

硝化细菌中亚硝酸盐氧化还原酶的研究进展

张星 林炜铁* 朱雅楠

(华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510006)

摘要: 亚硝酸盐氧化还原酶(nitrite oxidoreductase, NXR)是硝化细菌将亚硝酸盐氧化为硝酸盐的关键酶,广泛存在于亚硝酸盐氧化菌中。由于它是可溶性的膜内酶,其催化机理与膜内电子传递密切联系,给它的研究带来了一定的困难。本文综述了多年来国内外研究者从不同方面对NXR研究的成果,详细论述了NXR的组成结构、工作机理以及不同因子对其活性的影响,总结了近几年应用于研究NXR的新方法,并展望了对NXR研究的发展方向及其意义。

关键词: 亚硝酸盐氧化还原酶, 催化机理, 硝化细菌

Research Progress of Nitrite Oxidoreductase in Nitrobacteria

ZHANG Xing LIN Wei-Tie* ZHU Ya-Nan

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract: Nitrite oxidoreductase (NXR) is the key enzyme responsible for the oxidation of NO₂⁻ to NO₃⁻ in nitrite-oxidizing bacteria. Since NXR is a dissoluble enzyme, located at the inner side of the membranes of cells, its function is dependent on the electron transfer chain related to membranes. This paper reviews the advances in study on NXR, including the structure, catalysis mechanism and the impact of different factors. New techniques applied in recent studies and research prospects are also presented.

Keywords: Nitrite oxidoreductase, Catalysis mechanism, Nitrobacteria

硝化作用是由硝化细菌的两个关键共生菌群相互作用来实现的,分别是亚硝化细菌即氨氧化细菌,利用体内的氨单加氧酶和羟胺氧还原酶将氨氮转化为亚硝酸盐,氨作为其唯一氮源;硝化细菌即亚硝酸盐氧化细菌(*Nitrite-oxidizing bacteria*, NOB)利用亚硝酸氧还原酶将亚硝酸盐氧化为硝酸盐,亚硝酸盐作为其唯一氮源^[1]。其中亚硝酸盐氧化菌是由进化上截然不同的4类菌构成:硝化杆菌属(*Nitrobacter*)属于变形菌纲的γ亚纲,硝化球菌属(*Nitrococcus*)属于γ亚纲,硝化刺菌属(*Nitrospina*)属于β亚纲、硝化螺菌属(*Nitrospira*)属于硝化螺菌门(phylum Nitros-

pira)^[2]。

近几年随着研究的深入,氨氧化菌体内的两种酶被广泛研究并取得了一定的成果,而亚硝酸盐氧化还原酶一步催化反应则未受到广泛重视,国内外对于其作用机制的研究尚处于起步状态。但是,亚硝酸盐氧化细菌在水体治理过程中的作用同样不可忽略。亚硝酸盐氧化菌作为降解水体中对生物体具有毒害作用的亚硝酸盐的关键菌群^[3],对其催化亚硝酸盐氧化还原反应的关键酶的研究具有重要意义,研究其降解效率的调节机制,促进其降解效率提高具有极其重要的理论与实践意义。

1 NXR 概述

亚硝酸盐氧化还原酶(nitrite oxidoreductase, NXR)是硝化细菌将亚硝酸盐氧化为硝酸盐的关键酶。但由于其为可溶性酶, 又是膜内酶, 位于细胞膜靠近胞质的一侧, 它的催化反应与膜内电子传递链紧密相关, 因此给 NXR 的研究带来了很大困难。

由于亚硝酸盐氧化还原酶既具有氧化亚硝酸盐的功能性亚基, 又具有将硝酸盐还原的功能性亚基, 因此它是一个具有多重功能的酶, 既可以催化亚硝酸盐的氧化, 还可以催化硝酸盐的还原。从能量代谢的角度讲, 此酶可以根据氧化还原反应的电势逆向工作。从宏观的角度讲, 不同的外界环境可以诱导NXR的不同功能, 使菌株进入不同的代谢途径, 比如缺氧条件下它可将硝酸盐还原^[4]。

由于硝化细菌在进化上的系统发育异源性, 其体内所含的亚硝酸盐氧化还原酶也呈现出多态性。通常对亚硝酸盐氧化菌混合培养时, 硝化杆菌是其中的优势菌种, 故研究者多以硝化杆菌为代表对亚硝酸盐氧化还原酶进行研究。硝化杆菌属又以 *Nitrobacter hamburgensis*、*N. winogradskyi*、*N. alkalicus* 以及 *N. vulgaris* 等几种菌较为常见。因此, 对 NXR 多态性以及根据 NXR 基因序列分析硝化细菌系统发育也是重要的研究方向。

2 NXR 的结构与功能

2.1 NXR 的结构

1984 年 Sundermeyer 等人率先从 *Nitrobacter hamburgensis* 中分离出了 NXR。证明了此酶是由 3 个分子量分别为 115 kD、65 kD 和 32 kD 的 3 种蛋白构成的^[5]。但在接下来的研究中发现, 第 3 种蛋白即分子量为 32 kD 的蛋白并不存在于经热处理后的 NXR 中^[6]。1990 年 Bock 等人^[7]的研究证实了 *N. winogradskyi* 以及 *N. vulgaris* 中的 NXR 具有几乎相同分子量的类似蛋白亚基。1998 年 Spieck E 等人^[8]通过热处理细胞膜将关联膜的整个亚硝酸盐氧化系统从一株 *Nitrospira moscoviensis* 中分离出来。电子显微镜观察纯化后的酶显示了大概 7 nm×9 nm 的均匀颗粒, 并识别出了含 b 型细胞色素的 β 亚基类似物, 这与硝化杆菌中发现的 β 亚基蛋白一致。故通常认为 NXR 是由一个 α 亚基(大亚基)和一个 β 亚基(小亚基)组成的异源二聚体, 两个亚基的 *Mr* 分

别为 116 kD(NxrA)和 65 kD(NxrB)。NXR 复合体还含有铁、钼、硫和铜离子, 是一直径大约为 $95 \text{ \AA} \pm 30 \text{ \AA}$ 的颗粒, 其中 NxrB 的双核中心含无血红素的铁离子。

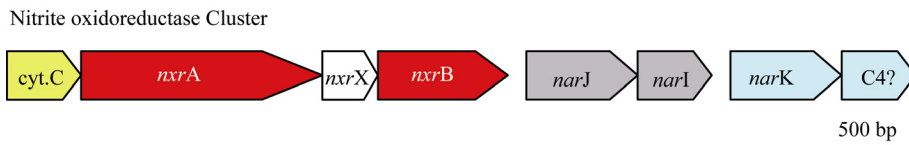
NXR的这种亚基组成和催化硝酸盐还原的能力与异化硝酸盐还原酶非常相似。其中NxrA和NxrB是异养脱氮菌中NarG、NarH多肽的同系物, 由硝酸盐还原酶A的大小亚基组成。NXR是膜内酶, 在细胞膜近胞质的一面, 但至今未检测出NxrA和NxrB的信号肽。根据TOPPRED和TMPRED对其基因序列的分析, 可能 α 亚基上有 2 个或 3 个跨膜的 α 螺旋转角将NXR定位在细胞质膜上^[9]。

2.2 NXR 的功能

由于传统方法的热处理溶解提取蛋白的方法会使NXR在纯化过程中发生变化, 因此越来越多的研究者使用生物信息学方法研究NXR, 从基因序列推测其蛋白组成、结构以及功能。由于NXR基因的多态性, 其基因序列在不同菌株中略有差别^[10], 但至少含有 2 个功能性基因: *nxrA*和*nxrB*分别对应大小两个亚基, *nxrA*约为 3000 bp、*nxrB*为 1539 bp, 受亚硝酸及硝酸诱导表达^[11]。*nxrA*和*nxrB*与大肠杆菌的异化硝酸盐还原酶基因*nrA*、*nrZ*的 α 亚基和 β 亚基有较高的相似性, 在氨基酸序列上分别可以达到 60% 和 65%的相似性。由*nxrB*推测出NxrB含有 4 个与细菌的铁氧化还原蛋白的铁-硫中心非常同源的半胱氨酸残基串。

2006 年, 首个亚硝酸盐氧化菌——*Nitrobacter winogradskyi*-Nb255 的全基因组序列得到破译^[9], 为通过序列分析研究亚硝酸盐氧化过程提供了充足的信息。研究表明, *N. winogradskyi*中的*nxr*基因簇除了*nxrA*与*nxrB*以外还有一个 648 bp 的*nxrX*基因, 推测*nxrX*基因可能与NXR的空间折叠构象有关。DNA序列分析表明, 它们在染色体上相邻排列: *nxrA*、*nxrX*、*nxrB*, 形成一个基因簇。这个*nxr*基因簇和与其相邻的 4 个其他基因(可能有NXR的附属作用)形成了一个操纵子(图 1), 但其调控机理仍待研究。

*nxrA*上游的基因编码一种与亚硝酸盐氧化还原有关的c型细胞色素, 它还可能是电子传递系统的一部分, 电子通过亚硝酸盐氧化还原酶的组分细胞色素a1、c1 释放出来, 然后改用细胞色素c氧化酶(Cox)穿过细胞色素c550^[13]。NxrB的下游, 两个

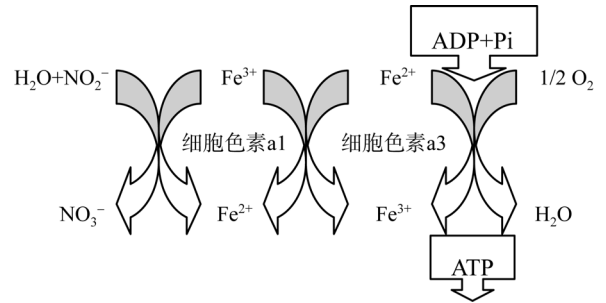
图1 *nxr*基因簇操纵子^[9]Fig. 1 Nitrite oxidoreductase Cluster^[9]

基因编码NarJ和NarI这两个与异养脱氮菌的异化硝酸盐还原酶类似的亚基^[12]。NarJ是硝酸盐还原酶的 δ 亚基，插入硝酸盐还原酶A的钼辅助因子^[14]，可能在NxrA的合成中扮演类似角色。NarI(硝酸盐还原酶的 γ 亚基)是一个b型细胞色素，作为苯钼的电子受体和钼辅助因子 α 亚基的电子供体。Nxr族的最后两个基因认为编码类似NarK的硝酸盐/亚硝酸盐运载体和C4 二羧酸/苹果酸或碲的运载体。NarK是一个运载体的主要推进子超家族的膜，有报道认为它是一个NO₃-H共输送体，一个NO₃-NO₂反向转运体，一个亚硝酸盐单输送体。亚硝酸盐的主动吸收或硝酸盐的输出对于维持NXR的工作效率非常重要，其作用机制仍有待研究。

3 NXR 的工作机理

亚硝酸氧化菌将NO₂⁻氧化为NO₃⁻，产生ATP和NADH，并通过卡尔文循环固定CO₂。亚硝酸盐氧化还原酶(NXR)催化亚硝酸氧化为硝酸，通过呼吸链的氧化磷酸化产生还原剂(NADH)。原子示踪实验证明亚硝酸盐好氧氧化过程中，产物硝酸盐中的氧原子来自于水。亚硝酸氧化酶(NXR)位于细胞的呼吸颗粒上，与膜紧密结合，因为能量的需要，参与此过程的细胞色素不是C型，而是a型，整个体系称为“亚硝酸氧化酶”，整个反应至今未检出任何中间产物，是一步完成的(图2)^[15]。

这种利用无机物的化能自养代谢过程，各反应的还原电势都比较高： $E'(\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+) = 340 \text{ mV}$ ， $E'(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-) = 430 \text{ mV}$ ，因此欲使无机基质的氧化和NAD的还原相偶联，必须提供一定的能量，而细菌的氧化磷酸化效率很低，NAD还原过程产生1分子NADH需消耗3分子ATP，然而实际情况是氧化1分子亚硝酸盐只产生1分子的ATP，因此为获得合成细胞所需的还原力，必须消耗大量ATP，这就是硝化细菌生长慢、世代时间长、细胞产率低的原因。

图2 亚硝酸盐氧化过程的电子传递示意图^[15]Fig. 2 Electron transfer sketch map of nitrite oxidation^[15]

4 环境因素对NXR的影响

NXR是与膜偶联的酶，一旦分离出细胞膜即失去了酶活性，故对NXR酶催化氧化反应活性的研究至今仍以亚硝酸盐氧化菌降解亚硝酸盐的能力来表达。

4.1 抑制剂的影响

硝化反应的主体和反应中间产物，如游离氨、亚硝酸盐、硝酸盐，都会对硝化反应产生抑制作用，其中被研究者们广泛认可的是游离氨(free ammonia, FA)。早在30年前Anthonisen等人就指出FA和游离亚硝酸(FNA)对硝化反应有抑制作用，并且这种抑制受到pH值、温度等的影响。之后有很多研究者考察和验证了FA的这种选择性抑制作用，不过对FA的浓度有不同的结果。在FA对亚硝态氮聚集影响的研究中，一个值得注意的问题是亚硝酸盐氧化菌对这种抑制的适应性。研究发现，亚硝酸盐氧化菌虽然较氨氧化菌对FA的抑制作用敏感，但在长时间与游离氨接触后，可产生适应性从而使受到抑制的代谢系统得到恢复。最新的研究中，Vel M Vadivelu等人^[16]使用一种新的研究方法，解除了菌体生长和能量代谢间的偶联关系，通过对硝化杆菌富集培养过程中化学量的监测得出，游离氨对菌体硝化作用的抑制非常明显，另一项实验证实了是FNA而非亚硝酸盐对菌体能量代谢有明显的抑制作用^[17]。

亚硝酸盐通过 NXR 的氧化是可逆的, 而且 NXR 可以催化硝酸盐还原为亚硝酸盐; 这种转化被认为是维氏杆菌执行脱氮作用(反硝化作用)路径的一部分。但硝酸盐和亚硝酸盐对NXR的调控并不是简单的底物诱导和产物抑制, NXR的催化方向受到外界环境因素尤其是溶氧量的影响。对于自养型亚硝酸盐氧化菌, 亚硝酸盐是降解NAD的电子供体, 它能够倒转电子流并通过氧化磷酸化产生ATP, 有机能型的菌株生长比亚硝酸盐作为能量来源时明显减慢。而对于兼性异养的亚硝酸盐氧化菌*N. winogradskyi*在缺氧或碳源不足的条件下更容易形成降解硝酸盐的短程硝化代谢回路^[4]。

4.2 环境因子的影响

环境因子变化对硝化能力也有不容忽视的影响。1999年王歆鹏等人^[18]研究了不同环境因子变化对硝化菌群的增殖能力及其对硝化作用活性的影响, 认为温度、pH、供氧状况、无机碳源浓度等对于硝化细菌菌群的增殖能力及硝化作用活性具有较重要的影响, 而含盐量高低几乎无影响。2005年, 琚姝等人^[19]对一株亚硝酸盐氧化菌做了详细的研究, 实验得出菌体生长的最适pH值为8.0~8.5, 在适宜的氮、碳源条件下, 经过9d的培养能够收获 4.6×10^9 MPN/mL浓度的菌体。培养18d后, 培养基中 4.05×10^4 mg/L的 NaNO_2 可完全转化为 NO_3^- 。NaCl含量在0.5%以下、葡萄糖含量在0.1%以下时对菌体生长不构成影响。2005年陈旭良等人^[20]剖析了pH对生物硝化的影响以及与碱度的关系, 认为pH不仅影响硝化细菌的生长和代谢, 也影响硝化基质和产物的有效性和毒性, 可制约生物硝化反应器的效能。生物硝化系统的碱度主要由碳酸盐类组成, 因为碳酸盐系统在pH 6.5~8.5时缓冲强度较弱, 硝化过程中极易发生pH大幅度波动, 操作中应予以高度关注。2007年Tyson RV等人研究了培养基中各营养成分、硝酸盐以及pH对硝化速率的影响^[21]。Kim等人结合FISH技术鉴定硝化细菌种群分布, 研究了温度和游离氨对垃圾渗滤液中硝化作用和亚硝酸盐累积的作用^[22]。

NxrB的双核中心含无血红素的铁离子而非铜离子, 且NxrB中有4个谷氨酸残基用来协调无血红素铁配基, 故铁离子对NXR的降解效率也应有相当大的影响^[23]。铝是在由氨氮氧化为亚硝氮的过程中对其关键酶有极其明显的影响作用, 有研究表明亚硝酸盐氧化酶的活性也依赖于铝的存在^[8]。

5 展望

随着生物技术的发展, 新的研究方法不断应用于NXR的研究。Aamand等人^[24]制备出3种针对硝化杆菌中NXR的单克隆抗体: hyb153.1和153.3可识别分子量为64 kD的蛋白即 β 亚基, 153.2能识别分子量为115 kD的蛋白即 α 亚基, 开创了免疫分析法鉴定NXR蛋白的方法。靶标为NXR基因序列的PCR技术也逐渐成熟, 并与DGGE等其它分子生物学技术相结合, 用于研究系统发育^[25]以及种群结构中亚硝酸盐氧化菌的定性定量^[26]。最近Li Jun-Wen等人^[27]将DNA-Shuffling技术应用于NXR的研究, 以解决亚硝酸盐氧化菌生长缓慢酶浓度低带来的困扰。

目前, 水体的富营养化已经成为世界环境最为突出的问题之一, 利用硝化细菌代谢分解含氮有害物质已成为世界公认最经济最有效的绿色途径之一。但由于NXR的特殊性, 对其主要研究仍停留在定性定量的工作上, 对于其氧化还原反应具体作用机理及过程仅有一些国外研究者提出的猜想与假设, 至今未能有充分的解释, 因此也给提高亚硝酸盐氧化酶活性带来难度。为此, 笔者认为应该从以下几个方面加强对NXR的研究:

- (1) NXR的亚基组成已确定, 但其三维结构以及与铁、铝等辅助因子的结合形式仍不甚清楚。X射线衍射晶体结构分析法是研究蛋白质三维结构的最主要手段, 可用于测定酶的高分辨率三维结构, 并通过与底物类似物结合形成复合物的结构分析来研究NXR与辅助因子的结合形式。
- (2) 利用先进的分子生物学技术以及生物信息学的方法, 从基因序列的层面进行分析, 对NXR基因的转录、翻译以及酶合成的调节机理进行更深入的研究具有重大的理论意义。
- (3) 从宏观上进一步研究各种环境因子和抑制剂对NXR活性影响, 以及产生影响的原因, 从微观上探讨酶与底物分子的相互识别及其催化机理, 以期找到提高酶活性的最有效途径。
- (4) 作为复杂的多功能酶, NXR既具有氧化能力又具有还原能力, 若能精确控制其催化能力则应用价值倍增, 故应加强应用方面研究, 以期找到人工诱导其不同功能发挥的最适条件。

作为降解有毒物质亚硝酸盐的关键酶, NXR不仅已应用于水体污染综合治理, 以及养殖水体防止鱼虾中毒, 更可应用于人类的食品饮品中去除亚硝

酸盐。因此,对NXR的基础研究,不仅开拓了膜内酶的研究先例,有着重要的理论意义,更为今后能够更好地利用该酶为人类生产生活做贡献打下理论基础。

参 考 文 献

- [1] 郑平,冯孝善.硝化作用的生化原理.微生物学通报,1999,26(3):215-217.
- [2] Stackebrandt E, Goebel B, Taxonomic M. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 846-849.
- [3] Antonio T, Carlos M. Environmental impacts of intensive aquaculture culture in marine waters. *Water Research*, 2000, 34(1): 334-342.
- [4] Feray C, Montuelle B. Competition between two nitrite-oxidizing bacterial populations: a model for studying the impact of wastewater treatment plant discharge on nitrification in sediment. *FEMS microbiology ecology*, 2002, 42(1): 15-23.
- [5] Sundermeyer-Klinger H, Meyer W, Warninghoff B, et al. Membrane-bound nitrite oxidoreductase of nitrobacter: evidence for a nitrate reductase system. *Arch Microbiol*, 1984, 140: 153-158.
- [6] Meincke M, Bock E, Kastrau D, et al. Nitrite oxidoreductase from nitrobacter hamburgensis: redox centers and their catalytic role. *Arch Microbiol*, 1992, 158: 127-131.
- [7] Bock E, Koops H, Moller U, et al. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. Nov. *Arch Microbiol*, 1990, 53: 105-110.
- [8] Spieck E, Ehrich S, Aamand J, et al. Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Archives of Microbiology*, 1998, 169(3): 225-230.
- [9] Starkenburg S, Chain P, Sayavedra-Sotoet L, et al. Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Applied and Environmental microbiology*, 2006, 72(3): 2050-2063.
- [10] Poly F, Wertz S, Brothier E, et al. First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(1): 132-140.
- [11] Kirstein K, Bock E. Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. *Arch Microbiol*, 1993, 160: 447-453.
- [12] Zumft W, Korner H. Enzyme diversity and mosaic gene organization in denitrification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 71: 43-58.
- [13] Yamanaka T. Mechanisms of oxidation of inorganic electron donors in autotrophic bacteria. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 569-574.
- [14] Vergnes A, Gouffi-Belhabich K, Blasco F, et al. Involvement of the molybdenum cofactor Biosynthetic machinery in the maturation of the *Escherichia coli* nitrate reductase. *A J Biol Chem*, 2004, 279: 41398-41403.
- [15] 赵丹,任南琪,马放,等.生物脱氮微生物学及研究进展.哈尔滨建筑大学学报,2002,10:61-62.
- [16] Vadivelu VM, Keller J, Yuan Z. Effect of free ammonia on the respiration and growth processes of an enriched Nitrobacter culture. *Water Research*, 2007, 41: 826-834.
- [17] Vadivelu VM, Yuan Z, Fux C, et al. The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched nitrobacter culture. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(14): 4442-4448.
- [18] 王歆鹏,陈坚,华兆哲,等.硝化菌群在不同条件下的增殖速率和硝化活性.应用与环境生物学报,1999,5(1):64-68.
- [19] 琚姝,周长林,窦洁.高硝化活性亚硝酸盐氧化细菌的培养和应用研究.微生物学通报,2005,32(5):56-61.
- [20] 陈旭良,郑平,金仁村,等.pH和碱度对生物硝化影响的探讨.浙江大学学报(农业与生命科学版),2005,31(6):755-759.
- [21] Tyson RV, Simonne EH, Davis M, et al. Effect of nutrient solution, nitrate-nitrogen concentration, and pH on nitrification rate in Perlite medium. *Journal of Plant Nutrition*, 2007, 30(4-6): 901-913.
- [22] Kim DJ, Lee D, Keller J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology*, 2006, 97(3): 459-468.
- [23] Richardson D. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 2000, 146: 551-571.
- [24] Aamand J, Ahl T, Spieck E. Monoclonal antibodies recognizing nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter hamburgensis*, *N winogradskyi* and *N vulgaris*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(7): 2352-2365.
- [25] Vanparys B, Spieck Eva, Heylen K, et al. The phylogeny of the genus Nitrobacter based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(4): 297-308.
- [26] Wertz S, Poly F, Le Roux X, et al. Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like nxrA sequences in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(2): 261-271.
- [27] Li JW, Zheng JL, Wang XW, et al. Directed molecular evolution of nitrite oxido-reductase by DNA-shuffling. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2007, 20(2): 111-118.