中国科学: 地球科学 2016 年 第 46 卷 第 2 期: 199 ~ 206
SCIENTIA SINICA Terrae earth.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

进 展

海洋异养细菌硝酸盐同化研究进展

姜学霞[①②], 焦念志[①②*]

① 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361102;
② 厦门大学海洋微型生物与地球圈层研究所, 厦门 361102
* 通讯作者, E-mail: jiao@xmu.edu.cn

收稿日期: 2015-07-02; 接受日期: 2015-09-15; 网络版发表日期: 2016-02-01
国家重点基础研究发展计划项目(编号: 2013CB955700)资助

摘要 硝酸盐同化是指把硝酸盐还原分解并最终合成自身所需的有机氮的过程. 最近基于分子生物学的手段研究发现异养细菌的硝酸盐同化基因(*nasA*)普遍存在于海洋水体和沉积物中. 比较基因组学揭示了硝酸盐同化系统的基因排列存在种间差别, 基因调节系统具有多样性. 对这类微生物及其作用过程进行系统的分析和总结不但有助于充分认识硝酸盐同化过程及其生态意义, 更能深入了解异养细菌在氮循环过程中的重要作用. 本文结合作者的工作, 集中总结和讨论异养细菌同化硝酸盐有关的研究进展, 认识异养细菌硝酸还原作用的具体过程及其生态意义, 对未来该领域的研究起到引导作用.

关键词 硝酸盐同化, *nasA*基因, 异养细菌, 分子生态学

1 引言

海洋异养细菌具有很高的丰度、多样性高且功能多样, 在海洋生态系统生源要素的循环中扮演着极为重要的角色(Cho和Azam, 1988). 氮是生物体的重要组成元素之一, 它的生物地球化学循环过程, 对于海洋生态系统的功能至关重要. 氮的转化主要是由微生物的代谢来驱动的, 包括由微生物调节的固氮、硝化、反硝化和同化等多种过程. 硝酸盐是氮转化过程的中间环节的产物, 海洋异养细菌不仅可以通过矿化作用分解有机物释放无机氮, 同时也吸收无机氮转化为自身有机氮. 硝态氮可以作为生物反应的电子受体, 通过反硝化作用(Denitrification)和厌氧铵氧化途径(Anaerobic ammonium oxidation, anammox)把氮从海洋生态系统去除或丢失. 近年来研究发现厌氧铵氧化和经典反硝化作用会在不同的时间或地点占主导(Ward等, 2009), 反硝化作用和硝酸盐异化还原成铵(Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)是硝酸盐异化途径. 硝酸盐异化还原成铵过程可能为厌氧铵氧化作用提供反应底物铵(Lam等, 2009). 最新研究发现, 环境对氮的转化产物起着决定性作用, 特别是碳氮比, 它决定着硝酸还原最终的产物(Kraft等, 2014). 因此, 硝酸还原是氮循环过程中最复杂、最受环境影响的过程.

传统观点认为无机氮被浮游植物吸收, 细菌通过降解作用释放溶解有机氮, 异养细菌对硝酸盐的

中文引用格式: 姜学霞, 焦念志. 2016. 海洋异养细菌硝酸盐同化研究进展. 中国科学: 地球科学, 46: 199–206, doi: 10.1360/N072015-00356
英文引用格式: Jiang X X, Jiao N Z. 2016. Nitrate assimilation by marine heterotrophic bacteria. Sci China Earth Sci, 59: 477–483, doi: 10.1007/s11430-015-5212-5

© 2016《中国科学》杂志社

吸收作用使得氮的转化过程更加复杂, 然而, 硝酸盐同化过程的研究进展缓慢. 研究表明异养细菌选择性的吸收不同形式的无机氮与海洋环境因子密切相关(Kirchman等, 1994), 海洋异养细菌可以同化吸收硝酸盐的研究越来越引起国内外科学家的重视(Kirchman和Wheeler, 1998). 当下, 农业施肥等人类活动严重影响了全球生态系统中氮的平衡(Fowler等, 2013), 工业污染导致近岸生态系统的富营养化, 产生了一系列的生态问题, 如赤潮频发、海水大面积缺氧等(Qu和Kroeze, 2011). 近岸生态系统中营养盐的持续增加会降低C/N比值, 促进异养细菌对溶解有机碳(DOC)的降解, 呼吸作用增强, 加快二氧化碳释放, 从而使海水中的有机碳被重新释放到大气, 微型生物储碳作用降低(Jiao等, 2010; 焦念志, 2012). 因此研究海洋异养细菌硝酸盐的吸收同化具有重要的生态学意义.

2 海洋异养细菌对硝酸盐吸收同化的地球化学研究

异养细菌吸收硝酸盐的研究始于20世纪60年代, 早在1967年, Dugdale等人在大西洋西北海域和北太平洋近岸海域的研究发现异养细菌对硝酸盐的平均吸收值为8.3%~39.5%; 在亚北极太平洋海区通过比较异养细菌对不同形式的氮源(铵氮, 硝态氮和溶解自由氨基酸DFAA)的吸收情况, 证实了硝态氮是异养细菌吸收的重要氮源之一(Kirchman和Wheeler, 1998). 从此, 异养细菌可以同化吸收硝酸盐的功能被逐渐认识到. 在海洋生态系统中, 异养细菌与浮游植物竞争吸收利用硝酸盐, 所产生的新生产力对氮元素的收支估算具有重要影响(Eppley等, 1977).

随着研究的深入, ^{15}N标记技术和粒径分离技术的应用, 科学家对典型的海洋环境(河口、海湾及近岸到大洋)中异养细菌对硝酸盐同化吸收的能力进行了调查(表1). 研究发现在河口和海湾, 特别是深层海水中异养细菌对硝酸盐的吸收所占比例更大. 在硝态氮丰富的泰晤士河口内部, 异养细菌对硝态氮吸收较多, 而在河口外部, 异养细菌对氨基酸吸收较多(Middelburg和Nieuwenhuize, 2000). 在巴伦支海到陆源海冰带的研究发现异养细菌可以吸收总硝态氮的16%~40%, 各个站位的80 m层海水中异养细菌吸收的硝态氮比例最高(Allen等, 2002). 在水体中, 研究发现深层水比表层水中硝酸盐吸收比例大. 在大西洋中部海湾, 底层水中异养细菌的吸收能力是表层水的2.5倍(Bradley等, 2010). 在硝酸盐丰富的海水中, 异养细菌吸收的比例呈增加趋势, 而细菌吸收硝态氮转化为的新生产力是海洋生产力的重要组成部分. 在北大西洋海区的研究发现细菌对DOC的周转率很高, 细菌的生物量和溶解氮(如硝态氮)紧密相关(Kirchman等, 1991). 异养细菌吸收硝酸盐会对元素比产生一定的影响, Kirchman等(1994)的研究发现无机氮的吸收需要吸收DOC来平衡, 认为海洋异养细菌在氮和碳的生物地球化学循环过程中起着更重要的作用, 这对新生产力的估计产生了影响. 异养细菌吸收硝态氮转化的生产力部分在新生产力评估时不可忽视, 异养细菌对硝酸盐的同化吸收作用可能对全球海洋生态系统中氮和碳的转化和循环具有重要影响.

3 异养细菌同化硝酸还原系统的蛋白和基因水平研究

已有研究表明异养细菌具有三种不同的硝酸盐还原蛋白系统(Solomonson和Barber, 1990; Richardson

表 1 各典型海洋环境中异养细菌吸收硝酸盐的研究总结

环境	海区	硝酸盐同化吸收比例(%)	参考文献
近岸、大洋	Georges Bank	27	Harrison和Wood, 1988
	North Atlantic	4~14	Kirchman等, 1994
	Barents Sea	16~40	Allen等, 2002
河口	Thames estuary	60~90	Middelburg和Nieuwenhuize, 2000
	Scheldt estuary	<48	Andersson等, 2006
海湾	Southern California Bight	9	Bronk和Ward, 2005
	Northern Baffin Bay	25	Fouilland等, 2007
	Mid-Atlantic Bight	20~49 36~93	Bradley等, 2010

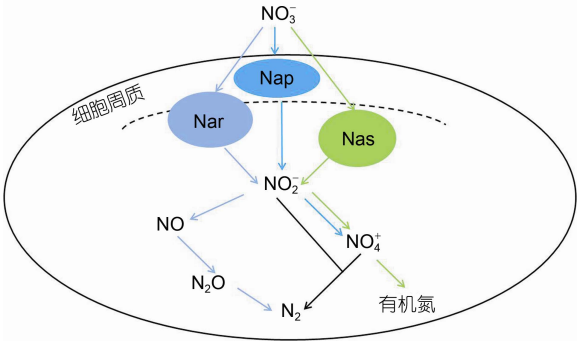


图 1　异养细菌的硝酸还原转化途径

绿色: 硝酸盐同化; 蓝色: 硝酸盐异化成铵; 浅蓝: 反硝化作用

等, 2001; Gonzalez等, 2006)(图1), 包括呼吸性硝酸还原酶(Nar), 间质硝酸还原酶(Nap)和同化硝酸还原酶(Nas). 硝酸还原酶都有Mo元素、钼蝶呤鸟嘌呤二核苷酸(Mo-bis-MGD)和至少一个[4Fe-4S]作为辅因子(Hille, 1996), 属于二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide DMSO)还原酶家族. 分子遗传学表明同化硝酸还原酶Nas在系统进化关系上与间质硝酸还原酶Naps蛋白的关系更近(Stolz和Basu, 2002). 异养细菌同化吸收硝酸盐需要同化硝酸还原酶(Nas), 硝酸盐这种高氧化态的无机氮被同化硝酸盐还原系统还原为氨氮, 并通过谷氨酸脱氢酶和谷氨酰氨合成酶的作用合成到各种含氮物质的碳骨架中去. 同化硝酸还原酶的特征为我们了解同化硝酸还原过程的分子基础提供了信息. 异养细菌的同化硝酸还原酶至少分为两种: 以铁氧化还原蛋白为还原剂的同化硝酸还原酶通常以单体形式存在, 而依靠NADH为还原剂的同化硝酸还原酶以异二聚体形式存在(Moreno-Vivian等, 1999). 异养细菌的Nas蛋白与其他原核生物的Nas蛋白结构不同, 古菌*Haloferax mediterranei*中的Nas蛋白是一个含有105和50 kDa两个亚基的二聚体, 铁氧化还原蛋白作为还原剂而不是NAD(P)H, 与细菌的Nas蛋白相同的是其活性可以被硝酸盐诱导, 被铵抑制(Martínez-Espinosa等, 2001).

细菌硝酸盐同化系统的功能基因串联排列在一起, 构成比较大的基因簇, 以协同的形式完成对硝酸盐的吸收和同化功能(Luque-Almagro等, 2011). 随着基因组测序技术的发展, 发现了同化硝酸还原酶系统广泛存在于各种变形细菌的基因组中, 如新鉴定的一株硒还原细菌*Clostridium* sp. BXM的基因组中具有硝酸盐同化基因*nasA*, 在实验室培养条件下, 可以同化吸收硝酸盐(Bao等, 2012). Noriega等(2005)通过基因干扰技术确认了在*Pseudomonas aeruginosa*中, *nasA*基因编码同化硝酸还原酶的催化亚基. 比较基因组学揭示出异养细菌的同化硝酸还原系统的基因簇存在差异, 主要有两点: 不同种属的细菌间存在功能基因排列的不同, 以及硝酸盐同化基因系统调控基因间的差别(图2). Alpha变形菌*Jannaschia sp.* CCS1和Gamma变形菌*Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14的调节因子不同, 它们与Beta变形菌*Cupriavidus metallidurans* CH34的硝酸盐同化基因又有差别. 遗传证据及对邻接DNA位点的序列分析揭示了*Pseudomonas putida* KT2442编码同化硝酸盐蛋白的*nasB*基因与其他相关基因不在同一个操纵子上, *nasB*的转录表达受到氨的抑制(Eberl等, 2000). 异养细菌的硝酸盐同化基因表达和调控系统与自养的蓝细菌也不同, 编码蓝细菌同化硝酸还原酶的*narB*基因与编码转运蛋白的*nrtABCD*基因和亚硝酸盐还原的*nirA*基因一起转录. 古菌*Haloferax mediterranei* 基因组信息揭示了硝酸盐同化吸收硝酸盐蛋白的操纵子存在4个开放阅读框*nasA*, *nasB*, *nasC*和*nasD*(Lledo等, 2005), *nasR*基因定位在*nasFEDCBA*操纵子的上游, 编码转录反终止因子, 受到硝酸盐和亚硝酸盐的

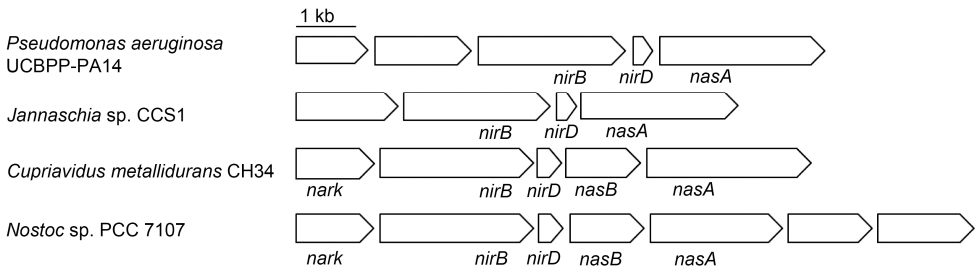


图 2　细菌硝酸盐同化系统基因排列顺序

正调节. 硝酸盐同化过程涉及的步骤多, 从硝酸盐还原为亚硝酸盐, 亚硝酸盐被还原成氨再被合成到有机氮中, 同化硝酸还原酶基因表达调控的每一个过程中都由基因系统调节和控制.

4 海洋异养细菌同化硝酸盐的分子生态学研究进展

异养细菌对硝酸盐的同化吸收会对全球的碳氮循环产生重要影响, 研究发现海洋细菌同化硝酸盐的作用可能比传统认识的更广泛. 利用粒径分离技术在亚北极太平洋海区的研究发现硝态氮在支持异养细菌生物量的重要氮源之一(Kirchman和Wheeler, 1998). 由于技术水平的限制, 传统的研究方法(^{15}N标记技术和粒径分离技术)还不能确定同化吸收硝酸盐的异养细菌类群.

随着分子生态学技术的发展, 认识功能细菌类群的生态功能成为可能. 对环境中的硝酸盐同化细菌(Nitrate-assimilating bacteria, NAB)的分子生态学研究始于2001年, Allen等人(2001)首先设计了针对于异养细菌同化硝酸盐基因(*nasA*)的引物, 并对南大西洋海湾、巴伦支海以及北太平洋环的硝酸盐同化细菌功能类群的多样性进行了调查, 发现含有*nasA*基因的异养细菌在海洋中分布非常广泛. 后来, 通过实时荧光定量PCR技术对*nasA*基因的丰度进行了定量研究, 认为*Marinobacter*类群的丰度与硝酸盐关系非常密切(Allen等, 2005). 该项技术也应用到南海北部的调查研究中, 发现从近岸到外海的环境梯度上硝酸盐同化细菌的丰度在近岸较高(Cai和Jiao, 2008), 这些研究结果暗示着在硝酸盐丰富的海区, 如近岸生态系统, 硝酸盐同化细菌功能类群可能会在近岸生态系统的氮循环中发挥着重要的作用.

最近, ^{15}N标记的DNA稳定同位素检测技术(^{15}N-based DNA stable isotope probing)用于佛罗里达陆架海域的研究中, 该实验证明*Thalassobacter*和*Alteromonadales*两大类群是同化吸收硝态氮的主要异养细菌类群(Wawrik等, 2012). 我们最新的研究发现在全球典型海洋环境中, 硝酸盐同化细菌的分布模式具有区域性特点, 垂直梯度上, *nasA*基因多样性指数(Shannon)揭示了在东海陆架底层(90 m)和南海及印度洋中层海水(500~800 m)的NAB群落组成尤其丰富(图3), 我们推测受到真光层浮游植物氮源利用的影响, 硝酸盐同化细菌的分布海区更广泛, 可以分布到整个水体, 这与硝酸盐异化过程不同, 硝酸盐同化还原过程不受氧的限制(Gonzalez等, 2006), 而硝酸盐被异化还原成氮气或者铵的过程主要发生在低氧或缺氧的环境中, 利用硝酸盐异化途径的标记基因(*narG*和*napA*)的分子生态学研究主要集中在土壤和沉积物中(Nogales等, 2002), 硝酸盐同化细菌可以分布到任何水层, 其高多样性、广分布的特点暗示着该功能类群可能对全球的氮循环具有重要影响.

5 影响海洋异养细菌硝酸盐同化的主要环境因子

环境因子对细菌的硝酸还原过程及终产物起着决定性的作用(Kraft等, 2014). 同样, 海洋异养细菌同化硝酸盐的过程也会受到外界生物化学因子以及自身的生理状态需求的重要影响.

首先, 氮源种类(如铵盐, 尿素, 亚硝酸盐等)会影响异养细菌对硝酸盐的吸收. (1) 铵盐的影响. 最早的研究认为各种粒径的浮游生物更偏向于吸收铵盐, 而不是硝态氮(Probyn, 1985), 在真光层海水中, 异养细菌可以吸收利用铵盐作为氮源(Wheeler和Kirchman, 1986), 铵盐可以支持异养细菌35%~60%的氮需求(Tupas等, 1994). 而在北大西洋海区的研究表明, 尽管氨氮和硝态氮都支持了异养细菌的氮源需求, 而氨氮支持的细菌生产力要高于硝态氮(Kirchman等, 1994). 同样, 在香港近岸海域的研究

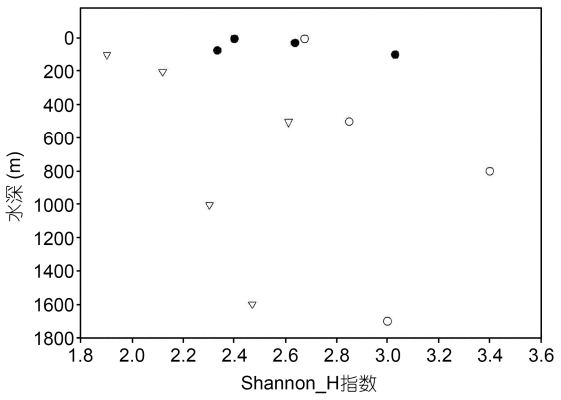


图 3 中国东海(圆点)、南海(圆圈)和印度洋(三角形)各水层样品 *nasA* 基因指数(Shannon_H)

也认为, 氨氮和有机氮是异养细菌主要的氮源, 大部分的硝酸盐可能被转运到近岸和深海陆架(Yuan等, 2011). 从能量消耗的角度考虑, 硝态氮可能不是优先选择的氮源, 因为硝酸盐的吸收需要较多的能量, 铵盐可能比硝酸盐优先吸收. 但是, 后来实验证明, 这个结论并不通用, 铵盐和硝酸盐可以同时被细菌吸收, 在南极陆架海域的研究发现在部分站位, 氨氮对硝态氮的吸收没有表现出明显的抑制作用(Cochlan和Bronk, 2003), 可见, 异养细菌对硝酸盐的同化吸收还受到其他环境因子的影响. (2) 尿素的影响. 研究发现异养细菌在某些环境下会优先吸收尿素作为氮源. 在挪威西部海域开展的氮磷添加实验发现细菌对尿素的吸收最多(Sanderson等, 2008), 在大西洋中部海湾陆架的研究结果也显示细菌与浮游植物竞争利用尿素(Bradley等, 2010). 由此可见, 异养细菌对硝酸盐的吸收受到其他可利用的氮源(如氨氮、尿素)的影响, 海洋细菌对氮源的吸收利用具有选择性和偏好性.

在海洋生态系统中, 其他生物对硝酸盐的竞争利用也会影响异养细菌对硝酸盐的吸收. 细菌和浮游植物在氮源的利用上存在竞争关系, 浮游植物的竞争利用是影响异养细菌硝酸盐吸收的一个重要因素. 在大部分情况下, 浮游植物可能优先吸收硝酸盐作为支持自身的氮源, 异养细菌可能在硝酸盐充足的情况下更能表现出硝酸盐同化的潜能, 因为浮游植物的大量繁殖, 积累的DOC会成为异养细菌的碳源, 可以同化硝酸盐作为氮源的功能细菌类群会成为优势类群, 进而对环境中的碳氮转化起到重要的调节作用. 在麦奈海峡近岸的赤潮发生海域, 细菌和氨氮硝态氮吸收的关系紧密相关, 研究认为细菌和浮游植物对无机氮的竞争吸收有利于赤潮的终止(Rodrigues和Williams, 2002). 最新研究发现在东海赤潮频发海区, 硝酸盐同化细菌的群落结构在赤潮前后发生了变化(图4), *Roseobacter*类群变化最为显著(Jiang等, 2015), 这一结果与在北海南部开展的调查结果一致, 高通量测序数据表明*Roseobacter*类群是浮游植物引发的赤潮过程中丰度和活性变化最显著的类群(Wemheuer等, 2014), 这些研究揭示了异养细菌对硝酸盐的同化吸收在赤潮的消亡过程中起到重要作用.

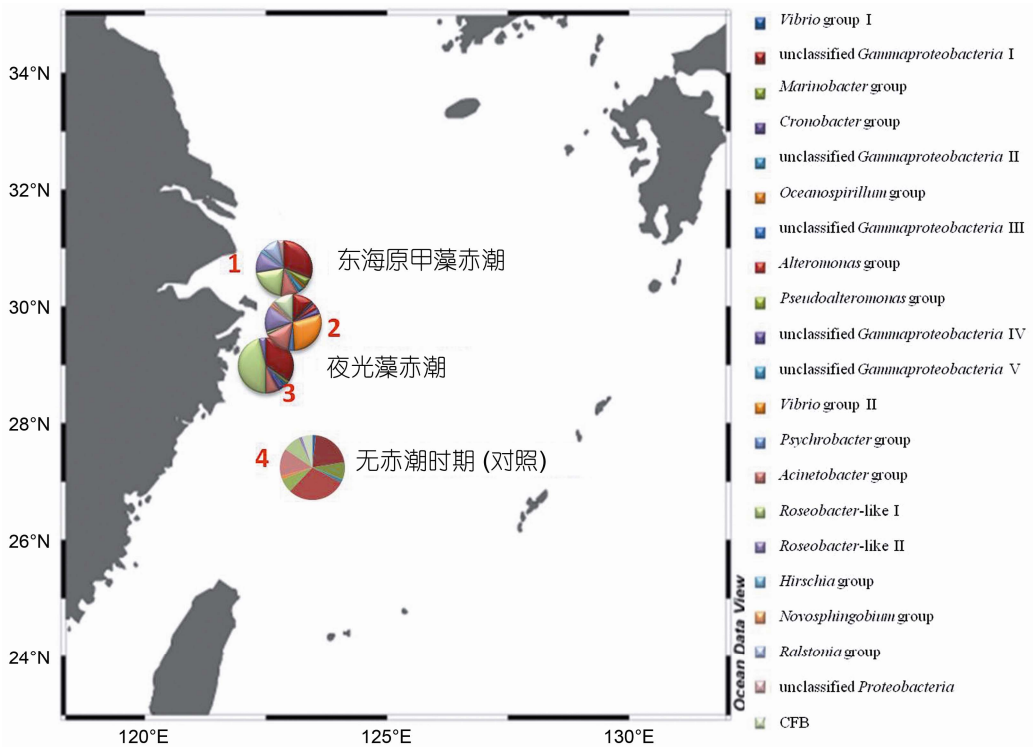


图 4　不同优势种赤潮发生时的 NAB 群落组成比较(1 和 4 为相同站位)

影响异养细菌同化吸收硝酸盐的其他环境因子, 如盐度、温度和碳源等. 在斯凯尔特河河口的研究结果揭示了硝酸盐的吸收和盐度季节紧密相关(Andersson等, 2006). 在中国南海珠江口盐度梯度上, 通过功能基因*nasA*揭示出硝酸盐同化细菌的多样性和丰度受到盐度和营养盐的共同影响(Cai和Jiao, 2008). 另外, 硝酸盐的吸收与碳源的利用密切相关. 研究发现碳源提供的能量是调节农业土壤中真菌的硝酸还原酶基因表达的主要环境因子(Gorfer等, 2011).

由于理化因子和生物因素的影响, 硝酸盐作为异养细菌的氮源之一在海洋生态系统中发挥着重要的作用, 细菌同化吸收硝酸盐在支持细菌生产力方面的作用不容忽视. 硝酸盐还原系统的调控非常复杂, 比较基因组数据揭示出异养细菌硝酸盐同化基因的调节途径存在种类间的差别(Luque-Almagro等, 2011). 异养细菌硝酸盐同化的调节机制复杂且多样, 对该领域的深入研究, 有助于充分认识异养细菌在海洋生态系统中的作用.

6 海洋异养细菌同化硝酸盐研究中存在的问题及未来研究展望

本文对海洋异养细菌同化吸收硝酸盐的研究进行了系统的总结, 这些研究认为硝酸盐同化作用在海区间存在较大差异. 利用分子手段, 基于*nasA*基因对硝酸盐同化细菌在各种典型海洋环境下的分布模式进行了调查, 发现硝酸盐是影响赤潮过程中NAB群落组成变化的重要环境因素, 而盐度对中国南海、东海和印度洋海洋水体NAB的分布起着最主要的调节作用(Jiang等, 2015). 然而, 目前硝酸盐同化细菌在海洋生态系统中的丰度数据有限, 有限的数据得出的结果显示在不同海区硝酸盐同化细菌的丰度差异较大, 最主要的原因可能与研究方法、调查的海区有限等因素有关(Stepanauskas和Sieracki, 2007; Cai和Jiao, 2008). 硝酸盐同化细菌在海洋氮循环中所发挥的重要功能还未被认识清楚. 以后对该领域的研究应重点考虑对硝酸盐同化细菌的定量研究, 从而揭示该功能类群对海洋氮循环的重要贡献. 另一方面, 目前的数据缺乏异养细菌硝酸盐同化基因的表达研究, 基于DNA水平的研究只能揭示出具有潜在同化硝酸盐能力的异养细菌, 却不能真实反映海洋环境中具有同化功能的细菌类群, 硝酸盐同化基因的表达研究有助于充分认识异养细菌在海洋氮循环中的作用.

随着分子生态学技术的进步, 特别是组学时代的到来, 微生物参与的海洋氮循环过程取得了突飞猛进的进步, 使我们逐渐深入认识到了微生物对海洋氮循环的重要影响. 在当前富营养化加剧、赤潮爆发危害渔业等一系列海洋环境问题的情况下, 探讨异养细菌对硝酸盐的同化作用对生态问题的解决极其重要. 异养细菌的硝酸盐还原过程具有多样化的特点, 未来在硝酸盐同化细菌的基因数量、基因的表达、调控机制及硝酸盐吸收速率等方面的研究成果有助于我们理解海洋生态系统中氮的转化和平衡, 这些研究为我们解决环境问题提供了理论基础, 对开展环境保护和生态恢复具有重要意义.

参考文献

焦念志. 2012. 海洋固碳与储碳-并论微型生物在其中的重要作用. 中国科学: 地球科学, 42: 1473–1486

Allen A E, Booth M G, Verity P G, Frischer M E. 2005. Influence of nitrate availability on the distribution and abundance of heterotrophic bacterial nitrate assimilation genes in the Barents Sea during summer. Aquat Microb Ecol, 39: 247–255

Allen A E, Booth M G, Frischer M E, Verity P G, Zehr J P, Zani S. 2001. Diversity and detection of nitrate assimilation genes in marine bacteria. Appl Environ Microbiol, 67: 5343–5348

Allen A E, Howard-Jones M H, Booth M G, Frischer M E, Verity P G, Bronk D A, Sanderson M P. 2002. Importance of heterotrophic bacterial assimilation of ammonium and nitrate in the Barents Sea during summer. J Marine Syst, 38: 93–108

Andersson M G, Van Rijswijk P, Middelburg J J. 2006. Uptake of dissolved inorganic nitrogen, urea and amino acids in the Scheldt estuary: Comparison of organic carbon and nitrogen uptake. Aquat Microb Ecol, 44: 303–315

Bao P, Huang H, Hu Z Y, Haggblom M M, Zhu Y G. 2012. Impact of temperature, CO_2 fixation and nitrate reduction on selenium reduction, by a paddy soil *Clostridium* strain. J Appl Microbiol, 113: doi: 10.1111/jam.12084

Bradley P B, Sanderson M P, Frischer M E, Brofft J, Booth M G, Kerkhof L J, Bronk D A. 2010. Inorganic and organic nitrogen uptake by phytoplankton and heterotrophic bacteria in the stratified Mid-Atlantic Bight. Estuar Coast Shelf S, 88: 429–441

Bronk D, Ward B. 2005. Inorganic and organic nitrogen cycling in the Southern California Bight. Deep-Sea Res Part I-Oceanogr Res Pap, 52: 2285–2300

Cai H Y, Jiao N Z. 2008. Diversity and abundance of nitrate assimilation genes in the Northern South China Sea. Microb Ecol, 56: 751–764

Cho B C, Azam F. 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. Nature, 332: 441–443

Cochlan W P, Bronk D A. 2003. Effects of ammonium on nitrate utilization in the Ross Sea, Antarctica: Implications for f-ratio estimates. Biogeochem Ross Sea, 78: 159–178

Dugdale R C, Goering J J. 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. Limnol Oceanogr, 12: 196–206

Eberl L, Ammendola A, Rothballer M H, Givskov M, Sternberg C, Kilstrup M, Schleifer K H, Molin S. 2000. Inactivation of gltB abolishes expression of the assimilatory nitrate reductase gene (*nasB*) in *Pseudomonas putida* KT2442. J bacteriol, 182: 3368–3376

Eppley R, Sharp J, Renger E, Perry M, Harrison W. 1977. Nitrogen assimilation by phytoplankton and other microorganisms in the surface waters of the central North Pacific Ocean. Mar Biol, 39: 111–120

Fouilland E, Gosselin M, Rivkin RB, Vasseur C, Mostajir B. 2007. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in Arctic surface waters. J Plankton Res, 29: 369–376

Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton M A, Cape J N, Reis S, Sheppard L J, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway J N, Vitousek P, Leach A, Bouwman A F, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M. 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. Philos Trans R Soc B-Biol Sci, 368: 20130164

Gonzalez P J, Correia C, Moura I, Brondino C D, Moura J J. 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. J Inorg Biochem, 100: 1015–1023

Gorfer M, Blumhoff M, Klaubauf S, Urban A, Inselsbacher E, Bandian D, Mitter B, Sessitsch A, Wanek W, Strauss J. 2011. Community profiling and gene expression of fungal assimilatory nitrate reductases in agricultural soil. ISME J, 5: 1771–1783

Harrison W, Wood L J. 1988. Inorganic nitrogen uptake by marine picoplankton: Evidence for size partitioning. Limnol Oceanogr, 33: 468–475

Hille R. 1996. The mononuclear molybdenum enzymes. Chem Rev, 96: 2757–2816

Jiang X, Dang H, Jiao N. 2015. Ubiquity and Diversity of Heterotrophic Bacterial *nasA* Genes in Diverse Marine Environments. PloS one, 10: e0117473

Jiao N, Tang K, Cai H, Mao Y. 2010. Increasing the microbial carbon sink in the sea by reducing chemical fertilization on the land. Nat Rev Microbiol, 9: 75–75

Kirchman D L, Wheeler P A. 1998. Uptake of ammonium and nitrate by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the sub-Arctic Pacific. Deep-Sea Res Part I-Oceanogr Res Pap, 45: 347–365

Kirchman D L, Suzuki Y, Garside C, Ducklow H W. 1991. High turnover rates of dissolved organic carbon during a spring phytoplankton bloom. Nature, 352: 612–614

Kirchman D L, Ducklow H W, McCarthy J J, Garside C. 1994. Biomass and nitrogen uptake by heterotrophic bacteria during the spring phytoplankton bloom in the North Atlantic Ocean. Deep-Sea Res Part I-Oceanogr Res Pap, 41: 879–895

Kraft B, Tegetmeyer H E, Sharma R, Klotz M G, Ferdelman T G, Hettich R L, Geelhoed J S, Strous M. 2014. The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration. Science, 345: 676–679

Lam P, Lavik G, Jensen M M, Vossenberg J, Schmid M, Woebken D, Gutierrez D, Amann R, Jetten M S, Kuypers M M. 2009. Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 4752–4757

Lledo B, Marhuenda-Egea F C, Martinez-Espinosa R M, Bonete M J. 2005. Identification and transcriptional analysis of nitrate assimilation genes in the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. Gene, 361: 80–88

Luque-Almagro V M, Gates A J, Moreno-Vivian C, Ferguson S J, Richardson D J, Roldan M D. 2011. Bacterial nitrate assimilation: Gene distribution and regulation. Biochem Soc T, 39: 1838–1843

Martínez-Espinosa R M, Marhuenda-Egea F C, Bonete M J. 2001. Assimilatory nitrate reductase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: Purification and characterisation. Fems Microbiol Lett, 204: 381–385

Middelburg J J, Nieuwenhuize J. 2000. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the nitrate rich Thames estuary. Mar Ecol Prog Ser, 203: 13–21

Moreno-Vivian C, Cabello P, Martinez-Luque M, Blasco R, Castillo F. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. J bacterial, 181: 6573–6584

Nogales, B., Timmis K N, Nedwell D B, Osborn A M. 2002. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse Transcription-PCR amplification from mRNA. Appl Environ Microbiol, 68: 5017–5025

Noriega C, Hassett D J, Rowe J J. 2005. The *mobA* gene is required for assimilatory and respiratory nitrate reduction but not xanthine dehydrogenase activity in Pseudomonas aeruginosa. Curr Microbiol, 51: 419–424

Probyn T. 1985. Nitrogen uptake by size-fractionated phytoplankton populations in the southern Benguela upwelling system. Mar Ecol-Prog Ser, 22: 249–258

Qu H J, Kroeze C. 2011. Nutrient export by rivers to the coastal waters of China: Management strategies and future trends. Reg Environ Change, 1: 153–167

Richardson D J, Berks B C, Russell D A, Spiro S, Taylor C J. 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. Cell Mol Life Sci, 58: 165–178

Rodrigues R M N V, Williams P J L. 2002. Inorganic nitrogen assimilation by picoplankton and whole plankton in a coastal ecosystem. Limnol Oceanogr, 47: 1608–1616

Sanderson M P, Bronk D A, Nejstgaard J C, Verity P G, Sazhin A F, Frischer M E. 2008. Phytoplankton and bacterial uptake of inorganic and organic nitrogen during an induced bloom of Phaeocystis pouchetii. Aquat Microb Ecol, 51: 153–168

Solomonson L P, Barber M J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. Annu Rev Plant Biol, 41: 225–253

Stepanauskas R, Sieracki M E. 2007. Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 9052–9057

Stolz J F, Basu P. 2002. Evolution of nitrate reductase: Molecular and structural variations on a common function. Chembiochem, 3: 198–206

Tupas L M, Koike I, Karl D M, Holm-Hansen O. 1994. Nitrogen metabolism by heterotrophic bacterial assemblages in Antarctic coastal waters. Polar Biol, 14: 195–204

Ward B B, Devol A H, Rich J J, Chang B X, Bulow S E, Naik H, Pratihary A, Jayakumar A. 2009. Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. Nature, 461: 78–81

Wawrik B, Boling W B, Van Nostrand J D, Xie J, Zhou J, Bronk D A. 2012. Assimilatory nitrate utilization by bacteria on the West Florida Shelf as determined by stable isotope probing and functional microarray analysis. Fems Microbiol Ecol, 79: 400–411

Wemheuer B, Güllert S, Billerbeck S, Giebel H A, Voget S, Simon M, Daniel R. 2014. Impact of a phytoplankton bloom on the diversity of the active bacterial community in the southern North Sea as revealed by metatranscriptomic approaches. Fems Microbiol Ecol, 87: 378–389

Wheeler P A, Kirchman D L. 1986. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. Limnol Oceanogr, 31: 998–1009

Yuan X, Glibert P M, Xu J, Liu H, Chen M, Liu H, Yin K, Harrison P J. 2011. Inorganic and organic nitrogen uptake by phytoplankton and bacteria in Hong Kong Waters. Estuar Coast, 35: 325–334