

王乙橙,晏 鹏,陈猷鹏.厌氧氨氧化细菌梯烷脂的研究进展 [J]. 中国环境科学, 2023,43(9):4886~4895.

Wang Y C, Yan P, Chen Y P. Research advances in ladderane lipids of anammox bacteria [J]. China Environmental Science, 2023,43(9):4886~4895.

厌氧氨氧化细菌梯烷脂的研究进展

王乙橙,晏 鹏,陈猷鹏* (重庆大学环境与生态学院,重庆 400045)

摘要: 厌氧氨氧化细菌(AnAOB)在地球氮循环和环境污染治理中扮演着重要角色。AnAOB 含有独特的梯烷脂,其核心结构是 3 或 5 个线性串联的环丁烷基团。至今尚未发现梯烷脂存在于其他细菌中,而且其生物合成通路和生理功能仍然未知。本文对 AnAOB 梯烷脂的发现、结构、性质、种类、合成及其应用进行了系统综述,并对梯烷脂的前沿问题和未来研究方向进行了讨论与展望。

关键词: 厌氧氨氧化细菌; 磷脂; 梯烷脂; 环丁烷; 生物合成; 生物标记物

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2023)09-4886-10

Research advances in ladderane lipids of anammox bacteria. WANG Yi-cheng, YAN Peng, CHEN You-peng* (College of Environment and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400045, China). *China Environmental Science*, 2023,43(9): 4886~4895

Abstract: Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (AnAOB) play an important role in the global nitrogen cycle and environmental pollution control. AnAOB contain unique ladderane lipids, whose key structure is three or five linearly concatenated cyclobutane moieties. Ladderane lipids have not been found in other bacteria so far, and their biosynthetic pathway and physiological function remain unknown. In this work, the advances in the discovery, structure, properties, types, applications, and synthesis of AnAOB ladderane lipids were comprehensively reviewed, and the current issues and prospected future research directions were discussed.

Key words: anaerobic ammonium-oxidizing bacteria; phospholipids; ladderane lipids; cyclobutane; biosynthesis; biomarker

厌氧氨氧化细菌(AnAOB)是属于浮霉菌门(Planctomycetes)的一类独特细菌,能够进行厌氧氨氧化(Anammox)并产生氮气,从中获取能量生长繁殖^[1-4]。AnAOB 是介导地球氮循环的重要微生物类群^[2-3],而且其在缺氧条件下无需外加有机碳源就可以实现脱氮,对于污水处理具有重要意义^[2-3,5-7]。Anammox 反应被证明发生在 AnAOB 特殊的亚细胞结构厌氧氨氧化体(Anammoxosome)中^[8]。厌氧氨氧化体占据细胞总体积的 40%~70%,而且厌氧氨氧化体膜具有致密、相对不渗透性的特点,含有大量特殊的磷脂——梯烷脂(Ladderane lipids);AnAOB 所有的细胞膜均含有梯烷脂^[8-10]。Damste 等^[9]通过理论计算表明以单一梯烷脂构成的磷脂双分子层膜的密度达到了 1.5kg/dm³,明显高于其他一般细胞膜的密度(大多为 1.2kg/dm³)。梯烷脂含有 3 个或 5 个线性顺式连接的环丁烷基团,该基团拥有独特的 CCC 键角度和扭转应变,纯化后的梯烷脂能够形成脂质堆积密度较高的液膜^[9,11-13]。至今为止,仅在 AnAOB 中发现了梯烷脂,因此它也被用作指示 AnAOB 和 Anammox 活动的生物标记物^[14-25]。

鉴于梯烷脂组成的厌氧氨氧化体膜通透性较

低,梯烷脂的作用可能是避免 Anammox 过程中的有毒中间产物(例如肼或其他更大的有毒分子)从厌氧氨氧化体中扩散出来,从而保护细胞核酸和周质内容物免受损伤,维持正常代谢功能^[9,26]。除了避免有毒中间产物泄露外,梯烷脂的功能还可能是阻碍质子从厌氧氨氧化体中被动扩散出去。因为 Anammox 代谢缓慢,AnAOB 需要致密的梯烷脂膜来维持合成 ATP 所需的质子动力势^[27]。但是,对化学合成的天然梯烷脂的最新研究结果则表明,梯烷脂的功能极有可能是阻止质子动力势的崩溃,而不是阻止肼在 AnAOB 中的跨膜扩散^[28]。综上,基于现有的研究结果对于梯烷脂的生物功能假说主要分为两类:(1)作为 Anammox 有毒中间产物的屏障;(2)维持质子动力势。然而,由于目前尚未实现 AnAOB 的纯培养,其基础代谢研究较为困难,梯烷脂的生物功能和在 Anammox 反应中发挥的作用依然是一个谜。

厌氧氨氧化体是 Anammox 反应发生的主要场所^[29-30],其膜的重要组成成分梯烷脂对于 Anammox

收稿日期: 2023-02-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21876016,52070031)

* 责任作者,教授,ypchen@cqu.edu.cn

和 AnAOB 具有关键作用,而且梯烷脂可以成为可再生、高能量密度的航空燃料^[11-12,31],因此梯烷脂的功能和可控人工合成研究具有重要的科学意义和工程应用前景^[1].本文通过对 AnAOB 梯烷脂的结构、种类、功能、合成及其应用进行系统综述,并指出梯烷脂研究的可能发展方向,旨在为深入研究梯烷脂的功能、生物合成和工程应用提供有价值的参考.

1 梯烷脂的结构与种类

Damste 等^[9]于 2002 年首次报道了 AnAOB 梯烷脂,这类物质是特殊的由甘油分子和含有环丁烷基团的烷烃支链结合而成的磷脂,由于线性连接的环丁烷基团的投影呈梯子状,因此被称为“梯烷”(Ladderane)(图 1).AnAOB 菌体中的天然梯烷目前共发现有两种分子结构,分别称为 X 结构和 Y 结构(图 1)^[9].甘油分子作为梯烷脂的骨架,其具有 3 个连接位点,分别是 sn-1、sn-2、sn-3(图 1).sn-1 位点可以连接氢、普通烷烃或梯烷支链(通过醚键或酯键连接烷基)等多种不同基团,sn-2 位点通过醚键连接含有 X 结构的梯烷支链,而 sn-3 位点则可以与一个极性首基(Polar headgroup)相结合;如果 sn-3 位点连接有首基,被称为完整梯烷脂(Intact ladderane lipids),失去首基但含有梯烷基团则被称为核心梯烷脂(Core ladderane lipids)(图 2, I 和 a-d)^[9,14,29,32].由于细胞死亡后,磷脂会迅速分解,因此完整梯烷脂只来自 AnAOB 细菌活体,其适合用于指示正在进行的 Anammox 活动^[19,33-34].核心梯烷脂相对稳定,可能来自 AnAOB 细菌活体,也可能来自凋亡的细菌,更适合用于重建古环境的 Anammox 活动^[35].

完整梯烷脂的极性首基目前共发现 3 类,分别是磷酸胆碱(PC)、磷酸乙醇胺(PE)和磷酸甘油(PG)(图 1).Boumann 等^[32]检测发现 *Candidatus. Kuenenia stuttgartiensis* 的富集培养物含有的完整梯烷脂的极性首基主要为 PC 和 PE.Rattray 等^[14]则在 4 个不同属(*Candidatus Anammoxoglobus*、*Candidatus Brocadia*、*Candidatus Kuenenia* 和 *Candidatus Scalindua*)的 AnAOB(表 1)中都检测到了 PC 和 PE 首基完整梯烷脂,并发现了 PG 首基.该研究还表明不同属的 AnAOB 梯烷脂的组成有较大差异,这可能是由于物种或培养条件的差异所造

成^[14].此外, Rattray 等^[14]发现 4 个属的 AnAOB 均含有 C₂₀ 梯烷脂和 C₁₈ 梯烷脂,而且 C₂₀ 梯烷脂是主要的梯烷脂.AnAOB 的梯烷脂结构相对复杂且种类较多:首基和甘油骨架的组成结构共有 10 种,分别用罗马数字 I-X 表示,而 sn-1 位点连接的尾部烷烃支链共有 10 种,分别用小写英文字母 a-j 表示(图 2).

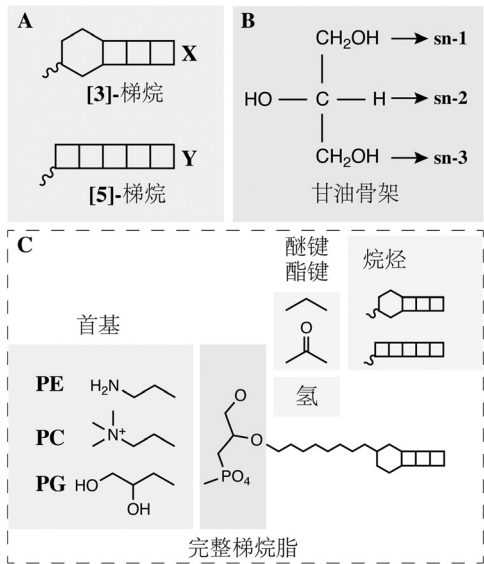


图 1 梯烷脂的分子结构
Fig.1 Molecular structures of ladderane lipids
(A)线性串联的环丁烷基团;(B)甘油骨架;(C)完整梯烷脂

表 1 含有梯烷脂的 AnAOB			
Table 1 The AnAOB containing ladderane lipids			
属	种	梯烷脂	参考文献
<i>Candidatus Anammoxoglobus</i>	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>	+	[14,36]
<i>Candidatus Brocadia</i>	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	+	[9]
<i>Candidatus Brocadia</i>	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>	+	[14,37]
<i>Candidatus Kuenenia</i>	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	+	[14,38]
<i>Candidatus Scalindua</i>		+	[14,37,39]

目前对于梯烷脂的检测和鉴定,主要局限在 4 个属的 AnAOB 富集培养物,但是其他新发现的属或科(例如 *Candidatus Jettenia*^[40-41]、*Candidatus Loosdrechtia*^[42]、*Candidatus Anammoxibacter*^[43] 和 *Candidatus Anammoxibacteraceae*^[43])的 AnAOB 的梯烷脂的结构、种类或含量则未见报道.此外,浮霉菌

门的细菌具有细胞器膜化和细胞壁缺少肽聚糖的独特特征^[44],因此除了 AnAOB 以外的其他浮霉菌门细菌(特别是可纯培养的浮霉菌)的膜磷脂结构和种类值得进一步探究.

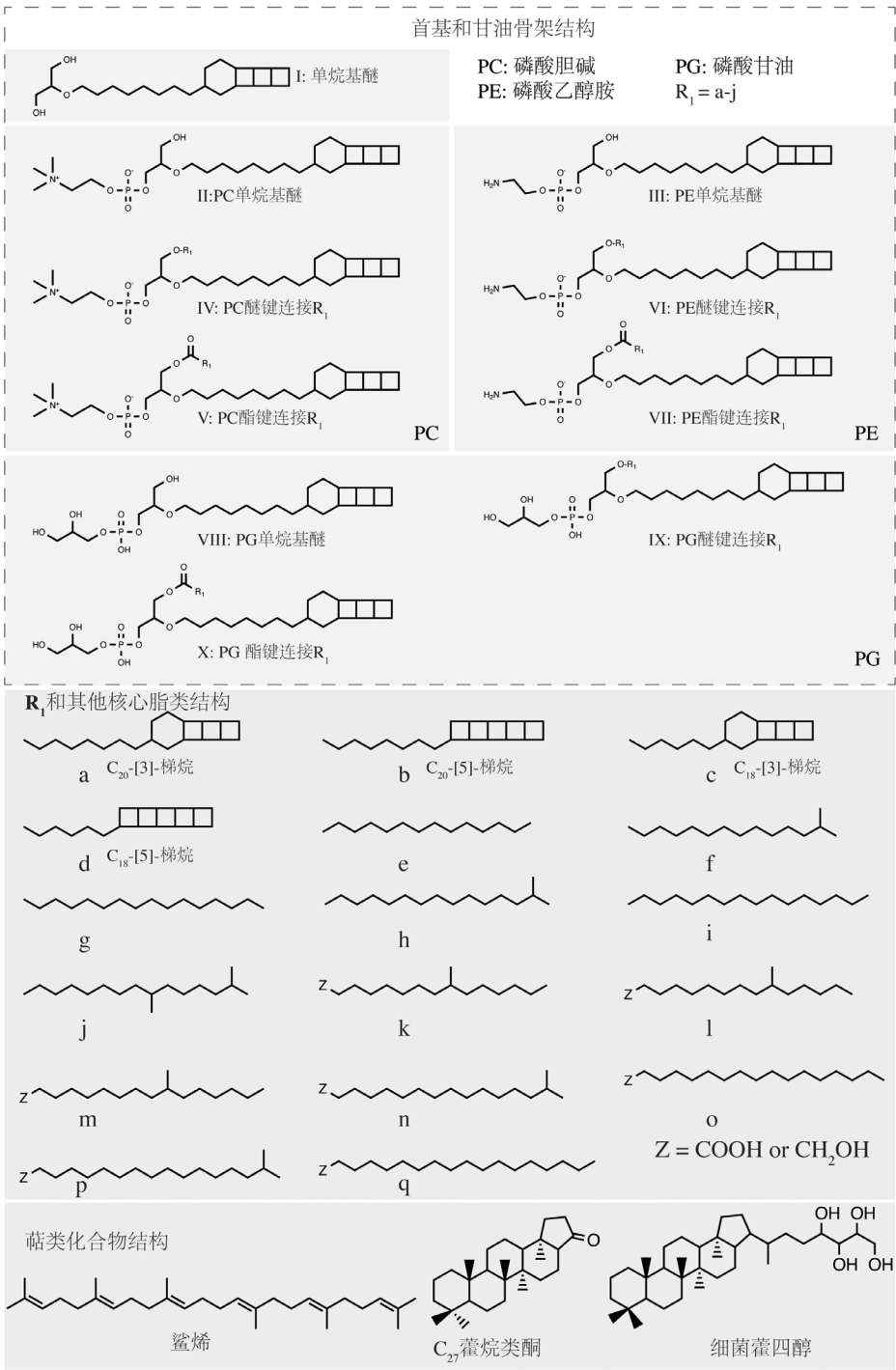


图2 AnAOB 富集培养物核心脂类和完整梯烷脂的类型^[14]
Fig.2 Types of core lipids and intact phospholipids found in AnAOB enriched cultures^[14]

2 梯烷脂在环境研究中的应用

如前所述,梯烷脂是 AnAOB 特有的磷脂,因此可以用作指示 AnAOB 和 Anammox 活动的生物标

记物.截至目前,已有大量研究基于梯烷脂探究某一特定区域的 AnAOB 的分布或 Anammox 对氮循环的贡献(表 2).Kuypers 等^[20]首次利用梯烷脂作为生物标记物来指示海洋中的 Anammox 活动,结合氮同

位素标记和荧光原位杂交技术(FISH),证明了 AnAOB 在海洋氮循环中发挥了重要作用.此外,许多海洋区域的沉积物中也检测出梯烷脂,再次证明 Anammox 是海洋氮循环中的重要途径^[15,17,33,35].Jaseschke 等^[35]利用海洋沉积物柱中的核心梯烷脂结合年代地层学技术重建了阿拉伯北部海域古环境的 Anammox 活动,结果表明 Anammox 活动在该海洋区域至少存在了 14 万年.Zhao 等^[15]利用沉积物柱和悬浮微粒物质中的梯烷脂重建中国东海过去百年尺度的 Anammox 活动,并分析了梯烷脂对富营养化和缺氧的响应,认为梯烷脂可以作为中国东海过去缺氧变化的有效指示物质,同时能够间接地用于沿海海洋区域富营养化记录的重建.

目前利用梯烷脂作为生物标记物的研究对象主要是海洋环境,鲜见对其他环境(如湖泊、土壤等)的调查研究报道.此外,虽然先前的研究表明梯烷脂是研究海洋氮循环或缺氧的有效指示物,但是未来仍需进一步探究环境影响因素(如溶解氧、营养盐浓度、温度、水深等)和梯烷脂种类或含量之间的联系.

表 2 利用梯烷脂作为生物标记物探究自然环境中的厌氧氨氧化的研究

Table 2 Studies on anammox in natural environments using ladderane lipids as biomarkers

年份	研究区域或对象	参考文献
2003	黑海	[20]
2004	丹麦格陵兰东北部海冰	[45]
2005	南大西洋本格拉上升流区	[21]
2006	瑞典古尔马峡湾	[46]
2007	阿拉伯海最小含氧层	[18]
2009	阿拉伯海沉积物	[35]
2009	爱尔兰海和凯尔特海沉积物	[33]
2009	深海热液喷口	[47]
2009	温泉	[48]
2010	非洲西北部大陆架和斜坡沉积物	[19]
2011	阿拉伯海最小含氧层	[22]
2011	瑞典古尔马峡湾海洋沉积物	[17]
2012	北太平洋东部热带最小含氧层	[23]
2013	中国东海	[25]
2016	长江口	[49]
2019	中国东海	[15]
2023	中国东海	[50]

3 梯烷脂的合成

鉴于 AnAOB 梯烷脂的独特性质、良好的环境研究和工业应用前景,因此揭示梯烷脂的生物合成

通路和高效化学合成梯烷脂具有重要意义.总的来说,天然梯烷脂的生物合成通路至今仍然未知,需要进一步挖掘 AnAOB 膜磷脂的合成基因簇和相关通路,但是在化学合成天然或非天然梯烷(脂)方面目前已经取得了重要突破——现已开发出多种化学合成梯烷(脂)的方法.

3.1 生物合成

Damste 等^[51]首次提出了梯烷脂的生物合成假说:AnAOB 首先合成 C₂₀ 多不饱和脂肪酸,然后 C₂₀ 多不饱和脂肪酸在 C₉ 和 C₂₀ 处环合形成 C₁₂ 大环,随后形成 CC 单键,最终形成线性连接的环丁烷基团;由于梯烷脂基团的结构相似,可以通过增加或减少环化步骤的数量来合成含有 3 或 5 个环丁烷基团.Mascitti 等^[52]则认为梯烷生物合成可能通过级联型多环化发生,该反应可能利用的底物是丙二烯系 C₂₀ 脂肪酸 9,10,12,16,18,19-二十二碳六烯酸.此外,Nouri 等^[11]也提出了 3 种可能的需要六步多环化反应的梯烷脂生物合成机制.

细菌一般通过 II 型脂肪酸合成(FAS II)通路进行饱和/不饱和脂肪酸的合成^[53],梯烷脂有可能通过该通路合成.Strous 等^[54]发现在 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 基因组中,脂肪酸生物合成功能基因分布在 4 个基因簇上,其中两个基因簇由已知的 FAS II 和 S-腺苷-甲硫氨酸(SAM)自由基酶编码基因的同源基因组成.由于 SAM 自由基酶编码基因在细菌基因组中较为少见,而且这些酶通常负责催化困难的化学反应,所以他们认为这些基因簇最有可能负责梯烷脂的合成^[54].

随后,Rattray 等^[55]以模式细菌 *Escherichia coli* 的基因组为参考通过比较基因组学的方法进一步鉴定了 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 的脂肪酸合成基因,发现 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 拥有除了 *fabA*、*fabK*、*fabR* 和 *fadR* 以外大部分的 FAS II 功能基因,同时它的 FAS II 基因簇中有 6 个基因编码 SAM 自由基酶或甲基化酶(Methylase enzymes),有 2 个基因的产物和八氢番茄红素脱氢酶 (Phytoene dehydrogenases)有一定的同源性.此外,Rattray 等^[55]通过序列比对鉴定了其他 137 个物种是否拥有类似的 FAS II 基因簇,发现 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 的这些基因簇稀少但并不唯一,属于 δ -变形菌纲的两种细菌 (*Desulfotalea psychrophila* 和 *Pelobacter*

carbinolicus) 具有类似的基因簇, 并且 *D. psychrophila* 除了拥有 SAM 自由基酶和八氢番茄红素脱氢酶的同源编码基因外, 还有 1 个功能未知的膜蛋白和 1 个苯乙酰 CoA 连接酶(Phenylacetyl-CoA ligase)的编码基因. 然而, 在 *D. psychrophila* 细胞中并没有发现梯烷脂, 但是检测到不常见的多不饱和碳氢化合物, 该化合物在 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 细胞中并未检测到^[55]. 基于上述的研究结果, Rattray 等^[55]提出了两种 C₂₀-[5]-梯烷脂肪酸的生物合成通路(图 3): 通路 a, 首先合成多不饱和碳氢化合物, 然后经过

SAM 自由基酶的作用形成梯烷脂肪酸; 通路 b, 梯烷基团通过未知的合成通路形成, 然后进入到 FAS II 通路, 最终形成梯烷脂肪酸. 然而, 对 *Ca. Brocadia fulgida* 的碳同位素标记实验结果表明, 其梯烷脂的关键结构环丁烷和环己烷的碳原子不是通过已知的 FAS II 通路合成, 因此梯烷基团更可能是通过未知的新通路合成^[56]. Chen 等^[57]通过量子化学计算探究了利用低聚环丙烷(Oligocyclopropane)作为前体生物合成梯烷的反应可行性, 并认为一种涉及到混合机制的合成通路从自由能变的角度来看是较为合理的.

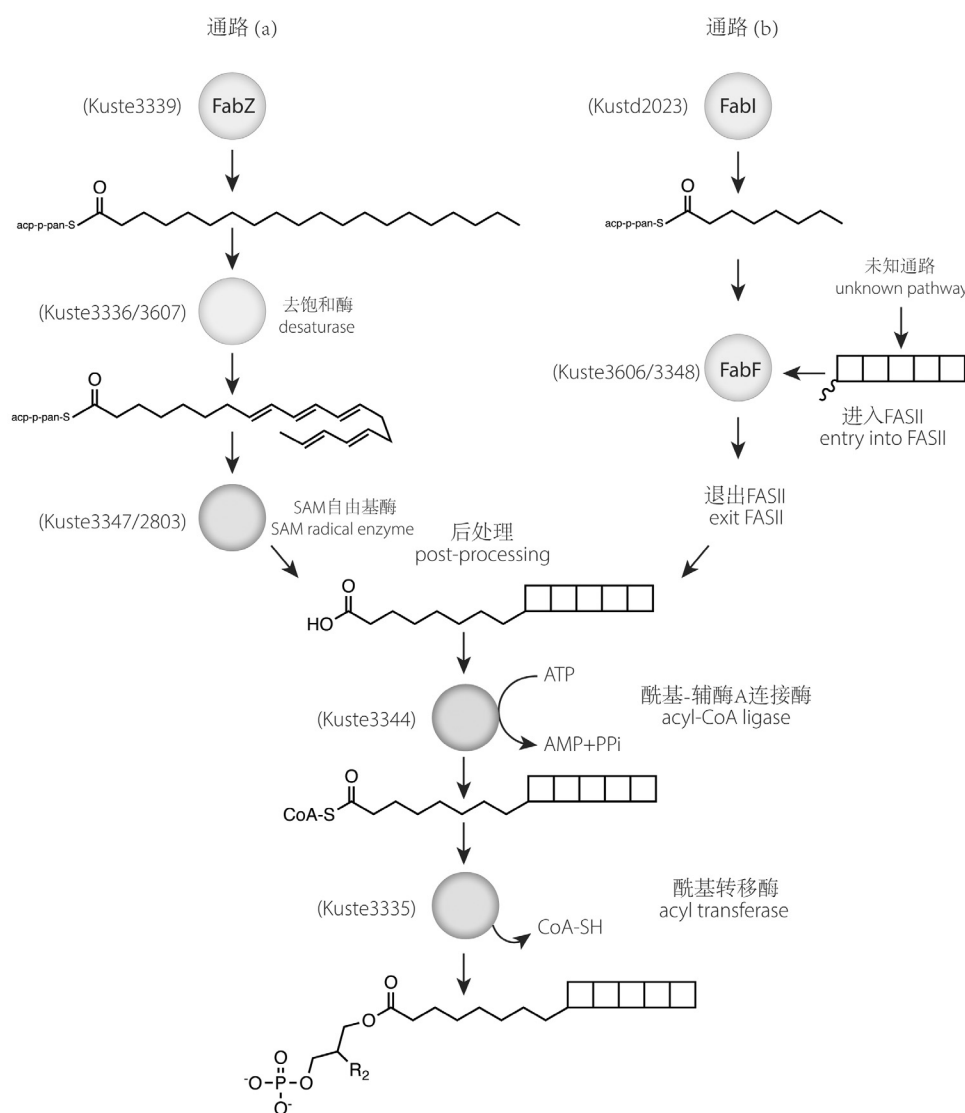


图 3 C₂₀-[5]-梯烷脂肪酸的两种生物合成通路^[55]

Fig.3 Two biosynthetic pathways of C₂₀-[5]-ladderane fatty acids^[55]

2016 年, Javidpour 等^[31]首次通过异源表达和鸟枪蛋白组学研究了先前在 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 基

因组中鉴定出的 27 个可能涉及到梯烷脂合成的基因的功能, 尽管他们最终并没有确定梯烷脂的合成

基因(失败的原因可能是部分候选基因未能有效表达、表达蛋白不能正确折叠或者选择的宿主 *E. coli* 可能并非 AnAOB 基因最佳的异源表达宿主),但是在这项研究中他们建立起了有效的 AnAOB 基因异源表达载体构建方法.此外,Javidpour 等^[31]的研究结果表明先前被认为在梯烷脂合成中可能起到重要作用的去饱和酶(由基因 *kuste3336* 和 *kuste3607* 编码,和八氢番茄红素去饱和酶 *CrtI* 有大约 30% 的序列相似性)并不能将八氢番茄红素去饱和产生番茄红素.

当前,对于梯烷脂的生物合成功能基因的推测主要基于 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 的比较基因组学研究结果,然而梯烷脂合成的碳同位素标记实验对象是 AnAOB 另一个属的 *Ca. Brocadia fulgida*,物种本身的差异可能导致合成通路的差异.因此,基于

Ca. Brocadia fulgida 的实验推论可能不适用于 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*.后续可采用 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 的富集培养物开展类似的碳同位素标记实验,以检验 Rattray 等^[55-56]提出的推论.此外,鉴于目前已有多个 AnAOB(属于确认含有梯烷脂的 4 个属)的全基因组序列公布,可考虑对这些基因组进行比较基因组分析——鉴定它们所共有的核心脂肪酸合成基因簇,在 Rattray 等^[55]的研究基础上进一步鉴定可能的梯烷脂生物合成通路.Javidpour 等^[31]的结果为通过异源表达技术研究 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 的梯烷脂合成基因建立了基础,未来可考虑在此基础上优化启动子和核糖体结合位点(RBS)序列,利用与 AnAOB 较为近缘的浮霉菌门细菌作为表达宿主.

3.2 化学合成

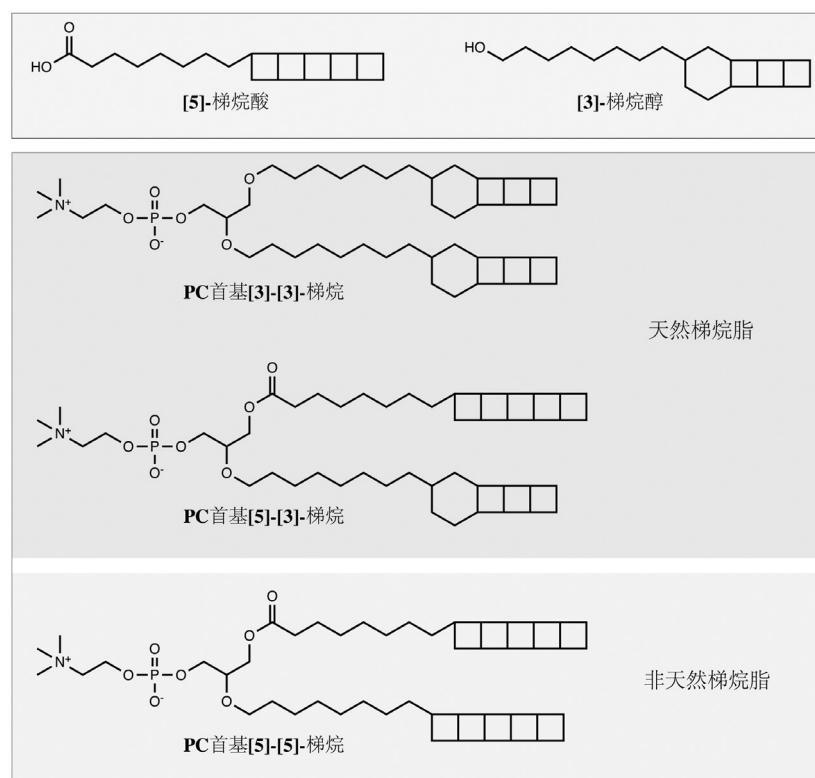


图 4 化学合成的梯烷(脂)

Fig.4 Chemically synthesized ladderane (lipids)

2004 年,Mascitti 等^[58]首次报道了天然梯烷脂的关键结构之一(±)-[5]-梯烷酸(Ladderanoic acid)(图 4)的外消旋合成(Racemic synthesis)方法,关键步骤利用了光化学[2+2]-环加成和 Wolff 重排环收缩反应.而后,Mascitti 等^[52]继续优化了合成策略于 2006 年报道

了(±)-[5]-梯烷酸的拆分合成(Enantioselective synthesis)方法,即逐级连接环丁烷形成线性串联的环丁烷基团.Mercer 等^[59]通过拆分合成方法化学合成了(-)-[5]-梯烷酸,同时第一次合成了天然梯烷脂的另一个关键结构[3]-梯烷醇(Ladderanol),而且首

次通过化学合成和自组装获得了一种常见的天然梯烷脂——PC 首基[5]-[3]-梯烷(图 4);他们提出的策略利用了基于 Ramberg–Bäcklund 反应的环收缩和 Zweifel 烯基化反应,可以合成高纯度和产量相对较多的天然梯烷脂,这将有助于梯烷脂的生物物理研究.Line 等^[60]通过拆分合成方法分为 14 个步骤合成了对映-[3]-梯烷醇.Moss 等^[28]则在先前 Mercer 等^[59]的拆分合成方法基础上,又合成了 PC 首基[3]-[3]-梯烷(最常见天然梯烷脂之一)和非天然结构的 PC 首基[5]-[5]-梯烷(图 4).最近,Hancock 等^[61]和 Ray 等^[62]分别报道了改进的(+)-[5]-梯烷酸和[3]-梯烷醇的拆分合成策略.此外,还有一些关于非天然梯烷的化学合成研究报道^[11,63-65].

尽管光化学[2+2]-环加成、基于 Wolff 重排和 Ramberg–Bäcklund 反应的环收缩以及 Zweifel 烯基化反应已经被证明是切实可行的梯烷(脂)合成策略,但是由于应变引起的变形和迭代环丁烷组装导致合成难度较高^[64],未来仍然需要开发更为简单可行的合成方法.梯烷脂的化学合成促进了一些新的合成方法和策略的开发,同时化学合成梯烷脂则在一定程度上提示了生物合成梯烷脂的可能前体和组装过程,并且可以提供高纯度的标准梯烷(脂),这将有助于梯烷脂的生物合成和功能研究.

4 影响梯烷脂生物合成的因素

梯烷脂是 AnAOB 磷脂膜的主要成分,其和 AnAOB 的生长状态密切相关.已有相关研究表明,温度是影响梯烷脂生物合成的重要因素,但其他可能的影响因素如盐度、基质浓度、氧气浓度等则鲜见报道.

从污水处理系统中富集得到的 AnAOB 大多是嗜中温菌,生长温度为 20~43℃^[66-67].但是在自然环境中,AnAOB 生长温度的范围更广.目前已经在北极海冰(温度为 -2.5℃)^[45]、热泉(温度高达 65℃)^[48,68]、石油储层(温度高达 75℃)^[69]、深海热液喷口区域(温度高达 85℃)^[47]检测到 AnAOB 或 Anammox 活动.此外,从海洋沉积物中富集的 *Ca. Scalindua* 属的 AnAOB 可以在 15~20℃ 生长^[70].值得注意的是,从上述高温环境中检测到一些从污水系统中富集得到的嗜中温 AnAOB,说明这些 AnAOB 存在某些生理机制以适应环境温度的变化.

其他含有脂肪酸的细菌会通过调整磷脂膜的组成维持细胞膜的流动性,以适应环境温度的变化^[71-74].AnAOB 同样表现出类似的温度适应机制.Rattray 等^[37]研究了温度对 4 种不同属的 AnAOB 富集培养物梯烷脂的影响,发现随着温度的升高 C₂₀-[5]-梯烷脂肪酸相对于 C₁₈-[5]-梯烷脂肪酸的含量升高,而随着温度的降低,C₁₈-[5]-梯烷脂肪酸相对于 C₂₀-[5]-梯烷脂肪酸的含量升高.基于该实验结果,Rattray 等^[37]提出了 NL₅ 指数(式(1))来定量描述梯烷碳链长度的变化趋势.

$$NL_5 = \frac{[C_{20}\text{-[5]-ladderane fatty acid}]}{[C_{18}\text{-[5]-ladderane fatty acid}] + [C_{20}\text{-[5]-ladderane fatty acid}]} \quad (1)$$

此外,他们还测定了其他处于不同温度下的自然环境样品的梯烷脂肪酸含量,发现 NL₅ 指数和样品原位环境温度具有强相关性,因此利用 NL₅ 指数有可能确定沉积物中梯烷脂的来源(原位或非原位产生)^[37].对 *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 的冷适应策略研究发现,低温对该物种梯烷脂的影响主要体现在 3 个方面:[5]-梯烷烷基的碳链长度减少、sn-1 位点连接碳链更短的 C₁₄ 和 C₁₆ 非梯烷烷基以及 PE 首基的相对含量增加^[38].Kouba 等^[39]对 14 种不同温度下(10~37℃)的 Anammox 富集培养物梯烷脂的研究结果也表明随着温度降低 AnAOB 会减少[5]-梯烷烷基的碳链长度,而且还发现在低温下 AnAOB 主要的无首基梯烷和完整梯烷脂并不匹配,这些无首基梯烷可能是与低温适应有关的常规膜组分.上述研究的关注点主要为梯烷脂在温度改变时的变化,后续可基于梯烷脂生物合成通路的研究结果探究不同温度下候选梯烷脂合成基因/蛋白的表达量和梯烷脂含量及种类的变化,为揭示其合成通路提供重要依据.

5 总结与展望

梯烷脂是 AnAOB 独有的膜磷脂且相对含量较高,在 4 种不同属的 AnAOB 富集培养物中都可以检测到,能够作为指示 AnAOB 和 Anammox 活动的生物标记物,还可以作为可再生、高能量密度的航空燃料.从发现梯烷脂以来,已取得许多重要的研究进展,这些加深了人们对 AnAOB、Anammox 及地球氮循

环的认识,然而关于 AnAOB 梯烷脂仍然存在很多问题亟待解决,未来可开展如下研究:

5.1 可利用梯烷脂结合基因分子标记物探明 AnAOB 的种类和分布环境,研究特定环境中的氮循环过程以及评估 Anammox 对氮循环的贡献,还可以结合年代地层学和其他指标,重建古环境的地球化学演化规律。

5.2 梯烷脂是反映海洋缺氧事件的有效指示物,然而梯烷脂如何定量反映特定环境过去及现在的缺氧和富营养化事件,以及人类活动对水体环境的影响是值得深入探讨的问题.这可为未来生态环境变化预测提供有价值的理论依据。

5.3 目前仅在 AnAOB 中检测到梯烷脂,但是其他细菌类群或是古菌是否含有梯烷脂仍然是后续研究中应该关注的问题。

5.4 一些 AnAOB 新的种、属以及科陆续被发现,因此值得探究这些新的 AnAOB 是否也含有梯烷脂;如果检测到梯烷脂,则需要关注它们的梯烷脂含量、结构及种类,这将有助于揭示梯烷脂在 Anammox 过程中发挥的作用。

5.5 虽然化学合成的天然梯烷脂的通透性研究表明梯烷脂的功能很可能是阻止厌氧氨氧化体内部质子动力势的崩溃,但是这仅仅是基于两种天然梯烷脂的实验结果的推论,今后需要对其他的天然梯烷脂进行生物物理学表征以进一步检验该推论的正确性.此外,基于该推论,如何通过厌氧氨氧化体膜形成质子动力势则是待解答的另一个问题。

5.6 当前对于梯烷脂生物功能的假说之一是主要由梯烷脂构成的厌氧氨氧化体膜可以作为 Anammox 有毒中间产物肼的屏障.厌氧氨氧化体膜的组成较为复杂,而且 AnAOB 菌体内的其他细胞膜也含有梯烷脂,因此当前基于两种单一梯烷脂的体外膜渗透性实验结果仍不足以推翻上述假说.相比之下,活体的功能研究更具有说服力.可以考虑采用密度梯度离心技术获得高纯度的 AnAOB 菌体,进而分离出厌氧氨氧化体及其他细胞组分,检测各个组分中肼和其他 Anammox 中间产物的含量,相关结果将有助于检验上述假说的正确性。

5.7 比较基因组学和碳同位素标记分析初步揭示了梯烷脂的生物合成通路,但是梯烷脂(特别是关键结构串联的环丁烷基团)的生物合成通路仍然有待

阐明.因此,可以采用合适的技术方法如新的标记底物或标记方法、宏蛋白质组学、脂质组学、异源表达等深入挖掘梯烷脂的合成通路.而后,在梯烷脂的生物合成通路得到阐明的基础上,利用合成生物学技术和工程菌规模化生产梯烷脂,进而将其应用到工业生产领域。

参考文献:

- [1] Kuenen J G. Anammox and beyond [J]. *Environmental Microbiology*, 2020,22(2):525–536.
- [2] Kartal B, de Almeida N M, Maalcke W J, et al. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013,37(3):428–461.
- [3] Peeters S H, van Niftrik L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019,49:45–52.
- [4] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete [J]. *Nature*, 1999,400(6743):446–449.
- [5] Kartal B, Kuenen J G, van Loosdrecht M C M. Sewage treatment with anammox [J]. *Science*, 2010,328(5979):702–703.
- [6] Wang Y, Ji X M, Jin R C. How anammox responds to the emerging contaminants: Status and mechanisms [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021,293:112906.
- [7] 韩雪格,王峥嵘,彭永臻,等.几种重要因素对厌氧氨氧化过程的影响综述 [J]. *中国环境科学*, 2023,43(5):2220–2227.
Han X K, Wang Z R, Peng Y Z, et al. A review of several important factors influencing the anammox process [J]. *China Environmental Science*, 2023,43(5):2220–2227.
- [8] Neumann S, Wessels H, Rijpstra W I C, et al. Isolation and characterization of a prokaryotic cell organelle from the anammox bacterium *Kuenenia stuttgartiensis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2014,94(4):794–802.
- [9] Damste J S S, Strous M, Rijpstra W I C, et al. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane [J]. *Nature*, 2002,419(6908):708–712.
- [10] Peng M W, Guan Y, Liu J H, et al. Quantitative three-dimensional nondestructive imaging of whole anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2020,27(3):753–761.
- [11] Nouri D H, Tantillo D J. They came from the deep: Syntheses, applications, and biology of ladderanes [J]. *Current Organic Chemistry*, 2006,10(16):2055–2074.
- [12] Novak I. Ring strain in [n] ladderanes [J]. *Journal of Physical Chemistry A*, 2008,112(40):10059–10063.
- [13] Boumann H A, Longo M L, Stroeve P, et al. Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria: I. Ladderane phospholipids form highly organized fluid membranes [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2009,1788(7):1444–1451.
- [14] Rattray J E, van de Vossenberg J, Hopmans E C, et al. Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria [J]. *Archives of Microbiology*, 2008,190(1):51–66.
- [15] Zhao Z, Cao Y, Fan Y, et al. Ladderane records over the last century in

- the East China sea: Proxies for anammox and eutrophication changes [J]. *Water Research*, 2019,156:297–304.
- [16] Hamersley M R, Lavik G, Woebken D, et al. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone [J]. *Limnology and Oceanography*, 2007,52(3):923–933.
- [17] Brandsma J, van de Vossenberg J, Risgaard-Petersen N, et al. A multi-proxy study of anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011,3(3):360–366.
- [18] Jaeschke A, Hopmans E C, Wakeham S G, et al. The presence of ladderane lipids in the oxygen minimum zone of the Arabian Sea indicates nitrogen loss through anammox [J]. *Limnology and Oceanography*, 2007,52(2):780–786.
- [19] Jaeschke A, Abbas B, Zabel M, et al. Molecular evidence for anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in continental shelf and slope sediments off northwest Africa [J]. *Limnology and Oceanography*, 2010,55(1):365–376.
- [20] Kuypers M M M, Slikers A O, Lavik G, et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea [J]. *Nature*, 2003,422(6932):608–611.
- [21] Kuypers M M M, Lavik G, Woebken D, et al. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005,102(18):6478–6483.
- [22] Pitcher A, Villanueva L, Hopmans E C, et al. Niche segregation of ammonia-oxidizing archaea and anammox bacteria in the Arabian Sea oxygen minimum zone [J]. *ISME Journal*, 2011,5(12):1896–1904.
- [23] Rush D, Wakeham S G, Hopmans E C, et al. Biomarker evidence for anammox in the oxygen minimum zone of the Eastern Tropical North Pacific [J]. *Organic Geochemistry*, 2012,53:80–87.
- [24] Wakeham S G, Amann R, Freeman K H, et al. Microbial ecology of the stratified water column of the Black Sea as revealed by a comprehensive biomarker study [J]. *Organic Geochemistry*, 2007, 38(12):2070–2097.
- [25] Zhao Z S, Cao Y L, Li L, et al. Sedimentary ladderane core lipids as potential indicators of hypoxia in the East China Sea [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2013,31(1):237–244.
- [26] Chaban V V, Nielsen M B, Kopec W, et al. Insights into the role of cyclic ladderane lipids in bacteria from computer simulations [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2014,181:76–82.
- [27] van Niftrik L A, Fuerst J A, Damste J S S, et al. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004,233(1):7–13.
- [28] Moss F R, Shuken S R, Mercer J A M, et al. Ladderane phospholipids form a densely packed membrane with normal hydrazine and anomalously low proton/hydroxide permeability [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018,115(37):9098–9103.
- [29] Jetten M S M, van Niftrik L, Strous M, et al. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009,44(2/3):65–84.
- [30] van Niftrik L, Geerts W J C, van Donselaar E G, et al. 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.
- [31] Javidpour P, Deutsch S, Mutalik V K, et al. Investigation of proposed ladderane biosynthetic genes from Anammox bacteria by heterologous expression in *E. coli* [J]. *PLoS ONE*, 2016,11(3):e0151087.
- [32] Boumann H A, Hopmans E C, van de Leemput I, et al. Ladderane phospholipids in anammox bacteria comprise phosphocholine and phosphoethanolamine headgroups [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006,258(2):297–304.
- [33] Jaeschke A, Rooks C, Trimmer M, et al. Comparison of ladderane phospholipid and core lipids as indicators for anaerobic ammonium oxidation (anammox) in marine sediments [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2009,73(7):2077–2088.
- [34] Lanekoff I, Karlsson R. Analysis of intact ladderane phospholipids, originating from viable anammox bacteria, using RP-LC-ESI-MS [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010,397(8):3543–3551.
- [35] Jaeschke A, Ziegler M, Hopmans E C, et al. Molecular fossil evidence for anaerobic ammonium oxidation in the Arabian Sea over the last glacial cycle [J]. *Paleoceanography*, 2009,24:PA2202.
- [36] Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, et al. *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007,30(1):39–49.
- [37] Rattray J E, van de Vossenberg J, Jaeschke A, et al. Impact of temperature on ladderane lipid distribution in anammox bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010,76(5):1596–1603.
- [38] Kouba V, Vejmelkova D, Zwolsman E, et al. Adaptation of anammox bacteria to low temperature via gradual acclimation and cold shocks: Distinctions in protein expression, membrane composition and activities [J]. *Water Research*, 2022,209:117822.
- [39] Kouba V, Hurkova K, Navratilova K, et al. Effect of temperature on the compositions of ladderane lipids in globally surveyed anammox populations [J]. *Science of the Total Environment*, 2022,830:154715.
- [40] Quan Z X, Rhee S K, Zuo J E, et al. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11):3130–3139.
- [41] Mardanov A V, Beletsky A V, Ravin N V, et al. Genome of a novel bacterium “*Candidatus* Jettenia ecosi” reconstructed from the metagenome of an anammox bioreactor [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019,10:2442.
- [42] Yang Y, Lu Z, Azari M, et al. Discovery of a new genus of anaerobic ammonium oxidizing bacteria with a mechanism for oxygen tolerance [J]. *Water Research*, 2022,226:119165.
- [43] Suarez C, Dalcin Martins P, Jetten M S M, et al. Metagenomic evidence of a novel family of anammox bacteria in a subsea environment [J]. *Environmental Microbiology*, 2022,24(5):2348–2360.
- [44] Fuerst J A, Sagulenko E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011,9(6):403–413.
- [45] Rysgaard S, Glud R N. Anaerobic N₂ production in Arctic sea ice [J]. *Limnology and Oceanography*, 2004,49(1):86–94.

- [46] Hopmans E C, Kienhuis M V M, Rattray J E, et al. Improved analysis of ladderane lipids in biomass and sediments using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006,20(14):2099–2103.
- [47] Byrne N, Strous M, Crepeau V, et al. Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents [J]. *ISME Journal*, 2009,3(1):117–123.
- [48] Jaeschke A, den Camp H, Harhangi H, et al. 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009,67(3):343–350.
- [49] Hu J W, Zhang H L, Li L, et al. Seasonal changes of organic matter origins and anammox activity in the Changjiang Estuary deduced from multi-biomarkers in suspended particulates [J]. *Science China-Earth Sciences*, 2016,59(7):1339–1352.
- [50] Lai X S, Li X G, Song J M, et al. Nitrogen loss from the coastal shelf of the East China Sea: Implications of the organic matter [J]. *Science of the Total Environment*, 2023,854:158805.
- [51] Damste J S S, Rijpstra W I C, Geenevasen J A J, et al. Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox) [J]. *FEBS Journal*, 2005,272(16):4270–4283.
- [52] Mascitti V, Corey E J. Enantioselective synthesis of pentacycloanammoxic acid [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006,128(10):3118–3119.
- [53] White S W, Zheng J, Zhang Y M, et al. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis [M]. *Annual Review of Biochemistry*, 2005:791–831.
- [54] Strous M, Pelletier E, Manganot S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome [J]. *Nature*, 2006,440(7085):790–794.
- [55] Rattray J E, Strous M, den Camp H, et al. A comparative genomics study of genetic products potentially encoding ladderane lipid biosynthesis [J]. *Biology Direct*, 2009,4:8.
- [56] Rattray J E, Geenevasen J A J, Van Niftrik L, et al. Carbon isotope-labelling experiments indicate that ladderane lipids of anammox bacteria are synthesized by a previously undescribed, novel pathway [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009,292(1):115–122.
- [57] Chen S S, Tantillo D J. Potential for ladderane (bio)synthesis from oligo-cyclopropane precursors [J]. *ACS Omega*, 2020,5(40):26134–26140.
- [58] Mascitti V, Corey E J. Total synthesis of (+/-)-pentacycloanammoxic acid [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004,126(48):15664–15665.
- [59] Mercer J A M, Cohen C M, Shuken S R, et al. Chemical synthesis and self-assembly of a ladderane phospholipid [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016,138(49):15845–15848.
- [60] Line N J, Witherspoon B P, Hancock E N, et al. Synthesis of ent-3-ladderanol: Development and application of intramolecular chirality transfer 2+2cycloadditions of allenic ketones and alkenes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017,139(41):14392–14395.
- [61] Hancock E N, Kuker E L, Tantillo D J, et al. Lessons in strain and stability: enantioselective synthesis of (+)-5-ladderanoic acid [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020,59(1):436–441.
- [62] Ray S, Mondal S, Mukherjee S. Enantioselective total synthesis of [3]-ladderanol through late-stage organocatalytic desymmetrization [J]. *Angewandte Chemie*, 2022,134:e202201584.
- [63] Hopf H. Step by step – From nonnatural to biological molecular ladders [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003,42(25):2822–2825.
- [64] Hancock E N, Brown M K. Ladderane natural products: From the ground up [J]. *Chemistry—a European Journal*, 2021,27(2):565–576.
- [65] Epplin R C, Paul S, Herter L, et al. [2]-Ladderanes as isosteres for meta-substituted aromatic rings and rigidified cyclohexanes [J]. *Nature Communications*, 2022,13(1):6056.
- [66] Kartal B, van Niftrik L, Keltjens J T, et al. Anammox-growth physiology, cell Biology, and metabolism [M]. *Advances in Microbial Physiology*, 2012,60:211–262.
- [67] Strous M, Kuenen J G, Jetten M S M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999,65(7):3248–3250.
- [68] Liu L, Lv A-P, Narsing Rao M P, et al. Diversity and distribution of anaerobic ammonium oxidation bacteria in hot springs of Conghua, China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022,12:739234.
- [69] Li H, Chen S, Mu B Z, et al. Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs [J]. *Microbial Ecology*, 2010,60(4):771–783.
- [70] van de Vossenberg J, Rattray J E, Geerts W, et al. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11):3120–3129.
- [71] Russell N J. Mechanisms of thermal adaptation in bacteria – blueprints for survival [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1984,9(3):108–112.
- [72] Sandercock S P, Russell N J. The elongation of exogenous fatty-acids and the control of phospholipid acyl chain-length in *Micrococcus cryophilus* [J]. *Biochemical Journal*, 1980,188(3):585–592.
- [73] Sinensky M. Homeoviscous adaptation – homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1974,71(2):522–525.
- [74] Suutari M, Laakso S. Microbial fatty-acids and thermal adaptation [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1994,20(4):285–328.

作者简介: 王乙橙(1996-),男,重庆涪陵人,博士研究生,研究方向为环境微生物技术.发表论文3篇.bitmatrix@yeah.net.