

硝酸异化还原成铵的微生物学过程

殷士学 陆驹飞

(扬州大学农学院农学系 225009)

过去认为,在淹水土壤、沉积物、水体以及类似的缺氧生境中, NO_3^- 绝大部分(如果不是全部)经反硝化作用而逸失。但是近二十年的研究表明,在这些生境中 NO_3^- 可以被某些细菌还原成 NH_4^+ ,文献中称该过程为“硝酸异化还原成铵”(即 dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, 以下简称 DRNA)过程。过去一般认为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ 只能先反硝化成 N_2 ,然后再由有限的几种原核生物作用下转变成 NH_4^+ (即生物固氮作用,同化途径另当别论),DRNA 过程的确立,使我们认识到自然界氮素循环中还有一条由 NO_3^- 直接到 NH_4^+ 的短捷途径。国内对这一问题研究较少。鉴于该过程在环境科学、生态学和农学方面的意义,本文对

有关文献作一简要综述。

1 DRNA 细菌

是否能象划分反硝化菌这一生理类群一样,根据硝酸还原产物 NH_4^+ 划分出一类“DRNA 菌”生理类群呢?

Cole and Brown^[1]研究表明,在肯定可以进行 DRNA 过程的生境中,兼厌氧发酵性细菌(如 *Aeromonas*, *Enterobacteria* 等)是主导区系。经富集、分离、纯培养证明,这类细菌在厌氧条件下可以把培养基中 NO_3^- 还原为 NH_4^+ ,但在好气条件下,培养基中

国家自然科学基金和江苏省自然科学基金资助课题
1996-02-12收稿

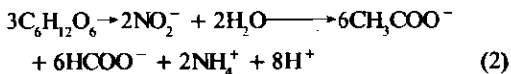
既无 NO_2^- 也无 NH_4^+ 的积累。归纳有关文献, Cole^[2]列出了已具有一定生化依据的、能进行 DRNA 过程的细菌共 11 属: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Desulfovibrio*, *Wolinella*, *Haemophilus*, *Achromobacter*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Neisseria subflava*。稍作比较便可看出, 这些细菌绝大部分不属于 Paync^[3]所列出的反硝化菌类群(*Achromobacter* 例外), 但几乎都包括在硝酸呼吸菌(将 NO_3^- 仅还原为 NO_2^- 的一类细菌)类群中。这说明按 NO_3^- 还原产物划分 DRNA 生理类群似乎可行。应当指出, 过去习用的一些术语如“硝酸呼吸”、“硝酸异化还原”、“硝酸呼吸还原”和“反硝化”等, 所表示的概念彼此有些不同程度的重叠, 微生物学家和生态学家可用同一个词指不完全相同的对象。无论如何, 可以大概地说, 那些能在厌氧条件下把 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的兼厌氧发酵型细菌为 DRNA 细菌。当然这一概括不能排除例外。

2 DRNA 过程的生理

Klebsiella K312 在氧分压为 15mmHg (大约为大气氧压的 10%), 有 15% 的 NO_3^- 被还原为 NH_4^+ , 氧分压降为零时有高达 63% 的 NO_3^- 还原成 NH_4^+ ^[1]。这似乎表明 15mmHg 的氧分压是一个临界值, 只有低于这个值才能进行 DRNA 过程。

以葡萄糖为 C 源, 以 NH_4^+ 为 N 源, C/N 为 7.6, 厌氧条件下连续培养 *E. coli* K12, 测得发酵产物为甲酸、乙醇、乙酸, 故为混合酸发酵类型:

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{HCOO}^- + 3\text{H}^+$ (1)
每分子葡萄糖产生 3 个 ATP。若仅仅将 NH_4^+ 改换成 NO_2^- , 则几乎不产生乙醇, 占主导地位的产物为甲酸和乙酸, 而且培养基中有 NH_4^+ 的积累, 细胞生长量也增加。这样由 EMP 途径形成的 NADH 原本可在乙醇形成中被氧化, 而现在则可能由 NO_2^- 的还原而被氧化, 这样发酵过程才可能继续进行:



由此可见, NADH 是 DRNA 过程的电子供体。此外, 反应式 (2) 预测甲酸产出量应等同于乙醇 + 乙酸产出量; 甲酸产出量至少是 NO_2^- 还原量的 3 倍。这些预测与试验数据能够吻合^[4]。

如果向培养基中加入微量的 Mo 和 Se, 则更多的 NO_2^- 被还原成 NH_4^+ , 同时甲酸的累积量大大减少。因

为 Mo 和 Se 是甲酸脱氢酶的活化因子, 所以这一结果似乎表明, 由甲酸脱氢酶催化的 $\text{HCCOH} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ 所释放出的电子是被用来还原更多的 NO_2^- , 因此认为甲酸也是 NO_2^- 还原成 NH_4^+ 的电子供体。

3 DRNA 酶系及其遗传调控

3.1 硝酸还原酶(NAR): 目前已查出两类异化硝酸还原酶, 一类是位于质膜上的 NAR, 另一类是溶解性 NAR。 *E. coli* K12 中位于质膜上的 NAR^[5,6] 含 α 、 β 和 γ 三个亚单位, 其分子量分别为 150kDa、60kDa 和 20kDa, 以 $(\alpha\beta\gamma)_n$ 式量组成, 其中 n 为 2 或 4。 α 、 β 两亚基位于胞质一面, γ 亚基质位于胞围一面。 Mo 和大部分非血红素 Fe 位于 α 亚基中, 亦正是 NO_3^- 还原的位点所在。 γ 亚基为含细胞色素 b_{558} 脱辅基蛋白, 是还原 NO_3^- 所必需的。 β 亚基的功能尚不完全清楚, 似乎与 α 与 γ 亚基的相互联结以及使其在质膜上正确定位有关。显然这类 NAR 与电子传递有关。

另一类 NAR 仅发现于专性厌氧的 *Clostridium Perfringens*^[7,8] 中, 是溶解性的, 只含一个亚单位非血红素铁硫蛋白, 分子量为 90kDa, 含 Mo 辅因子, 其功能与含细胞色素的电子传递无关。该酶的电子供体为铁氧还蛋白。

3.2 亚硝酸还原酶: 反硝化菌的亚硝酸还原酶是含 Cu 的金属黄素蛋白^[9,10] (*Achromobacter*, *Rhodospseudomonas*, *Pseudomonas denitrificans* 等)或者是含细胞色素 cd 的血红蛋白^[11] (*Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. perfectomarinus* 等), 这两种酶均可把 NO_2^- 直接还原成 N_2O 和 N_2 或再通过 N_2O 还原酶还原成 N_2 。

对于 DRNA 过程的 NIR 目前已知有 2 类。第一类是溶解性细胞质蛋白 (*E. coli*), 该酶为同二聚体, 每一亚单位分子量为 90kDa, 含 $2[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 或 $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ 铁-硫簇、FAD 和 sirohaem, 自身构成一个完整的电子传递链。 NADH 是唯一有效的电子供体, 通过 FAD 传给铁-硫中心, 再传递给 sirohaem, 最后交给 NO_2^- ^[12]。 Sirohaem 是一种类似血红素结构的八羧基同菌绿素, 其特征^[13]和化学结构^[14]到 70 年代才得以明确。它催化 6 电子传递反应(如 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$, $\text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-}$), 同时也催化羟胺的还原^[12]。这类 NIR 的特征与高等植物(菠菜)和真菌的同化 NIR 相似, 但是 *E. coli* 和 *Pseu-*

domonas aeruginosa 体内的同化 NIR 和异化 NIR 是由类似但彼此独立的基因所控制^[15, 16]。

另一类是胞浆周围酶, 其特征尚不清楚。所报道的几种不同细菌 (*E. coli*, *Vibrio fischeri*, *Wolinella succinogenes*, *Desulfovibrio desulfuricans*) 中该酶的分子量有些差别。它们的辅基都是六血红素 c (hexahaem, 每分子含 6 个血红素 c 型基团), 亦催化 6 电子传递反应, 电子供体可能是甲酸。早期人们认为, 低氧化还原电位的细胞色素 c_{552} 是甲酸裂解酶复合物中的一个组分, 但后来证明六血红素 c 型细胞色素中的色素可能就是 c_{552} , 而且是 NIR 酶的末端组分。其主要依据是: 依赖 NADH 的 NIR 缺陷型 *E. coli* 菌株保留了依赖甲酸 NIR 酶活性^[17, 18]; *Desulfovibrio desulfuricans* 中的细胞色素 c 为依赖甲酸 NIR 末端组分, 其结构亦与胞浆周围酶中的六血红素 c 型色素相似^[19]; 还原态六血红素 c 可迅速被 NO_2^- 氧化^[20]。

3.3 遗传调控: 对于 NAR 的遗传调控, Stewart^[21] 有详细综述。这里主要介绍关于 NIR 的遗传调控。

依赖 NADH 的 NIR 的结构基因位于 *E. coli* 染色体 74min 处, 克隆的 *nirB* 操纵子由 *nirB*、*nirC* 和 *cysG* 三个基因组成 (很可能还有一个位于 *nirB* 和 *nirC* 之间的 *nirD* 基因)。*nirB* 启动子上有一个 FNR 结合位点, -147~-87 之间的碱基是 NO_2^- 诱导所必需的; -55 下游序列是厌氧条件下 FNR 激活转录所必需的。 -55 与转录起始点之间包含一个靶位点, FNR 就是于这个区域激活 NIR 的转录。*nirB* 的启动子只有在无 O_2 的条件下才能表达^[2]。由此看出依赖 NADH 的 NIR 合成受

NO_2^- 的诱导, 受 O_2 的阻遏, 且均在结构基因的转录水平上受调控。

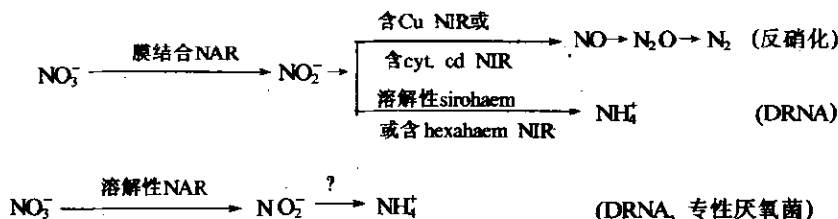
硝酸诱导 NAR 合成时, 需要 2 个转录激活蛋白, NARX 和 NARL。NARX 对 NO_3^- 敏感, 当有 NO_3^- 存在时, 立即活化 NARL, 进而转变成转录激活因子, 诱导 *nar* 操纵子全面表达。依赖甲酸 NIR 的基因 *nrf* 的表达受 NARL 的阻遏。这样, 有 NO_3^- 存在时, 依赖甲酸 *nrf* 不能表达, 还原的 NO_2^- 将沿着依赖 NADH 的 NIR 进行进一步还原; 若无 NO_3^- 存在时, 依赖甲酸的 NIR 能够表达, 进而由依赖甲酸 NIR 进行进一步还原。这恰好说明为什么 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ 有两种不同的途径。

至今一直未能分离纯化到专性厌氧的 *Clostridium perfringens* 中的 NIR, 也未能获得基因缺失突变株, 因而关于专性厌氧 DRNA 过程的遗传调控尚不明。

4 DRNA 过程 N_2O 的产生

DRNA 细菌也能产出 N_2O , 迄今报道唯一不能产出 N_2O 的菌株是 *Clostridium KDHS2*, 但一般产生量仅占 NO_3^- 或 NO_2^- 总量的 1% 左右^[22]。但 *Citrobacter C48* 的 N_2O 产出量可高达 23.5%^[23]。用选择性抑制剂研究表明产 N_2O 的酶似乎独立于 DRNA 酶系, 因而 N_2O 似乎不是 DRNA 过程的中间产物, 而是另一还原过程产物。土壤中这类细菌很多, 足以成为硝化菌和反硝化菌以外的另一种 N_2O 产源。过去把 N_2O 的产源一般仅归于硝化和反硝化两个过程^[24, 25], 看来不够全面。遗憾的是目前还没有区分不同 N_2O 产源的测定方法。

综上所述, 反硝化过程和 DRNA 过程的关系可用下图表示:



溶解性依赖 NADH 的 NIR 主要功能是提供微生物生长所需 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$; 将 NADH 氧化成 NAD^+ 以使发酵过程得以继续进行; 消除胞浆周围有毒的 NO_2^- 。相反, 膜结合依赖甲酸 NIR 主要功能是消除胞围有毒的 NO_2^- 和甲酸, 同时产生质子电化学梯度^[2]。

尽管关于 DRNA 过程的微生物学研究已取得了不少进步, 但是关于该过程在自然生境下发生的程度及

条件的研究仍相当少。淹水土壤中 DRNA 过程尤值得关注, 因为它是一个有利于保存土壤氮素的过程, 对农业有特别重要的意义。此外, DRNA 过程是一个新的 N_2O 产源, 进一步研究自然生境下 DRNA 过程, 将有助于正确评价硝化、反硝化及 DRNA 过程对 N_2O 的相对贡献, 对环境保护无疑有积极意义。

致谢 美国 Xerox Corporation, The Documen

Company 傅敏红博士为本文资料收集提供慷慨帮助, 特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Cole J A and Brown C M. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1980, 7:65~72.
- [2] Cole J A. *Denitrification in Soil and Sediment* (ed. N.P. Revsbech and J. Sorensen). Plenum Press, N. Y., 1990, pp.57~76.
- [3] Payne W J. *Bacteriol. Rev.*, 1973, 407~452.
- [4] Cole J A. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1978, 4:327~329.
- [5] MacGregor C H, Schnaitman C A, Normansell D E et al. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249:5321~5327.
- [6] MacGregor C H. *J. Bacteriol.*, 1975, 121:1102~1110.
- [7] Seki-chiba S and Ishimoto M. *J. Biochem.*, 1977, 82: 1663~1672.
- [8] Seki-chiba S, Hattori Y and Hasegawa T. *J. Biochem.*, 1977, 101: 503~510.
- [9] Iwasaki H and T Matsubara. *J. Biochem.*, 1972, 71: 645~652.
- [10] Iwasaki H and Matsubara T. *J. Biochem.*, 1975, 78: 355~361.
- [11] Matsubara T and Iwasaki H. *J. Biochem.*, 1971, 69: 859~868.
- [12] Jackson R H, Cornish-bowden A and Cole A. *Biochem. J.*, 1981, 193:861~867.
- [13] Seigel L M, Murphy M J and Kamin H. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248:251~264.
- [14] Scott A I, Irwin A. J, Seigel L M. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 100:7987~7994.
- [15] Jeter R M, Sias S. R and Ingraham J L. *J. Bacterol.*, 1984, 157:673~677.
- [16] Bonnefoy V, Burini J F, Giordano G. et al. *Mol. Microbiol.*, 1987, 1:143~148.
- [17] Abou-Jaoude A, Chippaux M and Pascal M C. *Eur. J. Biochem.*, 1979, 95:309~314.
- [18] Abou-Jaoude A, Pascal M C and Chippaux M. *Eur. J. Biochem.*, 1979, 95:315~321.
- [19] Sreenkemp D J and Peck H D. *J. Biol. Biochem.*, 1981, 256:5450~5458.
- [20] Fujita T and Sato R. *J. Biochem.*, 1966, 60:691~700.
- [21] Stewart V. *Microbiol. Rev.*, 1988, 52(2):190~230.
- [22] Bleakey B H and J M. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44:1342~1348.
- [23] Smith M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 43: 854~860.
- [24] 封克, 殷士学. 土壤学进展, 1995, 23(6):35~42.
- [25] Bremner J M and Blackmer A M. *Denitrification, Nitrification and Atmospheric nitrous oxides* (ed. C. C. Delwiche) John Wiley & Sons, Inc. N. Y, 1981, pp. 151~170.