2026, 66(10): 5093-5106
CSTR: 32112.14.j.AMS.20260132
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20260132

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

一种具有同步反硝化聚磷能力的不产氧光合细菌固氮蜡色杆菌及其分子调控机制解析

王世龙，刘书良，周波，邢宪春，亓正良*，刘新利

齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省生物传感与智能代谢调控重点实验室，山东 济南

王世龙, 刘书良, 周波, 邢宪春, 亓正良, 刘新利. 一种具有同步反硝化聚磷能力的不产氧光合细菌固氮蜡色杆菌及其分子调控机制解析[J]. 微生物学报, 2026, 66(10): 5093-5106.

WANG Shilong, LIU Shuliang, ZHOU Bo, XING Xianchun, QI Zhengliang, LIU Xinli. An anoxygenic phototrophic bacterium *Cereibacter azotoformans* with simultaneous denitrifying and polyphosphate-accumulating capabilities and its molecular regulation mechanism[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(10): 5093-5106.

摘　要：固氮蜡色杆菌(*Cereibacter azotoformans*)具备高效的氮、磷去除能力，且对水生动物有益生功能，被广泛应用于水产养殖水质调节与渔业病害预防。目前，该菌是否具备同步反硝化聚磷(denitrifying polyphosphate-accumulating, DPA)功能尚属未知。【目的】明确固氮蜡色杆菌的 DPA 表型，并解析其分子调控机制。【方法】以固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 菌株为研究对象，基于 DPA 产生条件对其代谢特点进行表征，明确是否具有 DPA 表型；通过基因敲除、DNA 亲和纯化测序(DNA affinity purification sequencing, DAP-seq)及生理生化分析等手段系统研究双组分系统 NtrX/Y 在 ATCC 17025 菌株 DPA 代谢中的调控作用。【结果】固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 表现出典型 DPA 表型：厌氧阶段释放磷酸盐，缺氧阶段过量吸收磷酸盐并与反硝化协同，实验结束时硝酸盐降解率达到 95%，磷酸盐去除率则超过 90%。敲除 *ntrY* 导致该菌丧失 DPA 表型，特别是环境中的磷酸盐浓度不仅未下降反而持续上升，且胞内聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHAs)的合成峰值较野生型(0.11 mg/mL)显著降低。DAP-seq 分析表明，NtrX 可直接调控该菌反硝化关键基因(*nir*K、*nor*B/C)和聚羟基脂肪酸酯合成基因 *pha*C，从而协同调节其反硝化与聚磷代谢。【结论】本研究证实不产氧光合细菌固氮蜡色杆菌具有优异的 DPA 能力，并揭示了 NtrX/Y 双组分系统在该过程中的重要调控作用机制，有望为同步脱氮除磷微生物资源开发提供新的理论依据。

关键词：固氮蜡色杆菌；反硝化聚磷；双组分系统；分子调控机制

资助项目：山东省自然科学基金(ZR2024MC069)；国家自然科学基金(31800108)；济南市市校融合发展战略工程项目(JNSX2025030)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2024MC069), the National Natural Science Foundation of China (31800108), and the Jinan City-University Integration Development Strategic Project (JNSX2025030).

*Corresponding author. E-mail: qizhengliang@qlu.edu.cn

Received: 2026-02-12; Accepted: 2026-04-29; Published online: 2026-06-08

An anoxygenic phototrophic bacterium *Cereibacter azotoformans* with simultaneous denitrifying and polyphosphate-accumulating capabilities and its molecular regulation mechanism

WANG Shilong, LIU Shuliang, ZHOU Bo, XING Xianchun, QI Zhengliang*, LIU Xinli

Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensing and Microbial Intelligent Metabolic Regulation, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan, Shandong, China

Abstract: *Cereibacter azotoformans* has been widely applied in the water quality regulation and disease prevention of aquaculture owing to its efficient nitrogen and phosphorus removal capacity as well as its probiotic effects on aquatic animals. However, whether this bacterium possesses both capabilities of denitrification and polyphosphate accumulation (DPA) remains unclear. **[Objective]** To identify the DPA phenotype of *C. azotoformans* and to elucidate its underlying molecular regulation mechanism. **[Methods]** Using the *C. azotoformans* strain ATCC 17025 as a model, we first examined its metabolic characteristics under DPA-inducing conditions to determine the presence of a DPA phenotype. Subsequently, gene deletion, DNA affinity purification sequencing (DAP-seq), and physiological and biochemical analyses were employed to systematically investigate the regulatory role of the NtrX/Y two-component system in DPA of the model strain. **[Results]** The *C. azotoformans* strain exhibited a typical DPA phenotype: releasing phosphate during the anaerobic stage and excessively absorbing phosphate in synergy with denitrification during the anoxic stage. At the end of the experiment, the nitrate degradation rate reached 95%, and the phosphate removal rate exceeded 90%. The deletion of *ntrY* resulted in the loss of the DPA phenotype. Particularly, the environmental phosphate concentration continuously increased rather than decreased, and the peak synthesis of intracellular polyhydroxyalkanoates (PHAs) was significantly impaired compared with that of the wild type (0.11 mg/mL). DAP-seq analysis revealed that NtrX directly targeted key denitrification genes (*nir*K and *nor*B/C) as well as the PHAs synthesis gene *pha*C, thereby coordinately regulating denitrification and polyphosphate metabolism. **[Conclusion]** This study demonstrates that the anoxygenic phototrophic bacterium *C. azotoformans* possesses excellent DPA capabilities, and it reveals a central regulatory role of the NtrX/Y two-component system in this process. These findings offer a new theoretical basis for the development of microbial resources for simultaneous nitrogen and phosphorus removal.

Keywords: *Cereibacter azotoformans*; denitrification and polyphosphate accumulation; two-component system; molecular regulation mechanism

随着全球陆基集约化水产养殖的快速发展，水产养殖尾水已逐渐成为一种棘手的新型污染源[1]。此类微污染水体总体污染负荷较低，主要污染物为氮、磷及有机物；其污染物组成相对稳定，但具有废水产生量大、排放时段集中的特点。研究表明，生物处理技术尤其是以微生物为核心的处理工艺非常适用于此类污水的治理[2]。水产养殖污水处理的核心目标在于降低

✉ actamicro@im.ac.cn, ☏ 010-64807516

氮、磷污染负荷。传统治理手段受相关微生物代谢特性的限制，污水中的反硝化与除磷过程通常被设计为相互独立的处理单元[3]。反硝化聚磷微生物(denitrifying polyphosphate-accumulating organisms, DPAOs)的发现，使污水处理过程中反硝化与除磷的同步实现成为可能[4]。将 DPAOs 应用于污水处理具有显著优势：其可实现“一碳两用”，从而大幅降低外加有机碳源的需求[5]；同时，该过程在厌氧-缺氧条件下运行，无需额外供氧，可有效降低运行成本[6]。因此，基于 DPAOs 的废水同步脱氮除磷技术有望成为一种新型、高效且经济的水产养殖污水治理策略。

目前，DPAOs 主要分离自假单胞菌属(*Pseudomonas*)、索氏菌属(*Thauera*)和嗜水气单胞菌属(*Aeromonas*)[7]等，而在不产氧光合细菌(anoxygenic phototrophic bacteria, APB)中尚未有 DPAOs 的报道。固氮蜡色杆菌(*Cereibacter azotoformans*)属于紫色非硫细菌，根据 KEGG 数据库对固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 全基因组序列的注释，其基因组内具有完整且成簇排布的不产氧光合作用完整基因簇，包括编码光反应中心的 *puf* 和 *puh* 操纵子、负责捕光天线合成的 *puc* 操纵子以及参与细菌叶绿素合成的 *bch* 基因簇，证实固氮蜡色杆菌为不产氧光合细菌(APB)[8-9]。因此，本研究旨在探究固氮蜡色杆菌是否具有同步反硝化聚磷(denitrifying polyphosphate-accumulating, DPA)能力。本研究的开展有望进一步拓展 DPAOs 的微生物资源库，从而为水产养殖污水的生物处理提供了一种新的潜在功能菌。

双组分系统(two-component system, TCS)广泛存在于细菌中，是许多细菌感知环境变化并启动相关代谢反应(如反硝化作用)的关键调控元件[10]。典型的 TCS 由成对的组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和响应调节蛋白(response regulator, RR)构成。HK 的活性及其催化方向决定 RR 的磷酸化水平，进而调控靶基因转录强度[11]。NtrX/Y 双组分系统最早在茎瘤固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*)中被鉴定，随后发现其在多种细菌中广泛分布并具有多样化的生理功能[12]。例如，在草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)中，NtrX/Y 系统参与硝酸盐还原代谢调控[12]；在荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)中，该系统不仅调控氮代谢，还控制光合生长所必需的光反应中心的合成[13]。本课题组前期研究已证实 NtrX/Y 系统可调控固氮蜡色杆菌的反硝化过程，但该双组分系统能否介导其 DPA 功能仍有待阐明。

本研究主要目的是阐明 NtrX/Y 双组分系统调控固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 菌株 DPA 代谢的分子机制。首先，验证固氮蜡色杆菌是否具有 DPA 表型，其次明确 NtrX/Y 系统对固氮蜡色杆菌 DPA 能力是否具有调控作用；在此基础上，采用遗传操作技术、生理生化分析以及 DNA 亲和纯化测序(DNA affinity purification sequencing, DAP-seq)等技术解析其调控机制。本研究有望为蜡色杆菌属 APB 菌株在水产养殖尾水处理中实现氮磷同步去除的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基及培养条件

固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 菌株及其相应突变株接种于 NH1 培养基中，于 30 ℃、200 r/min 条件下培养 12 h 作为种子液[14]。本研究所使用的菌株及质粒信息见表 1。种子制备方法如下：从甘油保藏管中挑取一环固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 菌苔，在 NH1 固体培养基上划线分离纯种，平板倒置后置于 30 ℃恒温培养箱中培养，待形成红色单菌落(2−4 d)。随后挑取单个菌落接种于 NH1 液体培养基中，于 30 ℃、200 r/min 条件下振荡培养，直至菌液 OD_{600}>1.0 (通常为 1−2 d)，作为种子菌液。接种前，将种子菌液于 6 000×*g* 离心 10 min，弃上清后用质量分数 0.85% 的无菌生理盐水重悬。在固氮蜡色杆菌突

表1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Resource
Wild-type (WT)	*Cereibacter azotoformans* ATCC 17025	Lab preservation
Δ*ntrY*	*ntrY* markerless deletion mutant	Lab preservation
WT/op	WT harboring pBBR1MCS-2	Lab preservation
Δ*ntrY*/*ntrY*	Δ*ntr*Y harboring pBBR1MCS-2::*ntr*Y	Lab preservation
pBBR1MCS-2	*Ori* pBBR1, lacZa, Km^r, used for gene overexpression	Lab preservation

变菌培养中需要加入卡那霉素，其终浓度为25 μg/mL。

1.2 固氮蜡色杆菌在合成污水中的反硝化聚磷代谢分析

采用两阶段(厌氧/缺氧)培养策略研究固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 的 DPA 代谢，实验装置如图 1A 所示。厌氧阶段：用 N_2 充分置换反应器中的溶解氧(dissolved oxygen, DO)，随后紧固夹具以建立厌氧条件，此时培养基中溶解氧(用电极测定)<0.2 mg/L。缺氧阶段：松开夹具以允许空气进入，通过开闭排气管调节培养液中溶解氧维持在 0.2−0.7 mg/L。

采用人工合成污水培养基开展上述研究[15]。其中，无水乙酸钠、NH_4Cl/KNO_3 和 K_2HPO_4 分别模拟污水中的碳、氮和磷污染物。Δ*ntrY* 突变株在谷氨酰胺为唯一氮源的条件下生长良好，因此培养 Δ*ntrY* 时将 NH_4Cl 替换为谷氨酰胺(*ntrY* 缺失使细胞无法利用胞外 NH_4Cl，否则将完全抑制菌体生长)。

厌氧阶段操作：取体积分数 10% 种子菌接种于 800 mL 人工合成污水培养基中(反应器工作体积 1 000 mL)，30 ℃培养 48 h。缺氧阶段操作：向培养液中加入 KNO_3，使其终浓度达到 30 mg/L，继续 30 ℃培养 60 h。培养过程中，每 12 h 取样 10 mL，8 000 r/min 离心 5 min，上清液可立即分析或−20 ℃保存备用。同时，整个实验维持 12 h 光照/12 h 黑暗循环，光照由全光谱 LED 灯提供，光照强度控制在 5 000−6 000 lx。

1.3 生物信息学分析

从 KEGG 数据库(https://www.genome.jp/kegg/)中获取固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 的 NtrB、NtrC、NtrY 和 NtrX 氨基酸序列。利用 SMART 保守结构域数据库(https://smart.embl.de/)对上述蛋白的主要结构域及螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)基序进行鉴定。采用 Predict Protein 数据库(https://predictprotein.org/)预测 NtrY 的跨膜结构，同时利用 SWISS-MODEL 数据库(https://swissmodel. expasy. org/interactive)对蛋白质三级结构进行预测。NtrX 的磷酸化位点及 NtrY 的组氨酸残基通过 Pfam 软件(InterPro)进行分析鉴定。

1.4 RNA 提取及实时荧光定量逆转录 PCR (RT-qPCR)

在缺氧阶段，于选定时间点收集 ATCC 17025 菌体，常温 6 000 r/min 离心 10 min 去除上清后，于−80 ℃保存备用。采用 TRIzol 法提取菌体总 RNA，并使用 First cDNA Synthesis Kit (北京鼎国昌盛生物技术有限公司)反转录合成 cDNA。荧光定量逆转录 PCR (reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)反应体系：cDNA 模板 1.0 μL，2×SuperReal PreMix Plus 5.0 μL，正、反向引物(10 μmol/L)各 0.4 μL，ddH_2O 补充体系至 10.0 μL。混合均匀后使用实时荧光定量 PCR 仪(ThermoFisher Scientific 公司)进行检测。扩增条件：95 ℃ 15 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环。以 16S rRNA 基因为内参基因，对不同样品间的基因表达水平进行标准化处理，

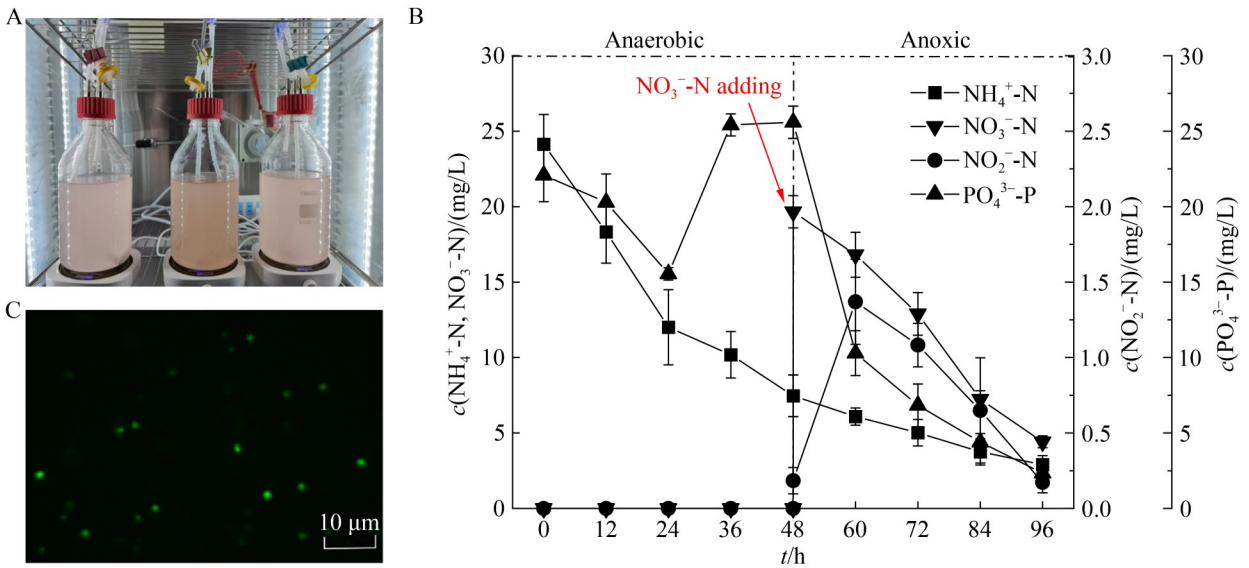


图1 固氮蜡色杆菌的DPA过程

Figure 1 Denitrifying polyphosphate-accumulating process of *Cereibacter azotoformans*. A: Physical diagram of the culture experimental apparatus; B: Changes in the concentrations of various indicators during anaerobic and anoxic cultivation processes (DO was <0.2 mg/L during anaerobic stage and was maintained among 0.2−0.7 mg/L during anoxic stage); C: Fluorescence microscope image of intracellular poly-P.

具体引物序列见表 2。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对数据进行相对定量分析。

1.5 DNA 亲和纯化测序

DNA 亲和纯化测序(DNA affinity purification sequencing, DAP-seq)是一种用于研究转录因子与 DNA 相互作用的高效技术。与染色质免疫共沉淀测序(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)相比，该方法无需制备转录因子特异性抗体[16]。DAP-seq 的基本流程如下：首先，提取固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 的基因组 DNA，并构建 NtrX 表达载体；其次，对部分基因组 DNA 进行片段化处理，通过琼脂糖凝胶电泳筛选 100−500 bp 片段，构建亲和测序文库；将纯化的 NtrX 蛋白与 DNA 文库在体外孵育，利用磁珠特异性富集与 NtrX 蛋白结合的靶 DNA 片段；最后，将洗脱回收的 DNA 片段(DAP-seq 文库)进行高通量测序。下机数据比对至 ATCC 17025 参考基因组后，采用 MACS2 软件进行全基因组结合峰(peak calling)识别，并利用 MEME Suite 工具包进行核心结合基序(motif)的预测分析[17]。

表2 用于RT-qPCR的引物

Table 2 Primers used for RT-qPCR

Primer names	Primer sequences (5′→3′)
16S-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S-R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT
*ntr*Y-F	CTTTGACGATGTGACCGATCT
*ntr*Y-R	GTCAGCGGGTTCTTGATCTC
*ntr*X-F	GCTCGAGAAGGTCACGAAAT
*ntr*X-R	CCCGAGTTGGAATGGATGAA

1.6 细胞内多聚磷酸盐及多聚羟基脂肪酸酯测定

分别在实验过程的 48、72、96 h 取野生型(WT)和 Δ*ntrY* 菌株的菌悬液各 1.5 mL。样品于 4 ℃、10 000 r/min 离心 15 min，弃去上清。将菌体沉淀置于 1.0 mL 20 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.0)中充分涡旋重悬后，再次于 4 ℃、10 000 r/min 离心 15 min[18]，弃去上清。随后将

菌体沉淀重悬于 1.0 mL HEPES 缓冲液中。取 0.3 mL 菌悬液加入 1.5 mL 离心管中，加入 0.1 mL 100 μmol/L DAPI 溶液[19]，充分涡旋混匀后，于室温避光条件下孵育 10 min；随后于 4 ℃、10 000 r/min 离心 3 min，弃去上清[20]。菌体沉淀用 HEPES 缓冲液洗涤 1 次，并重悬于 1.0 mL HEPES 缓冲液中。取 10 μL 重悬液滴加于载玻片上，加入香柏油后，在荧光显微镜下使用 100×油镜物镜和 10×目镜进行观察。以 488 nm 为激发波长，在 500−560 nm 波段采集绿色荧光信号，用于表征 DAPI-多聚磷酸盐复合物的荧光强度[21]。

尼罗红可快速穿透悬浮细胞，实现细胞内多聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHAs)的快速检测，其染色后细胞的荧光强度与 PHAs 含量呈正相关关系[22]。以二甲基亚砜为溶剂配制尼罗红储备液，终浓度为 80 μg/mL，用于菌体染色。在 0、24、48、72、96 h 取适量菌液，12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀，并通过涡旋振荡以纯水重悬，将所有时间点细胞悬液调整为 OD_{600}=0.8。随后向 1.0 mL 菌悬液中加入 50 μL 尼罗红染色液，室温孵育 30 min 以完成染色；染色结束后，于 12 000 r/min 离心 5 min，弃去上清。菌体沉淀以纯水重悬并洗涤 1 次，最终重悬于 1.0 mL 纯水中。荧光测定时，取 200 μL 重悬后的菌液加入 96 孔板中，每个样品设置不少于 2 个重复孔。采用荧光酶标仪进行检测，激发波长为 535 nm，发射波长为 595 nm。通过与 PHAs 标准曲线对比计算样品中的 PHAs 含量[23]。

1.7 生物量、脱氮除磷理化指标测定及数据分析

细胞密度采用 UV2300 II 分光光度计(Techcomp 公司)在 600 nm 波长下测定(OD_{600})。细胞干重(dry cell weight, DCW)与吸光度的关系为：1 OD_{600} 对应 0.40 g DCW/L。硝酸盐氮(NO_3^--N)采用紫外分光光度法测定(分别在 220 nm 和 275 nm 处测量吸光度)；亚硝酸盐氮(NO_2^--N)采用 *N*-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定。上述指标检测的具体操作步骤参照文献[15]。磷酸盐(PO_4^{3-}-P)采用铵-钼酸盐比色法测定。检测前，所有样品均以 10 000 r/min 离心 10 min。所有数据分析均使用 SAS Ver 8.01 软件(SAS 公司)，结果以均值±标准差形式表示。

2 结果与讨论

2.1 固氮蜡色杆菌具备典型的同步反硝化聚磷代谢表型

如图 1B 所示，实验过程中硝酸盐(NO_3^--N)、亚硝酸盐(NO_2^--N)和磷酸盐(PO_4^{3-}-P)的浓度变化符合典型的 DPA 代谢特征。具体来说，厌氧阶段固氮蜡色杆菌释放出一定量的磷酸盐，导致环境中 PO_4^{3-}-P 浓度升高；随后，在缺氧阶段呈现 PO_4^{3-}-P 快速下降的现象，这是多聚磷酸盐(poly-P)过量积累所致，最终 PO_4^{3-}-P 去除率超过 90%。缺氧阶段开始时加入硝酸盐，其间 NO_3^--N 浓度迅速下降，到实验结束(96 h)时降至<1.0 mg/L。同时，实验过程中 NO_2^--N 浓度先短暂升高随后下降，最终降至<0.2 mg/L，硝酸盐去除率达到 95%。这种变化趋势在污水反硝化处理中较为常见，通常是由于处理初期细菌反硝化酶合成能力的不平衡所致。此外，通过荧光显微镜观察到细菌细胞内 DAPI-poly-P 的荧光强烈积累(图 1C)，证实了缺氧阶段细胞内储存 poly-P。

DPAOs 驱动的氮、磷同步去除在水产养殖污水处理中的应用前景广阔[24]。现有研究表明，大多数 DPAOs 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、索氏菌属(*Thauera*)和嗜水气单胞菌属(*Aeromonas*)[7]，但来源于这 3 个属中的部分 DPAOs 菌株可能对水产养殖物种构成潜在的致病风险。本研究证实，固氮蜡色杆菌具有典型 DPA 特征。同时，考虑到蜡色杆菌属 APB 在水产养殖中具有多种有益功能，可维持水质并抑制病害。因此，固

氮蜡色杆菌 ATCC 17025 作为推进水产养殖尾水处理中 DPA 处理策略的候选菌株，展现出极高的应用潜力与安全性。

2.2 NtrY 突变抑制固氮蜡色杆菌反硝化聚磷代谢

细菌通过多种代谢调控机制适应环境变化。其中，双组分系统(TCS)是细菌快速响应外界刺激的重要机制。研究表明，双组分系统 NtrX/Y 可以调控多种细菌的反硝化过程。例如，已证实 NtrX/Y 系统在固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 中正向调控反硝化代谢[15]。鉴于在 DPAOs 中反硝化和聚磷代谢密切协同，本研究提出了一个重要问题：NtrX/Y 系统是否也调控固氮蜡色杆菌的这种同步代谢?

为解答这一问题，本研究对野生型 WT 和 *ntrY* 基因敲除株(Δ*ntrY*)进行了 DPA 能力测试。本研究监测了硝酸盐(NO_3^--N)、亚硝酸盐(NO_2^--N)和磷酸盐(PO_4^{3-}-P)的浓度变化(图 2)。结果显示 Δ*ntrY* 与 WT 之间存在显著差异。关于 PO_4^{3-}-P 代谢：ATCC 17025 WT 菌株在缺氧阶段显示出快速吸收磷酸盐的表型，但对于接种了 Δ*ntrY* 菌株的实验组，在缺氧阶段 PO_4^{3-}-P 浓度并未下降，反而持续上升(图 2A)，表明敲除 *ntrY* 后细菌 poly-P 合成功能显著受损。关于 NO_3^--N 还

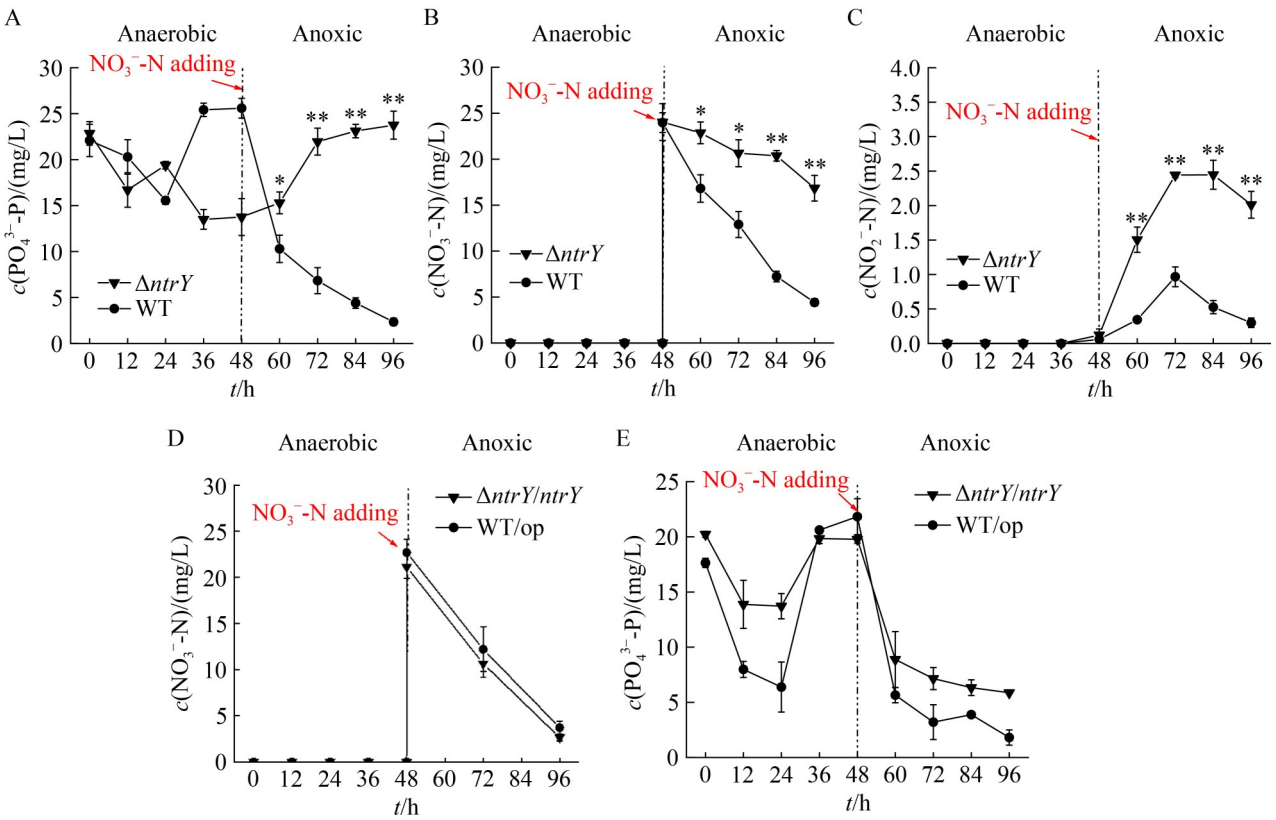


图2 *ntrY*基因突变对固氮蜡色杆菌DPA代谢的影响

Figure 2 The effect of *ntrY* mutation on the denitrifying polyphosphate-accumulating metabolism of *Cereibacter azotoformans*. A: PO_4^{3-}-P concentration profiles for the WT and Δ*ntrY*; B: NO_3^--N concentration profiles for the WT and Δ*ntrY*; C: NO_2^--N concentration profiles for the WT and Δ*ntrY*; D: NO_3^--N concentration profiles for the WT/op and Δ*ntrY*/*ntrY*; E: PO_4^{3-}-P concentration profiles for the WT/op and Δ*ntrY*/*ntrY*. * indicates significant difference, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

原：Δ*ntrY* 突变株的硝酸盐还原能力显著受到抑制(图 2B)。关于 NO_2^--N 积累：Δ*ntrY* 菌株在缺氧阶段的 NO_2^--N 积累明显高于野生型菌株(图 2C)，这一现象与之前的研究结果一致[15]。此外，Δ*ntrY* 在 0 h 时仅显示微弱荧光，且随着培养时间的延长始终未出现绿色荧光，进一步证实其无法积累 poly-P。接下来，本研究使用导入空质粒的突变菌株(WT/op)作为对照，测试 *ntrY* 基因回补株(Δ*ntrY*/*ntrY*)是否恢复 DPA 能力。结果表明，回补株成功恢复了 DPA 表型(图 2D、2E)，进一步证实了 *ntrY* 基因的缺失显著损害了固氮蜡色杆菌的聚磷能力。同时，该结果揭示 NtrX/Y 系统通过直接或间接的方式正向调控该代谢过程。上述研究表明，NtrX/Y 双组分系统在固氮蜡色杆菌的 DPA 代谢中发挥关键的调控作用。

2.3 固氮蜡色杆菌反硝化聚磷代谢的调控机制

2.3.1 NtrX/Y 蛋白结构解析

在固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 基因组中，编码 NtrX/Y 蛋白的基因位于另一双组分系统 NtrB/C 的下游(图 3)。其中，响应调节蛋白 NtrX 属于 Fis 家族，是一种 σ^{54} 依赖型转录因子。其结构

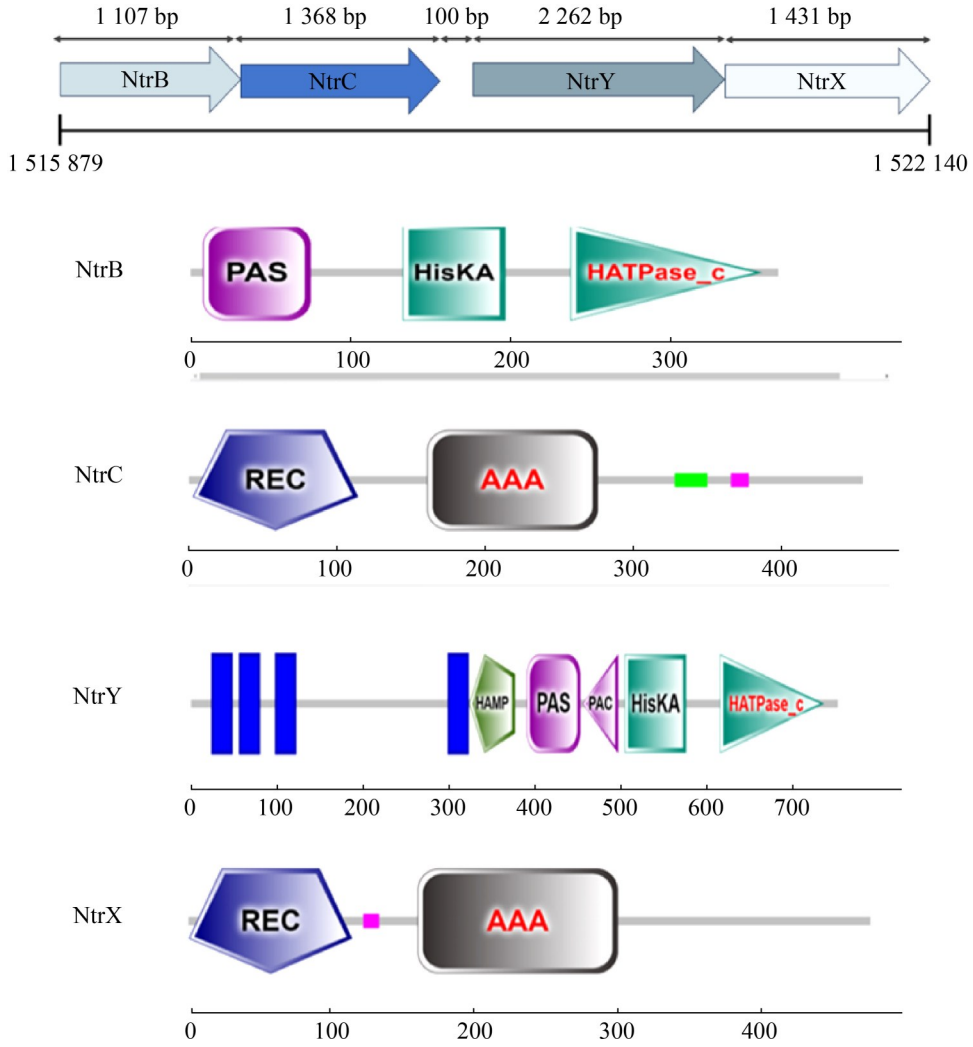


图3 固氮蜡色杆菌中NtrB/C、NtrX/Y功能的生物信息学分析

Figure 3 Bioinformatics analysis of the functions of NtrB/C and NtrX/Y in *Cereibacter azotoformans*.

域组成包括 N 端的受体结构域(REC，通过磷酸化调节蛋白活性)以及核心 AAA^+ ATPase 结构域(在核苷酸结合/水解、寡聚化以及与 σ^{54} 的直接相互作用中发挥关键作用)[25]。REC 结构域的磷酸化状态受到严格调控，是控制 AAA^+结构域寡聚化的关键开关[26]。磷酸化引发蛋白构象发生改变，从而促进寡聚体组装或解除 REC 与 AAA^+ 结构域之间的自抑制相互作用，从而形成转录激活所必需的功能性六聚体[27]。

NtrY 作为 NtrX/Y 系统的组氨酸激酶，含有组氨酸激酶二聚体/磷酸受体结构域(HisKA)、类组氨酸激酶 ATP 酶结构域(HATPase_c)以及 PAS 信号感知结构域。HisKA 与 HATPase_c 结构域协同介导 NtrY 在保守组氨酸残基上的自磷酸化及随后向 NtrX 的磷酸基团转移。HAMP 结构域通过响应 PAS 域传递的信号，在调控 NtrY 同源二聚体构象与活性中发挥关键作用。值得注意的是，与其相类似的激酶 NtrB 不同，NtrY 具有跨膜区和 HAMP 信号转导结构域。在 α-变形菌中，NtrB/C 系统主要调控氮代谢，通过转录调控靶基因实现对有限氮源(如硝酸盐)的利用[28]。然而，先前研究发现，固氮蜡色杆菌中的 NtrB/C 系统对反硝化起负调控作用，而 NtrX/Y 系统则发挥激活作用，这一调控模式在草螺菌等细菌中也有体现[12]。更为重要的是，结构分析揭示了 NtrY 与 NtrB 之间的一个关键差异：NtrY 为膜结合型传感激酶，具有跨膜结构域和 HAMP 结构域，而 NtrB 缺乏上述结构。该结构特征使 NtrY 能够感知胞外或周质信号，而胞质型的 NtrB 则不具备此功能。

综合功能差异(NtrX/Y 系统与 NtrB/C 系统在反硝化调控中发挥相反作用)与结构特征(NtrY 为膜整合结合型传感激酶)等分析结果，可以推断出固氮蜡色杆菌在进化过程中更倾向于以 NtrX/Y 系统而非 NtrB/C 系统作为调控反硝化代谢的信号传导通路。

2.3.2 *ntrX*/*Y* 基因的转录动态变化

为明确固氮蜡色杆菌 ATCC 17025 在 DPA 过程中 *ntrX* 和 *ntrY* 的转录动态变化，采用 RT-qPCR 方法进行分析。在 48−72 h 期间，每隔 6 h 采集 3 个生物学重复样品(图 4)。结果显示，在 48、54、60 h 时 *ntrY*/*X* 的转录水平持续上调，表明 NtrX/Y 双组分系统在该耦合代谢过程中处于活跃状态。

值得注意的是，在 66 h 出现了明显的转录转折点：*ntrX*/*Y* 的表达水平急剧下降。与此同时，NO_2^--N 浓度出现峰值(图 1)。NO_2^--N 浓度升高可能抑制细菌的反硝化活性，从而导致 NtrX/Y 表达下调。此外，*ntrX*/*Y* 的表达水平在 72 h 时再次回升。考虑到 NtrX/Y 系统作为一种全局转录调控因子，推测固氮蜡色杆菌可能通过反馈调控机制重新激活 *ntrX*/*Y* 的表达，以满足新的代谢需求或适应资源变化，从而维持自身的生存适应性。

2.3.3 细胞内多聚羟基脂肪酸酯含量变化

多聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHAs)是 DPAOs 中驱动 DPA 代谢的重要能量与还原力储备物质[29]。在厌氧阶段，细胞内 poly-P 水解释放 PO_4^{3-}-P 同时生成 ATP；与此同时，乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)作为前体合成并储

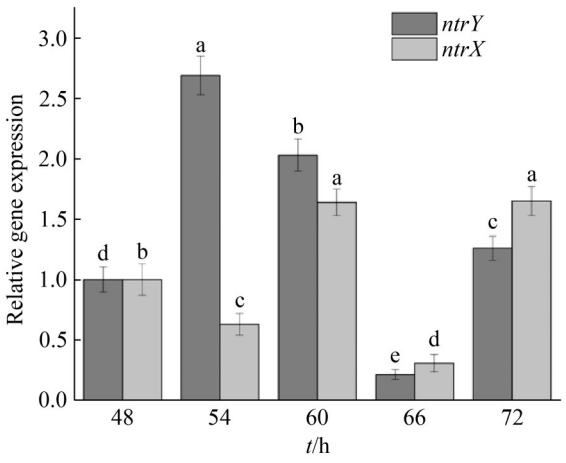


图4 厌氧阶段*ntrY*和*ntrX*的转录水平分析

Figure 4 Transcriptional level analysis of *ntrY* and *ntrX* during the anaerobic stage. Different letters indicate significant differences in data (P<0.05).

存 PHAs。随后在缺氧阶段，PHAs 发生分解再生成乙酰辅酶 A，产生 ATP 和 NADH，从而为聚磷代谢与反硝化的耦合过程提供关键的电子和能量[30]。

与上述代谢模型一致，固氮蜡色杆菌在厌氧条件下表现出显著的 PHAs 合成能力(图 5)。结果显示，在 48 h 时细胞内 PHAs 含量达到峰值(0.11 mg/mL)，该时间点对应厌氧阶段磷酸盐释放的后期。进入缺氧阶段并发生聚磷积累后，细胞内 PHA 含量迅速下降，符合 DPAOs 的经典代谢动态特征。值得注意的是，Δ*ntrY* 菌株的 PHA 生物合成能力显著受损，进一步表明 NtrX/Y 双组分系统在 PHA 代谢调控中发挥关键作用。

2.3.4 NtrX 靶基因的全基因组规模鉴定

本研究采用 DAP-seq 技术对固氮蜡色杆菌全基因组范围内的 NtrX 结合靶位点进行了鉴定[相关数据已上传 ScienceDB 数据库(www.scidb.cn)，CSTR 编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00072)]。2 次技术重复中峰型分布高度一致，表明实验样品具有良好的重复性和数据可靠性。利用 depTools2 软件分析发现，NtrX 的结合峰主要聚集于靶基因编码区起始位点附近，其中 46.30% 的结合位点位于转录起始位点(transcription start site, TSS)上游 2 000 bp 以内，证实 NtrX 作为转录因子主要通过结合启动子区域发挥调控作用。MEME-chip 分析进一步揭示 49.10% 的结合峰序列中存在一个保守序列基序(YGTGGCVNWNBYGCM，命名为 MEME-1)，该序列被确定为 NtrX 的核心结合位点。对目标基因进行 GO 富集分析发现，其主要参与 DNA 结合、整合及转录调控等功能，反映了 NtrX/Y 系统的调控特征。KEGG 富集分析结果显示，排名前 20 的通路主要集中于氮代谢相关通路，包括酪氨酸代谢，表明 NtrX/Y 系统可能通过调控氮代谢及氧化磷酸化相关基因来介导固氮蜡色杆菌的 DPA 代谢。

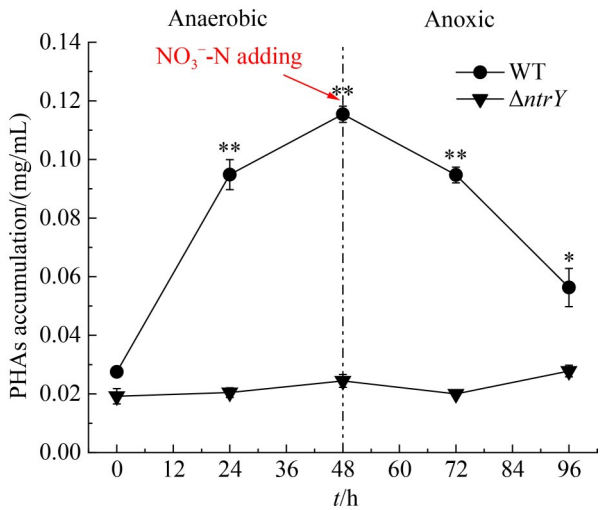


图5 整个实验过程中多聚羟基脂肪酸酯含量的变化

Figure 5 Polyhydroxyalkanoates content change during the whole experimental process. * indicates significant difference, *: P<0.05; **: P<0.01.

截至目前，细菌 DPA 代谢的转录调控机制仍不清楚。本研究将 NtrX/Y 双组分系统与固氮蜡色杆菌的 DPA 代谢过程直接联系起来。表 3 总结了部分鉴定的 NtrX 靶基因，其中包括反硝化关键基因 *nirK* (亚硝酸盐还原酶)和 *norB*/*C* (一氧化氮还原酶)，与先前研究结果一致[15]。此外，电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)进一步验证了 DAP-seq 的结果(图 6A)。

值得注意的是，DAP-seq 结果显示，聚磷代谢的核心基因(如 *ppk* 和 *ppx*)并未出现在 NtrX 的直接靶基因列表中，提示 NtrX 并不直接作用于聚磷途径。然而，NtrX 却直接作用于 PHAs 合酶基因(*phaC*)以及 NADH-醌氧化还原酶亚基 D 基因(*nuoD*)。在经典的 DPA 模型中，PHAs 是反硝化和生成 ATP 的重要内碳源与能量前体；而 *nuoD* 编码的复合物 I 直接参与电子传递链并建立跨膜质子梯度，是驱动 ATP 合成的关键枢纽。基于上述靶基因网络，结合 WT 在缺氧阶段积累高达 0.11 mg/mL 的 PHAs 且将硝酸盐降至<1 mg/L，而 Δ*ntrY* 突变体反硝化与 PHA 合成

表3 基于DAP-seq鉴定的与DPA相关的NtrX靶基因

Table 3 DAP-seq based target genes of NtrX associated with DPA

Gene name	Login ID	Function
nirK	Rsph17025_1595	Nitrite reductase mediates the key denitrification reaction by catalyzing the reduction of NO_2^- to NO
glnA	Rsph17025_1344	L-glutamine synthetase: involved in ammonia assimilation, and helps maintain the overall carbon and nitrogen metabolic balance during the DPA process
norB/*C*	Rsph17025_0970	Nitric oxide reductase subunit C: catalyzes NO reduction and maintains the operation of denitrification electron transport chain
phaC	Rsph17025_0254	PHAs synthase: synthesizes PHAs and supplies electrons (NADH) and energy reserves for nitrogen and phosphorus removal
sdhA	Rsph17025_0088	Succinate dehydrogenase subunit A: participates in TCA cycle and provides crucial reducing power for nitrogen and phosphorus removal
glgB	Rsph17025_1783	1,4-α-glucan branching enzyme: participates in glycogen synthesis
nuoD	Rsph17025_2004	NADH-quinone oxidoreductase subunit D: involves in electron transport chain and pumps protons, acting as a core hub driving ATP synthesis
gltB, *gltD*	Rsph17025_2781, Rsph17025_2778	Glutamate synthase II: Cooperates with glnA to mediate efficient ammonia assimilation pathway
nifD, *nifK1*, *nifH*	Rsph17025_1247, Rsph17025_1248, Rsph17025_1246	Participates in the assembly of nitrogenase complex

受阻且完全丧失聚磷能力的宏观表型，推测NtrX蛋白可能通过直接激活反硝化与能量代谢途径(*phaC*、*nuoD*)，以电子传递和ATP供应为桥梁，间接驱动聚磷代谢的完成。

综上所述，NtrX/Y系统通过直接调控反硝化代谢和PHAs合成，从而协同调节整个DPA过程(图6B)。与前人报道的经典DPAOs相比，固氮蜡色杆菌在代谢调控网络上展现出了鲜明的特性。传统理论认为DPAOs (如假单胞菌属、候选累积杆菌等)的聚磷代谢通常是“以磷为驱动”的，其核心调控信号主要来源于环境磷浓度感受器(如经典的PhoB/PhoR双组分系统)，通过直接结合聚磷核心基因启动相关代谢[31-32]。然而，本研究证实固氮蜡色杆菌ATCC 17025展现出一种“以氮驱动”的全局调控策略：其高度依赖感应环境氮素信号的NtrX/Y系统，以反硝化模块作为关键中枢枢纽，连接PHAs与聚磷代谢途径。这种跨网络的调控模式，不仅在转录层面上丰富了微生物同步反硝化聚磷代谢的分子机制理论框架，也表明了固氮蜡色杆菌在应对复杂水环境时的代谢灵活性。

3 结论

本研究以一种具有DPA能力的不产氧光合细菌固氮蜡色杆菌为研究对象，系统研究了其DPA代谢特征及分子调控机制。结果表明，固氮蜡色杆菌表现出典型的DPA表型，能够在厌氧/缺氧交替条件下实现氮、磷的协同去除。通过构建*ntrY*缺失突变株并开展对比分析发现，双组分调控系统NtrX/Y在固氮蜡色杆菌DPA代谢中发挥重要的调控作用。*ntrY*缺失显著削弱了菌株的反硝化能力和聚磷能力，并导致胞内PHAs合成受阻，表明NtrX/Y系统是连接反硝化、PHAs代谢与聚磷过程的重要调控纽带。DAP-seq结果进一步揭示，NtrX可直接结合并调控多种反硝化及能量代谢相关基因(如*nirK*、*norB*/*C*、*phaC*等)，从转录水平上协调反硝化与PHAs合成过程，而聚磷代谢可能通过能量代谢间接受到调控。

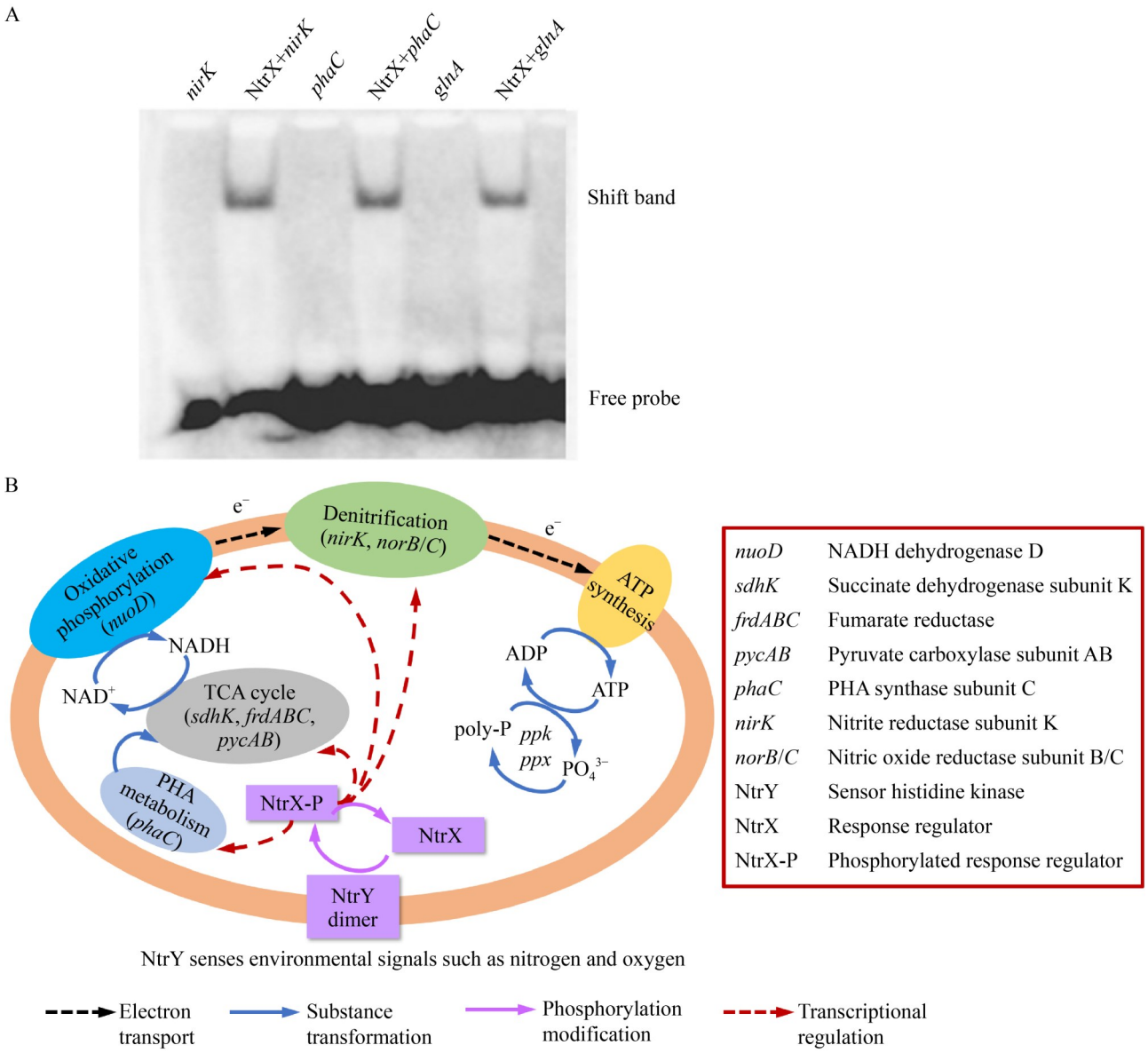


图6　固氮蜡色杆菌DPA代谢调控机制

Figure 6　Regulatory mechanism of denitrifying polyphosphate-accumulating metabolism in *Cereibacter azotoformans*. A: Results of electrophoretic mobility shift assay (EMSA); B: Model of the regulatory mechanism for denitrifying polyphosphate-accumulating metabolism in *Cereibacter azotoformans*. Genes marked in red are the target genes of NtrX.

综上所述，本研究从分子水平阐明了 NtrX/Y 系统在固氮蜡色杆菌 DPA 代谢中的重要调控作用，加深了对 DPA 代谢调控网络的认识，为 DPA 功能菌的筛选、调控及其在水产养殖污水氮磷协同去除中的应用提供了重要理论基础。

作者贡献声明

王世龙：研究构思和设计、实验操作、论文撰写与修改；刘书良：数据收集；周波：数据分析；邢宪春：资料收集；亓正良：研究设计、研究指导、论文修改；刘新利：项目管理。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在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] Wang R, Xu Q, Chen CL, Li XK, Zhang CF, Zhang DD. Microbial nitrogen removal in synthetic aquaculture wastewater by fixed-bed baffled reactors packed with different biofilm carrier materials[J]. Bioresource Technology, 2021, 331: 125045.

[2] Tom AP, Jayakumar JS, Biju M, Somarajan J, Ibrahim MA. Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: a review[J]. Energy Nexus, 2021, 4: 100022.

[3] Delgadillo-Mirquez L, Lopes F, Taidi B, Pareau D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture[J]. Biotechnology Reports, 2016, 11: 18-26.

[4] Wu T, Yang SS, Zhong L, Pang JW, Zhang LY, Xia XF, Yang F, Xie GJ, Liu BF, Ren NQ, Ding J. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal: what have we done so far and how do we need to do in the future[J]. Science of the Total Environment, 2023, 856: 158977.

[5] Dai HL, Sun Y, Wan D, Abbasi HN, Guo ZC, Geng HY, Wang XG, Chen Y. Simultaneous denitrification and phosphorus removal: a review on the functional strains and activated sludge processes[J]. Science of the Total Environment, 2022, 835: 155409.

[6] Mishra S, Singh V, Cheng L, Hussain A, Ormeci B. Nitrogen removal from wastewater: a comprehensive review of biological nitrogen removal processes, critical operation parameters and bioreactor design[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022, 10(3): 107387.

[7] Singleton CM, Petriglieri F, Wasmund K, Nierychlo M, Kondrotaite Z, Petersen JF, Peces M, Dueholm MS, Wagner M, Nielsen PH. The novel genus, '*Candidatus* Phosphoribacter', previously identified as *Tetrasphaera*, is the dominant polyphosphate accumulating lineage in EBPR wastewater treatment plants worldwide[J]. The ISME Journal, 2022, 16(6): 1605-1616.

[8] Hiraishi A, Muramatsu K, Ueda Y. Molecular genetic analyses of *Rhodobacter azotoformans* sp. nov. and related species of phototrophic bacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1996, 19(2): 168-177.

[9] Suresh G, Lodha TD, Indu B, Sasikala C, Ramana CV. Corrigendum: taxogenomics resolves conflict in the genus *Rhodobacter*: a two and half decades pending thought to reclassify the genus *Rhodobacter*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1111.

[10] Lazar JT, Tabor JJ. Bacterial two-component systems as sensors for synthetic biology applications[J]. Current Opinion in Systems Biology, 2021, 28: 100398.

[11] Cruz-Bautista R, Ruíz-Villafán B, Romero-Rodríguez A, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. Trends in the two-component system's role in the synthesis of antibiotics by *Streptomyces*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(15): 4727-4743.

[12] Bonato P, Alves LR, Osaki JH, Rigo LU, Pedrosa FO, Souza EM, Zhang N, Schumacher J, Buck M, Wassem R, Chubatsu LS. The NtrY-NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(21): 3919-3930.

[13] Xing SH, Zheng WJ, An F, Huang LQ, Yang XW, Zeng S, Li NN, Ouenzar K, Yu LL, Luo L. Transcription regulation of cell cycle regulatory genes mediated by NtrX to affect *Sinorhizobium meliloti* cell division[J]. Genes, 2022, 13(6): 1066.

[14] Yang YY, Li L, Sun HY, Li Z, Qi ZL, Liu XL. Improving CoQ10 productivity by strengthening glucose transmembrane of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20: 207.

[15] Qi ZL, Gao AX, Li L, Li Z, Zhang WY, Dong SH, Liu XL. A novel strategy to improving *Rhodobacter azotoformans* denitrification efficiency: insight into the role of a two-component system NtrX/Y in denitrification regulation[J]. Bioresource Technology, 2023, 368: 128349.

[16] Zhang PY, Wang TC, Cao LR, Jiao ZX, Ku LX, Dou DD, Liu ZX, Fu JX, Xie XW, Zhu YF, Chong L, Wei L. Molecular mechanism analysis of ZmRL6 positively regulating drought stress tolerance in maize[J]. Stress Biology, 2023, 3: 47.

[17] Bartlett A, O'Malley RC, Huang SC, Galli M, Nery JR, Gallavotti A, Ecker JR. Mapping genome-wide transcription-factor binding sites using DAP-seq[J]. Nature Protocols, 2017, 12(8): 1659-1672.

[18] Du YL, Han ZL, Wang XY, Wan CS. A fluorometric method for direct detection of inorganic polyphosphate in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of Southern Medical University, 2019, 39(3): 344-350.

[19] Allan RA, Miller JJ. Influence of *S*-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1980, 26(8): 912-920.

[20] Gomes FM, Ramos IB, Wendt C, Girard-Dias W, de Souza W, Machado EA, Miranda K. New insights into the *in situ* microscopic visualization and quantification of inorganic polyphosphate stores by 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-staining[J]. European Journal of Histochemistry, 2013, 57(4): 34.

[21] Omelon S, Georgiou J, Habraken W. A cautionary (spectral) tail: red-shifted fluorescence by DAPI-DAPI interactions[J]. Biochemical Society Transactions, 2016, 44(1): 46-49.

[22] Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbüchel A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds[J]. Archives of Microbiology, 1999, 171(2): 73-80.

[23] Zhao C, Luo MT, Huang C, Chen XF, Xiong L, Li HL, Chen XD. Determining intracellular lipid content of

different oleaginous yeasts by one simple and accurate Nile Red fluorescent method[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2019, 49(6): 597-605.

[24] Patel RJ, Nerurkar AS. *Thauera* sp. for efficient nitrate removal in continuous denitrifying moving bed biofilm reactor[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2024, 47(3): 429-442.

[25] Puchades C, Sandate CR, Lander GC. The molecular principles governing the activity and functional diversity of AAA^+ proteins[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21(1): 43-58.

[26] Bhaskara GB, Wong MM, Verslues PE. The flip side of phospho-signalling: regulation of protein dephosphorylation and the protein phosphatase 2Cs[J]. Plant, Cell & Environment, 2019, 42(10): 2913-2930.

[27] Bush M, Dixon R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54}-dependent transcription[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012, 76(3): 497-529.

[28] Yang ZM, Li Q, Yan YL, Ke XB, Han YY, Wu SY, Lv FY, Shao YH, Jiang SS, Lin M, Zhang YH, Zhan YH. Master regulator NtrC controls the utilization of alternative nitrogen sources in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(10): 177.

[29] 郑春霞, 王侧容, 张漫漫, 吴启凤, 陈梦苹, 丁晨雨, 何腾霞. 反硝化聚磷菌及其脱氮除磷机理研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1009-1025.
Zheng CX, Wang CR, Zhang MM, Wu QF, Chen MP, Ding CY, He TX. Denitrifying phosphate accumulating organisms and its mechanism of nitrogen and phosphorus removal[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1009-1025 (in Chinese).

[30] Jing L, Liu CQ, Zhang W, Yin ZX. Phosphorus release and uptake behavior and microbial metabolic activity in reversed A2O process: importance of influent VFAs/COD and anaerobic duration[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 200: 109098.

[31] Mukherjee C, Chowdhury R, Begam MM, Ganguli S, Basak R, Chaudhuri B, Ray K. Effect of varying nitrate concentrations on denitrifying phosphorus uptake by DPAOs with a molecular insight into pho regulon gene expression[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2586.

[32] Kondrotaite Z, Petersen J, Singleton C, Peces M, Petriglieri F, Jensen TBN, Sereika M, Daugberg AOH, Wagner M, Dueholm MKD, Nielsen PH. Ecophysiology and niche differentiation of three genera of polyphosphate-accumulating bacteria in a full-scale wastewater treatment plant[J]. mSystems, 2025, 10(9): e00322-25.