

棘孢木霉与黄曲霉协同降解聚丙烯酰胺的机制预测

李嘉¹, 靳振江^{1,2,3,4,5*}, 胡章恒¹, 王诗萱¹, 罗婷¹, 杨承熹¹, 范晨¹

- 1 桂林理工大学 环境科学与工程学院, 广西 桂林
- 2 桂林理工大学, 岩溶地区水污染控制与用水安全保障协同创新中心, 广西 桂林
- 3 桂林理工大学, 广西环境污染控制理论与技术重点实验室, 广西 桂林
- 4 广西生态环保现代产业学院, 广西 桂林
- 5 桂林理工大学, 流域保护与绿色发展广西高校工程研究中心, 广西 桂林

李嘉, 靳振江, 胡章恒, 王诗萱, 罗婷, 杨承熹, 范晨. 棘孢木霉与黄曲霉协同降解聚丙烯酰胺的机制预测[J]. 微生物学报, 2025, 65(12): 5309-5324.

LI Jia, JIN Zhenjiang, HU Zhangheng, WANG Shixuan, LUO Ting, YANG Chengxi, FAN Chen. Mechanism prediction of the synergistic degradation of polyacrylamide by *Trichoderma asperellum* and *Aspergillus flavus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(12): 5309-5324.

摘要: 【目的】筛选具有降解聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAM)能力的真菌, 并分析其降解产物特性, 为明晰其降解机制提供参考依据。【方法】从铝土矿矿泥中筛选能够降解 PAM 的真菌并构建复合真菌群, 测定在优化后的 PAM 降解条件下的产物和形貌特征。【结果】筛选到的 3 株真菌分别为棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*), 其对 PAM 的降解率分别为 27.35%、25.20% 和 23.04%。经响应面法优化试验后, 由棘孢木霉与黄曲霉构建的复合真菌体系在初始 pH 5.5、接种量为 5%、培养温度为 32 °C 时对 PAM 的降解效率可达 45.44%, 降黏率为 84.57%, 产漆酶和脲酶活力分别为 13.90 U/mL 和 17.70 U/mL。降解后 PAM 结构表面形成大量凹陷和空腔, 并附着菌丝状生物膜; 降解产物中出现-COOH 和-OH 官能团。【结论】本研究结果表明, 复合真菌可能通过菌丝物理侵蚀和胞外酶的协同作用将 PAM 降解为小分子物质。

关键词: 降解 PAM; 真菌; 漆酶; 脲酶

资助项目: 国家自然科学基金(42367017)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42367017).

*Corresponding author. E-mail: zhenjiangjinjin@163.com

Received: 2025-04-11; Accepted: 2025-07-25; Published online: 2025-09-11

Mechanism prediction of the synergistic degradation of polyacrylamide by *Trichoderma asperellum* and *Aspergillus flavus*

LI Jia¹, JIN Zhenjiang^{1,2,3,4,5*}, HU Zhangheng¹, WANG Shixuan¹, LUO Ting¹, YANG Chengxi¹, FAN Chen¹

1 College of Environmental Science and Engineering, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi, China

2 Collaborative Innovation Center for Water Pollution Control and Water Security in Karst Regions, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi, China

3 Guangxi Key Laboratory of Environmental Pollution Control Theory and Technology, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi, China

4 Guangxi Modern Industrial College of Ecological Environmental Protection, Guilin, Guangxi, China

5 Guangxi Engineering Research Center for Basin Protection and Green Development, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi, China

Abstract: [Objective] Screening fungi with the ability to degrade polyacrylamide (PAM) and analyzing the characteristics of their degradation products can provide a basis for clarifying the degradation mechanism. [Methods] Fungi capable of degrading PAM were screened from bauxite sludge and used to construct a composite fungal community, with the degradation products and morphological characteristics being determined under optimized conditions. [Results] The results showed that the three strains of fungi screened out were *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus niger*, which showed the degradation rates of 27.35%, 25.20%, and 23.04%, respectively, for PAM. The degradation conditions were optimized by the response surface method as initial pH 5.5, inoculum amount of 5.1%, and incubation temperature of 32 °C, under which the fungal complex constructed with *T. asperellum* and *A. flavus* showed the PAM degradation rate of 45.44%, a viscosity reduction rate of 84.57%, and laccase and urease activities of 13.90 U/mL and 17.70 U/mL, respectively. A large number of hollows and cavities were formed on the surface of PAM after degradation. In addition, mycelial biofilm was observed on the surface. The degradation products showed -COOH and -OH functional groups. [Conclusion] The above results suggest that the fungal complex may degrade PAM into small molecules through the synergistic effects of mycelial physical erosion and extracellular enzymes.

Keywords: polyacrylamide degradation; fungi; laccase; urease

聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAM)具有高水溶性、高黏度以及絮凝作用等特性,因而被广泛应用于矿业领域。在铝土矿洗矿废水中加入PAM进行絮凝,经沉降和压缩后可大幅降低矿泥含水率和体积^[1]。含PAM的矿泥经处理后可用于复垦,能有效解决矿区土地土源不足的问题,

实现矿泥的安全处置和资源化利用^[2]。然而,经过压滤后含PAM的矿泥形成块状体,干燥后极易板结,导致植物难以扎根。此外,PAM在自然条件下会产生有毒害的丙烯酰胺,不仅会污染河流和土壤,还会对人体健康造成严重危害^[3-4]。因此,去除其中的PAM对于实现

矿泥的安全处置和资源化利用尤为重要。

据报道, PAM 的去除方式包括物理处理^[5]、化学氧化^[6]和微生物降解^[7]。其中, 微生物能够将 PAM 最终降解为丙烯酸和 CO₂ 等小分子物质, 且不会对环境造成二次污染, 因而微生物降解备受关注^[7-10]。与细菌相比, 真菌的优势在于其在极端环境中具有较高的适应能力, 适用性更广^[11]; 同时, 真菌在生长过程中产生的菌丝网络有助于其在矿泥中扩散。对降解塑料聚合物的研究表明, 真菌能够先物理侵蚀聚合物表面结构, 再分泌胞外酶进一步降解聚合物^[12-13]。这一降解机制启示我们, 真菌对 PAM 的降解可能同样遵循物理侵蚀与酶催化的协同作用。目前, 对 PAM 生物降解关键酶信息研究较多的包括酰胺酶和漆酶。脲酶是一种常见的酰胺酶, 能够催化有机物质中的酰胺基水解, 将有机氮转化为铵态氮后供微生物利用^[14]; 而漆酶在降解 PAM 时更倾向于氧化其碳骨架, 使其转变为小分子聚合物^[15]。因此, 测定降解 PAM 的真菌的脲酶和漆酶活性有助于揭示 PAM 的降解机理。

目前已知的 PAM 降解真菌仅有部分白腐真菌^[16]和木霉^[17]。韩昌福等^[18]发现, 在低氮环境下处理 PAM 废水时可促进真菌产生降解 PAM 的生物酶。张东晨等^[16]在复合菌协同降解 PAM 的体系中发现, 在培养基中预添加少量葡萄糖和 NH₄⁺作为共代谢底物时能够显著提高复合菌降解 PAM 的能力。路蓉蓉^[17]从油田土壤中分离出复合真菌, 其复合体系在第 8 天表现出最优降解效能。虽然棘孢木霉和曲霉属尚未被证实能够降解 PAM, 但 Shanmugam 等^[19]筛选出的一株棘孢木霉在 30 °C 下具有较好的产漆酶能力。研究表明黄曲霉和黑曲霉在降解塑料等高分子聚合物方面具有较大潜力, 其中黄曲霉在降解聚氨酯(polyurethane, PU)和聚乙烯(polyethylene, PE)等高分子聚合物时能够产生较高水平的漆酶和脲酶^[20-22]。上述特性表明, 木霉与曲霉对 PAM 这类高分子聚合物的生物降解具有重要研

究价值。

本研究拟从铝土矿泥中筛选出能够降解 PAM 的真菌, 然后按照最佳配比构建复合真菌体系, 研究复合真菌对聚丙烯酰胺的协同降解效果。利用 Box-Behnken design (BBD) 响应面法确定最佳降解条件, 测定脲酶和漆酶的活性, 利用红外光谱和扫描电镜分析 PAM 降解后的产物和结构变化, 并推测 PAM 的降解途径和机制, 以期为含 PAM 矿泥的安全处置和资源化利用提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种来源和培养基

本研究所涉及的真菌分离自铝土矿矿泥, 其中污泥中 PAM 的浓度约为 500 mg/L, 聚丙烯酰胺为非离子型, 分子量大于 3×10⁶。

富集培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 无水葡萄糖 40.0, 氯霉素 0.1。

PAM 液体培养基(g/L): 无水葡萄糖 3.0, NH₄Cl 0.1, KH₂PO₄ 3.0, MgSO₄ 1.0, 维生素 B₁ 0.008, CuSO₄·5H₂O 0.008, ZnSO₄·7H₂O 0.012, PAM 0.5, 加入去离子水搅拌溶解后定容, 自然 pH。PAM 固体培养基是在 PAM 基础液体培养基中加入 18.0 g/L 琼脂。PAM 马丁氏培养基: 参考文献^[17]配制。

1.2 降解真菌的筛选、分离和纯化

将 5 g 矿泥加入到无菌水中, 30 °C、150 r/min 恒温振荡 3 h 后, 取 5 mL 悬浊液加入到 100 mL 富集培养基中, 在相同条件下培养 4 d。然后取 5 mL 富集后的菌液到 PAM 液体培养基中, 使培养基中 PAM 浓度依次增大至 100、200、500 mg/L。在每个浓度下各培养 8 d 后, 将终浓度培养液稀释 1 000 倍, 取 0.1 mL 稀释液分别涂布于 PAM 固体培养基和 PAM 马丁氏培养基, 于 30 °C 倒置培养 4 d。将固体培养基上单一的真菌菌落重新分离纯化 3 次后, 用 0.85% 的无菌生理盐水洗刮平板, 再用双层纱布过滤除去

菌丝和培养基, 得到 $OD_{600}=1.0$ 的孢子悬液^[23]。在 PAM 液体培养基中加入 2% 的真菌孢子液, 30 °C、150 r/min 培养 8 d, 经 8 000 r/min 高速离心 10 min 后收集上清液, 利用淀粉-碘化镉法初步测定降解率, 选取降解率最高的真菌作为后续研究对象。

1.3 降解真菌的鉴定

1.3.1 PAM 降解真菌的形态观察与拮抗实验

分别在 PAM 马丁氏培养基中滴加 1 μ L 降解真菌的孢子悬液, 在 30 °C 下恒温培养 4 d 后观察各真菌的菌落特征以及真菌之间的拮抗情况。

1.3.2 PAM 降解真菌的分子生物学鉴定

选取降解率最高的真菌经 Ezup 柱式试剂盒 [生工生物工程(上海)股份有限公司] 提取 DNA, 采用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG C-3') 对真菌内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列进行扩增。PCR 扩增体系 (25 μ L): 2 \times Taq Plus Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 扩增产物的测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。所测 ITS 序列经 NCBI 数据库 BLAST 比对并构建系统发育树。

1.4 复合真菌的构建

将未产生拮抗反应的真菌按 1:1 的比例制成复合真菌孢子液, 以 2% 的接种量接种于 PAM 液体培养基中, 在 30 °C、150 r/min 条件下培养 8 d 后用淀粉-碘化镉法^[24]测定 PAM 的降解率。

1.5 复合真菌降解 PAM 试验的条件优化

1.5.1 单因素试验

将未产生拮抗反应的复合真菌分别按照 1:7、2:6、3:5、4:4、5:3、6:2、7:1 的配比以 2% 的接种量加入到 PAM 液体培养基中, 在自然 pH、30 °C 和 150 r/min 条件下培养 8 d 后测定降解率。为确定复合真菌体系最佳 pH, 将 pH 设为 4.5、5.5、6.5、7.5 和 8.5; 为确定复合真菌最适接种量, 将接种量设为 1%、2%、3%、4%、5% 和 6%; 为确定复合真菌的最佳培养温度, 在复合真菌最佳配比、pH 和接种量的条件下, 将温度设定为 28、32、36、40 和 44 °C, 在 150 r/min 转速条件下培养 8 d 后测定 PAM 的降解率。

1.5.2 Box-Behnken design (BBD) 响应面法优化复合真菌降解 PAM 反应条件以及结果验证

在单因素降解试验结果的基础上设计响应面试验。根据 BBD 的中心组合试验设计原理, 选择初始 pH、复合真菌接种量和培养温度作为 3 个显著性因素, 将 3 种水平分别编码为 -1、0 和 1, 以代表单因素中的低、中和高 3 种水平进行多因素多水平的响应面试验方案。根据试验结果拟合模型, 通过对响应值进行方差分析后确定复合真菌降解的最佳条件, 并对该条件进行验证。

1.6 最优降解条件下的降解产物、PAM 分子量与酶活测定

1.6.1 降解产物与 PAM 分子量测定

CO-NH₂ 的测定采用淀粉-碘化镉法^[24]。NO₃-N 和 NO₂-N 的测定采用紫外分光光度法^[25-26]。NH₂-OH 的测定采用卢光远等^[27]的方法。总有机碳 (total organic carbon, TOC) 浓度测定采用燃烧氧化-非分散红外吸收法^[28]。PAM 分子量采用乌氏黏度计测定其极限黏数, 并按照经验公式计算^[29]。

1.6.2 漆酶与脲酶酶活测定

采用 ABTS 法测定漆酶活力^[30]: 将上清液、柠檬酸缓冲溶液和 ABTS 溶液充分混匀后 30 °C 水浴反应 3 min, 于 420 nm 处测得吸光度, 计算 3 min 内的吸光度变化。此时求得每分钟内催化 1 μmol 底物所需酶量并定义为 1 个酶活力单位(U)。

利用陈素素^[31]的研究方法测定得脲酶活力: 将上清液与 3% 的尿素溶液混合, 水浴加热 7 min 后立即加入 10% 的三氯乙酸溶液终止反应, 取下冷却至室温, 加入 1 mL 纳氏试剂后定容, 显色 20 min 后与标准曲线一起在 415 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算试样中的 NH_4^+ 浓度, 以每分钟释放的 1 μmol 游离的 NH_4^+ 来表示脲酶活性(U)。

1.7 PAM 降解前后的红外光谱与扫描电镜分析样品制样

将 PAM 降解前后的上清液与过量甲醇混合, 静置 10 min 后培养液中残留的聚合物会发生沉淀, 4 000 r/min 离心 10 min。再用甲醇洗涤沉淀 2 次, 最后将沉淀置于 50 °C 的真空干燥箱中进行干燥后待测^[17]。

1.8 数据分析

数据处理采用 Excel 2021 和 SPSS 26.0, 系统发育树采用 MEGA 11 绘制, 响应面试验设计与结果分析采用 Design-Expert 13, 代谢途径采用 InDraw 绘制。

2 结果与分析

2.1 筛选到的 PAM 降解真菌及其降解率

本研究共分离纯化了 12 株真菌, 其中#2、#8 和#12 菌株的降解率显著高于其他菌株, 分别为 23.04%、25.20% 和 27.35%, 因此被选为后续研究的对象。

2.2 PAM 降解真菌的形态学观察、拮抗实验和分子生物学鉴定

如图 1B 所示, #12 菌株的分生孢子呈深绿色簇棉絮状; #2 呈黑色厚绒状, 分生孢子头呈褐黑色球形放射状; #8 菌株呈黄绿至草绿色, 中央部分呈絮状, 分生孢子呈球形或近球形。仅有#12 菌株与#2 菌株在 PAM 马丁氏培养基上产生明显的拮抗现象, 因此后续的复合真菌研究将重点考察#2/#8 以及#12/#8 的组合。

结果序列经对比分析后得出#2、#8 和#12 菌株与黑曲霉(*Aspergillus niger*) (KY593490.1)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*) (JQ844451.1)和棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) (MN945286.1)的相似度分别为 100.00%、99.47% 和 99.61% (图 1A)。因此, 确定这 3 株真菌分别为黑曲霉、黄曲霉和棘孢木霉。目前, 这 3 株真菌的序列均已上传至 NCBI, 登录号分别为 PQ651884、PQ656717 和 PQ658230。

2.3 复合真菌的构建

从图 2 可以看出, 复合真菌#12/#8 和#2/#8 的降解率分别为 31.68% 和 15.12%, 因此选定 #12/#8 为后续研究对象。

2.4 单因素试验设计

复合真菌#12/#8 在 4 种条件下对 PAM 的 8 d 降解率如图 3 所示。当复合真菌#12/#8 的配比从 3:5 逐渐调整为 6:2 时降解率分别为 29.01%、30.30%、30.95% 和 30.30%。整体来看, 配比的调整并未显著影响 PAM 的降解率, 因此后续仅选择最佳配比 5:3 进行试验, 并不再将此因素纳入响应面试验设计中。复合真菌在 pH 值为 5.5 时 PAM 降解率达到最高, 为 32.32%, 因此后续的响应面试验选择 pH 值为 4.5、5.5 和 6.5 进行研究。接种量为 5% 时降解率最大, 为 38.54%; 当接种量增至 6% 时降解率反而下降, 因此后续的响应面试验选择以 4%、5% 和 6% 的接种量进行研究。复合真菌在 32 °C 时对 PAM 的降解率最高, 为 41.72%, 而

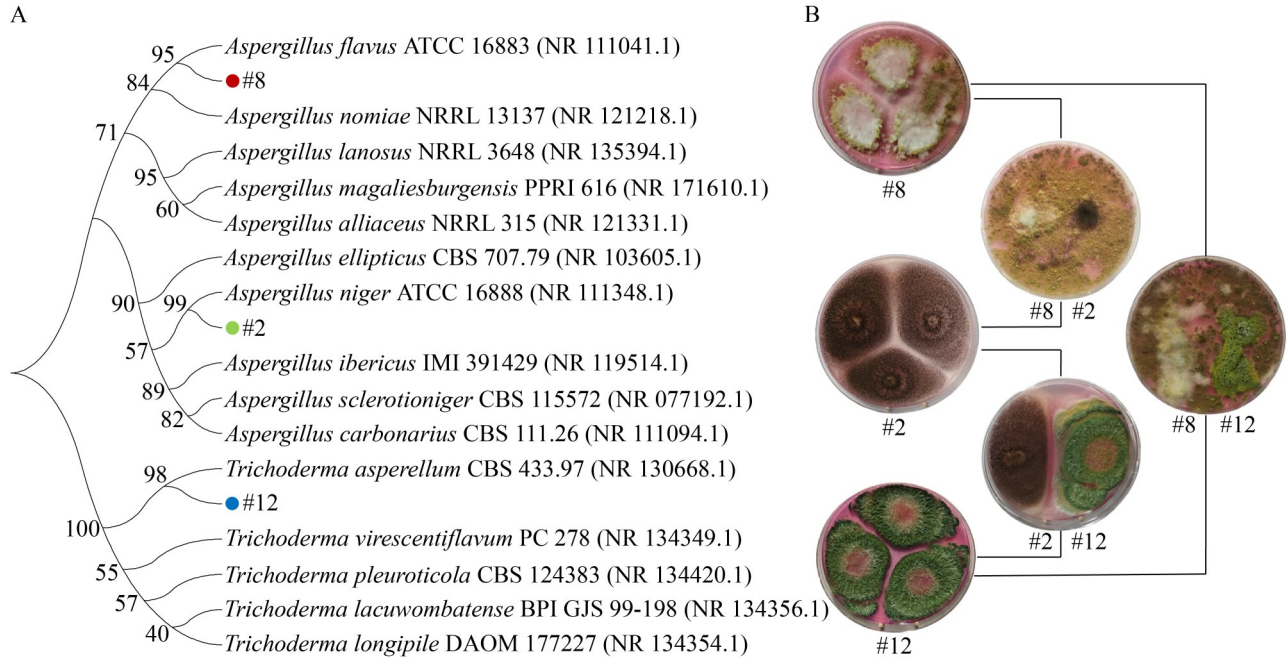


图1 真菌的系统发育树与在培养皿上的生长情况和拮抗现象。A: 3株真菌的ITS基因序列系统发育树(菌株后面括号内为其ITS序列的GenBank登录号; 分支处的数值是bootstrap值); B: 3株真菌在培养皿上的生长情况和拮抗现象。

Figure 1 Development status of three fungi in Petri dishes, growth and antagonistic phenomenon in Petri dishes. A: Phylogenetic tree of ITS gene sequences of three fungi and other related strains (The NCBI accession number for the ITS sequence of each strain is given in parentheses after the strain name; The value at the branch is the bootstrap value); B: Growth status and antagonism of three fungi strains observed on Petri dishes.

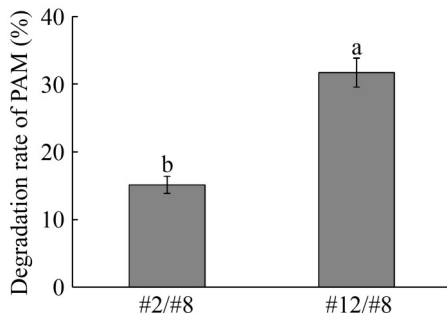


图2 复合真菌#2/#8和#12/#8对PAM的降解率。不同小写字母表示相同降解条件下不同复合真菌对PAM降解率的差异显著。

Figure 2 Degradation rate of PAM by mixed fungi #2/#8 and #12/#8. Different lowercase letters indicate significant differences in the degradation rate of PAM by different mixed fungi under the same degradation conditions.

较低或较高的温度都会影响复合真菌的降解效果。为了简化响应面设计, 因此选择更接近 32 °C 的 30 °C 和 34 °C 作为研究对象。

2.5 BBD 响应面法试验结果与分析

2.5.1 BBD 试验结果

在单因素试验的基础上, 以 pH (X_1)、接种量(X_2)和培养温度(X_3)为自变量, 以复合真菌对 PAM 的降解率(Y)为响应值进行 3 因素 3 水平的响应面设计(表 1), 对上述 3 组因素与 PAM 降解率 Y 之间进行试验设计并代入试验结果, 见表 2。

2.5.2 模型拟合和方差分析试验结果

利用 Design-Expert 13 软件进行数据分析后

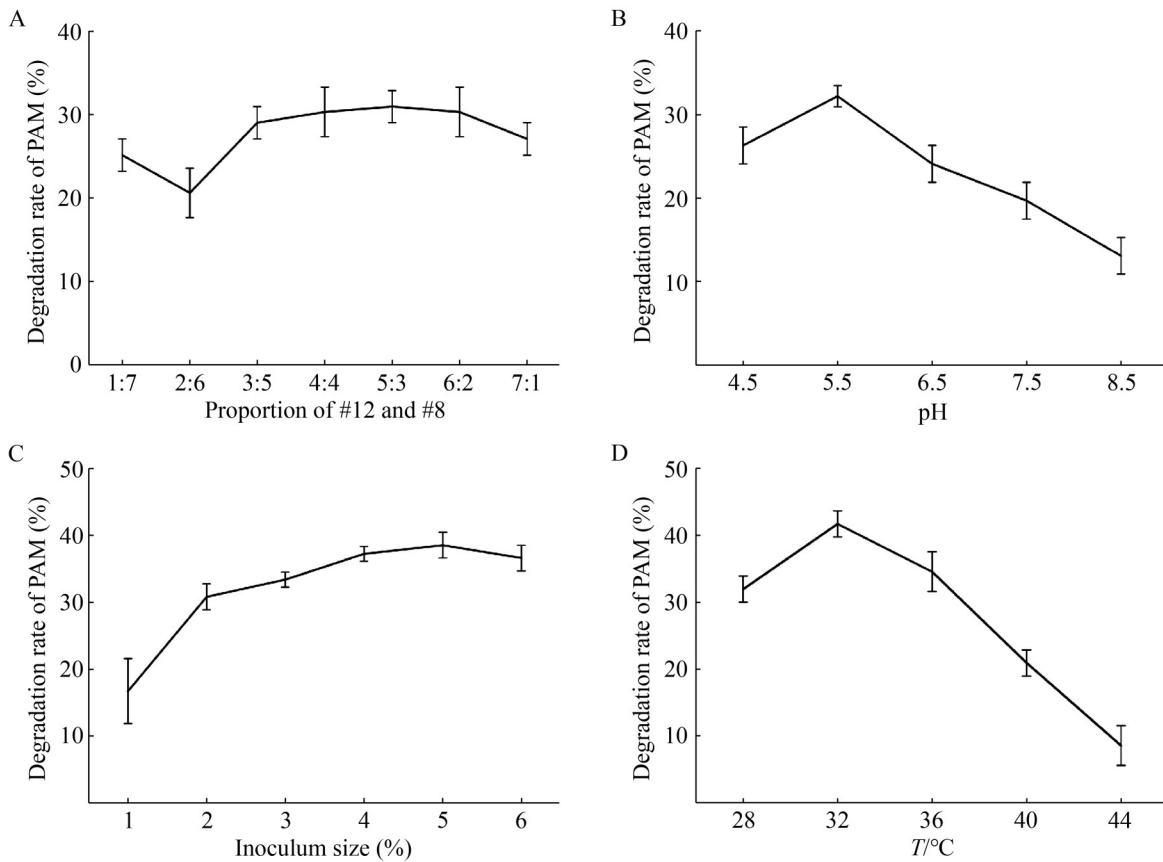


图3 复合真菌#12/#8在不同配比、pH、接种量和温度下对PAM的降解率。A: 复合真菌在#12和#8的不同配比下对PAM的降解率; B: 复合真菌在不同pH下对PAM的降解率; C: 复合真菌在不同接种量下对PAM的降解率; D: 复合真菌在不同温度下对PAM的降解率。

Figure 3 PAM degradation rates of mixed fungi #12/#8 at different ratios, pH, inoculum size, and temperature. A: Degradation rate of PAM by mixed fungi at different ratios of #12 and #8; B: Degradation rate of PAM by mixed fungi at different pH levels; C: Degradation rate of PAM by mixed fungi at different inoculation levels; D: Degradation rate of PAM by mixed fungi at different temperatures.

表1 BBD试验因素水平表

Table 1 Response surface experimental design

因素 Factors	水平 Levels		
	Low level (-1)	Base lever (0)	High lever (1)
pH	4.5	5.5	6.5
接种量 Inoculum size (%)	4	5	6
温度 T/°C	30	32	34

得到二次回归方程: $Y (%) = 44.526 - 1.14375X_1 - 0.405X_2 - 1.28125X_3 - 8.54361e^{-15}X_1X_2 + 0.3825X_1X_3 + 0.46X_2X_3 - 2.99425X_1^2 - 3.01175X_2^2 - 4.53925X_3^2$ 。

PAM 降解率的方差分析如表 3 所示。此回归模型的 $P < 0.01$, 极显著; 而失拟项 $0.2330 > 0.0500$, 不显著, 这表明该模型拟合度较好, 可用于对复合真菌降解 PAM 的条件优化。该模型的决定系数 (R^2)、调整后拟合度 (adjusted R^2 , R^2_{Adj}) 和预测拟合度 (predicted R^2 , R^2_{Pre}) 分别为 0.9908、0.9790 和 0.9034, R^2_{Adj} 与 R^2_{Pre} 的差值小于 2, 可证明此模型能够较好地预测响应值。方差分析结果表明, 温度 (X_3) 和 pH (X_1) 是影响复合真菌降解 PAM 的主要因素, 二次项 X_1^2 、 X_2^2 、

表2 BBD试验设计与结果

Table 2 BBD experimental design and results

Run	X_1 pH	X_2 接种量 Inoculum size (%)	X_3 温度 $T/^\circ\text{C}$	降解率 Degradation rate (%)	Run	X_1 pH	X_2 接种量 Inoculum size (%)	X_3 温度 $T/^\circ\text{C}$	降解率 Degradation rate (%)
1	4.5	6	32	38.90	10	5.5	5	32	44.24
2	5.5	5	32	44.86	11	4.5	4	32	40.43
3	5.5	5	32	43.97	12	5.5	4	30	38.90
4	6.5	5	30	36.61	13	5.5	5	32	45.00
5	5.5	6	34	35.97	14	4.5	5	34	36.61
6	5.5	6	30	37.89	15	4.5	5	30	39.66
7	6.5	5	34	35.09	16	5.5	5	32	44.56
8	6.5	4	32	38.14	17	5.5	4	34	35.14
9	6.5	6	32	36.61					

表3 二次模型方差分析表

Table 3 ANOVA for quadratic model

Source	Sum of squares	df	Mean square	F -value	P -value	Significance	Fit statistics
模型 Model	207.07	9	23.01	83.92	<0.000 1	**	-
X_1	10.47	1	10.47	38.17	0.000 5	**	-
X_2	1.31	1	1.31	4.79	0.064 9	-	-
X_3	13.13	1	13.13	47.90	0.000 2	**	-
X_1X_2	0.00	1	0.00	0.00	1.000 0	-	-
X_1X_3	0.59	1	0.59	2.13	0.187 4	-	-
X_2X_3	0.85	1	0.85	3.09	0.122 3	-	-
X_1^2	37.75	1	37.75	137.69	<0.000 1	**	-
X_2^2	38.19	1	38.19	139.30	<0.000 1	**	-
X_3^2	86.76	1	86.76	316.44	<0.000 1	**	-
残差 Residual	1.92	7	0.27	-	-	-	-
失拟项 Lack of fit	1.19	3	0.40	2.18	0.233 0	-	-
纯误差 Pure error	0.73	4	0.18	-	-	-	-
总和 Cor total	208.99	16	-	-	-	-	-
R^2	-	-	-	-	-	-	0.990 8
Adjusted R^2	-	-	-	-	-	-	0.979 0
Predicted R^2	-	-	-	-	-	-	0.903 4

**表示 $P<0.01$ 水平上差异显著；-表示无该项目。

** indicate significant differences at the $P<0.01$ level, respectively; - denotes items not applicable.

X_3^2 和 X_4^2 均对响应值有极显著影响。

2.5.3 响应面结果分析

运用 Design-Expert 13 软件根据二次回归模型方程可绘制 3 种因素的影响 PAM 降解率(响应

值)的三维响应面和等高线图。三维曲面越陡则代表该因素对响应值的影响越显著；等高线越接近椭圆则代表两组因素间相互作用更强，见图 4。

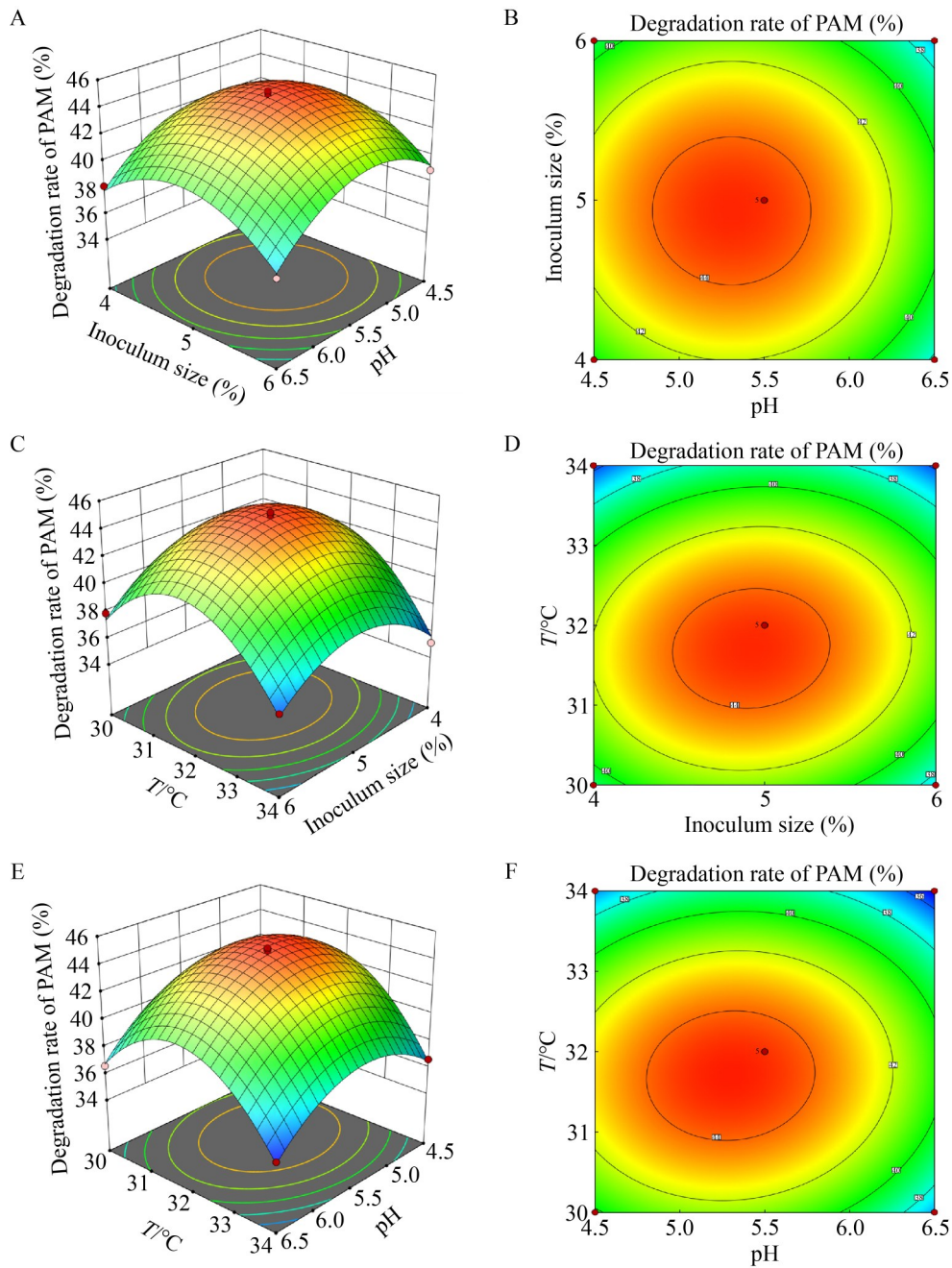


图4 pH、接种量和温度对降解率的响应面3D和等高线图。A、B：分别代表接种量和pH对降解率的3D图和等高线图；C、D：分别代表温度和接种量对降解率的3D图和等高线图；E、F：分别代表温度和pH对降解率的3D图和等高线图。

Figure 4 The 3D surface and contour plots showing the response of the degradation rate to pH, inoculum size, and temperature. A, B: 3D plots and contour plots showing the effects of inoculum amount and pH on degradation rate, respectively; C, D: 3D plots and contour plots showing the effects of temperature and inoculum amount on degradation rate, respectively; E, F: 3D plots and contour plots showing the effects of temperature and pH on degradation rate, respectively.

2.5.4 最适条件验证

根据模型拟合结果,复合真菌降解 PAM 的最佳 pH、接种量和温度分别为 5.53、5.13% 和 32.03 °C, 此时降解率可达 44.36%。为便于实际应用,将上述最佳 pH、接种量和温度分别近似取整为 5.5、5% 和 32 °C, 因此在本研究中将采用此降解条件进行验证试验。经过 3 次验证试验测得的降解率分别为 45.44%、46.67% 和

44.20%, 平均降解率为 45.44%, 计算得到相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 2.72%。结果与模型预测值相近, 表明该模型能够较好地预测复合真菌降解 PAM 的情况。

2.6 最优降解条件下漆酶和脲酶酶活测定

从图 5 可以看出, 复合真菌系在降解 8 d 后的脲酶和漆酶活力分别为 17.70 U/mL 和 13.90 U/mL。

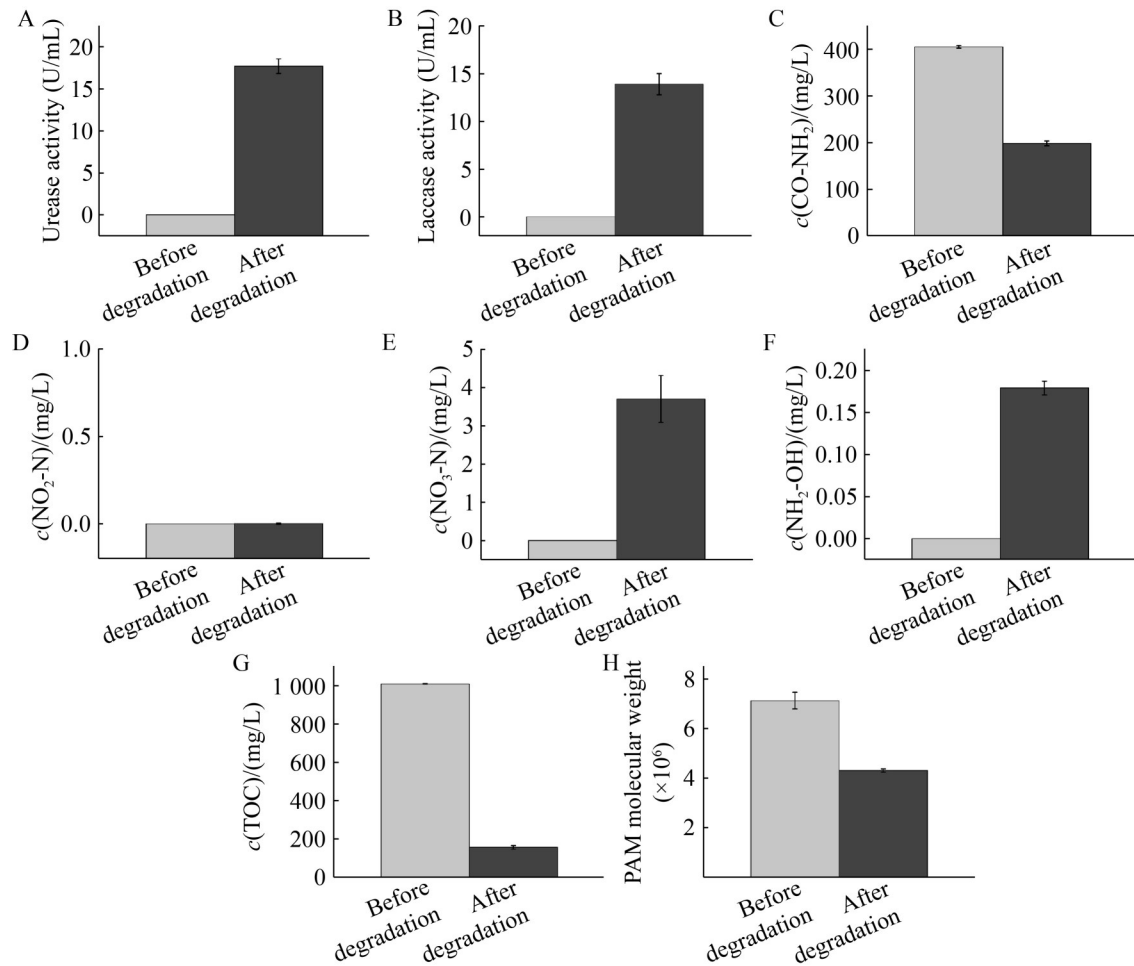


图5 最优条件下复合真菌降解前后不同酶活与不同产物的浓度变化图。A-H分别为最优条件下复合真菌降解前后培养基中脲酶活力、漆酶活力、CO-NH₂、NO₂-N、NO₃-N、NH₂-OH、TOC浓度和PAM分子量的变化图。

Figure 5 Figure showing changes in enzyme activity and product concentration before and after mixed fungi degradation under optimal conditions. A to H respectively show the changes in urease activity, laccase activity, CO-NH₂, NO₂-N, NO₃-N, NH₂-OH, TOC concentration, and PAM molecular weight in the culture medium before and after degradation by mixed fungi under the optimal conditions.

此时复合真菌产漆酶酶活高于脲酶酶活, 表明复合真菌在降解初期可能以氮代谢为主导来降解 PAM。对复合真菌降解 PAM 前后培养基中的 CO-NH₂、NO₃-N、NO₂-N 和 NH₂-OH 的测定结果显示, PAM 被降解 8 d 后培养基中的 CO-NH₂ 浓度从 405.17 mg/L 降低至 198.50 mg/L, NO₃-N 和 NH₂-OH 的浓度分别升至 3.70 mg/L 和 0.18 mg/L, 培养基中未检测出 NO₂-N。培养基中的 TOC 浓度和 PAM 的分子量分别从 1 010.33 mg/L 和 7.13×10⁶ 降至 154.86 mg/L 和 1.10×10⁶, TOC 浓度和 PAM 分子量分别降低了 84.67% 和 84.57%。

2.7 复合真菌降解前后 PAM 的红外光谱特征分析

从图 6 可以看出, 红外光谱吸收带在 3 500–3 100 cm⁻¹ 范围是 N–H 键的伸缩振动^[9], 1 601 cm⁻¹ 则代表了酰胺基 N–H 的面内弯曲振动^[32], 降解后 N–H 的伸缩振动峰 3 433 cm⁻¹ 更加尖锐, 同时 N–H 的面内弯曲振动峰 1 607 cm⁻¹ 减弱, 说明 PAM 侧链的酰胺基大量水解, –NH₂ 浓度增加, 但由于该峰并未消失, 因此说明复合真菌未能完全利用水解后的 NH₃。

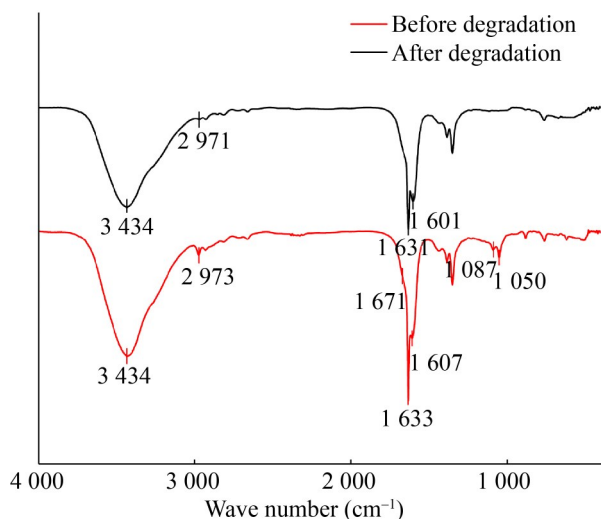


图6 复合真菌降解前后PAM的红外光谱分析
Figure 6 Infrared spectral analysis of PAM before and after degradation by mixed fungi.

2 969 cm⁻¹ 为甲基的反对称伸缩振动特征吸收峰, 该峰在降解后增强且发生蓝移, 说明降解后的 PAM 长链分子被分解成小分子物质, 导致末端甲基数量增加^[33]。2 950–2 700 cm⁻¹ 是 C–H 的伸缩振动, 此范围的部分峰在降解后消失, 说明部分断裂的小分子 PAM 已被复合真菌完全利用。1 700–1 630 cm⁻¹ 是 C=O 的伸缩振动峰, C=O 的伸缩振动吸收带在降解后更加尖锐, 且透射率降低, 说明降解后生成了更多的 C=O 键, 出现了酮或羧酸类物质^[7]。1 200–1 000 cm⁻¹ 是 C–O 的伸缩振动峰和 C–C 的伸缩振动, 降解后出现的 1 048 cm⁻¹ 可能是生成了醇类物质, 而 1 087 cm⁻¹ 的弱峰则进一步验证了酮的生成。

2.8 复合真菌降解前后 PAM 的结构变化

从图 7 可以看出, PAM 在真菌降解前表面较为粗糙, 虽存在明显的凹凸, 但结构并未被破坏。在被真菌降解后 PAM 的结构遭到显著破坏, 表面出现了大量空腔、裂纹和凹陷。在 10 μm 标尺下可观察到真菌菌丝附着在 PAM 表面或延伸进入降解后的孔洞中, 形成类似生物膜的结构。

3 讨论

3.1 复合真菌降解 PAM 过程中的协同作用

在本研究中, 复合真菌对 PAM 的降解率显著高于单菌, 这是因为单一菌株通常只能利用特定的降解途径和酶系统来分解某些特定化合物, 所以单独研究一种真菌的降解效果并不理想^[34]。相比之下, 微生物菌群中的不同菌株可以分工合作, 相互补充不同的降解功能, 从而提高整体的降解能力, 表现出显著的协同效应^[35]。此外, 真菌产生的大量菌丝能够包裹 PAM, 甚至从 PAM 表面延伸至内部, 致使 PAM 的结构出现大量孔洞和裂纹。这一现象与已报道的真菌降解塑料的过程^[36]类似, 这种现

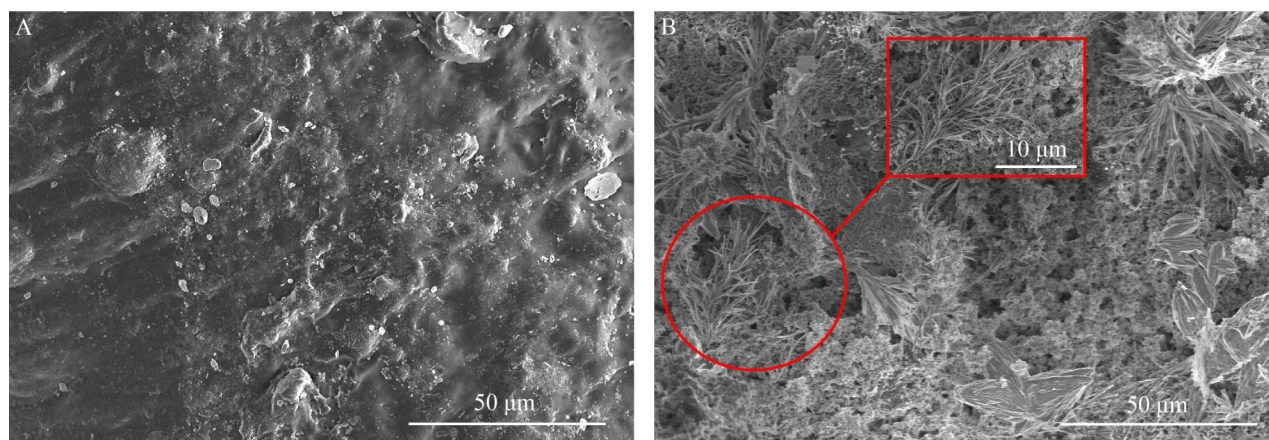


图7 复合真菌降解前后PAM的结构变化。A: 复合真菌降解前PAM在放大1 000倍后的表面结构图; B: 复合真菌降解后PAM在放大1 000倍后的表面结构图。红框部分为放大3 500倍后的PAM结构图。

Figure 7 SEM images of PAM before and after degradation by mixed fungi. A: Surface structure diagram of PAM before degradation by mixed fungi at 1 000 times magnification; B: Surface structure diagram of PAM after degradation by mixed fungi at 1 000 times magnification. The red-framed part is the structure diagram of PAM at 3 500 times magnification.

象在真菌对 PAM 的降解过程中尚属首次发现。这主要归因于真菌菌丝的独特作用, 因为菌丝能够机械性地渗入高分子材料的间隙与孔隙中, 首先通过物理手段破坏其稳定结构, 降低 PAM 的分子量, 随后分泌胞外酶对小分子 PAM 进行降解^[37]。复合真菌对 PAM 分子量的降低率普遍高于细菌^[38], 但对 PAM 氮源的利用率不如细菌^[39]。因此, 可将多菌协同代谢与真菌菌丝的物理化学双重作用相结合, 为实现 PAM 的彻底降解以及提高微生物的环境适应性提供新的研究方向。

3.2 复合真菌降解 PAM 的氮代谢途径推测

微生物无法直接将含酰胺基团的物质作为氮源用于生长, 而是需要通过一系列酶促反应将其转化为其他可利用的氮源^[40]。在本研究中, 复合真菌降解 PAM 后产物中的 TOC、酰胺基、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 PAM 分子量降低, PAM 酰胺基侧链的 -NH_2 大量水解, PAM 的长链结构被破坏, 被分解成小分子有机物。PAM 被降解后有少量

$\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NH}_2\text{-OH}$ 生成, 表明 $\text{NH}_4\text{-N}$ 参与了硝化作用^[41], 这可能与真菌在长期 PAM 的环境胁迫下发生了代谢重编程^[42]或氨氧化基因的水平转移现象^[42-43]有关。

氮代谢是微生物降解含氮有机物过程中的重要途径^[44]。由于本研究未对#8 和#12 进行全基因组测序, 因此将通过挖掘 KEGG 数据库中与#8 和#12 相似度最接近的同种菌株(其 org 编号分别为 afv00910 和 tasp00910^[45])的基因组进行分析。结合本研究中培养基中存在 NH_4Cl 和 PAM 2 种氮源的结果, 分别对黄曲霉和棘孢木霉的特异性氮代谢途径进行拼接, 拼接结果见图 8。从图 8 可以看出, 黄曲霉和棘孢木霉均能利用酰胺酶[EC: 3.5.1.49]将酰胺基水解生成氨, 进而在谷氨酸合酶的作用下将氨逐步转化为 L-谷氨酸, 完成后续的谷氨酸代谢步骤。此外, 黄曲霉和棘孢木霉均存在[EC: 1.7.1.4]这条亚硝酸盐还原途径, 且黄曲霉存在一条完整的同化硝酸盐还原途径(图 8), 这可能是培养基中降低亚硝酸盐积累的重要原因^[46]。

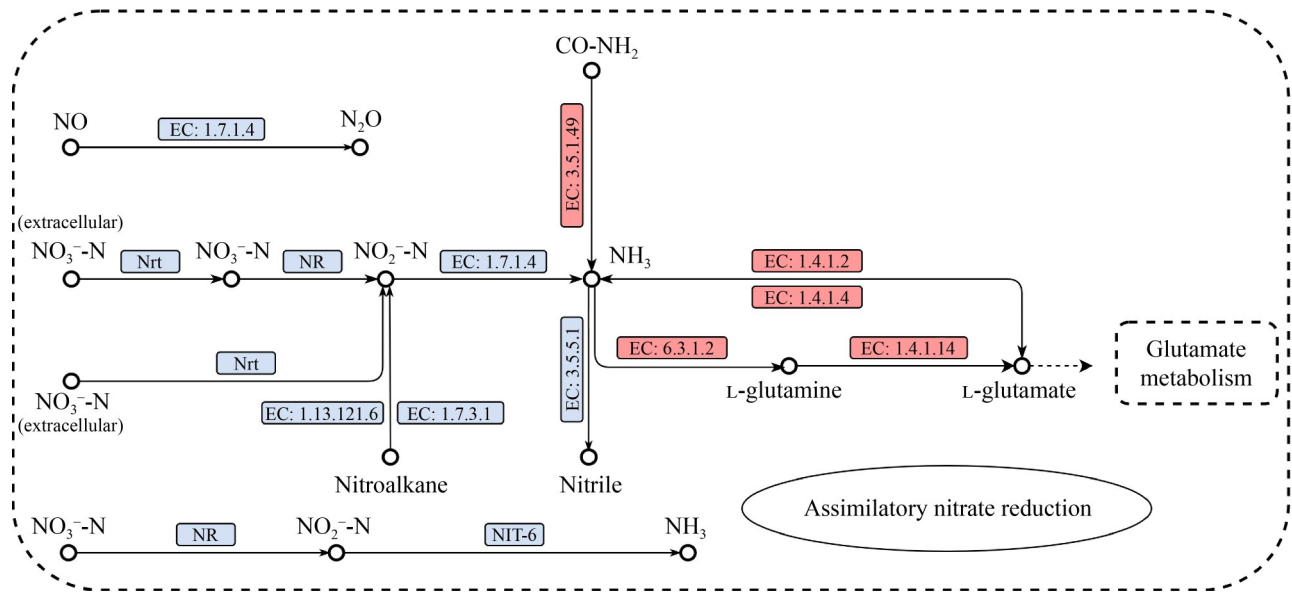


图8 复合真菌的氮代谢途径拼接。红色标签代表复合真菌对PAM的氮代谢途径，蓝色标签代表复合真菌存在降解其他含氮有机物的潜力。

Figure 8 Splicing of nitrogen metabolism pathways in mixed fungi. Red labels denote the nitrogen metabolism pathway of composite fungi in relation to PAM; Blue labels indicate the potential of composite fungi to degrade other nitrogen-containing organic compounds.

4 结论

(1) 从矿泥中筛选出 3 株可以降解 PAM 的真菌，分别为黑曲霉(#2)、黄曲霉(#8)和棘孢木霉(#12)，其在 8 d 的最大降解率分别为 25.20%、23.04% 和 27.35%，用#12/#8 构建的复合真菌对 PAM 的降解率为 31.68%。

(2) 复合真菌#12/#8 的最佳降解条件为配比 5:3，最佳 pH、接种量和培养温度分别为 5.5、5% 和 32 °C，最优条件下培养 8 d 后降解率为 45.44%，温度是影响其降解 PAM 的主要因素。最优降解条件下复合真菌的产漆酶和脲酶活力分别达到 13.90 U/mL 和 17.70 U/mL，对 CO-NH₂、TOC 和 PAM 分子量的降解率分别为 45.44%、84.67% 和 84.57%。

(3) 复合真菌降解后，PAM 的侧链酰胺基大量减少，碳链结构被破坏，生成了含-COOH 和-OH 的小分子有机物。降解后的 PAM 表面出现

大量孔洞、裂纹和凹陷，同时附着有真菌菌丝形成的生物膜。

(4) 根据产物变化和比对 KEGG 数据的特异性氮代谢途径，表明复合真菌在降解 PAM 过程中能够有效降低 NO₂-N 的积累。

作者贡献声明

李嘉：提出概念，调查研究、完成实验、数据分析、撰写正文；靳振江：项目管理、资源支持、监督指导、审阅与修改；胡章恒：协助微生物实验、数据整理；王诗萱：软件指导；罗婷：数据监管；杨承熹：协助实验；范晨：参与论文讨论。

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] SOLOMOU AD, MICHPOULOS P, MANTAKAS G. Monitoring reclamation of plant biodiversity and soil parameters in an area of bauxite mine spoils (a case study of Greece)[J]. *Sustainability*, 2023, 15(20): 15120.
- [2] 罗秀光, 马少健. 平果铝土矿尾矿用于采空区复垦的试验研究[J]. *矿产保护与利用*, 2000, 20(4): 51-52.
LUO XG, MA SJ. Study on application of tailings to worked-out land reclamation in Pingguo aluminium mine[J]. *Conservation and Utilization of Mineral Resources*, 2000, 20(4): 51-52 (in Chinese).
- [3] BASARAN B, ABANOZ YY, BOYRAZ A. Effects of different brewing conditions on acrylamide levels in Turkish black tea and health risk assessment[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2024, 133: 106420.
- [4] SONG CY. Enhancing photocatalytic degradation of hydrolyzed polyacrylamide in oilfield wastewater using BiVO₄/TiO₂ heterostructure nano-photocatalyst under visible light irradiation[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2023, 18(12): 100363.
- [5] SILVA MESRE, DUTRA ER, MANO V, MACHADO JC. Preparation and thermal study of polymers derived from acrylamide[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2000, 67(3): 491-495.
- [6] LIU Y, ZHAO Y, WANG JL. Fenton/Fenton like processes with *in situ* production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for degradation of emerging contaminants: advances and prospects[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 404: 124191.
- [7] BAO MT, CHEN QG, LI YM, JIANG GC. Biodegradation of partially hydrolyzed polyacrylamide by bacteria isolated from production water after polymer flooding in an oil field[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 184(1/2/3): 105-110.
- [8] SONG TW, LI SS, YIN ZC, BAO MT, LU JR, LI Y. Hydrolyzed polyacrylamide-containing wastewater treatment using ozone reactor-upflow anaerobic sludge blanket reactor-aerobic biofilm reactor multistage treatment system[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 269: 116111.
- [9] ZHANG H, WANG B, GAO CY, ZHU TJ, XIONG MY, REN HY. Effective degradation of hydrolyzed polyacrylamide (HPAM) in a simultaneous combination of acoustic cavitation and microbubbles ozonation: process optimization and degradation mechanism[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2022, 159: 465-476.
- [10] DU J, LV CH, LAN XT, SONG JF, LIU PL, CHEN X, WANG Q, LIU JM, GUO GX. A review on viscosity retention of PAM solution for polymer flooding technology[J]. *Petroleum Science and Technology*, 2024, 42(3): 372-405.
- [11] COLEINE C, STAJICH JE, SELBMANN L. Fungi are key players in extreme ecosystems[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2022, 37(6): 517-528.
- [12] LIU TY, XIN Y, LIU XZ, WU B, XIANG MC. Advances in microbial degradation of plastics[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(8): 2688-2702.
- [13] SRIKANTH M, SANDEEP TSRS, SUCHARITHA K, GODI S. Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 42.
- [14] WU BB, LAN T, LU DN, LIU Z. Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination[J]. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2014, 16(6): 1501-1509.
- [15] WANG FL, ZHANG DC, WU XF, DENG SS. Biodegradation of anionic polyacrylamide mediated by laccase and amidase: docking, virtual mutation based on affinity and DFT study[J]. *New Journal of Chemistry*, 2021, 45(32): 14554-14562.
- [16] 张东晨, 王方略, 王涛, 戴雯. 混合菌协同降解煤泥水中聚丙烯酰胺的试验研究[J]. *洁净煤技术*, 2021, 27(1): 209-216.
ZHANG DC, WANG FL, WANG T, DAI W. Experimental study on co-degradation of polyacrylamide in coal slime water by mixed bacteria[J]. *Clean Coal Technology*, 2021, 27(1): 209-216 (in Chinese).
- [17] 路蓉蓉. 聚丙烯酰胺降解真菌的筛选及其降解性能的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2021.
LU RR. Screening of polyacrylamide degrading fungi and study on their degrading properties[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [18] 韩昌福, 郑爱芳, 李大平. 聚丙烯酰胺生物降解研究[J]. *环境科学*, 2006, 27(1): 151-153.
HAN CF, ZHENG AF, LI DP. Study on biodegradation of polyacrylamide[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(1): 151-153 (in Chinese).
- [19] SHANMUGAM S, HARI A, ULAGANATHAN P, YANG F, KRISHNASWAMY S, WU YR. Potential of biohydrogen generation using the delignified lignocellulosic biomass by a newly identified thermostable laccase from *Trichoderma asperellum* strain BPLMBT1[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2018, 43(7): 3618-3628.
- [20] TEMPORITI MEE, NICOLA L, NIELSEN E, TOSI S. Fungal enzymes involved in plastics biodegradation[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(6): 1180.
- [21] KHAN S, NADIR S, SHAH ZU, ALI SHAH A, KARUNARATHNA SC, XU JC, KHAN A, MUNIR S, HASAN F. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 225: 469-480.
- [22] ZHANG JQ, GAO DL, LI QH, ZHAO YX, LI L, LIN HF, BI QR, ZHAO YC. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 704: 135931.
- [23] 邓小华, 李震宇, 郑巧双, 罗茜, 余薇, 高奋, 刘婷, 潘笃杰, 付晓超. 一种霉菌孢子制品的制备方法, CN107365735A[P]. 2017-11-21.

- [24] 关淑霞, 范洪富, 段吉国, 宋春红. 聚丙烯酰胺质量浓度的测定: 淀粉-碘化镉法[J]. 大庆石油学院学报, 2007, 31(2): 110-112, 131.
GUAN SX, FAN HF, DUAN JG, SONG CH. Examination of the concentration of HPAM: the starch-cadmium iodine method[J]. Journal of Daqing Petroleum Institute, 2007, 31(2): 110-112, 131 (in Chinese).
- [25] 中华人民共和国生态环境部. 水质 硝酸盐氮的测定 紫外分光光度法(试行): HJ/T 346—2007[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Water quality—determination of nitrate-nitrogen—ultraviolet spectrophotometry: HJ/T 346—2007[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007 (in Chinese).
- [26] 中华人民共和国生态环境部. 水质 亚硝酸盐氮的测定 分光光度法: GB 7493—87[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.
Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Water quality-determination of nitrogen (nitrite)-spectrophotometric method: GB 7493—87[S]. Beijing: Standards Press of China, 1987 (in Chinese).
- [27] 卢光远, 宋秀贤, 俞志明. 利用分光光度法间接测定海水中的羟胺[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(5): 954-958.
LU GY, SONG XX, YU ZM. Indirect determination of hydroxylamine in seawater in spectrophotometry[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(5): 954-958 (in Chinese).
- [28] 中华人民共和国生态环境部. 水质 总有机碳的测定 燃烧氧化—非分散红外吸收法: HJ 501—2009[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009.
Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Water quality determination of total organic carbon—combustion oxidation nondispersive infrared absorption method: HJ 501—2009[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2009 (in Chinese).
- [29] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 水处理剂 阴离子和非离子型聚丙烯酰胺: GB/T 17514—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Water treatment chemicals—anionic and non-ionic polyacrylamides: GB/T 17514—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018 (in Chinese).
- [30] 张鹏. 以 ABTS 为底物测定漆酶活力的方法[J]. 印染助剂, 2007, 24(1): 43-45.
ZHANG P. Test method for the laccase activity with ABTS as the substrate[J]. Textile Auxiliaries, 2007, 24(1): 43-45 (in Chinese).
- [31] 陈素素. 产脲酶菌修复典型矿冶园区周边农田土壤镉、铅污染研究[D]. 北京: 北京有色金属研究总院, 2022.
CHEN SS. Study on the remediation of Cd-Pb contaminated farmland soil by urease-producing bacteria in typical mining and metallurgy parks[D]. Beijing: General Research Institute for Nonferrous Metals, 2022 (in Chinese).
- [32] GAYTÁN I, BURELO M, LOZA-TAVERA H. Current status on the biodegradability of acrylic polymers: microorganisms, enzymes and metabolic pathways involved[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(3): 991-1006.
- [33] YU YQ, LI YS, SUN BJ, CUI JB, LIU H, SUN YX, XU QL, BOISSE N, VOELKER F, MATIOSZEK D, FAVERO C, KIEFFER J, LI YM, LU JR, LI HS, BAO MT. Characterization and degradation mechanism of a newly isolated hydrolyzed polyacrylamide-degrading bacterium *Alcaligenes faecalis* EPDB-5 from the oilfield sludge[J]. Environmental Pollution, 2024, 363: 125124.
- [34] MROZIK A, PIOTROWSKA-SEGET Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds[J]. Microbiological Research, 2010, 165(5): 363-375.
- [35] 徐希辉, 刘晓伟, 蒋建东. 微生物菌群强化修复有机污染物污染环境: 现状与挑战[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(1): 10-17.
XU XH, LIU XW, JIANG JD. Enhanced bioremediation of organic pollutant contaminated environment by microbial consortia: current situations and challenges[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(1): 10-17 (in Chinese).
- [36] ČERNOŠA A, CORTIZAS AM, TRAORÉ M, PODLOGAR M, DANEVČIČ T, GUNDE-CIMERMAN N, GOSTINČAR C. A screening method for plastic-degrading fungi[J]. Heliyon, 2024, 10(10): e31130.
- [37] GOODELL B. Fungi involved in the biodeterioration and bioconversion of lignocellulose substrates[M]// Genetics and Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2020: 369-397.
- [38] 孙文秀, 周沁雯, 王睿, 刘萌, 余维初. 3株聚丙烯酰胺降解菌联合降解机理初探[J/OL]. 长江大学学报(自然科学版), 2024: 1-6. (2024-04-22). <https://link.cnki.net/doi/10.16772/j.cnki.1673-1409.20240418.008>.
SUN WX, ZHOU QW, WANG R, LIU M, YU WC. Preliminary study on joint degradation mechanism of three polyacrylamide degrading bacteria[J/OL]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2024: 1-6. (2024-04-22). <https://link.cnki.net/doi/10.16772/j.cnki.1673-1409.20240418.008> (in Chinese).
- [39] 周沁雯, 王睿, 舒文明, 余维初, 孙文秀. 响应面法优化聚丙烯酰胺降解复合菌的降解条件[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2024, 49(2): 417-428.
ZHOU QW, WANG R, SHU WM, YU WC, SUN WX. Optimization of degradation conditions of polyacrylamide degrading complex bacteria by response surface methodology[J]. Journal of Guangxi University (Natural Science Edition), 2024, 49(2): 417-428 (in Chinese).
- [40] GEISSELER D, HORWATH WR, JOERGENSEN RG, LUDWIG B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms: a review[J]. Soil Biology and

- Biochemistry, 2010, 42(12): 2058-2067.
- [41] 杨裕然, 李辉妙, 李振轮, 汪恩旭. 好氧氨氧化过程中的关键酶及 N₂O 排放研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3321-3334.
YANG YR, LI HM, LI ZL, WANG EX. Key enzymes and N₂O emission in aerobic ammonia oxidation process[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(9): 3321-3334 (in Chinese).
- [42] ZHAO YB, LIN XR. A PAS protein directs metabolic reprogramming during cryptococcal adaptation to hypoxia[J]. *mBio*, 2021, 12(2): e03602-20.
- [43] 卢培利, 杨涵, 丁阿强, 李朝洋, 全林. 碳源与氮源限制下细菌代谢调节研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 946-962.
LU PL, YANG H, DING AQ, LI CY, QUAN L. Metabolic regulation of bacteria with limited carbon and nitrogen sources[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 946-962 (in Chinese).
- [44] CALATRAVA V, TEJADA-JIMENEZ M, SANZ-LUQUE E, FERNANDEZ E, GALVAN A. Nitrogen metabolism in *Chlamydomonas*[M]//The Chlamydomonas Sourcebook. Amsterdam: Elsevier, 2023: 99-128.
- [45] LI WC, LIN TC, CHEN CL, LIU HC, LIN HN, CHAO JL, HSIEH CH, NI HF, CHEN RS, WANG TF. Complete genome sequences and genome-wide characterization of *Trichoderma* biocontrol agents provide new insights into their evolution and variation in genome organization, sexual development, and fungal-plant interactions[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(3): e0066321.
- [46] HIRD K, CAMPECIÑO JO, LEHNERT N, HEGG EL. Recent mechanistic developments for cytochrome c nitrite reductase, the key enzyme in the dissimilatory nitrate reduction to ammonium pathway[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2024, 256: 112542.