光驱动 *Pseudomonas stutzeri*-CdS 半人工光合系统固氮产氨效果与机制

黄绍福, 靖宪月, 陈曼*, 周顺桂*

福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002

* E-mail: chenman@fafu.edu.cn; sgzhou@soil.gd.cn

收稿日期: 2020-06-14; 接受日期: 2020-09-07; 网络版发表日期: 2021-03-18

国家杰出青年科学基金(批准号: 41925028)和国家自然科学基金重大研究计划(批准号: 91751109)资助项目

摘要 基于微生物-半导体的半人工光合系统能高选择性、高效地利用太阳能驱动微生物固碳、产氢及反硝化, 受到了广泛的关注. 然而, 利用半人工光合系统驱动微生物固氮产氨却鲜见报道. 本研究成功构建了 *Pseudomonas stutzeri*-CdS (*P. stutzeri*-CdS) 半人工光合系统, 其具有捕获光能并还原 N_2 成氨的能力. 光照时, CdS 产生的光电子传递至胞内, 参与 *P. stutzeri* 固氮过程. 结果显示, 光照5天后, *P. stutzeri*-CdS 系统中 NH_4^+ 的产量达 (2.03 ± 0.07) mg/L, 是对照组的2.91~7.37倍. 光照系统表现出了明显的乙炔还原酶活性, 产生的乙烯量是对照组的6.2~100倍, 证明了 *P. stutzeri*-CdS 光照过程中的固氮酶活性. 同时, 实时荧光定量PCR技术进一步证实了光照时, *P. stutzeri*-CdS 中固氮酶基因 *nifA*, *nifD*, *nifH*, *nifK* 的相对表达丰度呈显著上调(1.41~2.35). 蛋白酶K添加处理实验表明, 该系统中胞外光电子传递至胞内不依赖于胞外蛋白, 可能为小分子氧化还原介体介导的传递过程. 本研究为发展高效、经济、绿色的氨生产提供了一种新思路, 为理解自然界的氮循环过程提供新视角.

关键词 半人工光合系统, 生物固氮, 太阳能, *Pseudomonas stutzeri*, 硫化镉 (CdS)

1 引言

氨(NH_3)是合成工农业化学品的重要原料, 同时也是一种绿色、高能的无碳能源载体和储能中间体^[1~4]. 目前, 全球 NH_3 的年产量约为1.5亿吨^[5]. 工业上 NH_3 的生产主要采用传统的Haber-Bosch工艺($N_2 + H_2 \rightarrow 2NH_3$). 尽管此工艺合成 NH_3 的效率高, 但是, 该工艺需要在高温($300^\circ C \sim 500^\circ C$)和高压(20~30 MPa)的条件下进行, 导致大量的能源消耗^[6]. 据估计, 此过程每年消

耗的能量约占全球年能耗的1%~2%, 而且消耗的 H_2 来源于天然气蒸汽重整过程($CH_4 + 2H_2 \rightarrow 4H_2 + CO_2$), 导致大量的 CO_2 产生, 加剧温室效应^[7,8]. 近年来, 研究者们开发了许多在常温常压下能催化 N_2 还原的光/电催化材料, 具有较低的能耗^[9~12]. 然而, 这些材料普遍面临着选择性低、稳定性差、成本高(主要为贵金属催化剂)等问题, 限制了其工业应用^[13]. 因此, 寻找一种高效、经济、绿色的 NH_3 生产方法, 对人类社会的可持续发展具有重要的意义.

引用格式: 黄绍福, 靖宪月, 陈曼, 等. 光驱动 *Pseudomonas stutzeri*-CdS 半人工光合系统固氮产氨效果与机制. 中国科学: 技术科学, 2021, 51: 435–445
Huang S F, Jing X Y, Chen M, et al. Feasibility and mechanism of light-driven nitrogen reduction to ammonium by a *Pseudomonas stutzeri*-CdS semi-artificial photosynthetic system (in Chinese). Sci Sin Tech, 2021, 51: 435–445, doi: 10.1360/SST-2020-0238

生物固氮是地球生态系统有效氮的主要来源, 每年氮输入量高达203 Tg (10^{12} g)^[14], 可提供生物圈中约65%的可利用氮. 生物固氮是指微生物利用自身固氮酶, 在常温常压下, 将 N_2 直接转化为 NH_3 ^[15,16], 如方程(1)所示.

该过程选择性高、不产生温室气体、不依赖难再生资源, 且固氮效率能与Haber-Bosch工艺相媲美, 是解决 NH_3 缺口的有效途径^[17]. 虽然生物固氮具有优异的催化效率, 然而该过程需要源源不断的电子参与(方程(1)), 导致生物固氮常受限于电子供体^[18]. 生物固氮过程中, 常见的电子来源包括有机碳(如乙酸盐、丙酸盐、乳酸钠等)和还原型无机物(如 Fe^{2+} , H_2 , H_2S , CO 等). 相较有机/无机电子供体驱动的固氮过程, 太阳光驱动的生物固氮过程成本较低, 受到了更广泛的关注. 在自然界中, 这个过程发生于光合固氮菌中. 光合固氮菌利用光合色素(如叶绿素), 吸收太阳光, 驱动固氮过程. 然而, 由于光合色素的光吸收效率较低, 导致光合固氮过程的光量子效率低, 限制固氮微生物对光能的利用, 同时也限制了光能到 NH_3 的转化效率. 因此, 建立一种高效的光能驱动生物固氮体系, 利于低成本、可持续 NH_3 的生产.

近年来, 半人工光合系统受到了广泛的关注. 它偶联了高选择性的生物催化和高光吸收效率的半导体, 实现了光能到化学能的高效转化^[19]. 光照时, 半导体被激发, 产生光电子, 光电子通过胞外的氧化还原物质(如细胞色素c、醌、吩嗪等)传递至胞内, 参与微生物的代谢过程, 并获得目标代谢产物. 2016年, Sakimoto等人^[20]构建了*Moorella thermoacetica*-CdS系统, 实现 CO_2 还原为单一产物乙酸, 光量子效率可达2.44%; 2018年, Wei等人^[21]构建了*Escherichia coli*-CdS系统, 实现光催化产氢, 氢气的最高产率达 $1.15 \mu mol/10^8 \text{ cells h}^{-1}$; 同时, 本团队^[22-25]也构建了*Thiobacillus denitrificans*-CdS, *Methanosarcina barkeri*-CdS, *Geobacter sulfurreducens*-CdS等一系列半人工光合系统, 分别实现了光驱动下, 硝酸盐还原至 N_2O ^[22,23]、 CO_2 还原至 CH_4 ^[24]和有机物的还原降解^[25]. 然而, 基于半人工光合系统驱动 N_2 还原成 NH_3 的研究却鲜见报道. 2016年, Brown等人^[26]从微生物中提取固

氮酶, 构建CdS与MoFe蛋白半人工光合系统, 实现了光驱动下, NH_3 的直接生成. 然而, 固氮酶的提取过程繁琐、成本较高, 且稳定性差, 限制了 NH_3 的大规模生产和实际应用. 因此, 建立一种能够稳定固氮且直接产 NH_3 的半人工光合系统, 对于 NH_3 的生产具有重要意义.

非光合固氮菌*Pseudomonas stutzeri* A1501(*P. stutzeri*)是一种电活性菌, 能够吸收胞外电子驱动自身代谢^[27], 且在缺乏碳源时, 由于能量的限制, NH_3 难以被同化利用, 因此微生物能够将 NH_3 分泌到胞外^[28]. 选用CdS作为半导体材料, 其具有高效的光捕获性能, 并且CdS具有较低的光激发态电位(-0.8 V vs NHE), 合成条件温和, 生物相容性高^[26]. 因此, 本研究通过构建全细胞*P. stutzeri*-CdS半人工光合系统, 验证该系统在光驱动下, 还原 N_2 产 NH_3 的能力. 采用扫描电子显微镜, 表征微生物和半导体材料的结合状况, 并采用X射线衍射仪(XRD)、X射线光电子能谱(XPS)等手段来表征系统中半导体材料的成分和元素形态; 采用靛酚蓝比色、乙炔还原法、固氮酶基因相对转录丰度分析及同位素标记等实验, 明确光驱动下*P. stutzeri*还原 N_2 成 NH_3 的过程; 最后通过蛋白酶K处理实验, 揭示*P. stutzeri*-CdS系统的光电子传递机制. 该研究不仅为发展高效、经济、绿色的 NH_3 的生产提供一种新思路, 也为理解自然界的氮循环过程提供新的视角.

2 材料与方法

2.1 *P. stutzeri*-CdS半人工光合系统的构建

*P. stutzeri*是一株从水稻根系中分离而得的内生固氮菌, 在低氮、微好氧条件下能够进行生物固氮^[29]. 本研究使用的*P. stutzeri*由中国农业科学院林敏赠送. 菌株的培养基成分为(g/L): K_2HPO_4 , 9.28; KH_2PO_4 , 1.81; $(NH_4)_2SO_4$, 0.661; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0242; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0056; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.99 mg/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.0515; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 1.32. 菌株的培养温度为 $30^\circ C$, 采用光度计监测细菌生长状况. 当培养基的 A_{600} 达0.4(对数期)时, 向培养基中添加0.1 wt%的半胱氨酸、1 mmol/L Cd^{2+} 和1 mmol/L S^{2-} . 该溶液在150 r/min恒温振荡器下继续培养24 h, 此时悬浮液颜色由白色逐渐变为淡黄色, 表明*P. stutzeri*-CdS已经形成. 将*P. stutzeri*-CdS离心

(6000 r/min, 10 min)收集, 然后用0.9%的生理盐水清洗三次, 最后重悬浮至25 mL磷酸盐缓冲体系中(66 mmol/L, pH 7, 且不含氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和碳源 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 无机培养基使用前, 除氧灭菌. 放置于黑暗条件12 h, 消耗微生物体内剩余的有机物及还原力, 留待光驱动 N_2 还原实验使用.

2.2 *P. stutzeri*-CdS半人工光合系统的表征

采用装配积分球的紫外可见光谱仪(UV2600, 岛津)测定*P. stutzeri*-CdS悬浮液的紫外-可见光谱, 并利用Tauc plot拟合计算CdS的禁带宽度. 采用X射线衍射仪(XRD-6000, 岛津)测定*P. stutzeri*-CdS的衍射图谱, 设定条件为40 kV和30 mA, 靶源为铜靶, 扫描范围为 $5^\circ \sim 80^\circ$, 扫速为 $1^\circ/\text{min}$. 样品为上述离心洗涤后的*P. stutzeri*-CdS, 真空冷冻干燥24 h. 采用场发射扫描电子显微镜(FESEM, SU8020, 日立)和场发射透射电子显微镜(FETEM, Tecnai G2 F20 S-TWIN, FEI, 美国)对样品进行形貌分析. 制样过程为: 将样品用2.5%戊二醛在 4°C 下固定12 h, 采用不同浓度的乙醇(30%, 50%, 70%, 80%, 90%和95%)梯度洗脱, 每个浓度15 min, 接着用100%乙醇处理两次, 每次20 min. 脱水处理后的样品用乙醇和乙酸异戊酯(v/v=1:1)的混合物处理30 min, 再用乙酸异戊酯处理1 h. 对用于FESEM分析的样品, 将样品进行临界点干燥, 并喷金处理. 而对用于FETEM分析的样品, 直接将样品滴于碳膜上, 在室温下干燥, 获得高分辨率的样品形貌, 并通过能量色散X射线检测器(EDS)分析微生物表面纳米颗粒的元素组成.

2.3 光驱动 N_2 还原实验

实验设置了一个实验组, 及3个对照组: *P. stutzeri*-CdS (光); *P. stutzeri*-CdS (暗); *P. stutzeri*-CdS (灭活, 光)和*P. stutzeri* (光). 为保证实验数据的有效性, 每组处理含3次重复. 光照开始前, 加入2 mmol/L乙醇作为牺牲试剂, 使用光源光强为 $(0.75 \pm 0.14) \text{ mW}/\text{cm}^2$, 光波长为 $(395 \pm 5) \text{ nm}$ 的LED紫色灯带. 使用光密度计(CEL-NP2000-2)测量光强. 采样间隔为24 h. 靛酚蓝比色法测定反应器中氨态氮的浓度变化. 乙炔还原法测定*P. stutzeri*-CdS的固氮酶活性. 具体步骤为: 取上述样品, 将顶空置换为含1%的乙炔和99%的氮气后, 进行光照实验. GC(GC-2014, 岛津)测定顶空乙炔和乙烯的

含量. GC条件为: 检测器为火焰离子化检测器(FID), 填充柱型号为Propark N.

2.4 RNA提取和实时荧光定量PCR

实时荧光定量PCR(RT-PCR)分析*P. stutzeri*-CdS (光)和*P. stutzeri*-CdS (暗)处理组中固氮酶基因(*nifA*, *nifD*, *nifH*和*nifK*)的相对表达丰度. 具体步骤为: 收集两个处理组的样品, 并储存于 -80°C . 使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen Inc., Valencia, CA, 美国)提取和纯化总RNA. 由于提取的总RNA中含有少量的DNA, 因此在 37°C 水浴条件下, 加入DNA酶(TURBO DNA-free Kit, 美国)水解去除DNA. 分光光度计(NanoDrop2000, Thermo Scientific, 美国)定量纯化后的RNA浓度. 使用cDNA反转录试剂盒, 将RNA反转录生成cDNA, 并保存于 -20°C 条件. 扩增体系为20 μL , 其中含有0.5 μL 的10 ng/ μL cDNA模板, 10 μL 的2x SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, 美国)和0.6 μL 正向和反向引物(表1)及8.3 μL 不含RNA酶的纯水. 表1中为RT-PCR的引物. 扩增和检测步骤如下: 95°C 反应5 min, 接着 95°C 反应15 s, 55°C 反应30 s, 进行40个循环, 最后 72°C

表1 本研究所用的固氮基因引物

Table 1 Primer set for nitrogen fixation genes used in this study

Gene	Sequence (5'-3')	Definition
16s RNA	CGGTGCTTCTCTGCT-GGTA	reference gene
	AAGCCTGATCCAGC-CATTCC	
<i>nifA</i>	CGCGAAGACCTCTAC-TACCG	nitrogenase gene
	CAGCTTGAGTTTGC-GACCCT	
<i>nifD</i>	ACATGATCCA-CATTCCCACG	molybdenum ferritin gene
	GAACAGCGTCTC-GATCTCGTC	
<i>nifH</i>	GAGATGATGGCGATG-TATGC	ferritin gene
	GGTCGGTGTTCGGCT-GTTG	
<i>nifK</i>	TCGAGACCTACCTGGG-CAACT	molybdenum ferritin gene
	GGGGTATCGAG-CATTCTTCC	

反应30 s. 以16s RNA基因为内标, 基因表达水平使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量方法确定其相对表达丰度^[30].

3 结果与讨论

3.1 *P. stutzeri*-CdS半人工光合系统构建与表征

P. stutzeri-CdS半人工光合系统的构建通过CdS原位合成至菌体表面. 当*P. stutzeri*生长至对数期, 向培养基中逐步注入半胱氨酸、 Cd^{2+} 和 S^{2-} . 在这个过程中, 半胱氨酸首先络合 Cd^{2+} , 并在 S^{2-} 的作用下逐渐生成具有荧光的CdS量子点(图1(a)和(b)). 平板涂布法结果表明, CdS的合成过程对*P. stutzeri*的活性无显著影响

(图1(c)), 这与*Geobacter sulfurreducens*原位合成硫化镉的结果一致^[26]. 这是由于半胱氨酸的加入降低了 Cd^{2+} 对细胞的毒害^[31]. 采用SEM对*P. stutzeri*和*P. stutzeri*-CdS的形貌进行分析, 如图1(d)和(e)所示, 纯*P. stutzeri*样品菌体表面光滑, 而*P. stutzeri*-CdS中菌体表面明显可见大量的纳米颗粒. 为了进一步证明这些纳米颗粒的存在位置及元素组成, 将*P. stutzeri*-CdS样品进行TEM和EDS分析. 如图1(e)和(f)所示, 细菌表面存在着粒径为10~100 nm的纳米团簇, 同时元素面扫结果表明, 微生物表面广泛存在着镉(Cd)和硫(S)元素(图1(g)). *P. stutzeri*-CdS的XPS分析结果证实了CdS的存在; 404.7和411.4 eV分别为Cd 3d_{5/2}的峰和Cd 3d_{3/2}的

图 1 (网络版彩图) *P. stutzeri*-CdS半人工光合系统表征. (a), (b) *P. stutzeri*-CdS和*P. stutzeri*系统在白炽灯和紫外灯下的荧光成像; (c) 构建*P. stutzeri*-CdS半人工光合系统对细胞活力的影响; (d), (e) 比例尺为2 μm 的*P. stutzeri*和*P. stutzeri*-CdS的SEM图像((e)中插图为500 nm比例尺的*P. stutzeri*-CdS的SEM图像); (f) 比例尺为1 μm 的*P. stutzeri*-CdS的TEM图; (g) *P. stutzeri*-CdS系统的高角环形暗场(HAADF)成像、EDS分层图像及镉(Cd)和硫(S)的EDS成像; (h), (i) *P. stutzeri*-CdS系统Cd 3d和S 2p的XPS图谱

Figure 1 (Color online) Characterization of *P. stutzeri*-CdS semi-artificial photosynthetic system. (a), (b) Images of *P. stutzeri*-CdS and *P. stutzeri* systems under incandescent and ultraviolet lamps; (c) effect of *P. stutzeri*-CdS construction on cell viability; (d), (e) SEM images of *P. stutzeri* and *P. stutzeri*-CdS with a scale of 2 μm (the inset in (e) is a SEM image of *P. stutzeri*-CdS with a scale of 500 nm); (f) TEM image of *P. stutzeri*-CdS with a scale of 1 μm ; (g) high-angle annular dark field (HAADF) image of the *P. stutzeri*-CdS system and elements mapping images (including Cd and S) by EDS; (h), (i) XPS spectra of Cd 3d and S 2p for the *P. stutzeri*-CdS system.

峰, 而161.2 eV为S 2p的峰(图1(h)和(i)). 同时, *P. stutzeri*-CdS的XRD谱图分析表明, CdS纳米颗粒晶型为六方相(图2(a)和(b)), 这之前原位生物诱导合成的CdS的晶型一致^[22]. 以上结果表明了*P. stutzeri*-CdS半人工光合系统的成功构建.

UV-DRS光谱和Tauc plot的拟合结果(图2(c)和(d))表明, *P. stutzeri*-CdS的带隙宽度为2.66 eV, 激发波长为466 nm, 表明该系统可以被可见光激发. 将*P. stutzeri*-CdS负载于铂碳电极, 测试其光生电子的能力. 如图2(e)所示, 当光照时, 立即检测到光电流的产生, 而当光照停止后, 光电流立即消失, 证实了*P. stutzeri*-CdS具有光生电子的能力. 同时, 电化学阻抗图谱(EIS)及其拟合结果表明(图2(f)), 相比于无光照条件, *P. stutzeri*-CdS在光照下具有更小的电荷传递内阻. 这是由于光照时, *P. stutzeri*-CdS产生大量的电子, 促进了系统中的电荷传递, 进一步证实了*P. stutzeri*-CdS光生电子的能力.

3.2 光驱动*P. stutzeri*-CdS系统生物固氮

在*P. stutzeri*-CdS半人工光合系统成功构建的基础上, 本工作设置了一个实验组, 及3个对照组: *P. stutzeri*-CdS (光)、*P. stutzeri*-CdS (暗)、*P. stutzeri*-CdS (灭活, 光)、*P. stutzeri* (光), 并测试这4组处理组光驱动N₂还原成NH₃的能力. 结果如图3(a)所示, 在*P. stutzeri*-CdS (光)中, 检测到NH₄⁺浓度随时间逐渐增加, 约5天, NH₄⁺浓度达到平衡, 为(2.03±0.07) mg/L, NH₄⁺浓度没有继续增长可能是因为微生物活性受影响或是CdS光催化性能下降导致. 然而实验组中产生NH₄⁺的浓度远高于其他3组对照组, 如*P. stutzeri* (光)为(0.27±0.05) mg/L, *P. stutzeri*-CdS (暗)为(0.36±0.12) mg/L, *P. stutzeri*-CdS (灭活, 光)为(0.70±0.04) mg/L. 在*P. stutzeri* (光)和*P. stutzeri*-CdS (暗)产生的微量NH₄⁺可能是由于将*P. stutzeri*转移至无电子源的环境中, 胞内外NH₄⁺具有浓度差, *P. stutzeri*将胞内的NH₄⁺分泌到胞外^[28,32]. 而在*P. stutzeri*-CdS (灭活, 光)系统中产生更高浓度的NH₄⁺.

图 2 (网络版彩图) (a) *P. stutzeri*-CdS系统的XRD图谱(参考峰来自JCPDS的NO.70-2553标准卡片); (b) *P. stutzeri*-CdS系统的高分辨TEM图像; (c) *P. stutzeri*-CdS半人工光合系统的UV-Vis图谱; (d) 基于Tauc plot拟合计算得到*P. stutzeri*-CdS带隙 $E_g = 2.66$ eV; (e) *P. stutzeri*和*P. stutzeri*-CdS在波长为(395±5) nm紫色LED灯照射下的瞬时光电流(每个循环1 min, 开启30 s, 关闭30 s); (f) *P. stutzeri*和*P. stutzeri*-CdS系统的电化学阻抗谱图(EIS)

Figure 2 (Color online) (a) XRD pattern of *P. stutzeri*-CdS system (reference peak from JCPDS NO.70-2553 standard card); (b) high resolution TEM image of the *P. stutzeri*-CdS system; (c) UV-Vis spectrum of *P. stutzeri*-CdS semi-artificial photosynthetic system; (d) based on Tauc plot fitting calculation, *P. stutzeri*-CdS band gap $E_g = 2.66$ eV; (e) instantaneous photocurrent of *P. stutzeri* and *P. stutzeri*-CdS systems under (395±5) nm violet LEDs illumination (1 min as a cycle, 30 s light on, 30 s light off, respectively); (f) electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of *P. stutzeri* and *P. stutzeri*-CdS systems.

图 3 (网络版彩图) *P. stutzeri*-CdS半人工光合系统光照下还原 N_2 产 NH_4^+ 能力表征. (a) *P. stutzeri*-CdS (光)及对照组中 NH_4^+ 浓度随时间变化; (b) *P. stutzeri*-CdS (光)及对照组中还原乙炔能力表征; (c) 光/暗条件下*P. stutzeri*-CdS系统固氮基因*nifA*, *nifD*, *nifH*, *nifK*基因相对表达丰度; (d) $^{15}\text{N}_2$ 和 $^{14}\text{N}_2$ 处理的系统中N15丰度测定(*表示显著相关, $P<0.05$; **表示极显著相关, $P<0.01$)

Figure 3 (Color online) Characterization of the ability of N_2 reduction NH_4^+ by *P. stutzeri*-CdS semi-artificial photosynthetic system driven by light. (a) NH_4^+ concentration change with time in *P. stutzeri*-CdS (light) and the control groups; (b) characterization of the ability of acetylene reduction by *P. stutzeri*-CdS (light) and the control groups; (c) relative transcript abundance of nitrogen-fixing genes *nifA*, *nifD*, *nifH*, and *nifK* in the *P. stutzeri*-CdS system under light/dark conditions; (d) N15 abundance of *P. stutzeri*-CdS in $^{15}\text{N}_2$ - or $^{14}\text{N}_2$ -incubated environment (* indicates significant correlation, $P<0.05$; ** indicates extremely significant correlation, $P<0.01$).

可能是由于光氧化蛋白物质而释放。微生物经灭活后,胞内会释放一些小分子蛋白物质,当光照时,CdS被激发产生光氧化物质,氧化蛋白质分解,最终产生 NH_4^+ 。Gracanin等人^[33]报道,在光敏剂存在的系统中,蛋白质可以光氧化分解,这个过程会导致 NH_4^+ 的释放,这项研究可以解释*P. stutzeri*-CdS (灭活,光)系统中 NH_4^+ 的产生高于*P. stutzeri* (光)和*P. stutzeri*-CdS (暗)。其次,该对照组中 NH_4^+ 浓度变化主要是在前24 h,并不随着光照时间的变化而发生显著的增加,这是由于释放的蛋白物质被CdS快速氧化,而后期蛋白物质经氧化完全后 NH_4^+ 便不再增加。以上结果表明,*P. stutzeri*-CdS系统中,光照能够固氮产 NH_3 ,而 NH_4^+ 的增加是光、*P. stutzeri*、CdS三者同时作用导致。

由于固氮酶具有将乙炔还原至乙烯的能力,因此

在固氮系统中,往往通过测定系统的乙炔还原活性来指示其固氮酶的活性。图3(b)显示,*P. stutzeri*-CdS系统在光照6天后,乙烯的产生量为 $(1.97\pm0.39)\mu\text{mol}$,极显著地高于其他3组对照组($P<0.01$),如*P. stutzeri*-CdS (暗)和*P. stutzeri* (光)系统中乙烯的浓度基本为0,而*P. stutzeri*-CdS (灭活,光)为 $(0.32\pm0.022)\mu\text{mol}$ 。在微生物灭活系统中测到的乙炔还原活性可能是由于CdS自身也具有光催化还原乙炔的能力^[34],但明显低于固氮酶。以上结果表明,系统中的固氮酶活强度与光、CdS、*P. stutzeri*三个因素有关。由于乙炔还原过程需要电子,这也说明在*P. stutzeri*-CdS系统中,光电子能够被微生物吸收利用,并驱动固氮酶活性。因此*P. stutzeri*-CdS (光)系统还原乙炔过程为:微生物利用胞外光电子,驱动微生物体内固氮酶将乙炔还原成乙烯。该现

象也发生于Wong团队^[35]构建的*R. palustri*-CdS系统中。

为了进一步验证光驱动*P. stutzeri*-CdS产NH₃是由微生物固氮酶主导的过程, 本研究采用RT-PCR技术分析该过程固氮相关基因(*nifA*, *nifD*, *nifH*和*nifK*)的相对转录丰度。RT-PCR的结果显示(图3(c)), *P. stutzeri*-CdS光照系统中, *nifA*, *nifD*, *nifH*, *nifK*等基因的表达丰度相较于黑暗处理, 呈现极显著上调($P < 0.01$)。相较于黑暗处理, *nifA*, *nifD*, *nifH*, *nifK*分别上调1.41倍、2.25倍、1.68倍和2.35倍。该结果证实了*P. stutzeri*-CdS (光)系统中固氮酶参与了生物固氮过程。

3.3 光驱动*P. stutzeri*-CdS系统生物固氮机制

为了进一步验证*P. stutzeri*-CdS半人工光合系统中NH₄⁺的产生来源于N₂, 本研究以¹⁵N₂(纯度99.9%)为氮气源, 采用元素分析-同位素比值质谱(EA-IRMS)检测

分析系统中¹⁵N的丰度。如图3(d)所示, 以¹⁵N₂为氮气源的样品中, 当光照后, 系统中¹⁵N的同位素丰度显著高于以¹⁴N₂为氮气源的样品($P < 0.05$)。该结果证实了¹⁵N₂被还原成NH₃。以上结果表明*P. stutzeri*-CdS半人工光合系统在光驱动下具有将N₂还原成NH₃的能力, 且*P. stutzeri*中固氮酶参与了反应。

为了进一步探讨光对*P. stutzeri*-CdS系统还原N₂成NH₃的影响, 本工作设置了间歇光照实验(间隔24 h)。结果如图4(a)所示, 光照时, 系统中能明显检测到NH₄⁺浓度的增加。而当停止光照时, 即在暗反应阶段, 系统中也检测到微量NH₄⁺的产生。该现象可能是由于在黑暗条件下, *P. stutzeri*将光照时胞内累积的NH₄⁺分泌至胞外, 也可能是在光反应阶段, 生物体内产生的一些还原力(如NADH)没有被立刻消耗, 导致在暗反应阶段仍存在产NH₄⁺的现象。在暗反应阶段继续产能这一现象

图4 (网络版彩图) (a) 光-暗循环条件下*P. stutzeri*-CdS NH₄⁺浓度随时间变化曲线; (b) Ar气条件下*P. stutzeri*-CdS (光)系统NH₄⁺浓度随时间变化曲线; (c) 不同浓度蛋白酶K处理对*P. stutzeri*-CdS (光)系统产NH₄⁺的影响; (d) 光驱动半人工光合系统生物固氮可能机制

Figure 4 (Color online) (a) Curve of NH₄⁺ concentration with time in *P. stutzeri*-CdS under light-dark cycle conditions; (b) curve of NH₄⁺ concentration with time in *P. stutzeri*-CdS under Ar atmosphere; (c) effects of different concentrations of proteinase K treatment on the production of NH₄⁺ by *P. stutzeri*-CdS (light) system; (d) possible mechanism of biological nitrogen fixation by light-driven semi-artificial photosynthetic system.

也常见于前人报道的微生物-半导体半人工光合系统, 如*Moorella thermoacetica*-CdS, *Thiobacillus denitrificans*-CdS, *Methanosarcina barkeri*-CdS等^[20,23~25,36]。

当将顶空的N₂置换为Ar条件时, 光照*P. stutzeri*-CdS系统, 未检测到NH₄⁺的生成(图4(b))。该结果进一步支持了NH₄⁺的生成来源于N₂。根据图3(a)的结果, 当没有电子来源时, 系统会分泌少量储存的NH₄⁺, 而在Ar环境中, *P. stutzeri*-CdS (光)系统未检测到NH₄⁺的生成。这意味着这部分NH₄⁺会被微生物利用。其过程为微生物利用CdS产生的光电子, 驱动自身的代谢反应, 将NH₄⁺转化为生物质。光电子作为微生物一种新的能量来源^[37~39], 驱动微生物的代谢, 已被广泛证实。这种新型的能量代谢过程, 也是半人工光合系统驱动N₂还原产NH₃的基础。另一方面, 该结果也表明了*P. stutzeri*-CdS (光)系统还原N₂产生的NH₃处于动态平衡中, 部分NH₃被分泌至胞外, 而另一部分被微生物利用并转化成生物质。

在半人工光合系统中, 光电子从半导体传递至胞内, 往往通过胞外蛋白或小分子的氧化还原介体进行。为了验证光电子是否通过胞外蛋白传至胞内, 本研究采用蛋白酶K去除微生物胞外蛋白, 在保证微生物活性不受影响的条件下^[25], 测定系统中产NH₃能力的变化。结果如图4(c)所示, 当添加不同浓度的蛋白酶K后(最高达5 U/mL), *P. stutzeri*-CdS (光)系统NH₄⁺的产生量并没有显著的差异。这表明光电子由胞外传递至胞内并不依赖胞外蛋白。该结果与Kirstein等人^[40]的报道一致。当电极作为电子供体时, *P. stutzeri*会分泌醌或吩嗪类物质作为电子介体, 协助生物-非生物界面的电子转移过程^[41,42]。微生物接收到胞外电子后, 再通过电子传递链传递给铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白, 最后传递给固氮酶催化N₂还原成NH₃。N₂还原过程所需的ATP也来自于电子传递链。电子传递过程中细胞膜内外会产生质子浓度差, 驱动ATP合成酶合成ATP^[43]。

综上所述, 本研究提出光驱动*P. stutzeri*-CdS半人工光合系统固氮产NH₃的可能机制, 具体过程如图4(d)所示。当细胞表面的CdS被可见光激发后, 产生大量的光电子及空穴。光电子通过胞外小分子氧化还原介质(如吩嗪、醌等)将电子传递至胞内, 随后通过电子传递链传递至铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白, 最终传递至固氮酶。同时, 电子传递过程中产生的质子梯度差驱动ATP的生成。电子和ATP共同参与了胞内N₂还原成

NH₃过程。由于碳源的缺乏, 产生的NH₃并不通过calvin循环合成生物质, 而是通过被动扩散将NH₃分泌至胞外。该系统优于传统的电化学系统或已报道的*R. palustri*-CdS系统, 不需要添加谷氨酰胺合成酶的抑制剂, NH₄⁺能够扩散至胞外^[35,44]。同时, 产生的空穴被牺牲试剂(乙醇)填补, 完成了光驱动*P. stutzeri*-CdS催化固氮产NH₃过程。牺牲试剂的加入不仅提高了光电子-空穴的分离效率, 同时也可以作为羟基自由基的猝灭剂, 降低自由基对微生物的伤害。同时, 部分电子经过FNR产生NADPH, 可能与乙醇的氧化产物反应, 利用产生的NH₃合成生物质。

3.4 光驱动半人工光合系统生物固氮产氨意义

本研究证实了光驱动半人工光合系统能够实现N₂还原成NH₃, 这为高效、绿色、经济的NH₃生产提供了新思路。相对于Haber-Bosch工艺产NH₃, 基于半人工光合系统固氮产NH₃在能耗方面具有显著的优势。同时, 这种固氮过程更为绿色, 符合人类社会的可持续发展。而相对于纯化学材料的光/电固氮过程, 半人工光合系统的固氮产NH₃效率还处于下游区域^[45], 虽然半人工光合系统产NH₃速率低, 但是半人工光合系统固氮是基于固氮酶的催化过程, 具有优良的选择性, 因此能够有效地转化光能至NH₃。同时半人工光合系统突破了光合固氮微生物基于光合色素的光吸收过程, 利用具有良好吸光能力的半导体作为光捕集材料, 更大程度地实现光能的转化。

更重要的是, 本研究拓展了传统上对非光合微生物能量来源的认识。长期以来, 普遍认为自然界中非光合微生物只能通过氧化还原性有机物或还原性无机物, 获取能量驱动代谢。而本研究的结果表明非光合微生物可以通过光敏物质利用光能, 实现自身代谢(如生物固氮), 这证实了光、光敏物质、非光合微生物三者之间的互作关系。由于自然界中广泛存在着光敏物质(如半导体、天然有机质等)和非光合固氮菌, 暗示着光驱动的非光合固氮过程可能广泛存在。该研究对理解自然界的氮循环过程及氮元素引起的生态系统演变过程提供了新视角。

4 结论

本文构建了一种CdS光敏化非光合固氮微生物的

半人工光合成系统 *P. stutzeri*-CdS, 证实了该系统能够在常温常压下还原 N_2 成 NH_3 . 该过程是在光、CdS、微生物三者共同作用下完成的. *P. stutzeri*-CdS 在光照 5 天后, NH_4^+ 的产量可以达到 (2.03 ± 0.07) mg/L, 是对照组的 2.91~7.37 倍. 乙炔还原实验证明了 *P. stutzeri*-CdS (光) 系统中固氮酶活性是对照组的 6.2~100 倍. RT-PCR 证明了 *P. stutzeri*-CdS (光) 系统中固氮酶活性及固氮酶

基因 *nifA*, *nifD*, *nifH*, *nifK* 的相对表达丰度呈显著性上调. 同时, $^{15}N_2$ 同位素标记实验进一步证实系统的固氮产 NH_3 过程. 蛋白酶 K 处理实验表明光电子从胞外传递至胞内过程为非固着的胞外蛋白介导过程. 该研究为发展高效、经济、绿色的 NH_3 的生产提供了一种新思路, 拓展了非光合固氮菌固氮途径的认识, 为理解自然界的氮循环过程提供新的视角.

参考文献

- Vitousek P M, Aber J D, Howarth R W, et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol Appl*, 1997, 7: 737–750
- Herrera J, Rubio G, Häner L, et al. Emerging and established technologies to increase nitrogen use efficiency of cereals. *Agronomy*, 2016, 6: 25
- Service R F. New recipe produces ammonia from air, water, and sunlight. *Science*, 2014, 345: 610
- Giddey S, Badwal S P S, Munnings C, et al. Ammonia as a renewable energy transportation media. *ACS Sust Chem Eng*, 2017, 5: 10231–10239
- Guo C, Ran J, Vasileff A, et al. Rational design of electrocatalysts and photo(electro)catalysts for nitrogen reduction to ammonia (NH_3) under ambient conditions. *Energy Environ Sci*, 2018, 11: 45–56
- Wu G, Yu L, Liu Y, et al. One step synthesis of N vacancy-doped g- C_3N_4 /Ag $_2$ CO $_3$ heterojunction catalyst with outstanding “two-path” photocatalytic N_2 fixation ability via *in-situ* self-sacrificial method. *Appl Surf Sci*, 2019, 481: 649–660
- Erisman J W, Sutton M A, Galloway J, et al. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nat Geosci*, 2008, 1: 636–639
- Rafiqul I, Weber C, Lehmann B, et al. Energy efficiency improvements in ammonia production—Perspectives and uncertainties. *Energy*, 2005, 30: 2487–2504
- Oshikiri T, Ueno K, Misawa H. Selective dinitrogen conversion to ammonia using water and visible light through plasmon-induced charge separation. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 3942–3946
- Bao D, Zhang Q, Meng F L, et al. Electrochemical reduction of N_2 under ambient conditions for artificial N_2 fixation and renewable energy storage using N_2/NH_3 cycle. *Adv Mater*, 2017, 29: 1604799
- Zheng Y, Jiao Y, Zhu Y, et al. Molecule-level g- C_3N_4 coordinated transition metals as a new class of electrocatalysts for oxygen electrode reactions. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 3336–3339
- Ran J, Zhu B, Qiao S Z. Phosphorene Co-catalyst advancing highly efficient visible-light photocatalytic hydrogen production. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 10373–10377
- Wight A P, Davis M E. Design and preparation of organic-inorganic hybrid catalysts. *Chem Rev*, 2002, 102: 3589–3614
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B*, 2013, 368: 20130164
- Burgess B K, Lowe D J. Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem Rev*, 1996, 96: 2983–3012
- Seefeldt L C, Hoffman B M, Dean D R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 701–722
- Lodwig E M, Hosie A H F, Bourdès A, et al. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*, 2003, 422: 722–726
- Limmer C, Drake H L. Effects of carbon, nitrogen, and electron acceptor availability on anaerobic N_2 -fixation in a beech forest soil. *Soil Biol Biochem*, 1998, 30: 153–158
- Xiong W, Feng J Y, Ma W M, et al. Semi-artificial photosynthesis based on inorganic material-microbe hybrids (in Chinese). *Chin J Inorg Chem*, 2019, 35: 1521–1534 [熊威, 冯建勇, 马为民, 等. 基于无机材料-微生物复合的半人工光合作用. 无机化学学报, 2019, 35: 1521–1534]
- Sakimoto K K, Wong A B, Yang P. Self-photosensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production. *Science*, 2016, 351: 74–77
- Wei W, Sun P, Li Z, et al. A surface-display biohybrid approach to light-driven hydrogen production in air. *Sci Adv*, 2018, 4: eaap9253
- Chen M, Zhou X F, Yu Y Q, et al. Light-driven nitrous oxide production via autotrophic denitrification by self-photosensitized *Thiobacillus denitrificans*. *Environ Int*, 2019, 127: 353–360

- 23 Chen M, Zhou X, Chen X, et al. Mechanisms of nitrous oxide emission during photoelectrotrophic denitrification by self-photosensitized *Thiobacillus denitrificans*. [Water Res](#), 2020, 172: 115501
- 24 Ye J, Yu J, Zhang Y, et al. Light-driven carbon dioxide reduction to methane by *Methanosarcina barkeri*-CdS biohybrid. [Appl Catal B-Environ](#), 2019, 257: 117916
- 25 Huang S, Tang J, Liu X, et al. Fast light-driven biodecolorization by a *Geobacter sulfurreducens*-CdS biohybrid. [ACS Sustain Chem Eng](#), 2019, 7: 15427–15433
- 26 Brown K A, Harris D F, Wilker M B, et al. Light-driven dinitrogen reduction catalyzed by a CdS:nitrogenase MoFe protein biohybrid. [Science](#), 2016, 352: 448–450
- 27 Sathishkumar K, Sathiyaraj S, Parthipan P, et al. Electrochemical decolorization of methyl red by RuO₂-IrO₂-TiO₂ electrode and biodegradation with *Pseudomonas stutzeri* MN1 and *Acinetobacter baumannii* MN3: An integrated approach. [Chemosphere](#), 2017, 183: 204–211
- 28 Kleiner D. Bacterial ammonium transport. [FEMS Microbiol Lett](#), 1985, 32: 87–100
- 29 Qiu Y S, Zhou S P, Mo X Z, et al. Studies on the nitrogen-fixing bacteria in rice rhizosphere (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 1980, 25: 1008 [丘元盛, 周淑萍, 莫小真, 等. 水稻根际固氮细菌的研究. 科学通报, 1980, 25: 1008]
- 30 Zhan Y, Deng Z, Yan Y, et al. NfiR, a new regulatory noncoding RNA (ncRNA), is required in concert with the NfiS ncRNA for optimal expression of nitrogenase genes in *Pseudomonas stutzeri* A1501. [Appl Environ Microbiol](#), 2019, 85: e00762
- 31 Dişbudak A, Bektaş S, Patır S, et al. Cysteine-metal affinity chromatography: Determination of heavy metal adsorption properties. [Separation Purification Tech](#), 2002, 26: 273–281
- 32 Zhang T, Yan Y, He S, et al. Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501. [Res Microbiol](#), 2012, 163: 332–339
- 33 Gracanin M, Hawkins C L, Pattison D I, et al. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. [Free Radical Biol Med](#), 2009, 47: 92–102
- 34 Frank A J, Goren Z, Willner I. Photohydrogenation of acetylene and ethylene by Pt and Rh supported on CdS semiconductor particles. [J Chem Soc Chem Commun](#), 1985, 15: 1029
- 35 Wang B, Xiao K, Jiang Z, et al. Biohybrid photoheterotrophic metabolism for significant enhancement of biological nitrogen fixation in pure microbial cultures. [Energy Environ Sci](#), 2019, 12: 2185–2191
- 36 Cheng H Y, Tian X D, Li C H, et al. Microbial photoelectrotrophic denitrification as a sustainable and efficient way for reducing nitrate to nitrogen. [Environ Sci Technol](#), 2017, 51: 12948–12955
- 37 Lu A, Li Y, Jin S, et al. Growth of non-phototrophic microorganisms using solar energy through mineral photocatalysis. [Nat Commun](#), 2012, 3: 768
- 38 Lu A, Li Y, Ding H, et al. Photoelectric conversion on Earth's surface via widespread Fe- and Mn-mineral coatings. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 9741–9746
- 39 Lu A H. The utilization of solar energy by non-phototrophic microorganisms through semiconducting minerals (in Chinese). *Microbiol China*, 2013, 40: 190–202 [鲁安怀. 半导体矿物介导非光合微生物利用光电子新途径. 微生物学通报, 2013, 40: 190–202]
- 40 Kirstein D, Kirstein L, Scheller F, et al. Amperometric nitrate biosensors on the basis of *Pseudomonas stutzeri* nitrate reductase. [J Electroanal Chem](#), 1999, 474: 43–51
- 41 Hernandez M E, Kappler A, Newman D K. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. [Appl Environ Microbiol](#), 2004, 70: 921–928
- 42 Rabaey K, Boon N, Höfte M, et al. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. [Environ Sci Technol](#), 2005, 39: 3401–3408
- 43 Hoffman B M, Lukoyanov D, Yang Z Y, et al. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. [Chem Rev](#), 2014, 114: 4041–4062
- 44 Liu C, Sakimoto K K, Colón B C, et al. Ambient nitrogen reduction cycle using a hybrid inorganic-biological system. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2017, 114: 6450–6455
- 45 Xue X, Chen R, Yan C, et al. Review on photocatalytic and electrocatalytic artificial nitrogen fixation for ammonia synthesis at mild conditions: Advances, challenges and perspectives. [Nano Res](#), 2019, 12: 1229–1249

Feasibility and mechanism of light-driven nitrogen reduction to ammonium by a *Pseudomonas stutzeri*-CdS semi-artificial photosynthetic system

HUANG ShaoFu, JING XianYue, CHEN Man & ZHOU ShunGui

College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Considering their high selectivity and excellent efficiency in using solar energy for carbon fixation, hydrogen production, and denitrification, semi-artificial photosynthetic systems (semiconductor-microorganism systems) have received extensive research attention. However, the reduction of N_2 to NH_4^+ using such systems has rarely been reported. Herein, a *Pseudomonas stutzeri*-CdS (*P. stutzeri*-CdS) semi-artificial photosynthetic system was successfully constructed to reduce N_2 to NH_4^+ by capturing solar energy. Upon irradiation, photoelectrons from CdS are absorbed by *P. stutzeri* and participate in intracellular N_2 fixation. After 5 days of irradiation, the concentration of NH_4^+ produced by *P. stutzeri*-CdS was (2.03 ± 0.07) mg/L, which is 2.91–7.37 times greater than that obtained from control groups. *P. stutzeri*-CdS showed excellent ability to reduce acetylene to ethylene under light irradiation, and the molar quantities of the product obtained were 6.2–100 times greater than those obtained from the controls, indicating that active nitrogenases in *P. stutzeri*-CdS respond well to light. Real-time polymerase chain reaction assays proved that the nitrogenase-encoding genes of *P. stutzeri*-CdS, i.e., *nifA*, *nifD*, *nifH*, and *nifK*, are significantly upregulated (1.41–2.35) by light. Proteinase K treatment assays indicated that the inward transfer of photoelectrons does not depend on extracellular proteins, thereby indicating a possible redox shuttle mediating the extracellular transfer of photoelectrons. This work provides not only a new method for the efficient, economical, and green production of NH_4^+ but also a new perspective for understanding the N_2 cycle in nature.

semi-artificial photosynthetic system, microbial nitrogen fixation, solar energy, *Pseudomonas stutzeri*, cadmium sulfide (CdS)

doi: [10.1360/SST-2020-0238](https://doi.org/10.1360/SST-2020-0238)