张慕琦,王乙橙,晏 鹏,等.厌氧氨氧化细菌的混合营养代谢机制研究进展 [J]. 中国环境科学, 2025,45(7):3724-3734.
Zhang M Q, Wang Y C, Yan P, et al. Research advances on the mixotrophic metabolic mechanisms of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. China Environmental Science, 2025,45(7):3724-3734.

厌氧氨氧化细菌的混合营养代谢机制研究进展

张慕琦,王乙橙,晏 鹏,陈猷鹏* (重庆大学,三峡库区生态环境教育部重点实验室,重庆 400045)

摘要：本文综述了厌氧氨氧化细菌(AnAOB)混合营养代谢机制的研究进展,并展望了未来研究方向和工程意义.研究表明,AnAOB 的混合营养代谢受 C/N 比、有机物浓度和种类等因素影响.然而,不同 AnAOB 菌种代谢小分子有机物(如乙酸盐、丙酸盐等)的代谢速率和微观机制分析尚不清晰.近年来,先进的 ^{13}C 同位素标记技术(DNA-SIP)和单细胞技术为深入揭示 AnAOB 吸收和代谢小分子有机物的途径提供了新手段.多组学联合分析显示,AnAOB 通过还原性乙酰辅酶 A 途径固定无机碳,并具备利用异化硝酸盐还原为铵(DNRA)、甲酸盐代谢、乙酸盐代谢、丙酸盐代谢及三羧酸循环等多条小分子有机物代谢途径,但具体机制仍存在争议.未来研究可以聚焦于 AnAOB 混合营养代谢过程中的电子转移机制、内源有机物利用策略及小分子有机物同化能力,以优化 AnAOB 的富集与脱氮性能,拓展其在复杂污水处理中的应用潜力.

关键词：厌氧氨氧化细菌(AnAOB)；混合营养代谢；无机碳固定；异化硝酸盐还原为铵(DNRA)；小分子有机物
中图分类号：X172 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)07-3724-11

Research advances on the mixotrophic metabolic mechanisms of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. ZHANG Mu-qi, WANG Yi-cheng, YAN Peng, CHEN You-peng* (Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environments of MOE, Chongqing University, Chongqing 400045, China). *China Environmental Science*, 2025,45(7)：3724~3734

Abstract：This review summarized the research progress on mixotrophic metabolic mechanisms of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (AnAOB), and provided perspectives on future research directions and highlighted the engineering implications. Current studies indicated that the mixotrophic metabolism of AnAOB could be influenced by factors such as the C/N ratio, organic matter concentration and types. However, the metabolic rates and micro-mechanisms of different AnAOB strains in metabolizing small organic molecules (e.g., acetate, propionate) remain unclear. In recent years, advanced ^{13}C isotope labelling technology (DNA-SIP) and single-cell techniques have provided novel approaches to elucidate the pathways of small organic molecules uptake and metabolism in AnAOB. Multi-omics analysis showed that AnAOB fix inorganic carbon through the reductive acetyl-CoA pathway and harboured multiple pathways for small organic molecules metabolism, including denitrifying nitrate to ammonium (DNRA), formate metabolism, acetate metabolism, propionate metabolism, and the tricarboxylic acid cycle, yet the specific mechanisms remain controversial. Future research could focus on the electron transfer mechanisms, endogenous organic matter utilization strategies, and small organic molecules assimilation capabilities in the mixotrophic metabolism of AnAOB, aiming to optimize the enrichment and nitrogen removal performance of AnAOB, and expand their application potential in complex wastewater treatment.

Key words：anaerobic ammonium-oxidizing bacteria；mixotrophic metabolism；inorganic carbon fixation；dissimilatory nitrate reduction to ammonium；small organic molecules

厌氧氨氧化(Anammox)是指在缺氧或厌氧环境中,微生物利用 NO_2^--N 作为电子受体将 NH_4^+-N 直接氧化为 N_2 的过程[1],是污水脱氮领域的革命性技术[2-3].该过程由隶属于浮霉菌门(Planctomycetota)的厌氧氨氧化细菌(AnAOB)介导[4].AnAOB 具有自养生长和厌氧特性,因而生长缓慢(倍增时间通常在 7d 以上)、生物质产率低[2,5],极大限制了 Anammox 在实际工程中的应用[6].

近年来,组学研究为克服这一瓶颈提供了新的见解.研究表明,AnAOB 并非严格的化能自养型细菌,而是更倾向于采用多途径的碳源利用方式,即除了利用 CO_2 或 HCO_3^- 等无机碳源,还可以利用甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐等有机物质获得能量[7-9],因此可以认为 AnAOB 的碳代谢过程是一种混合营养代谢.过去的研究曾认为投加少量有机物(COD=100~200mg/L)将促进 Anammox-异养反硝化耦合,提高系统脱氮效率;有机物投加过多则会导致 Anammox

收稿日期：2024-12-03
基金项目：国家自然科学基金资助项目(52370030)
* 责任作者, 教授, ypchen@cqu.edu.cn

系统中异养菌大量繁殖成为优势种群,进而影响脱氮效率和群落的稳定性[10].然而,这一观点忽略了AnAOB 的混合营养代谢灵活性,具体表现为不同环境条件下,AnAOB 调整其代谢方式以维持活性和生长,例如在铵(NH_4^+)和亚硝酸盐(NO_2^-)充足的条件下,部分 AnAOB 直接利用小分子有机物展现更高的脱氮效率和生长优势[11-12];而在缺乏 NH_4^+ 或 NO_2^- 时,AnAOB 以小分子有机物为电子供体,直接将 NO_3^- 还原为 NO_2^-,进一步在酶的催化下还原为 NH_4^+[13].这种能力有助于加速 Anammox 反应器的启动,并维持其稳定运行,为废水处理等环境工程应用提供了潜在的优化路径.

AnAOB 的种类众多,彼此之间存在较大的代谢差异[12].目前,虽然已有许多学者针对 AnAOB 基因组数据进行了挖掘,但是涉及的 AnAOB 种类仍不全面[14].此外,AnAOB 利用小分子有机物的途径仍存在较多争议[8,12,15],其混合营养代谢的具体机制仍未完全清晰.本文旨在从细胞、分子等微观角度全面总结及探讨 AnAOB 的混合营养代谢,为解决 AnAOB 生长缓慢,抵抗有机负荷冲击等工程应用挑战提供参考和新思路.

1　AnAOB 的生理生态特性和化能自养代谢

1995 年,荷兰学者 Mulder 等[16]在实际运行的反应器中首次证实了 Anammox 过程的存在,随后,van de Graaf 等[17]基于实验结果进一步确认该反应是一种微生物驱动的生物过程.迄今为止,已发现介导 Anammox 过程的 AnAOB 在浮霉菌门中形成了一个独特且分支较深的系统发育群[4,7],共包括 4 个科 9 个属,即 Ca. Brocadiaceae 科的 *Ca.* Kuenenia、*Ca.* Brocadia、*Ca.* Anammoxoglobus、*Ca.* Jettenia、*Ca.* Anammoximicrobium 和 *Ca.* Loosdrechtia, Ca. Scalinduaceae 科的 *Ca.* Scalindua, Ca. Anammoxibacteraceae 科的 *Ca.* Anammoxibacter,以及 Ca. Bathyanammoxibiaceae 科的 *Ca.* Bathyanammoxibius(*Ca.*为 *Candidatus* 的简称)[18-22],均未实现纯培养.*Ca.* Scalindua 在海洋环境中占绝对优势,对海洋氮循环有重要贡献[23].*Ca.* Brocadia、*Ca.* Kuenenia 和 *Ca.* Jettenia 在淡水、土壤和人工系统环境中占优势,其中 *Ca.* Brocadia 表现出低底物亲和力和高生长速率[24],*Ca.* Jettenia 则能够耐受高浓度 NO_2^- [25].*Ca.*Anammoxooglobus 属能以 NO_2^- 或 NO_3^- 为电子受体,实现丙酸盐和 NH_4^+ - N 的共同氧化[9].*Ca.* Anammoximicrobium moscowii 是从莫斯科河淤泥中获得,细胞形态易变,很容易粘附在固体表面[26].*Ca.* Loosdrechtia 是近几年在废水处理生物膜中被发现的一类 AnAOB 属,在 NO_3^- 同化方面比较有优势[19].Ca. Anammoxibacteraceae 和 Ca. Bathyanammoxibiaceae 是新近发现包含 AnAOB 的科,具体菌种尚未完全明确[20-21].但依据目前研究发现,这两类科均包含了海洋和陆地环境中的种类,推测可能是 AnAOB 的古老分支[20-21].综上,对比不同 AnAOB 属的生理特性和生态分布,不同属之间存在明显的差异.

AnAOB 的氮代谢模型经过不断修正逐渐成熟,目前已描述了多种氮代谢关键酶的功能及不同菌属之间的氮代谢差异[7,12,27-28](图 1).AnAOB 的氮代谢过程与碳固定密切相关,特别是在能量传输和电子传递方面[12,28].研究表明,AnAOB 依靠 NH_4^+ 和 NO_2^- 之间的反应获取能量,这些化学反应释放的部分能量用于固定 CO_2 或 HCO_3^- 来合成细胞物质[4,12].研究者对于 *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 碳固定过程所用的电子来源虽持有多种观点,但普遍认为这些电子来源于氮代谢(图 1).Schouten 等[29]首次利用碳同位素标记法发现 *Ca.* Brocadia anammoxidans、*Ca.* Scalindua sorokinii 的碳固定途径相同,可能是卡尔文循环或还原性乙酰辅酶 A 途径.2006 年,*Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 的全基因组测序完成[7],其基因组中具备还原性乙酰辅酶 A 途径所需的所有关键基因,并且这些基因均能表达,而卡尔文循环中的关键基因有部分缺失[7].以上研究表明,不同种的 AnAOB 可能共享相同碳固定途径,并且很可能为还原性乙酰辅酶 A 途径.该固定过程需要高能量输入,早期假设所用的电子由 AnAOB 体内亚硝酸还原酶(NIR)将 NO_2^- 氧化为 NO_3^- 过程所提供.随着氮代谢模型修正,推测由氮代谢中联氨脱氢过程提供 4 个高能电子[30].而最新的研究表明,在没有 NO_2^- 的情况下,*Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 可将 NO 作为电子受体,联氨脱氢过程释放的 4 个电子中 3 个用于联氨合成,剩余 1 个电子用于生物质生产(碳固定)[28].

后续研究发现,AnAOB 并不是专性化学自养生物.相反,在复杂系统或环境中,AnAOB 能够通过异

化硝酸盐还原为铵(DNRA)途径使用小分子有机物(例如甲酸盐、乙酸盐和丙酸盐)作为替代电子供体进行混合营养生长[31].但值得注意的是,AnAOB 的代谢能力不应仅依据其是否具备 DNRA 途径来简单分类为有机型和无机型,因为基因组预测发现可能还具有其他利用有机碳源的途径[12,32-33].

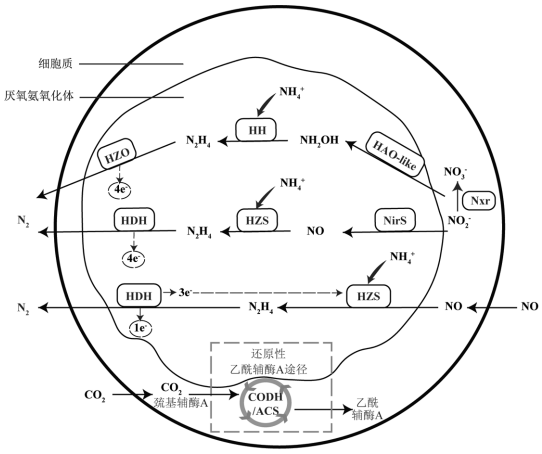


图 1 AnAOB 氧化铵的 3 条途径和无机碳固定途径

Fig.1 Three pathways of ammonium oxidation and inorganic carbon fixation in AnAOB

图改编自 Kartal 等[12]

2 AnAOB 的混合营养代谢

2.1 具备混合营养代谢潜力的 AnAOB 种类

如上所述,目前已发现的 AnAOB 分布于 4 个科的 9 个属中,其中已经确认或预测具有混合营养代谢能力的AnAOB菌种在 *Ca.* Kuenenia、*Ca.* Jettenia、*Ca.* Brocadia、*Ca.* Anammoxoglobus、*Ca.* Loosdrechtia、*Ca.* Anammoxibacter 以及 *Ca.* Scalindua 属中均有出现(表 1).

上述不同种类的 AnAOB 固定无机碳的途径相同[29,56],但具备混合营养代谢能力的 AnAOB 对小分子有机物的响应存在差异.这种差异具体表现为两类,一是特定有机物存在条件下某一 AnAOB 菌种形成竞争优势.例如,*Ca.* Brocadia fulgida 在乙酸盐存在环境中表现出竞争优势[8],*Ca.* Anammoxoglobus propionicus 在丙酸盐存在环境中成为优势菌种[9],它们分别在乙酸盐和丙酸盐存在的环境中能够竞争过包括反硝化菌在内的其他物种[12].另一类差异具体表现为 AnAOB 在系统内定向富集和种群转移.有研究通过添加不同有机碳源,从活性污泥中富集到不同的具备混合营养代谢潜力的 AnAOB 菌种[8],或是通过额外添加小分子有机物质,观测到 AnAOB 优势种群演替[57].但目前缺乏针对不同 AnAOB 菌种对有机碳的代谢速率和适应能力进行归一化比较和分析的研究,使得相关结论存在矛盾[58-59].

表 1 AnAOB 的分类和混合营养代谢潜力

Table 1 Classification and mixotrophic metabolic potential of AnAOB

属	种	混合营养代谢潜力	参考文献
Ca. Kuenenia	*Ca.* K. stuttgartiensis	++	[12,34]
Ca. Brocadia	*Ca.* B. fulgida	++	[8]
	Ca. B. sinica	++	[35]
	Ca. B. caroliniensis	+	[36]
	Ca. B. sapporoensis	+	[37]
	Ca. B. brasiliensis	−	[38]
	Ca. B. anammoxidans	−	[39]
Ca. Anammoximicrobium	*Ca.* A. moscowii	−	[26]
Ca. Anammoxoglobus	*Ca.* A. sulfate	−	[40]
	Ca. A. propionicus	++	[9]
Ca. Jettenia	*Ca.* J. caeni	++	[41]
	Ca. J. asiatica	++	[42]
	Ca. J. ecosi	−	[43]
	Ca. J. moscovienalis	−	[44]
Ca. Scalindua	*Ca.* S. profunda	+	[45]
	Ca. S. brodiae	−	[46]
	Ca. S. sorokinii	−	[47]
	Ca. S. wagneri	−	[46]
	Ca. S. marina	−	[48]
	Ca. S. arabiea	−	[49]
	Ca. S. rubra	−	[50]
	Ca. S. flavia	−	[51]
	Ca. S. pacifica	−	[52]
	Ca. S. zhenghei	−	[53]
	Ca. S. richardsii	−	[54]
	Ca. S. sinooifed	−	[55]
Ca. Loosdrechtia	*Ca.* L. aerotolerans	+	[19]
Ca. Anammoxibacter	*Ca.* A. sp.OFTM134	+	[20]
	Ca. A. sp.OFTM214	+	[20]
	Ca. A. sp.OFTM301	+	[20]
Ca. Bathyanammoxibius	*Ca.* B. amoris	−	[22]

注:++,代表基于实验验证具备混合营养代谢能力;+,代表基于组学预测具备混合营养代谢潜力;−,代表未知或未报道.

2.2 基于实验验证的 AnAOB 混合营养代谢途径

2.2.1 影响 AnAOB 混合营养代谢的因素 近些年,关于有机物对 Anammox 过程的效率和稳定性的影响引起了广泛关注[60].实验研究表明,影响 AnAOB 混合营养代谢的关键因素包括 C/N 比、浓度和有机物种类.

研究发现,培养基中小分子有机物与NH_4^+的比例可能显著影响 AnAOB 的代谢竞争力.尹雪娇[14]研究结果表明有机碳(TOC/TN=0.1)的存在有利于AnAOB 的生长.Kartal 等[8]利用 SBR 反应器富集和培养 *Ca.* Brocadia fulgida,为期 4 个月实现 80%富集密度(最终乙酸盐−C/NH_4^+-N 的物质的量浓度比为1/6);Winkler 等[61]以乙酸钠为进水有机物质,控制乙酸盐−C/NH_4^+-N <0.25,同样成功富集培养了以 *Ca.* Brocadia fulgida 为主的 AnAOB.He 等[62]发现当长期保持乙酸盐−C/NH_4^+-N =0.25,能够维持厌氧氨氧化的活性,实现较高(84.9%±2.8%)的 TN 去除效率.也有研究发现,当培养基中的丙酸盐与NH_4^+比例高于0.75~1.25 时,AnAOB 的丰度则显著降低[9,63].尽管由于运行方式和实验条件的差异,目前关于最适合 AnAOB 生长的 C/N 水平报道结果不一,但是可以肯定的是,合理控制 C/N 对于 AnAOB 的生长以及富集起着至关重要的作用.

部分研究揭示了 COD 浓度的重要性.Wang 等[11]认为 COD 在维持 Anammox 反应器稳定运行方面比 C/N 更重要.当 COD 浓度为 300mg/L 时,平衡了 Anammox 和反硝化对脱氮的协同和抑制作用,表现出最佳的脱氮性能.Huang 等[64]通过批次实验发现,低乙酸盐(≤30mg/L)和丙酸盐(≤50mg/L)浓度几乎不会影响 Anammox,而当浓度分别为 240 和 400mg/L 会导致NH_4^+-N 消耗率降低 33%和 29%.然而,关于 AnAOB 吸收和代谢小分子有机物的微观机制研究相对较少,特别是对不同 AnAOB 种群在不同有机物条件下的消耗速率仍缺乏明确的实验数据.

2.2.2　AnAOB 混合营养代谢研究的技术进展　由于 AnAOB 至今未实现纯培养,其混合营养代谢途径相关研究面临诸多挑战.为阐明 AnAOB 对有机物的吸收与代谢途径,研究者已尝试利用先进的分析技术探索 AnAOB 的混合营养代谢路径,如同位素标记技术和单细胞研究技术.1995 年,van de Graaf 等[17]通过同位素标记法使用 ^{15}N 标记的NH_4^+-N 和 ^{14}N 标记NO_2^-−N,结果产生了 $^{14-15}N_2$ 和极少量 $^{15-15}N_2$,基本否定NO_3^-−N 作为电子受体的猜想.这一技术随后被广泛用于研究 AnAOB 的代谢途径.例如,通过分析 AnAOB 脂质和生物质的稳定碳同位素组成,研究者对其可能的碳固定途径提出多种猜测[29].此外,碳水化合物和氨基酸的稳定碳同位素组成也可被用于推断 AnAOB 的生物合成或代谢途径.选择性抑制实验常被用于验证复杂系统中 AnAOB 在氮循环中的作用[65].该方法能应用于检测系统中 AnAOB 混合营养代谢利用和转化的小分子有机碳源所占比例.稳定性同位素核酸探针技术(DNA−SIP)作为同位素标记法的升级,专门针对微生物群落,能更准确地揭示复杂环境中参与标记底物代谢的微生物群落[66].Xiao 等[67]利用 ^{13}C DNA−SIP 耦合代谢组学和宏基因组学,鉴定和量化了 AnAOB 在细胞生长过程中产生的可溶性微生物产物(SMP).

单细胞研究技术是一类基于单细胞水平的研究细胞的技术,依据不同联用技术和应用领域可以划分为单细胞测序技术、单细胞光谱检测技术以及单细胞探针技术等类型[68−70].单细胞测序技术(SCS)是指从单个细胞中获取其基因组信息以克服宏基因组组装的限制和传统培养方式的局限,为研究未纯培养微生物提供新思路[71].开展 SCS 的前提是从复杂群落中获取单个 AnAOB 细胞.目前,有多种方法可以实现单细胞分选,例如微流控平台、全自动单细胞分选仪(CellenONE)等[71-72].最新研究发现,单细胞拉曼微光谱(SCRM)能够通过光谱信号(拉曼散射光)识别细胞内核酸、蛋白质、脂类等代谢物的差别[73],利用 Raman 活性细胞弹射(RACE)技术靶向识别并获取目标细菌单细胞[68].房安然[68]基于该技术从 Anammox 污泥中获取了 *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 的单细胞生物样品,从而发现 *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 具有糖酵解代谢(EMP)的潜力.荧光原位杂交技术(FISH)早在上世纪 90 年代广泛应用于 AnAOB 的鉴定和分析.研究者们针对不同 AnAOB 设计了特异性探针[74].单细胞探针技术,即通过联合特异性分子探针(如 DNA、RNA 或荧光标记探针)与先进的单细胞研究技术,如纳米级二次离子质谱法(NanoSIMS),可成为检测 AnAOB 有机碳利用途径的有力工具[42].有研究者[64,75]利用 NanoSIMS 揭示了 *Ca.* Jettenia asiatica 代谢乙酸盐和丙酸盐可能的途径.

总体而言,虽然 AnAOB 混合营养代谢研究面临技术和方法上的挑战,但随着同位素标记及单细胞分析等技术的不断发展,通过优化实验设计,不仅能够加深对 AnAOB 混合营养代谢机制的理解,也能为复杂系统内微生物的代谢研究提供新思路.

2.3 基于组学预测的 AnAOB 混合营养代谢多样性

组学研究已成为研究生物体生理代谢机制的常用方法,并在 Anammox 领域的机制研究中得到了广泛应用,关于 AnAOB 的一些独特的生理功能(潜力)不断的被发现[42].多组学联用分析方法通过整合宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学和宏代谢组学等多个领域,能够有助于预测和深入理解非纯培养物 AnAOB 代谢途径的动态变化和调控机制.

2.3.1 无机碳固定途径 AnAOB 通过还原性乙酰辅酶 A 途径固定无机碳,这一结论的关键证据在于其基因组中注释到该途径完整的基因集,而其他已知的碳固定途径(如卡尔文循环或反向三羧酸循环)均有缺失或不完整[7].在这个途径中,甲酸脱氢酶(FDH)将 CO_2 还原成甲酸,然后通过一系列酶反应,将甲酸转化为甲基四氢叶酸(CH_3-H_4F).与此同时,另一分子 CO_2 被 CO 脱氢酶/乙酸合成酶(CODH/ACS)还原为羰基,并与转移的甲基结合,最终合成乙酰辅酶 A.CODH/ACS 是这个过程的关键酶,负责整合羰基和甲基以生成乙酰辅酶 A,研究者证明了 *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 中该酶的活性[32].除 *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 菌株外,该关键酶的编码基因在 *Ca.* Brocadia fulgida,*Ca.* Brocadia caroliniensis, *Ca.* Brocadia sinica,*Ca.* Brocadia sapporoensis,*Ca.* Jettenia caeni,*Ca.* Jettenia asiatica,*Ca.* Scalindua profunda 等 AnAOB 的基因组中均能检测到[8,19,35-37,41],因此,可以基本确定 AnAOB 通过还原性乙酰辅酶 A 途径固定无机碳(图 2 (a)).

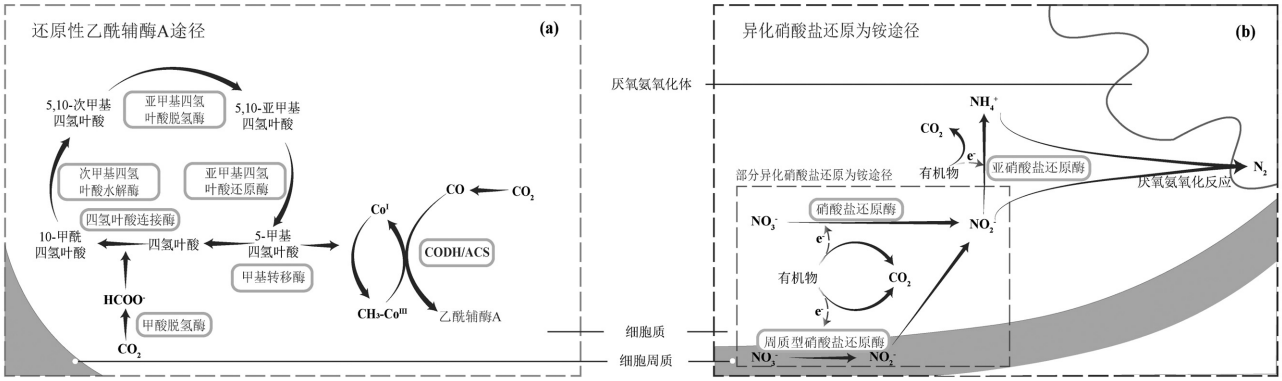


图 2 AnAOB 无机碳固定途径和 DNRA 途径的关键酶

Fig.2 Key enzymes involved in inorganic carbon fixation and DNRA pathways in AnAOB

图改编自 Kartal 等[12-13]

2.3.2 氧化有机碳的 DNRA 途径 DNRA 被归于 AnAOB 转化氮素的重要途径之一,也被认为是 AnAOB 代谢小分子有机物的重要路径[13].该途径依赖有机碳(如葡萄糖、挥发性脂肪酸、细胞内碳源等)作为电子供体[76-77],将 NO_3^- 还原成 NO_2^-,再进一步将 NO_2^- 还原为 NH_4^+.早期对 AnAOB 氮代谢的研究常忽略了 DNRA 的作用,导致低估了 AnAOB 对总氮去除的贡献[78].该途径关键的两个酶为硝酸还原酶(Nar)和亚硝酸盐还原酶(NrfA),部分细菌体内存在周质型硝酸盐还原酶(Nap)[79](图 2(b)).Park 等[36]利用宏基因组学在 *Ca.* Brocadia caroliniensis 基因组内检测到了编码 Nar 和 NrfAH 关键酶的功能基因,推测其具备完成 DNRA 途径的能力.同样,*Ca.* Brocadia fulgida 和 *Ca.* Jettenia caeni 基因组中也存在编码 Nar 和 Nrf 或 NirBD 等关键酶的功能基因[8,41],而 *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 是否能够利用 DNRA 代谢小分子有机物仍存在争议.尹雪娇[14]发现该菌种基因组中并不存在 *nrfAH* 基因,不具备完整 DNRA 代谢路径.然而,另有研究发现,AnAOB 可以通过部分 DNRA 途径将 NO_3^- 转化为 NO_2^-,生成的 NO_2^- 可以与环境中外部的 NH_4^+ 结合,产生 N_2[80].*Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 可能通过部分 DNRA 途径促进脱氮和利用少量小分子有机物补充电子和能量[80].诸多研究表明,基因组中具备完整 DNRA 途径的 *Ca.* Brocadia fulgida 和 *Ca.* Jettenia caeni 比 *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis 更能适应有机环境,具体表现为丰度的上升或发生种群转移[80-81].关于厌氧氨氧化细菌驱动 DNRA 途径的速率,Kartal 等[13]发现梯度离心纯

化的AnAOB将NO_3^-异化还原为NO_2^-的速率仅为正常Anammox速率的10%,因而在正常自养环境下难以自行驱动DNRA[81].有研究表明部分AnAOB能通过刺激DNRA途径相关基因表达,加快该途径的反应速率[80-81].但目前,有关刺激AnAOB进行DNRA的条件知之甚少,值得进一步研究.

2.3.3　其他转化有机碳的途径　后续深入挖掘功能基因或代谢关键酶发现,AnAOB能够在固定无机碳的同时转化某些有机碳以维持或促进代谢,最显著的是甲酸盐、乙酸盐和丙酸盐[12](图3).AnAOB的甲酸脱氢酶(FDH)除了在整个碳固定过程中扮演关键角色,将CO_2转化为甲酸,还能够催化甲酸的氧化反应(图3(a)).因此,Kartal等[12]认为AnAOB(例如*Ca.* Kuenenia stuttgartiensis)先将甲酸盐转化为CO_2,再通过还原性乙酰辅酶A途径利用.但有研究提出不同路径,认为在AnAOB中,以*Ca.* Scalindua profunda为例,甲酸盐可以通过一种依赖于四氢叶酸的生物化学途径被激活并参与代谢活动,这意味着甲酸盐与四氢叶酸结合形成甲酰四氢叶酸,使得甲酸的碳原子成为可用于其他代谢反应的一碳单位[45].目前尚不清楚这两种推测是否由于不同种AnAOB体内碳代谢关键酶的差异.值得注意的是,FDH通常含有钼辅因子,类似于钼蝶呤氧化还原酶的功能.在*Ca.* Scalindua profunda基因组中发现更多可能编码钼蝶呤氧化还原酶蛋白的基因,这些基因的产物可能参与甲酸盐的转化[45].

AnAOB代谢乙酸盐的途径也存在不同的推测(图3(b)).Kartal等[8]认为*Ca.* Brocadia fulgida不是直接将乙酸盐转化为乙酰辅酶A,而是先将乙酸盐降解为CO_2,最后由乙酰辅酶A途径重新固定.该过程中乙酸盐降解的速度非常快,不存在诱导期.然而,Gori等[82]的研究提出不同观点,其在*Ca.* Brocadia fulgida基因组中发现了AMP依赖的乙酰辅酶A合成酶和ADP依赖的乙酸盐CoA连接酶的编码基因,这意味着*Ca.* Brocadia fulgida具有直接催化乙酸与辅酶A(CoA)在ATP/ADP的辅助下生成乙酰辅酶A的能力.此外,尹雪娇[14]基于宏基因组学数据发现,在*Ca.* Jettenia caeni,*Ca.* Kuenenia stuttgartiensis,*Ca.* Brocadia sinica中存在两种乙酸盐代谢途径.一是乙酸盐直接转化为乙酰辅酶A,这条途径涉及的关键酶是乙酰辅酶A合成酶1和2(ACSS1和ACSS2). *Ca.* Jettenia caeni, *Ca.* Kuenenia stuttgartiensis, *Ca.* Brocadia sinica主要利用本途径完成乙酸盐代谢;二是AckA−Pta途径,即AnAOB利用磷酸转乙酰酶(Pta)将乙酸转化为乙酰磷酸,然后由乙酸激酶(AckA)催化乙酰磷酸与ADP反应生成乙酰辅酶A和ATP,这条途径涉及的关键酶为Pta和AckA.*Ca.* Brocadia fulgida以途径二为主完成乙酸盐代谢.存在多种碳代谢途径推测的根本原因在于不同AnAOB基因组中关键基因的多样性.其他AnAOB代谢乙酸盐的途径目前尚未有明确的报道,值得进一步研究.

Ca. Anammoxoglobus propionicus是一种从含有丙酸盐环境中的富集得到的AnAOB.与包括异养菌在内的其他菌株相比,该菌株的丙酸盐氧化速率高出2~5倍[12].先前研究发现,*Ca.* Anammoxoglobus propionicus虽不直接同化丙酸盐,但能利用丙酸盐作为补充电子供体和能量来源,从而在NO_2^-底物亲和力上显著优于其他AnAOB[9].然而,随着对其他AnAOB代谢丙酸盐途径的深入研究,研究者在具有代谢丙酸盐能力的*Ca.* Kuenenia stuttgartiensis基因组中注释到丙酸代谢关键酶甲基丙二酰辅酶A脱羧酶(*kustd2060*−*2061*)和甲基丙二酰辅酶A差向异构酶(*kuste4266*)的编码基因.前者负责将甲基丙二酰辅酶A(Methylmalonyl−CoA)脱羧生成丙酰辅酶A(Propionyl−CoA),后者主要将甲基丙二酰辅酶A转化为三羧酸循环(TCA循环)中的关键物质琥珀酰辅酶A(Succinyl−CoA).生成的Succinyl−CoA可以进入TCA循环,在循环中进一步氧化分解,为细胞提供能量(ATP)和其他重要的代谢物中间体.注释结果的争议之处在于所涉及的酶均以甲基丙二酰辅酶A为反应底物,反应过程相反.前者催化去羧基反应,可能生成丙酸等产物,代表一个碳骨架的拆解和能量释放过程,而后者介导异构化反应,将丙酸及其相关的代谢物整合入TCA循环,产生能量.Kartal等[12]对于这一矛盾的解释为在某些生物系统中,尤其是生长缓慢的细菌,某些可逆反应或过程能够在接近热力学平衡的条件下以低速率进行.这可能是AnAOB的一种生存策略,使它们能够在资源匮乏或极端环境下存活.最近研究表明,*Ca.* Brocadia也与*Ca.* Kuenenia相同,也可以通过三羧酸循环途径降解丙酸[33].目前,*Ca.* Jettenia利用丙酸盐的途径还不清晰,结合组学分析结果,推测*Ca.* Jettenia asiatica对丙酸

的代谢途径倾向于利用其做为电子供体[42].丙酸盐虽然都属于小分子有机物质,但无法像乙酸盐能够较易穿过细胞壁进入细胞,其转运较为困难[42].因此,对于具有混合营养代谢潜力的不同种 AnAOB 摄取丙酸盐的方式和代谢途径可能存在较大差异(图 3(c)).

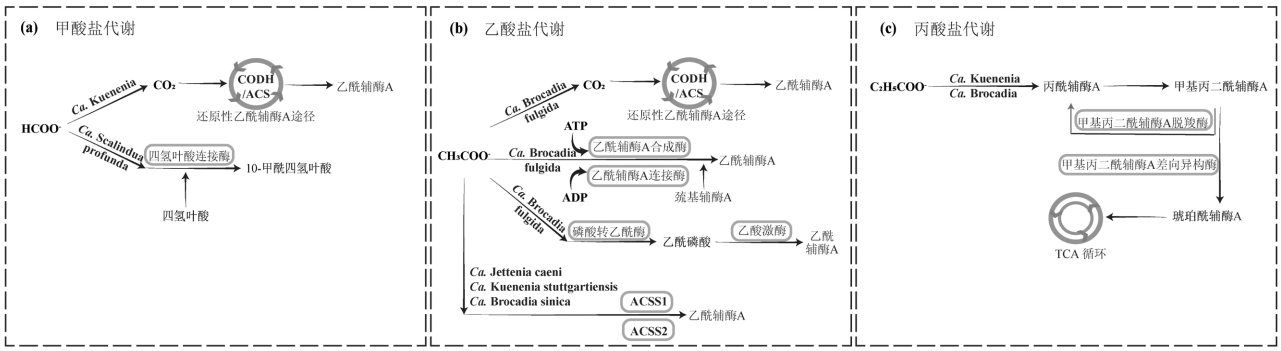


图 3 预测 AnAOB 代谢甲酸盐、乙酸盐和丙酸盐的路径

Fig.3 Predicted metabolic pathways for formate, acetate and propionate in AnAOB

综上所述,AnAOB 利用还原性乙酰辅酶 A 途径固定 CO_2 等无机碳,还具有能够利用 DNRA,甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐代谢途径,以及三羧酸循环等多途径代谢小分子有机物的潜力.另外,部分 AnAOB 可以使用甲胺、二甲胺和甲醇作为电子供体,但参与其代谢的酶仍然未知[12].后续需要利用针对未纯培养物的先进实验技术对代谢通路的关键酶和代谢中间物进行深入分析和验证.

3 未来突破方向与工程应用前景

3.1 未来突破方向

3.1.1 混合营养代谢的电子转移过程 AnAOB 因合成代谢的还原反应或中间体的泄漏而导致的电子损失,可以通过代谢小分子有机物(挥发性脂肪酸、甲胺和二甲胺等)或甘油[60]进行补充.目前尚不清楚其他类型的有机物质(如多糖)是否也能充当电子供体,进一步研究有助于丰富 AnAOB 的混合营养代谢途径.目前有关 AnAOB 混合营养代谢过程中电子转移过程方面的研究集中于 DNRA 途径.目前已证明,在不存在 NO_2^- 的条件下,AnAOB 具备将电子转移到不溶性胞外电子受体的胞外电子转移(EET)能力[83],以电极为电子受体氧化 NH_4^+ 的替代途径.最新研究基于这一新发现,探索了以光激发电子为供体,刺激 AnAOB 进行 DNRA 途径去除 NO_3^- 的可行性[84].AnAOB 中涉及其他有机物代谢途径的电子转移过程还有待深入研究.

3.1.2 内源有机物的混合营养代谢机制 目前普遍接受外源易生物降解的有机物能够引起混合营养代谢型 AnAOB 代谢关键基因的上调,但有机物的加入不可避免的会触发系统中异养反硝化菌的增殖,不利于 AnAOB 的富集[76].一些 AnAOB(例如 *Ca.* Kuenenia 和 *Ca.* Brocadia)会产生糖原颗粒,作为能量存储物质[85-86].已有研究表明在 HCO_3^- 存在或不存在时 *Ca.* Kuenenia 都可以利用胞内糖原作为电子供体进行 DNRA,该途径能够消耗 Anammox 过程产生的 NO_3^- [77,87].探索通过调控 AnAOB 基于内源有机物的 DNRA 途径进行混合营养代谢,从而减少外源有机物的投加,确保 AnAOB 的稳定富集和提高脱氮效率,具有重要研究意义.

3.1.3 AnAOB 同化小分子有机物机理 关于 AnAOB 能否同化小分子有机物,仍存在较大争议.许多研究者认为,乙酸盐或丙酸盐可能不是被 AnAOB 直接同化,而是首先被氧化为 CO_2 ,然后作为自养的碳源,同时获取额外能量和电子,证据之一是与自养条件相比,*Ca.* Jettenia asiatica 群落在有机营养条件下的生长没有明显优势[64].与此同时,Feng 等[15]研究结果发现,添加简单有机酸的混合营养生长使得 AnAOB 的生物质产量高于自养生长.通过组学预测的 DNRA 或小分子有机物代谢途径关键基因的上调可以解释 AnAOB 具有代谢相应有机物的能力,但不同 AnAOB 是否具有有机物利用途径的偏向,未来值得进一步的比较和研究.

3.2 工程应用前景

综上所述,混合营养代谢对 AnAOB 的脱氮功能

和生存具有重要影响,通过调控其混合营养代谢,可以带来以下工程应用的意义:(1)增强 AnAOB 的环境适应性:AnAOB 在面对环境因素变化时,如有机物浓度波动,通过调整其混合营养代谢途径,能够提高其生存能力且保存系统脱氮的稳定性;(2)加速 AnAOB 的富集培养过程:通过优化环境(有机物浓度或 C/N)条件,可以加速 AnAOB 的生长和生物质积累,从而缩短反应器启动时间;(3)进一步提高污水处理的脱氮效率和效果:城市污水中易生化降解的有机物质刺激 AnAOB 的混合营养代谢,可以进一步提高去除 NH_4^+ 和 NO_3^- 的比例,提升整体的脱氮效果.

4　总结与展望

AnAOB 的混合营养代谢能力为提高其在脱氮过程中的功能效率和环境适应性提供了重要的科学研究方向和工程应用前景.本文介绍了 AnAOB 的生理生态特性及其自养代谢途径,并总结目前已被证实或预测具备混合营养代谢潜力的 AnAOB 种类.随后,从实验验证和基因组学预测两个角度分析了影响 AnAOB 混合营养代谢能力的因素,代谢关键酶及可能的混合营养代谢路径,探讨了其中的不确定性.在工程应用方面,合理调控混合营养代谢途径能够加速 Anammox 反应器的启动与运行,并增强系统对有机物负荷变化的适应性,从而实现更高效且稳定的脱氮效果.未来研究可重点关注不同 AnAOB 菌种的电子传递机制,内源有机物的代谢,以及碳源利用途径的差异,以深入阐明其代谢特性,为优化 AnAOB 在脱氮系统中的应用提供更多理论支撑.

参考文献：

[1] 韩雪恪,王峥嵘,彭永臻,等.几种重要因素对厌氧氨氧化过程的影响综述 [J]. 中国环境科学, 2023,43(5):2220−2227.
Han X K, Wang Z R, Peng Y Z, et al. A review of several important factors influencing the anammox process [J]. China Environmental Science, 2023,43(5):2220–2227.

[2] Strous M, Kuenen J G, Jetten M S. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999,65(7):3248−3250.

[3] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M, et al. Missing lithotroph identified as new Planctomycete [J]. Nature, 1999,400(6743):446−449.

[4] 潘　超,郑　平,胡宝兰,等.厌氧氨氧化菌内含物——糖原颗粒 [J]. 微生物学报, 2023,63(12):4522−4535.
Pan C, Zheng P, Hu B L, et al. Research progress in glycogen particles in anaerobic ammonium−oxidizing bacteria [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023,63(12):4522−4535.

[5] Adams M, Xie J, Kabore A J, et al. Research advances in anammox granular sludge: A review [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2022,52(5):631−674.

[6] Liu Y, An T, Xie J, et al. The influencing mechanisms and optimization strategies of organics on anammox process: A critical review [J]. Chemical Engineering Journal, 2024,493:152743.

[7] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome [J]. Nature, 2006,440(7085):790−794.

[8] Kartal B, van Niftrik L, Rattray J, et al. *Candidatus* 'Brocadia fulgida': An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008,63(1):46−55.

[9] Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, et al. *Candidatus* "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007,30(1):39−49.

[10] 常尧枫,郭萌蕾,谢军祥,等.厌氧氨氧化脱氮除碳功能菌群结构及代谢途径 [J]. 中国环境科学, 2022,42(3):1138−1145.
Chang Y F, Guo M L, Xie J X, et al. The structure and metabolic pathway of functional bacteria for nitrogen and carbon removal in Anammox [J]. China Environmental Science, 2022,42(3):1138–1145.

[11] Wang X, Yang R, Guo Y, et al. Investigation of COD and COD/N ratio for the dominance of anammox pathway for nitrogen removal via isotope labelling technique and the relevant bacteria [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019,366:606−614.

[12] Kartal B, de Almeida N M, Maalcke W J, et al. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013,37(3):428−461.

[13] Kartal B, Kuypers M M M, Lavik G, et al. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: Nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium [J]. Environmental Microbiology, 2007,9(3):635−642.

[14] 尹雪娇.有机营养型厌氧氨氧化菌氮、有机碳代谢途径及处理生活污水的研究 [D]. 重庆:重庆大学, 2023.
Yin X J. Study on nitrogen and organic carbon metabolism pathways and domestic wastewater treatment by organotrophic anammox bacteria [D]. Chongqing: Chongqing University, 2023.

[15] Feng Y, Zhao Y, Guo Y, et al. Microbial transcript and metabolome analysis uncover discrepant metabolic pathways in autotrophic and mixotrophic anammox consortia [J]. Water Research, 2018,128:402−411.

[16] Mulder A, van de Graaf A A, Robertson L A, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995,16(3):177−183.

[17] van de Graaf A A, Mulder A, de Bruijn P, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995,61(4):1246−1251.

[18] 郑　平,张　蕾.厌氧氨氧化菌的特性与分类 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009,35(5):473−481.
Zheng P, Zhang L. Characterization and classification of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2009,35(5):473−481.

[19] Yang Y, Lu Z, Azari M, et al. Discovery of a new genus of anaerobic

ammonium oxidizing bacteria with a mechanism for oxygen tolerance [J]. Water Research, 2022:119165.

[20] Suarez C, Dalcin‐Martins P, Jetten M S M, et al. Metagenomic evidence of a novel family of anammox bacteria in a subsea environment [J]. Environmental Microbiology, 2022,24(5):2348‐2360.

[21] Zhao R, Biddle J F, Jørgensen S L. Introducing Candidatus Bathyanammoxibiaceae, a family of bacteria with the anammox potential present in both marine and terrestrial environments [J]. ISME Communications, 2022,2(1):42.

[22] Zhao R, Babbin A R, Roerdink D L, et al. Nitrite accumulation and anammox bacterial niche partitioning in Arctic Mid‐Ocean Ridge sediments [J]. ISME communications, 2023,3(1):26.

[23] Hamersley M R, Lavik G, Woebken D, et al. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone [J]. Limnology and Oceanography, 2007,52(3):923‐933.

[24] van der Star W R L, Miclea A I, van Dongen U G J M, et al. The membrane bioreactor: A novel tool to grow anammox bacteria as free cells [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008,101(2):286‐294.

[25] 贾方旭,彭永臻,王衫允,等.厌氧氨氧化菌细胞的超微结构及功能 [J]. 应用与环境生物学报, 2014,20(5):944‐954.
Jia F X, Peng Y Z, Wang S Y, et al. Ultrastructure and function of an‐aerobic ammonium oxidation bacteria cells [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014,20(5):944‐954.

[26] Khramenkov S V, Kozlov M N, Krevbona M V, et al. A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented residue [J]. Mikrobiologiia, 2013,82(5):625‐634.

[27] van de Graaf A A, de Bruijn P, Robertson L A, et al. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor [J]. Microbiology, 1997,143(7):2415‐2421.

[28] Hu Z, Wessels H J C T, van Alen T, et al. Nitric oxide‐dependent anaerobic ammonium oxidation [J]. Nature Communications, 2019, 10(1):1244.

[29] Schouten S, Strous M, Kuypers M M M, et al. Stable carbon isotopic fractionations associated with inorganic carbon fixation by anaerobic ammonium‐oxidizing bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004,70(6):3785‐3788.

[30] Sun J, Feng Y, Zheng R, et al. Potential growth of anammox bacteria under aerobic conditions [J]. Environmental Science & Technology, 2024,58(41):18244‐18254.

[31] 赵 硕,汪 超,杨 蒙,等.硝酸盐异化还原为铵耦合厌氧氨氧化处理含氮废水 [J]. 中国环境科学, 2024,44(8):4389‐4399.
Zhao S, Wang C, Yang M, et al. Treatment of nitrogen‐containing wastewater by dissimilatory nitrate reduction to ammonium coupled with anaerobic ammonium oxidation [J]. China Environmental Science, 2024,44(8):4389–4399.

[32] Zhang T, Wei N, Wu G. Autotrophic nitrogen removal and potential microbial interactions in anammox systems with different ammonia and organic carbon concentrations [J]. Journal of Water Process Engineering, 2020,37:101493.

[33] Zhang T, Yin Q, Shi Y, et al. Microbial physiology and interactions in anammox systems with the intermittent addition of organic carbons [J]. Bioresource Technology, 2021,319:124226.

[34] Russ L, Harhangi H R, Schellekens J, et al. Genome analysis and heterologous expression of acetate‐activating enzymes in the anammox bacterium Kuenenia stuttgartiensis [J]. Archives of Microbiology, 2012,194(11):943‐948.

[35] Shu D, He Y, Yue H, et al. Metagenomic insights into the effects of volatile fatty acids on microbial community structures and functional genes in organotrophic anammox process [J]. Bioresource Technology, 2015,196:621‐633.

[36] Park H, Brotto A C, van Loosdrecht M C M, et al. Discovery and metagenomic analysis of an anammox bacterial enrichment related to *Candidatus* “Brocadia caroliniensis” in a full‐scale glycerol‐fed nitritation‐denitritation separate centrate treatment process [J]. Water Research, 2017,111:265‐273.

[37] Narita Y, Zhang L, Kimura Z, et al. Enrichment and physiological characterization of an anaerobic ammonium‐oxidizing bacterium ‘*Candidatus* Brocadia sapporoensis’ [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2017,40(7):448‐457.

[38] Araujo J C, Campos A C, Correa M M, et al. Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge [J]. Water Science and Technology, 2011,64(7):1428‐1434.

[39] Jetten M S M, Wagner M, Fuerst J, et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (‘anammox’) process [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001,12(3):283‐288.

[40] Liu S, Yang F, Gong Z, et al. Application of anaerobic ammonium‐oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(15):6817‐6825.

[41] Ali M, Oshiki M, Awata T, et al. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium ‘*Candidatus* Jettenia caeni’ [J]. Environmental Microbiology, 2015,17(6):2172‐2189.

[42] 黄晓丽.厌氧氨氧化菌的富集培养及优势菌 Jettenia asiatica 有机营养特性研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2016.
Huang X L. Study on the anammox bacteria enrichment and organotrophic characteristics of predominant bacteria Jettenia asiatica [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.

[43] Botchkova E A, Litti Y V, Novikov A A, et al. Description of “*Candidatus* Jettenia ecosi” sp. nov., a new species of anammox bacteria [J]. Microbiology, 2018,87(6):766‐776.

[44] Nikolaev Y A, Kozlov M N, Kevbrina M V, et al. *Candidatus* “Jettenia moscovienalis” sp. nov., a new species of bacteria carrying out anaerobic ammonium oxidation[J]. Microbiology, 2015,84(2):256‐262.

[45] van de Vossenberg J, Woebken D, Maalcke W J, et al. The metagenome of the marine anammox bacterium “*Candidatus* Scalindua profunda” illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium [J]. Environmental Microbiology, 2013,15(5):1275‐1289.

[46] Schmid M, Walsh K, Webb R, et al. *Candidatus* “Scalindua brodae”, sp. nov., *Candidatus* “Scalindua wagneri”, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003,26(4):529‐538.

[47] Kuypers M M M, Sliekers A O, Lavik G, et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea [J]. Nature,

2003,422(6932):608−611.

[48] Brandsma J, van de Vossenberg J, Risgaard−Petersen N, et al. A multi−proxy study of anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden [J]. Environmental Microbiology Reports, 2011,3(3):360−366.

[49] Woebken D, Lam P, Kuypers M M M, et al. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus* Scalindua phylotype in marine oxygen minimum zones [J]. Environmental Microbiology, 2008,10(11):3106−3119.

[50] Speth D R, Lagkouvardos I, Wang Y, et al. Draft genome of Scalindua rubra, obtained from the interface above the discovery deep brine in the Red Sea, sheds light on potential salt adaptation strategies in anammox bacteria [J]. Microbial Ecology, 2017,74(1):1−5.

[51] Ahmed S, Shakeela Q, Niaz I K N. Molecular detection of *Candidatus* Scalindua flavia, study of anammox bacterial community structure, composition in the sediments of the East China Sea and the Yellow Sea [J]. Indian Journal of Geo−Marine Sciences, 2017,46(1):33−47.

[52] Dang H, Zhou H, Zhang Z, et al. Molecular detection of *Candidatus* Scalindua pacifica and environmental responses of sediment anammox bacterial community in the Bohai Sea, China [J]. PloS One, 2013, 8(4):e61330.

[53] Hong Y G, Li M, Cao H, et al. Residence of habitat−specific anammox bacteria in the deep−sea subsurface sediments of the South China Sea: Analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters [J]. Microbial Ecology, 2011,62(1):36−47.

[54] Fuchsman C A, Staley J T, Oakley B B, et al. Free−living and aggregate−associated Planctomycetes in the Black Sea [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012,80(2):402−416.

[55] Li H, Chen S, Mu B Z, et al. Molecular detection of anaerobic ammonium−oxidizing (Anammox) bacteria in high−temperature petroleum reservoirs [J]. Microbial Ecology, 2010,60(4):771−783.

[56] Yin X, Rahaman M H, Liu W, et al. Comparison of nitrogen and VFA removal pathways in autotrophic and organotrophic anammox reactors [J]. Environmental Research, 2021,197:111065.

[57] Winkler M K H, Kleerebezem R, van Loosdrecht M C M. Integration of anammox into the aerobic granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures [J]. Water Research, 2012,46(1):136−144.

[58] Liang Y, Li D, Zhang X, et al. Nitrate removal by organotrophic anaerobic ammonium oxidizing bacteria with C2/C3 fatty acid in upflow anaerobic sludge blanket reactors [J]. Bioresource Technology, 2015,193:408−414.

[59] Kallistova A Y, Nikolaev Y A, Mardanov A V, et al. Investigation of formation and development of anammox biofilms by light, epifluorescence, and electron microscopy [J]. Microbiology, 2020,89 (6):708−719.

[60] Xiao R, Ni B J, Liu S, et al. Impacts of organics on the microbial ecology of wastewater anammox processes: Recent advances and meta−analysis [J]. Water Research, 2021,191:116817.

[61] Winkler M K H, Yang J, Kleerebezem R, et al. Nitrate reduction by organotrophic Anammox bacteria in a nitritation/anammox granular sludge and a moving bed biofilm reactor [J]. Bioresource Technology, 2012,114:217−223.

[62] He Y, Mao H, Makinia J, et al. Impact of soluble organic matter and particulate organic matter on anammox system: Performance, microbial community and N_2O production [J]. Journal of Environmental Sciences, 2023,124:146−155.

[63] van de Vossenberg J, Rattray J E, Geerts W, et al. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production [J]. Environmental Microbiology, 2008,10(11): 3120−3129.

[64] Huang X L, Gao D W, Tao Y, et al. C2/C3 fatty acid stress on anammox consortia dominated by *Candidatus* Jettenia asiatica [J]. Chemical Engineering Journal, 2014,253:402−407.

[65] Zhang S, Li C, Lv H, et al. Anammox activity improved significantly by the cross−fed NO from ammonia−oxidizing bacteria and denitrifying bacteria to anammox bacteria [J]. Water Research, 2024, 249:120986.

[66] 贾仲君.稳定性同位素核酸探针技术 DNA−SIP 原理与应用 [J]. 微生物学报, 2011,51(12):1585−1594.
Jia Z J. Principle and application of DNA−based stable isotope probing: A review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011,51(12):1585−1594.

[67] Xiao R, Zhu W, Zheng Y, et al. Active assimilators of soluble microbial products produced by wastewater anammox bacteria and their roles revealed by DNA−SIP coupled to metagenomics [J]. Environment International, 2022,164:107265.

[68] 房安然.厌氧氨氧化快速启动及其代谢途径重构与机制 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2022.
Fang A R. Mechanism of rapid start−up and metabolic pathway reconstruction of anammox [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2022.

[69] Baysoy A, Bai Z, Satija R, et al. The technological landscape and applications of single−cell multi−omics [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2023,24(10):695−713.

[70] 沈燚昀,齐谢敏,宋沁馨,等.单细胞蛋白定量检测方法研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2015,46(5):521−531.
Shen Y Y, Qi X M, Song Q X, et al. Research advances in quantitative detection of single cell protein [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2015,46(5):521−531.

[71] 郭晗玥,王礼岳,阮　杨,等.单细胞分选与测序技术在环境微生物领域的应用及前景 [J]. 南京农业大学学报, 2024,47(3):415−423.
Guo H Y, Wang L Y, Ruan Y, et al. Application and prospect of single−cell isolation and sequencing technology in environmental microbiology [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024,47 (3):415−423.

[72] Chi K R. Singled out for sequencing [J]. Nature Methods, 2014, 11(1):13−17.

[73] Lee K S, Palatinszky M, Pereira F C, et al. An automated Raman−based platform for the sorting of live cells by functional properties [J]. Nature Microbiology, 2019,4(6):1035−1048.

[74] Schmid M C, Maas B, Dapena A, et al. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium−oxidizing (anammox) bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005,71(4):1677−1684.

[75] Tao Y, Huang X, Gao D, et al. NanoSIMS reveals unusual enrichment of acetate and propionate by an anammox consortium dominated by Jettenia asiatica [J]. Water Research, 2019,159:223−232.

[76] 彭 博.乙酸和丙酸对厌氧氨氧化系统脱氮效能影响及微生物学机制 [D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2023.
Peng B. Impact of acetate and propionate acids on the nitrogen removal performance of anammox system and microbiological mechanisms [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2023.

[77] Wang C, Qiao S, Bi Z, et al. Nitrate removal by anammox biomass with intracellular carbon source as electron donors via DNRA pathway [J]. Environmental Research, 2021,200:111390.

[78] Risgaard-Petersen N, Nielsen L P, Rysgaard S, et al. Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification coexist [J]. Limnology and Oceanography: Methods, 2003,1(1):63-73.

[79] Wang C, He T, Zhang M, et al. Review of the mechanisms involved in dissimilatory nitrate reduction to ammonium and the efficacies of these mechanisms in the environment [J]. Environmental Pollution, 2024,345:123480.

[80] Castro-Barros C M, Jia M, van Loosdrecht M C M, et al. Evaluating the potential for dissimilatory nitrate reduction by anammox bacteria for municipal wastewater treatment [J]. Bioresource Technology, 2017,233:363-372.

[81] Wang W, Wang T, Liu Q, et al. Biochar-mediated DNRA pathway of anammox bacteria under varying COD/N ratios [J]. Water Research, 2022,212:118100.

[82] Gori F, Tringe S G, Kartal B, et al. The metagenomic basis of anammox metabolism in *Candidatus* 'Brocadia fulgida' [J]. Biochemical Society Transactions, 2011,39(6):1799-1804.

[83] Shaw D R, Ali M, Katuri K P, et al. Extracellular electron transfer-dependent anaerobic oxidation of ammonium by anammox bacteria [J]. Nature Communications, 2020,11(1):2058.

[84] Guo M, Lu X, Qiao S. Nitrate removal by anammox bacteria utilizing photoexcited electrons via inward extracellular electron transfer channel [J]. Water Research, 2024,250:121059.

[85] Okabe S, Shafdar A A, Kobayashi K, et al. Glycogen metabolism of the anammox bacterium "*Candidatus* Brocadia sinica"[J]. ISME Journal, 2021,15:1287–1301.

[86] van Niftrik L, Geerts W J C, van Donselaar E G, et al. Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome *c* proteins [J]. Journal of Bacteriology, 2008,190(2): 708-717.

[87] Wang C, Qiao S. Electron transfer mechanism of intracellular carbon-dependent DNRA inside anammox bacteria [J]. Water Research, 2023,244:120443.

作者简介: 张慕琦(2000-),女,湖南邵阳人,重庆大学硕士研究生,研究方向为环境微生物技术.发表论文 2 篇.mqz2000.1010@gmail.com.