

异养硝化微生物的分子生物学研究进展

王一明 彭光浩

(中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘要 硝化作用是自然界 N 素循环的一个重要环节,对于农业生产、环境保护等都具有重要意义。除了传统上认为的自养硝化细菌以外,近几十年来已发现很多异养微生物和甲烷营养细菌可以进行硝化作用。现就异养硝化微生物的分子生物学研究作一综述。

关键词 硝化作用; 异养硝化微生物; 分子生物学

中图分类号 S154.3; Q7

硝化作用 (nitrification), 一般是指微生物把 NH_4^+ 氧化为 NO_2^- , 继而 NO_2^- 再氧化为 NO_3^- 的过程, 是自然界 N 素循环的一个重要环节; 由于其在陆地 (包括农田) 水域、沉积物等生态系统中均可广泛的发生, 对于农业生产、环境保护等都具有重要意义: 如农田 N 素去向的调控、水体富营养化的应对、污水污泥的生物处理等。

硝化作用的引发者除了传统上认为的自养硝化细菌以外, 现已证明异养微生物也具有重要作用。

1 异养硝化作用研究的简要回顾和异养硝化作用的定义

1.1 异养硝化作用的定义

迄今为止, 自养硝化细菌还是被认为是自然界硝化作用的主要执行者。传统的自养硝化作用 (autotrophic nitrification) 的定义常被视作硝化作用的定义。它通常是指微生物将氨氧化为硝酸盐, 并从中获得能量的过程。整个过程由两类细菌分两个阶段进行, 第一阶段是氨氧化为亚硝酸盐, 靠亚硝酸细菌完成; 第二阶段是亚硝酸盐氧化为硝酸盐, 由硝酸细菌完成^[1]。而异养硝化作用 (heterotrophic nitrification) 不同于传统的自养硝化作用, 它的底物可以是无机态 N 也可以是有机态 N。据此, Alexander 曾提出一种广泛的硝化作用的定义: 有机和无机 N 化合物从还原态经生物氧化为多种氧化态的过程^[2]。这个定义涵盖了自养硝化作用和异养硝化作用。近年来, 有研究者提出更为严格的异养硝化作用的定义: 异养微生物在好氧条件下将氨/铵或氧化态-3 (oxidation state-3) 的有机态 N 氧化为羟

胺、亚硝酸盐和硝酸盐的过程^[3]。也有研究者将之归结为异养微生物将还原态 N (包括有机态 N) 氧化为亚硝酸盐和硝酸盐的过程。鉴于异养硝化作用底物和产物的多样性, Alexander 的定义更为妥贴, 也为研究者广泛认可。

1.2 异养硝化作用研究的简要回顾

异养硝化作用和异养硝化微生物其实早在 1886 年和 1894 年、1908 年就有报道, 但由于遭到 Winogradsky (维诺格拉德斯基) 的强烈批判和否定, 在此后的很多年几乎没有研究报道^[4]。

在 Quastel 和 Scholefield 以丙酮酸脲作为选择性培养基, 采用连续灌注土柱的方法分离获得具有产生 NO_2^- 能力 (不经过氨化) 的异养菌株以来^[5, 6], 异养硝化微生物和异养硝化作用重新引起研究者的广泛关注, 并进行多方面的研究: 自然生境中的异养硝化作用, 异养硝化微生物的分离、计数和活性确认, 异养硝化作用的生物化学、分子生物学, 异养硝化作用与温室气体排放等, 逐渐成为农业及环境研究的热点问题之一。

近几十年来, 研究者相继从不同类型的土壤^[3, 7-12]、污泥^[13, 14]、湖水^[15]、深海火山口^[16]等发现和分离了多种具有硝化活性的异养微生物 (包括细菌、放线菌、真菌), 并证明一些反硝化微生物也能够进行硝化作用, 生成 NO_2^- 或 NO_3^- ^[17]。

目前, 异养硝化作用常常被援引来说明自养硝化微生物不能生长或未能检测到的土壤中实际发生的硝化作用。如许多研究者将酸性土壤的硝化作用主要归功于异养硝化微生物, 大量的实验证据也表明酸性土壤 (特别是酸性森林土壤) 中主要的硝化

作用承担者是异养微生物^[11, 18-21]。有研究者认为森林土壤的硝化作用主要由异养硝化微生物调控，自养硝化细菌控制农业土壤中的硝化作用^[21]。但是对于适宜自养硝化细菌生长和表现硝化活性的土壤：如农田土壤中，异养硝化微生物的表现如何呢？它们是不是也同样具有重要作用呢？几乎没有报道。

概而言之，异养硝化作用在自然生境中的存在虽已基本得到认同，但其在土壤硝化作用和自然界N素循环中的地位尚存在争议，有待于进一步明确。

2 异养硝化作用的生物化学

异养微生物可以利用很多基质，包括无机N和有机N：如铵、胺、酰胺、N-烷基羟胺、脞、氧脞酸及芳香硝基化合物等生成NO₂⁻^[9]，这也是异养硝化作用与自养硝化作用不同的特点之一。也正因为如此，异养硝化作用的底物及其代谢途径至今仍不甚清楚^[12, 22, 23]，虽然有研究者曾经提出如下通式^[24]（图1）。

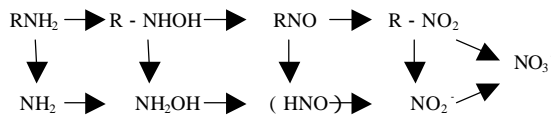


图1 异养硝化作用的无机和有机途径

Fig. 1 Proposed inorganic and organic pathways of heterotrophic nitrification

从现有的研究来看，异养硝化微生物的硝化途径、机理可能与自养硝化细菌不同，它们可在氧化过程中形成多种无机和有机N化合物^[14, 25]。包括一些气态N产物如氧化亚氮等^[26-30]。异养硝化作用途径、产物的多样性和异养硝化、好气反硝化的同时

存在被认为是异养硝化微生物硝化作用产物（NO₂⁻和NO₃⁻）积累量偏低的原因。

在Quastel 和Scholefield 以丙酮酸脞作为基质研究异养硝化作用以来，丙酮酸脞及其它一些脞类几乎成为异养硝化作用的标准底物^[3]。丙酮酸脞形成亚硝酸盐的途径如何，目前仍然存在争议。一般认为可能存在两条途径，所谓无机或有机途径（图2）^[22]：即丙酮酸脞先水解为羟胺和丙酮酸，羟胺再氧化为亚硝酸，或者丙酮酸脞直接氧化生成亚硝酸。从目前的研究结果来看，可能因研究菌株的不同，丙酮酸脞的氧化机理也不相同^[31]。

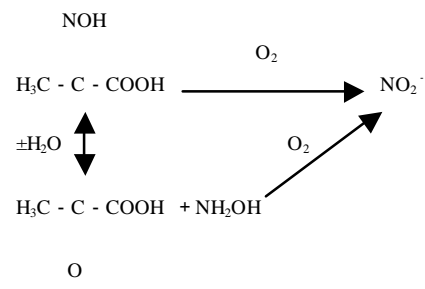


图2 丙酮酸脞的氧化途径

Fig. 2 Pathway of oxidation of pyruvic oxime

已经有充分的实验证据表明在产碱杆菌属（*Alcaligenes*）的参与下，丙酮酸脞直接氧化生成亚硝酸，并不先水解为羟胺和丙酮酸^[22, 31, 32]。初步的酶学研究也已基本证实这一结论^[33]。目前，已从粪产碱杆菌 IFO13111（*Alcaligenes faecalis* IFO13111）分离纯化了丙酮酸脞加双氧酶（Pyruvic oxime dioxygenase）^[34]，研究者就此提出了粪产碱杆菌硝化途径的模型，并认为催化剂量还原剂（如Vc等）的存在有利于酶活。

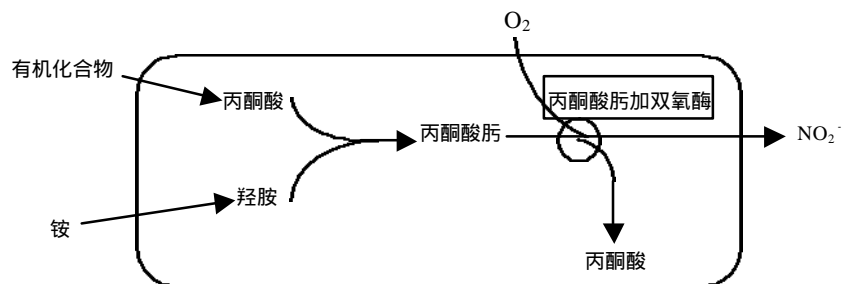


图 3 粪产碱杆菌IFO13111的硝化途径示意图

Fig. 3 A schematic presentation of pathway of nitrification by *Alcaligenes faecalis* IFO 13111

3 异养硝化微生物的分子生物学研究

在大量生理、生化实验的基础上，研究者对异养硝化微生物开展了大量酶学及分子生物学研究，

虽然相对于自养硝化细菌而言，还不够深入，但也取得了较大进展：如关键酶的提取（羟胺氧化酶，氨单加氧氧化酶、丙酮酸脞加双氧酶等）相关基因的测序（amo、hao）及外源表达等。分述如下：

3.1 氨单加氧酶 (Ammonia monooxygenase, AMO)

3.1.1 自养硝化细菌的AMO 迄今为止, 尚未获得活性形式的自养硝化细菌氨单加氧酶。它的亚基组成和三级结构也还没有完全清楚。目前已分离到的认为可能是AMO亚基的有: AmoA, 膜结合、含有活性位点, 27~30 kDa; AmoB, 铜-铁蛋白, 38~43 kDa; AmoC, 膜结合的多肽, 36 kDa^[35]。

经鉴定, AMO的正常底物是NH₃而不是NH₄⁺。与其它单加氧酶相同, AMO也拥有很宽的底物范围, 已有40多种化合物(包括<C8的各种直链烷烃、<C5的烯烃、环己烷及多种芳香烃)被证明可以作为它的底物, 并能竞争性地抑制AMO对氨的氧化^[36]。

AMO的活性位点被认为含有Cu原子, 并且Cu原子可能对于酶活性的保持是必需的。一些螯合剂的加入可以明显的抑制它的活性。少量Cu离子的加入可以明显的刺激NH₃的氧化^[37], 并能稳定细胞提取液中AMO的活性^[38]。研究者推测细胞裂解液(cell lysis)AMO活性丧失可能是由于AMO中Cu的缺失。

现已充分证明AMO是一个对光敏感的酶, 经紫外线抑制后, 活力的修复需要蛋白的从头合成(de novo protein synthesis)^[36, 39]。

3.1.2 异养硝化细菌的AMO Moir等从脱N副球菌Pd1222中获得了部分纯化的氨单加氧酶^[49]。

与欧洲亚硝化单胞菌的AMO相似, 脱N副球菌的AMO也是一个膜结合蛋白, 含两个亚基, 分别为38 kDa和46 kDa (SDS-PAGE)。纯化的酶是一个醌醇氧化酶。从无细胞提取物来看, 它比欧洲亚硝化单胞菌的AMO更为稳定。后者经提取后易丧失活性, 除非加入一些稳定剂如牛血清清蛋白(BSA)、精胺或Mg、Cu离子等。

其次, 也可能含有一个易变的Cu中心。Cu离子的加入可以明显刺激酶活, 如100 μM CuCl₂的加入可恢复酶的活性。1mM 二乙基二硫代氨基甲酸盐(diethylthiocarbamate)或0.5mM 烯丙基硫脲(allylthiourea)的加入都可以完全抑制酶活。

同样, 它也是一个对光敏感的酶, 紫外线照射同样可以抑制它的酶活。

不同的是, 1mM (相当于2.5%)的乙炔并不能抑制它的酶活, 推测可能是乙炔不能进入它的活性中心。而对于欧洲亚硝化单胞菌, 0.25 μM的乙炔就可强烈抑制它对氨的氧化, 3.8 μM的乙炔可完全抑制它的酶活^[41]。

3.2 编码AMO、HAO的基因及其外源表达

目前, 编码异养硝化细菌AMO和HAO的基因研究的还不是很多。从已有的结果来看, 因菌株的不同, 异养硝化细菌的amo、hao存在很大的差别。如恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的amo和自养硝化细菌: 欧洲亚硝化单胞菌(*N. europaea*)的amoA存在明显的序列相似性^[42]; 而脱N副球菌Pd1222 (*Paracoccus denitrificans* Pd1222)与自养硝化细菌又存在较大差异^[43]。

3.2.1 编码自养硝化细菌AMO、HAO的基因 编码自养硝化细菌AMO的基因有3个: amoA、amoB、amoC, 基因序列已被检出, 在欧洲亚硝化单胞菌及亚硝化单胞菌ENI-11 (*Nitrosomonas sp.* ENI-11)中各有两个拷贝, 其中amoA基因含有AMO的活性位点^[35, 44, 45], amoA和amoB位于同一操纵子, amoB在amoA的下游, amoC则位于amoA的上游。从在*E. coli*中进行的克隆表达实验来看, amo基因对*E. coli*有很大的毒害性, 不能得到相应基因片段的克隆或外源表达^[46]。

编码欧洲亚硝化单胞菌HAO的hao基因也已经得到分离测定, 和amo相似, hao也有3个拷贝, 并与编码细胞色素C554-HAO的电子受体的bcy基因紧密的连在一起^[47]。

3.2.2 编码恶臭假单胞菌AMO的基因 Southern杂交实验表明: 经不同限制性酶切后的恶臭假单胞菌的DNA片段均能与欧洲亚硝化单胞菌的amoA探针进行异源杂交, 证明两者间具有较高的相似性。恶臭假单胞菌的可读框(ORF, open reading frame)长度为1530bp, 核糖体结合位点GAGG位于起始密码子(ATG)上游14个碱基处。

与欧洲亚硝化单胞菌的AmoA相比, 恶臭假单胞菌的ORF多234个氨基酸残基, 这与脱N副球菌2621部分纯化的氨单加氧酶具有较高分子量的结果相符。

序列比较发现, 恶臭假单胞菌ORF有两个区域(氨基酸226~325, 392~434)与自养氨氧化细菌具有较高的相似性: 白里亚硝化螺菌(*Nitrosospira briensis*) 46.0%、纤细亚硝化弧菌(*Nitrosovibrio tenuis*) 32.6%、欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*) 39.0%和27.9%; 与甲烷加单氧酶小亚基的相似性低于30% (不同培养条件下的实验也表明恶臭假单胞菌不能氧化甲烷)。此外, 这两个区域的疏水性表面(hydrophobicity profile)与这4种自养硝化细菌相应的区域相似。特别是, 该ORF中同样存

在AmoA多肽的保守区如Cu-结合位点等。

从蛋白分析结果来看,恶臭假单胞菌的ORF很可能编码的是一个膜结合的氨单加氧酶:蛋白N-端存在高比例的疏水性氨基酸,表明这是一个膜结合或整合(membrane association or interaction)的多肽;位于C-端的疏水性区域与拥有膜结合氨单加氧酶的欧洲亚硝化单胞菌的AmoA非常相似。

3.2.3 编码脱N副球菌AMO、HAO基因及其外源表达 同恶臭假单胞菌不同,脱N副球菌Pd1222的AMO和HAO基因与自养硝化细菌的AMO、HAO差异很大^[43]:

(1) 与酶学的初步研究结果相反,脱N副球菌Pd1222的amo和欧洲亚硝化单胞菌的amo基因只有很微弱的交叉杂交现象;自养硝化细菌amo序列和甲烷营养菌pmo序列的PCR引物不能扩增脱N副球菌的amo。

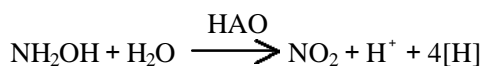
(2) 脱N副球菌的amo和hao基因在基因组中相连并只有一个拷贝,不象自养硝化细菌具有多个拷贝。

(3) 欧洲亚硝化单胞菌的amo基因对E.coli有很大的毒害性,不能得到相应基因片段的克隆或外源表达。而脱N副球菌的硝化基因至少有部分片段(含AMO)对E.coli几乎没有毒害性,并在E.coli中得到了表达。

3.3 羟胺氧化酶(Hydroxylamine oxidase, HAO; 也称羟胺-细胞色素C还原酶, Hydroxylamine-Cytochrome reductase)

目前,研究者已经分别从球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)、脱N副球菌GB17(*Paracoccus denitrificans* GB17)即泛养硫球菌LMD82(*Thiosphaera pantotropha* LMD82)^[48, 49]、假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)^[50]中获得了部分纯化的羟胺氧化酶,从现有的研究来看,它们与自养硝化细菌的羟胺氧化酶存在明显或部分不同的特点。

3.3.1 自养硝化细菌的羟胺氧化酶 在自养硝化细菌中,羟胺氧化酶被认为催化了以下反应^[51]:



每分子羟胺的氧化产生4个电子,电子受体是细胞色素C554。经电子传递链,这4个电子中的2个被传递给氨单加氧酶(AMO)用来氧化氨生成羟胺,另外2个电子或经细胞色素bc₁复合物传到氧化酶产生质子动力势(protonmotive force),或经反电子传

递到NADH脱氢酶生成NADH。这个反应没有分子氧的加入。

纯化的羟胺氧化酶的结构研究表明:它是一个多体蛋白,3个亚基,共有24个血红素(Haem)以一种复杂的结构排列。每个亚基为63kDa,含7个血红素C和1个血红素P-460。

3.3.2 异养硝化细菌的HAO 从目前已经获得的纯化或部分纯化的异养硝化细菌的HAO来看,它们与自养细菌的HAO明显不同:

(1) 相对于自养硝化细菌HAO的复杂,异养硝化细菌的HAO简单的多,只是一个单体蛋白。如从假单胞菌S2.14(*Pseudomonas sp.* S2.14)和脱N副球菌GB17获得的羟胺氧化酶,都是单体蛋白,分子量分别为19kDa和18.5kDa左右(SDS-PAGE)。

(2) 这些分离到的异养硝化细菌HAO都不含血红素。如球形节杆菌羟胺氧化酶活性表现最高的分离组分的吸收光谱显示其不含细胞色素。

(3) 含非血红素Fe中心。有研究者认为可能非血红素Fe的羟胺氧化酶在异养硝化细菌中广泛分布^[49]。这些酶的羟胺氧化活性可明显被亚铁离子激活而被EDTA抑制:如球形节杆菌的羟胺氧化酶,10⁻⁶M和100⁻⁶M亚铁离子的加入可分别使氧化活性增强6倍和21倍;10⁻⁶M和100⁻⁶M EDTA的加入则可分别抑制氧化活性的50%和100%。

(4) 可能与自养硝化细菌HAO的蛋白序列无序列同源性。N-端分析显示,脱N副球菌GB17与欧洲亚硝化单胞菌的HAO多肽没有明显的序列同源性。而假单胞菌S.14 N端起始的15个氨基酸残基与脱N副球菌GB17存在27%的同一性和40%的相似性:

脱N副球菌GB17

⁺H₃N-A E I K D P E N T V I I E L K

假单胞菌S2.14

⁺H₃N-T N V K L T T N F G D I V L E

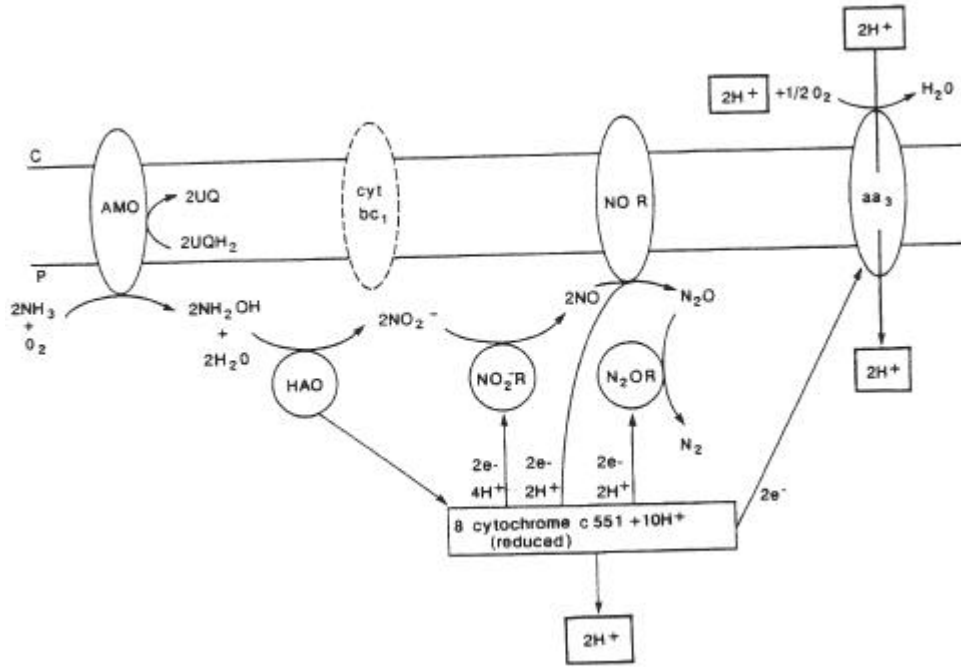
(5) 自养硝化细菌羟胺的氧化没有分子氧的加入,而好氧条件下,脱N副球菌催化羟胺氧化的过程是一个需要分子氧的反应。

(6) 羟胺氧化的电子受体不同。假单胞菌和脱N副球菌或泛养硫球菌,其羟胺的氧化的电子受体分别为细胞色素C550和C551,每分子羟胺的氧化产生2个电子,不产生能量。而欧洲亚硝化单胞菌,每分子羟胺的氧化生成4个电子,这4个电子中的2个必须用于还原细胞色素C554,以生成ATP和NADH。

鉴于细胞色素C551/550又证明是反硝化过程酶

如亚硝酸盐还原酶、氧化亚氮还原酶等的电子供体，有研究者提出一种硝化和反硝化偶联机理的模型（图4）^[48]：硝化作用产生的电子大部分通过周质电子传递用于还原亚硝酸盐为N₂，而不是伴随跨质膜

的电子转移^[48, 50]。这种偶联将导致醌醇（UQH）的净消耗，可能被用于去除生长过程中因含C底物还原所产生的多余还原剂^[48, 52]。



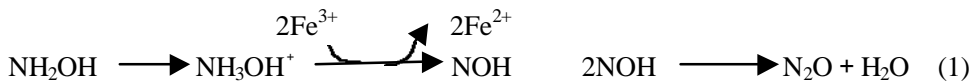
C = cytoplasm 细胞质 P = periplasm 周质 AMO = 氨加单氧酶 HAO = 羟胺氧化酶
NO₂ R = 亚硝酸盐还原酶 NO R = 一氧化氮还原酶 N₂O R = 氧化亚氮还原酶

图4 异养硝化 - 好氧反硝化偶联机理模型

Fig. 4 A model for heterotrophic nitrification coupled with aerobic denitrification

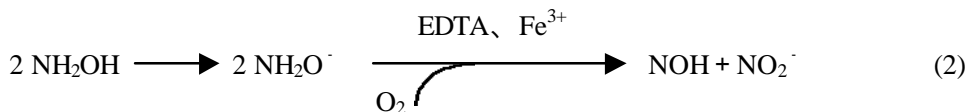
土壤沉积物和熟土能够释放N₂O和NO，研究者认为可能与异养硝化细菌的异养硝化 - 反硝化有关^[26, 46, 53]。上述实验结果为这些猜想提供了很好的证明。也为一些异养硝化微生物硝化作用产物亚硝酸盐积累偏低是因为异养硝化作用和好氧反硝化的同时存在提供了分子学证据。

3.3.3 推测的异养细菌羟胺氧化机理 羟胺与Fe³⁺离子的化学反应很早就有报道，很多研究者就此进行了多方面的深入研究，并提出了假说。认为强酸条件下，两个高Fe³⁺离子的还原，导致一个分子羟胺氧化为硝酰基（nitroxyl），两分子硝酰基反应生成N₂O及H₂O：



而在强碱性条件下，Fe³⁺、EDTA仅作为催化剂，由1mol O₂氧化羟胺生成亚硝酸盐和硝酰基的混合

物，反应底物被认为是NH₂O⁻，因为在pH值低于11.5时，反应被强烈抑制：



Moir等进行了一系列实验，证明脱N副球菌GB17中由羟胺氧化酶介导的羟胺氧化类似于酸性条件下的反应^[49]：

氧化酶没有活性；

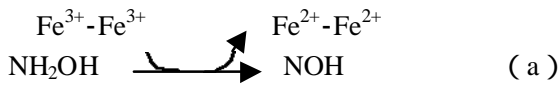
(2) 反应底物被认为是不带电的羟胺；因为酶活性从pH8开始下降，pH6时几乎检测不到，而pKa (NH₃OH⁺ / NH₂OH) = 8。

(1) pH高于11.5时，即在碱性反应范围时，羟胺

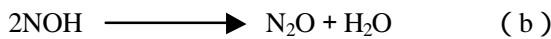
(3) 此外，羟胺氧化酶的Fe³⁺ 必须被羟胺还原为Fe²⁺，羟胺氧化酶被认为是作为细胞色素还原酶工作。

根据厌氧条件下，只检测到N₂O，没有亚硝酸盐；而在有氧情况下，除亚硝酸盐以外也有N₂O生成，假设了以下羟胺氧化的可能途径：

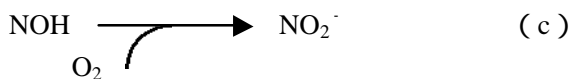
首先，位于活性位点的双核中心Fe³⁺-Fe³⁺与羟胺反应，生成的硝酰基（NOH）与Fe²⁺-Fe²⁺相连。以细胞色素C550作为电子受体，双核活性位点被氧化重新生成Fe³⁺-Fe³⁺（伴随两分子C550还原），电子的传递可能通过单核的非血红素Fe中心：



在厌氧状况下的反应可能与酸性条件下Fe³⁺和羟胺的反应相同。生成的硝酰基离开双核中心，与另外一分子硝酰基结合反应，生成N₂O和H₂O：



而好氧情况下，除反应（b）以外，可能进行以下反应：



通过以上反应，每分子羟胺的氧化产生2个电子，不产生能量。而在欧洲亚硝化单胞菌，每分子羟胺的氧化生成4个电子。对于自养硝化细菌而言，羟胺氧化生成的4个电子中的2个必须用于还原细胞色素C554，以生成ATP和NADH。这可能也是为什么欧洲亚硝化单胞菌的羟胺氧化酶比脱N副球菌的羟胺氧化酶复杂得多的原因。这个假设同样可以很好的解释为什么脱N副球菌及其它异养硝化细菌培养亚硝酸盐积累偏低，并有其它及气体N产物检出。

但是，硝化过程中有气体N产物，是由于硝化与反硝化的偶联还是如Moir构想的是羟胺氧化过程产物硝酰基（NOH）的自由结合所致，尚需进一步研究。

3.4 丙酮酸肟加双氧酶（Pyruvic oxime dioxygenase）

目前，研究者已经从粪产碱杆菌中获得了纯化到电泳均一状态（electrophoretically homogeneous state）的丙酮酸肟加双氧酶^[33, 34]。

经鉴定，该酶为115kDa，含3个相同分子量的亚基（40 kDa）；不含无机S，每个亚基含1个Fe原子，可能是一个非血红素Fe蛋白，无Fe/S簇（Fe/S cluster）。从吸收光谱看，酶在450nm附近有一个宽的低吸收峰，连二亚硫酸（dithionite）或高铁氰化物（ferricyanide）的加入不影响该吸收峰。

3.4.1 酶的催化特性 酶没有显示任何羟胺氧化酶活性，反应最适pH为7.5。

3.4.2 Fe 酶分子中的Fe原子对于酶的催化活力是必须的。硫酸亚铁的加入可以明显的加强酶的活力：50μM 硫酸亚铁加入可以使酶（2μM）活力从630上升到1243（mol NO₂⁻ / (mol 酶·min)）。而高Fe离子的刺激作用需要一个延滞期（lag time）。金属螯合剂的存在可明显的降低酶的氧化能力：如1mM EDTA或 EDDHA可以分别抑制粗酶液38%或69%的活性，0.1mM 邻-菲咯啉（O-phenanthroline）可完全抑制精制酶的活性。

3.4.3 还原剂 还原剂的存在可明显的加强酶对丙酮酸肟的氧化能力，推测酶可能是在还原态（Reduced state）时进行催化的。

Vc的加入可以明显的加强酶活：6μM L-Vc加入到1mM 丙酮酸肟和15nM 酶的反应体系，可生成300μM 的亚硝酸盐。推测Vc可能是作为还原剂还原酶，或者更正确的是还原酶分子中的Fe原子。

羟胺可能也可作为Fe原子的还原剂。由丙酮酸加羟胺所生成的亚硝酸盐浓度明显的高于由丙酮酸肟生成的浓度（3倍左右）。鉴于羟胺和丙酮酸可非酶促生成丙酮酸肟，这可能意味着羟胺不仅可以作为反应物，也可同时作为酶的活化剂。

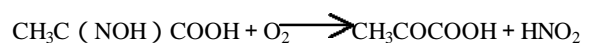
3.4.4 O₂ 酶被认为是加双氧酶。从以粗酶液进行实验的结果^[33]（表1）看，丙酮酸肟氧化过程中消耗分子氧和所形成的亚硝酸盐的摩尔数几乎相等：

表1 丙酮酸肟酶促氧化中NO₂⁻生成和O₂消耗的联系
Table 1 Relation between formation of NO₂⁻ and consumption of O₂ in enzymatic oxidation of pyruvic oxime

实验	NO ₂ ⁻ 生成 (μM)	O ₂ 消耗 (μM)
1	73.5	81
2	38.4	37

以纯化到电泳均一态的酶进行的实验，结果也基本相同（4组平行实验）：

亚硝酸盐:丙酮酸盐:分子氧 = 0.95 ± 0.4:1.1 ± 0.1:1.0 研究者认为，丙酮酸肟的酶促氧化，可能如以下反应方程所示：



3.4.5 抑制剂 0.1 mM 邻-菲咯啉可完全抑制酶活。1mM 二乙基二硫代氨基甲酸盐可抑制58.9%的酶活，而1mM 烯丙基硫脲几乎没有影响。

Ono等就以上实验结果，提出了如图3所示的氧

化机理^[34]：首先，细菌在细胞内氧化铵盐为羟胺，并从胞外摄入如丙酮酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐等羧酸盐形成丙酮酸盐。而后，丙酮酸盐和羟胺在细胞内非酶促形成丙酮酸肟。丙酮酸肟加双氧酶就可利用这些丙酮酸肟生成亚硝酸盐。这样，粪产碱杆菌既可以由铵盐和外源羧酸盐形成亚硝酸盐，也可催化外源丙酮酸肟形成亚硝酸盐。现在还不知道其它异养硝化微生物对丙酮酸肟的氧化是不是也循与之相同或相似的途径。

异养硝化微生物可以氧化丙酮酸肟形成亚硝酸盐的现象已经发现将近半个世纪，先后很多研究者从不同的角度对这个现象进行了研究：如活性菌株的分离、丙酮酸肟氧化途径的探讨、不同菌株间的连续氧化等，并取得了一些结果^[13, 22, 32, 54-56]。但丙酮酸肟几乎不能在自然环境中形成，这些异养硝化微生物对丙酮酸肟的氧化并不能解释它们生成亚硝酸盐的机理。它们在自然生境中的行为、意义一直存在争议，有研究者甚至认为丙酮酸肟等根本不能算作硝化作用的底物，对自然土壤 NO_2^- 的积累贡献很少^[3]。

Ono等的工作至少从酶学上证明确实存在这样一些微生物，可以由铵盐和外源羧酸盐经丙酮酸肟形成亚硝酸盐，也可催化外源丙酮酸肟形成亚硝酸盐。虽然它们在自然界硝化作用、亚硝酸盐的生成中的贡献有多大，尚无法确定。

4 国内硝化微生物的研究状况

我国的土壤硝化微生物研究很早就有报道。60年代，陈华癸等、阮妙增等先后就水稻田中的硝化微生物、硝化微生物纯培养的分离等开展了研究^[57-59]。很多研究者还就不同土壤中硝化能力、影响土壤硝化作用的因子等开展了研究；并对国外发展的硝化抑制剂在我国土壤中的应用效果等进行了追踪调查、验证及其它应用研究^[60]。但遗憾的是，近年来国内有关硝化微生物研究的报道不多^[61-64]。对于异养硝化微生物及硝化微生物的分子生物学等的研究，目前国内尚未见报道。

对于我国这样一个资源相对匮乏、N素利用率低下、环境污染压力日益严重的发展中国家而言，目前这些研究所取得的成果离国家的需要还存在较大的距离。迫切需要对硝化微生物及其代谢、硝化微生物的分子生物学等展开深入的研究，探明土壤N素转化（硝化作用）的发生机制，为寻求合理的N素调控对策及N素利用率的提高提供技术手段和理

论指导。

5 结 语

以上介绍了近年来，在异养硝化微生物的分子生物学研究上所取得的一些进展：硝化作用关键酶（氨单加氧酶、羟胺氧化酶及丙酮酸肟加双氧酶）的纯化；相关基因序列与自养硝化细菌的比较及外源表达等；以及研究者提出的几种异养硝化作用的途径假说和模型。这些模型和假说在一定程度解释了纯培养下这些生命体的硝化行为。但是，异养微生物为什么能进行硝化作用，硝化作用的生理学意义是什么？仍然没有得到阐释。

从已有的结果看，因为菌株的不同，异养硝化微生物的酶学特性、关键酶的基因序列存在较大差异。现已证明很多异养微生物（包括细菌、真菌和放线菌）能够进行硝化作用，它们的硝化行为、关键酶组成和这些“模式株”的硝化行为相同，还是相近或是根本不同？尚有待进一步的深入研究。

参考文献

- 1 武汉大学，复旦大学生物系微生物学教研室编. 微生物学. 第二版. 北京：高等教育出版社，1980，342
- 2 Alexander M. Nitrification. In: Wiley J, Sons. eds. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. New York, 1977, 251~271
- 3 Papen H, von Berg R. A most probable number (MPN) method for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. Plant and soil, 1998, 199:123~130
- 4 维诺格拉德基斯基著（阎逊初译）. 土壤微生物学问题和方法. 北京：科学出版社，1962，128~132，199~203，225~23，240~250，291~295
- 5 Quastel JH, Scholefield PG. Influence of organic nitrogen compounds on nitrification in soil. Nature (London), 1949, 164:1068~1072
- 6 Qusatel JH, Scholefield PG, et al. Oxidation of pyruvic oxime by soil organisms. Nature (London), 1950, 166:940~942
- 7 Fisher T, Fisher E, et al. Nitrite production by heterotrophic bacteria. J. Gen. Microbiol., 1956, 14:238~247
- 8 Eylar OR, Jun, et al. A survey of heterotrophic microorganisms from soil for ability to form nitrite and nitrate. J. Gen. Microbiol., 1959, 20: 473~481
- 9 Doxtader KG, Alexander M. Nitrification by heterotrophic soil microorganisms. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1966, 30:351~355

- 10 White JP, Johnson GT. Aflatoxin production correlated with nitrification in *Aspergillus flavus* group species. *Mycologia*, 1982, 74:718~723
- 11 Stroo HF, Klein TM, et al. Heterotrophic Nitrification in an acid forest soil and by an acid-tolerant Fungus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 52:1107~1111
- 12 Brierley EDR, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33:1403~1409
- 13 Verstraete W, Alexander M. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter sp.* *J. Bacteriol.*, 1972a, 110:955~961
- 14 Robertson LA, Kuenen JG. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *J. Gen. Microbiol.*, 1983, 129: 2847~2855
- 15 Witzel K-P, Overbeck HJ. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter sp.* (strain 9006) as influenced by different cultural conditions, growth state and acetate metabolism. *Arch. Microbiol.*, 1979, 122:137~143
- 16 Mevel G, Prieur D. Thermophilic Heterotrophic nitrifiers isolated from Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vents. *Can. J. Microbiol.*, 1998, 44:723~733
- 17 Castignetti D, Hollocher TC. Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, 47:620~623
- 18 Ishque M, Cornfield AH. Evidence for heterotrophic nitrification in an acid Bangladesh soil lacking autotrophic nitrifying organisms. *Trop. Agric.*, 1976, 53:157~160
- 19 Strayer RF, Lin CJ, et al. Effect of simulated acid rain on nitrification and nitrogen mineralization in forest soils. *J. Environ. Qual.*, 1981, 10:547~551
- 20 Schimel JP, Firestone MK, et al. Identification of heterotrophic nitrification in a sierran forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, 48:802~806
- 21 Killham K. Nitrification in coniferous forest soils. *Plant and soil.*, 1990, 128:31~44
- 22 Castignetti D, Hollocher TC. Nitrogen redox metabolism of a heterotrophic nitrifying-denitrifying *alcaligenes sp.* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44: 923~928
- 23 Nishio T, Yoshikura T, et al. Effects of organic acids on heterotrophic nitrification by *Alaligenes faecalis* OKK17. *Biosci. biotech. Biochem.*, 1994, 58:1574~1578
- 24 Norton JM. Nitrification. In: Sumner ME ed. *Handbook of soil science*. Florida, USA: CRC Press, 2000, 160~175
- 25 Kurokawa M, Fukumori Y, et al. A hydroxylamine-cytochrome c reductase occurs in the heterotrophic nitrifier *Arthrobacter globiformis*. *Plant Cell Physiol.*, 1985, 26:1439~1442
- 26 Robertson LA, Kuenen JG. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: oxygen uptake and enzyme studies. *J. Gen. Microbiol.*, 1988, 134:857~863
- 27 Papen H, von Berg R, et al. Heterotrophic nitrification by *Alaligenes faecalis*: NO_2^- , NO_3^- , N_2O and NO production in exponentially growing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55:2068~2072
- 28 Anderson IC, Poth M, et al. A comparison of NO and N_2O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 3525~3533
- 29 Robertson LA, Dalsgaard T, et al. Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1995, 18:113~120
- 30 Otte S, Grobber NG, et al. Nitrous oxide production by *Alaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62:2421~2426
- 31 Castignetti D, Palutsis D, et al. An examination of proton translocation and energy conservation during heterotrophic nitrification. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, 66: 175~182
- 32 Castignetti D, Petithory JR, et al. Pathway of oxidation of pyruvic oxime by a heterotrophic nitrifier of the genus *Alcaligenes*: evidence against hydrolysis to pyruvate and hydroxylamine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 224: 587~593
- 33 Ono Y, Makino N, et al. An iron dioxygenase from *Alaligenes faecalis* catalyzing the oxidation of pyruvic oxime to nitrite. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, 139:103~108
- 34 Ono Y, Enokiya A, et al. Pyruvic oxime dioxygenase from *Alaligenes faecalis*: purification, and molecular and enzymatic properties. *Plant Cell Physiol.*, 1999, 40:47~52
- 35 Klotz MG, Alzerreca J, et al. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amo A/amo B* genes in ammonia oxidising bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 150: 65~73
- 36 McCarty GW. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils.*, 1999, 29:1~9
- 37 Loveless JE, Painter HA. The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. *J. Gen. Microbiol.*, 1968, 52:1~14
- 38 Ensign SA, Hyman MR, et al. In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by

- copper. *J. bacteriol.*, 1993, 175: 1971~1980
- 39 Bedard C, Knowles R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4 , NH_4^+ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.*, 1989, 53: 68~84
- 40 Moir JWB, Crossmann LC, et al. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.*, 1996a, 387:71~74
- 41 Hynes RK, Knowles R. Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. *Can. J. Microbiol.*, 1982, 28: 334~340
- 42 Daum M, Zimmer W, et al. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Curr. Microbiol.*, 1998, 37: 281~288
- 43 Crossman LC, Moir JWB, et al. Heterologous expression of heterotrophic nitrification genes. *Microbiol.*, 1997, 143: 3775~3783
- 44 McTavish H, Fuchs JA, et al. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, 1993, 175:2436~2444
- 45 Hirota R, Yamagata A, et al. Physical map location of the multicopy genes coding for ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas sp.* strain ENI-11. *J. Bacteriol.*, 2000, 182: 825~828
- 46 Bergmann DG, Hooper AB. Sequence of the gene, *amo B*, for the 43-kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 204: 759~762
- 47 Hommes NG, Sayavedra-Soto LA, et al. Transcript analysis of multiple copies of *amo* (encoding ammonia monooxygenase) and *hao* (encoding hydroxylamine oxidoreductase) in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 1096~1100
- 48 Wehrfritz J-M, Reilly A, et al. Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*. Identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification. *FEBS Lett.*, 1993, 335:246~250
- 49 Moir JWB, Wehrfritz J-M, et al. The biochemical characterization of novel non-haem-iron hydroxylamine oxidase from *Paracoccus denitrificans* GB17. *Biochem. J.*, 1996b, 319:823~827
- 50 Wehrfritz J-M, Carter JP, 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
- 51 Yamanaka T. Mechanisms of oxidation of inorganic electron donors in autotrophic bacteria. *Plant Cell Physiol.*, 1996, 37:569~574
- 52 Robertson LA, kuenen GJ. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonia van Leeuwenhoek.*, 1990, 57:139~152
- 53 Paul JW, Beauchamp EG, et al. Nitrous and nitric oxide emissions during nitrification and denitrification from manureamended soil in the laboratory. *Can. J. Soil Sci.*, 1993, 73:539~553
- 54 Verstraete W, Alexander M. Mechanism of nitrification by *Arthrobacter sp.* *J. Bacteriol.*, 1972b, 110:962~967
- 55 Castignetti D, Gunner HB. Sequential nitrification by an *Alcaligenes sp* and *Nitrobacter agilis*. *Can. J. Microbiol.*, 1980, 26: 1114~1119
- 56 Castignetti D, Gunner HB. Nitrite and nitrate synthesis from pyruvic oxime by an *Alcaligenes sp.* *Curr. Microbio.*, 1981, 5: 379~384
- 57 李良漠. 土壤硝化作用研究概况. *土壤学进展*, 1984, (5): 1~10
- 58 李良漠. 我国土壤硝化 - 反硝化作用研究概况与展望. 见: 中国土壤学会土壤农业化学专业委员会和土壤生物与生物化学专业委员会编. 我国土壤氮素研究工作的现状和展望 (中国土壤学会土壤氮素工作会议论文集). 北京: 科学出版社, 68~81
- 59 Zhou Qi, Chen HK. The activity of nitrifying and denitrifying bacteria in paddy soil. *Soil Sci.*, 1983, 135: 31~34
- 60 李良漠. 硝化作用. 见: 朱兆良, 文启孝主编. 中国土壤氮素. 南京: 江苏科学出版社, 1992, 94~120
- 61 郑平, 冯孝善. 硝化作用的生化机理. *微生物学通报*, 1999, 26 (3): 215~217
- 62 郑平, 徐向阳等. 固定化硝化细菌耐低温机理的研究. *生物工程学报*, 1997, 13 (3): 334~338
- 63 华兆哲, 陈坚等. 清除水体氨氮污染的微生物制剂的研究(). 亚硝酸细菌的性质及其动力学. 见: 第八届全国化学工程会议论文集. 天津: 天津大学出版社, 1996, 21~24
- 64 王歆鹏, 陈坚等. 硝化菌群在不同条件下的增殖速率和硝化活性. *生物工程学报*, 1999, 5(1): 64~68

application, the annual growth rate of soil organic matter is the highest in the farmyard manure treatment, followed by the green manure treatment and the straw treatment. The relation between accumulation of organic matter and quantity of organic manure applied is $Y=Ae^{bx}$, where Y stands for content of organic matter in the soil and X for quantity of organic manure applied. The primary factors affecting the accumulation rate are quantity and C/N of the organic matter applied. C/N of the organic matter has a major effect on the accumulation coefficient of organic matter of different organic manure source(kg OM/kg fertilizer).

The most important problems affecting increasing content of organic matter in red soil through application of organic manure are sources and transportation of organic manure, especially in hilly red soil areas. The results of the experiment indicate recycling straw as manure in the plots yet slightly increases organic matter content in the red soil, and also brings back most part of the potassium (>60 percent) absorbed by the crop to the soil, but at a low rate. Thereby, this measure can be taken as solution to the above-mentioned problems in farming practice.

Key words Organic matter , Organic manure , Long-time experiment , Upland of red soil

(上接第 386 页)

ADVANCE IN MOLECULAR BIOLOGY OF HETEROTROPHIC NITRIFIER

Wang Yiming Peng Guanghao

(Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science, Nanjing 210008)

Abstract Nitrification is an important part of N cycle in nature. Besides the well known autotrophic nitrifiers belonging to the *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* groups, there are some heterotrophic microorganisms and methanotrophic bacteria that are able to do the job. Advance in molecular biology of heterotrophic nitrifier is reviewed in this paper.

Key words Nitrification, Heterotrophic nitrifier, Molecular biology

(上接第 391 页)

DB32/T343.1-1999 and GB15618-1995. The county has a total of 5.30×10^4 hm² of farmland, or 97.7% of the county's total, in compliance with the national and local environmental norms for production of non-hazard agricultural produce (vegetables, grain, cooking oil); With the standard (GB/T18407.1-2001) as the norm for assessment of the natural background value of the soil, the integrated pollution index of the county is 0.86, falling into the category of "clean". About 79.3% of the soil is of Grade One (clean), Factors contributing to the soil pollution are in the order of As>Cr>DDT>Hg>Cu>Pb>Cd> benzene hexachloride, which is mainly the result of some traditional cotton fields having been slightly contaminated with agro-chemicals (DDT, Hg, Arsenic products) and the patterns of land use and pesticide utilization in the 70-80s. In terms of regions and severity of pollution, the Lixiahe Region > coastal region > the Riverside region. Based on the research results, strategies for utilization and remediation of the soils are brought forth.

Key words Farming soil, Pollution, Monitor, Evaluate, Use