

异养硝化机理的研究进展

何 霞, 吕 剑, 何义亮*, 赵 彬, 李春杰

(上海交通大学环境科学与工程学院 上海 200240)

摘 要 :硝化作用是自然界氮素循环的一个重要环节。除了传统上的自养硝化细菌以外, 至今为止已发现许多异养微生物可以进行硝化作用。异养硝化已成为环境领域的热点问题。简要的介绍了自然界中的异养硝化微生物的分布以及针对其生物多样性而建立的探测和分离方法。着重从异养硝化的关键酶、相关基因、电子传递及代谢途径这几个方面综述了异养硝化机理的研究进展。最后总结了目前在研究异养硝化机理过程中存在的问题, 并对其今后进一步的研究方向做出了展望。

关键词 :异养硝化作用; 异养硝化微生物; 机理

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0844-04

与传统自养硝化作用不同, 异养硝化作用的底物可以是无机态氮或有机态氮。有研究者提出较为严格的异养硝化作用的定义为^[1]: 异养微生物在好氧条件下将氨/铵或是氧化态-3 的有机态氮氧化到羟胺、亚硝酸盐和硝酸盐的过程。在深入了解传统硝化作用的同时, 越来越多的研究围绕异养硝化展开。杜睿等^[2]对内蒙古草原土壤 N₂O 产生的机理进行研究, 发现异养硝化作用是主要原因。温东辉等^[3]认为在污水脱氮过程中, 异养硝化与自养硝化相比有其自身优点, 更利于治理高氮低碳废水。杨凤林等^[4]发现异养硝化菌也是高效活性污泥中的重要组成部分。在国外, 在研究异养硝化在处理高氮污水脱氮过程中的应用^[5], 异养硝化对温室效应气体 N₂O 的贡献^[6], 土壤氮素循环中的异养硝化^[7]等问题的同时, 对异养硝化机理也进行了深入研究。而国内对异养硝化机理的研究则起步较晚, 相关研究和论述也不够深入。为此, 本文从异养硝化作用的微生物、关键酶及其基因、电子传递、代谢途径这几方面对异养硝化机理进行了较为系统的论述。

1 环境中的异养硝化微生物

异养硝化微生物分布广泛, 土壤、污泥、湖水、深海火山口等处发现了多种具有硝化活性的异养硝化微生物, 包括细菌、放线菌、真菌, 甚至是藻类^[8]。真菌被认为是数量最大效率最高的异养硝化微生物^[9]。然而在实验室的培养中, 细菌也表现出了较好的异养硝化能力。Kuener^[10]总结了一些常见的异养硝化菌(表 1)。

由于异养硝化菌的代谢活动范围远大于自养硝化菌, 再加上异养硝化菌的生物多样性, 使得对其探测、分离、纯化变得困难。常用的方法是以有机底物为介质进行选择培养,

经过多次富集分离, 从而得到目的菌株, 张光亚等^[11]从土壤分离到一株名为 *Rhodococcus* sp. HN 的异养硝化菌。我们从膜生物反应器中分离出了异养硝化菌 *Bacillus* sp. LY^[12], 该菌株对污水中的总氮和 COD 有较高的去除率^[13]。利用相关的功能基因检测异养硝化菌的存在是目前的研究方向^[14], 随着研究的深入, 更多的异养硝化菌将被分离纯化出来, 从而更有利于异养硝化机理的深入研究。

表 1 常见的原核和真核异养硝化菌

Table 1 Examples of prokaryotic and eukaryotic heterotrophs which nitrify

Species	Substrate	Product
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Ammonium	Hydroxylamine
<i>Aspergillus flavus</i>	Ammonium	Monohydroxamic acid
<i>Streptomyces</i> sp.	Ammonium	Monohydroxamic acid
<i>Mycobacterium phlei</i>	Ammonium	Dihydroxamic acid
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Ammonium	Dihydroxamic acid
<i>Rhodotorula</i> sp.	Ammonium	Dihydroxamic acid
<i>Ustilago sphaerogena</i>	Ammonium	Trihydroxamic acid
<i>Neurospora crassa</i>	Ammonium	Trihydroxamic acid
<i>Streptomyces griseus</i>	Ammonium	Trihydroxamic acid
<i>Thiosphaera pantotropha</i>	Ammonium	Nitrite*
<i>Proteus</i> sp.	Hydroxylamine	Nitrite
<i>Alcaligenes</i> sp.	Oximes	Nitrite*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aliphatic nitro compounds	Nitrite
<i>Flavobacterium</i> sp.	Aromatic nitro compounds	Nitrite
<i>Nocardia</i> sp.	Aromatic nitro compounds	Nitrite
<i>Chlorella</i> sp.	Ammonium	Nitrate
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Ammonium	Nitrate
<i>Aspergillus wentii</i>	Nitrite	Nitrate
<i>Aspergillus flavus</i>	Aliphatic nitro compounds	Nitrate
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aromatic nitro compounds	Nitrate

* Bacteria known to simultaneously denitrify to N₂O or N₂.

基金项目: 国家自然科学基金(50478019)

* 通讯作者。Tel: 86-21-54745634; Fax: 86-21-54740825; E-mail: ylhe@sjtu.edu.cn

作者简介: 何 霞(1982-), 女, 广西桂林人, 硕士研究生, 研究方向为水污染控制。E-mail: hex@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-17; 接受日期: 2006-02-17; 修回日期: 2006-02-22

2 异养硝化作用的关键酶及其基因

异养硝化机理研究的重点是异养硝化作用的关键酶及其基因。研究发现^[15]异养硝化菌在代谢底物时,有着与自养硝化菌相似的酶系统,即先由氨单加氧酶(Amonia monooxygenase, AMO)催化铵氧化,得到羟胺,然后由羟胺氧化酶(Hydroxylamine oxidase, HAO)催化进一步氧化得到亚硝酸。氨单加氧酶和羟胺氧化酶就是异养硝化菌代谢过程中的关键酶,与之相对应的是 *amo* 和 *hao* 基因。

2.1 氨单加氧酶(AMO)

在对异养硝化菌 *T. pantotropha* 的 AMO 的研究中发现, *T. pantotropha* 的 AMO 有很多特性与自养硝化菌相似。但是,与自养硝化菌不同, *T. pantotropha* 的 AMO 需要 NADPH 作辅酶,对光敏感,镁离子能刺激其活性^[16]。并且,该酶对羟胺敏感程度远大于自养硝化菌^[17]。

Moir 等^[18]在研究异养硝化菌 *Paracoccus denitrificans* 时,获得了部分纯化的 AMO。这个酶含有 2 个亚基,大小分别是 38kDa 和 46kDa,与欧洲亚硝化单胞菌(自养硝化菌)的 AmoA 和 AmoB 相似,与产甲烷菌 *Methylococcus capsulatus* 的 PmoA 和 PmoB 同源。纯化的酶是一种醌醇氧化酶,受到光与多种整合剂抑制,有一个易变的铜离子中心,能被二价铜离子激活。与欧洲亚硝化单胞菌不同,1mmol/L 的乙炔并不能抑制 *Paracoccus denitrificans* 中该酶的活性,这可能是由于乙炔不能进入该酶的活性位点。因此,乙炔有可能被用于区分环境中异养硝化菌和自养硝化菌。

2.2 羟胺氧化酶(HAO)

从自养硝化菌中纯化的羟胺氧化酶是一个多体蛋白,然而 Wehrfritz 等^[19]从 *T. pantotropha* 中纯化的 HAO 是一种溶解性的单体周质酶,20kDa,铁离子能提高其活性,整合剂 EDTA

会抑制其活性。这个酶与自养硝化菌的 HAO 有很大的不同,它可以使用周质还原蛋白、细胞色素 *c*₅₅₁ 和亚硝酸盐还原酶作为反硝化酶。

研究者还从 *Arthrobacter globiformis*、*Pseudomonas* sp.^[19,20] 中获得了部分纯化的 HAO,发现它们与自养硝化菌的 HAO 有明显的不同(1)异养硝化菌的 HAO 结构相对简单,只是一个单体蛋白(2)异养硝化菌的 HAO 酶中都不含有血红素,含有非血红素 Fe 的 HAO 可能在异养硝化菌中广泛分布^[21](3)两者可能没有序列同源性。

2.3 *amo* 和 *hao* 基因

异养硝化菌 *amo* 和 *hao* 基因的研究是建立在与自养硝化菌对应基因相比较的基础上。Daum^[22]将异养硝化菌 *Pseudomonas putida* 的 DNA 片断与自养硝化菌 *Nitrosospira briensis* 的 *amoA* 探针进行杂交,结果表现出与自养硝化菌较高的相似性。但是异养硝化菌 *Paracoccus denitrificans* Pd1222 的 *amo* 基因与自养硝化菌的 *amo* 基因仅有微弱的交叉杂交现象^[23],说明它与自养硝化菌的 *amo* 基因存在较大的差异,而且 *Paracoccus denitrificans* Pd1222 的 *hao* 基因只有 1 个拷贝,自养硝化菌却有 3 个拷贝。我们参考 Rothauwe^[24]等设计的 *amoA* 引物和 Lai^[25]等设计的 *amoB* 的引物,对 *Bacillus* sp. LY 的 *amo* 基因进行了 PCR 扩增。研究表明,该菌株与自养硝化菌的 *amo* 基因有较大的差异。现有的研究表明,不同异养硝化菌之间, *amo* 和 *hao* 基因也存在较大的差别[△]。

3 异养硝化作用的电子传递和代谢途径

3.1 异养硝化作用的电子传递

目前,对于异养硝化电子传递过程的研究较少,主要集中在常见的菌株上。Wehrfritz 等^[19]研究异养硝化菌 *T. pantotropha* 时指出,在铵氧化阶段, *T. pantotropha* 与自养硝化

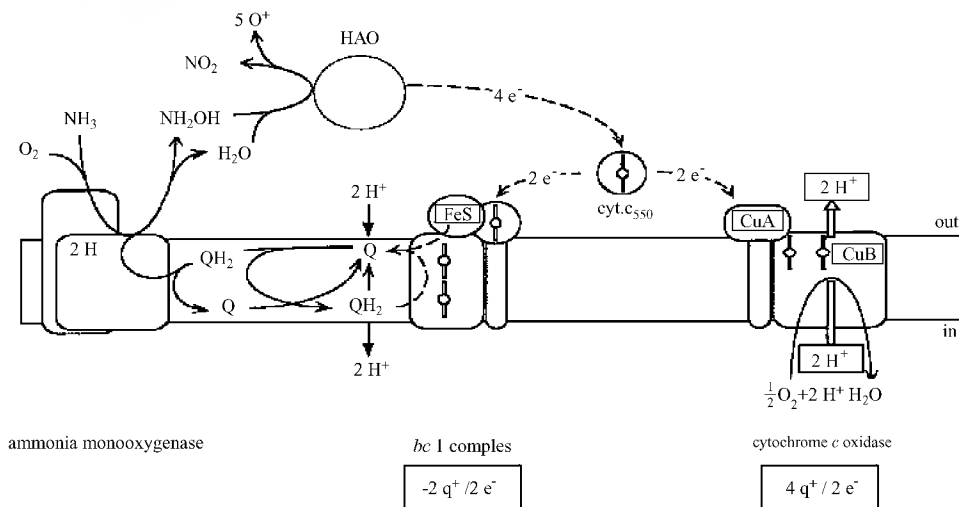


图 1 *Paracoccus denitrificans* 在异养硝化过程中电子传递和质子分离模式

Fig.1 Scheme for the electron transfer and charge separation during heterotrophic nitrification in *Paracoccus denitrificans*.

△ 林燕的博士论文:膜生物反应器中异养硝化细菌的分离及其硝化性能实验研究。

菌 *N. europaea* 相似,都是以还原态泛醌为电子供体;但在羟胺氧化阶段,*N. europaea* 的电子受体是细胞色素 *c*554,电子传递到泛醌,其中一部分用于启动羟胺氧化,另一部分经过 *bc*1 复合体传递到 *aa*3 型细胞色素 *c* 氧化酶,而在 *T. pantotropha* 中,电子直接经过细胞色素 *c*-550 或是亚硝酸盐还原酶传递到细胞色素 *c* 氧化酶。

Stouthamer 等^[26]在研究 *Paracoccus denitrificans* 代谢无机氮的过程中总结了其在进行异养硝化时的电子传递模式(图 1)。从此模式可以看出,*Paracoccus denitrificans* 将 NH_3 氧化到 NO_2^- 所得到的电子先传递到细胞色素 *c*550,其中一半传递给细胞色素 *c* 氧化酶,另一半通过铁硫蛋白传递给氧化态泛醌,氧化态泛醌转变为还原态泛醌后作为电子供体再为 NH_3 氧化提供电子。

3.2 异养硝化作用的代谢途径

异养硝化菌种类繁多,并且其可以利用的基质范围广泛,如铵、胺、酰胺、*N*-烷基羟胺、脲、氧脲酸及芳香硝基化合物等^[27],这使得异养硝化机理的研究异常困难,因此,异养硝

化作用的代谢途径还不完全清楚,许多研究者提出了不同的假想途径。

目前,多以丙酮肟以及其他一些脲类为有机底物研究异养硝化的有机代谢途径,认为异养硝化菌氧化丙酮肟存在两种可能的代谢途径^[28]:一种是无机途径,即丙酮肟先水解为羟胺和丙酮酸,羟胺再氧化为亚硝酸;另一种是有机途径,即将丙酮肟直接氧化成亚硝酸。

Kuener^[10]在他的研究基础上总结出了异养硝化菌在进行硝化作用时的代谢通式,包括无机氮硝化代谢途径(即 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)和有机氮硝化代谢途径(即 $\text{RNH}_2 \rightarrow \text{RNHOH} \rightarrow \text{R}-\text{NO} \rightarrow \text{RNO}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$)。

在 Robertson 等^[29]发现了具有异养硝化和好氧反硝化能力的异养硝化菌 *T. pantotropha* 后,陆续有报道发现类似的异养硝化菌,对它们的脱氮能力也展开了研究^[5, 30, 31]。Richardson 等^[32]在对这类异养硝化菌进行深入研究后,提出了较为详细的脱氮假想途径(图 2)

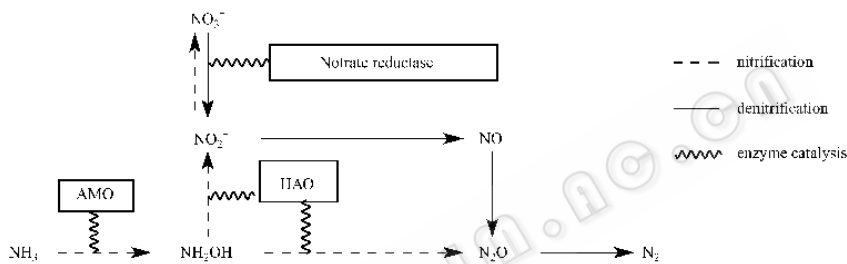


图 2 Richardson 提出的异养硝化脱氮假想途径

Fig. 2 Scheme for nitrogen removal pathway during heterotrophic nitrification proposed by Richardson.

我们目前的研究表明,*Bacillus* sp. LY 的异养硝化脱氮途径很有可能是从氨氮氧化到羟胺,然后从羟胺直接氧化到氧化亚氮,进而氧化到氮气。

4 问题和展望

异养硝化菌的生物多样性使其硝化机理的研究变得困难。已有的研究成果仅局限在个别菌株上。并且,不同菌株参与异养硝化过程的关键酶及其编码基因都存在较大的差别。因此,异养硝化机理有待于进一步深入研究。今后的研究重点主要包括以下几方面:(1)深入研究异养硝化反应中的关键酶,包括酶的分离、纯化、酶学特性等,通过酶学的研究来进一步证实异养硝化菌的代谢途径;(2)进一步研究关键酶的基因及其外源表达,从分子水平上阐明异养硝化作用的机理;(3)研究异养硝化菌在反应中的电子传递以及其关键的控制步骤,从能量转化的角度理解异养硝化菌的代谢机理;(4)通过对异养硝化机理的研究,深入探讨异养硝化过程在自然界氮素循环中的地位,为寻求合理的氮素循环调控技术手段和改进废水脱氮工艺提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Papen H, Berg RV. A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and soil*, 1998, **199**: 123 - 130.
[2] 杜睿,王庚辰. 内蒙古典草原土壤 N_2O 产生的机理探讨. *中国环境科学* 2000, **20**(5): 387 - 391.

[3] 温东辉,唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用. *环境污染与防治* 2003, **25**(5): 283 - 285.
[4] 杨凤林,王芳,张兴文,等. SBAR 中同步脱氮好氧颗粒污泥的菌种特性. *中国环境科学* 2005, **25**(2): 218 - 221.
[5] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* no. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, **100**(2): 184 - 191.
[6] Bateman EJ, Baggs EM. Contributions of nitrification and denitrification to N_2O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, **41**(6): 379 - 388.
[7] Muller C, Stevens RJ, Laughlin RJ. A N-15 tracing model to analyse N transformations in old grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, **36**(4): 619 - 632.
[8] Spiller H, Dietsch E, Kessler E. Intracellular appearance of nitrite and nitrate in nitrogen-starved cells of *Ankistrodesmus braunii*. *Planta*, 1976, **129**: 175 - 181.
[9] Pedersen H, Dunkin KA, Firestone MK. The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ^{15}N tracer and pool dilution techniques. *Biogeochemistry*, 1999, **44**: 135 - 150.
[10] Kuener JG, Robertson LA. Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, **15**: 109 - 117.
[11] 张光亚,陈美慈,韩如昉,等. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析. *微生物学报* 2003, **43**(2): 156 - 161.

- [12] Lin Y, Kong HN, He YL, *et al.* Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacteria. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 2004, **40**(3): 105 – 114.
- [13] 林 燕,孔海南,何义亮,等.膜生物反应器异养硝化菌的分离及硝化特性. *中国环境科学* 2005 **25**(4) 394 – 398.
- [14] Boer WD, Kowalchuk GA. Nitrification in acid soils: microorganisms and mechanisms. *Soils Biology & Biochemistry*, 2001, **33**(7–8): 853 – 866.
- [15] Hooper AB, Vannelli T, Bergmann DJ, *et al.* Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, **71**: 59 – 67.
- [16] Robertson LA, Kuenen JG. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropa*: Oxygen uptake and enzyme studies. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 857 – 863.
- [17] Gupta AB. *Thiosphaera pantotropa*: a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, **21**: 589 – 595.
- [18] Moir JWB, Crossman LC, Spiro S, *et al.* The purification of ammonia monoxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Letters*, 1996, **387**: 71 – 74.
- [19] Wehrfritz JM, Reilly A, Spiro S, *et al.* Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropa*. Identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification. *FEBS Letters*, 1993, **335**: 246 – 250.
- [20] Wehrfritz JM, Carter JP, Spiro S, *et al.* Hydroxylamine oxidation in heterotrophic nitrate-reducing soil bacteria and purification of a hydroxylamine-cytochrome c oxidoreductase from a *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, 1997, **166**: 421 – 424.
- [21] Moir JWB, Wehrfritz JM. The biochemical characterization of novel non-haem-iron hydroxylamine oxidase from *Paracoccus denitrificans* GB17. *Biochem J*, 1996b, **319**: 823 – 827.
- [22] Daum M, Zimmer W, Papen H, *et al.* Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Current Microbiology*, 1998, **37**: 281 – 288.
- [23] Crossman LC, Moir JWB, Enticknap JJ, *et al.* Heterologous expression of heterotrophic nitrification genes. *Microbiol*, 1997, **143**: 3775 – 3783.
- [24] Rothauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monoxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(12): 4704 – 4712.
- [25] Calvo L, Garcia-Gil LJ. Use of *amoB* as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **57**: 69 – 78.
- [26] Stouthamer AH, Boer APND, Oost JVD, *et al.* Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus denitrificans* and related bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, **71**: 33 – 41.
- [27] Doxtader KG, Alexander M. Nitrification by heterotrophic soil microorganisms. *Soil Sci Soc Amer Proc*, 1966, **30**: 351 – 355.
- [28] Castignetti D, Hollocher TC. Nitrogen redox metabolism of a heterotrophic nitrifying-denitrifying *alcaligenes* sp. From soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, **44**: 923 – 928.
- [29] Robertson LA, Kuenen JG, Kleijntjens R. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1985, **51**(4): 445
- [30] Anderson IC, Poth M, Homstead J. A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(11): 3525 – 3533.
- [31] Honda N, Hirai M, Ano T, *et al.* Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, 1998, **20**(7): 703 – 705.
- [32] Richardson DJ, Wehrfritz JM, Keech A, *et al.* The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochem Soc Trans*, 1998, **26**(3): 401 – 408.

Study progress on the mechanism of heterotrophic nitrification

HE Xia, LV Jian, HE Yi-liang*, ZHAO Bin, LI Chun-jie

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Nitrification plays an important role in the nitrogen cycle. Autotrophic bacteria have traditionally been regarded as the nitrifying agents. However, research in last few decades has established that a lot of heterotrophic microorganisms also make contribution to nitrification. Heterotrophic nitrification has become an issue for scientific research and environment management. In this overview, both the location of heterotrophic microorganisms and the methods of detection and isolation which take the polyphyletic nature of heterotrophic bacteria into account are briefly presented. The study on the mechanism which focuses on the enzymes, functional genes, electron transfer and metabolism pathway of heterotrophic nitrification are mainly reviewed. In the end, the problems lying in the research of the mechanism of the heterotrophic nitrification are proposed and future research directions are suggested.

Keywords: Heterotrophic nitrification; Heterotrophic nitrifiers; Mechanism

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(50478019)

* Corresponding author. Tel: 86-21-54745634; Fax: 86-21-54740825; E-mail: ylhe@sjtu.edu.cn

Received: 17 November 2005/Accepted: 17 February 2006/ Revised: 22 February 2006