组硝酸盐去除率高于葡萄糖组。不同碳源被反硝化菌利用的难易程度不同,因此具有不同的电子产生效率:结构、代谢途径简单的碳源更容易被反硝化菌利用,其氧化产生的电子可以快速供给 Nar 用于硝酸盐还原;结构、代谢途径复杂碳源的分解是电子产生过程中的限速步骤,其电子产生效率较低^[53-54]。反硝化过程中不同还原酶之间存在电子竞争,这可能导致有毒中间体亚硝酸盐积累,其离子化形式游离亚硝酸(free nitrous acid, FNA)会对微生物体产生毒害并下调还原酶 Nar 的表达,而更高的电子产生效率能够缓解反硝化还原酶之间的电子竞争,避免亚硝酸盐的积累^[50,55]。另外,碳源还可以影响硝酸盐的转运过程,从而对硝酸盐还原过程产生间接影响。例如, Wunderlich 等^[56]发现反硝化菌芳香化合物索氏菌(*Thauera aromatica*)和解芳香物解芳香油菌(*Aromatoleum aromaticum*) strain EbN1 以苯甲酸盐、甲苯作为碳源时,细胞膜的流动性降低,阻碍硝酸盐的运输。

代谢途径简单的有机碳源(乙酸钠、琥珀酸钠等)也能够快速为 Nap 提供反应所需的电子,加速硝酸盐的去除^[57]。此外, Nap 的表达还受到碳源还原程度的调控。有研究表明,好氧条件下,全食副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)的 Nap 在还原程度较高的碳底物中(己酸盐、丁酸盐)的活性高于在氧化程度较高的碳底物(琥珀酸盐、苹果酸盐)的活性^[58]。同样好氧条件下,反硝化菌 *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* 在还原程度更高的碳底物(丁酸盐)上生长时, Nap 有更高的表达量^[59]。这个现象或许可以用 Nap 能够耗散多余的还原当量,维持细胞的氧化还原平衡来解释^[60]。在异养反硝化的过程中,碳源充当硝酸盐同化和异化过程

中的底物:在硝酸盐同化过程中,需要将碳源还原或氧化成细胞碳原子的平均还原状态,相对还原的碳源比相对氧化的碳源产生更多的还原当量,而过量的还原当量不利于细胞氧化还原平衡的维持,可能会导致过量 ATP 的积累,从而使得二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)浓度降低,而 ADP 的磷酸化与微生物呼吸相关联,最终对生物体呼吸产生不利影响^[61]。而 Nap 能够消耗多余的还原当量,并且不与 ATP 的产生耦合,因此在高度还原的碳源上生长时, Nap 活性以及硝酸盐还原速率也较高^[62]。

3.2 溶解氧(dissolved oxygen, DO)

反硝化过程中,氧和硝酸盐都能够作为电子受体,但是从热力学角度来说,氧作为电子受体能够产生更多的能量,因此氧能够影响硝酸盐还原过程^[57]。DO 对于 Nar 的影响主要体现在基因调控和硝酸盐转运这 2 个方面。在基因调控方面,还原酶 Nar 的合成、表达是由转录因子(例如, FNR 及其同源蛋白)感知环境中 DO 含量的变化来进行调控:在厌氧条件下,操纵子 *narGHJI* 被转录因子激活并合成还原酶 Nar,如 *E. coli*、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)以及施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*);在好氧条件下,转录因子失活, Nar 的基因表达受到抑制^[10]。在硝酸盐转运方面, DO 能够降低硝酸盐转运蛋白的活性,阻碍硝酸盐的跨膜运输^[32]。例如, Ren 等^[45]发现在好氧条件下,编码索氏菌属(*Thauera*)细菌硝酸盐转运蛋白的基因表达被显著下调。相较于 Nar, Nap 对氧气并不敏感,在厌氧或者好氧条件下都可以发挥作用,这可能是由于 Nap 位于细胞周质,不需要依靠转运蛋白进行硝酸盐的运输^[62]。

3.3 硝酸盐

硝酸盐作为电子受体,能够通过转录因子(如 NarXL、NarQP 等)在转录水平上调控硝酸

盐还原酶 Nar 与 Nap 的表达。除了作为电子受体, 高浓度的硝酸盐还会导致有毒中间产物亚硝酸盐积累, 其离子化形式 FNA 会抑制细菌以及生物酶活性, 同时高浓度硝酸盐冲击会下调 Nar 基因的表达^[63-64]。此外, Nar 对硝酸盐的亲合力弱于 Nap, 这可能导致二者在不同的硝酸盐浓度条件下具有不同的优势地位^[29]。例如, *E. coli* 在硝酸盐浓度低于 3 mmol/L 时优先表达 Nap, 在硝酸盐浓度高于 3 mmol/L 时优先表达 Nar^[65]。

3.4 pH

还原酶 Nar 最适 pH 值在 7.0 ± 0.5 , 低于或者高于该值, 都会对其活性产生不利影响^[66]。Olaya-Abril 等^[67]发现, 厌氧条件下, 菌株脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*) PD1222 在 pH 6.5 条件下 Nar 活性低于 pH 7.2。在 Nar 催化过程中, 钼辅因子中 MGD 配体附近 2 个保守的组氨酸残基会发生去质子化, 使得天冬氨酸羧基团旋转并形成一个双齿配体, 从而阻止硝酸盐的结合^[13]。pH 的升高会对组氨酸残基的质子化、去质子化产生影响, 改变 Nar 周转效率^[68]。Carlson 等^[66]纯化并研究了 *Pseudomonas aeruginosa* 的还原酶 Nap, 发现其最适 pH 范围在 6.5–7.5。超出这个范围势必会抑制 Nap 活性, 但 pH 影响 Nap 催化活性的确切机制尚不清晰。

3.5 其他因素

细菌生长及反硝化活性最适温度范围是 25–35 °C, 当温度超过这一范围时, 会抑制细菌生长, 降低其反硝化性能^[69]。在以有机物为碳源的反硝化过程中, 温度还影响碳源的释放速率。Shen 等^[69]在研究温度对于反硝化影响机制时发现, 30 °C 条件下碳源的释放速率是 13 °C 条件下的 2 倍; 同时, 碳源释放速率的降低会导致电子供体不足, 加剧反硝化还原酶之间的

竞争, 易出现亚硝酸盐的累积, 从而抑制微生物活性, 不利于 Nar 与 Nap 活性的提高。

反硝化菌对盐度具有一定的耐受范围, 如果超出这个范围, 则会破坏细胞的渗透交换, 抑制电子传递系统进而降低还原酶的活性^[70-71]。Li 等^[72]研究发现, 当盐度水平从 6% 提高到 8% 时, 硝酸盐去除率从 95.77% 降低至 38.01%, 同时电子传递以及还原酶 Nar 活性降低。廖绍安等^[73]研究发现好氧反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* 在高盐度水平条件下, 硝酸盐去除效率下降, 由此推测 Nap 活性被抑制。

此外, 一些金属元素也能够影响还原酶 Nar 与 Nap 活性, 如 Fe 元素与 Mn 元素。其中, Fe 是重要的微量元素, 参与微生物生长、代谢等生物过程, 也是许多生物酶合成所必需的, 如 Fe^{3+} 能够参与还原酶 Nar 的合成^[74]。Fe 添加有利于提高 Nar 与 Nap 活性, 例如, Chen 等^[75]发现在好氧条件下, 向反硝化系统补充铁屑能够上调 Nap 编码基因并且提高酶的活性; Jiang 等^[76]利用石墨烯提高微生物细胞内 Fe^{3+} 的含量后, 编码 Nar 基因被显著上调。另外, 部分细菌可以将 Fe^{2+} 作为电子供体将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 如 Song 等^[77]研究发现添加 Fe^{2+} 后, 硝酸盐去除率显著提高。硝酸盐还原过程中, Fe^{2+} 可以作为电子供体, 但过量的 Fe^{2+} 添加反而显著抑制硝酸盐的还原。例如, 张相杰等^[78]发现在高浓度 Fe^{2+} 添加下, 硝酸盐还原受到抑制, 这是由于大量的 Fe^{2+} 氧化产物附着在细菌表面, 形成细胞结壳, 阻碍硝酸盐进入细胞, 硝酸盐还原酶活性被抑制。 Mn^{2+} 也可以作为硝酸盐还原过程中的电子供体, 但是过多的 Mn^{2+} 胁迫会影响蛋白质等大分子的稳定性, 同时过量的 Mn^{2+} 也被证明抑制 *E. coli* 厌氧呼吸中 Nar 与 Nap 的基因表达^[79-80]。

4 总结与展望

硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 在以下方面存在差异,具体表现在:(1)在结构方面,Nar 与 Nap 都为多亚基蛋白复合体,但二者在催化位点配位氨基酸、底物通道所带电荷等方面存在差异。除此之外,还原酶 Nar 与 Nap 细胞定位不同,因此二者在硝酸盐吸收过程中也存在差异。(2)在反应机理方面,二者都依靠膜结合的电子传递链将电子传递到催化位点,但硝酸盐底物与活性位点结合的顺序并不相同,这可能影响硝酸盐还原的速率。(3)在基因调控方面,编码硝酸盐还原酶 Nar 的操纵子基因组成相对保守,而编码还原酶 Nap 的操纵子基因的组成和排列却因物种而异,具有显著的多样性,但二者都是依赖转录因子感知环境信号的变化。(4)还原酶 Nar 与 Nap 在不同的环境条件下,具有不同的竞争优势。

基于已有的研究进展,有如下问题值得今后研究:(1)与还原酶 Nar 不同,还原酶 Nap 本身并不能产生用于 ATP 合成的 pmf,但在厌氧条件下,Nap 仍然是许多菌种硝酸盐呼吸的唯一还原酶。因此,需进一步研究厌氧条件下还原酶 Nap 通过何种机制供给微生物能量。(2)研究环境因子对于硝酸盐还原酶 Nar 与 Nap 影响的具体范围可以为反硝化脱氮系统的参数设置提供参考,对还原酶 Nar 与 Nap 的进一步对比研究,将完善对硝酸盐还原亚硝酸盐这一步骤的理解。

REFERENCES

- [1] HE YY, LI L. Density functional theory calculations of nitrogen and oxygen equilibrium isotope fractionations in NO_3^- - NO_2^- - H_2O aqueous system reveal inverse kinetic isotope effects during nitrite oxidation[J]. *Applied Geochemistry*, 2022, 139: 105265.
- [2] LIU KH, LIU MH, LIN ZW, WANG ZF, CHEN BQ, LIU C, GUO AP, KONISHI M, YANAGISAWA S, WAGNER G, SHEEN J. NIN-like protein 7 transcription factor is a plant nitrate sensor[J]. *Science*, 2022, 377(6613): 1419-1425.
- [3] GONZALEZ PJ, RIVAS MG, MOTA CS, BRONDINO CD, MOURA I, MOURA JGG. Periplasmic nitrate reductases and formate dehydrogenases: biological control of the chemical properties of Mo and W for fine tuning of reactivity, substrate specificity and metabolic role[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2013, 257(2): 315-331.
- [4] 杨平恒, 华茂松, 罗为群, 郭文静. 基于 CiteSpace 的岩溶地下水硝酸盐示踪研究进展[J]. *中国岩溶*, 2024, 43(3): 563-574.
YANG PH, HUA MS, LUO WQ, GUO WJ. Research progress of nitrate tracing in Karst groundwater based on CiteSpace[J]. *Carsologica Sinica*, 2024, 43(3): 563-574 (in Chinese).
- [5] 陈甜甜, 王先宝, 张雨笛, 高楚玥, 谢怡俐, 张安龙. 氧化还原介体强化生物反硝化脱氮研究进展[J]. *环境化学*, 2021, 40(10): 3199-3206.
CHEN TT, WANG XB, ZHANG YD, GAO CY, XIE YL, ZHANG AL. Enhanced biological denitrification by redox mediators: a review[J]. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(10): 3199-3206 (in Chinese).
- [6] MUJICA-ALARCON JF, THORNTON SF, ROLFE SA. Long-term dynamic changes in attached and planktonic microbial communities in a contaminated aquifer[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 277: 116765.
- [7] KRAFT B, STROUS M, TEGETMEYER HE. Microbial nitrate respiration—genes, enzymes and environmental distribution[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155(1): 104-117.
- [8] GONZÁLEZ PJ, CORREIA C, MOURA I, BRONDINO CD, MOURA JGG. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100(5/6): 1015-1023.
- [9] CORDAS CM, MOURA JGG. Molybdenum and tungsten enzymes redox properties: a brief overview[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, 394: 53-64.
- [10] DURAND S, GUILLIER M. Transcriptional and post-transcriptional control of the nitrate respiration in bacteria[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 667758.
- [11] FU WL, SONG GL, WANG YS, WANG Q, DUAN PF, LIU C, ZHANG X, RAO ZM. Advances in research into and applications of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying microorganisms[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2022, 10: 887093.
- [12] MORENO-VIVIÁN C, CABELLO P, MARTÍNEZ-LUQUE M, BLASCO R, CASTILLO F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(21): 6573-6584.
- [13] COELHO C, ROMÃO MJ. Structural and mechanistic insights on nitrate reductases[J]. *Protein Science*, 2015, 24(12): 1901-1911.
- [14] NAJMUDIN S, GONZÁLEZ PJ, TRINCÃO J, COELHO C, MUKHOPADHYAY A, CERQUEIRA NMFSA, ROMÃO CC, MOURA I, MOURA JGG, BRONDINO CD, ROMÃO MJ. Periplasmic nitrate reductase revisited: a sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(5): 737-753.

- [15] BERTERO MG, ROTHERY RA, PALAK M, HOU C, LIM D, BLASCO F, WEINER JH, STRYNADKA NCJ. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A[J]. *Nature Structural Biology*, 2003, 10(9): 681-687.
- [16] ASAMOTO CK, REMPFERT KR, LUU VH, YOUNKIN AD, KOPF SH. Enzyme-specific coupling of oxygen and nitrogen isotope fractionation of the nap and nar nitrate reductases[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(8): 5537-5546.
- [17] HU XJ, WAN XD, YUE JY, XIE HJ, WU HM, HU Z, ZHOU QH, YANG Y, ZHANG J. Altered microbial diversity, interaction pattern, and nitrogen transformation processes response to different iron addition amounts in constructed wetlands[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 493: 152484.
- [18] LIU LX, LI AH, SHI CJ, HRYNSPHAN D, TATSIANA S, WANG ZY, CHEN J. Advancements and challenges in protein purification techniques for denitrifying enzymes: a path to effective nitrogen removal and reduced N₂O emissions[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2024, 54(21): 1546-1568.
- [19] FREY C, HIETANEN S, JÜRGENS K, LABRENZ M, VOSS M. N and O isotope fractionation in nitrate during chemolithoautotrophic denitrification by *Sulfurimonas gotlandica*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(22): 13229-13237.
- [20] MAGALON A, ASSO M, GUIGLIARELLI B, ROTHERY RA, BERTRAND P, GIORDANO G, BLASCO F. Molybdenum cofactor properties and [Fe-S] cluster coordination in *Escherichia coli* nitrate reductase A: investigation by site-directed mutagenesis of the conserved his-50 residue in the NarG subunit[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(20): 7363-7370.
- [21] ELLIOTT SJ, HOKE KR, HEFFRON K, PALAK M, ROTHERY RA, WEINER JH, ARMSTRONG FA. Voltammetric studies of the catalytic mechanism of the respiratory nitrate reductase from *Escherichia coli*: how nitrate reduction and inhibition depend on the oxidation state of the active site[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(3): 799-807.
- [22] GONZÁLEZ PJ, RIVAS MG, FERRONI FM, RIZZI AC, BRONDINO CD. Electron transfer pathways and spin-spin interactions in Mo- and Cu-containing oxidoreductases[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 449: 214202.
- [23] CERQUEIRA NA, GONZALEZ PJ, BRONDINO CD, ROMÃO MJ, ROMÃO CC, MOURA I, MOURA JG. The effect of the sixth sulfur ligand in the catalytic mechanism of periplasmic nitrate reductase[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(15): 2466-2484.
- [24] PANDEY CB, KUMAR U, KAVIRAJ M, MINICK KJ, MISHRA AK, SINGH JS. DNRA: a short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 738: 139710.
- [25] CLEGG SJ, JIA WJ, COLE JA. Role of the *Escherichia coli* nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth[J]. *Microbiology*, 2006, 152(Pt 7): 2091-2100.
- [26] REY MW, RAMAIIYA P, NELSON BA, BRODY-KARPIN SD, ZARETSKY EJ, TANG M, LOPEZ de LEON A, XIANG H, GUSTI V, CLAUSEN IG, OLSEN PB, RASMUSSEN MD, ANDERSEN JT, JØRGENSEN PL, LARSEN TS, SOROKIN A, BOLOTIN A, LAPIDUS A, GALLERON N, EHRLICH SD, et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species[J]. *Genome Biology*, 2004, 5(10): R77.
- [27] WOOD NJ, ALIZADEH T, BENNETT S, PEARCE J, FERGUSON SJ, RICHARDSON DJ, MOIR JW. Maximal expression of membrane-bound nitrate reductase in *Paracoccus* is induced by nitrate via a third FNR-like regulator named NarR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(12): 3606-3613.
- [28] SHARMA V, NORIEGA CE, ROWE JJ. Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 695-701.
- [29] STEWART V, LU YR, DARWIN AJ. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(5): 1314-1323.
- [30] SPARACINO-WATKINS C, STOLZ JF, BASU P. Nitrate and periplasmic nitrate reductases[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(2): 676-706.
- [31] SEARS HJ, SAWERS G, BERKS BC, FERGUSON SJ, RICHARDSON DJ. Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (napEDABC) from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates[J]. *Microbiology*, 2000, 146(Pt 11): 2977-2985.
- [32] van SPANNING RJM, RICHARDSON DJ, FERGUSON SJ. Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification[M]//*Biology of the Nitrogen Cycle*. Amsterdam: Elsevier, 2007: 3-20.
- [33] DELGADO MJ, BONNARD N, TRESIERRA-AYALA A, BEDMAR EJ, MÜLLER P. The *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration[J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 12): 3395-3403.
- [34] TRUNK K, BENKERT B, QUÄCK N, MÜNCH R, SCHEER M, GARBE J, JÄNSCH L, TROST M, WEHLAND J, BUER J, JAHN M, SCHOBERT M, JAHN D. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the anr and dnr regulons[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(6): 1719-1733.
- [35] PITTMAN MS, ELVERS KT, LEE L, JONES MA, POOLE RK, PARK SF, KELLY DJ. Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(2): 575-590.
- [36] KERN M, SIMON J. Characterization of the NapGH quinol dehydrogenase complex involved in *Wolinella succinogenes* nitrate respiration[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(5): 1137-1152.
- [37] GIOVANNELLI D, SIEVERT SM, HÜGLER M, MARKERT S, BECHER D, SCHWEDER T, VETRIANI C. Insight into the evolution of microbial metabolism from the deep-branching bacterium, *Thermovibrio ammonificans*[J]. *eLife*, 2017, 6: e18990.

- [38] SONG WS, KIM JH, NAMGUNG B, CHO HY, SHIN H, OH HB, HA NC, YOON SI. Complementary hydrophobic interaction of the redox enzyme maturation protein NarJ with the signal peptide of the respiratory nitrate reductase NarG[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 262: 129620.
- [39] COLE J. Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation?[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 136(1): 1-11.
- [40] KAVIRAJ M, KUMAR U, SNIGDHA A, CHATTERJEE S. Nitrate reduction to ammonium: a phylogenetic, physiological, and genetic aspects in Prokaryotes and eukaryotes[J]. *Archives of Microbiology*, 2024, 206(7): 297.
- [41] DONG YY, WANG JX, FU HH, ZHOU GQ, SHI MM, GAO HC. A Crp-dependent two-component system regulates nitrate and nitrite respiration in *Shewanella oneidensis*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51643.
- [42] ALBINA P, DURBAN N, BERTRON A, ALBRECHT A, ROBINET JC, ERABLE B. Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5163.
- [43] BUENO E, MESA S, BEDMAR EJ, RICHARDSON DJ, DELGADO MJ. Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 16(8): 819-852.
- [44] GAIMSTER H, ALSTON M, RICHARDSON DJ, GATES AJ, ROWLEY G. Transcriptional and environmental control of bacterial denitrification and N₂O emissions[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018. DOI: 10.1093/femsle/fnx277.
- [45] REN T, JIN X, DENG SH, GUO K, GAO YH, SHI X, XU L, BAI X, SHANG YB, JIN PK, WANG XC. Oxygen sensing regulation mechanism of *Thauera* bacteria in simultaneous nitrogen and phosphorus removal process[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 434: 140332.
- [46] BROSSE A, BOUDRY P, WALBURGER A, MAGALON A, GUILLIER M. Synthesis of the NarP response regulator of nitrate respiration in *Escherichia coli* is regulated at multiple levels by Hfq and small RNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(12): 6753-6768.
- [47] CRACK JC, HUTCHINGS MI, THOMSON AJ, Le BRUN NE. Biochemical properties of *Paracoccus denitrificans* FnrP: reactions with molecular oxygen and nitric oxide[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2016, 21(1): 71-82.
- [48] FILENKO N, SPIRO S, BROWNING DF, SQUIRE D, OVERTON TW, COLE J, CONSTANTINIDOU C. The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(12): 4410-4417.
- [49] PANG YM, WANG JL. Various electron donors for biological nitrate removal: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 794: 148699.
- [50] WEI Q, ZHANG JS, LUO FZ, SHI DH, LIU YC, LIU S, ZHANG Q, SUN WZ, YUAN JL, FAN HT, WANG HC, QI L, LIU GH. Molecular mechanisms through which different carbon sources affect denitrification by *Thauera linaloolentis*: Electron generation, transfer, and competition[J]. *Environment International*, 2022, 170: 107598.
- [51] STRONG PJ, McDONALD B, GAPES DJ. Enhancing denitrification using a carbon supplement generated from the wet oxidation of waste activated sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(9): 5533-5540.
- [52] ZHANG YM, WANG XC, CHENG Z, LI YY, TANG JL. Effect of fermentation liquid from food waste as a carbon source for enhancing denitrification in wastewater treatment[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 689-696.
- [53] LEE YY, CHOI H, CHO KS. Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N₂O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2019, 54(1): 16-29.
- [54] XU ZS, DAI XH, CHAI XL. Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 634: 195-204.
- [55] PAN YT, NI BJ, BOND PL, YE L, YUAN ZG. Electron competition among nitrogen oxides reduction during methanol-utilizing denitrification in wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2013, 47(10): 3273-3281.
- [56] WUNDERLICH A, MECKENSTOCK R, EINSIEDL F. Effect of different carbon substrates on nitrate stable isotope fractionation during microbial denitrification[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(9): 4861-4868.
- [57] 杨丽, 何腾霞, 张漫漫, 杨露. 好氧反硝化细菌碳氮代谢特点及途径的研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(12): 4781-4797.
- YANG L, HE TX, ZHANG MM, YANG L. Research progress in the characteristics and pathways of carbon and nitrogen metabolism of aerobic denitrifying bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4781-4797 (in Chinese).
- [58] GU X, LENG JT, ZHU JT, ZHANG K, ZHAO JQ, WU P, XING QY, TANG KJ, LI XL, HU B. Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126116.
- [59] TABATA A, YAMAMOTO I, MATSUZAKI M, SATOH T. Differential regulation of periplasmic nitrate reductase gene (napKEFDABC) expression between aerobiosis and anaerobiosis with nitrate in a denitrifying phototroph *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*[J]. *Archives of Microbiology*, 2005, 184(2): 108-116.
- [60] GRANGER J, SIGMAN DM, LEHMANN MF, TORTELL PD. Nitrogen and oxygen isotope fractionation during dissimilatory nitrate reduction by denitrifying bacteria[J]. *Limnology and Oceanography*, 2008, 53(6): 2533-2545.
- [61] LI SJ, LUO ZX, WANG S, NAN Q, JI GD. Denitrification fractionates N and O isotopes of nitrate following a ratio independent of carbon sources in

- freshwaters[J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25(11): 2404-2415.
- [62] SEARS HJ, FERGUSON SJ, RICHARDSON DJ, SPIRO S. The identification of a periplasmic nitrate reductase in *Paracoccus denitrificans*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 113(1): 107-111.
- [63] WU MT, HUANG XJ, FENG LK, SUN Y, LU YB, HU L, TIAN SM, SHE TX, SHEN F, DENG SH, FANG DX. Hysteresis response of carbon release and nitrate reduction in polymer denitrification systems[J]. *Water Research*, 2025, 268: 122582.
- [64] MA J, YANG Q, WANG SY, WANG L, TAKIGAWA A, PENG YZ. Effect of free nitrous acid as inhibitors on nitrate reduction by a biological nutrient removal sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 175(1/2/3): 518-523.
- [65] WANG XG, TAMIEV D, ALAGURAJAN J, DiSPIRITO AA, PHILLIPS GJ, HARGROVE MS. The role of the NADH-dependent nitrite reductase, Nir, from *Escherichia coli* in fermentative ammonification[J]. *Archives of Microbiology*, 2019, 201(4): 519-530.
- [66] CARLSON CA, FERGUSON LP, INGRAHAM JL. Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1982, 151(1): 162-171.
- [67] OLAYA-ABRIL A, HIDALGO-CARRILLO J, LUQUE-ALMAGRO VM, FUENTES-ALMAGRO C, URBANO FJ, MORENO-VIVIÁN C, RICHARDSON DJ, ROLDÁN MD. Effect of pH on the denitrification proteome of the soil bacterium *Paracoccus denitrificans* PD1222[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 17276.
- [68] BLUM JM, SU QX, MA YJ, VALVERDE-PÉREZ B, DOMINGO-FÉLEZ C, JENSEN MM, SMETS BF. The pH dependency of N-converting enzymatic processes, pathways and microbes: effect on net N₂O production[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(5): 1623-1640.
- [69] SHEN QS, JI FY, WEI JZ, FANG DX, ZHANG Q, JIANG L, CAI AR, KUANG L. The influence mechanism of temperature on solid phase denitrification based on denitrification performance, carbon balance, and microbial analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 732: 139333.
- [70] ZHENG W, XUE DM, LI XZ, DENG Y, RUI JP, FENG K, WANG ZL. The responses and adaptations of microbial communities to salinity in farmland soils: a molecular ecological network analysis[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 120: 239-246.
- [71] LUO L, ZHOU WW, YUAN Y, ZHONG H, ZHONG CM. Effects of salinity shock on simultaneous nitrification and denitrification by a membrane bioreactor: performance, sludge activity, and functional microflora[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149748.
- [72] LI R, HOU YN, LI HB, HAN Y, ZHANG DH, SONG YY, HUANG C, GUO JB, LIU ZH, WEI W, NI BJ. Salinity responsive mechanisms of sulfur-based mixotrophic denitrification and ectoine induced tolerance enhancement[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 496: 154266.
- [73] 廖绍安, 黄捷畅, 王安利, 高方舟, 相晨曦, 罗年滔, 李永锋, 蓝宗坚. 碳源和盐度对好氧反硝化细菌脱氮特性的影响[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 48(6): 30-36, 143.
- LIAO SA, HUANG JC, WANG AL, GAO FZ, XIANG CX, LUO NT, LI YF, LAN ZJ. Effect of carbon source and salinity on nitrogen removal of an aerobic denitrifier[J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2016, 48(6): 30-36, 143 (in Chinese).
- [74] LIU HB, CHEN ZH, GUAN YN, XU SY. Role and application of iron in water treatment for nitrogen removal: a review[J]. *Chemosphere*, 2018, 204: 51-62.
- [75] CHEN H, ZHAO XH, CHENG YY, JIANG MJ, LI X, XUE G. Iron robustly stimulates simultaneous nitrification and denitrification under aerobic conditions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(3): 1404-1412.
- [76] JIANG M, FENG LY, ZHENG X, CHEN YG. Bio-denitrification performance enhanced by graphene-facilitated iron acquisition[J]. *Water Research*, 2020, 180: 115916.
- [77] SONG XS, WANG SY, WANG YH, ZHAO ZM, YAN DH. Addition of Fe²⁺ increase nitrate removal in vertical subsurface flow constructed wetlands[J]. *Ecological Engineering*, 2016, 91: 487-494.
- [78] 张相杰, 陈国俊, 李涵, 李芳柏, 刘同旭. 异化铁还原菌介导的硝酸盐还原亚铁氧化过程[J]. *土木与环境工程学报(中英文)*, 2021, 43(5): 166-177.
- ZHANG XJ, CHEN GJ, LI H, LI FB, LIU TX. Nitrate-reducing Fe(II)oxidation mediated by dissimilatory iron-reducing bacteria[J]. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2021, 43(5): 166-177 (in Chinese).
- [79] KAUR G, KUMAR V, ARORA A, TOMAR A, ASHISH, SUR R, DUTTA D. Affected energy metabolism under manganese stress governs cellular toxicity[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11645.
- [80] 李爽, 李晓敏, 李芳柏. Fe(II)对反硝化过程及其功能微生物群落的影响[J]. *中国环境科学*, 2018, 38(1): 263-274.
- LI S, LI XM, LI FB. Effect of Fe(II) on denitrification and associated functional microbial communities[J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(1): 263-274 (in Chinese).