

DOI: 10.13376/j.cbls/2021047

文章编号: 1004-0374(2021)04-0428-10

硝酸盐呼吸和厌氧氨氧化的机制及其应用研究进展

朱凌峰, 陈雪岚*

(江西师范大学生命科学院, 南昌 330022)

摘要: 硝酸盐呼吸过程广泛存在于厌氧及兼性厌氧菌中。当硝酸盐存在时, 微生物在微氧或缺氧条件下, 以硝酸盐作为电子受体, 与电子传递呼吸链过程相耦合, 产生能量并用于维持细胞的基本生命活动。硝酸盐的呼吸过程对污水处理、土壤氮保持、微生物氮循环具有重要作用, 研究硝酸盐呼吸对环境保护具有重要意义。该文对反硝化作用、硝酸盐异化还原为铵这两种硝酸盐呼吸和以硝酸盐为间接电子受体的厌氧氨氧化过程进行了综述, 阐述了与硝酸盐呼吸、厌氧氨氧化有关的氧化还原酶基因簇以及相应的氧化还原酶的结构和功能, 并对两者研究现状和未来发展进行了总结与展望。

关键词: 硝酸盐呼吸; 电子受体; 硝酸盐异化还原为铵; 反硝化作用; 厌氧氨氧化

中图分类号: Q939.97; X7 **文献标志码:** A

Research progress on the mechanism and applications of nitrate respiration and anaerobic ammonium oxidation

ZHU Ling-Feng, CHEN Xue-Lan*

(Faculty of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: Nitrate respiration occurs extensively in anaerobic and facultative anaerobes. In the presence of nitrate, microorganisms take nitrate as electron acceptor under microaerobic or anoxic conditions, which is coupled with the process of electron transfer respiratory chain to generate energy and maintain the basic life activities of cells. The respiration process of nitrate plays an important role in wastewater treatment, soil nitrogen conservation and microbial nitrogen cycling. Thus, it is of great significance to study nitrate respiration for environmental protection. In this paper, denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium (DNRA) and anammox process with nitrate as indirect electron acceptor were reviewed, the structure and function of oxidoreductase gene cluster related to nitrate respiration and anammox were described, and the research status and future direction of development were summarized and prospected.

Key words: nitrate respiration; electron acceptor; DNRA; denitrification; anaerobic ammonia oxidation

呼吸是大多数生物的一个最基本的生命活动。细胞代谢产生的或从环境中吸收的自由能通过膜被转换成原动力, 在呼吸过程中, 该原动力被用来驱动三磷酸腺苷的合成^[1]。氧是呼吸链最常见的末端电子受体, 但也有研究表明, 原核生物在缺氧环境中可以利用替代受体进行呼吸作用, 如甲酸盐、硫酸盐、碳酸氢盐、硝酸盐和铁等^[2-3]。在这些电子受体中, 硝酸盐是生物圈中重要的环境组成成分, 含量丰富, 具有较高的标准氧化还原电位, 产生能量的能力强, 被认为是微生物进行厌氧呼吸的首选受

体。因此, 硝酸盐成为许多细菌、古细菌和一些真核生物无氧呼吸时主要的电子受体^[4-5]。另外, 硝酸盐和亚硝酸盐的还原对氮同化和厌氧代谢亦至关重要。为了更好地掌握微生物体内氮代谢平衡的原理, 有必要了解每一类参与硝酸盐呼吸的氧化还原

收稿日期: 2020-10-15; 修回日期: 2020-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960014, 31660019);

江西省自然科学基金重点项目(20202ACBL205001)

*通信作者: E-mail: xuelanchen162@163.com

酶的具体作用, 明确硝酸盐的呼吸作用机制及其在生产生活中的应用, 以期科研人员进一步研究利用硝酸盐呼吸作用提供理论参考。

1 硝酸盐呼吸的方式

根据最终生成产物以及催化机制的不同, 以硝酸盐作为电子受体的硝酸盐呼吸主要分为反硝化作用、硝酸盐异化还原为铵两种方式, 厌氧氨氧化的直接电子受体为亚硝酸盐, 但其存在将硝酸盐转化为亚硝酸盐的代谢途径, 在此也归类于硝酸盐呼吸^[6]。

1.1 反硝化作用

反硝化作用在系统发育中广泛存在, 在细菌、古生菌和真核生物中都发现了反硝化作用。Francis等^[7]对淡水环境和海水生态系统中的反硝化菌群研究发现, 占据反硝化作用主导地位的菌群是变形杆菌门。其中, 研究最广泛、最透彻的完全反硝化菌属为假单胞菌属(*Pseudomonas*)和海杆菌属(*Marinobacter*)^[8]。

反硝化作用是通过相应的硝酸盐还原酶(nitrate reductase, Nar)、亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, Nir)、一氧化氮还原酶(nitric oxide reductase, Nor)和一氧化二氮还原酶(nitrous oxide reductase, Nos)的连续作用, 将硝酸盐还原为亚硝酸盐、一氧化氮(NO)、一氧化二氮(N₂O), 最终还原为氮气(N₂)的一个呼吸过程(图1)。有的微生物因为Nos或Nor的缺失, 其反硝化终产物是NO或N₂O, 称为不完全反硝化^[9-10]。不完全反硝化作用可能是全球主要的N₂O产生途径, 且在硝酸盐浓度较高、低氧条件和充足的有机碳促进还原的情况下具有巨大的优势^[11]。

在细菌中, 富马酸硝酸还原调控蛋白(fumarate nitrate reduction regulatory protein, Fnr)或其同源蛋白能通过检测氧气浓度^[12-13], 正向调控硝酸盐呼吸作用所需的基因^[14-15]。大多数具有硝酸盐呼吸作用的物种都含有硝酸盐/亚硝酸盐感应调节蛋白(nitrate/nitrite response regulatory protein, NarX/NarL)系统, 其构成了最常见的反硝化的硝酸盐感受系统^[16-18]。然而, 有的反硝化细菌, 如嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)缺乏NarX/NarL系统及其同源蛋白, 但其在反硝化过程中存在具有类似作用的硝酸盐传感器(nitrate sensors, DrpAB)^[19]。NarX/NarL或DrpAB双组分系统检测到细胞周质中存在硝酸盐时, 激活NO₃⁻/NO₂⁻转运蛋白NarK的表达。在大多数反硝化细菌中, 硝酸盐和亚硝酸盐的转运过程都是通过跨膜转运体进行的, 该转运体属于蛋白质的主要促进因子超家族(major facilitator superfamily transporters, MFS)成员, 是一个独特的亚家族, 称为NarK^[20]。NarK1将NO₃⁻转运至胞质侧, 由膜结合型硝酸还原酶NarG还原成NO₂⁻; NarK2则将产物NO₂⁻反转运至细胞周质^[21]。

细胞周质中的NO₂被亚硝酸盐还原酶NirK/NirS催化生成NO。NirK和NirS都是同源三聚体蛋白酶, 不同的是NirK以铜原子作为辅因子, 而NirS以细胞色素cd₁作为辅因子来行使催化功能^[22-23]。NirS和NirK催化生成过量的NO会对活细胞产生危害, 因为它的反应活性很高, 会导致细胞内的核酸、脂类、过渡金属元素和蛋白质等化合物氧化, 从而影响它们的功能^[24-25]。环腺苷酸受体蛋白(cAMP receptor protein, Crp)/Fnr蛋白家族全局转录调节因

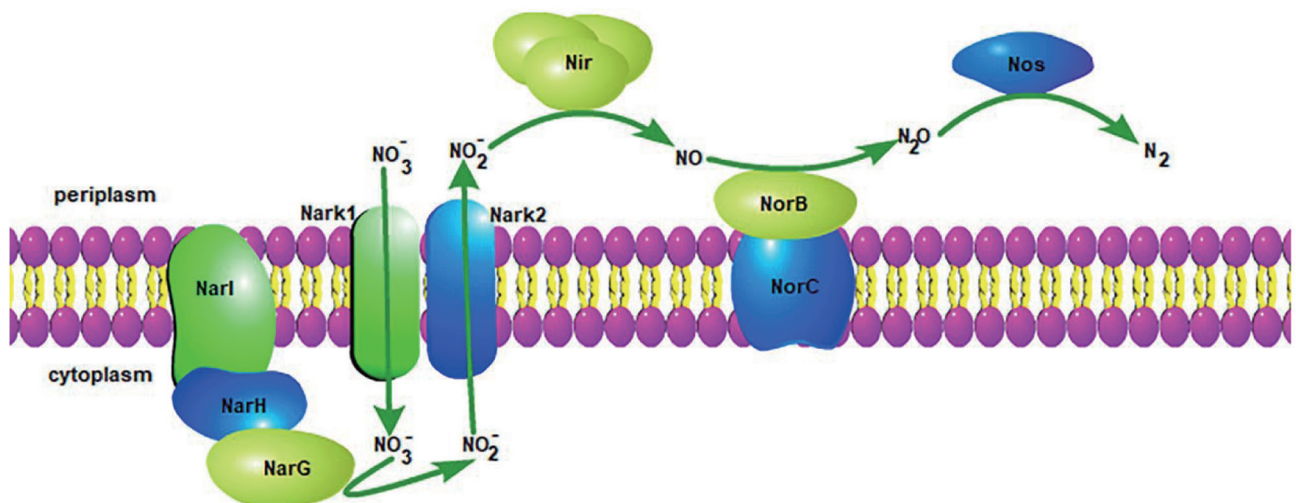


图1 反硝化作用的主要催化反应示意图

子会对NO进行响应,调节Nir与Nor的表达,以此减少NO的生成或提高NO的消耗量^[24,26]。为防止NO的积累,Nor将其还原成N₂O。Nos是参与反硝化作用所需的4种酶中的最后一种,它在革兰氏阴性菌中属胞质酶,而在革兰氏阳性菌中则为膜结合酶。Nos能以N₂O为电子受体,将其还原成N₂^[22];但大约40%的反硝化菌都缺乏*nosZ*基因,无法表达出Nos,这导致反硝化作用的最终产物是N₂O而非N₂^[27]。微生物代谢所产生的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)作为生物反硝化作用的直接电子供体,通过电子传递系统,即NADH脱氢酶复合物I、醌池、bc₁复合物III和细胞色素c将电子转移给相应的反硝化还原酶^[28-29]。

1.2 厌氧氨氧化

厌氧氨氧化反应(anaerobic ammonia oxidation, anammox)是以铵作为电子供体,以亚硝酸盐作为唯一的电子受体,在缺氧环境中生成氮气或同时生成硝酸盐副产物^[30]。厌氧氨氧化细菌是该生物反应的功能性微生物,是一种革兰氏阴性厌氧微生物;它包含一个具有梯形膜脂质结构的厌氧氨氧化体,这是与线粒体功能类似的细胞器,能够产生质子动力势并驱动ATP合酶生成三磷酸腺苷^[31]。在这个结构体系中,厌氧氨氧化细菌利用包括大量的细胞色素c在内的多种蛋白质,通过逐步生成NO和有

毒的、能量极其丰富的胼将亚硝酸盐和氨转化为N₂^[32]。第一个被分离发现的厌氧氨氧化菌是*Candidatus Brocadia*,现已发现的厌氧氨氧化菌均属于浮霉状菌纲(Planctomycetes),除了个别催化反应中酶的差别,它们有着及其相似的亚硝酸盐代谢途径^[8](图2)。

当生长环境中缺乏亚硝酸盐时,厌氧氨氧化菌的NarG将硝酸盐还原生成亚硝酸盐^[33];同时,在自然水体及其沉积物中,氨也会在好氧/缺氧界面转化为亚硝酸,为厌氧氨氧化菌的生存提供有利条件。亚硝酸盐被亚硝酸还原酶Nir进一步还原成NO,NO的生成反应是厌氧氨氧化过程的关键步骤^[34],反应过程所需的电子由细胞色素bc₁复合体提供,不产生质子动力势^[6,35]。Nir与NarG一样既存在于反硝化细菌中,又存在于厌氧氨氧化细菌中;不同厌氧氨氧化菌的Nir其辅因子会有所差别,通常是铜原子或者细胞色素^[36]。

生成的NO与进入厌氧氨氧化体的铵在胼合成酶(hydrazine synthase, Hzs)的作用下生成胼,此过程由细胞色素bc₁复合体供应3e⁻,亦不产生质子动力势^[6,37]。其中,Hzs是一种多蛋白复合物,每个亚基包含两个独特的c型血红素活性位点,同时也是氧化还原反应的位点,血红素中的电子转移过程在胼N-N键的形成中起着重要的作用^[38];其晶体结构

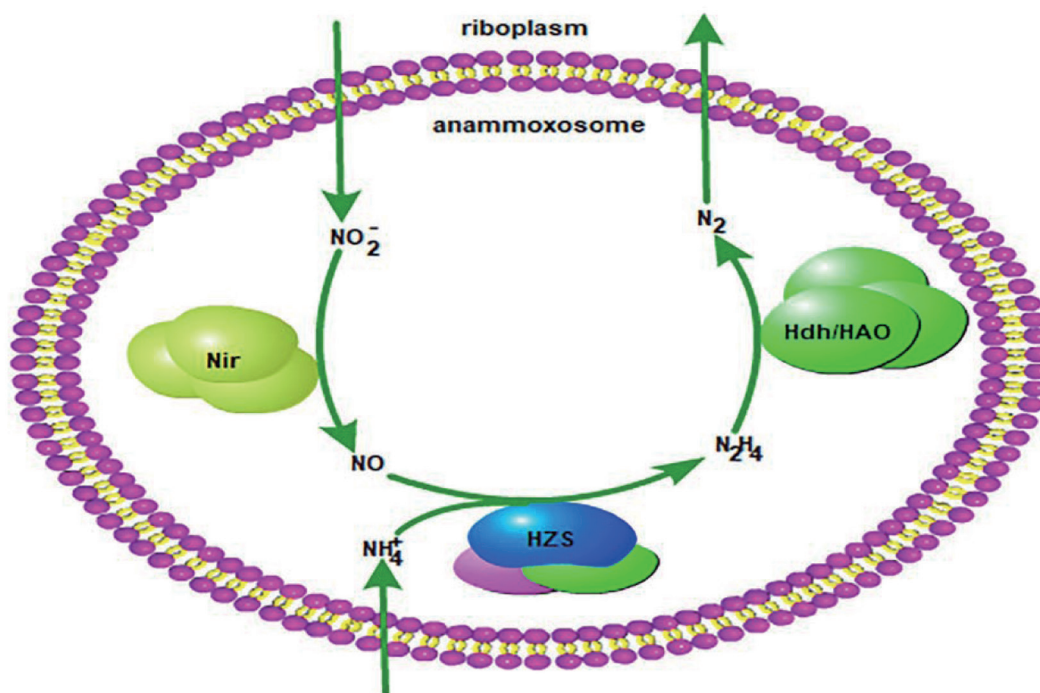


图2 厌氧氨氧化的主要催化反应示意图

揭示了胍合成的两步机制: NO在Hzs的 γ 亚基活性位点上获取三个电子而被还原成羟胺(NH_2OH), 随后与 NH_3 缩合, 在 α 亚基的活性中心产生胍^[38-39]。氨氧化体的梯形膜脂质结构有利于阻止胍进入细胞质中对细胞产生毒性^[31,40]。

最后, 胍在胍脱氢酶(hydrazine dehydrogenase, Hdh)或与其基因序列高度相似的羟胺氧化酶(hydrazine oxidoreductase, Hzo)的催化下生成 N_2 , 并通过辅酶Q将 $4e^-$ 传递给细胞色素 bc_1 复合体, 该过程所产生的质子动力势用于合成ATP^[37,41]。Hdh和Hzo均以同型三聚体的形式存在, 它们的亚基通过一种罕见的交联方式在血红素的催化部分和相邻亚基上的保守的酪氨酸残基之间共价连接, 这种共价交联被认为可以通过扭曲血红素平面来调节血红素的活性位点, 从而促进氧化催化^[41]。

1.3 硝酸盐异化还原为铵

硝酸盐或亚硝酸盐是经过反硝化作用还是异化还原为铵, 决定了氮元素是以 N_2 气体形式排出还是生成铵被回收利用。相比于反硝化作用, DNRA的研究并不深入, 直到近些年, 才发现有一些细菌可以同时含有反硝化作用和DNRA作用的基因库^[42]。硝酸盐在反硝化与DNRA的代谢分配量会受到C/N比值(即电子供体和电子受体的比值)的影响, 在电子受体受限制的条件更有利于DNRA过程^[43-44]。

一些具有DNRA过程的有机体也会含有编码膜结合型硝酸还原酶Nar的基因簇, 但一般并未被激活转录, 因此, DNRA的起始底物亚硝酸盐常常需要由周质硝酸还原酶(periplasmic nitrate reductase, Nap)复合体NapAB还原硝酸盐生成。NapAB转移 $2e^-$ 至硝酸盐催化其生成亚硝酸盐, 该反应过程依赖于NapAB特殊的活性中心结构, 它含有一个 4Fe-4S 簇和两个c型血红素形成分子内电子转移链, 可以将电子传递到活性位点^[45]。膜结合的细胞色素c(NapC)作为电子供体, 电子从醌池经NapC转移给

NapB再转移至NapA, 最后传递给电子受体硝酸盐^[6]。有的微生物的nap基因簇中不存在NapC, 如产琥珀酸沃廉菌(*Wolinella succinogenes*), 但其含有一个napAGHBFLD基因簇, 醌池中的电子能通过NapH和NapG流向NapAB^[46]。

DNRA的第二个反应, 即亚硝酸盐还原为铵, 与终端代谢产物是易挥发的气态氮氧化物的反硝化作用相反, 亚硝酸盐被还原生成不易流失的铵(图3)。亚硝酸盐还原酶Nrf作为催化DNRA特征性反应过程的关键酶, 可以作为研究环境中DNRA细菌的遗传标记^[47]。Nrf有两类, NrfHA和NrfABCD。在*W. succinogenes*和其他变形杆菌中, 膜结合的NrfH蛋白介导了从醌池到NrfA蛋白的电子传输, 并将NrfHA酶蛋白复合物固定在细胞质膜的胞外侧^[48]。Na等^[49]利用X射线晶体衍射测定了来自脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*)的亚硝酸还原酶NrfH₂A₄的三维结构, 发现它由6条蛋白链和28个血红素辅助因子组成, NrfH链上的4个亚铁血红素分子被认为只是作为一个传递链, 从醌池中传递电子, NrfA链上的5个血红素分子中只有血红素A₁包含活性位点, 其他血红素(A₂~A₅)则参与电子的转移、存储和释放。在NrfABCD中, NrfB被认为是NrfA的直接电子供体, 电子来源于甲酸脱氢酶氧化甲酸盐, NrfB通过膜整合蛋白复合物NrfC-NrfD将电子转移到NrfA^[48]; 另一种观点是电子来源于醌池, 但NrfB同样是依赖于膜整合蛋白复合物NrfC-NrfD将电子从醌池转移给NrfA^[6]。NrfA还原亚硝酸盐生成 NH_4^+ , 细胞周质侧生成的 NH_4^+ 通过 NH_4^+ 转运体AmtB进入胞质侧, 进而流向生物合成途径被重新利用^[42]。

2 应用

随着经济的发展和公众环保意识的提高, 水环境污染已成为相关学术界探讨的中心话题, 以硝酸盐呼吸为主的污水处理方式受到科研工作者的广泛

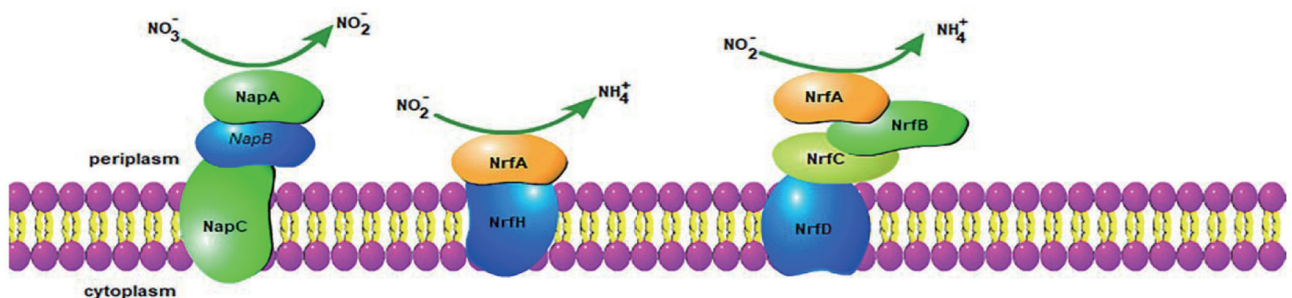


图3 DNRA的主要催化反应示意图

关注。硝酸盐呼吸作用除用于高氮废水脱氮,对于废水中磷和芳香族化合物的处理也有着重要作用。微生物介导生态系统氮循环过程,有关微生物中的反硝化、厌氧氨氧化和DNRA在各级生态系统中如何影响氮循环的研究报道较多。此外,土壤生态系统中的硝酸盐呼吸研究对于农业生产具有实际应用价值,相关报道不少,主要集中在减少土壤活性氮损失和提高土壤氮保留能力等方面。

2.1 水环境治理

2.1.1 脱氮

无机氮积累引起的水质恶化是一种典型的污染问题,直接或间接地影响着人类和动物的健康。无机氮在水中主要以 NO_3^- 和 NH_4^+ 的形式存在,污水处理脱氮就是指将不同形式的氮转化为氮气,排放到大气中。1995年, Mulder等^[50]用反硝化流化床反应器处理产甲烷反应器排出的废水时发现了厌氧氨氧化过程,以此奠定了厌氧氨氧化与反硝化作用耦合进行废水脱氮的基础。

在传统的生物脱氮(biological nitrogen removal, BNR)工艺中,城市污水中的氮是通过硝化-反硝化复合去除的,即氮在有氧的情况下,先氧化成硝酸盐,再以生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)为电子供体将硝酸盐还原成氮气^[51]。然而, BNR工艺因为在硝化过程中曝气能耗高、反硝化过程的外部BOD要求高、污泥生产过剩等问题受到越来越多的质疑^[52]。相较于BNR工艺,厌氧氨氧化耦合短程反硝化作用(anammox and partial denitrification coupling, AMX/PDN)是一种环保、高效的脱氮处理工艺,可以同时去除氨态氮、硝态氮和亚氮^[53]。与BNR相比, AMX/PDN脱氮的单位需氧量和曝气能耗可分别降低47.7%和60%,并且AMX/PDN的污泥产量可降低66.3%,因此, AMX/PDN比BNR具有更大的经济可行性和环境可持续性^[51,54]。Deng等^[55]建立了一体化短程硝化、厌氧氨氧化耦合反硝化(single-stage partial nitrification, anammox and denitrification, SPNAD)工艺,实现了对城市污水的深度脱氮,第一阶段只进行短程硝化,通过控制溶解氧浓度和曝气时间,使得亚硝酸盐积累速率超过95%;第二阶段则同时进行厌氧氨氧化和反硝化,脱氮效率最高可达到97.1%。前期的短程硝化过程易受到实际城市污水中氨氮浓度变化的影响,曝气时长难以实时准确调整,无法维持稳定的出水,给后续厌氧氨氧化耦合反硝化处理带来困难,使得脱氮效率无法维持在最高水平^[56]。彭永臻等^[57]研究发

现了SPNAD系统中剩余氨氮、亚硝与溶解氧质量浓度跃变的实时对应关系,提出一种适用于连续低氧曝气的SPNAD系统的梯度递减曝气控制策略,可以较为准确、及时地对短程硝化过程的曝气时长进行调整,稳定实现了平均96.7%的总氮去除率。Wang等^[58]发现, DNRA的发生可以去除污水中的 NO_3^- ,但其终产物是 NH_4^+ ,并没有达到去除污水中氮污染物的目的。虽然在很多污水处理系统中检测到DNRA细菌的存在,但其更多的是发挥着转换氮污染物的存在形式,促进污水中氮循环的作用。Castro-Barros等^[59]提出了DNRA-anammox耦合工艺,该工艺可以实现对城市污水的可持续脱氮, DNRA可以减少废水中硝酸盐的浓度,同时为厌氧氨氧化过程提供大量的铵和亚硝酸盐,从而提高脱氮能力。虽然有关DNRA-anammox耦合脱氮工艺的研究报道较少,但AMX/PDN脱氮工艺的进一步优化离不开DNRA的参与。随着对硝酸盐呼吸机理的深入了解, DNRA联合反硝化、厌氧氨氧化进行污水处理的工艺也会不断得到改进。

2.1.2 除磷

废水中的氮、磷都是水体富营养化的主要贡献者,都应该被去除。污水处理厂的脱氮除磷功能已经成为阻止水体富营养化的有效措施,但是实际生活污水碳源缺乏, C/N比较低,脱氮和除磷存在碳源的竞争,这极大地限制了同步脱氮除磷效率^[60]。强化生物除磷(enhanced biological P removal, EBPR)是磷去除或回收的重要手段,该工艺是依靠活性污泥中的聚磷菌(phosphorus accumulating organisms, PAOs), PAOs会对污水中的磷进行过量吸收,在细胞内积累大量的磷,而通过排出富含PAOs的污泥即可使污水中的磷被有效去除^[61]。PAOs具有好氧摄磷与厌氧释磷的特性,活性污泥在厌氧和好氧条件下循环可以实现EBPR^[62]。反硝化聚磷微生物(denitrifying phosphorus accumulating organisms, DPAOs)是研究人员在PAOs的基础上,筛选到的兼具反硝化和聚磷功能的微生物,它可以在厌氧-缺氧操作条件下,用 NO_3^- 或 NO_2^- 代替氧做电子受体实现同步脱氮除磷^[63]。张玉君等^[64]对处理城市污水的序批式反应器(SBR)分别以梯度曝气、恒定曝气和传统方式运行时发现,厌氧、好氧和缺氧交替的运行方式更有利于DPAOs的富集,且梯度曝气较恒定曝气方式富集更多。这对碳源不足的低强度城市生活污水处理有重要意义,曝气段溶解氧的逐级降低提高了污泥颗粒同步硝化反硝化率并降低了能耗,

同时有利于提高同步硝化反硝化除磷效率。在无氧条件下, 最大限度地除磷可以显著降低工艺操作成本, 有利于节省曝气能耗以及反硝化所需的碳源数量^[65]。Yuan等^[66]建立了一种新型的城市废水磷去除工艺, 经EBPR-SN (semi-nitritation, 半硝化)反应器处理的废水进入厌氧氨氧化反应池, 通过严格把控好氧及厌氧反应时间, 磷去除率可达94.3%, 整个循环过程的曝气时间仅3 h, 极大地减少了能源消耗。

2.1.3 芳香族化合物降解

工业废水中芳香族化合物也是水环境中一种严重的有害污染物, 它对人类有着潜在的致癌特性。芳香族化合物具有高疏水性和持久性, 当这些化合物处于水生生态中时, 它们容易吸附在悬浮颗粒上并最终沉降到沉积物中^[67]。芳香族化合物在好氧条件下是易于降解的, 但由于覆盖水体的耗氧, 水体沉积物中芳香族化合物的主要降解过程是缺氧的^[68]。Burland等^[69]在土壤和地下水微生物的富集培养中, 观察到苯氧化成二氧化碳与硝酸盐还原相关联。苯的生物降解与硝酸盐的还原同时发生, 其比例恒定为每降解1 mol苯消耗10 mol硝酸盐。在苯降解培养中, 随着硝酸盐的还原, 亚硝酸盐在化学计量上积累, 然后慢慢还原为氮气; 当硝酸盐被耗尽, 只剩下亚硝酸盐时, 苯的降解率几乎为零。Xu等^[70]发现, 添加硝酸盐可以增强厌氧条件下芳香族化合物的降解, 但硝酸盐部分转化为亚硝酸盐时会导致亚硝酸盐在反硝化条件下积累, 这会抑制芳香族化合物的降解^[71-72]。Peng等^[73]发现, 在反硝化条件下, 加入厌氧氨氧化污泥, 可以消除亚硝酸盐, 同时增强苯的厌氧降解。显然, 厌氧氨氧化过程降低了亚硝酸盐的浓度, 解除了苯降解所受到的抑制作用。然而, 在实际的污水处理中, 人为添加厌氧氨氧化污泥是一个巨大的挑战, 且外源添加的铵也会急剧被消耗, 限制厌氧氨氧化菌的生长。Han等^[72]利用同时具有DNRA与厌氧氨氧化途径的淡水厌氧氨氧化细菌*Candidatus Brocadia*处理污水, 发现其可以通过DNRA产生的内源性铵实现低速率生长, 增强了厌氧反硝化背景下苯的降解。

2.2 农业土壤中氮素的保留

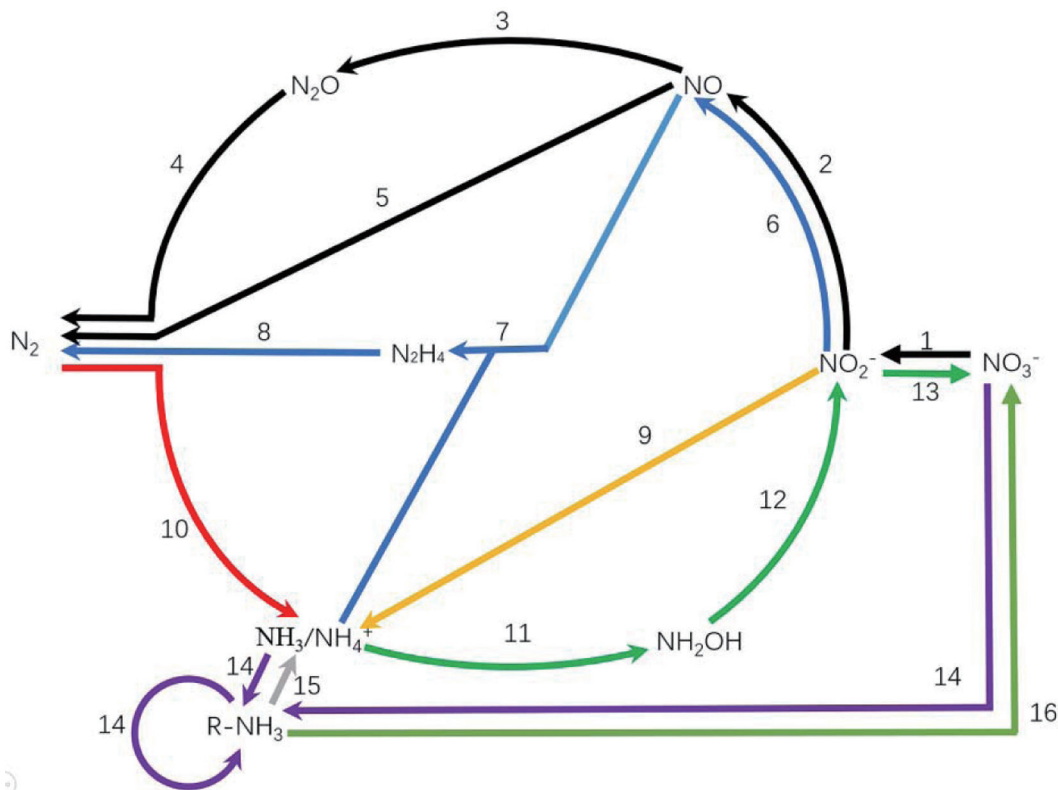
一氧化二氮是造成温室效应的气体之一, 由人类活动而排放的一氧化二氮, 有超过50%是因为农业耕地所产生的^[74]。农业土壤中的硝态氮以一氧化二氮的形式流失, 既损耗了大气平流层臭氧层, 也降低了土壤肥力, 给农业生产带来极大的影响。与铵态氮相比, 硝态氮更容易伴随着雨水渗透进入地

下水而导致氮流失, 尤其是在降雨量高的地区^[75-76]。反硝化细菌和DNRA细菌在土壤中的相对丰度与活力决定土壤中氮元素的保留程度, 反硝化过程($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)会造成氮元素以 N_2O 或 N_2 的形式流失, DNRA过程则通过将 NO_3^- 还原成不易流失的 NH_4^+ 而保留氮^[43,77]。换句话说, 有利于DNRA进程的影响因素都可以提升土壤的氮保留能力。Shi等^[78]利用同位素示踪技术和定量PCR发现, 林场中不同树种的种植会影响土壤氮素的保持能力, 树种会显著影响土壤中的微生物群落组成, 这会抑制自养硝化作用而促进DNRA活性。

目前, 研究者主要通过控制 NO_3^- 分配在DNRA和反硝化过程的流通量来决定土壤氮素的去留。Putz等^[43]通过探究不同农作物轮作种植, 充分保持土壤中较高的有机质含量, 以此维持土壤中较高的C/ NO_3^- 比率, 这将有利于DNRA过程(详见本文1.3), 因此, 涉及的微生物群落丰度的变化会降低 N_2O 的排放并最大限度地保留氮素, 最终提高了农作物的产量。农业上为了提高作物产量, 会施加大量的氮肥, 但有研究表明这会造成土壤中的有机氮损失, 对农业种植用地造成巨大的损害^[79]。因为在农业土壤中, 较高的氮输入可能会刺激厌氧氨氧化细菌的生长, 最终导致土壤氮损失^[80]。厌氧氨氧化细菌利用DNRA细菌固定的铵态氮为底物生成 N_2 , 整个耦合过程可以类似看作反硝化过程, 使得土壤氮素以 N_2 的形式流失^[81]。因此, 相关研究应集中在探究土壤中影响厌氧氨氧化进程的因素(如土壤pH、盐度、溶氧)^[81]及其与DNRA耦合程度强弱的因素上, 可能更好地利用DNRA细菌保留土壤氮, 以便为农业生产提供更大的助力。

3 总结与展望

厌氧氨氧化与部分脱氮途径耦合是一种新型的废水生物脱氮工艺, 尤其是对于含芳香化合物废水和高氮废水。但由于厌氧氨氧化菌与部分反硝化菌是在恶劣的生存条件下偶联, 偶联过程的某些操作条件和机理尚不清楚, 因此过程的控制更加困难, 这也是该过程没有得到广泛应用的原因。为了提高脱氮性能, 发展耦合脱氮工艺, 未来对耦合脱氮工艺的进一步研究应集中在以下几个方面: (1)抑制机理研究, 即对底物、有机质、盐等抑制剂的抑制作用及其机理的研究; (2)传质机理研究, 根据污泥的状态(颗粒、絮状等)和菌株在污泥中的分布, 可以研究不同条件下的传质机理以及污泥状态与物种群



1~5: 反硝化作用; 6~8: DNRA; 10: 氮固定; 11~13: 硝化作用; 14: 氮同化; 15: 矿化作用; 16: comammox
图4 微生物氮循环网络示意图

落分布之间的传质关系; (3)菌株优化, 废水中的重金属对微生物的高毒性限制了除氮效率, 可以通过基因工程技术对菌株进行改造, 筛选出对重金属盐高耐受的菌株; (4)工艺参数优化, 通过调节多种工艺参数(如pH、温度、溶解氧、氧化还原电位、碳氮比、污泥)来改善厌氧氨氧化与部分脱氮途径的耦合强度, 从而改善脱氮性能。

理论上, 农业种植土壤中DNRA细菌丰度的提升会增强土壤对氮素的保留能力, 但提高土壤DNRA细菌丰度的方法尚不明确, 这也是未来研究人员需要研究的问题; 且微生物氮循环网络的复杂性及其不完整性导致该理论应用于实际充满不确定性。毕竟土壤微生物中只有小部分被培养并研究, 而未培养的大多数微生物可能含有未发现的代谢途径, 因为一切有利于自身生命活动的氮转化方式都有可能通过进化产生, 包括未发现的氮转化过程^[34]。目前已证实存在于土壤且与氮循环具有紧密关联的微生物反应过程主要有反硝化作用、厌氧氨氧化、DNRA、氮固定、硝化作用、氮同化和矿化作用, 以及近年来新发现的comammox (图4)^[8,34,82]。土壤中新的氮转化过程, 以及未被发现的在氮循环中发挥

重要作用的微生物有待科研工作者去寻找。这要求科研人员探索更多与氮转化过程相关的代谢通路, 并确定催化该反应的关键酶, 以掌握更多可以作为细菌特征性遗传标记的基因。其次, 开发更为灵敏、便捷的分子工具检测细菌遗传标记, 用于高通量筛选土壤中参与氮循环的微生物, 并进一步对该微生物展开深入研究, 明确其氮转化方式或探索其新的氮转化过程。以上问题的解决将极大地完善氮循环网络, 为上述理论的实践应用提供科学的参考。

[参 考 文 献]

- [1] Berry BJ, Trewin AJ, Milliken AS, et al. Optogenetic control of mitochondrial protonmotive force to impact cellular stress resistance. *EMBO Rep*, 2020, 21: e49113
- [2] Zhang ZT, Wang CY, He JZ, et al. Anaerobic phenanthrene biodegradation with four kinds of electron acceptors enriched from the same mixed inoculum and exploration of metabolic pathways. *Front Environ Sci Eng*, 2019, 13: 1-12
- [3] Kern M, Simon J. Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787: 646-56
- [4] Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms

- involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci Plant Nutr*, 2008, 54: 33-45
- [5] Richardson DJ. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology (Reading)*, 2000, 146: 551-71
- [6] Kraft B, Strous M, Tegetmeyer HE. Microbial nitrate respiration--genes, enzymes and environmental distribution. *J Biotechnol*, 2011, 155: 104-17
- [7] Francis CA, O'mullan GD, Cornwell JC, et al. Transitions in nirS-type denitrifier diversity, community composition, and biogeochemical activity along the Chesapeake Bay estuary. *Front Microbiol*, 2013, 4: 237
- [8] Zhang XN, Bess BW, Daniel MS. Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chem Rev*, 2020, 120: 5308-51
- [9] Chen Y, Wang FP. Insights on nitrate respiration by *Shewanella*. *Front Mar Sci*, 2015, 2
- [10] Zhang Z, Zhang Y, Chen Y. Recent advances in partial denitrification in biological nitrogen removal: from enrichment to application. *Bioresour Technol*, 2020, 298: 122444
- [11] Quick AM, Reeder WJ, Farrell TB, et al. Nitrous oxide from streams and rivers: a review of primary biogeochemical pathways and environmental variables. *Earth-Sci Rev*, 2019, 191: 224-62
- [12] Crack JC, Green J, Thomson AJ, et al. Iron-sulfur cluster sensor-regulators. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 35-44
- [13] Mettert EL, Kiley PJ. Reassessing the structure and function relationship of the O₂ sensing transcription factor FNR. *Antioxid Redox Sign*, 2018, 29: 1830-40
- [14] Spiro S, Guest JR. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *Fems Microbiol Rev*, 1990, 6: 399-428
- [15] Al Ibrahim NA, Green J. Regulation of the *Escherichia coli* ydhY-T operon in the presence of alternative electron acceptors. *Microbiology (Reading)*, 2017, 163: 584-94
- [16] Benkert B, Quack N, Schreiber K, et al. Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arcDABC operon. *Microbiology (Reading)*, 2008, 154: 3053-60
- [17] Goh EB, Bledsoe PJ, Chen LL, et al. Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system. *J Bacteriol*, 2005, 187: 4890-99
- [18] Mangalea MR, Plumley BA, Borlee BR. Nitrate sensing and metabolism inhibit biofilm formation in the opportunistic pathogen *Burkholderia pseudomallei* by reducing the intracellular concentration of c-di-GMP. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1353
- [19] Chahlafi Z, Alvarez L, Cava F, et al. The role of conserved proteins DrpA and DrpB in nitrate respiration of *Thermus thermophilus*. *Environ Microbiol*, 2018, 20: 3851-61
- [20] Alvarez L, Sanchez-Hevia D, Sanchez M, et al. A new family of nitrate/nitrite transporters involved in denitrification. *Int Microbiol*, 2019, 22: 19-28
- [21] Goddard AD, Bali S, Mavridou DAI, et al. The *Paracoccus denitrificans* NarK-like nitrate and nitrite transporters--probing nitrate uptake and nitrate/nitrite exchange mechanisms. *Mol Microbiol*, 2017, 103: 117-33
- [22] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61: 533-616
- [23] Moura I, Moura JGG. Structural aspects of denitrifying enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 168-75
- [24] Spiro S. Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiol Rev*, 2007, 31: 193-211
- [25] Hausladen A, Stamler JS. Nitrosative stress. *Methods Enzymol*, 1999, 300: 389-95
- [26] Ebert M, Schweyen P, Broring M, et al. Heme and nitric oxide binding by the transcriptional regulator DnrF from the marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* increases napD promoter affinity. *J Biol Chem*, 2017, 292: 15468-480
- [27] Graf DRH, Jones CM, Hallin S. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. *PLoS One*, 2014, 9: e114118
- [28] Jiang M, Zheng X, Chen YG. Enhancement of denitrification performance with reduction of nitrite accumulation and N₂O emission by *Shewanella oneidensis* MR-1 in microbial denitrifying process. *Water Res*, 2020, 169: 115242
- [29] Chen JW, Strous M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827: 136-44
- [30] Li ZX, Peng YZ. Biphasic effect of nitrate on anaerobic ammonium oxidation (anammox) and related kinetic modeling. *Chemosphere*, 2020, 238: 124654
- [31] Kartal B, Kuenen JG, Van Loosdrecht MCM. Sewage treatment with anammox. *Science*, 2010, 328: 702-3
- [32] Ferousi C, Lindhoud S, Baymann F, et al. Discovery of a functional, contracted heme-binding motif within a multiheme cytochrome. *J Biol Chem*, 2019, 294: 16953-65
- [33] Wang DP, He Y, Zhang XX. A comprehensive insight into the functional bacteria and genes and their roles in simultaneous denitrification and anammox system at varying substrate loadings. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103: 1523-33
- [34] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 263-76
- [35] Kartal B, Maalcke WJ, De Almeida NM, et al. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, 2011, 479: 127-30
- [36] Hira D, Matsumura M, Kitamura R, et al. Unique hexameric structure of copper-containing nitrite reductase of an anammox bacterium KSU-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526: 654-60
- [37] Wang ZB, Ni SQ, Zhang J, et al. Gene expression and biomarker discovery of anammox bacteria in different reactors. *Biochem Eng J*, 2016, 115: 108-14
- [38] Shimizu T, Lengalova A, Martinek V, et al. Heme:

- emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 5624-57
- [39] Oshiki M, Yamada K, Kato I, et al. Biosynthesis of hydrazine from ammonium and hydroxylamine using an anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *Biotechnol Lett*, 2020, 42: 979-85
- [40] Li M, Gu JD. Advances in methods for detection of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90: 1241-52
- [41] Dietl A, Maalcke WJ, Ferousi C, et al. A 60-heme reductase complex from an anammox bacterium shows an extended electron transfer pathway. *Acta Crystallogr D*, 2019, 75: 333-41
- [42] Sun YH, De Vos P, Willems A. Nitrogen assimilation in denitrifier *Bacillus azotoformans* LMG 9581(T). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110: 1613-26
- [43] Putz M, Schleusner P, Rutting T, et al. Relative abundance of denitrifying and DNRA bacteria and their activity determine nitrogen retention or loss in agricultural soil. *Soil Biol Biochem*, 2018, 123: 97-104
- [44] Grebliunas BD, Perry WL. Carbon limitation of sediment bacterial production and denitrification in high nitrate low carbon systems. *Environ Earth Sci*, 2016, 75: 662.1-9
- [45] Zeamari K, Gerbaud G, Grosse S, et al. Tuning the redox properties of a [4Fe-4S] center to modulate the activity of Mo-bisPGD periplasmic nitrate reductase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2019, 1860: 402-13
- [46] Hein S, Witt S, Simon J. Clade II nitrous oxide respiration of *Wolinella succinogenes* depends on the NosG, -C1, -C2, -H electron transport module, NosB and a Rieske/cytochrome bc complex. *Environ Microbiol*, 2017, 19: 4913-25
- [47] Cannon J, Sanford RA, Connor L, et al. Optimization of PCR primers to detect phylogenetically diverse nrfA genes associated with nitrite ammonification. *J Microbiol Meth*, 2019, 160: 49-59
- [48] Wang XG, Tamiev D, Alagurajan J, et al. The role of the NADH-dependent nitrite reductase, Nir, from *Escherichia coli* in fermentative ammonification. *Arch Microbiol*, 2019, 201: 519-30
- [49] Na S, Bauss A, Langenmaier M, et al. Thermodynamic integration network study of electron transfer: from proteins to aggregates. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19: 18938-47
- [50] Mulder A, Van De Graaf AA, Robertson LA, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *Fems Microbiol Ecol*, 1995, 16: 177-83
- [51] Winkler MKH, Straka L. New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater. *Curr Opin Biotech*, 2019, 57: 50-5
- [52] Liu YJ, Gu J, Liu Y. Energy self-sufficient biological municipal wastewater reclamation: present status, challenges and solutions forward. *Bioresource Technol*, 2018, 269: 513-9
- [53] You QG, Wang JH, Qi GX, et al. Anammox and partial denitrification coupling: a review. *RSC Adv*, 2020, 10: 12554-72
- [54] Zhang M, Wang SY, Ji B, et al. Towards mainstream deammonification of municipal wastewater: partial nitrification-anammox versus partial denitrification-anammox. *Sci Total Environ*, 2019, 692: 393-401
- [55] Deng SY, Peng YZ, Zhang L, et al. Advanced nitrogen removal from municipal wastewater via two-stage partial nitrification-simultaneous anammox and denitrification (PN-SAD) process. *Bioresource Technol*, 2020, 304: 122955
- [56] Feng Y, Lu X, Al-Hazmi H, et al. An overview of the strategies for the deammonification process start-up and recovery after accidental operational failures. *Rev Environ Sci Bio*, 2017, 16:541-68
- [57] 彭永臻, 阮蓉蓉, 彭轶. 梯度递减曝气实现一体化部分短程硝化、厌氧氨氧化耦合反硝化工艺 (SPNAD) 的稳定运行. *北京工业大学学报*, 2020, 46: 540-5
- [58] Wang SY, Liu CL, Wang XX, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in traditional municipal wastewater treatment plants in China: widespread but low contribution. *Water Res*, 2020, 179: 115877
- [59] Castro-Barros CM, Jia MS, Van Loosdrecht MCM, et al. Evaluating the potential for dissimilatory nitrate reduction by anammox bacteria for municipal wastewater treatment. *Bioresource Technol*, 2017, 233: 363-72
- [60] Ma Y, Peng Y, Wang X. Improving nutrient removal of the AAO process by an influent bypass flow by denitrifying phosphorus removal. *Desalination*, 2008, 246: 534-44
- [61] Izadi P, Izadi P, Eldyasti A. Design, operation and technology configurations for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process: a review. *Rev Environ Sci Bio*, 2020, 19: 10.1007/s11157-020-09538-w
- [62] Barnard JL. Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Water Res*, 1975, 9: 485-90
- [63] 余鸿婷, 李敏. 反硝化聚磷菌的脱氮除磷机制及其在废水处理中的应用. *微生物学报*, 2015, 55: 264-72
- [64] 张玉君, 李冬, 李帅. 间歇梯度曝气的生活污水好氧颗粒污泥脱氮除磷. *环境科学*, 2020, 41: 3707-14
- [65] Oehmen A, Lemos PC, Carvalho G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res*, 2007, 41: 2271-300
- [66] Yuan CS, Peng YZ, Ji JT, et al. Advanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater via simultaneous enhanced biological phosphorus removal and semi-nitrification (EBPR-SN) combined with anammox. *Bioproc Biosyst Eng*, 2020, 43: 2039-52
- [67] Mai BX, Fu HM, Sheng GY, et al. Chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine and estuarine sediments from Pearl River Delta, China. *Environ Pollut*, 2002, 117: 457-74
- [68] Rivett MO, Buss SR, Morgan P, et al. Nitrate attenuation in groundwater: a review of biogeochemical controlling processes. *Water Res*, 2008, 42: 4215-32
- [69] Burland SM, Edwards EA. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 529-33

- [70] Xu MY, He ZL, Zhang Q, et al. Responses of aromatic-degrading microbial communities to elevated nitrate in sediments. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 12422-31
- [71] Van Der Zaan BM, Saia FT, Stams AJM, et al. Anaerobic benzene degradation under denitrifying conditions: *Peptococcaceae* as dominant benzene degraders and evidence for a syntrophic process. *Environ Microbiol*, 2012, 14: 1171-81
- [72] Han XK, Peng SC, Zhang LL, et al. The co-occurrence of DNRA and anammox during the anaerobic degradation of benzene under denitrification. *Chemosphere*, 2020, 247: 125968
- [73] Peng SC, Zhang LL, Zhang DJ, et al. Denitrification synergized with ANAMMOX for the anaerobic degradation of benzene: performance and microbial community structure. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 4315-25
- [74] Shcherbak I, Robertson GP. Nitrous oxide N₂O emissions from subsurface soils of agricultural ecosystems. *Ecosystems*, 2019, 22: 1650-63
- [75] Zhang YS, Zheng XZ, Ren XY, et al. Land-use type affects nitrate production and consumption pathways in subtropical acidic soils. *Geoderma*, 2019, 337: 22-31
- [76] Klaus VH, Friedritz L, Hamer U, et al. Drought boosts risk of nitrate leaching from grassland fertilisation. *Sci Total Environ*, 2020, 726: 137877
- [77] Abbas T, Zhang QC, Zou X, et al. Soil anammox and denitrification processes connected with N cycling genes co-supporting or contrasting under different water conditions. *Environment Int*, 2020, 140: 105757
- [78] Shi XZ, Wang JQ, Müller C, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium dominates soil nitrate retention capacity in subtropical forests. *Biol Fert Soils*, 2020, 56: 785-97
- [79] Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, et al. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 2004, 70: 153-226
- [80] Humbert S, Tarnawski S, Fromin N, et al. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *ISME J*, 2010, 4: 450-4
- [81] Nie SA, Zhu GB, Singh B, et al. Anaerobic ammonium oxidation in agricultural soils-synthesis and prospective. *Environ Pollut*, 2019, 244: 127-34
- [82] Van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 2015, 528: 555-9