

厌氧氨氧化菌的中心代谢研究进展

陆慧锋, 丁爽, 郑平*

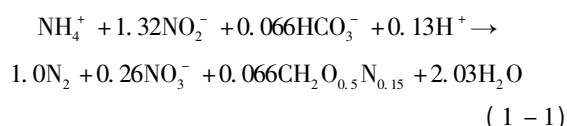
浙江大学环境与资源学院环境工程系 杭州 310058

摘要: 厌氧氨氧化是以 NH_4^+ 为电子供体, 以 NO_2^- 为电子受体产生 N_2 的生物反应。厌氧氨氧化菌是厌氧氨氧化过程的执行者, 在废水生物脱氮和地球氮素循环中扮演着重要角色。研究厌氧氨氧化菌的代谢特性, 将有助于理解厌氧氨氧化过程, 开发厌氧氨氧化工艺。厌氧氨氧化菌是化能自养型细菌, 以 CO_2 或 HCO_3^- 为碳源, 并通过偶联 NH_4^+ 氧化和 NO_2^- 还原的生物反应获得能量。在 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ 的生物氧化还原反应过程中, 检出了中间产物 N_2H_4 , 但未检出其他中间产物(如 NH_2OH 、 NO)。此外, 由基因组信息推断, 厌氧氨氧化菌通过乙酰-CoA 途径固定碳素。上述基于基因组信息推断的厌氧氨氧化途径与现有的实验资料、热力学计算和生化分析相吻合, 并遵守奥卡姆剃刀原理。

关键词: 厌氧氨氧化菌, 氮代谢, 能量转化, CO_2 同化

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 08-1014-09

厌氧氨氧化 (Anaerobic ammonium oxidation, Anammox) 是以亚硝酸盐 (NO_2^-) 为电子受体将氨 (NH_4^+) 转化成氮气 (N_2) 的生物过程^[1] (反应式 1–1)。厌氧氨氧化的发现不仅推动了生物脱氮技术的发展, 而且丰富了微生物学内容, 加深了人们对氮素循环的认知^[1–6]。



厌氧氨氧化菌 (Anaerobic Ammonium Oxidation Bacteria, AAOB) 为化能自养型细菌, 以 CO_2 或 HCO_3^- 为碳源, 并从 NH_4^+ 和 NO_2^- 的生物反应中获得能量。但迄今为止, 厌氧氨氧化代谢途径仍未探明。本文从酶学特性、氮代谢、能量转化、 CO_2 固定等方面, 综述分析了厌氧氨氧化中心代谢途径的研

究进展, 以期为进一步深入研究提供参考。

1 基于基因组的 AAOB 中心代谢途径

Strous 等采用双向测序技术建立了 *Kuenenia stuttgartiensis* 的 BAC 文库、Fosmid 文库和 DNA 质粒文库, 基于对基因组序列的分析, 提出了如图 1 所示的厌氧氨氧化中心代谢途径^[2, 4, 7–8]。该途径主要包括表 1 所列的 4 步反应: ① Cyt cd₁ 型亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase, Nir) 将 NO_2^- 还原成 NO ; ② 联氨水解酶 (Hydrazine Hydrolase, HH) 将 NO 和 NH_4^+ 缩合成 N_2H_4 ; ③ 联氨氧化酶 (Hydrazine Oxidoreductase, HZO) 将 N_2H_4 氧化成 N_2 ; ④ 亚硝酸盐氧化酶 (Nar) 将 NO_2^- 氧化成 NO_3^- 。上述反应主要发生于厌氧氨氧化体 (anammoxosome) 内, N_2H_4 释

基金项目: 国家“863 计划” (2009ZZ06311); 国家自然科学基金 (31070110)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-88982819; E-mail: pzhen@zju.edu.cn

作者简介: 陆慧锋 (1987–), 男, 浙江平湖, 硕士研究生, 从事废水生物脱氮的研究。E-mail: luhuifeng_1987@hotmail.com

收稿日期: 2011-01-16; 修回日期: 2011-04-09

放的4个电子通过细胞色素c、辅酶Q、细胞色素bc₁复合体以及其它细胞色素c的传递而交给 Nir 和 HH(其中1个电子交给 Nir ,3个电子交给 HH) ,伴随电子传递,质子被排至厌氧氨氧化体(anammoxosome) 膜外侧,在该膜两侧形成质子梯度驱动 ATP 和 NADPH 合成^[2,4,7-10]。此外,根据同位素示踪试验和基因组学研究结果推测,AAOB 可能通过卡尔文循环(Calvin cycle)^[10]或乙酰-辅酶A(Acetyl-CoA) 途径^[4,10]同化 CO₂。

本课题组研究了厌氧氨氧化富集培养物对氮素基质的转化特性,发现厌氧氨氧化富集培养物能将羟氨转化成联氨,转化速率为 0. 207 mmol/(gVSS·h)^[11]。Kostera 等^[12]试验证明:以还原性甲基紫精为电子供体,HAO 可将 NO 转化为 NH₂OH。由此推测,在厌氧氨氧化中心代谢途径中,先由 Nir 将 NO₂⁻ 转化为 NO;接着由 HAO 将 NO 转化为 NH₂OH;再由 HH 将 NH₂OH 和 NH₃ 缩合成 N₂H₄;此后按图 1 所示途径代谢。

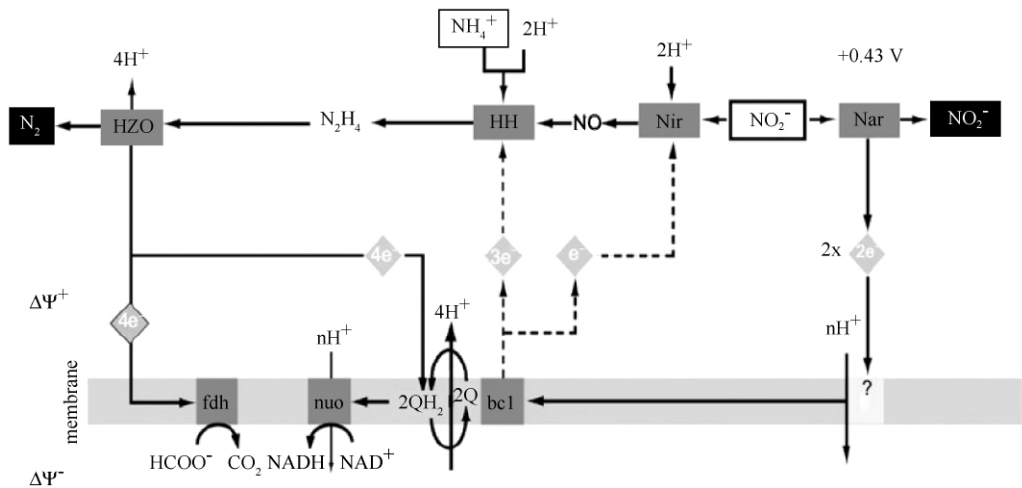


图1 假定的 *K. stuttgartiensis* 的中心分解代谢和为乙酰-CoA 代谢途径提供电子的途径^[2]

Fig. 1 Hypothetical scheme showing a combination of the central catabolism of *K. stuttgartiensis* together with the nitrate reductase to generate low-redox-potential electrons for the acetyl-CoA pathway. Abbreviations: Nir, nitrite reductase; HH, hydrazine hydrolase; HZO, hydrazine dehydrogenase; Nar, nitrate reductase; Q, ubiquinone; fdh, formate dehydrogenase; nuo, NADH: ubiquinone oxidoreductase; Q(H₂), (reduced) ubiquinone; bc1, bc1-complex; . Symbols: light diamonds, cytochromes; dark diamond with a black rim, ferredoxin; solid arrows, reductions; dashed arrows, oxidations. ΔΨ⁺ and ΔΨ⁻ are thought to represent the anammoxosome and riboplasmic compartments, respectively.

表1 厌氧氨氧化中心代谢的主要反应^[2]

Table 1 The main reactions of anammox central metabolism

Process(Enzyme)	Reaction	E ⁰ (V/ e ⁻)	Location
1 Denitrification(Nir)	NO ₂ ⁻ + 2H ⁺ + e ⁻ → NO + H ₂ O	0. 34	Periplasm
2 Hydrazine formation(HH)	NH ₄ ⁺ + NO + 2H ⁺ + 3e ⁻ → N ₂ H ₄ + H ₂ O	0. 34	Anammoxosome
3 Nitrogen generation(HZO)	N ₂ H ₄ → N ₂ + 4H ⁺ + 4e ⁻	- 0. 75	Anammoxosome
4 Nitrification(Nar)	NO ₂ ⁻ + H ₂ O → NO ₃ ⁻ + 2H ⁺ + 2e ⁻	- 0. 43	Membrane

2 AAOB 的氮代谢

2.1 亚硝酸盐还原

催化 NO₂⁻ 还原(NO₂⁻ + 2H⁺ + e⁻ → NO + H₂O) 的酶是 Nir。基因组研究表明, *K. stuttgartiensis* 中存在编码 Cyt cd₁ 型 Nir 的 *nirs* 基因^[4]。但到目前为止, Nir 尚未被分离纯化。

K. stuttgartiensis 的 Nirs(kuste4136) 与反硝化菌

Paracoccus pantotrophus 的相似度高达 49%^[4], 且该反应(表 1 反应 1) 类似于反硝化中的 NO₂⁻ 还原反应。反硝化菌中的 Nir 有 2 种类型。一种为 Cyt cd₁ 型 Nir, 分子量约120 kDa, 系同型二聚体(图 2 - A) , 每个单体含一个 c 型和一个 d₁ 型血红素^[13]。光谱分析证明, NO₂⁻ 结合位点为血红素 d₁ 中的 Fe²⁺^[14]。另一种为 Cu 型 Nir, 分子量约36 kDa, 系同型三聚体, 每个亚单位(图 2-B) 含两个铜原子。亚单位上的两个铜原子组成 I 型(蓝色) 铜活性中心和 II 型

(非蓝色)铜活性中心^[15-16]。I型铜被认为是电子由供体流向 NO_2^- 还原酶的入口^[14]。II型铜被认为是 NO_2^- 的催化中心^[17]。除了能将 NO_2^- 还原为NO外,Cyt cd₁型和Cu型Nir还能将氧还原成水^[18-19]。Cyt cd₁型Nir对 NO_2^- 的半饱和常数 K_m 为800 μM ,Cu型Nir对 NO_2^- 的 K_m 为74 μM ^[22]。Cyt cd₁型Nir和Cu型Nir一般不共存于同一菌体中。

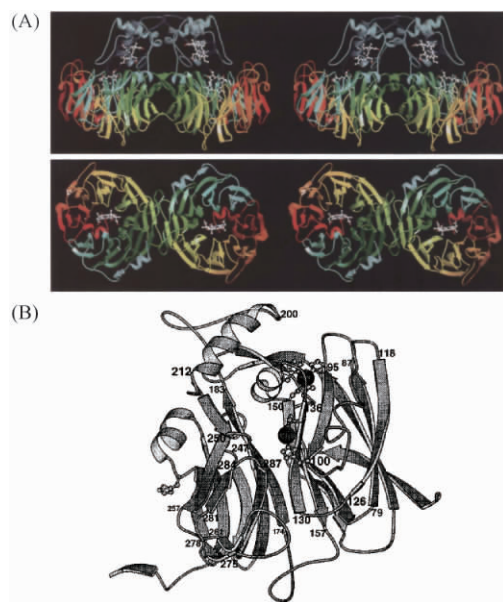


图2 Nir结构图

Fig.2 The structure of Nir. A: Cyt cd₁-type Nir^[20]; B: Copper-Nir. ^[21].

2.2 联氨生成

催化 N_2H_4 生成反应($\text{NH}_4^+ + \text{NO} + 2\text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{H}_4 + \text{H}_2\text{O}$)的酶是HH。该酶是厌氧氨氧化的关键酶之一,为AAOB所特有^[4]。

基因组研究表明:*K. stuttgartiensis*中共有8个编码HH的基因(*kuste2854-kuste2861*)^[4]。HH由多个细胞色素和一个β螺旋桨复合体(beta-propeller complex)组成。其中β螺旋桨复合体(图3)是催化位点,细胞色素主要负责电子传递^[4 23]。Karlsson等人^[24]采用LP-MS/MS方法,从厌氧氨氧化体中成功分离了组成HH的3个蛋白质,即Kuste2859、Kuste2860和Kuste2861。其中,Kuste2860和Kuste2861为血红素二聚体,Kuste2859和Kuste2861形成β螺旋桨复合体。迄今为止,HH还未被分离纯化。

Jetten等人认为,HH的结构类似于反硝化菌的

N_2O 还原酶结构^[4 24]。 N_2O 还原酶^[26](图4)分子量约130 kDa,系同型二聚体,每个单体含有一个铜氧还蛋白结构域和一个β螺旋桨复合体结构域。铜氧还蛋白结构域内的 Cu_A 活性中心能接受电子供体传递的电子。β螺旋桨结构域的 Cu_Z 活性中心是 N_2O 的还原位点。

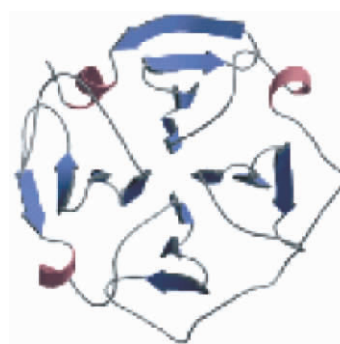


图3 β螺旋桨复合体结构^[25]

Fig.3 The structure of β-propeller complex.

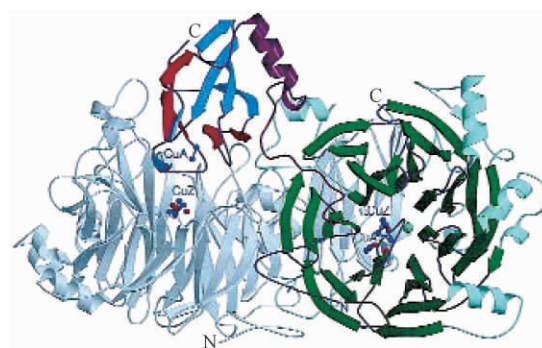


图4 N_2O 还原酶单体的结构^[26]

Fig.4 The structure of N_2O reductase monomer.

2.3 氮气生成

根据图1所示的AAOB代谢途径,HZO可将 N_2H_4 转化成 N_2 ($\text{N}_2\text{H}_4 \rightarrow \text{N}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$)。Shimamura等人从AAOB富集培养物中分离纯化了一个HZO^[27]。该酶分子量为130 kDa,系同型二聚体,每个亚单位含8个血红素。采用连二亚硫酸盐还原光谱分析证明, N_2H_4 结合在该酶的细胞色素 P_{472} 上。该酶仅能转化 N_2H_4 ,最大转化速率 V_{\max} 和半速率常数 K_m (以蛋白计)分别为 $6.2 \pm 0.3 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 和 $5.5 \pm 0.6 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。

研究发现,HAO亦能将 N_2H_4 转化成 N_2 ($3\text{N}_2\text{H}_4 \rightarrow 4\text{NH}_4^+ + \text{N}_2$)^[28]。该酶分子量为183 kDa,系三聚体,共含26个血红素,基质的结合部位为细胞色素

P_{468} 。该酶不仅能转化 N_2H_4 , 还能转化 NH_2OH 、 NO 和 NO_2^- 。HAO(以蛋白计)氧化 N_2H_4 的 V_{max} 和 K_s 分别为 $1.1 \mu mol/(min \cdot mg)$ 和 $18 \mu M$ 。

2.4 亚硝酸盐氧化

催化 NO_2^- 氧化 ($NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e^-$) 的酶为 Nar。基因组研究表明: *K.*

Stuttgartiensis 中存在 15 个编码 Nar 的基因 (*kustd1699-kustd1713*)。这些基因分别编码了 NarG、NarH、FeS 中心和血红素等^[2,4]。*K. stuttgartiensis* 的 Nar 对亚硝酸盐的氧化活性为 $42 nmol/(min \cdot mg)$ (以蛋白计)^[4]。迄今为止,人们还未从 AAOB 中分离出 Nar。

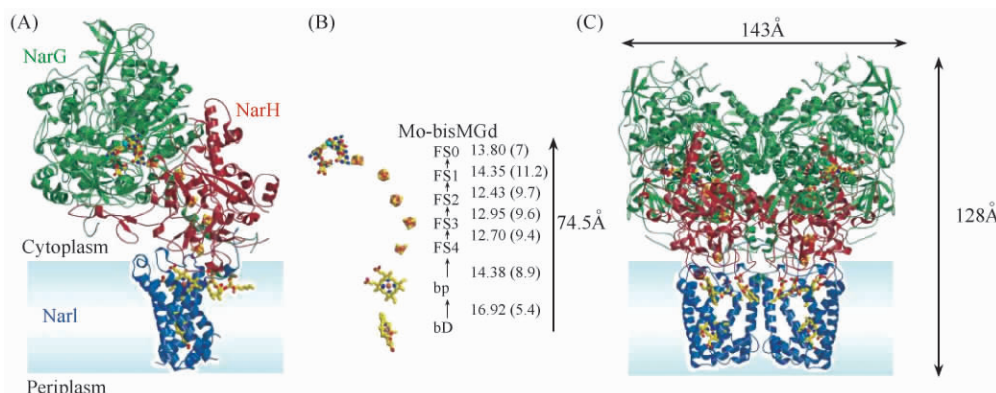


图5 *E. Coli* 的 NarGHI 结构^[31]

Fig.5 Over all structure of *E. Coli* NarGHI. A: NarGHI viewed parallel to the membrane; B: Redox cofactor of NarGHI in the same orientation as in A; C: NarGHI dimer viewed parallel to the membrane and rotated 90° from A.

NO_2^- 氧化是 NO_3^- 还原的逆反应。在 *P. denitrificans* 中, Nar 催化 NO_3^- 还原反应, 该酶分子量约 448 kDa, 系异型三聚体^[29] (图 5), 由 NarG (含 Mo 催化中心)、NarH (几个 [4Fe-4S] 和 1 个 [3Fe-4S])、NarI (血红素 bD 和 bP) 3 种亚单位组成。其中, NarG 和 NarH 呈球状, NarI 横跨细胞膜^[6,30]。NarG 的 Mo 原子为 NO_2^- 结合位点。

3 能量转化

AAOB 生长所需的能量主要来自 ATP。研究表

明, AAOB 可能通过氧化磷酸化将 NH_4^+ 和 NO_2^- 反应产生的能量转移至 ATP 中^[2,4]。

3.1 电子传递链

在线粒体内膜上的电子传递链 (图 6) 中, 复合体 I 和复合体 II 分别接受 NADH 和琥珀酸的电子, 经辅酶 Q 传递给复合体 III, 再经细胞色素 c 传递给复合体 IV, 最终经复合体 IV 传递给氧。复合体 I、复合体 III 和复合体 IV 每传递 1 对电子, 分别从膜内向膜外排出 4、4 和 2 个 H^+ , 在线粒体膜两侧形成质子梯度和电势梯度, 驱动 ATP 合成。

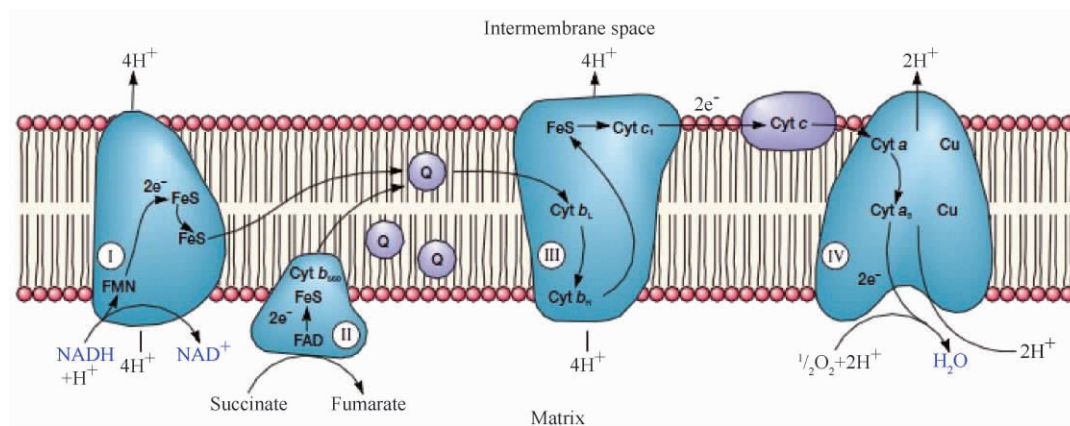


图6 线粒体的电子传递链^[32]

Fig.6 Electron transfer chain of mitochondria.

AAOB 中的电子传递链如图 1 所示, N_2H_4 释放的 4 个电子, 经细胞色素 c 传递给辅酶 Q, 再经辅酶 Q 传递给细胞色素 bc_1 复合体(相当于线粒体电子传递链的复合体 III), 最后经细胞色素 bc_1 复合体传递, 将 1 个电子用于亚硝酸盐还原, 3 个电子用于 N_2H_4 合成。据 Jetten 等人推测, 细胞色素 bc_1 复合体每传递 4 个电子, 将 4 个 H^+ 排至 anammoxosome 膜外侧, 建立质子梯度及电势梯度, 以驱动 ATP 合成^[2, 4]。

3.1.1 细胞色素 c: 基因组研究发现, *K. stuttgartiensis* 中存在大量含有血红素和 FeS 中心结合位点的小分子蛋白(以细胞色素 c 为主)^[4], 但在 HZO 基因中未发现编码辅酶 Q 结合位点的序列。细胞色素 c 超氧化酶染色试验发现: AAOB 菌中的细胞色素 c 与厌氧氨氧化体紧密结合, 主要分布于厌氧氨氧化体膜内侧距膜 150 nm 的狭窄范围内^[2, 9]。据此, 研究者推测细胞色素 c 是厌氧氨氧化电子传递链的中间媒介^[33-34]。细胞色素 c^[25](图 7-A) 的分子量约 13 kDa, 仅由 1 个亚单位组成, 其辅基是血红素, 电子结合位点是 Fe 原子。Irina 等人已从厌氧氨氧化富集培养物中分离到一个分子量约 10 kDa 细胞色素 c^[35]。

3.1.2 辅酶 Q: 基因组研究发现, *K. stuttgartiensis* 中存在多个编码辅酶 Q 合成酶的关键基因^[4]。据

此, Strous 等人认为, 在 AAOB 中, 辅酶 Q 从细胞色素 c 接受电子, 再将电子传递给细胞色素 bc_1 复合体。辅酶 Q(图 7-B), 也称泛醌, 是一个常见的电子传递体。辅酶 Q 可接受 1 个电子形成半醌($QH\cdot$), 再接受 1 个电子形成氢醌(QH_2)。

3.1.3 细胞色素 bc_1 复合体: *K. stuttgartiensis* 中存在一套完整地编码细胞色素 bc_1 复合体的基因(*kustd1480 - kustd1485*), 分别编码了 [2Fe-2S] 中心、细胞色素 b_6 和细胞色素 c^[4]。Jetten 等认为, 在 AAOB 中, 细胞色素 bc_1 复合体从辅酶 Q 接受电子, 并将电子转给细胞色素 c^[2]。迄今为止, AAOB 的细胞色素 bc_1 复合体尚未分离纯化。细胞色素 bc_1 复合体^[25](图 7-C) 的分子量约 250 kDa, 系同型二聚体。每个单体由 11 个亚单位组成。3 个功能基团分别为细胞色素 b(血红素 b_L 和 b_H)、Fe-S 蛋白([2Fe-2S] 中心) 和细胞色素 c_1 (血红素)^[25]。细胞色素 bc_1 复合体中的电子流为: $QH_2 \rightarrow$ 细胞色素 b($b_L \rightarrow b_H$) \rightarrow Fe-S 蛋白 \rightarrow 细胞色素 $c_1 \rightarrow$ 下游电子载体^[32]。细胞色素 bc_1 有两种构像, 一种是 [2Fe-2S] 中心, 靠近细胞色素 b, 另一种是 [2Fe-2S] 中心, 靠近细胞色素 c_1 , 通过两种构像互相转换完成电子传递^[25]。细胞色素 bc_1 每转移 1 对电子从膜内往膜外泵出 2 个 H^+ 。

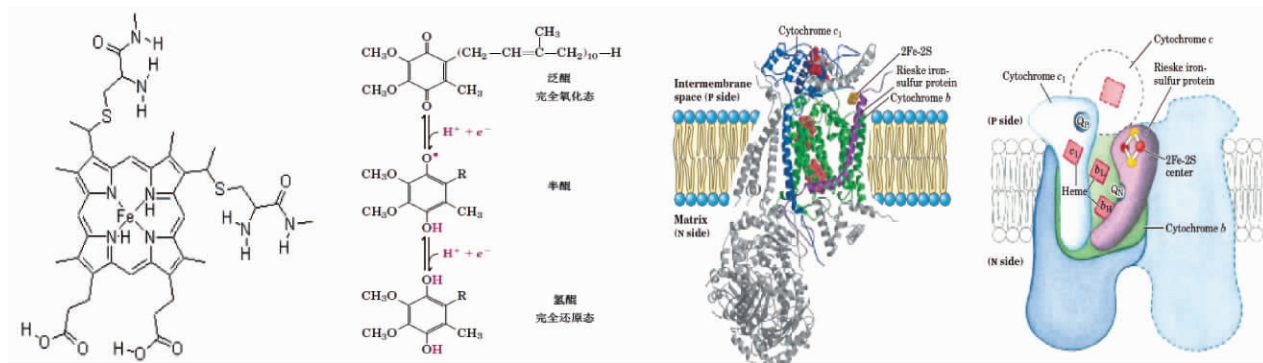


图 7 AAOB 的电子传递链中的电子传递体

Fig. 7 The electron carriers of electron transfer chain of AAOB. A: Cytochrome c; B: Coenzyme Q^[25]; C: Cytochrome bc_1 complex^[25].

3.2 ATP 的合成

基因组研究发现, *K. stuttgartiensis* 中存在一套完整地编码 F_0F_1 型 ATP 合成酶的基因(*kuste4592 - kuste4600*)^[4]。到目前为止, AAOB 的 ATP 合成酶尚未分离纯化。

ATP 合成酶(图 8)可分为 F_1 (头部) 和 F_0 (质子

通道)两大部分。 F_1 由 5 种不同的多肽组成, 结构形式为 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, 其主要功能是引起 ADP + Pi 与 ATP 之间的互相转化; F_0 由 3 种多肽组成, 结构形式为 ab_2c_{12} , 其主要功能是作为质子通道。质子通过 F_0 由细胞膜外流入细胞膜内, 推动 ATP 合成, 能量转化效率为每消耗 4 个质子合成 1 个 ATP。

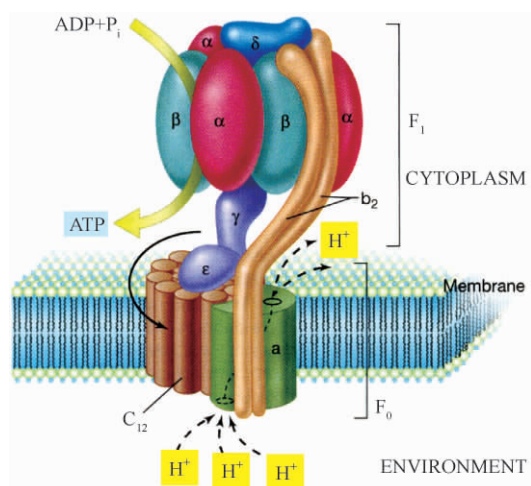
图8 ATP合成酶的结构和功能^[36]

Fig.8 The structure and function of ATP synthetase.

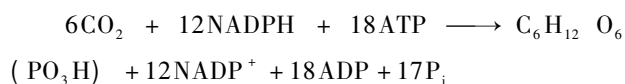
4 CO₂ 的同化

自养型微生物固定碳素的途径主要有4种: 卡尔文循环(Calvin Cycle)、反向三羧酸循环(Rreverse Tricarboxylic Acid Cycle)、还原性乙酰-CoA途径(Reductive acetyl-CoA Pathway)(下简称acetyl-CoA途径)和3-羟基丙酸途径(3-Hydroxypropionate Pathway)。研究表明,AAOB可能通过卡尔文循环^[10]或acetyl-CoA途径固定CO₂^[4,10]。

4.1 卡尔文循环

卡尔文循环如图9所示。通过卡尔文循环,消耗18个ATP和12个NADPH,固定6个CO₂,产生1个6-磷酸果糖。6-磷酸果糖参与细胞合成代谢,被转化成各种细胞物质。

卡尔文循环的总反应式如下:

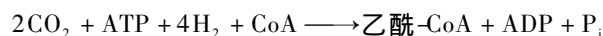


在卡尔文循环中,1,5-二磷酸核酮糖羧化酶和磷酸核酮糖激酶是两个关键酶。

4.2 Acetyl-CoA 途径

基因组研究发现,*K. stuttgartiensis*中存在一条完整的乙酰-CoA固碳途径^[2,4]。*K. stuttgartiensis*中,乙酰-CoA途径的关键酶一氧化碳脱氢酶和甲酸脱氢酶的活性分别为3.4 nmol/(min·mg)(以蛋白计)^[4]。迄今为止,AAOB乙酰-CoA途径中的关键酶均未分离纯化。

Acetyl-CoA途径如图10所示。通过乙酰-CoA途径,消耗1个ATP、4个H₂和1个CoA,固定2个CO₂,形成1个乙酰-CoA。乙酰-CoA再通过糖异生/糖酵解途径和三羧酸循环参与细胞的合成代谢,转化成细胞物质。乙酰-CoA的总反应式如下:



在Acetyl-CoA途径中,四氢叶酸依赖型酶、一氧化碳脱氢酶(CODH)和乙酰-CoA合成酶(ACS)是3个关键酶。

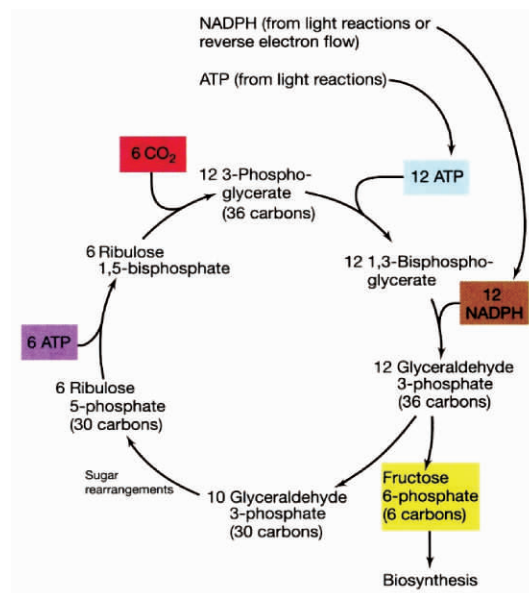
图9 卡尔文循环^[36]

Fig.9 Calvin cycle.

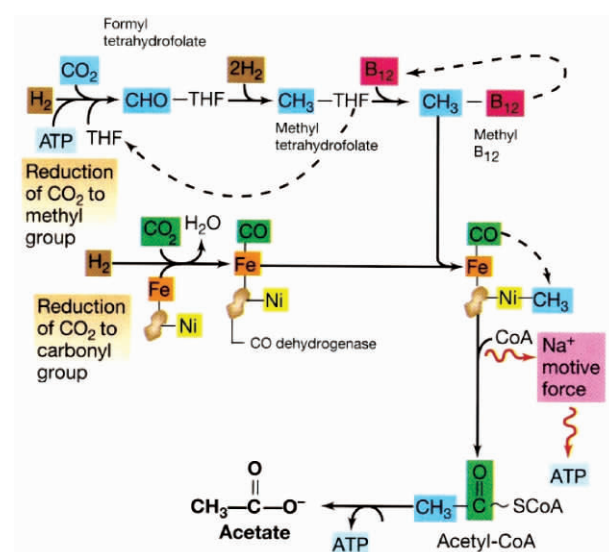
图10 自养型产乙酸菌的acetyl-CoA途径^[36]

Fig.10 The acetyl-CoA pathway of Autotrophic acetogenic bacteria.

4.3 还原力形成

检测表明, *K. stuttgartiensis* 基因组中存在编码 NADH: 辅酶 Q 氧化酶(复合体 I)、NADH: 氢醌氧化酶以及甲酸盐: 氢醌氧化酶复合体的基因。据此, Strous 等人推测, AAOB 固定碳素的还原力来自 NADH 或者 $\text{QH}_2^{[2]}$ 。

目前, 有关 AAOB 中还原力的详细形成途径尚不清楚, 但从基因组分析看, 它们可能存在如下途径: 亚硝酸盐氧化中释放 2 个电子, 细胞色素 c 接受这 2 个电子并将其传递给辅酶 Q, 辅酶 Q 再将接受的 2 个电子直接用于 CO_2 固定, 或先由 NADH: 氢醌氧化酶用于合成 NADH, 再将 NADH 用于 CO_2 固定。

5 问题和展望

厌氧氨氧化的研究和应用, 不仅推动了生物脱氮技术的发展, 而且丰富了微生物学内容, 加深了人们对氮素循环的认知。AAOB 是厌氧氨氧化的执行者, 其生长代谢特性直接关系着氮素转化的效能。基于酶学研究、基质转化和基因组学分析, Strous 等人初步绘出了 AAOB 物质代谢和能量代谢的框架图, 为 AAOB 代谢的深入研究提供了指南。但因 AAOB 生长极慢, 至今尚未获得纯培养物, 严重限制了 AAOB 代谢途径的实验证明。AAOB 纯培养和关键酶分离, 已成为该领域今后工作的重要任务。

参考文献

- [1] van de Graaf AA, Mulder A, de Bruijn P, Jetten MS, Robertson LA, Kuenen JG. Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1246-1251.
- [2] Jetten MSM, Niftrik LV, Strous M, Kartal B, Keltjens JT, Op den Camp HJM. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 44(2-3): 65-84.
- [3] Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles (vol 437, pg 349, 2005). *Nature*, 2005, 438(7064): 122-122.
- [4] Strous M, Pelletier E, Mangenot 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, Me´ digue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Opden 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, Paslier DL. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, 440(7085): 790-793.
- [5] Jetten MSM, Wagner M, Fuerst J, van Loosdrecht M, Kuenen G, Strous M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (‘anammox’) process. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(3): 283-291.
- [6] 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术. 北京: 科学出版社, 2004: 1-20.
- [7] Shimamura AM, 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. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73(4): 1065-1072.
- [8] Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, Toyomoto T, Kawahara Y, Furukawa K, Fujii T. Another multiheme protein, hydroxylamine oxidoreductase, abundantly produced in an anammox bacterium besides the hydrazine-oxidizing enzyme. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2008, 105(4): 432-432.
- [9] Van Niftrik L, Geerts WJC, Van Donselaar EG, Humbel BM, Webb RI, Fuerst JA, Verkleij AJ, Jetten MSM, Strous M. Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome c proteins. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 708-717.
- [10] Schouten S, Strous M, Kuypers MMM, Rijpstra WIC, Baas M, Schubert CJ, Jetten MSM, Damste JS. Stable carbon isotopic fractionations associated with inorganic carbon fixation by anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3785-3788.
- [11] Hu AH, Zheng P, Mahmood Q, Zhang L, Shen LD, Ding S. Characteristics of nitrogenous substrate conversion by anammox enrichment. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 536-542.
- [12] Kostera J, Youngblut MD, Slosarczyk JM, Pacheco AA. Kinetic and product distribution analysis of NO center dot reductase activity in *Nitrosomonas europaea* hydroxylamine oxidoreductase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13: 1073-1083.
- [13] Tiedje JM. Ecology of denitrification and dissimilatory

- nitrate reduction to ammonium. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Zehnder AJB (ed), John Wiley & Sons, New York, 1988. 179-244.
- [14] Ferguson SJ. Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1994, 66(1-3): 89-110.
- [15] Godden JW and Turley Ws, Teller DC, Adman ET, Liu MY, Payne WJ, LeGall J. The 2, 3 Ångström X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science*, 1991, 253(5018): 438-442.
- [16] Fenderson FF, Kumar FS, Adman ET, Liu MY, Payne WJ, LeGall J. Amino acid sequence of nitrite reductase: a copper protein from *Achromobacter cycloclastes*. *Biochemistry*, 1991, 30(29): 7180-7185.
- [17] Howes BD, Abraham Z, Abraham DJL, Thomas B, Robert RE, Barry ES. EPR and electron-nuclear double-resonance (ENDOR) studies show nitrite binding to the type 2 copper centers of the dissimilatory nitrite reductase of *Alcaligenes xylosoxidans* (NCIMB110157). *Biochemistry*, 1994, 33(11): 3171-3177.
- [18] Timkovich R, Robinso MK. Evidence for water as the product for oxygen reduction by cytochrome cd_1 . *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 88: 649-655.
- [19] Masuko M, Iwasaki H, Sakurai T, Suzuki S, Nakahara A. Characterization of Nitrite Reductase from a Denitrifier, *Alcaligenes* Sp. NCIB 11015. A Novel Copper Protein. *Journal of Biochemistry*, 1984, 96(2): 447-454.
- [20] Vilmos F, James WBM, Stuart JF, Hajdua J. The anatomy of a bifunctional enzyme Structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd_1 . *Cell*, 1995, 81(3): 369-377.
- [21] Elinor T, Adman JW, Godden, Stewart T. The Structure of Copper-nitrite Reductase from *Achromobacter cycloclastes* at Five pH Values, with NO_2^- Bound and with Type II Copper Depleted. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(46): 27458-27474.
- [22] Sann R, Kostka S, Friedrich B. A cytochrome cd_1 -type nitrite reductase mediates the first step of denitrification in *Alcaligenes eutrophus*. *Archives of Microbiology*, 1994, 161(6): 453-459.
- [23] Baker SC, Saunders NFW, Willis AC, Ferguson SJ, Hajdu J, Fülöp V. Cytochrome cd_1 Structure: Unusual Haem Environments in a Nitrite Reductase and Analysis of Factors Contributing to b-Propeller Folds. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 271(2): 294-295.
- [24] Karlsson R, Karlsson A, Backman O, Johansson BR, Hulth S. Identification of key proteins involved in the anammox reaction. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 297(1): 87-94.
- [25] Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry* (Fourth Edition). New York: W. H. Freeman, 2005.
- [26] Brown K, Tegoni M, Prudencio M, Pereira AS, Besson S, Mouram JJ, Moura I, Cambillau C. A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(3): 191-195.
- [27] 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. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1065-1072.
- [28] Schalk J, Oustad H, Kuenen JG, Jetten MSM. The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 158(1): 61-67.
- [29] Shapleigh JP. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Database for Microbiological Community*. 3rd eds. New York: Springer-Verlag, 2001.
- [30] Steward V. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in *enterobacteria*. *Microbiological Reviews*, 1988, 52(2): 190-232.
- [31] Bertero MG, Rothery RA, Palak M, Hou C, Lim D, Blasco F, Weiner JH, Strynadka NCJ. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase. *Nature Structure Biology*, 2003, 10(9): 681-687.
- [32] Lansing MP, John PH, Donald AK. *Microbiology*. 5th eds. New York: McGraw-Hill Companies, 2002.
- [33] Cirpus IE, de Been M, Op den Camp HJM, Strous M, Le PD, Kuenen GJ, Jetten MSM. A new soluble 10 kDa monoheme cytochrome c-552 from the anammox bacterium *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 252: 273-278.
- [34] Huston WM, Harhangi HR, Leech AP, Butler CS, Jetten MSM, Op den Camp HJM, Moir JWB. Expression and characterisation of a major c-type cytochrome encoded by gene *kuste0563* from *Kuenenia stuttgartiensis* as a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2007, 51(1): 28-33.
- [35] Cirpus IEY, Geerts W, Hermansa JHM, Op den Camp HJM, Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM. Challenging protein purification from anammox bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 39(1-3): 88-97.
- [36] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms* (10th edition). Prentice Hall: Pearson Education, Inc. 2002.

Central metabolism of anammox bacteria—A review

Huifeng Lu, Shuang Ding, Ping Zheng*

Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Anaerobic ammonium oxidation (anammox) is a biological process by which ammonium is oxidized to dinitrogen gas by using nitrite as the electrons acceptor. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria play an important role in nitrogen removal from wastewater and global N-cycle. The study of metabolism of anammox bacteria will help us understand the anammox mechanism and develop anammox biotechnology. Anammox bacteria are chemoautotrophic bacteria that use CO_2 or HCO_3^- as carbon source and obtain their energy from the conversion of ammonium and nitrite into dinitrogen gas. Hydrazine has been detected as an intermediate in the anammox pathway, while hydroxylamine and nitric oxide have not been detected yet. The genomic data indicate that anammox bacteria fix carbon dioxide through acetyl-CoA pathway. The proposed anammox pathway is consistent with the available experimental data, thermodynamical calculation and biochemical determination and as well as the Ockham's razor principal.

Keywords: anammox bacteria, nitrogen metabolism, energy conversion, carbon dioxide fixation

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the High-tech Research and Development Program of China(2009ZZ06311) and by the National Natural Science Foundation of China (31070110)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-88982819; E-mail: pzheng@zju.edu.cn

Received: 16 January 2011/Revised: 9 April 2011

《微生物学报》声明

《微生物学报》根据举报人提供的情况,经进一步调查核实,确认李宗军发表在《微生物学报》2005年45卷3期426—430页的论文“大肠杆菌生长温度、膜脂肪酸组成和压力抗性之间的关系”明显地抄袭 B. M. Mackey 等人的文章“Role of Membrane Fluidity in Pressure Resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164”(*Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 5965–5972)。

为了加强我国科技界精神文明建设、提高科技工作者学术道德水平、保护我国科学研究成果的知识产权和维护《微生物学报》的声誉,本刊依照我国相关法律规定、参照“全国性学会科技期刊道德公约”,经本刊编委会讨论后做出如下决定:

1. 李宗军抄袭 B. M. Mackey 等人的文章事实确凿,决定撤消其发表在《微生物学报》2005年45卷3期426—430页的研究论文;
2. 在《微生物学报》的纸质版和网页上发布撤消该论文的声明;
3. 《微生物学报》今后将不再受理该作者的任何投稿。

在此,《微生物学报》再次声明,任何人发给本刊的投稿,严禁抄袭和剽窃他人的研究结果。一旦发现,本刊必将追究作者的责任,并给予严厉处罚。

《微生物学报》编委会

2011年7月19日