

无机硫化合物的微生物氧化

徐海岩 颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

硫是自然界存在的重要元素之一,也是构成生物有机体必不可少的一种元素。自然界硫的转化主要是在微生物直接或间接参与下完成的。在这些微生物中,有异养菌,也有自养菌。自养菌主要是以硫杆菌属为主体的化能无机营养硫氧化菌,它们分布较广,能够从无机硫化合物氧化过程中获得能量,因而在硫素循环的重要环节——无机硫化合物的氧化作用中起着重要的作用。

能氧化无机硫化合物的硫杆菌(Thiobacillus),自发现至今已有90年。1902年,Nathansohn首先提出了硫氧化的假说,并证明了硫代硫酸盐可被硫杆菌裂解为硫和亚硫酸盐,亚硫酸盐继而氧化成硫酸盐;还证明了硫代硫酸盐可以2:1的克分子比产生硫酸盐和四硫酸盐^[1]。

在以后的半个多世纪中,硫的氧化机制研

究进展不大。1957年,Vishniac和Santer证明了硫代硫酸盐氧化过程中存在底物水平磷酸化^[2]。1960年,Peck证明了排硫硫杆菌(*T. thioparus*)中含有亚硫酸盐通过磷酸腺苷硫酸盐(APS)转化成硫酸盐的酶类,为亚硫酸盐氧化成硫酸盐的APS途径提供了一个酶学基础,另外,他还发现该菌含有硫代硫酸盐还原酶和硫化物氧化酶^[3,4]。这两种酶在以后的文献中未见进一步确证的报道,关于它们的存在与作用也无统一的结论。

1961年,Trudinger证实了在那不勒斯硫杆菌(*T. neapolitanus*)中含有硫代硫酸盐氧化酶,该酶的产物是四硫酸盐^[5]。1965年,Suzuki提出了硫氧化的模式^[6,7]。此外,Moriarty和Nicholas在1969、1970两年中报道了蚀固硫杆

1992-09-18 收稿

菌 (*T. concretivorus*) 对于多聚体硫的氧化方式^[8,9]。

进入 80 年代后, *Weiping* 和 *Kelly* 证实了在多能硫杆菌 (*T. versutus*) 中存在一个复合酶系, 能够将硫代硫酸盐经过一系列酶作用氧化成硫酸盐^[10-16]。

关于硫氧化的机制问题, 从诸多观点中可以归纳为两点: 其一认为硫氧化过程是经过一系列的多硫酸盐中间体(主要是四硫酸盐), 然后再生成硫酸盐; 其二认为在硫的氧化过程中, 不产生多硫酸盐的中间体, 氧化的第一个产物是亚硫酸盐, 然后再被氧化成硫酸盐。但是, 硫杆菌将无机硫化物氧化成硫酸盐的机制和途径等问题, 至今仍未完全解决, 其原因是:

1. 硫的氧化过程中产生了一些低价硫化物, 当其中某些化合物共存时, 尚缺乏一种准确的、可靠的微量测定方法。

2. 这些硫化物的性质都不很稳定, 在一定条件下, 可以互相起化学反应(次级反应), 使问题更加复杂化。

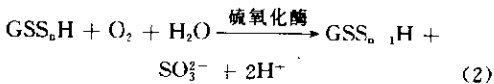
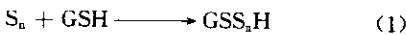
3. 不同的研究者, 用不同的菌种在不同的条件下进行实验, 也可能会有不同的解释^[17]。

另外, 硫杆菌作为化能无机营养菌, 对其研究要受到许多条件和方法的限制, 故也是这类菌的研究进展比较缓慢的原因之一。

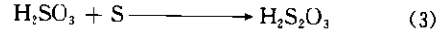
本文仅就硫杆菌对无机硫化物氧化的途径及其机制作如下讨论。

1 元素硫的氧化

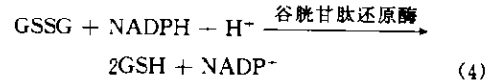
自然状态下的硫以聚合态 S_n 的形式存在(主要是 S_8 环状结构)。关于元素硫的氧化机制, 现在比较倾向于 1965 年 *Suzuki* 提出的硫氧化模式^[6,7]。模式中元素硫是在还原型谷胱甘肽 (*GSH*) 参与下, 由硫氧化酶催化, 氧化生成亚硫酸盐。对硫氧化酶的研究表明, 该酶作用的产物第一个可检测到的是亚硫酸盐, 方程式为:



在上述反应过程中, 通过谷胱甘肽多硫化物中间体 (GSS_nH), 硫原子逐个从聚合态 S_n 上解离下来, 被氧化成亚硫酸盐, 亚硫酸盐可以被继续氧化成硫酸盐(见反应式 2), 也可与硫经非酶缩合形成硫代硫酸盐, 反应式为:



当硫原子全部被氧化后, 生成的氧化型谷胱甘肽 (*GSSG*) 可在谷胱甘肽还原酶作用下, 再生成还原型谷胱甘肽^[19]:

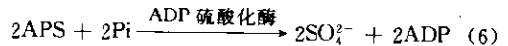
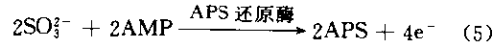


硫化物的氧化是通过硫化物氧化酶(?)的作用, 生成元素硫, 再经上述反应生成亚硫酸盐。

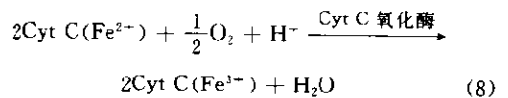
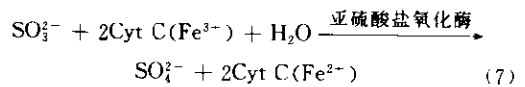
2 亚硫酸盐的氧化

一般无机硫化物的氧化都是经过亚硫酸盐, 然后被氧化成硫酸盐, 所以, 亚硫酸盐的氧化是比较关键的部分。已经证明, 亚硫酸盐的氧化有两条途径:

2.1 亚硫酸盐以磷酸腺苷硫酸盐为中间体, 通过一系列酶的催化, 被氧化成硫酸盐:



2.2 亚硫酸盐通过以细胞色素 C (*Cyt C*) 为电子受体的亚硫酸盐氧化酶^[20-22]的作用, 被氧化成硫酸盐:

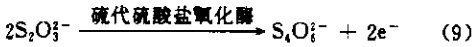


3 硫代硫酸盐的氧化

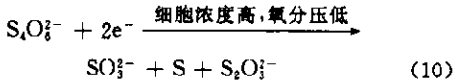
几乎所有的硫杆菌都能以硫代硫酸盐为能源进行生长, 但它们对硫代硫酸盐的氧化, 随反应条件和菌种的不同而表现出很大差异。

3.1 在某些培养条件下, 硫代硫酸盐在硫代硫

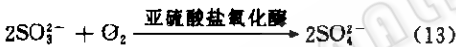
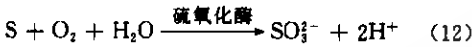
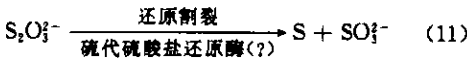
酸盐氧化酶作用下形成大量的四硫酸盐,但在多能硫杆菌和脱氮硫杆菌(*T. denitrificans*)中,此酶的活性非常低^[23,24]。反应式为:



生成的四硫酸盐在有些情况下,如细胞浓度高,氧分压低时,则可进行还原性割裂,除可重新形成硫代硫酸盐外,还可形成亚硫酸盐和元素硫:



3.2 在某些条件下,硫代硫酸盐通过还原割裂形成了元素硫和亚硫酸盐。元素硫通过硫氧化酶的作用形成亚硫酸盐,亚硫酸盐则最终被氧化成硫酸盐:



当菌体在硫代硫酸盐培养基上生长产酸,导致周围环境 pH 值降至 4 以下时,硫代硫酸盐便会析出胶体硫。

综上所述,硫杆菌对于无机硫化物的氧化可以归纳为图 1。

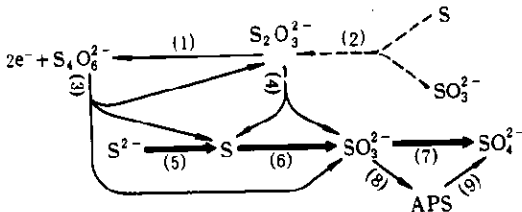


图 1 硫杆菌的无机硫化物氧化机制

- (1) 硫代硫酸盐氧化酶; (2) 非酶缩合; (3) 还原割裂 (高细胞浓度, 低氧分压); (4) 还原割裂 (硫代硫酸盐还原酶(?)); (5) 硫化物氧化酶(?); (6) 硫氧化酶;
- (7) 亚硫酸盐氧化酶; (8) APS 还原酶; (9) ADP 硫酸化酶;

当基质是硫化物和元素硫时,氧化进入主要途径(粗箭头表示);如果基质是硫代硫酸盐时,以还原割裂为主,形成硫和亚硫酸盐;进入主要氧化途径,被氧化成硫酸盐;如果硫的氧化速度低于硫代硫酸盐的割裂速度,便会造成硫的沉积;如果硫代硫酸盐的还原割裂受阻时,则会在硫代硫酸盐氧化酶的作用下,生成四硫酸盐;当细胞浓度较高,氧分压较低时,四硫酸盐进行还原割裂,生成硫、亚硫酸盐和硫代硫酸盐。

4 多能硫杆菌(A₂)的硫代硫酸盐氧化机制

多能硫杆菌是兼性化能无机营养菌,能够以硫代硫酸盐为唯一能源进行生长。大量的工作表明,多能硫杆菌的整体细胞或无细胞提取物中含有一个可溶性的复合酶系^[15],能够氧化硫代硫酸盐形成硫酸盐,但不产生任何可检测到的中间产物。这一复合酶系由四部分组成:酶 A、酶 B、细胞色素 C₅₅₁ (Cyt C₅₅₁)、细胞色素 C_{552.5} (Cyt C_{552.5})^[12],它们的主要特性见表 1。这四部分缺一不可,是一个复合酶系统。

用同位素标记实验证明,1 克分子硫代硫酸盐氧化产生 2 克分子标记的硫酸盐。并且证明了硫代硫酸盐氧化的第一步不是-S-S-键裂解反应,硫氰化酶(Rhodanese)与此第一步反应无关,亚硫酸盐也不是硫代硫酸盐氧化过程中的中间产物。实验还发现,反应的第一步,硫代硫酸盐与复合酶系中的酶 A 是以 1:1 的比率相结合的。

以上结果表明,多能硫杆菌复合酶系催化的硫代硫酸盐的氧化反应是一个整体的、不分阶段的连续过程,该酶系中的亚硫酸盐脱氢酶(亚硫酸盐:Cyt C 氧化还原酶)与酶 B 和 Cyt C₅₅₁ 紧密相连,而不作为一个单独的酶起作用。

表1 多能硫杆菌硫代硫酸盐氧化复合酶系的组分及主要特性

组 分	分 子 量	等 电 点	最大光吸收带(nm)	功 能
酶 A	16,000	4.2	—	复合酶系上 $S_2O_3^{2-}$ 结合部位
酶 B	64,000 ($2 \times 32,000$)	4.3	—	复合酶系的关键组分
Cyt C ₅₅₁	260,000 ($6 \times 43,000$)	5.2	551	复合酶系的电子载体
Cyt C _{552.5}	56,000 ($2 \times 29,000$)	4.8	552.5	
亚硫酸盐 脱氢酶	43,000	4.3	—	催化 SO_3^{2-} 还原 Cyt C, 对酶系有 增活作用

用^[14]。目前还不清楚,在硫代硫酸盐氧化过程中的哪个阶段,二个硫原子分离开。另外,在多能硫杆菌中,磷酸腺苷硫酸盐途径缺失^[25],硫代硫酸盐氧化酶和硫氧化酶或缺失或只有很低的活性^[12]。由此我们看出,复合酶系的优势就在于它为反应中间体提供了由一个酶到另一个酶的非常短的时间,这对于那些不稳定的化合物,象亚硫酸盐和其它在硫代硫酸盐氧化过程中以中间体形式产生的还原性硫化物来说,是尤其重要的。

5 硫杆菌的电子传递系统及磷酸化机制

不管是专性化能自养的,还是兼性化能自养的硫杆菌,在自然状态下,都包含着连接

NAD 和 O_2 的所必需的一切电子传递组分。在好氧硫杆菌中,硫化物氧化所产生的电子是在细胞色素 c 水平上进入传递链的,以 O_2 为最终电子受体,也就是说,每传递一对电子,只有一个部位与 ATP 合成相偶联。而脱氮硫杆菌在厌氧条件下,氧化硫化物产生的电子则是在黄素蛋白(FP)或细胞色素 b'水平上进入传递链的,这表明,每传递一对电子,有两个部位可以产生 ATP^[26],而且是以硝酸盐为最终电子受体,这是脱氮硫杆菌区别于其它硫杆菌之处。关于硫杆菌的电子传递系统及氧化磷酸化的机制见图 2。

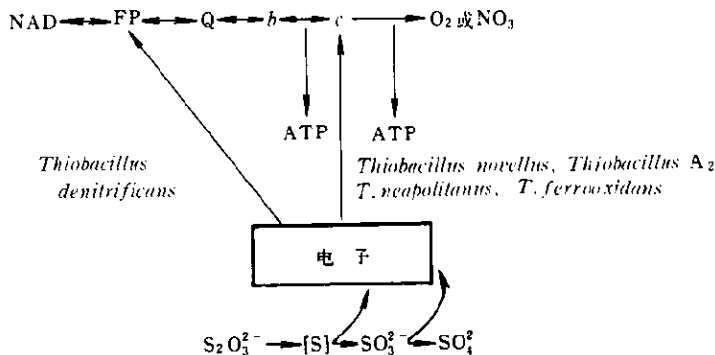


图2 硫杆菌中的电子传递系统及氧化磷酸化机制

在多能硫杆菌中,电子传递系统包括二个不寻常的作为电子受体的C-型细胞色素:C₅₅₁、C_{552.5},实验证实了来自硫代硫酸盐氧化的8个电子,在复合酶系的催化下,被这二个细胞色素C所接受,并连续地传递到呼吸链上,产物硫酸盐的氧来自水。氧化1克分子硫代硫酸盐,需消耗2克分子O₂,P/O比约为1。虽然氧化硫代硫酸盐的复合酶系是可溶的(130,000g不沉淀),但氧的吸收则需要位于膜上的细胞色素C和细胞色素氧化酶。利用抗霉素A和HQNO进行的研究表明,抗霉素A和HQNO对多能硫杆菌的氧化磷酸化的效率没有什么大的影响,这与依赖NADH₂的氧化磷酸化相反,后者可被严重抑制。这说明,由硫代硫酸盐氧化成硫酸盐和与ATP合成的偶联,不包括通过细胞色素b的电子传递。而且,2,4-二硝基苯酚(DNP)可以抑制存在于上清液中的ATP的合成,却不抑制氧化作用,说明ATP的合成与底物水平磷酸化无关,这与该菌明显地缺失磷酸腺苷硫酸盐还原酶是一致的^[26]。关于多能硫杆菌中的电子传递机制及复合酶系在细胞中的定位情况见图3。

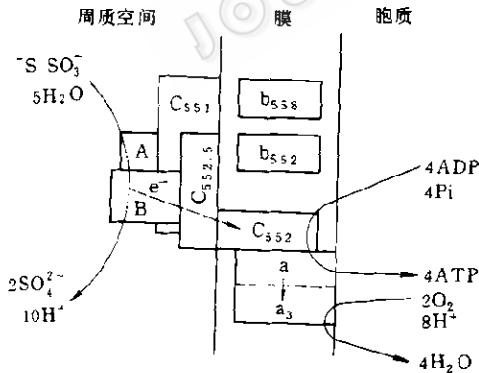


图3 多能硫杆菌的电子传递机制及复合酶系的定位^[16]

在硫杆菌中唯一存在的底物水平磷酸化发生于磷酸腺苷硫酸盐途径。反应的第一步(见反应式5),在AMP存在的条件下,亚硫酸盐在磷酸腺苷硫酸盐还原酶的催化下,氧化生成磷酸腺苷硫酸盐的反应中放出的4个电子可能在细

胞色素C处与电子传递链相偶联,通过氧化磷酸化产生2分子ATP[在脱氮硫杆菌中,4个电子是在黄素蛋白(FP)处进入电子传递链的,结果产生4分子ATP];反应的第二步(见反应式5),在ADP硫酸化酶的催化下,使磷酸腺苷硫酸盐磷酸化生成了ADP和硫酸盐;反应的第三步,2分子ADP在腺苷酸激酶作用下,生成了1分子ATP和1分子AMP:



结果,2分子的亚硫酸盐通过磷酸腺苷硫酸盐途径被氧化时,以底物水平磷酸化产生1分子ATP,加上反应中放出的4个电子,通过氧化磷酸化产生的2分子ATP,共产生了3分子ATP(在脱氮硫杆菌中,共产生5分子ATP)。

通过与磷酸腺苷硫酸盐途径偶联的底物水平磷酸化作用,对于氧化磷酸化的抑制剂——2,4-二硝基苯酚是不敏感的,因此,它不受其抑制,而是与AMP及Pi有依存关系。据报道,在某些硫杆菌中,通过磷酸腺苷硫酸盐途径的底物水平磷酸化作用提供给细胞的能量,大约占硫代硫酸盐氧化过程中所形成的高能磷酸盐的20—40%^[17]。

对于专性化能自养的硫杆菌来说,生长所需的能量必须取自无机硫化化合物的氧化,所需的碳源则依赖卡尔文循环固定的CO₂。由于无机硫化化合物的氧化还原电位较高(表2),所以无机硫化化合物的氧化不能直接还原NAD,因此,固定CO₂所需的还原力,必须通过反向电子传递,消耗能量来获得(图4)。由于CO₂的固定及其还原的过程是非常耗能的,而无机硫化化合物氧化所产生的能量又较少,所以硫杆菌必须氧化大量的无机硫化化合物来满足能量上的需要,如此一来,对专性化能自养硫杆菌就造成了能量上的一大障碍,使得硫杆菌生长比较缓慢,细胞得率比较低,从而给研究工作带来了一定的困难。

表 2 硫杆菌自养代谢中无机硫化化合物氧化还原反应中的氧化还原电位^[26]

反应或偶联对	E ₀ (V)
NAD/NADH ₂	-0.320
FAD/FADH ₂	-0.220
Cyt b ox• /red.	-0.040
Cyt C ox• /red.	+0.200/+0.270
H ₂ S→S+2H ⁺ +2e ⁻	-0.250
S+3H ₂ O→H ₂ SO ₃ +4H ⁺ +4e ⁻	+0.050
S ₂ O ₄ ²⁻ +3H ₂ O→2H ₂ SO ₃ +2H ⁺ +4e ⁻	-0.020
H ₂ SO ₃ +H ₂ O→H ₂ SO ₄ +2H ⁺ +2e ⁻	-0.280
S ₄ O ₆ ²⁻ /S ₂ O ₄ ²⁻	+0.024
S ₂ O ₄ ²⁻ +6H ₂ O→4H ₂ SO ₃ +4H ⁺ +6e ⁻	+0.090
APS/AMP+HSO ₃ ⁻	-0.060

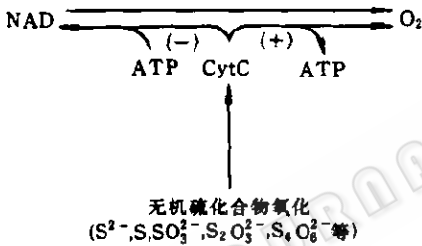


图 4 硫杆菌中正、反向电子传递示意图

虽然在近几十年中,由于科学和技术的飞速发展,对于硫杆菌无机硫化物氧化的机制有了进一步的了解,取得了很大的进展,但是,关于无机硫化物的氧化及能量贮存、偶联的过程这些问题远没有解决,特别是从分子和基因水平上进一步阐明硫化物氧化的机理还需艰苦的努力。我们相信,随着新技术、新方法、新手段不断的被采用,最终完全了解硫杆菌对于硫化物的氧化机制是确定无疑的。

参 考 文 献

[1] Nathansohn A. Mitt. zool. Stn. Neapel. 1902, **15**, 655—680.
 [2] Vishniac W, Santer M. Bact. Rev. 1957, **21**, 195—213.

[3] Peck H D. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 1960, **46**, 1053—1057.
 [4] Peck H D, Deacon T E, Davidson J T. Biochim, biophys. Acta. 1965, **96**, 429—446.
 [5] Trudinger P A. Biochem, J. 1961, **78**, 680—686.
 [6] Suzuki I. Biochim. biophys. Acta. 1965, **104**, 359—371.
 [7] Suzuki I, Silver M. Biochim. biophys. Acta. 1966, **122**, 22—23.
 [8] Moriarty D J W, Nicholas D J D. Biochim Biophys Acta. 1969, **184**, 114—123.
 [9] Moriarty D J W, Nicholas D J D. Biochim Biophys Acta. 1970, **197**, 143—151.
 [10] Weiping L, Kelly D P. J Gen Microbiol, 1983, **129**, 1661—1671.
 [11] Weiping L, Kelly D P. J Gen Microbiol, 1983, **129**, 1673—1681.
 [12] Weiping L, Kelly D P. J Gen Microbiol, 1983, **129**, 3549—3564.
 [13] Weiping L, Kelly D P. Biochim Biophys Acta. 1984, **765**, 106—117.
 [14] Weiping L, Kelly D P. J Gen Microbiol, 1984, **130**, 1683—1692.
 [15] Weiping L, Swoboda B E P, Kelly D P. Biochim, biophys. Acta. 1985, **828**, 116—122.
 [16] Weiping L. FEMS. Microbiol. Lett. 1986, **34**, 313—317.
 [17] 郑士民, 顾望明, 钱新民. 自养微生物, 北京, 科学出版社, 1983, 60—65, 125—127.
 [18] Kelly D P. Aust, J. Sci. 1968, **31**, 165—173.
 [19] Oh J K, Suzuki I. Diversity of bacterial respiratory systems. CRC Press, Inc. 1980, **1**, 113—117.
 [20] Charles A M, Suzuki I. Biochim Biophys Acta. 1966, **128**, 522—534.
 [21] Lyric R M, Suzuki I. Can, J. Biochem. 1970, **48**, 334—343.
 [22] Hempfling W P, Trudinger P A, Vishniac W. Arch. Mikrobiol. 1967, **59**, 149—157.
 [23] Kelly D P. In 1st International Congress of Bacteriology, Abstracts **1**, p71. Jerusalem, International Association of Microbiological Societies, 1973.
 [24] Justin P Kelly D P. J Gen Microbiol, 1978, **107**, 131—137.
 [25] Silver M, Kelly D P. J Gen Microbiol. 1976, **97**, 277—284.
 [26] Kelly D P. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1982, **298**, 499—528.