

微生物脱氮研究进展

张德民 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 脱氮, 氮素循环

分类号 Q93-938.1

氮是蛋白质的基本组成元素, 因此氮素循环是维持生物圈的重要条件。脱氮早在一百多年前即已被人们所认识, 它是化合态氮转变成游离态氮从而构成氮素循环的主要途径, 故被认为是生物学氮循环中的关键过程之一。

脱氮作用日益受到重视的主要原因有: 1. 脱氮引起土壤肥力丧失; 2. 脱氮作用产生的一氧化氮和一氧化二氮与大气中的二氧化碳、甲烷等一起成为对臭氧层破坏和全球变暖有重要影响的因子之一; 3. 脱氮在废水处理中起着重要作用。微生物脱氮既可去除过量的硝酸根, 又刺激 BOD 的去除, 因此, 它对河流海域日益严重的富营养化的治理有着重要作用。4. 脱氮的生物学研究是阐明光合作用、好氧呼吸、厌氧呼吸之间进化起源关系的基础^[1]。

1 微生物脱氮的一般生理生化特征

脱氮有广义和狭义之分, 前者是环境学意义上的脱氮, 指任何硝酸盐或亚硝酸盐转变成含氮气体的过程。后者是微生物学意义上的脱氮, 指含氮氧化物顺序还原与电子传递磷酸化相偶联的细菌呼吸过程, 又称呼吸性脱氮, 或反硝化作用。后者是本文所要论述的内容。

呼吸性脱氮包括以下四个顺序过程: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。呼吸性脱氮有两大特征: 1. 细胞生长以硝酸盐或亚硝酸盐为呼吸链的电子受体; 2. 同时有一氧化氮、一氧化二氮或氮气的产生。脱氮作用可看作是几个生化反应的随意组合, 其中亚硝酸呼吸是脱氮的中心, 其前后都可以增加其他反应。多数脱氮菌只具有脱氮的第一个反应即硝酸盐呼吸, 从硝酸盐开始, 终止在亚硝酸盐水平上, 可能是硝酸盐呼吸菌在进化过程中丧失了所有代谢亚硝酸盐和气态含氮氧化物的后续反

应; 一些脱氮菌不能进行硝酸盐呼吸, 但可将亚硝酸盐还原成含氮气体; 有些脱氮菌只能靠一氧化二氮生长; 有些脱氮菌则把脱氮的四个顺序过程偶联起来, 即从溶解态硝酸盐开始, 以氮气结束。

脱氮是一酶学过程, 因此对催化脱氮关键步骤——亚硝酸还原的亚硝酸还原酶的研究随着人们对脱氮作用的日益重视而成为一个生物学热点。本文简述硝酸还原酶, 着重论述亚硝酸还原酶及其基因分子生物学的最新进展。

2 微生物脱氮的酶学特征

2.1 硝酸还原酶

不少脱氮菌具有两种硝酸还原酶: 同化性硝酸还原酶和异化性硝酸还原酶。这两种酶虽然催化的是同一种反应, 即将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 但是其在细胞中的位置不同, 性质不同, 功能不同, 基因不同, 生理特性也不同。脱氮作用中的硝酸还原酶为异化性硝酸还原酶, 异化性硝酸还原酶又有膜结合酶和细胞周质酶两种。

E. coli 异化性硝酸还原酶是一种膜结合蛋白, 由 $\alpha_2\beta_2\gamma_4$ 复合物组成, 含有铁及硫。 α 、 β 、 γ 亚基的分子量分别为 150kDa、60kDa、20kDa^[2]。*Rhodobacter capsulata*、*Paracoccus denitrificans* 中, 该酶在细胞周质中。在同一株 *Thiosphaera pantotropha* 中发现有两种异化性硝酸还原酶同时存在, 细胞周质酶负责好氧脱氮, 膜结合酶负责厌氧脱氮的 80%~90%^[3]。

2.2 亚硝酸还原酶

亚硝酸还原酶有两种, 即含铜型和细胞色素 cd1 型。

2.2.1 含铜型亚硝酸还原酶:该酶是一个三聚体,每个亚基分子量为36kDa,含两个铜原子。每个单体的两个铜原子,一个构成1型(“蓝色”)铜位点,另一个构成2型(“非蓝色”)铜位点。1型铜结合单体内的残基,而2型铜结合两个单体的残基。现在认为2型铜构成酶的活性中心^[1]。大多数含铜型亚硝酸还原酶的多克隆抗体之间有交叉反应。目前已从 *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligines eutrophus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Haloflex denitrificans* 中分离出含铜型亚硝酸还原酶。

2.2.2 细胞色素cd1型亚硝酸还原酶:细胞色素cd1型亚硝酸还原酶由两个相同的60kDa亚基组成。每个亚基含有一个与多肽链共价连接的色素c辅基和一个非共价连接的色素d1^[4]。色素c配位体位于蛋白的N端。所有cd1亚硝酸还原酶的基因序列都揭示出一种信号肽的存在,该信号肽与酶在周质中的定位有关^[5]。有三分之二的脱氮菌含有细胞色素cd1型亚硝酸还原酶,但从属的水平上不如铜型酶分布广泛。目前已从 *Paracoccus denitrificans* (*Thiosphaera pantotropha*), *Pseudomonas stutzeri*, *Alcaligines eutrophus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Paracoccus halodenitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* 中分离出细胞色素cd1型亚硝酸还原酶。*P.aeruginosa*的cd1亚硝酸还原酶的抗血清可以与许多其他的cd1亚硝酸还原酶强烈交叉反应。

3 微生物脱氮的分子生物学研究

3.1 基因结构

目前对脱氮酶基因的研究主要集中在亚硝酸还原酶和一氧化二氮还原酶的基因方面。迄今研究过的cd1型亚硝酸还原酶的基因均与一氧化二氮还原酶的基因在一个基因族内。研究最深入的是假单胞菌属的 *P.aeruginosa*^[6], *P.stutzeri*^[7], 和 *P.fluorescens*^[8] 中的cd1亚硝酸盐还原酶和一氧化二氮还原酶的结构基因及相关操纵子。

*P.aeruginosa*的操纵子的第一个基因是亚硝酸还原酶的结构基因 *nirS*。其下游是细胞色素c551的基因 *nirM* 和一未知色素蛋白的基因 *nirC*(ORF5)。*nirS*的上游是编码几个疏水蛋白的由 *nirQ*、ORF2、ORF3组成的操纵子,该操纵子的转录方向与 *nirS*的方向相反;ORF3的下游是一氧化氮还原酶基因 *norB* 和 *norC* 及脱氮必不可少的基因 ORF6,然后是一个反向操纵子,由 *dnr* 和

ORF7组成。

在 *P.stutzeri* 中,编码未知色素蛋白基因 *nirT* 和编码细胞色素c552的基因 *nirB* 插入在 *nirS* 和 *nirM* 之间,在其下游发现有五个开放阅读框: *nirF*, *nirD*, *nirL*, *nirG*, *nirH*, *nirFDLGH* 可能编码参与色素d1合成的多亚基、多功能酶复合体。*nirF* 与 *nirS* 之间, *nirM* 与 *nirC* 之间以及 *nirDLGH* 内都有一定的同源性。*nirFDLGH* 的插入突变引起活体或离体呼吸性亚硝酸还原酶活性的丧失。*nirFDLGH* 内的突变也较明显地降低了 *norCB* 的表达水平。*nirFDLGH* 的下游即是 *norC* 和 *norB*。与 *P.aeruginosa* 不同, *norC*、*norB* 的转录方向与 *nirS* 的方向相同。

关于铜型亚硝酸还原酶的基因知道的很少。*P.aureofaciens* 和 *Pseudomonas* sp. G-179^[9] 中 Cu-dNir 的结构基因 *nirU* 已分离出来。这两个基因推测的氨基酸序列与 *Achromobacter cycloclastes* 中相应酶的氨基酸序列可能是同源的。当 *P.sp.* G-179 的 *nirU* 基因用作探针时,它可以与大多数铜型亚硝酸还原酶的脱氮菌DNA杂交,但不能与cd1型亚硝酸还原酶的脱氮菌DNA杂交(*P.stutzeri* JM300除外)。

3.2 基因表达调控

厌氧条件下, *E.coli* 中,延胡索酸和硝酸盐还原基因的表达需要一种FNR蛋白。在依赖FNR的基因和操纵子的上游有一个保守性序列TTGATN₄ATCAA,称之为FNR盒。许多脱氮菌中也有一种由基因 *anr*(精氨酸脱氨酶和硝酸盐还原的厌氧调节)编码的蛋白ANR,其在结构上和功能上与 *E.coli* 的FNR蛋白相似^[9]。*P.aeruginosa* 的ANR缺失突变体不能在厌氧条件下以硝酸盐、亚硝酸盐和一氧化二氮生长,而野生型菌株却能在这些底物上正常生长。并且,突变体的粗提物几乎没有亚硝酸还原酶活性和一氧化二氮还原酶活性,而野生型则有很高的酶活性^[1]。Arai, H等^[7]发现,在 *P.aeruginosa* 中,除了ANR蛋白外,还有另一个转录调节子DNR。DNR与CRP/FNR类转录调节因子同源, *dnr* 突变体中,基因 *nirS*, *nirQ*, *norCB* 的启动子活性也有明显降低。

环境和生物学研究表明,脱氮途径的底物如硝酸盐、亚硝酸盐、一氧化二氮等对酶活的充分表达是必要的。这个发现最近也在基因水平上得到证实。只有精氨酸条件下厌氧生长的细胞与厌氧脱氮条件下生长的

细胞相比,反硝化相关的操纵子表达水平低得多^[10]。这表明含氮氧化物底物激活亚硝酸还原酶基因的转录。

4 微生物脱氮的分子生态学研究

据 Zumft 的统计^[11],有超过五十个属的 130 多种细菌具脱氮作用,其中数量最多的属是 *Pseudomonas*(28 种)、*Neisseria*(13 种)、*Bacillus*(12 种)。但绝大多数有关脱氮菌的种类及生理生化的认识是在实验室纯培养条件下得到的,确定自然环境下脱氮菌脱氮活性的诱导和表达所需的具体环境条件更具有实际意义。亚硝酸还原酶由于在脱氮作用中的关键作用而成为鉴别和定性分析脱氮菌的功能性探针,而不必考虑细菌的种属特征。测定该酶蛋白是否存在可推断在自然环境中脱氮过程是否发生,这对于研究由于脱氮引起的氮素流向与环境调节是非常有意义的。Coyne 和 Smith 等人在亚硝酸还原酶的抗体探针及 DNA 探针上做了一些工作。但研究结果表明,象亚硝酸还原酶这样的保守性蛋白作为探测脱氮菌的功能性通用探针也有一定的局限性^[12]。

5 微生物脱氮在废水处理中的应用

近年来,沿岸海域和湖泊的富营养化已成为很大的社会问题。因此,从工业废水和生活废水中除去氮、磷等元素,引起了国内外环境科学工作者的重视。利用微生物在好氧条件下的氨化和硝化作用,在厌氧条件下的反硝化作用,发展了许多不同形式的生物脱氮技术。常规使用的技术为活性污泥脱氮法;有采用三相污泥方式、二相污泥方式和单项污泥方式。单项污泥方式中又分为回流循环式、替换曝气式和间歇曝气式。最近,日本采用改进活性污泥循环法除去生活污水中的氮,可使除氮率达 60%~70%^[13]。我国文一波^[14]在 A—A/O(厌氧、缺氧/好氧)系统对焦化废水的生物脱氮进行了研究,硝化效果达 98%~99%,除氮效果在 75% 以上。

日本有人^[15]用海藻酸盐或 PVA 固定化光合细菌细胞,用来处理鱼塘水,除去 BOD 和硝态 N。固定化细胞消耗硝酸盐,逸出氮气,有 NO₂ 的暂时积累。固定化的细胞可以利用各种有机化合物作为电子供体进行脱氮。

参 考 文 献

- [1] Ye R W, Bruce A A, James M T. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 1053~1058.
- [2] Stewart B. Microbiol Rev, 1988, 52: 190~232.
- [3] Bell L C, Richardson D J, Ferguson S J. FEBS Lett, 1990, 265: 85~87.
- [4] Weeg-Aerssens F, Wu W, Ye R W et al. J Biol Chem, 1991, 266: 7496~7502.
- [5] Jungst A, Wakabayashi S, Matsubara H et al. FEBS Lett, 1991, 279: 205~209.
- [6] Arai H, Igarashi Y, Kodama T. FEBS Lett, 1995, 371: 71~76.
- [7] Palmedo G, Seither P, Komer H et al. Eur J Biochem, 1995, 232: 737~746.
- [8] Ye R W, Arunakumari A, Averill B A et al. J Bacteriol, 1992, 174: 2560~2564.
- [9] Ye RW, Fries M R, Serguei SG et al. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 250.
- [10] Arai H, Igarashi Y, Kodama T. FEBS Lett, 1991, 288: 227~228.
- [11] Zumft W G. In the Prokaryotes. 2nd. 1992, vol. 1(below, A., Truper, HG., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, L. H., eds) pp. 554~582. springerverlag, Heidelberg.
- [12] Ward B B. Arch Microbiol, 1995, 163: 167~175.
- [13] 许京文. 日本生活污水处理技术的趋向, 上海环境科学, 1995, 14(2): 38~40.
- [14] 文一波, 张辉明, 钱 易. 环境科学, 1992, 1(3): 45~50.
- [15] Shen J, Osamu H. J Ferment Bioeng, 1993, 75(1): 43~47.