

厌氧氨氧化菌细胞的超微结构及功能*

贾方旭¹ 彭永臻^{1**} 王衫允² 王淑莹¹ 杨庆¹

¹北京工业大学北京市水质科学与水环境恢复工程重点实验室,北京市污水脱氮除磷处理与过程控制工程技术研究中心 北京 100124

²哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室 哈尔滨 150090

摘要 厌氧氨氧化菌是浮霉状菌属 (*Planctomyces*) 的化能自养型细菌,其在缺氧条件下以亚硝酸盐 (NO_2^-) 作为电子受体将氨 (NH_4^+) 转化为氮气 (N_2)。该过程具有高效低耗的优点,因而厌氧氨氧化工艺成为目前最具应用前景的污水脱氮工艺,为了更好地将厌氧氨氧化工艺应用到实际规模中,对厌氧氨氧化菌的生物学研究非常必要。近年来,电镜技术的快速发展使得厌氧氨氧化菌超微结构的研究成为可能。厌氧氨氧化菌结构独特,被厌氧氨氧化体膜、胞浆内膜、细胞质膜分隔成厌氧氨氧化体、核糖细胞质及外室细胞质3个部分。本文由内至外地总结和描述了厌氧氨氧化菌的细胞器、膜结构、储存颗粒以及细胞附属物的形态特征,并对他们的功能进行了合理的解释和推测,得出以下结论:1) 厌氧氨氧化体占据细胞体积的50%左右,是厌氧氨氧化菌最重要的细胞器,为厌氧氨氧化菌的代谢提供了场所;2) 厌氧氨氧化体膜具有致密的阶梯烷膜脂结构,可抵抗有毒中间产物扩散从而保护细胞;3) 厌氧氨氧化体内的铁储存颗粒可为血红素提供铁元素从而加快细胞的新陈代谢,而核糖细胞质中的糖原物质与储存颗粒可能分别与生物膜的形成及能量储存有关;4) 厌氧氨氧化菌的菌毛可能与细胞黏着或胞间通讯相关,而S-layer对细胞的完整性及细胞形状的维持起着至关重要的作用。目前对厌氧氨氧化菌超微结构的研究还仅局限于生物学方面,建议今后以不同水质及操作条件下厌氧氨氧化细胞超微结构的改变为研究重点。图7 表1 参57

关键词 厌氧氨氧化;超微结构;厌氧氨氧化体;阶梯烷膜脂;储存颗粒;细胞分裂环;S-layer

CLC X703.1 : X172

Ultrastructure and function of anaerobic ammonium oxidation bacteria cells*

JIA Fangxu¹, PENG Yongzhen^{1**}, WANG Shanyun², WANG Shuying¹ & YANG Qing¹

¹Beijing Key Laboratory for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Engineering Research Center of Beijing, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

²State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Abstract Anaerobic ammonium oxidation bacteria are chemolitho-autotrophs belonging to a clade of deeply branching *Planctomycetes*. The anammox bacteria use ammonium as an electron donor for nitrite reduction to dinitrogen gas under anoxic conditions. The anammox process is an attractive treatment option for removing nitrogen from wastewater with high efficiency and low consumption. In order to fully apply this process, it is necessary to study the cell biology of anammox bacteria, which is made possible by the fast development of electron-microscopy technology. The structure of anaerobic ammonium oxidation bacteria cells is special, with three separate compartments of cytoplasm bounded by individual bilayer membranes, namely the anammoxosome membrane, intracytoplasmic membrane, and cytoplasmic membrane, respectively. This study selected the anammox bacteria cells as the research object to investigate and describe the morphological specificity of organelle, membrane structure, storage particles and cell appendages from inside to outside, and make a further explanation and assumption of their functions. We found that 1) the anammoxosome occupies about fifty percent cell volume, with the intracytoplasmic compartment the very important place for anammox catabolism. 2) The ladderane lipids occur in the membrane of the anammoxosome and it can protect the cell from the toxic anammox intermediates. 3) Iron particles in anammoxosome can provide heme with iron to expedite the cell metabolism; the function of glycogen and the riboplasmic particles in riboplasm could be that anammox bacteria store glycogen and riboplasmic particles for biofilm formation and energy storage, respectively. 4) The function of the pilus-like appendages is for adherence to the environment or in cell-to-cell communication, and S-layer

收稿日期 Received: 2014-02-24 接受日期 Accepted: 2014-03-31

*国家自然科学基金项目(21177005)、北京市教委科技创新平台项目和北京工业大学研究生科技基金项目(ykj-2013-10521)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (21177005), the Project of Scientific Research Base and Scientific Innovation Platform of Beijing Municipal Education Commission, and the Science Foundation of Beijing University of Technology (ykj-2013-10521)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: pyz@bjut.edu.com)

of Anammox bacteria plays a key role in maintaining cell shape and integrity. Further researches are suggested to focus on ultrastructure changes in the anammox treatment of different wastewater and operating conditions.

Keywords anaerobic ammonium oxidation; ultrastructure; anammoxosome; ladderane; storage particles; cell division ring; S-layer

厌氧氨氧化反应 (Anaerobic ammonium oxidation, Anammox) 是指在缺氧条件下以亚硝酸盐 (NO_2^-) 作为电子受体将氨 (NH_4^+) 转化为氮气 (N_2) 的生物过程^[1]. 其化学计量学方程式^[2]如下:



且执行该过程的微生物称之为厌氧氨氧化菌 (Anaerobic ammonium oxidation bacteria, AAOB), 基于16S rRNA基因序列的研究表明厌氧氨氧化菌属于浮霉状菌^[3-5]. 如图1所示, 目前已知的厌氧氨氧化菌共有5个属, 分别为Candidatus “*Scalindua*”、Candidatus “*Kuenenia*”、Candidatus “*Anammoxoglobus*”、Candidatus “*Jettenia*”以及Candidatus “*Brocadia*”.

厌氧氨氧化菌广泛存在于自然生态系统和人工生态系统中, 其对氮循环的贡献不可小觑. 到目前为止, 厌氧氨氧化菌仍未能纯培养, 因此阻碍了厌氧氨氧化菌代谢途径的深入研究. 近年来, 随着宏基因组学的发展, 使得未获得纯培养微生物的相关研究成为可能. 目前已完成了Candidatus *Kueneniaia stuttgartiensis*和Candidatus *Scalindua profunda*的全序列测定^[7-8], 并分别研究了这两种厌氧氨氧化菌与代谢相关的酶, 研究发现这两种厌氧氨氧化菌的生理代谢方式基本相同且十分奇特, 如图2所示, 厌氧氨氧化菌首先在亚硝酸盐转运蛋白 (FocA) 的作用下将 NO_2^- 运输到厌氧氨氧化体内, 其中一部分 NO_2^- 在亚硝酸盐氧化酶 (Nar) 的作用下被氧化为 NO_3^- 排至厌氧氨氧化体外, 而另一部分 NO_2^- 则由cd1型亚

硝酸盐还原酶 (NirS) 还原为 NO ; 其次氨转运蛋白 (AmtB) 将 NH_4^+ 运输到厌氧氨氧化体内并与上一阶段产生的 NO 相结合, 共同在联氨水解酶 (HZS) 的作用下缩合成 N_2H_4 ; 最后在联氨氧化还原酶 (HZO) 的作用下将 N_2H_4 氧化为 N_2 . 在该代谢途径中, 联氨氧化过程会释放4个电子, 这4个电子经过细胞色素c、辅酶Q、细胞色素bc1复合体以及其它细胞色素c的传递, 将其中1个电子传递给NirS, 而另外3个电子则传递给HZS. 伴随电子的传递过程, 质子会排至厌氧氨氧化体外, 使得厌氧氨氧化体膜两侧形成质子驱动力, 从而加快ATP和NADH的合成.

厌氧氨氧化菌为化能自养型细菌, 新陈代谢缓慢, 在30-40 °C条件下, 其倍增时间为10-14 d^[7], 细胞产率为0.11 g VSS/g NH_4^+ ^[5]. 而且厌氧氨氧化过程的中间产物也很容易穿透过它们的生物膜. 为了避免扩散活动对厌氧氨氧化菌生理造成的伤害, 厌氧氨氧化菌必须具备异于普通细菌的特殊细胞结构. 目前对厌氧氨氧化菌细胞结构的研究表明: 厌氧氨氧化菌细胞中的确存在某些特殊的细胞物质, 如厌氧氨氧化体、阶梯型膜脂质以及一些胞内储存颗粒等. 本文主要对厌氧氨氧化菌细胞的超微结构研究情况进行总结和详细的描述, 并论述这些特殊结构的功能及意义.

1 厌氧氨氧化菌细胞结构概述

由图3所示, 厌氧氨氧化菌呈不规则球形, 细胞壁中不含肽聚糖 (Peptidoglycan), 无外膜 (Outer membrane) 也无周质

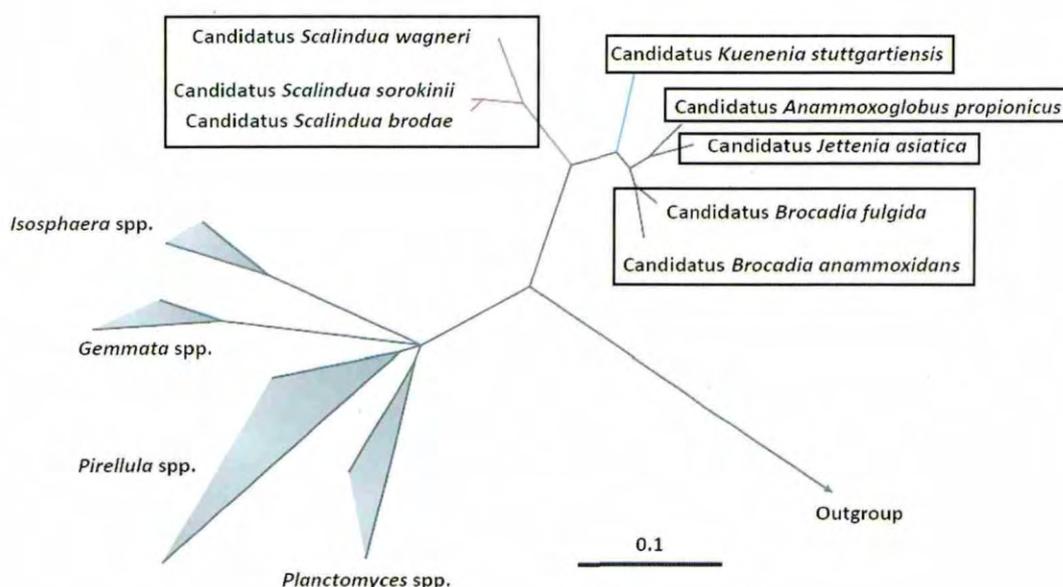


图1 基于厌氧氨氧化菌16S rRNA的系统发育树^[6].

Fig. 1 Consensus trees based on the Anammox bacterial 16S rRNA gene^[6].

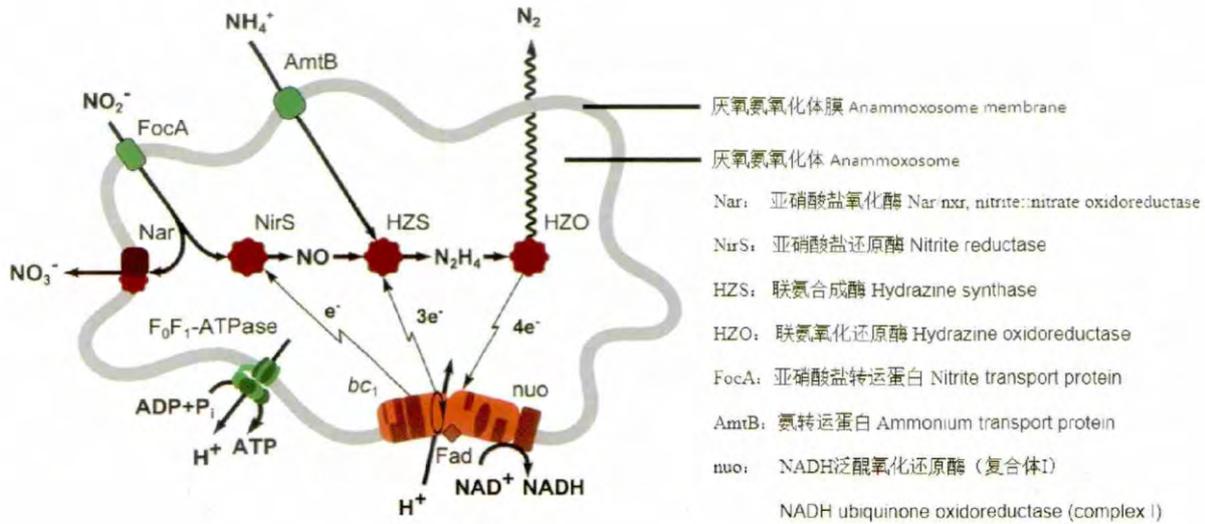


图2 厌氧氨氧化代谢示意图^[8]。

Fig. 2 Schematic diagram of anammox metabolism^[8].

空间(Periplasmic space)^[9-10],细胞壁主要成分为蛋白质.此外,Kartal对Candidatus *Kueneniaia stuttgartiensis*的蛋白质组研究也表明:Candidatus *Kueneniaia stuttgartiensis*除了产生肽聚糖前体(D-丙氨酰基-D-丙氨酸)的D-丙酰胺-D-丙氨酸连接酶(D-alanine-D-alanine ligase, Ddl)基因外,在其蛋白质组中存在与肽聚糖合成相关的全部必需基因^[11],因此厌氧氨氧化菌既不属于革兰氏阴性细菌也不属于革兰氏阳性细菌^[12].厌氧氨氧化菌除了具有特殊的细胞壁,其细胞结构与普通细菌相比也存在较大差异,厌氧氨氧化菌细胞被厌氧氨氧化体膜(Anammoxosome membrane)、胞浆内膜(Intracytoplasmic membrane)、细胞质膜(Cytoplasmic membrane)分隔成3个部分,分别为厌氧氨氧化体(Anammoxosome)、核糖细胞质(Riboplasm)及外室细胞质(Paryphoplasm).虽然厌氧氨氧化菌至今未获得纯培养,但易于辨认的特殊细胞结构使其能够采用电镜技术进行研究^[13].图3(C)所示为典型的厌氧氨氧化菌细胞结构.

2 厌氧氨氧化体

L. van Niftrik等利用电子断层成像技术和透射电镜技术对Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*、Candidatus *Brocadia fulgida*、Candidatus *Anammoxoglobus propionicus*、Candidatus *Scalindua* spp.的超微结构进行了研究^[13-14].图4(A)和(B)为Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的电子断层扫描图片,可以清楚观察到呈不规则弯曲形态的厌氧氨氧化体膜、厌氧氨氧化体内的储存颗粒以及由厌氧氨氧化体膜伸向厌氧氨氧化体内部的深管状突起.

2.1 厌氧氨氧化体

2.1.1 厌氧氨氧化体的形态 L. van Niftrik等对厌氧氨氧化菌进行透射电镜的观察发现厌氧氨氧化体膜呈不同程度的弯曲^[11].如图5(A)和(D)所示,在用透射电镜观察Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*细胞时,发现其厌氧氨氧化体呈椭圆形,无弯曲.而在观察分裂的Candidatus *Brocadia fulgida*细胞时,发现其一端呈椭圆形无弯曲,而另一端则仍然保留弯曲

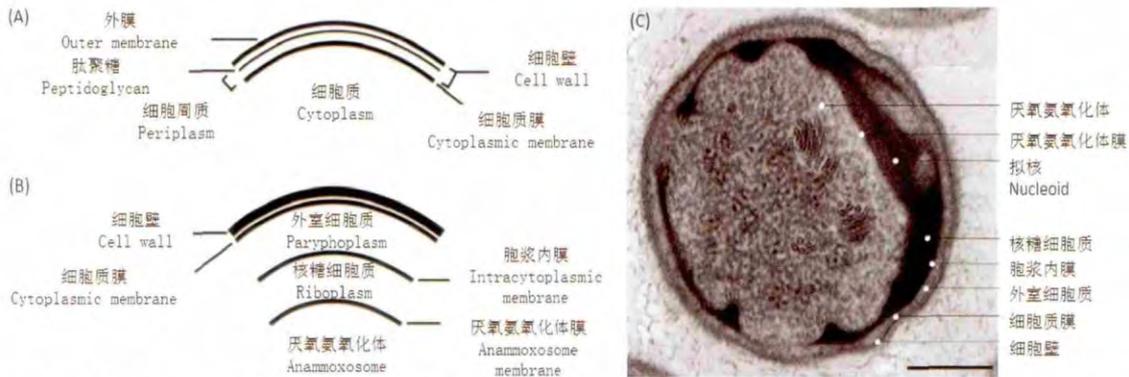


图3 厌氧氨氧化菌的细胞结构^[6,13]. (A) 普通革兰氏阴性细菌; (B) 厌氧氨氧化细菌; (C) Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的透射电镜图片(比例尺200 nm).

Fig. 3 Structure of anaerobic ammonium oxidation bacteria cells^[6,13]. (A) Gram-negative cell; (B) Anammox bacteria cell; (C) Transmission electron micrographs of Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis* (Scale bars 200 nm).

状态. 因此并非所有厌氧氨氧化体膜都是不规则弯曲形态, 但该现象多发生在分裂细胞中. 此外从图中可以看出厌氧氨氧化体占据厌氧氨氧化菌细胞大部分空间(大于50%), 表1所示为4种厌氧氨氧化菌细胞平均直径与厌氧氨氧化体所占细胞体积大小的对比.

表1 厌氧氨氧化菌细胞中厌氧氨氧化体所占比例

Table 1 Proportion of anammoxosome in anaerobic ammonium oxidation bacteria cells

厌氧氨氧化菌 Anaerobic ammonium oxidation bacteria	细胞平均直径 (d/nm) Mean diameter of cells	厌氧氨氧化体所占细胞 体积(φ%) Percentage of anammoxosome
<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	800	61 ± 5
<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	800	61 ± 5
<i>Candidatus Scalindua</i> spp.	950	51 ± 8
<i>Candidatus Anammoxoglobus propionicus</i>	1100	66 ± 6

2.1.2 厌氧氨氧化体的功能 由于厌氧氨氧化体占据厌氧氨氧化菌细胞大部分空间, 因此可以推测厌氧氨氧化体是最核心的部位. 而该核心部位一直以来都被认为是厌氧氨氧化菌分解代谢的主要场所, 为了证明这个观点, L. van Niftrik等利用细胞色素c过氧化物酶染色方法对*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*进行染色, 用来检测参与Anammox代谢过程中细胞色素c蛋白的确切位置^[13-14]. 从图5(G)和(H)中可观察到细胞色素c蛋白位于厌氧氨氧化体内并靠近厌氧氨氧化体边缘约150 nm的范围内(虚线所示), 此外在厌氧氨氧化体膜弯曲程度较高的地方还发现强烈的染色现象. 因此厌氧氨氧化菌分解代谢的确发生在厌氧氨氧化体内并靠近厌氧氨氧化体膜.

此外, 该实验还验证了厌氧氨氧化体是厌氧氨氧化菌细胞内的细胞器, 而不是由细胞质膜折叠弯曲形成的. 因为到目前为止具有血红素c的细胞色素(羟氨氧化还原酶、亚硝酸盐还原酶)只在普通细菌的细胞周质空间发现过^[17-18]. 而该实验表明厌氧氨氧化菌中具有血红素c的细胞色素只存在于厌氧氨氧化体中, 如果厌氧氨氧化体是由细胞质膜折叠弯曲形成的, 那么在外室细胞质中也应该存在过氧化物酶染色现象. 因此厌氧氨氧化体确实是厌氧氨氧化菌细胞内的细胞器. J. S. S. Damste等在研究厌氧氨氧化体膜时, 利用溶菌酶使*Candidatus Brocadia anammoxidans*的厌氧氨氧化体成功的从其细胞中分离(图5(J)箭头所示)^[19], 这也同样能证明厌氧氨氧化体是厌氧氨氧化菌细胞中真实存在的细胞器.

2.2 厌氧氨氧化体膜

2.2.1 厌氧氨氧化体膜的结构 相关报道表明, 厌氧氨氧化体膜也具有特殊结构. J. S. S. Damste等分别用Delft和Dokhaven所富集的*Candidatus Brocadia anammoxidans*细胞来研究厌氧氨氧化体膜的结构和功能, 在研究过程中发现厌氧氨氧化体膜具有特殊的结构^[19]. 如图6(A)和(B)所示, 其中一种膜脂质确定为C₂₀的脂肪酸甲酯(a), 该脂肪酸甲酯结构包含5个线性串联的环丁烷(Y)并连接一个庚基链, 在庚基链末端的碳原子上又连接一个甲基酯. 而另一种脂质确定为

C₂₀的sn-2-甘油单醚(sn-2-glycerol monoether)(b), 该sn-2-甘油单醚结构包含3个线性串联的环丁烷和1个环己烷(X)并连接一个辛基链, 在辛基链末端的碳原子上以醚键连接一个甘油. 此外还有一种更特殊的膜脂质确定为混合型甘油醚酯(c), 该混合型甘油醚酯包含以上两种脂质结构. 值得注意的是所有线性串联的环烷烃(X、Y)都以顺式方式进行连接, 由于顺式结构不能旋转, 所以其三维结构以阶梯形状进行排列, 因此J. S. S. Damste等称其为“ladderane”.

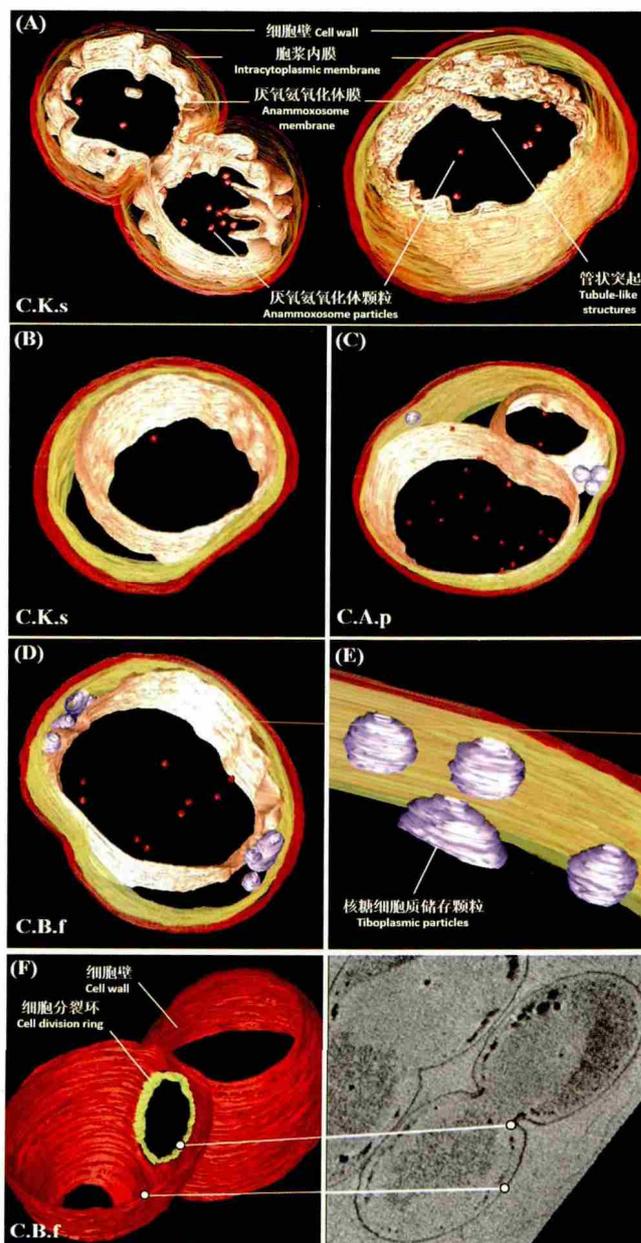


图4 厌氧氨氧化菌电子断层扫描图片^[13-15]. C.K.s: *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*; C.A.p: *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*; C.B.f: *Candidatus Brocadia fulgida*.

Fig. 4 Snapshots of electron tomography models of anaerobic ammonium oxidation bacteria cells^[13-15]. C.K.s: *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*; C.A.p: *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*; C.B.f: *Candidatus Brocadia fulgida*.

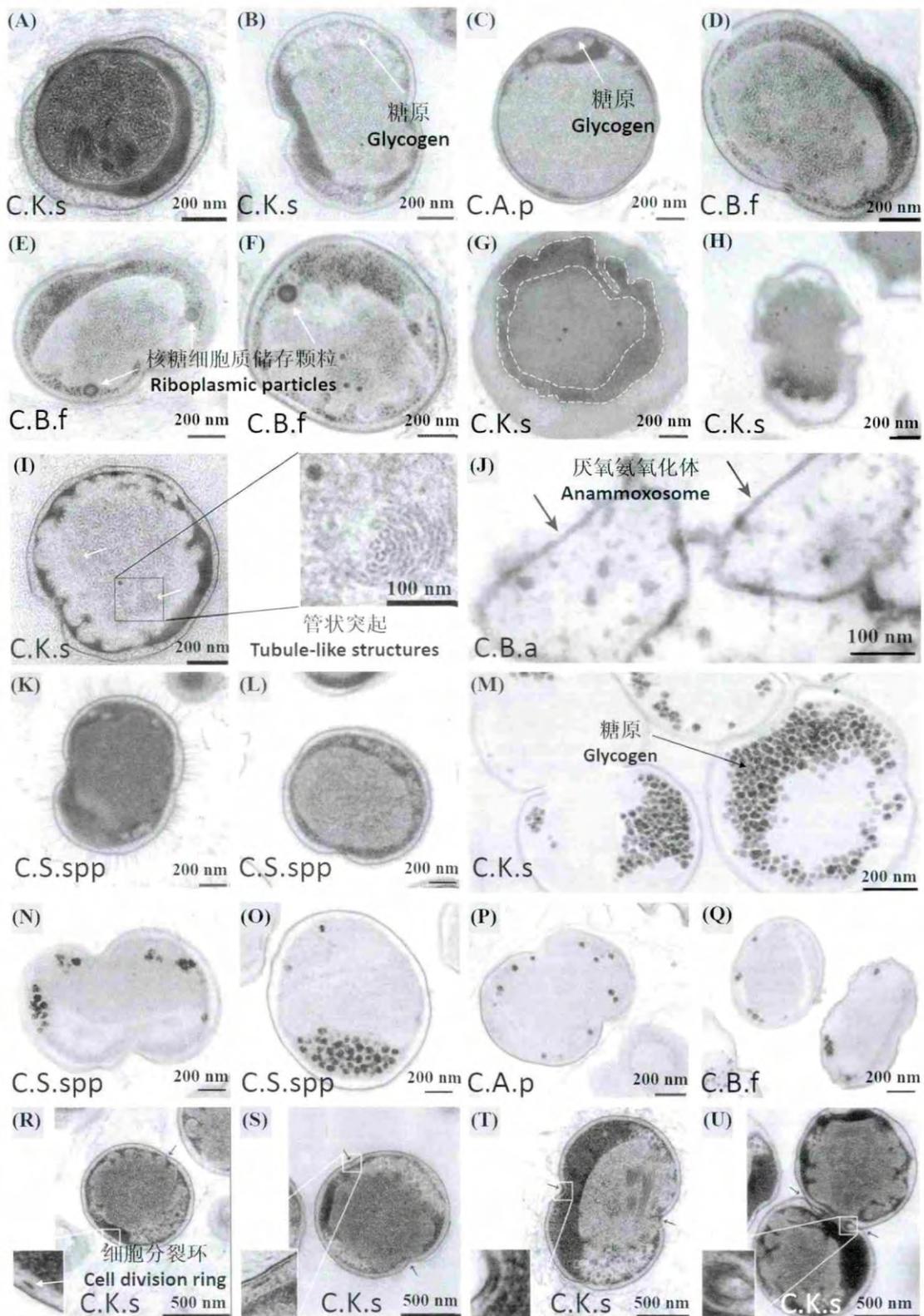


图5 厌氧氨氧化菌细胞透射电镜图片^[13-16]. C.K.s :Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis* ;C.A.p :Candidatus *Anammoxoglobus propionicus* ;C.B.f :Candidatus *Brocadia fulgida* ;C.B.a :Candidatus *Brocadia. anammoxidans* ;C.S.spp :Candidatus *Scalindua* spp.

Fig. 5 Transmission electron micrographs of anaerobic ammonium oxidation bacteria ^[13-16]. C.K.s: Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*; C.A.p: Candidatus *Anammoxoglobus propionicus*; C.B.f: Candidatus *Brocadia fulgida*; C.B.a: Candidatus *Brocadia. Anammoxidans*; C.S.spp: Candidatus *Scalindua* spp.

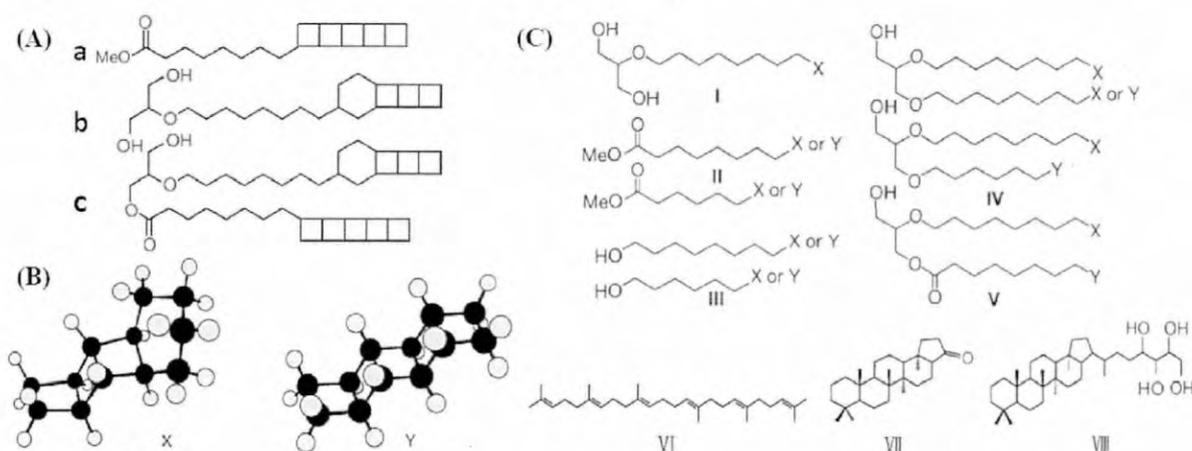


图6 厌氧氨氧化体膜的阶梯烷膜脂与非阶梯烷膜脂结构^[19-21]。(A) 厌氧氨氧化细菌独特膜脂质的化学结构式;(B) 环状结构X和Y的三维立体结构,碳原子以黑球表示,氢原子以灰球表示;(C) 阶梯烷膜脂与非阶梯烷膜脂的化学结构式。

Fig. 6 Ladderane and common membrane lipids of anammoxosome^[19-21]. (A) General chemical structures of unique membrane lipids of anammox bacteria; (B) Three-dimensional representation of ring structures X and Y. Carbon and hydrogen atoms are represented by black and grey balls, respectively; (C) Chemical structures of unique membrane lipids and common membrane lipids.

目前,对厌氧氨氧化体膜的成分研究表明,在各种厌氧氨氧化菌中阶梯烷膜脂的种类及含量基本相似^[22-25]。如图6(C)所示,按阶梯烷膜脂相对含量由多至少分别为:脂肪酸甲酯()、sn-2-烷基甘油单醚()、醇类()、sn-1,2-二烷基甘油二醚()、甘油醚和酰基甘油()^[20]。且在混合型甘油醚上,X阶梯型结构优先占据sn-2位置,Y阶梯型结构却只能占据sn-1位置。厌氧氨氧化体膜中所含X、Y型脂质非常丰富,约占据其总脂质的34%^[19]。而厌氧氨氧化体膜中的非阶梯烷膜脂所占比重也不可小觑。厌氧氨氧化体膜中的非阶梯烷膜脂主要由直链脂肪酸、支链脂肪酸、单饱和脂肪酸和三萜系化合物组成。其中三萜系化合物由C₂₇的藿烷类化合物(Hopanoid)()、细菌藿四醇(bacteriohopanetetrol, BHT)()和鲨烯(Squalene, C₃₀H₅₀)()组成。与阶梯烷膜脂所不同的是,非阶梯烷膜脂在不同厌氧氨氧化菌中的种类和含量差异较大^[26]。阶梯烷膜脂一直以来被认为是厌氧氨氧化体膜所独有的,但目前的研究表明,阶梯烷膜脂也存在于厌氧氨氧化菌的其他膜结构上,并且能与非阶梯烷膜脂相结合从而改善膜的渗透性^[21]。

除了阶梯烷膜脂具有特殊的阶梯结构外,厌氧氨氧化体膜的醚连接和酯连接也值得人们关注,因为醚连接通常为古细菌所特有的膜脂结构^[27],酯连接则是典型细菌和真菌的膜脂特征。关于甘油二醚和酯醚混合的脂类,尽管在细菌中比较罕见,但还是在一些嗜热菌^[28-30]和硫酸盐还原细菌^[31-32]中发现其踪影。而16S rRNA基因表明厌氧氨氧化菌既不属于嗜热菌,也不属于古细菌。但Brochier认为脂类的连接方式对于研究厌氧氨氧化菌的进化历程具有良好的指导意义^[33]。

2.2.2 厌氧氨氧化体膜的功能 由于厌氧氨氧化体膜结构特殊,因此J. S. S. Damste等推测其在厌氧氨氧化菌代谢过程中必定起到至关重要的作用^[19],为了探寻厌氧氨氧化体膜的作用他们对其渗透性做了相关的研究,由于脂质双分子层具有流动性,所以可以利用与联氨小分子结构类似的荧光分子进行渗透实验,如果荧光分子能渗透到厌氧氨氧化体中,那

么就意味着像联氨这样的小分子也可以渗透到厌氧氨氧化体内部。实验结果表明荧光分子很容易透过细胞质膜和胞浆内膜,但不能透过厌氧氨氧化体膜。令人惊奇的是当把厌氧氨氧化菌细胞加热至92℃并持续90 min,荧光分子仍不能透过厌氧氨氧化体膜,只有用100%的乙醇使细胞完全脱水或将细胞干燥处理后,荧光分子才能透过厌氧氨氧化体膜。这说明厌氧氨氧化体膜相当致密。此外他们还对厌氧氨氧化体膜进行了模型模拟,模拟表明阶梯烷膜脂部分的密度高达1.5 kg/dm³,而普通细菌的膜脂密度最大不超过1.2 kg/dm³。而该模型只用一种梯形脂质()进行模拟,因此与实际厌氧氨氧化体膜阶梯烷膜脂相比,其致密程度仍不可估量。

由于厌氧氨氧化菌分解代谢主要发生在厌氧氨氧化体内,同时阶梯烷膜脂具有较高的致密程度,因此对于厌氧氨氧化菌在分解代谢过程中产生的有毒中间产物,阶梯烷膜脂可作为有效屏障来抵抗有毒物质的扩散,从而保护细胞。此外,厌氧氨氧化菌作为自养菌,其依赖电化学离子梯度跨膜来产生ATP,由于厌氧氨氧化菌代谢异常缓慢,单位时间内转移的质子数有限,所以阶梯烷膜脂也有利于长时间维持厌氧氨氧化体内外的浓度梯度,从而维持生命活动。

到目前为止,在自然界中阶梯烷膜脂只存在于厌氧氨氧化菌中,甚至在同门(浮霉菌门)的其他细菌如*Pirellula marina*、*Gemmata obscuriglobus*中也未曾发现其踪影^[19]。因此,除了16S rRNA技术,检验厌氧氨氧化菌阶梯烷膜脂质可以作为一种新兴手段,来验证厌氧氨氧化菌在生态系统中的是否存在^[24]。

诸多学者已对厌氧氨氧化体膜的结构与功能进行了研究,但是厌氧氨氧化体膜为什么呈现出规则弯曲形态仍引起他们的好奇。H. T. McMahon等对膜的弯曲机制进行了研究,推测膜弯曲主要有两个作用^[34]:

(1) 蛋白质分子可以选择性地附着在弯曲褶皱上,且呈弯曲状态的膜为其创造了有利的微环境,使其在膜突起处优先定位离子通道。

(2) 厌氧氨氧化体膜的功能如同线粒体的脊^[35]。厌氧氨氧化体是发生厌氧氨氧化过程的主要场所,且其主要发生在膜的内侧。电子转移过程中释放的能量可将核糖细胞质中的质子转移至厌氧氨氧化体内,因此在厌氧氨氧化体膜两侧形成质子电化学梯度,而电子转移所释放的大部分能量将以质子推动力的形式储存起来,然后,在质子推动力的作用下,质子通过ATP酶从厌氧氨氧化体内回流至核糖细胞质中,并在核糖细胞质中驱动ADP与Pi合成ATP。因此弯曲状态的膜使其比表面积增加,增强代谢反应,从而使厌氧氨氧化活性增大。

不过,关于厌氧氨氧化体膜弯曲状态的形成机制仍然是个谜题,如果在厌氧氨氧化菌中缺乏膜的主动弯曲机制,那么厌氧氨氧化体膜所受到的张力必然随着渗透压的改变而改变,形成弯曲膜以保持膜内外渗透压达到平衡。然而,膜主动弯曲也存在许多其他原因^[35],包括脂质组成的改变、内在的膜蛋白的影响、细胞骨架蛋白、微管运动活性等。因此关于厌氧氨氧化体膜弯曲状态的形成到底是属于主动弯曲方式还是非主动弯曲方式仍不清楚,有待进一步的深入研究。

2.3 厌氧氨氧化体内管状突起及储存颗粒

图4(A)和5(I)分别为*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*和*Candidatus Brocadia fulgida*的电子断层扫描及透射电镜图片,从该图片中可以清楚地观察到厌氧氨氧化体内存在一些管状结构^[10, 36],经放大观察,这些管状结构的横截面呈六边形,且由3个彼此相同的单元所构成。每个独立的单元平均宽度为9.4 nm,共同组成了即长又细的管状结构,有时该结构也会排列成组,并可以充分伸展。据推测,该管状结构可能作为细胞骨架以维持厌氧氨氧化体膜的弯曲形态,或者在厌氧氨氧化体分裂时起到关键作用,此外也可能是厌氧氨氧化体内某种关键代谢酶的高度聚集而形成的高级结构^[12]。

此外还在厌氧氨氧化体内发现一些储存颗粒(图4(A-D)、图5(B-D)),其在厌氧氨氧化体内的数量不定,直径为16-25 nm,对该储存颗粒进行TEM-EDX元素分析,该储存颗粒主要包含铁、磷两种元素,比值为0.83。而M. Strous等对*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*的基因组进行测序时,发现其具有铁储存基因kuste3640和kuste4480,且其与*E. coli*的铁蛋白基因序列具有32%-48%的同源性^[7],此外他们还还对厌氧氨氧化菌的铁呼吸作用进行了相关研究,研究表明在以硝酸盐为电子供体的情况下,*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*以 $4.8 \text{ nmol (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 的氧化速率来氧化 Fe^{2+} ;而在甲酸为电子供体的情况下,*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*能够还原 Fe^{3+} ;而在氨作为电子供体的情况下,*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*不能转化 Fe^{3+} 。因此可以推断厌氧氨氧化体内的储存颗粒事实上就是铁蛋白。L. van Niftrik等对该储存颗粒的功能进行了两点假设^[13]:

(1) 厌氧氨氧化体储存颗粒与铁呼吸有关^[7]。尽管厌氧氨氧化菌具有铁呼吸能力,但能量主要是通过亚硝酸盐的厌氧氨氧化作用所产生的。

(2) 厌氧氨氧化体储存颗粒是对环境中铁含量不足的反应。当环境中铁含量稀缺时,铁储存就会受到诱导^[37]。

厌氧氨氧化菌富集培养基质中含有6.25 mg/L的硫酸铁,据Strous研究,厌氧氨氧化菌只能利用一半的硫酸铁,因此

在铁含量受限制的情况下厌氧氨氧化菌的生长可能停止。然而厌氧氨氧化菌会产生大量含血红素的酶(>20%总细胞蛋白质),所以厌氧氨氧化菌储存的铁很可能用于合成血红素。也就是说铁储存颗粒可视为厌氧氨氧化菌细胞中的铁储存设备为血红素提供铁,因此这些含血红素的酶可认为是实际的电子转移链或是富含铁蛋白。

这些发现皆可说明AAOB对铁的需求量很大,相关研究表明厌氧氨氧化体内富含大量的血红素^[38-40],如每个羟氨氧化还原酶含26个血红素,每个联氨氧化酶含8个血红素,每个细胞色素c-552含1个血红素。而血红素是能量代谢和细胞合成的重要电子载体。因此,添加铁离子可以促进血红素的合成,从而加快电子传递并促进AAOB的生长和代谢。张蕾等在研究铁离子对厌氧氨氧化影响的过程中发现,当铁离子浓度为0.075 mmol/L时,被转化的铁离子达到0.039 mmol/L。因此常用培养基的铁含量不能满足AAOB对铁的需求。同时在该铁离子浓度下,反应器对 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的最大去除率分别为原来的1.6和1.8倍,因此铁离子能够促进厌氧氨氧化的脱氮效率。而彭厦等的研究表明,当进水 Fe^{2+} 浓度为0.08 mmol/L时,反应器 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的去除率均能稳定在95%左右,并且该过程中 $\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N} < 1.32$ ^[42],据推测这可能是由于铁离子代替亚硝酸盐参与了厌氧氨氧化过程所导致的。

3 核糖细胞质

3.1 核糖细胞质中的糖原物质

图5(B)和(C)为*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*和*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*细胞未经糖原染色所观察到的糖原物质,而图5(M)-(Q)分别为*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*、*Candidatus Scalindua* spp.、*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*、*Candidatus Brocadia fulgida*细胞通过糖原染色实验在核糖细胞质内的储存的糖原物质。每个糖原颗粒的直径大约为55 nm。在考察的4种厌氧氨氧化菌中,*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*细胞储存的糖原最多。对*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*的基因组进行研究显示:*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*具有糖原合成基因glgA、glgB、glgC^[43]。对其开放阅读框的研究发现其蛋白质序列与*E. coli*^[44]的糖原基因序列具有30%-35%的同源性。M. Strous等对*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*进行了全序列的测定,也发现其具有编码糖酵解与糖代谢合成的基因^[7]。目前,仅推测核糖细胞质中的糖原物质与生物膜的形成有关,且形成生物膜的机制可能与*Salmonella enterica* serovar Enteritidis细胞类似^[45],然而核糖细胞质中储存的糖原物质的确切功能尚不明确,需要进一步的深入研究。

3.2 核糖细胞质中的储存颗粒

图4(C)和(D)及图5(E)和(F)为*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*和*Candidatus Brocadia fulgida*细胞电子断层扫描及透射电镜图片,从上述图片中可以清晰看到核糖细胞质中的储存颗粒,通常呈球状,偶尔呈管状,平均直径为83 nm,通过电子断层扫描图片(图4(E))可知核糖细胞质储存颗粒彼此分离并无任何连接。通过能量弥散X射线探测器检测其

元素组成与核糖细胞质元素组成基本相同. 同时也通过糖原染色实验验证其并非核糖细胞质中的糖原物质.

据推测核糖细胞质中储存颗粒可能与碳源合成及能量储存有关(PHA)^[46]. 电镜研究显示在4种厌氧氨氧化菌中只有Candidatus *Brocadia fulgida*和Candidatus *Anammoxoglobus propionicus*存在核糖细胞质储存颗粒,而在Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*和Candidatus *Scalindua* spp.中不存在该颗粒,因此可以推测核糖细胞质中的储存颗粒可能是某些厌氧氨氧化菌种所特有的. 此外,对Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的基因组序列进行研究时,也未发现编码PHA的*phaC*基因^[47],这与电镜中未观察到Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*中存在核糖细胞质储存颗粒的现象相符. 如果说Candidatus *Brocadia fulgida*和Candidatus *Anammoxoglobus propionicus*能够储存PHA,那么意味着这两种厌氧氨氧化菌具有高效氧化小分子有机酸的能力^[22-23]. 此外还有一些学者猜测该储存颗粒其实是由胞浆内膜或厌氧氨氧化体膜分化的囊泡. 因此到目前为止关于核糖细胞质中储存颗粒的功能尚无定论,需进一步研究.

4 外室细胞质

厌氧氨氧化菌的外室细胞质约占整个细胞体积的20%空间, Lindsay等利用RNase-Gold及DNA免疫标记技术对Candidatus *Brocadia anammoxidans*细胞进行标记,结果显示厌氧氨氧化菌的外室细胞质中含有少量的RNA不含DNA^[10]. 然而,目前对厌氧氨氧化菌的外室细胞质的确切功能尚不清楚,但在透射电镜观察时发现,处在分裂状态下的厌氧氨氧化菌的外室细胞质中存在高电子密度物质(图5(R)), Van Niftrik L等推测该物质即为细胞分裂环(Cell division ring)^[15],其在细胞分裂的过程中起到关键的作用. 图4(F)为细胞分裂环的电子断层扫描电镜图片.

厌氧氨氧化细胞的分裂过程大致可分为4个阶段(图5(R)-(U)): ()在厌氧氨氧化菌的外室细胞质中出现细胞分裂环;()伴随细胞分裂环的出现,细胞壁开始轻微凹陷;()细胞等体积分割并向两极延伸;()细胞分裂环逐渐收缩直至细胞分裂过程完成. 到目前为止隶属于浮霉菌门的其他菌属的分裂方式均为出芽生殖^[48],但从厌氧氨氧化菌的分裂方式来看,厌氧氨氧化菌则属于二分裂,并非出芽生殖. 此外, Van Niftrik L等还考察了厌氧氨氧化菌细胞分裂过程中细胞分裂环的宽度和厚度,他们发现随着细胞分裂过程的进行,细胞分裂环的宽度和厚度都有明显的增加^[15].

为了确定外室细胞质中的高电子密度物质的确起在细胞分裂过程中起到关键作用, Van Niftrik L等对Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的基因组进行了分析^[15]. 据了解大多数细菌在分裂过程中, GTP发生水解从而驱动*ftsZ*在细胞中央装配成环状结构,环状结构逐渐收缩使细胞分裂. 然而在Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的基因组中却未发现编码Z-ring复合体(*ftsZ*, *ftsA*, *zipA*)及*ftsN*的同源基因. 但是,在Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*基因组的开放阅读框中找到一个拥有GTP结合位点的kustd1438蛋白,他们利用胶体金技术对kustd1438蛋白进行细胞原位检测,发现kustd1438蛋

白的确分布在外室细胞质的分裂环处,并在细胞分裂过程中起到关键作用. 因此在厌氧氨氧化细菌中与分裂环相关的蛋白并非普通细菌中的*ftsZ*蛋白而是厌氧氨氧化菌所特有的kustd1438蛋白.

5 细胞表面纤维状附着物

除了上述共有的厌氧氨氧化菌超微结构, J. van de Vossenberg在反应器(两种Candidatus *Scalindua* spp.按1:1混合)中还观察到了两种Candidatus *Scalindua* spp.菌种的特殊形态类型. 如图5(K)中Candidatus *Scalindua* spp.细胞长有纤维状附属物,且该附属物均匀分布在细胞表面,平均长度为131 nm,初步认定该纤维状附属物为细菌的菌毛,其主要作用是粘着环境^[49]. 而图5(L)为另一种Candidatus *Scalindua* spp.,细胞表面却没有菌毛附着,而是在细胞壁外侧包裹着一种不规则的外层,据推测可能是该细菌在进化过程中菌毛退化形成的不规则层. 然而在其他厌氧氨氧化菌细胞中均未观察到这种形态差异,因此推测这是Candidatus *Scalindua* spp.的独有属性.

然而,还有一种推测表明,这些所谓的“菌毛”并不是真正的菌毛,而是细胞之间粘合在一起所分泌的胞外聚合物(Extracellular polymeric substance, EPS). 随后 van de Vossenberg等发现,在Candidatus *Scalindua profunda*的基因组中存在着*pilT*-like基因^[8],而这些基因很可能起到细胞附着或胞间通讯的作用,而这与J. van de Vossenberg所观察到的纤维状的附着物相符.

6 S-layer

S-layer (Surface layer)是由蛋白质成分的亚单元组成的一种单分子二维晶格结构^[50],是古细菌和细菌中最常见的细胞表面结构之一. Van Teeseling M. C等对Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的S-layer进行了冷冻蚀刻研究^[50],如图7所示, Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的S-layer呈六角对称结构,且每个晶格由6个蛋白亚基组成. 同时又利用FFT (Fast Fourier Transform)光谱验证了S-layer分布的规律性,并测定了每个晶格的中心距为20 nm.

此外, Van Teeseling M. C等还对S-layer蛋白进行了研究, SDS-PAGE分析表明该蛋白的相对分子质量(M_r)为 160×10^3 ,包含1 591个氨基酸,并鉴定为Kustd1514^[51]. 而在 $M_r 55 \times 10^3$ 上还发现另一亮条带,对其进行氨基酸分析,发现该蛋白多以 β 折叠结构存在,因此假定该蛋白为OMP (Outer membrane protein)^[53],并鉴定为Kustd1878,这说明S-layer很可能固定在Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*的细胞质膜上. 之后又对SDS-PAGE进行PAS (Periodic Acid Schiff's)染色,发现 $M_r 160 \times 10^3$ 处有染色现象,说明该蛋白以糖基化形式存在. 然而对该蛋白进行同源比对却未发现同源蛋白.

S-layer通常是复杂细胞壁结构的一部分,因此功能上也不是单一独立的. 目前对S-layer的功能了解并不多,仍处于假说阶段,缺乏足够的实验数据支持. 普通细菌的S-layer功能主要有以下3点^[54-55]: (1)作为保护衣防止捕食、超滤分子

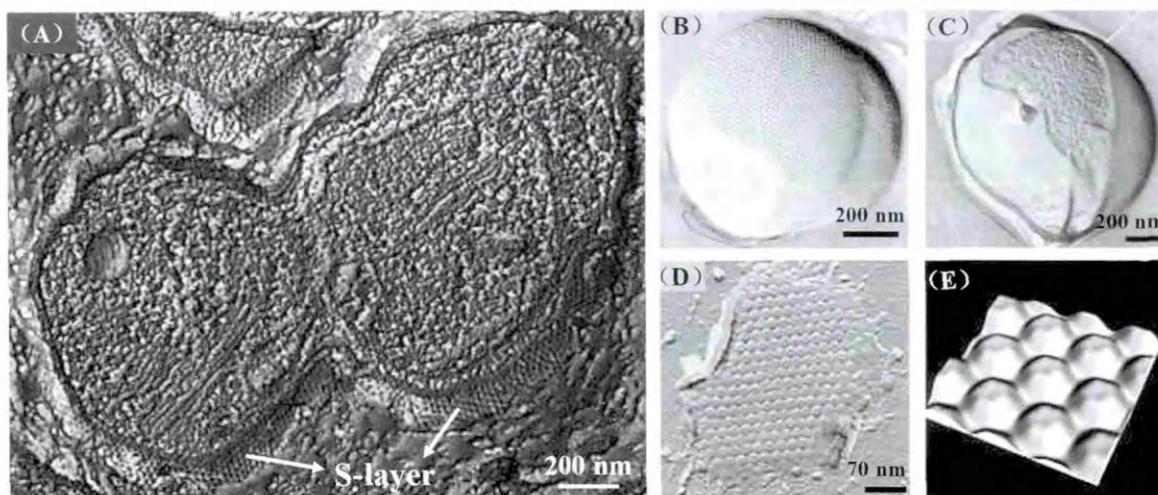


图7 厌氧氨氧化细菌S-layer透射电镜图片^[51-52]。(A) 厌氧氨氧化菌冷冻蚀刻图片,白色箭头所示为S-layer;(B) 厌氧氨氧化菌表面所覆盖的S-layer;(C) 穿过厌氧氨氧化菌S-layer所显示的细胞;(D) 经提取富集的S-layer图片;(E)通过三维模型模拟的S-layer六角对称结构。

Fig. 7 Transmission electron micrographs of anaerobic ammonium oxidation bacteria S-layer ^[51-52]. (A) *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* cells after freeze-etching; (B) *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* cells are covered by a hexagonal S-layer as observed after freeze-etching; (C) A freeze-fracture through the S-layer gives an inside into the *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* cell underneath; (D) S-layer patch with typical hexagonal symmetry observed by freeze-drying; (E) A three-dimensional model of the isolated S-layer shows the same relief as observed for the S-layers present on *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* cells.

筛、分子及离子陷阱、渗透保护;(2)作为细胞粘连和表面识别的基质;(3)决定细胞形状的骨架,维持细胞形状和完整性。

相关研究表明肽聚糖对细胞的完整性及细胞形状起着至关重要的作用^[56],然而厌氧氨氧化菌的细胞壁却无肽聚糖^[57],因此必然存在某一结构以维持细胞形状和完整性。可推测厌氧氨氧化菌S-layer的主要功能是维持细胞形状并保持细胞完整性。然而目前仅是推测,建议今后利用基因敲除技术对厌氧氨氧化菌S-layer的确切功能进行更深层次的研究。

7 结论

厌氧氨氧化工艺作为一种低能耗、无需外加碳源的自养脱氮工艺,受到越来越多学者的研究和关注。然而欲将该工艺应用到实际工程中,必须对其执行者厌氧氨氧化菌进行充分的研究。目前已对厌氧氨氧化菌的最适生长因子、代谢途径、宏基因组学及宏蛋白质组学进行了相关研究。而本文主要对厌氧氨氧化菌细胞的超微结构及功能进行了详细的论述及总结,其中厌氧氨氧化体作为厌氧氨氧化菌细胞中最重要的细胞器,为厌氧氨氧化菌的代谢提供场所,而在代谢过程中具有梯形烷膜脂结构的厌氧氨氧化体也起着重要的作用。此外,厌氧氨氧化体内的铁储存颗粒可为血红素提供铁元素以加快新陈代谢。外室细胞质中的细胞分裂环在厌氧氨氧化菌细胞分裂过程起到关键的作用。而关于厌氧氨氧化体膜的弯曲机制,核糖细胞质中的糖原与储存颗粒、细胞表面纤维状附着物以及S-layer的具体功能仍处在推测阶段,尚无理论依据。虽然目前已研究了厌氧氨氧化菌的超微结构,但

某些特殊结构的相关功能仍无充足证据来证实。从目前研究形势来看,对厌氧氨氧化菌超微结构的研究多局限于电镜技术,建议今后将厌氧氨氧化细胞的超微结构及功能的相关研究与宏基因组学及宏蛋白质组学相结合。同时还应考虑不同水质及操作条件下的厌氧氨氧化细胞超微结构的差异,并将理论与实际相结合指导厌氧氨氧化工艺在污水生物处理中的应用。

参考文献 [References]

- 1 Vandegraaf AA, Mulder A, Debruijn P, Jetten MSM, Robertson LA, Kuenen JG. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (4): 1246-1251
- 2 Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, Jetten MSM. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50** (5): 589-596
- 3 Schmid MC, Maas B, Dapena A, De Pas-Schoonen KV, De Vossenberg JV, Kartal B, Van Niftrik L, Schmidt I, Cirpus I, Kuenen JG, Wagner M, Damste JSS, Kuypers M, Revsbech NP, Mendez R, Jetten MSM, Strous M. Biomarkers for *in situ* detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (4): 1677-1684
- 4 Schmid MC, Risgaard-Petersen N, Van De Vossenberg J, Kuypers MMM, Lavik G, Petersen J, Hulth S, Thamdrup B, Canfield D, Dalsgaard T, Rysgaard S, Sejr MK, Strous M, Den Camp H, Jetten MSM. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity [J]. *Environ Microbiol*, 2007, **9** (6): 1476-1484
- 5 Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, Van De Pas-

- Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM. Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. *Nature*, 1999, **400** (6743): 446-449
- 6 Kuenen JG. Anammox bacteria: from discovery to application [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6** (4): 320-326
- 7 Strous M, Pelletier E, Manganot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Medigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Op Den Camp HJM, Van Der Drift C, Cirpus I, Van De Pas-Schoonen KT, Harhangi HR, Van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, Van De Vossenberg J, Kartal B, Meier H, Frishman D, Huynen MA, Mewes HW, Weissenbach J, Jetten MSM, Wagner M, Le Paslier D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome [J]. *Nature*, 2006, **440** (7085): 790-794
- 8 Van De Vossenberg J, Woebken D, Maalcke WJ, Wessels HJ, Dutilh BE, Kartal B, Janssen-Megens EM, Roeselers G, Yan J, Speth D, Gloerich J, Geerts W, Van Der Biezen E, Pluk W, Francoijs KJ, Russ L, Lam P, Malfatti SA, Tringe SG, Haaijer SC, Op Den Camp HJ, Stunnenberg HG, Amann R, Kuypers MM, Jetten MS. The metagenome of the marine anammox bacterium 'Candidatus Scalindua profunda' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium [J]. *Environ Microbiol*, 2013, **15** (5): 1275-1289
- 9 Fuerst JA. The planctomycetes - emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology [J]. *Microbiol-SGM*, 1995, **141**: 1493-1506
- 10 Lindsay MR, Webb RI, Strous M, Jetten MS, Butler MK, Forde RJ, Fuerst JA. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell [J]. *Arch Microbiol*, 2001, **175** (6): 413-429
- 11 Kartal B, Maalcke WJ, De Almeida NM, Cirpus I, Gloerich J, Geerts W, Op Den Camp HJ, Harhangi HR, Janssen-Megens EM, Francoijs KJ, Stunnenberg HG, Keltjens JT, Jetten MS, Strous M. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation [J]. *Nature*, 2011, **479** (7371): 127-130
- 12 Van Niftrik L. Cell biology of unique anammox bacteria that contain an energy conserving prokaryotic organelle [J]. *Anton leeuw*, 2013, **104** (4): 489-497
- 13 Van Niftrik L, Geerts WJ, Van Donselaar EG, Humbel BM, Yakushevskaya A, Verkleij AJ, Jetten MS, Strous M. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: a membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria [J]. *J Struct Biol*, 2008, **161** (3): 401-410
- 14 Van Niftrik L, Geerts WJ, Van Donselaar EG, Humbel BM, Webb RI, Fuerst JA, Verkleij AJ, Jetten MS, Strous M. Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome C proteins [J]. *J Bacteriol*, 2008, **190** (2): 708-717
- 15 Van Niftrik L, Geerts WJ, Van Donselaar EG, Humbel BM, Webb RI, Harhangi HR, Camp HJ, Fuerst JA, Verkleij AJ, Jetten MS, Strous M. Cell division ring, a new cell division protein and vertical inheritance of a bacterial organelle in anammox planctomycetes [J]. *Mol Microbiol*, 2009, **73** (6): 1009-1019
- 16 Damsté JSS, Strous M, Rijpstra WIC, Hopmans EC, Geenevasen JA, Van Duin AC, Van Niftrik LA, Jetten MS. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane [J]. *Nature*, 2002, **419** (6908): 708-712
- 17 Arp DJ, Stein LY. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2003, **38** (6): 471-495
- 18 Averill BA. Dissimilatory nitrite and nitric oxide reductases [J]. *Chem Rev*, 1996, **96** (7): 2951-2964
- 19 Damste JSS, Strous M, Rijpstra WIC, Hopmans EC, Geenevasen JA, Van Duin ACT, Van Niftrik LA, Jetten MSM. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane [J]. *Nature*, 2002, **419** (6908): 708-712
- 20 Jetten MS, Sliemers O, Kuypers M, Dalsgaard T, Van Niftrik L, Cirpus I, Van De Pas-Schoonen K, Lavik G, Thamdrup B, Le Paslier D, Op Den Camp HJ, Hulth S, Nielsen LP, Abma W, Third K, Engstrom P, Kuenen JG, Jorgensen BB, Canfield DE, Sinninghe Damste JS, Revsbech NP, Fuerst J, Weissenbach J, Wagner M, Schmidt I, Schmid M, Strous M. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **63** (2): 107-114
- 21 Rattray JE, Van De Vossenberg J, Hopmans EC, Kartal B, Van Niftrik L, Rijpstra WI, Strous M, Jetten MS, Schouten S, Sinninghe Damste JS. Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria [J]. *Arch Microbiol*, 2008, **190** (1): 51-66
- 22 Kartal B, Rattray J, Van Niftrik LA, Van De Vossenberg J, Schmid MC, Webb RI, Schouten S, Fuerst JA, Damste JS, Jetten MS, Strous M. Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2007, **30** (1): 39-49
- 23 Kartal B, Van Niftrik L, Rattray J, Van De Vossenberg JL, Schmid MC, Sinninghe Damste J, Jetten MS, Strous M. Candidatus 'Brocadia fulgida': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **63** (1): 46-55
- 24 Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, Schmid M, Jorgensen BB, Kuenen JG, Damste JSS, Strous M, Jetten MSM. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea [J]. *Nature*, 2003, **422** (6932): 608-611
- 25 Schmid M, Walsh K, Webb R, Rijpstra WI, Van De Pas-Schoonen K, Verbruggen MJ, Hill T, Moffett B, Fuerst J, Schouten S, Sinninghe Damsté JS, Harris J, Shaw P, Jetten M, Strous M. Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2003, **26** (4): 529-538
- 26 Rattray JE, Van De Vossenberg J, Hopmans EC, Kartal B, Van Niftrik L, Rijpstra WIC, Strous M, Jetten MSM, Schouten S, Damste JSS. Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria [J]. *Arch Microbiol*, 2008, **190** (1): 51-66
- 27 Langworthy TA, Pond JL. Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1986, **7** (2-3): 253-257
- 28 Huber R, Rossnagel P, Woese CR, Rachel R, Langworthy TA, Stetter KO. Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium Ammonifex degensii

- gen nov sp nov [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1996, **19** (1): 40-49
- 29 Huber R, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, Konig H, Rachel R, Rockinger I, Fricke H, Stetter KO. Aquifex-pyrophilus gen nov sp-nov represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1992, **15** (3): 340-351
- 30 Langworthy TA, Holzer G, Zeikus JG, Tornabene TG. Iso-branched and anteiso-branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe thermodesulfotobacterium-commune [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1983, **4** (1): 1-17
- 31 Jahnke LL, Eder W, Huber R, Hope JM, Hinrichs KU, Hayes JM, Des Marais DJ, Cady SL, Summons RE. Signature lipids and stable carbon isotope analyses of octopus spring hyperthermophilic communities compared with those of Aquificales representatives [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (11): 5179-5189
- 32 Pancost RD, Bouloubassi I, Aloisi G, Damste JSS, Medinaut Shipboard Sci P. Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts [J]. *Org Geochem*, 2001, **32** (5): 695-707
- 33 Brochier C, Philippe H. Phylogeny - A non-hyperthermophilic ancestor for bacteria [J]. *Nature*, 2002, **417** (6886): 244-244
- 34 McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling [J]. *Nature*, 2005, **438** (7068): 590-596
- 35 Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae [J]. *Biochim Biophys Acta Cell Res*, 2006, **1763** (5-6): 542-548
- 36 Van Niftrik LA, Fuerst JA, Damste JSS, Kuenen JG, Jetten MSM, Strous M. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **233** (1): 7-13
- 37 Andrews SC. Iron storage in bacteria [J]. *Adv Microb Physiol*, Vol 40, 1998, **40**: 281-351
- 38 Cirpus IEY, De Been M, Op Den Camp HJM, Strous M, Le Paslier D, Kuenen GJ, Jetten MSM. A new soluble 10 kDa monoheme cytochrome c-552 from the anammox bacterium Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis" [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **252** (2): 273-278
- 39 Schalk J, De Vries S, Kuenen JG, Jetten MSM. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation [J]. *Biochemistry*, 2000, **39** (18): 5405-5412
- 40 Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, Toyomoto T, Kawahara Y, Furukawa K, Fujii T. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (4): 1065-1072
- 41 张蕾, 郑平, 胡安辉. 铁离子对厌氧氨氧化反应器性能的影响[J]. 环境科学学报, 2009, **29** (8): 1629-1634 [Zhang L, Zheng P, Hu A H. Effect of ferrous ion on the performance of an anammox reactor [J]. *Acta Sci Circumst*, 2009, **29** (8): 1629-1634]
- 42 彭厦, 高大文, 黄晓丽. 金属离子对厌氧氨氧化反应器效能的影响[J]. 中国给水排水, 2012, **28** (21): 30-33 [Peng S, Gao DW, Huang XL. Impact of metal ions on performance of ANAMMOX reactor [J]. *China Water Wastewater*, 2012, **28** (21): 30-33]
- 43 Preiss J, Yung SG, Baecker PA. Regulation of bacterial glycogen-synthesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 1983, **57** (1): 61-80
- 44 Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Colladovides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 [J]. *Science*, 1997, **277** (5331): 1453-1426
- 45 Bonafonte MA, Solano C, Sesma B, Alvarez M, Montuenga L, Garcia-Ros D, Gamazo C. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **191** (1): 31-36
- 46 Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates [J]. *Microbiol Rev*, 1990, **54** (4): 450-472
- 47 Sheu DS, Wang YT, Lee CY. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR [J]. *Microbiol-SGM*, 2000, **146**: 2019-2025
- 48 Fuerst JA. The Planctomycetes: emerging models for microbial ecology; evolution and cell biology [J]. *Microbiology*, 1995, **141** (7): 1493-1506
- 49 Scott JR, Zahner D. Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently [J]. *Mol Microbiol*, 2006, **62** (2): 320-330
- 50 Klingl A, Flechler J, Heimerl T, Rachel R. Archaeal Cells [M]. *eLS*, 2013
- 51 Van Teeseling MC, De Almeida NM, Klingl A, Speth DR, Op Den Camp HJ, Rachel R, Jetten MS, Van Niftrik L. A new addition to the cell plan of anammox bacteria: "Candidatus *Kuenenia stuttgartiensis*" has a protein surface layer as the outermost layer of the cell [J]. *J Bacteriol*, 2014, **196** (1): 80-89
- 52 Fuerst JA, Webb RI, Van Niftrik L, Jetten MS, Strous M. Complex Intracellular Structures in Prokaryotes [M]. Springer, 2006. 259-283
- 53 Speth DR, Van Teeseling MC, Jetten MS. Genomic analysis indicates the presence of an asymmetric bilayer outer membrane in *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia* [J]. *Front Microbiol*, 2012, **3**: 304
- 54 Gyrovary E, Schroedter A, Talapin DV, Weller H, Pum D, Sleytr UB. Formation of nanoparticle arrays on S-layer protein lattices [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004, **4** (1-2): 1-2
- 55 Tarao M, Jezbera J, Hahn MW. Involvement of cell surface structures in size-independent grazing resistance of freshwater Actinobacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75** (14): 4720-4726
- 56 Van Heijenoort J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan [J]. *Glycobiology*, 2001, **11** (3): 25R-36R
- 57 Neumann S, Van Teeseling MC, Van Niftrik L. Planctomycetes: cell structure, origins and biology [M]. Springer, 2013. 89-123