

羟胺氧化还原酶在生物脱氮中的研究进展

吴启凤, 丁晨雨, 何腾霞*, 陈梦苹, 张漫漫

贵州大学生命科学学院 农业生物工程研究院 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室 山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵州 贵阳 550025

吴启凤, 丁晨雨, 何腾霞, 陈梦苹, 张漫漫. 羟胺氧化还原酶在生物脱氮中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1120-1134

Wu Qifeng, Ding Chenyu, He Tengxia, Chen Mengping, Zhang Manman. Research progress of hydroxylamine oxidoreductase in biological denitrification[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1120-1134

摘要: 羟胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO)属于多血红素蛋白酶家族, 每个单体由7个电子转移血红素和1个催化血红素组成。HAO既可分别催化羟胺和胂的氧化反应, 也可催化羟胺、一氧化氮及亚硝酸盐的还原反应。不同硝化细菌中, HAO的最适温度、pH、底物、产物特异性及酶抑制剂等存在差异。作为生物硝化过程的关键酶, HAO在提升生物脱氮速率及清除硝化中间产物(羟胺)对生物的毒害方面发挥重要作用。本文系统综述了HAO在脱氮微生物中的分布、蛋白结构、表达调控及其活性等, 总结其不同硝化细菌中的生物化学特性, 最后对HAO进一步的研究方向进行展望, 有助于深入理解生物脱氮过程和微生物体内羟胺代谢的机理, 为优化废水处理工艺提供新的指导。

关键词: 羟胺氧化还原酶; 生物脱氮; 酶活性

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]); 国家自然科学基金青年科学基金(42007223); 贵州省教育厅自然科学研究青年人才成长项目(黔教合 KY 字[2021]086); 贵州大学培育项目(贵大培育[2019]50号); 贵州大学引进人才科研项目(贵大专基合字[2019]04)

Supported by: Guizhou Science and Technology Program (ZK[2021]); National Natural Science Foundation of China (42007223); Natural Science Research Youth Talent Growth Project of Guizhou Education Department (KY [2021]086); Cultivation Project of Guizhou University ([2019]50); Guizhou University Introduction Talent Research Project ([2019]04)

*Corresponding author: E-mail: txhe@gzu.edu.cn

Received: 2021-09-12; Accepted: 2021-11-19; Published online: 2021-12-17

Research progress of hydroxylamine oxidoreductase in biological denitrification

WU Qifeng, DING Chenyu, HE Tengxia*, CHEN Mengping, ZHANG Manman

Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering (CICMEAB), Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Institute of Agro-Bioengineering, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: Hydroxylamine oxidoreductase (HAO) is a multiheme protein, and each monomer consists of seven electron transfer hemes and one catalytic heme. HAO can catalyze the oxidation of hydroxylamine and hydrazin or the reduction of hydroxylamine, nitrite oxide, and nitrite. The optimum temperature, pH, substrate, product specificity, and inhibitor of HAO vary among different nitrifying bacteria. As a key enzyme in nitrification, HAO plays an important role in improving the biological nitrogen removal rate and eliminating the toxicity of nitrification intermediates (hydroxylamine). This article systematically reviewed the distribution, structure, expression regulation, and activity of HAO in denitrifying microorganisms, summarized the biochemical properties of HAO in different nitrifying bacteria, and finally put forward the future research directions of HAO. This review is helpful for understanding the biological denitrification process and the mechanism of hydroxylamine metabolism in microorganisms and will shed new light on the optimization of wastewater treatment.

Keywords: hydroxylamine oxidoreductase; biological denitrification; enzyme activity

含氮化合物在生命代谢过程中扮演着重要的角色,参与生物地球化学循环^[1]。近年来,为了满足人类的生产生活需求,农田氮肥的大量施用、工业废水的随意排放、养殖场的扩建、垃圾场废水的渗漏等,导致水体受到不同程度的含氮物质污染。据报道,国内已有 75% 以上的地表水受到氮污染,铵态氮是饮用水和地下水超标的主要物质之一^[2-6]。水是生命之源,过量的氮元素不仅会使水体恶化、释放难闻气味,而且对人类健康和水生生物的生存也有着巨大的威胁^[7],因此去除水体中氮污染物质显得尤为重要。

生物脱氮是一种高效、绿色环保和经济节约型的废水治理技术。脱氮微生物的发现已有 100 多年的历史,传统的生物脱氮技术通常依赖于微生物的自养硝化和厌氧反硝化过程^[8],随着新的生物脱氮菌株不断被发现,微生物的氮转

化过程也在不断被丰富。目前已报道的生物脱氮菌株多数为细菌,少量为古细菌或真菌。然而需要注意的是,许多微生物硝化反应脱氮过程往往会产生并积累氮代谢中间产物如羟胺,这是一种会对微生物产生毒害作用的脱氮中间产物或次生代谢产物,会降低脱氮菌的生物活性和脱氮速率,甚至引起脱氮系统崩溃^[9],因此,快速去除脱氮系统中积累的羟胺有利于提高生物脱氮效率。此外,近期研究发现,羟胺与生物脱氮过程中产生的强烈温室效应气体 N₂O 密切相关,而且已证实羟胺是 N₂O 排放的促进剂,该过程受 HAO 的调控^[10-11]。HAO 作为生物脱氮过程的关键酶之一,研究者们主要从参与氮代谢相关的不同种类微生物中分离纯化相应的酶蛋白、解析其蛋白结构和酶反应动力学等方面研究 HAO。长期以来,HAO 一直被认为是羟胺直接转化为亚硝酸盐的催化剂,然而最近的

酶学证据表明, HAO 的催化产物还有 NO 和 N_2O ^[12-13], 因此, HAO 参与的生物脱氮过程在不同脱氮菌中可能存在差异。重新认识 HAO 参与的氮循环过程有助于提高生物脱氮效率与控制温室气体排放, 对开发新型生物脱氮工艺具有重要的指导意义。本课题组前期分离获得了多株能高效转化羟胺并利用其进行生长的生物脱氮菌, 同时致力于该类菌转化羟胺的途径研究, 但对于 HAO 在生物脱氮过程中的作用机理仍缺乏全面系统的认识。

本文结合国内外对 HAO 的研究报道, 系统分析了 HAO 在脱氮微生物的分布情况、蛋白结构、编码基因、催化氮转化的机理以及影响其酶活的相关因素, 并对今后的研究方向及应用提出展望, 以期为微生物脱氮机理研究和降低温室气体释放的氮污染废水治理工艺应用研究提供参考。

1 HAO 在微生物中的分布

HAO 属于八重体蛋白家族, 是微生物硝化过程中的关键酶, 存在于细胞膜外周质中, 含有多种 c 型血红素和一个 P460 发色团, 是最复杂的血红素蛋白之一^[14]。目前, 通过 BLASTp 可以搜索到来自各种微生物的数百种血红素蛋白, 这些蛋白与 HAO 同源, 结合 HAO 酶活性相关研究报道, 已证实 HAO 存在于粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)^[15]、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)^[16]、不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.)^[17-18]、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)^[11,19-20]、善变副球菌 (*Paracoccus versutus*)^[21]、谷氨酸杆菌 (*Glutamicibacter arilaitensis*)^[22]、梅久兰链霉菌 (*Streptomyces mediolani*)^[23]、脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*)^[24]、厌氧氨氧化菌^[25]和硝化螺旋菌 (*Nitrospira* sp.)^[26]等氨氧化细菌中。也有研究者认为^[26], HAO 是所有氨氧化细

菌均能编码的一种酶, 与之对应的氨氧化古菌则因为缺乏编码 HAO 相应的同源序列而被认为不存在 HAO, 但部分参与羟胺氧化还原的酶在古菌中仍有报道^[27], 因此, 氨氧化古菌能否合成 HAO 仍有待商榷。此外, 据推测许多甲烷氧化菌在生物参与的氮循环中也有着重要作用, 因为其基因组中也存在编码羟胺氧化还原酶 (mHAO) 的基因序列, 但目前仍缺乏相关的生化证据^[28]。

不同微生物对碳源和氮源的利用及代谢途径存在着很大差异, HAO 在不同微生物中的合成量及酶活性也各不相同, 在未经纯化的情况下, 某些微生物胞内是否转录合成 HAO 在检测时可能会受到其他酶的干扰, 因此, 仅仅依靠蛋白序列分析或生理生化过程判断并不能准确反映 HAO 是否存在, 必要时还可结合其他方式方法进行多重验证, 如分子生物学方法。

2 HAO 在不同微生物种类中的结构及其基因表达

HAO 和大多数酶一样, 是一类在活细胞中产生的具有催化作用的蛋白质, 其功能主要由其结构所决定, 其合成受编码的基因所调控, 了解 HAO 的结构和调控基因序列有助于明晰其活性易受哪些因素影响, 深入理解其在生物脱氮中的作用机理。

2.1 自养硝化菌的 HAO 结构及其基因表达

自养硝化菌是一类革兰氏阴性的化能自养菌, 能够氧化某种无机物并利用其所产生的化学能还原二氧化碳, 生成有机碳化合物。自养硝化细菌的氨单加氧酶可将铵盐氧化为羟胺, 在该氧化过程所产生的能量条件下, HAO 进一步催化羟胺转变成亚硝酸盐, 进而完成亚硝化作用^[29-30]。生物化学基础理论普遍认为蛋白酶的氨基酸序列决定其结构, 进而实现相应的生

物学功能。纯化的 HAO 结构研究表明^[31-32](图 1), 自养硝化细菌的 HAO 是一种复杂结构排列的同源三聚体蛋白, 其三级结构和四级结构采用了均三聚构型或其倍数, 包含 3 个亚基, 每个亚基大小为 63 kDa, 含有 8 个共价结合的血红素, 其中 7 个由双 His 连接的 c 型电子转移血红素组成, 是配位饱和的, 另外一个由 His 轴向连接的 5 配位催化血红素组成, 称为 P460 辅因子, 其为 HAO 催化的关键位点, 可能会被 21 个非 P460 的血红素辅助因子掩盖。相关研究表明^[33-34], 自养硝化菌和甲烷氧化菌的 HAO 至少含有一种 P460 辅因子和几种 c 型血红素。血

红素 P460 辅因子结构极其复杂, 由一个非常褶皱的 c 型血红素组成, 从与血红素铁结合的配体中提取电子, 而其他参与氧化还原化学反应的血红素通常将电子注入其配体中^[35]。此外, P460 辅因子血红素卟啉和保守的酪氨酸之间还存在 2 个共价键^[36](图 2), 也许正是酪氨酸交联和血红素皱折这一特殊结构赋予了 P460 辅因子异常的吸电子活性, 导致其偏离了典型的血红素氧化还原化学反应^[37]。深入研究血红素 P460 辅因子的结构有助于理解其在生化反应中的作用机理, 揭示非常规血红素蛋白交联的一些关键功能。

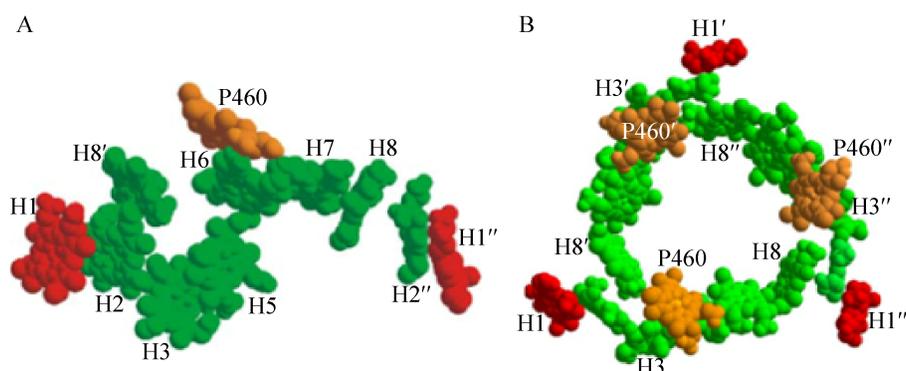


图 1 8 种血红素在 HAO 一个亚基内的排列(A)及 HAO 三聚体内所有血红素的排列(B)^[31-32]

Figure 1 The arrangement of 8 hemes within a subunit of HAO (A) and the arrangement of all hemes in HAO trimers (B)^[31-32].

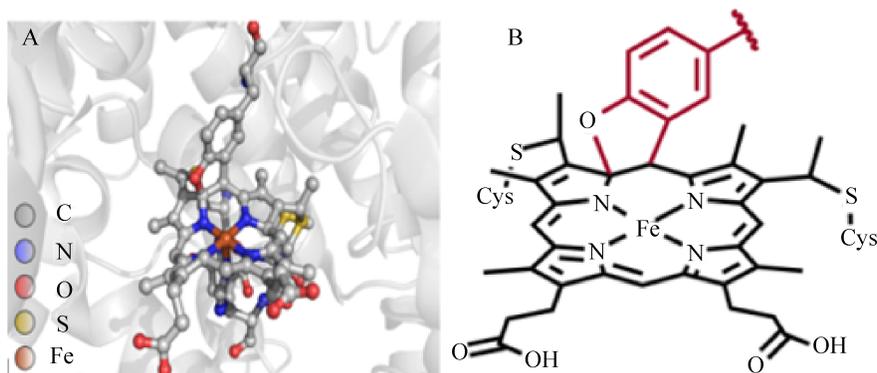


图 2 HAO 中 P460 辅因子的结构^[36] A: 以红色突出显示双交联的 P460 的棍状表示法; B: 以红色突出显示双交联的 P460 的线状表示法

Figure 2 Structure of P460 cofactor in HAO^[36]. A: A stick representation of the double cross-linked P460 cofactor highlighted in red; B: Line representation of double cross-linked P460 cofactors highlighted in red.

HAO 单体之间通过独特的双交联结构相互连接,即酪氨酸的 C3 和酚的 O 原子分别连接到相邻亚基催化血红素部分的 C5 和 C4 原子上^[38]。Klotz 等^[39-40]认为这种交联结构有利于 HAO 催化氧化反应,而无这种交联结构则被预测有利于催化还原反应。这一假说在 Ferousi 等^[38]的报道中得到证实,他们从依赖亚硝酸盐的厌氧氨氧化细菌中提纯得到了 HAO 同系物 HAO_r, HAO_r 结构中缺乏血红素-酪氨酸交联,可以将亚硝酸盐还原为一氧化氮,同时可还原作为非生理底物的一氧化氮和羟胺,但不能氧化羟胺,表明缺乏交联的 HAO 酶是还原酶。与氧化型 HAOs 相比,HAO_r 具有较高的中点电位(至少 80 mV)和较低卟啉褶皱程度[约 0.7 (Å°)-1.2 (Å°)]的活性位点血红素^[41]。

HAO 的转录是通过 NH₄⁺ 的添加诱导完成的,编码 HAO 的基因簇包括重复 *hao* 基因、*cycA* 基因(编码细胞色素 c554)和 *cycB* 基因(编码四血红素细胞色素 c552); *hao* 基因位于 *cycA* 基因上游 1 162 bp 处,但这 2 个基因通常分布在不同的操纵子上;*cycB* 基因位于 *cycA* 基因下游,其下游还有单拷贝基因 *cyp* (编码细胞色素 P460)、*cyt* (编码细胞色素 c552)、*dcp* (编码双亚铁血红素 c553 过氧化物酶);在欧洲亚硝化单胞菌中,编码 HAO 的 *hao* 基因 3 个拷贝的编码区具有同一性,其中有 1 个拷贝存在核苷酸差异,转录分析表明 *hao* 基因的重复拷贝 *hao1* 和 *hao2* 的核苷酸序列在上游区 160 bp 内几乎完全相同,其起始密码子上游 71 bp 的转录起始位点为 σ^{70} 启动子序列,而 *hao3* 拷贝的 σ^{70} 启动子序列则位于起始密码子上游 54 bp 处^[42-43]。此外,*hao3* 拷贝与 *cycA* 基因紧密地连在一起,而且该基因还能够编码一个 18-24 氨基酸前导肽序列,引导 HAO 蛋白在胞内转运、折叠和修饰等过程^[30]。

2.2 异养硝化菌的 HAO 结构及其基因表达

异养硝化菌可利用有机碳进行生长,具有生长快、耐受性强等优点,并且已被证明具有强大的脱氮潜能,近年来已经成为生物脱氮的研究热点^[44]。目前异养硝化菌的硝化作用机理仍在不断探索之中,国内外对于异养硝化作用的研究大多集中在异养硝化菌的分离鉴定及对氨氮的去除效率方面,从酶学与基因组学角度对异养硝化作用进行研究的报道较少。异养硝化菌的 HAO 在氧化 1 分子羟胺的过程中产生 2 个电子,这 2 个电子用于还原亚硝酸盐,该过程用于驱除细胞内多余的还原力,并不产生能量,同时也偶联了硝化和反硝化过程;而自养硝化菌在氧化 1 分子羟胺的过程中可产生 4 个电子,其中 2 个电子用于还原辅酶 Q,另外 2 个电子还原细胞色素 c,以生成 ATP 和 NADH^[42]。相较于自养硝化菌,异养硝化菌的 HAO 结构较简单,大多是不含血红素的单体周质蛋白,如从异养硝化菌 *Thiosphaera pantotropha* 和 *Pseudomonas* sp. 获得的 HAO 分别是 20 kDa 和 19 kDa 左右的单体蛋白^[45-46]。异养硝化菌的 HAO 酶活性中心与自养硝化菌也有所不同,自养硝化菌的 HAO 以血红素 P460 为酶活性中心,而以非血红素铁为活性中心的 HAO 可能在异养硝化细菌中广泛分布,如脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*) 的 HAO 显示该类酶每个分子含有 3-5 个铁离子,酶的羟胺氧化活性可明显被 Fe²⁺ 或 Fe³⁺ 激活而被 EDTA 抑制,说明该类酶含有易变铁离子且其对维持酶活是必需的^[42];异养硝化菌 *A. faecalis* IFO1311 的 HAO 酶活性在加入铁离子后也显著提高^[47]。然而,Wehrfritz 等^[45]发现异养硝化菌 *Thiosphaera pantotropha* 的 HAO 不含有任何血红素辅基;Jetten 等^[48]在假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) PB16 的 HAO 中也发现了类似的情况,作为异养硝化

菌硝化过程的关键酶之一, HAO 的提取纯化及其酶结构功能的解析鲜有报道, 因此, 铁是否为异养硝化菌 HAO 活性中心所必需的元素仍有待更多的实验证明。从现有的研究来看, 自养硝化菌和异养硝化菌编码 HAO 的 *hao* 基因序列相似性较低, 甚至不同异养硝化菌株之间的 *hao* 基因也存在较大的差异。此外, 尽管异养硝化的无机氮代谢途径与自养硝化菌存在相似之处, 但由于缺乏足够的证据, 异养硝化菌的 HAO 基因表达及调控是否与自养硝化菌存在显著差异还不明确, 有关 HAO 在异养硝化过程中的作用机理仍有待进一步探索。

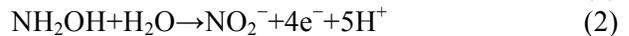
3 HAO 在生物脱氮中的作用机理

生物脱氮指的是在污水处理的过程中, 含氮化合物在脱氮微生物的联合作用下通过氨化、厌氧氨氧化、硝化及反硝化等反应在有氧或厌氧条件下将污水中的含氮污染物最终转化为气态氮的过程, 从而达到废水脱氮的目的。目前已分离到的 HAO 具有多种催化功能, 可以氧化肼(N_2H_4)和羟胺, 还原亚硝酸盐、一氧化氮和羟胺。传统的生物脱氮理论普遍认为 HAO 是催化羟胺转化成亚硝酸盐的生物脱氮酶, 位于膜外周质中, 但是随着脱氮微生物种类的不断丰富, HAO 催化羟胺转化的产物也有了新的发现。近期研究结果发现, HAO 与硝化过程中 NO 及 N_2O 的产生也有关联。

3.1 HAO 催化羟胺转化为亚硝酸盐

微生物脱氮过程中, 羟胺是已知的脱氮中间产物。长期以来, 人们一直认为在合适的电子受体存在情况下, HAO 可以将羟胺氧化为亚硝酸盐, 但羟胺转化为亚硝酸盐的具体催化步骤仍存在争议。早期, Yamanaka 等^[49]发现无论在好氧或厌氧条件下, HAO 催化羟胺生成亚硝酸盐的产率取决于所加入的电子受体与羟胺的

比例及反应所使用的缓冲液种类; 如在反应体系中加入足够数量的细胞色素 c 或铁氧化物, HAO 几乎将羟胺完全氧化为亚硝酸盐, 而且亚硝酸盐的生成量与电子受体的加入量呈正相关; 在有氧条件下, 氨氧化反应通过膜结合的氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)催化铵氧化为羟胺($NH_4^+ \rightarrow NH_2OH$), 然后再由 HAO 将羟胺氧化为亚硝酸盐($NH_2OH \rightarrow NO_2^-$), 此过程主要由氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)介导完成。目前公认的 AOB 代谢模型(主要基于对 *Nitrosomonas europaea* AOB 模型的研究)通过下面两步酶促反应进行^[50]:



HAO 是目前已知的唯一能在循环过程中从血红素连接底物中回收电子的酶。如图 3 所示, 氨氧化代谢模型第一步反应由 AMO 催化依赖氧气的氨羟基化生成羟胺, 此过程需要 2 个电子的参与; 随后, 羟胺通过 HAO 催化失去 4 个电子被氧化成亚硝酸盐, 4 个电子转移到 HAO 的生理电子受体——Cyt_{c554}, 其中 2 个电子返回到 AMO 参与第一步的催化反应, 另外 2 个电子进入细胞膜上呼吸电子传递链的末端氧化酶,

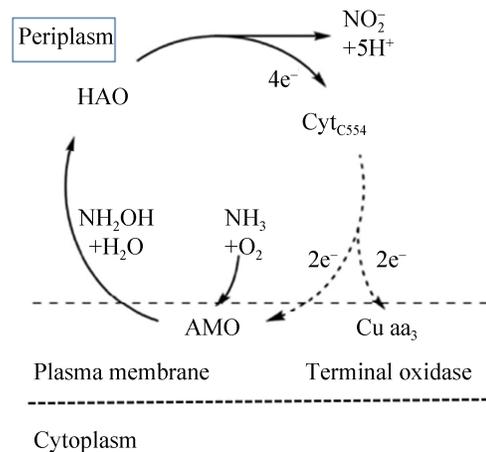


图 3 硝化菌氨氧化过程^[43]

Figure 3 Ammonia oxidation by nitrifying bacteria^[43].

以 O_2 作为末端电子受体促成电化学梯度, 驱动胞内物质和能量进行转换, 维持细胞活性^[51-52]。

3.2 HAO 催化羟胺转化为 NO

NO 在细胞间通讯、微生物防御和氮循环过程中均具有重要作用, 是生物脱氮过程中多种无机氮化合物还原和氧化的中间体之一。有酶学研究表明, HAO 氧化羟胺的不完全或 O_2 浓度不足时其产物为 NO^[12,28,53]。此外, NO 作为 HAO 的催化产物很难被直接检测到, 是研究所面临的重大障碍, 其主要原因有以下两点: (1) O_2 存在的情况下, NO 的寿命很短。在空气饱和条件下, 当 NO 浓度为 10–100 $\mu\text{mol/L}$ 时, NO 的半衰期为 5.6–56.0 s, 还会发生二级反应生成亚硝酸盐; (2) 无氧或厌氧条件下, NO 仍然很难被检测到, 这是因为 NO 可以在酶的催化作用下被转化为 NH_4^+ 、亚硝酸盐、硝酸盐和 N_2O ^[32,54]。Caranto 等^[12]为了证明 NO 是 *N. europaea* 的 HAO 催化羟胺的专有产物, 使用了由 Pacheco 等^[55]开发的 NO 封存系统, 在该系统中, NO 清除剂过氧化氢酶在 403 nm 处呈现 Soret 带, 在 500 nm 和 700 nm 处呈现低分辨率的吸光度特征, 而在迅速结合 NO 之后, 出现明确的紫外-可见 (UV-vis) 吸收特征, 即 Soret 带移至 433 nm 处, 同时在 542 nm 和 579 nm 处出现 2 个分辨率清晰的谱带, 通过 NO 与过氧化氢酶结合后在 433 nm 处引起的吸收变化可对 NO 进行量化。实验结果表明, 无论在有氧还是无氧的条件下, *N. europaea* 菌的 HAO 氧化羟胺产物都是 NO 而不是亚硝酸盐, 这意味着 AOB 需要 3 个步骤才可能将 NH_3 氧化成亚硝酸盐, 同时也表明 NH_3 氧化途径还需要第 3 种未知的酶才能将 NO 转化为亚硝酸盐。最近一项蛋白质组比较研究显示^[27], 亚硝基蓝蛋白(nitrocyanin, NcyA)在 3 种不同的氨氧化细菌中高度表达, 在转录水平上, NcyA 的序列与铜型亚硝酸盐还原酶的 I 型铜

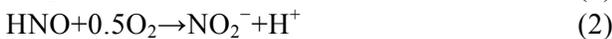
结合区显著同源, 不同的地方在于 NcyA 存在与 His₂/Cys/Glu/ H_2O 连接的方锥形铜位点^[56], 揭示其可能具备不同的生物学功能, 或许在 NO 氧化为亚硝酸盐的氮代谢途径中发挥重要作用, 是 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^-$ 途径中尚未揭示的第 3 种酶; 也有研究认为一氧化氮氧化还原酶(nitric oxide oxidoreductase, NOO)负责将 NO 氧化为亚硝酸盐^[57,12]。因此, 第 3 种酶的确定仍需要更多的实验证据。

3.3 HAO 催化羟胺转化为 N_2O

生物脱氮的过程中会产生大量的 N_2O , N_2O 不仅在平流层、地球辐射平衡和全球氮循环中起着重要的作用, 而且具有强烈的增热效应, 其升温潜势比 CO_2 大 300 多倍^[11], 过量的 N_2O 释放会破坏人类的生态环境, 影响农业、林业及畜牧业等方面的经济发展, 是不可忽视的潜在威胁。由于 N_2O 在生物废水处理的温室气体排放总量中占主导地位, N_2O 的产生途径一直是废水生物脱氮备受关注的问题, 目前已有相关研究对其潜在产生途径进行了探索^[58]。 N_2O 被认为是好氧反硝化的主要中间产物($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), 但也有研究结果表明, 在生物脱氮的过程中硝化阶段也产生 N_2O , 而且与 HAO 参与的催化反应相关, 与反硝化过程无关^[13,59]。根据 ^{15}N 同位素示踪实验, Otte 等^[60]认为 N_2O 和 N_2 不是在好氧条件下还原亚硝酸盐所产生, 而可能是由粪产碱杆菌 *A. faecalis* TUD 的异养硝化作用氧化羟胺所导致, Joo 等^[61]也报道过类似的现象。在连续培养的 *Alcaligenes faecalis* NR 菌株中增加羟胺的投加量, 羟胺氧化的直接副产物 N_2O 的产量也会随之增加^[62]。以上研究均表明 N_2O 的产生可能与 HAO 催化羟胺氧化相关, 然而 N_2O 与 HAO 之间的复杂关系尚未得到合理的解释。与之相对应, 也有研究者认为羟胺仅仅只是 N_2O 产生的促进剂, 但其

背后的作用机理同样尚未阐明^[10,63]。

截至目前, 由于确切的证据不足, 硝化菌生物脱氮过程中产生 N₂O 的作用机理还不清楚, 研究者们对其进行了多方面的推测和验证。有研究者认为, N₂O 的产生仅仅是由于羟胺和氧气 (2NH₂OH+O₂→N₂O+3H₂O) 或亚硝酸盐 (NH₂OH+ NO₂⁻+H⁺→N₂O+2H₂O)之间的非化学反应^[58,64], 而 Caranto 等^[12]在厌氧条件下研究 HAO 作用机理时通过对 Cyt P460 的活性位点进行改造, 发现 Cyt P460 催化铁结合的羟胺氧化成亚硝基铁 {FeNO}⁶, 当第 2 个羟胺分子继续对 {FeNO}⁶ 进行亲核攻击时也会导致 N₂O 的生成; 此外, 根据对自养硝化菌 *N. europaea* 的研究, NO 可能是 HAO 催化羟胺氧化的唯一产物, 由此推测自养硝化菌产生的 N₂O 还可能源于 NO 的还原^[12,65-66], 或更有可能是硝化菌在 HAO 催化下氧化羟胺生成^[67-68]。目前比较被人们接受的是 Moir 等^[24]提出的一个假设, 即通过 HAO 的 Fe³⁺-Fe³⁺ 中心位点催化羟胺形成不稳定的中间产物 HNO, 对于 HNO 的进一步氧化, 可能涉及(2)和(3)这 2 个反应:



综上所述, 可以发现 HAO 在生物脱氮中可

能具有多种催化作用, 参与羟胺、亚硝酸盐、NO、N₂O 等氮化合物的代谢过程, 但许多代谢过程背后的机理仍缺乏充足的实验证据加以明确。根据前人研究将 HAO 在生物脱氮中的作用机理总结为图 4 中可能存在的模型, 以期为后续研究提供参考。

4 影响 HAO 酶活的因素

酶通常是在生物体内合成, 具有催化生物化学反应并传递电子、原子和化学基团的生物学功能。微生物的生长和代谢需要在酶的作用下才能顺利进行。大量研究表明, 由于生存环境和代谢方式的差异, 从不同细菌内纯化出来的 HAO 其酶活也各不相同, 如表 1 所示。这些微生物的酶活力会受环境因子如培养温度、pH、金属离子、硝化抑制剂和电子受体等方面的影响。

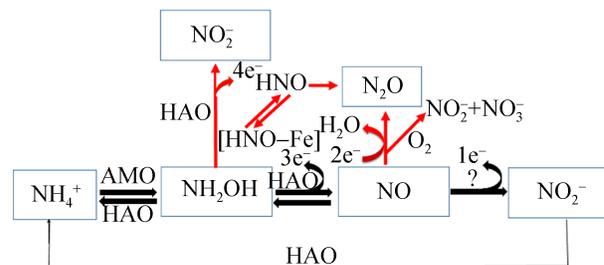


图 4 HAO 酶活性产物及其预留中间体模型
Figure 4 Model of the product of HAO enzyme activity and its reserved intermediates.

表 1 不同硝化细菌 HAO 的生物化学特性

Table 1 Biochemical characteristics of different nitrifying bacteria HAO

菌株 Strains	比活力 Specific activity (U/mg)	温度 Temperature (°C)	PH	电子受体 Electron acceptor	参考 References
<i>Alcaligenes faecalis</i> NR	0.092	30	8.0	K ₃ Fe(CN) ₆	[62]
<i>Bacillus</i> K5	0.045	30	8.0	K ₃ Fe(CN) ₆	[16]
<i>Acinetobacter</i> Y1	1.550	30	8.0	K ₃ Fe(CN) ₆	[18]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> HNR	0.051	NR	NR	Cytc	[67]
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> J488	0.049	15	NR	Cytc	[11]
<i>Acinetobacter</i> Y16	0.310	15	7.5	K ₃ Fe(CN) ₆	[17]
Anammox bacteria KSU-1	NR	65	8.0	K ₃ Fe(CN) ₆	[25]
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> EM-H8	0.065	20	8.0-8.2	K ₃ Fe(CN) ₆	[22]

注: NR: 没有报道

Note: NR: No report.

4.1 温度

温度作为一个强环境因素,不仅会影响脱氮微生物的生长速率,同时也会通过影响氮代谢相关酶的活性对脱氮菌的脱氮性能产生显著影响。通常情况下,酶只有在特定的温度范围内才能发生作用,一旦超出这个温度范围,酶活性会降低甚至完全失活,通常高温会造成酶结构的改变而导致永久性失活,低温则会抑制酶的活性。HAO对温度的需求与脱氮微生物的生存环境相关,多数脱氮细菌HAO的最适温度为30℃^[16,18,25,62]。有报道表明,部分HAO对较高温度也具有耐受性,如Shimamura等^[25]为了测试氢氧化细菌KSU-1菌株HAO的热稳定性,将提取的粗酶液置于不同温度的100 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液中放置2 min,发现该酶在60℃以下时保持了初始活性的90%以上,而且在温度高达65℃时表现出最大的酶活性。与之相对应的是少数脱氮菌的HAO在低温条件下仍能表现出酶活性,如本课题组前期分离获得的耐冷脱氮菌*Pseudomonas taiwanensis* J488^[11],该菌含有的HAO在15℃条件下也能高效地将羟胺转化为氮气和生物量氮的能力。此外,还有报道显示,*Acinetobacter* sp. Y16的HAO在胞外以羟胺为底物,以铁氰化物为电子受体时其酶活最佳温度也为15℃且在较宽的温度范围(4–40℃)内均能表现出氧化羟胺的能力,而且在4–15℃范围内较稳定,酶活力变化小于30%^[17]。

4.2 pH

pH也是影响酶活性的一个重要因素,pH的高低不仅可以改变酶的构象,还影响活性基团、酶与底物分子的解离状态,从而直接或间接地影响脱氮微生物的生长代谢和脱氮效率。HAO和大多数蛋白酶相似,在强酸或强碱环境下易变性失活,其酶活一般在微碱性或碱性条

件(7.5–9.0)下最强^[47,62]。如菌株*Bacillus* sp. K5与*Acinetobacter* sp. Y16的HAO酶活性分别在pH 8.0和pH 7.5时达到最高,但pH值低于7.0和6.5或高于9.0时酶活性急剧降低甚至检测不到活性^[16–17]。有的细菌以不同物质作为电子受体时HAO最适酶活所对应的pH也有所不同,如异养硝化菌*Paracoccus denitrificans* GB17的HAO以哺乳动物细胞色素c作为电子受体时,其酶活性在pH值为8.5时达到最大值,高于8.5则活性丧失,而以假蓝蛋白和细胞色素c550为电子受体时pH升高至10.0和11.0仍可检测到该酶的活性^[24]。少数脱氮微生物的HAO在较宽的pH范围内也能保持活性稳定,如不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) Y1的HAO在pH 3.0–10.0的条件下均具有活性,在pH 6.0–9.0时活性较强,其中pH 8.0时活性最强^[18]。

4.3 金属离子

金属离子广泛地存在于自然界中,其为废水处理过程中的另一个环境压力。微量的金属离子是微生物生长、繁殖及功能表达所必需的营养元素,这是因为一部分金属离子是酶的重要活性部位,并影响着酶的三维结构和构型,但过量的金属离子会对细胞产生毒害作用,扰乱微生物的生命活动及物质代谢过程^[69]。HAO是一种含有金属离子的共轭酶,金属离子会对其活性产生很大的影响,进而影响脱氮菌的生长和脱氮速率。不同金属离子对HAO酶活的促进及抑制效果不同,研究金属离子对*A. faecalis* NR HAO活性的影响时发现,Ca²⁺的添加提高了HAO的活性,Mn²⁺的加入明显降低了HAO的活性,表明Mn²⁺的存在抑制了HAO的活性^[62]。即使是同一金属离子对不同硝化菌HAO酶活的抑制和促进效果也存在差异。1 mmol/L的Fe²⁺和Fe³⁺可使*Acinetobacter* sp. Y1的HAO酶活分别提高43.78%和25.64%^[18];Fe²⁺的加入同样提

高了异养硝化菌 *P. denitrificans* GB17 和 *A. faecalis* IFO1311 的 HAO 活性^[24,46], 却对 *A. faecalis* TUD 的 HAO 活性未产生显著的影响^[60]。金属离子影响 HAO 酶活性的方式较为复杂, 而且目前关于金属离子影响 HAO 酶活性的具体作用机理的报道仍为空白, 但现实废水处理问题中, 无论是工业废水还是生活污水均可能含有金属离子, 因此其作用机理值得进一步地研究和阐明。

4.4 HAO 的抑制剂

酶抑制剂是指特异性作用于酶的某些基团、降低酶的活性甚至使酶活性完全丧失的物质, 不同抑制剂的抑制作用机理存在差异, 抑制强度还与抑制剂浓度相关。乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)是一种金属螯合剂, 可以清除二价阳离子, 使依赖金属离子的酶失活, 如果 EDTA 对酶活性有抑制作用, 说明金属离子对该酶活性起关键作用。研究发现^[18], 0.4 mmol/L EDTA 对 *Acinetobacter* sp. Y1 的 HAO 有促进作用, 但随着剂量的增加逐渐产生负效应, 表明其 HAO 活性中心的铁元素应为亚铁离子, 低浓度的激活可能是 EDTA 解除了其他金属阳离子的抑制作用所致。众所周知, 苯胂是一种自杀抑制剂, 有研究者发现^[70]其对不同脱氮菌的 HAO 活性也表现出不同的抑制效果, 当苯胂与 *Nitrosomonas europaea* 的 HAO (NeHAO) 中的 P460 特异性结合时, 10 mmol/L 的苯胂即可抑制约 60% 的 NeHAO 活性, 而在相同浓度下却对 *Nitrosococcus oceani* HAO 的 (NoHAO) 活性几乎无抑制作用, 这可能预示着苯胂抑制剂对 HAO 底物结合位点周围的局部环境也具有选择性。Schalk 等^[71]发现氰化物、 H_2O_2 、十二烷基硫酸钠(SDS)对厌氧氨氧化细菌的 HAO 活性也具有抑制作用, 其中 H_2O_2 的抑制效果最强, 40 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 即可使 HAO 活性

降低 95%, 而且 3 种化合物的抑制效果均与加入的浓度呈正相关。

4.5 酶反应液中电子受体的选择

大量胞外实验结果^[17,25,72]证实, 不同电子受体的选择对 HAO 的活性测定会产生不同的影响, 因此, 为了提高测定 HAO 活性方法的准确性, 在对 HAO 的酶活进行测定时, 通常会在初步测试时使用不同的电子受体。常用的电子受体包括铁氰化钾 [$K_3Fe(CN)_6$]、细胞色素 c、吩嗪硫酸甲酯(phenazine methosulfate, PMS)、甲基噻唑基四唑溴化铵(methylthiazolyl tetrazolium bromide, MTT)、2,6-二氯靛酚钠(2,6-dichloroindophenol sodium salt, DCPIP)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)等。细胞色素 c 和 $K_3Fe(CN)_6$ 是目前已知的大多数 HAO 的电子受体, 使用其中一种作为电子受体即可检测到目的菌株 HAO 的酶活, 如脱氮菌 *A. faecalis* NR^[62] 和 *A. calcoaceticus* HNR^[67] 的 HAO 以细胞色素 c 为电子受体时均表现出高活性, 以 $K_3Fe(CN)_6$ 为电子受体时则几乎测不到其活性, 这与菌株 *Acinetobacter* sp. Y1^[18] 和 *A. faecalis* C16^[72] 的表现刚好相反。有些脱氮菌的 HAO 对电子受体的选择性不高, 如研究厌氧氨氧化细菌 KSU1 的 HAO 酶活时, 以羟胺为电子供体, 在 pH 8.0 和 35 °C 条件下测定了纯化酶的动力学性质, 结果显示除 NAD^+ 外, 细胞色素 c、PMS+MTT 和 $K_3Fe(CN)_6$ 均可作为 HAO 氧化的电子受体, 其中以铁氰化钾作为电子受体时测得的 HAO 活性最高^[25]。此外, 胞内研究发现, 亚硝化单胞菌 HAO 的直接电子受体是 Cyt_{c554} , 这是一种存在于自养硝化菌中的四血红素 c 型细胞色素, 被认为是在醌池水平上给电子传递链提供电子, 在羟胺存在的条件下可以被 HAO 的 2 个电子还原^[33]; 而异养硝化菌 *Paracoccus denitrificans* GB17 的 HAO 电子受体是 Cyt_{c550} ^[24]。

综上所述,在不同硝化细菌中 HAO 的生物化学特性存在差异,通过研究生存环境对 HAO 酶活性的影响,发现生存环境主要通过影响 HAO 的结构、活性中心及电子传递过程等影响酶的催化效率,因此,温度、pH、金属离子和抑制剂等因素的探索可能在解决生物脱氮硝化过程中羟胺积累和 N_2O 减释问题方面具有积极意义。

5 展望

HAO 作为生物脱氮过程的关键酶,广泛存在于氨氧化、自养硝化和异养硝化微生物中,但其相关研究报道还较少,阐明 HAO 的作用机理有助于控制羟胺氧化还原的生物化学过程,并加深对生物脱氮菌以铵为能源的初级代谢途径的理解。近年来,随着异养硝化菌的不断报道,对 HAO 也有了新的认识,本文系统地综述了 HAO 在不同脱氮微生物的分布情况、蛋白结构、基因表达差异、生物脱氮中的作用机理、酶活性影响因素与电子受体的差异性,有利于更全面地了解 HAO 及其在生物脱氮过程中的作用机理,但仍有许多问题有待后续研究者解决:

(1) 已有文献报道部分古细菌具有氨氧化作用,但未发现与 HAO 相似的基因编码序列,因此,古细菌是否产生相似功能的 HAO 及其对生物脱氮过程的作用机理有待进一步研究。

(2) 异养硝化菌 HAO 氨基酸序列与自养硝化菌不存在显著同源性,表明编码和调控 HAO 的基因序列可能也存在较大差异,但目前缺乏对异养硝化菌 HAO 编码基因表达调控的研究证据。基于该现状,从不同硝化微生物特别是异养硝化菌中分离与纯化 HAO,并结合基因组学与转录组学的研究是探索该酶生物多样性的趋势之一。

(3) 部分研究者认为 HAO 在生物脱氮过程

中的作用产物仅有 NO,但该论断仅在胞外实验中获得,尚缺乏胞内实验证实,假设该论断在胞内也成立,那么 $NH_2OH \rightarrow NO \rightarrow NO_2^-$ 和 $NH_2OH \rightarrow NO \rightarrow N_2O$ 过程是如何进行的、负责将 NO 氧化为亚硝酸盐的第 3 种酶又是什么,这些问题也许可通过结合转录组学、蛋白质组学的研究方法与胞内生化学代谢过程研究得到解决。

(4) 代谢途径中的关键酶往往决定生化反应速度,所以关键酶的研究对于代谢途径的优化具有重要的作用,而氮循环中羟胺氧化途径所面临的一个主要挑战是缺乏关键酶 HAO 的生化特征信息。如金属离子和抑制剂可影响 HAO 的活性,但具体的作用机理仍缺乏较为全面的实验证据,这阻碍了人们对 HAO 作用机理的深层次认识,突破这一限制将会是这一领域未来研究的工作重点,可以利用动力学、光谱学和理论研究对 HAO 的作用机理进行更多的探究,比如活性位点可能介导的基本化学反应,从而提高对 HAO 反应机理的认识。此外,还可以通过羟胺氧化途径进行复杂的模型研究,确定 HAO 高效运作的潜在化学反应环境,帮助后续研究者们更快更方便地优化生物脱氮工艺。

(5) 重组基因工程菌已经被广泛用于多个领域,构建出高效表达 HAO 的重组菌株可能是解决现有生物脱氮体系羟胺积累和保证脱氮系统稳定的重要手段之一。构建高性能的重组菌株通常需要进行多方面的改造,可以通过基因重组法引入具有高活性的外源酶基因以提高菌株 HAO 的活性,或者通过基因工程的方法在 HAO 基因前插入调节性的启动子来调节 HAO 的表达量,或者通过基因编辑技术对 HAO 的基因序列进行改造,提高其对酶抑制剂或产物抑制的抵抗力。目前许多参与硝化作用的关键酶与标准重组 DNA 技术不相容,因此,准确、全面分析高活性 HAO 的结构与功能,结合转录调

控分析确定 HAO 的改造靶点也将是未来更好地利用 HAO 的研究方向之一。

REFERENCES

- [1] Tang ZX, Zhang YF, Zeng LF, Yuan Q, Li N. Investigation and analysis of three nitrogen pollution in groundwater in Ledong, Hainan province[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2019, 8(3): 135-137, 144
- [2] 刘晓斐, 杜伊, 胡玮璇, 王晓燕. 城市河流中碳源对同步硝化反硝化的影响[J]. *环境工程*, 2019, 37(2): 73-78
Liu XF, Du Y, Hu WX, Wang XY. Influence of carbon source on simultaneous nitrification and denitrification (snd) in urban rivers[J]. *Environmental Engineering*, 2019, 37(2): 73-78 (in Chinese)
- [3] 刘舒蕾, 彭慧君, 杨佳怡, 肖琳. 水生植物生物质炭去除水体中氮磷性能[J]. *环境科学*, 2019, 40(11): 4980-4986
Liu SL, Peng HJ, Yang JY, Xiao L. Removal of nitrogen and phosphorus from water by biomass carbon of aquatic plants[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(11): 4980-4986 (in Chinese)
- [4] 董斯齐, 黄翀. 粤港澳大湾区陆源氮污染来源结构与空间分布[J]. *环境科学*, 2021, 42(11): 5384-5393
Dong SQ, Huang C. Land-based nitrogen pollution source structure and spatial distribution in Guangdong-Hong Kong-Macao greater bay area[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(11): 5384-5393 (in Chinese)
- [5] 中国环保产业编辑部. 环境保护部公布 2015 年上半年全国环境质量状况[J]. *中国环保产业*, 2015(8): 11
Editorial Department of China Environmental Protection Industry. The Ministry of Environmental Protection announces national environmental quality status in the first half of 2015[J]. *China Environmental Protection Industry*, 2015(8): 11 (in Chinese)
- [6] 丛鑫, 张珊珊, 徐征和, 徐立荣, 潘维艳, 王荣震. 华北典型超采区浅层地下水“三氮”时空变异及驱动因素分析[J]. *地球与环境*, 2021, 8(12): 1-12
Cong X, Zhang SS, Xu ZH, Xu LR, Pan WY, Wang RZ. Spatial-temporal variation and driving factors of “three nitrogen” in shallow groundwater in typical over-exploited area in North China[J]. *Earth and Environment*, 2021, 8(12): 1-12 (in Chinese)
- [7] Arvand M, Arjmandi N, Shakibaie M, Jafarnejad S, Shahghadami R, Sasanpour P. Colorimetric microfluidic paper-based sensor for determination of nitrite in drinking water with enhanced color development[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2020, 53(35): 355403
- [8] 娄宏伟, 雷鑫, 陈元彩. 生物脱氮的研究进展[J]. *工业水处理*, 2019, 39(5): 1-4
Lou HW, Lei X, Chen YC. Research progress in biological nitrogen removal[J]. *Industrial Water Treatment*, 2019, 39(5): 1-4 (in Chinese)
- [9] Liao OY, Wang KJ, Liu XY, Wong MH, Hu ZL, Chen HR, Yang XW, Li SF. A study on the nitrogen removal efficacy of bacterium *Acinetobacter tandoii* MZ-5 from a contaminated river of Shenzhen, Guangdong province, China[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123888
- [10] 李嘉伟. SND 生物脱氮过程 N₂O 的产生与关键酶及其活性[J]. *广东化工*, 2015, 42(1): 91-93
Li JW. SND biological denitrification process N₂O generation and key enzymes and their activity[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(1): 91-93 (in Chinese)
- [11] He TX, Xie DT, Ni JP, Li Z, Li ZL. Nitrous oxide produced directly from ammonium, nitrate and nitrite during nitrification and denitrification[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122114.
- [12] Caranto JD, Lancaster KM. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase[J]. *PNAS*, 2017, 114(31): 8217-8222
- [13] Liu Y, Ai GM, Wu MR, Li SS, Miao LL, Liu ZP. *Photobacterium* sp. NNA4, an efficient hydroxylamine-transforming heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(1): 64-71
- [14] Hoppert M, Mahony TJ, Mayer F, Miller DJ. Quaternary structure of the hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*[J]. *Archives of Microbiology*, 1995, 163(4): 300-306
- [15] Zhao B, An Q, He YL, Guo JS. N₂O and N₂ production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 116: 379-385
- [16] Yang YL, Lin ES, Huang SB. Heterotrophic nitrogen removal in *Bacillus* sp. K5: involvement of a novel hydroxylamine oxidase[J]. *Water Science and Technology*, 2017, 76(12): 3461-3467
- [17] Zhang SM, Li WG, Zhang DY, Huang XF, Qin W, Sha CQ. Purification and characterization of a low-temperature hydroxylamine oxidase from heterotrophic nitrifier *Acinetobacter* sp. Y16[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2014, 27(7): 515-522

- [18] Liu YX, Yuan X, Liu ZY. Optimization, purification, and characterization of hydroxylamine oxidoreductase from *Acinetobacter* sp. Y1[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(4): 494-501
- [19] Zhang SM, Sha CQ, Jiang W, Li WG, Zhang DY, Li J, Meng LQ, Piao YJ. Ammonium removal at low temperature by a newly isolated heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens* wsw-1001[J]. *Environmental Technology*, 2015, 36(19): 2488-2494
- [20] 张峰峰, 周可, 谢凤行, 赵琼, 赵玉洁. *Pseudomonas alcaliphila* AD-28 的脱氮性能及其关键酶活性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2166-2174
- Zhang FF, Zhou K, Xie FX, Zhao Q, Zhao YJ. Nitrogen removal characteristic and key enzymes activity of *Pseudomonas alcaliphila* AD-28[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2166-2174 (in Chinese)
- [21] Shi Z, Zhang Y, Zhou JT, Chen MX, Wang XJ. Biological removal of nitrate and ammonium under aerobic atmosphere by *Paracoccus versutus* LYM[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 144-148
- [22] Chen MP, Ding CY, He TX, Zhang MM, Wu QF. Efficient hydroxylamine removal through heterotrophic nitrification by novel bacterium *Glutamicibacter arilaitensis* EM-H8[J]. *Chemosphere*, 2022, 288: 132475
- [23] He TX, Wu QF, Ding CY, Chen MP, Zhang MM. Hydroxylamine and nitrite are removed effectively by *Streptomyces mediolani* strain EM-B2[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 224: 112693
- [24] Moir JWB, Wehrfritz JM, Spiro S, Richardson DJ. The biochemical characterization of a novel non-haem-iron hydroxylamine oxidase from *Paracoccus denitrificans* GB17[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 319(3): 823-827
- [25] Shimamura M, Nishiyama T, Shinya K, Kawahara Y, Furukawa K, Fujii T. Another multiheme protein, hydroxylamine oxidoreductase, abundantly produced in an anammox bacterium besides the hydrazine-oxidizing enzyme[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(3): 243-248
- [26] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276
- [27] Soler-Jofra A, Pérez J, Van Loosdrecht MCM. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: a review[J]. *Water Research*, 2021, 190: 116723
- [28] Versantvoort W, Pol A, Jetten MSM, Van Niftrik L, Reimann J, Kartal B, Op Den Camp HJM. Multiheme hydroxylamine oxidoreductases produce NO during ammonia oxidation in methanotrophs[J]. *PNAS*, 2020, 117(39): 24459-24463
- [29] 陈仁杰, 谢禹, 荆肇乾. 污水新型生物脱氮强化技术研究进展[J]. *应用化工*, 2020, 49(8): 2075-2079
- Chen RJ, Xie Y, Jing ZQ. Research progress on new biological nitrogen removal intensification technology for wastewater[J]. *Applied Chemical Industry*, 2020, 49(8): 2075-2079 (in Chinese)
- [30] 唐咸来. 微生物的氨氧化作用机理研究进展[J]. *化工技术与开发*, 2008, 37(11): 36-39
- Tang XL. Study advance on mechanism of ammonia oxidization[J]. *Technology & Development of Chemical Industry*, 2008, 37(11): 36-39 (in Chinese)
- [31] Maalcke WJ, Dietl A, Marritt SJ, Butt JN, Jetten MSM, Keltjens JT, Barends TRM, Kartal B. Structural basis of biological NO generation by octaheme oxidoreductases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(3): 1228-1242
- [32] Kostera J, Youngblut MD, Slosarczyk JM, Pacheco AA. Kinetic and product distribution analysis of NO reductase activity in *Nitrosomonas europaea* hydroxylamine oxidoreductase[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(7): 1073-1083
- [33] Arciero DM, Hooper AB. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea* is a multimer of an octa-heme subunit[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(20): 14645-14654
- [34] Zahn JA, Duncan C, DiSpirito AA. Oxidation of hydroxylamine by cytochrome P460 of the obligate methylotroph *Methylococcus capsulatus* Bath[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(19): 5879-5887
- [35] Dietl A, Maalcke W, Barends TRM. An unexpected reactivity of the P460 cofactor in hydroxylamine oxidoreductase[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2015, 71(Pt 8): 1708-1713
- [36] Coleman RE, Lancaster KM. Heme P460: a (cross) link to nitric oxide[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2020, 53(12): 2925-2935
- [37] Coleman RE, Vilbert AC, Lancaster KM. The heme-Lys cross-link in cytochrome P460 promotes catalysis by enforcing secondary coordination sphere architecture[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(24): 2289-2298
- [38] Ferousi C, Schmitz RA, Maalcke WJ, Lindhoud S, Versantvoort W, Jetten MSM, Reimann J, Kartal B. Characterization of a nitrite-reducing octaheme hydroxylamine oxidoreductase that lacks the tyrosine cross-link[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100476

- [39] Klotz MG, Schmid MC, Strous M, Op Den Camp HJM, Jetten MSM, Hooper AB. Evolution of an octahaem cytochrome c protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3150-3163
- [40] Kartal B, De Almeida NM, Maalcke WJ, Op Den Camp HJM, Jetten MSM, Keltjens JT. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(3): 428-461
- [41] Fernández ML, Estrin DA, Bari SE. Theoretical insight into the hydroxylamine oxidoreductase mechanism[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, 102(7): 1523-1530
- [42] 宋琴, 许雷. 异养硝化作用酶学研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008(5): 60-62, 66
Song Q, Xu L. Advancement of enzymology of heterotrophic nitrification[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(5): 60-62, 66 (in Chinese)
- [43] 何志仙. 污水生物脱氮过程中 N_2O 的产生与相关酶活性研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学博士学位论文, 2017
He ZX. Study on nitrous oxide emission and variation of enzymes activity in activated sludge during biological nitrogen removal[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of Xi'an University of Architecture and Technology, 2017 (in Chinese)
- [44] Zhao B, Tian M, An Q, Ye J, Guo JS. Characteristics of a heterotrophic nitrogen removal bacterium and its potential application on treatment of ammonium-rich wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 226: 46-54
- [45] Wehrfritz JM, Reilly A, Spiro S, Richardson DJ. Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*[J]. *FEBS Letters*, 1993, 335(2): 246-250
- [46] Wehrfritz JM, Carter JP, Spiro S, Richardson DJ. Hydroxylamine oxidation in heterotrophic nitrate-reducing soil bacteria and purification of a hydroxylamine-cytochrome c oxidoreductase from a *Pseudomonas* species[J]. *Archives of Microbiology*, 1996, 166(6): 421-424
- [47] Ono Y, Makino N, Hoshino Y, Shoji K, Yamanaka T. An iron dioxygenase from *Alcaligenes faecalis* catalyzing the oxidation of pyruvic oxime to nitrite[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 139(2/3): 103-108
- [48] Jetten MSM, De Bruijn P, Kuenen JG. Hydroxylamine metabolism in *Pseudomonas* PB16: involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1997, 71(1/2): 69-74
- [49] Yamanaka T, Sakano Y. Oxidation of hydroxylamine to nitrite catalyzed by hydroxylamine oxidoreductase purified from *Nitrosomonas europaea*[J]. *Current Microbiology*, 1980, 4(4): 239-244
- [50] Liu XH, Peng Y, Wu CY, Akio T, Peng YZ. Nitrous oxide production during nitrogen removal from domestic wastewater in lab-scale sequencing batch reactor[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(6): 641-645
- [51] Andersson KK, Lipscomb JD, Valentine M, Münck E, Hooper AB. Tetraheme cytochrome c554 from *Nitrosomonas europaea*. Heme-heme interactions and ligand binding[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(3): 1126-1138
- [52] Yamanaka T, Shinra M. Cytochrome c552 and cytochrome c554 derived from *Nitrosomonas europaea*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1974, 75(6): 1265-1273
- [53] Irida T, Hira D, Furukawa K, Fujii T. Reduction of nitric oxide catalyzed by hydroxylamine oxidoreductase from an anammox bacterium[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(6): 616-621
- [54] Hooper AB, Terry KR. Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: production of nitric oxide from hydroxylamine[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Enzymology*, 1979, 571(1): 12-20
- [55] Pacheco AA, McGarry J, Kostera J, Corona A. Techniques for investigating hydroxylamine disproportionation by hydroxylamine oxidoreductases[J]. *Methods in Enzymology*, 2011, 486: 447-463
- [56] Arciero DM, Pierce BS, Hendrich MP, Hooper AB. Nitrosocyanin, a red cupredoxin-like protein from *Nitrosomonas europaea*[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(6): 1703-1709
- [57] Lehnert N, Musselman BW, Seefeldt LC. Grand challenges in the nitrogen cycle[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(6): 3640-3646
- [58] Wunderlin P, Mohn J, Joss A, Emmenegger L, Siegrist H. Mechanisms of N_2O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions[J]. *Water Research*, 2012, 46(4): 1027-1037
- [59] Papen H, Von Berg R, Hinkel I, Thoene B, Rennenberg H. Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO_2^- , NO_3^- , N_2O , and NO production in exponentially growing cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(8): 2068-2072
- [60] Otte S, Schalk J, Kuenen JG, Jetten MSM. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer

- Alcaligenes faecalis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(2): 255-261
- [61] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191
- [62] Zhao B, Ran XC, An Q, Huang YS, Lv QH, Dan Q. N₂O production from hydroxylamine oxidation and corresponding hydroxylamine oxidoreductase involved in a heterotrophic nitrifier *A. faecalis* strain NR[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(12): 1983-1992
- [63] Schmidt I, Van Spanning RJM, Jetten MSM. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and *NirK*- and *NorB*-deficient mutants[J]. Microbiology: Reading, England, 2004, 150(Pt 12): 4107-4114
- [64] Stüven R, Vollmer M, Bock E. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*[J]. Archives of Microbiology, 1992, 158(6): 439-443
- [65] Stein LY. Surveying N₂O-producing pathways in bacteria[J]. Methods in Enzymology, 2011, 486: 131-152
- [66] Stein LY. Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2019, 49: 9-15
- [67] Zhao B, He YL, Hughes J, Zhang XF. Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* HNR[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(14): 5194-5200
- [68] Richardson DJ, Wehrfritz JM, Keech A, Crossman LC, Roldan MD, Sears HJ, Butler CS, Reilly A, Moir JW, Berks BC, et al. The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Biochemical Society Transactions, 1998, 26(3): 401-408
- [69] Ewert J, Glück C, Strasdeit H, Fischer L, Stressler T. Influence of the metal ion on the enzyme activity and kinetics of PepA from *Lactobacillus delbrueckii*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 110: 69-78
- [70] Nishigaya Y, Fujimoto Z, Yamazaki T. Optimized inhibition assays reveal different inhibitory responses of hydroxylamine oxidoreductases from beta- and gamma-proteobacterial ammonium-oxidizing bacteria[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 476(3): 127-133
- [71] Schalk J, De Vries S, Kuenen JG, Jetten MSM. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation[J]. Biochemistry, 2000, 39(18): 5405-5412
- [72] Liu YX, Wang Y, Li Y, An H, Lv Y. Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* C16[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2015, 23(5): 827-834