



专论与综述

厌氧氨氧化细菌 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 铁的吸收利用研究进展

董子阳¹ 胡宝兰^{*1} 韩佳慧^{*2}

1 浙江大学环境与资源学院 浙江 杭州 310058

2 中国环境科学学会 北京 100082

摘要: 铁是影响微生物生长代谢的关键元素, 它与蛋白质结合, 起催化、氧化还原或调节作用。厌氧氨氧化(ANAMMOX)细菌的生长代谢严重依赖铁, 尤其是含铁蛋白。ANAMMOX 细菌的厌氧生活方式和厌氧氨氧化体的存在使其对铁代谢的模式不同于其他微生物。弄清 ANAMMOX 细菌的铁吸收代谢模式, 可为获得其纯培养物奠定基础, 有利于促进其在环境领域中的应用。在这里, 我们将现有铁吸收、利用和代谢的观点、与 ANAMMOX 细菌的基因组信息和有限的生化生理数据结合起来, 提出 ANAMMOX 细菌可能的铁利用途径, 为后续的生理生化研究提供参考。

关键词: 厌氧氨氧化菌, 铁, 铁代谢, 铁蛋白

Research progress in the uptake and utilization of iron by the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*

DONG Ziyang¹ HU Baolan^{*1} HAN Jiahui^{*2}

1 College of Environmental & Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

2 Chinese Society For Environmental Sciences, Beijing 100082, China

Abstract: Iron is a key element that influences microbial growth and metabolism by binding to proteins and acting as a catalyst, redox or regulator. The growth metabolism of anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) bacteria is highly dependent on iron, especially iron-containing proteins. The anaerobic lifestyle of ANAMMOX bacteria and the presence of anammoxosome make their pattern of iron metabolism different from that of other microorganisms. Clarification of the pattern of iron uptake metabolism of ANAMMOX bacteria could provide the basis for obtaining their pure cultures and facilitate their application in the environmental field. Here, we combine existing views on iron uptake, utilization, and metabolism with genomic information and limited biochemical and physiological data of ANAMMOX bacteria to propose possible iron utilization pathways of ANAMMOX bacteria for subsequent physiochemical and biochemical studies.

Keywords: ANAMMOX bacteria, iron, iron metabolism, ferritin

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (41773074)

***Corresponding authors:** E-mail: HU Baolan: blhu@zju.edu.cn; HAN Jiahui: hanjiahui1984@163.com

Received: 31-07-2020; **Accepted:** 21-10-2020; **Published online:** 09-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(41773074)

***通信作者:** E-mail: 胡宝兰: blhu@zju.edu.cn; 韩佳慧: hanjiahui1984@163.com

收稿日期: 2020-07-31; **接受日期:** 2020-10-21; **网络首发日期:** 2021-04-09

铁是生物系统中最丰富的过渡金属,在氧化还原、电子转移反应和调控过程中起着重要的辅助作用。铁既能与碳、氧、硫和氮形成络合物,又能形成具有广泛的氧化还原电位的铁蛋白(-700 mV 到+350 mV)^[1],使其参与了所有的生物地球化学循环。大多数铁依赖的氧化还原蛋白含有血红素,并以铁硫(Fe-S)团簇^[1]的形式存在。具有丰富的铁、硫和含血红素蛋白的细菌和古生菌,通常具有代谢多种底物的能力^[1-2]。ANAMMOX 细菌就是这样,它在无氧的情况下以亚硝酸盐作为最终电子受体氧化铵^[3-4]。*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 的基因组编码了约 60 种 *c* 型细胞色素^[5-9],其至少占总蛋白质质量的 50%。与每个细胞含有 10^5 – 10^6 个铁原子的大肠杆菌细胞相比^[10-11],每个 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 细胞约含有 10^7 个铁原子。ANAMMOX 培养物的鲜红色也反映了胞内高含量的细胞色素 *c*。ANAMMOX 细菌是浮霉菌目 (*Planctomycetales*) 的厌氧氨氧化菌科 (*Anammoxaceae*) 内的一类厌氧革兰氏阴性细菌,具有一个分隔的细胞结构。除了含有多肽聚糖的细胞壁^[12]和细胞质膜外,它们还拥有第三层膜,这层膜就是厌氧氨氧化体膜,厌氧氨氧化体是一种独特的能量转化细胞器,占据了细胞 70% 的空间^[13-14]。厌氧氨氧化体中细胞内营养物质和基质的运输机制以及蛋白质分类目前还比较模糊。ANAMMOX 细菌广泛存在于不同的自然生境中,且有机碳和无机氮是影响 ANAMMOX 细菌分布的主要因素^[15-17]。厌氧氨氧化体含有大量的 Fe-S 蛋白和血红素细胞色素^[4],它们参与了氨氧化为氮气的过程。首先,亚硝酸盐在含 2 个血红素的亚硝酸还原酶(NirS)的作用下被还原为一氧化氮,接着含 4 个血红素的联氨合成酶催化一氧化氮与氨的缩合生成联氨^[18-19]。随后含 16 个血红素的联氨脱氢酶将联氨氧化为氮气^[20],该反应释放 4 个电子并通过厌氧氨氧化体膜,通过一系列的电子传递形成了膜电位。然后,电子返回厌氧氨氧化体,为

ANAMMOX 反应的前两步提供能量,并结束了电子转移循环。最后,通过亚硝酸盐氧化还原酶(Nitrite Oxidoreductase, NXR)的催化,亚硝酸盐被氧化为硝酸盐。此外,铁还参与合成超氧化物歧化酶和细胞色素 *c* 过氧化物酶的合成,使 *Candidatus Brocadia* 免受由于氧气导致的自由基和过氧化氢的危害^[21]。

铁对 ANAMMOX 细菌的生长和活性有积极的影响,将反应器中 Fe^{2+} 的浓度从 0.03 mmol/L 增加到 0.09 mmol/L,有利于血红素的合成并加速 ANAMMOX 细菌的生长^[22]。随着反应器中 Fe^{2+} 浓度从 0.03 mmol/L 增加到 0.09 mmol/L,ANAMMOX 细菌的生长速率增加,ANAMMOX 反应器的启动时间大大缩短,并能促进细胞色素 *c* 的合成并提高连氨脱氢酶(Hydrazine Dehydrogenase, HDH)的活性^[23]。 Fe^{2+} 的添加通过降低 PN/PS 比改善了污泥的疏水性,还增加了 ANAMMOX 细菌颗粒直径,提高了 ANAMMOX 反应器中的氮去除能力^[24]。添加 5 mg/L 的 Fe^{3+} 能够加快海洋 ANAMMOX 细菌的生长速度,并使其在反应器中的丰度由 17% 提高到 27%^[25]。在厌氧氨氧化(Anaerobic Ammonium Oxidizing, ANAMMOX)与反硝化厌氧甲烷氧化(Denitrification Dependent Anaerobic Methane Oxidation, N-DAMO)的耦合体系中,160 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} 可使 ANAMMOX 细菌 *Candidatus Brocadia* 获得竞争优势^[26],但人们至今并不清楚 ANAMMOX 细菌中铁的具体吸收代谢机制。在这篇综述中,我们以 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 为例,把模式微生物的用于铁吸收和代谢的蛋白质系统与 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 基因组预测相结合,简要讨论 ANAMMOX 细菌的铁呼吸及其将铁离子从细胞外转运进细胞质然后进入厌氧氨氧化体内部的过程,特别讨论了其特殊的细胞结构和厌氧氨氧化体内部的富铁纳米颗粒。

1 铁的代谢

铁的自然丰度及其氧化还原特性使它成为微

生物异养呼吸和自养生长的电子受体或供体。在前一种情况下,有机化合物的氧化与胞外三价铁的还原相结合;而在后一种情况下,铁的氧化将电子提供给氧、碳酸氢盐或硝酸盐。这些过程由 *c* 型细胞色素参与,并由多种微生物完成。*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 可将甲酸盐氧化与铁还原相结合^[5,27-28],并能进行硝酸盐依赖的铁氧化^[29]。

1.1 Fe^{3+} 的还原

Fe^{3+} 的还原涉及胞外电子传递,即电子从细胞质膜上的醌(Quinone, Q)池通过外膜转移到细胞外的铁矿物质^[30-32]。这个过程中重要的成分是膜醌(Ubihydroquinone, QH_2)脱氢酶,该酶位于细胞质膜上,并以其丰富的细胞色素结构域延伸至周质(例如 *Shewanella* 中的 CymA 和 *Geobacter* 中的 ImcH 或 CbcL)。电子转移到多血红素蛋白是由外膜桶蛋白或可溶性周质细胞色素介导^[33],或通过直接相互作用发生的^[34]。最终,电子通过可溶物质如黄素^[35]、纳米线^[36]等附属物或直接接触到达不溶性胞外矿物。 Fe^{3+} 偶联甲酸盐氧化还原已被报道用于 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 细菌^[5,28]。它们表达与 CymA 同源的膜 QH_2 脱氢酶,但有 11 个而不是 4 个血红素结合位点,2 个与 *Shewanella*-MtrA 同源的周质多血红素蛋白和至少一个外膜-桶状孔蛋白^[37]。虽然 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*-CymA 和 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*-MtrA 之间可以通过直接接触发生电子转移,但不能排除可溶性 *c* 型细胞色素的电子转移。一旦出了细胞,铁颗粒的还原是如何进行的目前并不清楚。此外,细胞内有机酸的氧化和细胞外铁的还原是如何与能量守恒相联系仍然是一个谜。

1.2 Fe^{2+} 的氧化

与铁还原作用相比,生物铁氧化作用的分子机制尚不清楚。在铁氧化的电子受体方面,除了微氧环境中的电子受体氧和光能自养型细菌的电子受体碳酸氢盐外,硝酸盐被认为是铁氧化过程中另一个可能的电子受体^[38-39]。

Candidatus Kuenenia stuttgartiensis 就表现出了硝酸盐依赖的铁氧化^[5,29]。催化硝酸盐还原(NXR)的唯一候选位点仅位于厌氧氨氧化体^[40]中,这需要 Fe^{2+} 被导入厌氧氨氧化体中,或者 Fe^{2+} 的电子穿过细胞质膜、细胞质和厌氧氨氧化体膜。在第一种情况下, Fe^{3+} 的输出可能很困难,而在第二种情况下,从反应中获得的自由能似乎不足以驱动电子在 2 层膜上的转移。因此目前并没有很好的解释。此外,细胞内不溶性氧化铁的形成和生物、非生物铁的氧化还原也是研究的潜在干扰^[41]。

2 铁的吸收与储存

尽管铁是地壳中第四大元素,但自然界中的铁大多以氧化态或氢氧化态的形式存在而溶解度极低,因此微生物进化出了多种机制来从环境中吸收铁^[42]。一个典型的例子是分泌铁载体来获取铁:一种使铁溶解并促进其吸收的有机铁螯合剂^[42-45]。ANAMMOX 细菌生活在缺氧的环境中,不具备合成铁载体所需的基因^[5-9]。可溶性亚铁被认为是可通过外膜孔道自由扩散到周质。虽然存在几种非特异性的二价金属离子转运蛋白,但目前已知只有 2 种机制专门将 Fe^{2+} 转运到细胞质中(即铁离子转运蛋白) EfeUOB 和 FeoABC^[46-47]。FeoABC 系统广泛分布于细菌中,是 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 基因组中发现的唯一铁摄取系统。虽然推测 FeoA 和 FeoC 可以增强铁的摄取^[46],但 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 细菌仅携带有编码铁转运蛋白 FeoB 的基因(图 1)。在参与调控 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 细菌的铁摄取和稳态方面, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 细菌可能存在与厌氧代谢相关的通用转录调节因子富马酸盐和硝酸还原酶(Fumarate and Nitrate Reductase, Fnr)^[48],以及金属特异性调节因子铁摄取调节因子(Ferric Uptake Regulator, Fur)^[49],但目前缺乏详细的分析与验证,同时目前也没有关于 Fe^{3+} 吸收和血红素吸收通路的报道。铁转运进 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 和 *Candidatus*

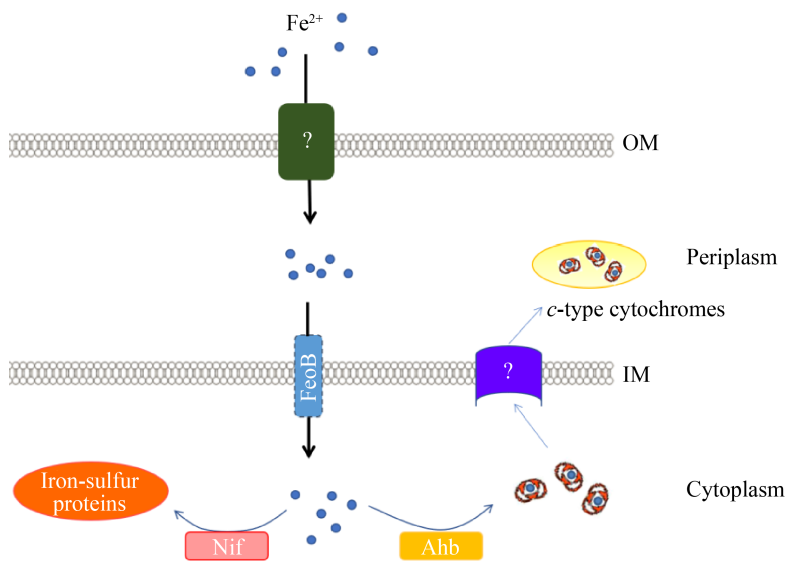


图1 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 的铁吸收代谢途径

Figure 1 Iron absorption and metabolic pathways in *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*

Brocadia fulgida 细胞内后,这2种细菌会在厌氧氨氧化体内部会形成直径16–25 nm的富铁粒子^[13],其作为可能的铁储存场所,是由细菌储铁蛋白形成的,这些颗粒是含有大量氧化铁的球形中空蛋白复合物(每个复合物含有2 000个铁原子)。然而,人们目前并不清楚这些储铁蛋白是如何转运进厌氧氨氧化体内部的。最近发现的胶囊蛋白^[50–51]可能为观测到的富铁粒子提供了解释。胶囊蛋白形成纳米仓储存不同功能的蛋白^[52]。胶囊蛋白可通过信号序列的引导进入厌氧氨氧化体,形成富含血红素的蛋白^[53]。厌氧氨氧化细菌中富铁粒子的特性和功能性胶囊蛋白的存在是今后研究的重点。随着 Fe^{2+} 浓度由0 mmol/L升高到0.06 mmol/L, *Candidatus Jettenia*、*Candidatus Brocadia*和*Candidatus Kuenenia*中厌氧氨氧化体体积与厌氧氨氧化细菌体积比例(A/C)降低,厌氧氨氧化细菌在铁饥饿的条件下,它们的A/C升高,导致厌氧氨氧化体表面积更大,更大的表面积增加了金属结合位点的数量。 Fe^{2+} 的添加能够提高*Candidatus Jettenia*、*Candidatus Brocadia*和*Candidatus Kuenenia*的生长速度和活性,并使铁储存蛋白的编码基因转录

上调^[54]。

3 含铁蛋白的生物合成

生物利用铁最常见的方式是将其组装到蛋白质中形成复合物,复合物起到催化、氧化还原或调节的作用。在含铁的辅因子中,血红素*b*和细胞色素*c*、Fe-S簇在生命的各个领域都是无处不在的,*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*细菌的能量代谢主要依赖于这3类辅因子^[3]。下面我们着重讨论*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*细菌中血红素*b*的生物合成、细胞色素*c*的成熟和Fe-S簇的生物发生。

3.1 血红素*b*的生物合成

血红素是一类广泛的有机辅因子,由四吡咯大环整合铁原子形成。四吡咯的形成分别通过4或6个保守的步骤,即C-4和C-5途径进行,从而形成尿卟啉原III^[55]。从这个中间产物开始,血红素*b*的生物合成有3种不同的途径,即依赖于原卟啉的经典合成途径、依赖于粪卟啉的合成途径和依赖于Siroheme的替代合成途径(Alternative Heme Biosynthesis, Ahb)。其中经典合成途径在真核生物和变形杆菌中是保守的^[56],而依赖于粪卟啉的

合成途径仅存在于革兰氏阳性细菌中^[57]。值得注意的是, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 与其他已知的利用经典合成途径的 *Planctomycetes* 成员不同, 它的基因组编码了依赖于 Siroheme 的血红素替代合成途径(Ahb) (图 1)^[58-59], 在系统发育上可能比经典合成途径更早^[60-61]。

3.2 细胞色素 *c* 成熟

血红素 *b* 经过酶修饰能够产生化学上截然不同的血红素辅因子(*a*、*b*、*c*、*d* 和 *o* 型)。*c* 型细胞色素是 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 中最丰富的血红素蛋白, 在细胞色素 *c* 中, 血红素 *b* 分子通过乙烯基的硫醚键与 2 个半胱氨酸残基的巯基共价连接, 在极少数情况下, 还会通过一个半胱氨酸残基连接^[62]。

目前已知的 3 种细胞色素 *c* 成熟系统(I, II, III)都由膜复合物组成, 它们将血红素 *b* 运输过膜, 并在胞质外侧催化其与载脂蛋白的共价结合^[63]。尽管细胞色素 *c* 可能存在于细胞周质空间, 但细胞色素的主要存在部位是厌氧氨氧化体^[64], *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 细菌可能通过 II 型细胞色素成熟系统合成细胞色素 *c*。

3.3 铁-硫簇的生物合成

Candidatus Kuenenia stuttgartiensis 细菌中的铁硫簇不仅存在于铁氧蛋白、细胞色素 *b* 复合物和氢化酶中, 而且还存在于厌氧氨氧化体内含量高度丰富的 NXR 蛋白复合物中^[3,40]。原核生物中铁硫簇的生物合成是由细胞质蛋白催化的, 包括将铁和硫组装成支架、簇的成熟以及运送到载脂蛋白^[64]。已知有 3 种铁硫蛋白合成途径: Isc、Suf 和 Nif^[65]。Isc 途径是铁-硫簇组装的通用途径, 而 Suf 途径一直是与铁限制和氧胁迫有关。Nif 相反, 该途径最初只与固氮细菌中固氮酶的组装有关^[66]。然而, 最近在 2 个不同的非固氮生物中被鉴定为唯一的铁-硫成熟途径, 从而改变了这一观点。有趣的是, 在 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 细菌中, Nif 途径似乎是唯一的 Fe-S 组装途径(图 1), 这支持了

Nif 途径比之前设想的更加灵活的观点。成熟的铁硫蛋白通过双精氨酸转运系统被转运到细胞膜上, 这些蛋白可能存在于厌氧氨氧化体中, 也可能存在于周质空间中。

4 展望

虽然人们已经对 ANAMMOX 细菌的生理、细胞结构和能量代谢有了相当深入的了解, 但我们对铁吸收和利用的了解却相当少。在这篇综述中, 我们主要介绍了 ANAMMOX 细菌 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 中可能用于支持其铁依赖生活方式的铁吸收代谢系统(图 1)。除了亚硝酸盐依赖的氨氧化, 也有研究表明 ANAMMOX 细菌利用细胞外铁 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 作为呼吸底物。人们对铁还原和氧化过程中的途径、转运和外排中的能量供给系统等生物能学方面的内容目前还知之甚少, 对 ANAMMOX 细菌对 Fe^{3+} 和铁载体吸收的研究还是空白, 胞内铁浓度是一把双刃剑, 铁浓度低会影响微生物生长代谢, 而胞内过量的铁可对微生物产生氧化损伤^[44], ANAMMOX 细菌是如何维持胞内铁浓度动态平衡的, 厌氧氨氧化体的富铁纳米颗粒是否参与了胞内铁浓度稳态的维持, 这些有趣的课题显然需要更多的关注和实验研究。

本文的综述仅仅基于基因组的注释和遗传同源性的推断, 并不能确定其真正的功能, ANAMMOX 细菌生长缓慢, 迄今没有纯培养物, 导致其生化的研究难以深入下去。在不同的铁浓度下培养 ANAMMOX 细菌, 并通过转录组和蛋白组来表征 ANAMMOX 细菌对铁浓度变化的响应, 并与基因组功能预测相结合, 找到可能参与铁转运调控蛋白的编码基因, 并将这些基因克隆到同样为革兰氏阴性菌、遗传背景清楚的大肠杆菌中研究是目前研究确定其生化功能的有效方法。一些先进的技术例如能谱仪分析、X 射线衍射、原子吸收光谱分析可以用于检测分析 ANAMMOX 细菌胞内的铁蛋白的组成、结构及铁的价态。

目前共鉴定 ANAMMOX 细菌 6 属 21 种^[53], 尽管它们都有厌氧氨氧化功能, 但他们的生理生化特征有较大差异, 例如它们适应不同的盐度, 亚硝氮浓度, 有机质浓度, 他们对于铁的转运代谢模式也存在差异, 而本文仅仅分析了 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 铁转运代谢系统, 其他的 ANAMMOX 细菌还有待分析研究, 以清楚他们之间的共性与特性, 为促进铁及铁载体在环境工程和生态中的应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Liu J, Chakraborty S, Hosseinzadeh P, Yu Y, Tian SL, Petrik I, Bhagi A, Lu Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers[J]. Chemical Reviews, 2014, 114(8): 4366-4469
- [2] Bertini I, Cavallaro G, Rosato A. Cytochrome *c*: occurrence and functions[J]. Chemical Reviews, 2006, 106(1): 90-115
- [3] Kartal B, De Almeida NM, Maalcke WJ, Op den Camp HJ, Jetten MS, Keltjens JT. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(3): 428-461
- [4] Kartal B, Keltjens JT. Anammox biochemistry: A tale of heme *c* proteins[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(12): 998-1011
- [5] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome[J]. Nature, 2006, 440(7085): 790-794
- [6] Hira D, Toh H, Migita CT, Okubo H, Nishiyama T, Hattori M, Furukawa K, Fujii T. Anammox organism KSU-1 expresses a NirK-type copper-containing nitrite reductase instead of a NirS-type with cytochrome *cd1*[J]. FEBS Letters, 2012, 586(11): 1658-1663
- [7] Van De Vossenberg J, Woebken D, Maalcke WJ, Wessels HJCT, Dutilh BE, Kartal B, Janssen-Megens EM, Roeselers G, Yan J, Speth D, et al. The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(5): 1275-1289
- [8] Speth DR, Russ L, Kartal B, Op den Camp HJ, Dutilh BE, Jetten MSM. Draft genome sequence of anammox bacterium '*Candidatus Scalindua brodae*,' obtained using differential coverage binning of sequencing data from two reactor enrichments[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e01415-14.
- [9] Oshiki M, Shinyako-Hata K, Satoh H, Okabe S. Draft genome sequence of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium, '*Candidatus Brocadia sinica*'[J]. Genome Announcements, 2015, 3(2): e00267-e00215
- [10] Outten CE, O'Halloran TV. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis[J]. Science: New York, N Y, 2001, 292(5526): 2488-2492
- [11] Posey JE. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen[J]. Science, 2000, 288(5471): 1651-1653
- [12] Van Teeseling MCF, Mesman RJ, Kuru E, Espaillet A, Cava F, Brun YV, Van Nieuwenhze MS, Kartal B, Van Niftrik L. Anammox Planctomycetes have a peptidoglycan cell wall[J]. Nature Communications, 2015, 6: 6878
- [13] Van Niftrik L, Geerts WJC, Van Donselaar EG, Humbel BM, Yakushevskaya A, Verkleij AJ, Jetten MSM, Strous M. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: A membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria[J]. Journal of Structural Biology, 2008, 161(3): 401-410
- [14] Neumann S, Wessels HJCT, Rijpstra WIC, Sinninghe Damsté JS, Kartal B, Jetten MSM, Van Niftrik L. Isolation and characterization of a prokaryotic cell organelle from the anammox bacterium *Kuenenia stuttgartiensis*[J]. Molecular Microbiology, 2014, 94(4): 794-802
- [15] Shen LD, Liu S, Lou LP, Liu WP, Xu XY, Zheng P, Hu BL. Broad distribution of diverse anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Chinese agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 6167-6172
- [16] Hu BL, Shen LD, Zheng P, Hu AH, Chen TT, Cai C, Liu S, Lou LP. Distribution and diversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in the sediments of the Qiantang River[J]. Environmental Microbiology Reports, 2012, 4(5): 540-547
- [17] Hu BL, Shen LD, Xu XY, Zheng P. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems[J]. Biochemical Society Transactions, 2011, 39(6): 1811-1816
- [18] Kartal B, Maalcke WJ, De Almeida NM, Cirpus I, Gloerich J, Geerts W, Op den Camp HJ, Harhangi HR, Janssen-Megens EM, Francoijs KJ, et al. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation[J]. Nature, 2011, 479(7371): 127-130
- [19] Dietl A, Ferousi C, Maalcke WJ, Menzel A, De Vries S, Keltjens JT, Jetten MSM, Kartal B, Barends TRM. The inner workings of the hydrazine synthase multiprotein complex[J]. Nature, 2015, 527(7578): 394-397
- [20] Maalcke WJ, Reimann J, De Vries S, Butt JN, Dietl A, Kip N, Mersdorf U, Barends TRM, Jetten MSM, Keltjens JT, et al. Characterization of anammox hydrazine dehydrogenase, a key N₂-producing enzyme in the global nitrogen cycle[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(33): 17077-17092
- [21] Ji XM, Wu ZY, Sung S, Lee PH. Metagenomics and metatranscriptomics analyses reveal oxygen detoxification and mixotrophic potentials of an enriched anammox culture in a continuous stirred-tank reactor[J]. Water Research, 2019, 166: 115039

- [22] Liu YW, Ni BJ. Appropriate Fe(II) addition significantly enhances anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity through improving the bacterial growth rate[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8204
- [23] Bi Z, Qiao S, Zhou JT, Tang X, Zhang J. Fast start-up of Anammox process with appropriate ferrous iron concentration[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 170: 506-512
- [24] Tang SM, Xu ZH, Liu YL, Yang GF, Mu J, Jin RC, Yang Q, Zhang XL. Performance, kinetics characteristics and enhancement mechanisms in anammox process under Fe(II) enhanced conditions[J]. *Biodegradation*, 2020, 31(4/5/6): 223-234
- [25] Yin SY, Li J, Dong HY, Qiang ZM. Enhanced nitrogen removal through marine anammox bacteria (MAB) treating nitrogen-rich saline wastewater with Fe(III) addition: Nitrogen shock loading and community structure[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 287: 121405
- [26] Lu YZ, Fu L, Li N, Ding J, Bai YN, Samaras P, Zeng RJ. The content of trace element iron is a key factor for competition between anaerobic ammonium oxidation and methane-dependent denitrification processes[J]. *Chemosphere*, 2018, 198: 370-376
- [27] Zhao R, Zhang HM, Li YF, Jiang T, Yang FL. Research of iron reduction and the iron reductase localization of anammox bacteria[J]. *Current Microbiology*, 2014, 69(6): 880-887
- [28] Van De Vossenberg J, Rattray JE, Geerts W, Kartal B, Van Niftrik L, Van Donselaar EG, Sinninghe Damsté JS, Strous M, Jetten MS. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3120-3129
- [29] Bi Z, Zhang WJ, Song G, Huang Y. Iron-dependent nitrate reduction by anammox consortia in continuous-flow reactors: A novel prospective scheme for autotrophic nitrogen removal[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 692: 582-588
- [30] Shi L, Dong HL, Reguera G, Beyenal H, Lu AH, Liu J, Yu HQ, Fredrickson JK. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(10): 651-662
- [31] Richardson DJ, Butt JN, Fredrickson JK, Zachara JM, Shi L, Edwards MJ, White G, Baiden N, Gates AJ, Marritt SJ, et al. The 'porin-cytochrome' model for microbe-to-mineral electron transfer[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 85(2): 201-212
- [32] Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. 2004, 49: 219-286
- [33] Sturm G, Richter K, Doetsch A, Heide H, Louro RO, Gescher J. A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(8): 1802-1811
- [34] Shi L, Fredrickson JK, Zachara JM. Genomic analyses of bacterial porin-cytochrome gene clusters[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 657
- [35] Kotloski NJ, Gralnick JA. Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*[J]. *mBio*, 2013, 4(1): e00553-e00512
- [36] Lovley DR, Malvankar NS. Seeing is believing: Novel imaging techniques help clarify microbial nanowire structure and function[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(7): 2209-2215
- [37] De Almeida NM, Wessels HJCT, De Graaf RM, Ferousi C, Jetten MSM, Keltjens JT, Kartal B. Membrane-bound electron transport systems of an anammox bacterium: A complexome analysis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Bioenergetics*, 2016, 1857(10): 1694-1704
- [38] Straub KL, Benz M, Schink B, Widdel F. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(4): 1458-1460
- [39] Klueglein N, Kappler A. Abiotic oxidation of Fe(II) by reactive nitrogen species in cultures of the nitrate-reducing Fe(II) oxidizer *Acidovorax* sp. BoFeN₁ - questioning the existence of enzymatic Fe(II) oxidation[J]. *Geobiology*, 2013, 11(2): 180-190
- [40] De Almeida NM, Neumann S, Mesman RJ, Ferousi C, Keltjens JT, Jetten MS, Kartal B, Van Niftrik L. Immunogold localization of key metabolic enzymes in the anammoxosome and on the tubule-like structures of *Kuenenia stuttgartiensis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(14): 2432-2441
- [41] Melton ED, Swanner ED, Behrens S, Schmidt C, Kappler A. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(12): 797-808
- [42] Miethke M. Molecular strategies of microbial iron assimilation: From high-affinity complexes to cofactor assembly systems[J]. *Metallomics*, 2012, 5(1): 15-28
- [43] Barry SM, Challis GL. Recent advances in siderophore biosynthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13(2): 205-215
- [44] Dong ZY, Guo SP, Fu HH, Gao HC. Investigation of a spontaneous mutant reveals novel features of iron uptake in *Shewanella oneidensis*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11788
- [45] Dong ZY, Hu JJ, Hu BL. Regulation of microbial siderophore transport and its application in environmental remediation[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(11): 2189-2200 (in Chinese)
董子阳, 胡佳杰, 胡宝兰. 微生物铁载体转运调控机制及其在环境污染修复中的应用[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2189-2200
- [46] Lau CK, Krewulak KD, Vogel HJ. Bacterial ferrous iron transport: The Feo system[J]. *FEMS Microbiology Reviews*,

- 2016, 40(2): 273-298
- [47] Roy EM, Griffith KL. Characterization of a novel iron acquisition activity that coordinates the iron response with population density under iron-replete conditions in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(1): e00487-16
- [48] Carpenter C, Payne SM. Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, 133: 110-117
- [49] Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 546: 41-52
- [50] Sutter M, Boehringer D, Gutmann S, Günther S, Prangishvili D, Loessner MJ, Stetter KO, Weber-Ban E, Ban N. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15(9): 939-947
- [51] McHugh CA, Fontana J, Nemecek D, Cheng NQ, Aksyuk AA, Heymann JB, Winkler DC, Lam AS, Wall JS, Steven AC, et al. A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and protects bacteria from oxidative stress[J]. *The EMBO Journal*, 2014, 33(17): 1896-1911
- [52] Giessen TW. Encapsulins: microbial nanocompartments with applications in biomedicine, nanobiotechnology and materials science[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 34: 1-10
- [53] Giessen TW, Silver PA. Widespread distribution of encapsulin nanocompartments reveals functional diversity[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17029
- [54] Peng MW, Guan Y, Liu JH, Chen L, Wang H, Xie ZZ, Li HY, Chen YP, Liu P, Yan P, Guo JS, Liu G, Shen Y, Fang F. Quantitative three-dimensional nondestructive imaging of whole anaerobic ammonium-oxidizing bacteria[J]. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2020, 27(Pt 3): 753-761
- [55] Frankenberg N, Moser J, Jahn D. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63(2): 115-127
- [56] Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2010, 19(6): 1137-1161
- [57] Dailey HA, Gerdes S, Dailey TA, Burch JS, Phillips JD. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(7): 2210-2215
- [58] Ishida T, Yu L, Akutsu H, Ozawa K, Kawanishi S, Seto A, Inubushi T, Sano S. A primitive pathway of porphyrin biosynthesis and enzymology in *Desulfovibrio vulgaris*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(9): 4853-4858
- [59] Bali S, Lawrence AD, Lobo SA, Saraiva LM, Golding BT, Palmer DJ, Howard MJ, Ferguson SJ, Warren MJ. Molecular hijacking of siroheme for the synthesis of heme and *d1* heme[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(45): 18260-18265
- [60] Bali S, Palmer DJ, Schroeder S, Ferguson SJ, Warren MJ. Recent advances in the biosynthesis of modified tetrapyrroles: The discovery of an alternative pathway for the formation of heme and heme *d1*[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71(15): 2837-2863
- [61] Ducluzeau AL, Nitschke W. When did hemes enter the scene of life? On the natural history of heme cofactors and heme-containing enzymes[A]//*Advances in Photosynthesis and Respiration*[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016: 13-24
- [62] De Vitry C. Cytochrome *c* maturation system on the negative side of bioenergetic membranes: CCB or System IV[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(22): 4189-4197
- [63] Kranz RG, Richard-Fogal C, Taylor JS, Frawley ER. Cytochrome *c* biogenesis: Mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, 73(3): 510-528
- [64] 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]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 708-717
- [65] Bandyopadhyay S, Chandramouli K, Johnson MK. Iron-sulfur cluster biosynthesis[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2008, 36(6): 1112-1119
- [66] Frazzon J, Dean DR. Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: An emerging field in bioinorganic chemistry[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(2): 166-173