

嫌気性アンモニア酸化 (anammox) 細菌の廃水処理への適用 Efficient Nitrogen Removal by Anaerobic Ammonium Oxidation (anammox) Process

押木 守¹, 佐藤 久², 岡部 聡^{2*}
MAMORU OSHIKI¹, HISASHI SATOH² and SATOSHI OKABE^{2*}

¹ 長岡工業高等専門学校環境都市工学科 〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町 888

² 北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

* TEL & FAX: 011-706-6266

* E-mail: sokabe@eng.hokudai.ac.jp

¹ Department of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology,
888 Nishikatakaimachi, Nagaoka, Niigata 940-8532, Japan

² Division of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Hokkaido University,
North-13, West-8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8628, Japan

キーワード: 嫌気性アンモニア酸化, 生理生態学的特性, 水浄化

Key words: anammox, ecophysiology, wastewater treatment

(原稿受付 2014 年 6 月 28 日 / 原稿受理 2014 年 7 月 2 日)

1. はじめに

好気性アンモニア酸化反応が古くから見いだされていたのに対して, 嫌気性アンモニア酸化反応 (anammox) は比較的最近に見いだされた生物反応であり, 発見に到るまでの歴史はなかなか興味深い。亜硝酸 (NO_2^-) を電子受容体とし, アンモニウム (NH_4^+) を嫌気的に酸化する反応を触媒する微生物が存在しえることを科学誌上で初めて提唱した人物は理論物理学者の E. Broda 博士であり, 論文の公表は 1977 年³⁾ のことである (余談であるが, Broda 博士は KGB の諜報スパイだった)。しばしば見過ごされる事実であるが, Broda 博士の仮説を支持する観測データは 1960 年代に報告されている。海洋学者である F.A. Richards 博士はフィヨルド海底における溶存酸素, 各態窒素濃度の分布を調査し, 無酸素領域で NH_4^+ と硝酸・亜硝酸 (NO_x^-) が同時に消費される現象を見いだしている^{58,59)}。結局, Broda 博士の仮説が実証されるまでには 1990 年代を待たねばならなかったが, 当時, デルフト工科大学の H. Kuenen 博士のもとへ市内の廃水処理場から興味深い報告がもたらされた。報告は, 「無酸素条件の反応槽内で NH_4^+ が消失しており, このときに硝酸も同時に消費されている」というものであった。Kuenen 博士は, この反応がある種の微生物によって行われているに違いないと考え, M.S.M. Jetten 博士 (現 Radboud 大学) とチームを組んで, 本現象の解明に取り組んだ。 NH_4^+ がある種の嫌気性微生物によって消費されることを実証した成果は 1995 年に FEMS Microbiology Ecology⁴⁶⁾ および Applied and Environmental Microbiology 誌上⁸⁰⁾ で報告され, これが微生物学者による嫌気性アンモニウム酸化 (anaerobic am-

monium oxidation, anammox) の研究の幕開けとなった。論文掲載直後は微生物学者の間ですら anammox の存在にコンセンサスが得られず, 論文査読に非常に苦労したようであるが, 1999 年に Nature 誌に掲載されて以降⁷¹⁾, 一流紙に anammox に関連した研究成果が度々紹介されており, 注目を集める研究分野となっている。本原稿では, anammox 細菌についてこれまでに明らかとなった知見を整理し, 著者の研究グループがこれまで取り組んだ成果を紹介する。

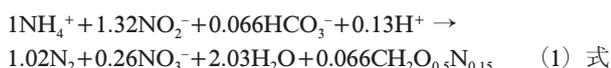
2. 系統学的分類

Anammox 細菌は *Bacteria* 界 *Planctomycetes* 門 *Brocadiales* 目に帰属される細菌である⁷¹⁾。Anammox 細菌は未だ純粋培養がなされておらず, 系統分類には全て “*Candidatus*” が付随しており, これまでに “*Ca. Brocadia*”, “*Ca. Kuenenia*”, “*Ca. Jettenia*”, “*Ca. Anammoxoglobus*”, “*Ca. Scalindua*”, “*Ca. Anammoximicrobium*” の 6 属が提案されている^{25,37)}。海洋で発見される anammox 細菌の 16S rRNA 遺伝子配列の大半が “*Ca. Scalindua*” へ分類されることから, “*Ca. Scalindua*” に帰属される anammox 細菌は海洋性 anammox 細菌としばしば見なされる^{65,88)}。なお, 環境由来の 16S rRNA 遺伝子配列のみが帰属する系統群も報告されており, 上述の 6 属には帰属されない anammox 細菌も存在する。

3. Anammox 反応の生理学

Anammox 反応は以下の化学量論式で表され, 大別して①亜硝酸還元, ②ヒドラジン合成, ③ヒドラジン酸化

の3ステップから構成される³⁵⁾。



亜硝酸還元は初発反応であり、過去に多くの議論がなされた。2006年以前の報告では、亜硝酸還元反応の産物はヒドロキシルアミン (NH_2OH) であると考えられていた^{24,81)}。しかし、2006年に“*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*”のゲノムが解読され、ゲノム上に一酸化窒素 (NO) を生成するシトクロム *cd1* 含有型亜硝酸還元酵素 (NirS) が見いだされたことを契機に⁷²⁾、亜硝酸還元反応の産物を一酸化窒素 (NO) とみなす仮説が提案された。最近になって、NOの生成を特異的に阻害すると anammox 活性が低下したことを受け³⁴⁾、この仮説が最も妥当と考えられている。NirSではなく、銅含有型亜硝酸還元酵素 (NirK) を用いる anammox 細菌も存在する¹⁴⁾。NO₂⁻のNOへの還元には電子を1個供給する必要がある、電子キャリアとして呼吸鎖複合体の *bc1* complex が関与すると考えられている³⁵⁾。

ヒドラジン合成では、NOとNH₄⁺が基質となりヒドラジンが合成される。この反応で強調すべき点は窒素二重結合を持つ化合物が合成される点であり、同様の反応はNO還元酵素でしか報告がない。ヒドラジン合成酵素はヘムタンパク質であり、3ないしは2個のサブユニットから構成されると考えられているものの、立体構造は明らかになっていない^{35,86)}。ヒドラジン合成には3個の電子が必要であるが、電子キャリアは同定されていない。なお、ヒドラジン合成酵素をコードする遺伝子のオーソログは現在までのところ anammox 細菌からしか見つかっておらず、anammox 細菌を環境中から検出するための遺伝子マーカーとして汎用されている¹⁰⁾。

Anammox 反応の最終ステップはヒドラジン酸化であり、ヒドラジンをN₂ガスへ酸化する過程で4個の電子を得る。ヒドラジン酸化はヒドラジン脱水酵素 (hydrazine dehydrogenase, Hdh) によって触媒され、本酵素はヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (hydroxylamine dehydrogenase, Hao) と高い配列相同性を示す^{34,64,67)}。Hdh, Hao はいずれもオクタヘムタンパクであり、ペンタヘムタンパクである cytochrome c nitrite reductase (NrfA) から進化したと考えられている^{38,66)}。HdhとHaoを比較すると、両者にはヘム結合モチーフに違いがあり、この違いがヒドラジンとヒドロキシルアミンに対する基質特異性につながると考えられている³⁵⁾。興味深いことに、anammox 細菌はゲノム上に複数の *hao/hdh* 遺伝子をコードしており、“*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*”では11コピーがゲノム上から見いだされている⁷²⁾。Anammox 細菌の細胞内ではHdhのみならず、Haoも高発現しており、HaoがNH₂OHを酸化してNOを生ずることが実証されている^{45,68)}。Anammox 細菌によるNH₂OHの生成は実証されていないが、細胞内で生じるNH₂OHをNOへ変換し、anammox 反応で利用していると考えられている³⁵⁾。

3. 環境分布および窒素代謝への寄与

Anammox 細菌は無酸素条件が成立しうる自然界、人工環境に幅広く存在することが既に明らかとなっている¹⁶⁾。先に述べたように anammox 細菌は廃水処理プラントから初めて見いだされたが、16S rRNA 遺伝子^{9,21)}、*hzs* 遺伝子¹⁰⁾、*hdh/hao* 遺伝子⁶⁶⁾ を標的とした PCR 法、fluorescence *in-situ* hybridization 法⁵⁴⁾ や脂肪酸分析^{6,15)} によって、様々な環境から anammox 細菌が検出されている。自然環境で言えば、海洋、汽水域、河川、湖沼、土壌から検出されているのみならず¹⁶⁾、海底熱水噴出孔^{4,48)}、海水⁶³⁾、永久凍土層^{20,55)}、油田土壌⁴¹⁾ といった環境からも anammox 細菌は検出されている。なお、anammox 細菌の16S rRNA 遺伝子は真性細菌、古細菌を標的としたユニバーサルプライマーに対してミスマッチがあるため、anammox 細菌の環境分布を16S rRNA 遺伝子にもとづいて調査する場合には適切なプライマー^{9,21)}を選定する必要がある。

Anammox 細菌は幅広い環境に生育し、窒素循環に大きく寄与している。Anammox 反応の窒素循環への寄与は¹⁵Nトレーサー法によって調査されてきた^{22,73,76)}。¹⁵Nトレーサー法ではバイオマスへ¹⁵NH₄⁺および¹⁴NO₂⁻または¹⁴NH₄⁺および¹⁵NO₂⁻を投与し、嫌気条件下で生成するN₂ガスを分析する。Anammox 反応からは²⁹N₂が生成するのに対し、脱窒反応では³⁰N₂を生ずるため、N₂ガス生成への anammox および脱窒反応の寄与を特異的に評価することができる。¹⁵Nトレーサー法はこれまでに幅広い環境サンプルへ適用され、anammox 反応の寄与を明らかにしてきた。例えば、海洋から大気へ放出されるN₂ガスのおよそ半分は酸素極小層 (oxygen minimum zone, OMZ) で生ずるが、ナミビア海のOMZで生成するN₂ガスのほぼ100%が anammox 反応に由来することが判明している^{39,65)}。海洋のみならず、淡水、土壌圏でも高い寄与率が明らかとなっている。例えば、中国の淡水湖沼を対象とした調査では、湖岸で生成するN₂ガスの最大94%が anammox 反応を経由したことが明らかとなっている⁸⁹⁾。ただし、これまで実施された調査全てが高い寄与率を報告しているわけではなく、脱窒反応が卓越するケースも多く報告されている。溶存酸素濃度³⁰⁾や硝酸・亜硝酸の利用性^{47,60)}、硫化物濃度^{27,28,87)}などの環境パラメータが anammox 活性の分布に影響することが明らかとなっている。

4. 生理学的特性

Anammox 細菌は独立栄養性の嫌気性細菌であり、酸素によって生育が不可逆的に阻害される⁷⁰⁾。これまでに複数の anammox 細菌が集積培養され、生理学的特性が調査されてきた。Anammox 細菌の生理学的特性を表1に示す。Anammox 細菌の増殖速度は一般的に遅く、倍加速度は通常1週間以上とされている。しかし、最近になって倍加速度3日を達成した例も報告されている⁴²⁾。これは膜分離型リアクターを用いて培養した anammox 細菌で測定された倍加速度であり、至適培養条件が整えられれば、この程度まで増殖速度を改善することができる可能性を示している。Anammox 細菌は中性 pH,

表 1. Anammox 細菌の生理学的特性一覧：n.d. 未測定

| | " <i>Ca. Brocadia sinica</i> " | " <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> " | " <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> " | " <i>Ca. Scalindua</i> sp." | " <i>Ca. Scalindua profunda</i> " |
|--|--------------------------------|--------------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| 増殖可能温度 (°C) | 25~45 | 20~43 | 10~30 | 25~37 | 15~45 |
| 増殖可能 pH | 7.0~8.8 | 6.7~8.3 | 6.0~8.5 | 6.5~9.0 | 7~8 |
| 塩耐性 (%) | <3% | n.d. | 1.5~4% | <4% | 3.3% |
| 増殖収率 (mmol C [mmol N] ⁻¹) | 0.063 | 0.07 | 0.03 | n.d. | n.d. |
| K _s for NH ₄ ⁺ (μM) | 28±4 | <5 | 3 | n.d. | n.d. |
| K _s for NO ₂ ⁻ (μM) | 34±21 | <5 | 0.45 | 0.2~3 | n.d. |
| タンパク含有率 (g protein [g VSS] ⁻¹) | 0.61 | 0.6 | 0.64 | n.d. | n.d. |
| 最大比増殖速度 μ _{max} (h ⁻¹) | 0.0041 | 0.0027 | 0.002 | 0.0026~0.0035 | 0.002 |
| 阻害耐性 | | | | | |
| NO ₂ ⁻ (mM) | <16 | 7 | 13, 25 | 7.5 | n.d. |
| NH ₄ ⁺ (mM) | n.d. | n.d. | n.d. | >16 | n.d. |
| 硫化物 (mM) | n.d. | n.d. | 0.01 | n.d. | n.d. |
| 溶存酸素 (μM) | <63 | <1 | 0~200 | n.d. | n.d. |
| リン酸 (mM) | <20 | n.d. | 20, 21 | n.d. | n.d. |
| メタノール (mM) | 1 | n.d. | 0.5 | n.d. | n.d. |

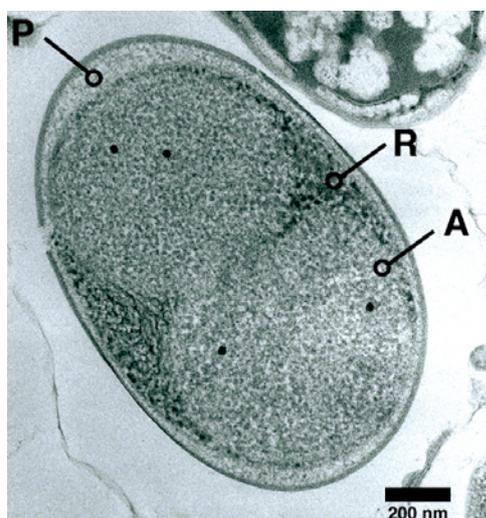


図 1. 透過型電子顕微鏡による "*Candidatus Brocadia sinica*" 細胞断面の観察⁵¹⁾：“*Ca. Brocadia sinica*”の細胞を樹脂包埋し、ウルトラミクロトームで切片を切り出し、透過型電子顕微鏡による観察を行った。Anammox 細菌の細胞は三層から構成され、それぞれ P：paraplast, R：riboplast, A：anammoxosome と呼ばれる。Anammoxosome 内に存在する黒点は細胞内に貯蔵された鉄粒子である。

30~37°C の温度域を好むが、海洋性の anammox 細菌である "*Ca. Scalindua*" はより低温域を好む傾向がある^{2,85)}。例えば、"*Ca. Scalindua*" の生息する海底沈積物からは 12~15°C で最も高い anammox 活性が検出されている^{5,62)}。Anammox 細菌の増殖を阻害する物質としては、溶存酸素の他に、塩濃度、硫化物、メタノール^{8,26)} が報告されている。硫化物については、硫化物が存在する環境では概して anammox 活性が低いことがフィールド調査^{27,28,87)} から見いだされており、H₂S の 50% 阻害濃度が 10±4 μM⁶¹⁾ と報告されている。一方、硫黄酸化細菌は H₂S を酸化、除去するため、anammox 細菌が硫黄酸化細菌近傍に共生する生存戦略を取っている事が明らかとなっている^{56,61)}。Anammox 細菌は細胞膜構造がグ

ラム陽性、陰性細菌と異なるため⁸³⁾、抗生物質に対する耐性が概して高い^{23,74)}。この特性を活かして、ペニシリン G やクロラムフェニコールを培地に添加して培養することで anammox 細菌特異的な活性を調査することができる。

また、anammox 細菌は anammox 反応以外に様々な代謝能を有することが知られている。例えば、anammox 細菌による鉄酸化、鉄・マンガン還元^{52,72,85)}、異化的硝酸還元 (dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA) 反応^{8,29,31,40)} が報告されている。鉄・マンガン還元、DNRA は有機物酸化を伴い、ギ酸、酢酸、プロピオン酸の酸化が確認されている³²⁾。硝酸還元反応における生成物は NO₂⁻ および NH₄⁺ であり、いずれも anammox 反応の基質である。従って、硝酸還元反応は貧栄養環境下で生存性を高めるための戦略と考えられている。

Anammox 細菌の構造学的特徴として細胞内小器官 anammoxosome を有することが挙げられる (図 1)⁸³⁾。Anammox 反応は anammoxosome 内で進行し、anammoxosome を隔ててプロトン濃度勾配が形成され、ATP が合成されると考えられており、きわめて重要な役割を持つ^{35,84)}。Anammoxosome にはラダラン脂質と呼ばれるシクロブタン環が付随した階段状の構造を持つ脂質が含まれており^{6,57)}、ラダラン脂質の生合成は anammox 細菌でしか確認されていない。

5. Anammox の廃水処理への応用

Anammox は次世代水浄化技術として、現在世界中で普及が進んでいる。廃水からの窒素除去は水圏の富栄養化現象防止のために重要であり、従来は硝化・脱窒法が用いられてきた。Anammox が次世代水浄化技術として注目される背景には、1) エネルギー消費量の削減 (従来技術と比較して曝気動力 62% 削減)、2) 余剰汚泥発生量の削減 (<70% 削減)、3) 脱窒反応に必要な有機物の投与が不要 (100% 削減)、4) 強力な温室効果ガスである N₂O ガスを放出しないといった利点がある^{33,69)}。

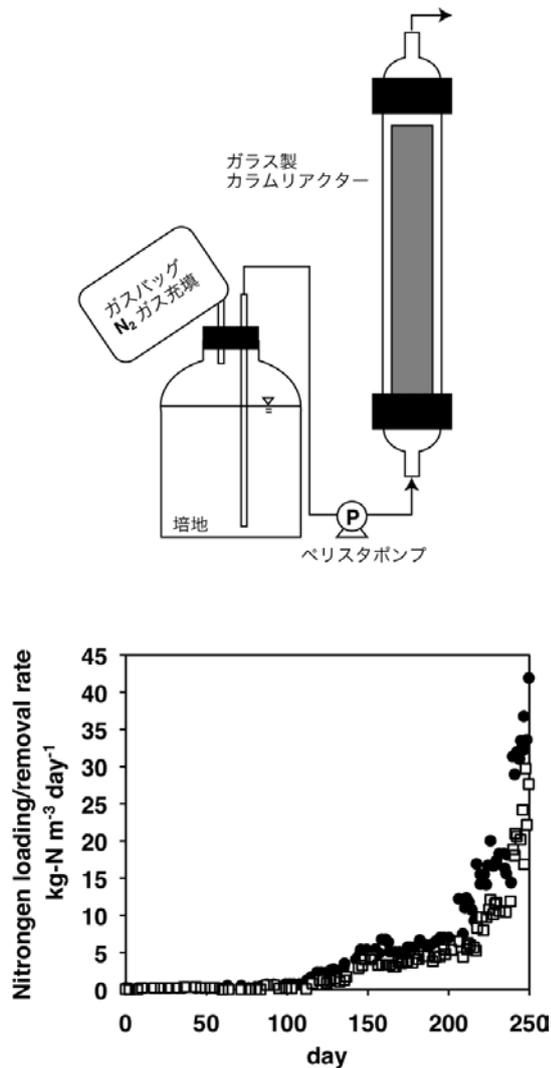


図2. “*Candidatus Brocadia sinica*”の培養に用いた連続培養装置と培養過程における窒素除去性能: a) 不織布(灰色)をカラムリアクター内へ充填し、リアクター下部より培地をペリスタポンプによって連続供給した。b) リアクターにおける窒素負荷(塗りつぶし)と窒素除去速度(中抜き)の挙動。培養100日経過後から窒素除去速度の増加が認められ、“*Ca. Brocadia sinica*”の増殖が確認された。

実廃水への anammox プロセスの適用は2008年から加速的に増加しており¹⁹⁾、ロッテルダムに設置されている世界最古の実規模 anammox プロセス(反応槽容積70 m³)は2002年から稼働している⁸²⁾。こうした大規模な処理槽の稼働によって、植種バイオマスの確保がますます容易になりつつあり、anammox プロセスの普及を後押しするものと考えられる。Anammox プロセスの適用はこれまで高濃度アンモニア含有廃水(汚泥消化液や半導体工場排水など)に集中してきたが、都市下水のような有機物を含む低濃度アンモニア含有廃水にも anammox プロセスが適用可能であることが最新の研究で明らかにされつつある^{11,12,43,44,50)}。

著者の研究グループでは次世代水浄化技術として anammox プロセスに注目し、処理性能の高効率化に取り組んできた。研究を開始した2000年前半は集積バイオマスを保有している研究室が限られており、培養のノ

ウハウが蓄積されていない状態から手探りで集積培養に取り組んだ。集積培養を成功させるためには、anammox 細菌が多く含まれるバイオマスから培養を開始することが有効であると予想されたため、我々は anammox 細菌の特異的検出・定量法を開発し、バイオマスの選別を行った⁷⁷⁾。下水処理場活性汚泥について定量を行ったところ、関西で稼働する下水処理場活性汚泥に anammox 細菌が多く存在することが確認されたため、この活性汚泥を植種源として培養を開始した。当初は密閉バイアルによる回分培養を行い、NH₄⁺ および NO₂⁻ が枯渇するたびに基質を再添加する方式で培養を行ったが、バイアル内での anammox 細菌の増殖は非常に遅かった⁷⁷⁾。我々は anammox 細菌の生成する代謝物によって増殖が阻害されているのではないかと考え、培養方法を連続式へ変更した⁷⁸⁾。連続式培養では、ガラスカラムリアクターの下部から基質を連続供給することによって、新鮮な培地が常に供給され、代謝物は速やかに上部から排出される(図2a)。さらに、バイオマスを不織布担体へ付着させ、リアクターからの菌体流出を防止した。このような連続培養法へ変更した結果、リアクター内部における anammox 活性が飛躍的に増加した(図2b)。さらに基質供給速度を高め、最大窒素除去速度を測定した結果、窒素除去速度は26 kg-N m⁻³ day⁻¹まで増加した⁷⁹⁾。これは従来技術である硝化・脱窒法の窒素除去速度と比較して1オーダー以上高い速度であり、きわめて優れた窒素除去能を有することがわかる。最近では不織布充填型カラムリアクターとは異なる培養法として、膜分離法を用いた培養法も開発している。これは、anammox 細菌の細胞よりも小さい径をもつ膜を用いて、物理的に細胞と培地を分離しながら連続培養する方法であり、本培養法を用いることで anammox 細菌をシングルセル状態で培養することに成功している⁵³⁾。

続いて、培養に成功した anammox 細菌の同定を行った。まず、anammox 細菌特異的な蛍光遺伝子プローブを用いた fluorescence *in-situ* hybridization 法によって anammox 細菌の存在量を定量した結果、バイオマスの9割以上が anammox 細菌によって占められていることが明らかとなった。本 anammox 細菌を同定するため、バイオマスからゲノム DNA を抽出し、16S-23S rRNA 遺伝子を対象とした PCR およびシーケンス解析を行った結果、本細菌は“*Ca. Brocadia*”属に帰属される anammox 細菌であり、より詳細には“*Ca. Brocadia sinica*”へ帰属される細菌であることが判明した⁵¹⁾。余談であるが、我々の論文査読中に“*Ca. Brocadia sinica*”の分類が提唱されてしまい¹⁶⁾、我々が投稿論文中で提案していた分類名はタッチの差でお蔵入りとなってしまった。“*Ca. Brocadia sinica*”はこれまでに日本、中国、ヨーロッパで検出されており、いずれも窒素負荷の比較的高い廃水処理リアクターから検出されている。

“*Ca. Brocadia sinica*”を廃水処理へ応用する上で、本細菌の至適培養条件および阻害物質への耐性を事前に把握しておくことは肝要である。そこで、我々は“*Ca. Brocadia sinica*”の生理学的特性を調査した(表1)。“*Ca. Brocadia sinica*”と他の anammox 細菌を比較すると、“*Ca. Brocadia sinica*”は高い増殖速度を持つ反面、基質親和性が低い特徴を有している。従って、“*Ca. Brocadia sinica*”

ca”を用いる場合には、基質濃度の高い廃水への適用が特に好ましいと考えられる。一方、基質親和性から考えると、“*Ca. Brocadia sinica*”は自然環境のような栄養環境では競合に不利である。これは、“*Ca. Brocadia sinica*”が窒素負荷の比較的高い廃水処理リアクターから検出されているという既往の検出報告と一致する。“*Ca. Brocadia sinica*”による処理過程では N_2O はごくわずかにしか生成せず、これは温室効果ガス排出量削減という観点から好ましい特長であった⁴⁹⁾。“*Ca. Brocadia sinica*”は溶存酸素に対して比較的高い耐性をもち、植種などの作業で一時的に酸素に曝されても失活する恐れが低い。従って、“*Ca. Brocadia sinica*”は他の酸素感受性の高いanammox細菌よりも容易に取り扱うことができる利点がある。

“*Ca. Brocadia sinica*”の生理学的特性を調査する過程で、anammox細菌が鉄酸化硝酸還元能を有することが判明した⁵²⁾。Anammox細菌のバイオマスへ硝酸と第一鉄を与えて培養を行った際、鉄酸化に伴って硝酸が還元され、 N_2 ガスが生成した。鉄酸化硝酸還元能がanammox細菌によって触媒されたことを検証する目的で抗生物質（ペニシリン G およびクロラムフェニコール）を添加しながら培養を行ったが、この場合にも同様の鉄酸化硝酸還元反応が生じた。従って、鉄酸化硝酸還元反応はanammox細菌によって担われていたと言える。鉄酸化硝酸還元反応で興味深い点は、“*Ca. Brocadia sinica*”のゲノム（未公開）には N_2 ガスの生成に関与する亜酸化窒素還元酵素（NosZ）がコードされていないにも関わらず N_2 ガスが生成した点である。鉄酸化硝酸還元反応における N_2 ガスの生成経路を調査するため、 $^{15}NO_3^-$ を用いたトレーサー試験を実施した。その結果、DNRAによって $^{15}NO_3^-$ は、 $^{15}NO_2^-$ を経て、 $^{15}NH_4^+$ まで還元されており、 $^{15}NO_2^-$ と $^{15}NH_4^+$ からanammox反応によって N_2 ガスを生じたことが明らかとなった。このような鉄酸化硝酸還元反応を利用することによって、anammoxプロセスを高機能化することが可能である。なぜなら、鉄酸化硝酸還元をanammox細菌に行わせることによって処理水中の NO_3^- 濃度を低減することができ、かつ、anammox反応に必要な NO_2^- を硝酸還元から供給することができるためである。Anammox反応では最終生成物として N_2 ガスに加えて NO_3^- を生成し（(1)式参照）、 NO_3^- が高濃度になる場合にはポスト処理が必要であった。また、廃水中の窒素化合物はアンモニア態窒素であり、anammox反応の基質である NO_2^- を供給するために部分硝化反応が必要となり、曝気動力を消費してきた。鉄酸化硝酸還元反応はこれら二つの問題を同時に解決する一石二鳥の効果を持つ反応である。事実、“*Ca. Brocadia sinica*”に NH_4^+ 、 NO_2^- および Fe^{2+} を与えて培養した際、 Fe^{2+} を添加しなかった場合に比べて、硝酸の生成量が少なく、 NO_2^- の要求量は低くなり⁵²⁾、連続プロセスへの応用が期待される。

著者らは最近ではゲノミクス解析に基づく生理学的特性の解明にも取り組んでいる。これはanammox細菌のような増殖速度の遅い細菌の生理学的特性を網羅的に明らかにするには培養依存的な方法では難しいためである。これまでに、“*Ca. Brocadia sinica*”の集積バイオマスを用いて、全ゲノム解読を行っており、454パイロ

シーケンサーを用いたショットガンシーケンスによって、ゲノム配列の再構築に成功している。再構築されたゲノム配列は3個のコンティグによって構成され、全長は4.07 Mbであった。ゲノム上には3,912個の遺伝子がコードされており、それらの遺伝子によってanammox反応や炭酸固定などの主要な代謝経路を再構築することができた。他のanammox細菌では、“*Ca. Kuenenia*”⁷²⁾、“*Ca. Jettenia*”^{14,18)}もゲノム配列が解読されており、それらのゲノム配列とblastPによる相同性解析を行ったところ、約3割の遺伝子が“*Ca. Brocadia sinica*”のゲノムにしか存在しないことが判明した。Anammox細菌のゲノムには遺伝的多様性が存在し、anammox細菌の生理学的特性の違いに反映されていると考えられる。

ゲノム解析から見いだされた興味深い発見は、“*Ca. Brocadia sinica*”のゲノム上にNO生成型亜硝酸還元酵素（NirSおよびNirK）がコードされていない点である。nirSおよびnirKの不在は、“*Ca. Brocadia*”属に帰属される“*Ca. Brocadia flugida*”でも報告がある⁷⁾。“*Ca. Brocadia sinica*”の細胞破砕物に $^{15}NO_2^-$ と電子供与体（還元型5-methylphenazinium methyl sulfate, N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamineあるいはcytochrome *c*）を加えて培養すると ^{15}NO を生ずることから、 NO_2^- はNOへ還元されていると考えられるが、触媒酵素はいまだ不明である。NirSおよびNirKとは異なる新規な亜硝酸還元酵素がanammox反応に関与している可能性が高く、現在“*Ca. Brocadia sinica*”の細胞破砕物から亜硝酸還元酵素を精製することを試みている。

6. 今後の展望

Anammox細菌のゲノミクス解析を通じて、anammox細菌の新たな生理学的特性の一面が明らかにされようとしている。しかしながら、anammox細菌は純粋培養されておらず、遺伝子破壊や組み換えといった機能同定に従来用いられてきた強力なツールを用いて機能を解析することが困難である。こうした理由により、天然タンパク質の精製および結晶構造解析という古典的手法のニーズが高まっている。例えば、anammox細菌のヒドラジン合成酵素は細胞内での発現量が極めて高く、集積バイオマスを用いれば本酵素を精製することはさほど難しくなく、本酵素は、繰り返しになるが、窒素二重結合を形成する反応を触媒する極めて興味深い酵素であり、その反応メカニズム、結晶構造は大変に興味深い。

廃水処理分野でのanammoxの普及は今後も加速度的に進むと考えられる。2008年まで普及が進まなかった理由は新しいプロセスを立ち上げるための種汚泥を確保することが困難だったためであるが、近年では稼働プラント数が増えたため、バイオマスの確保は容易になりつつある。また、anammoxバイオマスの保存方法も調査が進み、冷蔵・冷凍条件下で比較的長期間活性を維持できることが明らかとなっている^{1,13,36)}。こうしたバイオマスの確保が容易になったことや生理学的な知見の集積によりanammoxプロセスの普及はさらに加速するはずである。

また、anammox反応の中間代謝物であるヒドラジンはロケット燃料の原料になり得る物質であり、燃料の原

料として回収しようとする計画が過去に報告されている (http://news.nationalgeographic.com/news/2005/11/1109_051109_rocketfuel.html)。最近になって、anammox 細菌からヒドラジン合成酵素が精製され、試験管内ではあるが、ヒドラジンの合成が実証されている³⁴⁾。今のところ、酵素活性がきわめて低いが、これはヒドラジン合成酵素がタンパク質複合体であり、タンパク質精製過程において変性したためではないかと考えられている。ヒドラジン合成酵素によるヒドラジンの生合成およびエネルギー源としての回収はバイオテクノロジーの観点からきわめて興味深い。そのためには、ヒドラジン合成酵素によるヒドラジン合成の様式を理解することがまず必要であり、そのためにもヒドラジン合成酵素の結晶構造解析が待たれる。ヒドラジン合成酵素の異種発現も過去に実施されており⁷⁵⁾、バイオテクノロジーによるヒドラジンの人工合成が達成される日はそう遠くないかもしれない。

謝 辞

原稿執筆の機会を頂きました環境バイオテクノロジー学会誌論文編集委員の皆様へ厚く御礼申し上げます。研究実施にあたり、和木美代子博士（農業・食品産業技術総合研究機構）、金田一智規助教（広島大学工学研究院）、笠原康裕准教授（北海道大学低温科学研究所）、森川正章教授（北海道大学環境科学院）から多大な技術指導を頂きました。ここに感謝の意を表します。原稿で紹介した著者らの研究は NEDO 「嫌気性アンモニア酸化プロセスを軸とした高効率窒素除去システムの開発」、JSPS 特別研究員研究奨励金 23-4128 の一部として行われたことを付記し、感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ali, M., M. Oshiki, and S. Okabe. 2014. Rapid and effective preservation and reactivation of an anaerobic ammonium oxidizing bacterium "*Candidatus Brocadia sinica*". *Water Res.* doi:10.1016/j.watres.2014.03.036
- 2) Awata, T., M. Oshiki, T. Kindaichi, N. Ozaki, A. Ohashi, and S. Okabe. 2013. Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium belonging to the "*Candidatus Scalindua*" group. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 4145–4148.
- 3) Broda E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17: 491–493.
- 4) Byrne, N., M. Strous, V. Crepeau, B. Kartal, J.L. Birrien, M. Schmid, F. Lesongeur, S. Schouten, A. Jaeschke, M. Jetten, D. Prieur, and A. Godfroy. 2009. Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME J.* 3: 117–123.
- 5) Dalsgaard, T. and B. Thamdrup. 2002. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3802–3808.
- 6) Damsté, J.S.S., M. Strous, W.L.C. Rijpstra, E.C. Hopmans, J.A.J. Geenevasen, A.C.T. van Duin, L.A. van Niftrik, and M.S.M. Jetten. 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* 419: 708–712.
- 7) Gori, F., S.G. Tringe, B. Kartal, E. Machiori, and M.S.M. Jetten. 2011. The metagenomic basis of anammox metabolism in *Candidatus 'Brocadia fulgida'*. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1799–1804.
- 8) Güven, D., A. Dapena, B. Kartal, M.C. Schmid, B. Maas, K.

- van de Pas-Schoonen, S. Sozen, R. Mendez, H.J.M. Op den Camp, M.S.M. Jetten, M. Strous, and I. Schmidt. 2005. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1066–1071.
- 9) Han, P., Y.T. Huang, J.G. Lin, and J.D. Gu. 2013. A comparison of two 16S rRNA gene-based PCR primer sets in unraveling anammox bacteria from different environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 10521–10529.
- 10) Harhangi, H.R., M.L. Roy, T. van Alen, B.L. Hu, J. Groen, B. Kartal, S.G. Tringe, Z.X. Quan, M.S.M. Jetten, and H.J.M. Op den Camp. 2012. Hydrazine synthase, a unique phylogenetic marker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 752–758.
- 11) Hendrickx, T., Y. Wang, C. Kampman, G. Zeeman, H. Temmink, and C. Buisman. 2012. Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature. *Water Res.* 46: 2187–2193.
- 12) Hendrickx, T.L.G., C. Kampman, G. Zeeman, H. Temmink, Z. Hu, B. Kartal, and C.J.N. Buisman. 2014. High specific activity for anammox bacteria enriched from activated sludge at 10°C. *Bioresour. Technol.* 163: 214–221.
- 13) Heylen, K., K. Ertwig, Z. Hu, M. Jetten, and B. Kartal. 2012. Rapid and simple cryopreservation of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 3010–3013.
- 14) Hira, D., H. Toh, C.T. Migita, H. Okubo, T. Nishiyama, M. Hattori, K. Furukawa, and T. Fujii. 2012. Anammox organism KSU-1 expresses a NirK-type copper-containing nitrite reductase instead of a NirS-type with cytochrome *cd*. *FEBS Lett.* 586: 1658–1663.
- 15) Hopmans, E.C., M.V.M. Kienhuis, J.E. Rattray, A. Jaeschke, S. Schouten, and J.S. Sinninghe Damsté. 2006. Improved analysis of ladderane lipids in biomass and sediments using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 2099–2103.
- 16) Hu, B.L., P. Zheng, C.J. Tang, J.W. Chen, E. van der Biezen, L. Zhang, B.J. Ni, M.S.M. Jetten, J. Yan, H.Q. Yu, and B. Kartal. 2010. Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors. *Water Res.* 44: 5014–5020.
- 17) Hu, B.L., L.D. Shen, X.Y. Xu, and P. Zheng. 2011. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1811–1816.
- 18) Hu, Z., D.R. Speth, K.J. Francoijs, Z.X. Quan, and M.S.M. Jetten. 2012. Metagenome analysis of a complex community reveals the metabolic blueprint of anammox bacterium "*Candidatus Jettenia asiatica*". *Front. Microbiol.* 3: 366.
- 19) Hu, Z., T. Lotti, M. van Loosdrecht, and B. Kartal. 2013. Nitrogen removal with the anaerobic ammonium oxidation process. *Biotechnol. Lett.* 35: 1145–1154.
- 20) Humbert, S., S. Tarnawski, N. Fromin, M.P. Mallet, M. Aragno, and J. Zopfi. 2010. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *ISME J.* 4: 450–454.
- 21) Humbert, S., J. Zopfi, and S.E. Tarnawski. 2012. Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environ. Microbiol. Rep.* 4: 484–490.
- 22) Isobe, K., K. Koba, S. Ueda, K. Senoo, S. Harayama, and Y. Suwa. 2011. A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. *J. Microbiol. Methods* 84: 46–51.
- 23) Jetten, M., M. Strous, K. van de Pas-Schoonen, J. Schalk, U. van Dongen, A. van de Graaf, S. Logemann, G. Muyzer, M. van Loosdrecht, and J. Kuenen. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 421–437.
- 24) Jetten, M., M. Wagner, J. Fuerst, M. van Loosdrecht, G. Kuenen, and M. Strous. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 283–288.

- 25) Jetten, M.S.M., H.J.M. Op den Camp, J.G. Kuenen, and M. Strous. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology: the Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*, pp. 918–925. In N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig, and W.B. Whitman (eds.), *Bergey's manual*, Springer-Verlag, New York, USA.
- 26) Jensen, M.M., B. Thamdrup, and T. Dalsgaard. 2007. Effects of specific inhibitors on anammox and denitrification in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3151–3158.
- 27) Jensen, M.M., M.M.M. Kuypers, G. Lavik, and B. Thamdrup. 2008. Rates and regulation of anaerobic ammonium oxidation and denitrification in the Black Sea. *Limnol. Oceanogr.* 53: 23–36.
- 28) Jensen, M.M., J. Petersen, T. Dalsgaard, and B. Thamdrup. 2009. Pathways, rates, and regulation of N₂ production in the chemocline of an anoxic basin, Mariager Fjord, Denmark. *Marine Chem.* 113: 102–113.
- 29) Jensen, M.M., P. Lam, N.P. Revsbech, B. Nagel, B. Gaye, M.S.M. Jetten, and M.M.M. Kuypers. 2011. Intensive nitrogen loss over the Omani Shelf due to anammox coupled with dissimilatory nitrite reduction to ammonium. *ISME J.* 5: 1660–1670.
- 30) Kalvelage, T., M.M. Jensen, S. Contreras, N.P. Revsbech, P. Lam, M. Gunter, J. LaRoche, G. Lavik, and M.M.M. Kuypers. 2011. Oxygen sensitivity of anammox and coupled N-cycle processes in oxygen minimum zones. *PLoS One* 6: e29299.
- 31) Kartal, B., M.M.M. Kuypers, G. Lavik, J. Schalk, H.J.M. Op den Camp, M.S.M. Jetten, and M. Strous. 2007. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ. Microbiol.* 9: 635–642.
- 32) Kartal, B., L. van Niftrik, J. Rattray, J.L.C.M. van de Vossenberg, M.C. Schmid, J.S. Damsté, M.S.M. Jetten, and M. Strous. 2008. *Candidatus* 'Brocadia fulgida': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 46–55.
- 33) Kartal, B., J.G. Kuenen, and M.C.M. van Loosdrecht. 2010. Sewage treatment with anammox. *Science* 328: 702–703.
- 34) Kartal, B., W.J. Maalcke, N.M. de Almeida, I. Cirpus, J. Gloerich, W. Geerts, H.J.M. Op den Camp, H.R. Harhangi, E.M. Janssen-Megens, K.J. Francoijs, H.G. Stunnenberg, J.T. Keltjens, and M.S.M. Jetten. 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* 479: 127–130.
- 35) Kartal, B., N.M. de Almeida, W.J. Maalcke, H.J.M. Op den Camp, M.S.M. Jetten, and J.T. Keltjens. 2013. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 428–461.
- 36) Kerckhof, F.M., E.N.P. Courtens, A. Geirnaert, S. Hoefman, A. Ho, R. Vilchez-Vargas, D.H. Pieper, R. Jauregui, S.E. Vlaeminck, T.V. de Wiele, P. Vandamme, K. Heylen, and N. Boon. 2014. Optimized cryopreservation of mixed microbial communities for conserved functionality and diversity. *PLoS ONE* 9: e99517.
- 37) Khramenkov, S.V., M.N. Kozlova, M.V. Kevbrina, A.G. Dorofeev, E.A. Kazakova, V.A. Grachev, B.B. Kuznetsov, D. Yu. Polyakov, and Yu.A. Nikolaev. 2013. A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge. *Microbiology (Moscow)* 82: 628–636.
- 38) Klotz, M.G., M.C. Schmid, M. Strous, H.J.M. op den Camp, M.S.M. Jetten, and A.B. Hooper. 2008. Evolution of an octahaem cytochrome *c* protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria. *Environ. Microbiol.* 10: 3150–3163.
- 39) Kuypers, M.M.M., G. Lavik, D. Woebken, M. Schmid, B.M. Fuchs, R. Amann, B.B. Jørgensen, and M.S.M. Jetten. 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 6478–6483.
- 40) Lam, P., G. Lavik, M.M. Jensenaand Jack van de Vossenberg, M. Schmid, D. Woebken, D. Gutiérrez, R. Amann, M.S.M. Jetten, and M.M.M. Kuypers. 2009. Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 4752–4757.
- 41) Li, H., S. Chen, B.Z. Mu, and J.D. Gu. 2010. Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs. *Microb. Ecol.* 60: 771–783.
- 42) Lotti, T., R. Kleerebezem, C. Lubello, and M.C. van Loosdrecht. 2014. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. *Water Res.* doi: 10.1016/j.watres.2014.04.017
- 43) Lotti, T., R. Kleerebezem, C. van Erp Taalman Kip, T. Hendrickx, J. Kruit, and M.V. Loosdrecht. 2014. Anammox growth on pretreated municipal wastewater. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/es500632k
- 44) Ma, B., Y. Peng, S. Zhang, J. Wang, Y. Gan, J. Chang, S. Wang, S. Wang, and G. Zhu. 2013. Performance of anammox UASB reactor treating low strength wastewater under moderate and low temperatures. *Bioresour. Technol.* 129: 606–611.
- 45) Maalcke, W.J., A. Dietl, S.J. Marritt, J.N. Butt, M.S.M. Jetten, J.T. Keltjens, T.R.M. Barends, and B. Kartal. 2014. Structural basis of biological NO generation by octaheme oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* E-pub ahead: doi: 10.1074/jbc.M113.525147
- 46) Mulder, A., A.A. van de Graaf, L.A. Robertson, and J.G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 177–184.
- 47) Nicholls, J.C. and M. Trimmer. 2009. Widespread occurrence of the anammox reaction in estuarine sediments. *Aquat. Microb. Ecol.* 55: 105–113.
- 48) Nunoura, T., M. Nishizawa, T. Kikuchi, T. Tsubouchi, M. Hirai, O. Koide, J. Miyazaki, H. Hirayama, K. Koba, and K. Takai. 2013. Molecular biological and isotopic biogeochemical prognoses of the nitrification-driven dynamic microbial nitrogen cycle in hadopelagic sediments. *Environ. Microbiol.* 15: 3087–3107.
- 49) Okabe, S., M. Oshiki, Y. Takahashi, and H. Satoh. 2011. N₂O emission from a partial nitrification anammox process and identification of a key biological process of N₂O emission from anammox granules. *Water Res.* 45: 6461–6470.
- 50) Osaka, T., Y. Kimura, Y. Otsubo, Y. Suwa, S. Tsuneda, and K. Isaka. 2012. Temperature dependence for anammox bacteria enriched from freshwater sediments. *J. Biosci. Bioeng.* 114: 429–434.
- 51) Oshiki, M., M. Shimokawa, N. Fujii, H. Satoh, and S. Okabe. 2011. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium '*Candidatus* Brocadia sinica'. *Microbiology* 157: 1706–1713.
- 52) Oshiki, M., S. Ishii, K. Yoshida, N. Fujii, M. Ishiguro, H. Satoh, and S. Okabe. 2013. Nitrate-dependent ferrous iron oxidation by anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 4087–4093.
- 53) Oshiki, M., T. Awata, T. Kindaichi, H. Satoh, and S. Okabe. 2013. Cultivation of planktonic anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria by using membrane bioreactor. *Microbes Environ.* 28: 436–443.
- 54) Pavlekovic, M., M.C. Schmid, N. Schmider-Poignee, S. Spring, M. Pilhofer, T. Gaul, M. Fiandaca, F.E. Loeffler, M. Jetten, K.-H. Schleifer, and N.M. Lee. 2009. Optimization of three FISH procedures for *in situ* detection of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in biological wastewater treatment. *J. Microbiol. Methods* 78: 119–126.
- 55) Penton, C.R., A.H. Devol, and J.M. Tiedje. 2006. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-

- oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6829–6832.
- 56) Prokopenko, M.G., M.B. Hirst, L. De Brabandere, D.J.P. Lawrence, W.M. Berelson, J. Granger, B.X. Chang, S. Dawson, E.J. Crane Iii, L. Chong, B. Thamdrup, A. Townsend-Small, and D.M. Sigman. 2013. Nitrogen losses in anoxic marine sediments driven by Thioploca-Anammox bacterial consortia. *Nature* 500: 194–198.
 - 57) Rattray, J.E., J. van de Vossenberg, E.C. Hopmans, B. Kartal, L. van Niftrik, W.I.C. Rijpstra, M. Strous, M.S.M. Jetten, S. Schouten, and J.S. Sinninghe Damsté. 2008. Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria. *Arch. Microbiol.* 190: 51–66.
 - 58) Richards, F.A. 1965. Anoxic basins and fjords, pp. 611–645. In J.P. Riley and G. Skirrow (eds.), *Chemical Oceanography*. Academic Press, London, United Kingdom.
 - 59) Richards, F.A. 1965. Chemical observations in some anoxic, sulfide-bearing basins and fjords, pp. 215–232. In E.A. Pearson (ed.), *Advances in Water Pollution Research*. Pergamon Press, London, United Kingdom.
 - 60) Risgaard-Petersen, N., R.L. Meyer, and N.P. Revsbech. 2005. Denitrification and anaerobic ammonium oxidation in sediments: effects of microphytobenthos and NO₃⁻. *Aquat. Microb. Ecol.* 40: 67–76.
 - 61) Russ, L., D.R. Speth, M.S.M. Jetten, H.J.M. Op den Camp, and B. Kartal. 2014. Interactions between anaerobic ammonium and sulfur-oxidizing bacteria in a laboratory scale model system. *Environ. Microbiol.* DOI: 10.1111/1462-2920.12487
 - 62) Rysgaard, S., R.N. Glud, N. Risgaard-Petersen, and T. Dalsgaard. 2004. Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol. Oceanogr.* 49: 1493–1502.
 - 63) Rysgaard, S., R.N. Glud, M.K. Sejr, M.E. Blicher, and H.J. Stahl. 2008. Denitrification activity and oxygen dynamics in Arctic sea ice. *Polar Biol.* 31: 527–537.
 - 64) Schalk, J., S. de Vries, J. Gijs Kuenen, and M.S.M. Jetten. 2000. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation. *Biochemistry* 39: 5405–5412.
 - 65) Schmid, M.C., N. Risgaard-Petersen, J. van de Vossenberg, M.M.M. Kuypers, G. Lavik, J. Petersen, S. Hulth, B. Thamdrup, D. Canfield, T. Dalsgaard, S. Rysgaard, M.K. Sejr, M. Strous, H.J.M. Op den Camp, and M.S.M. Jetten. 2007. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ. Microbiol.* 9: 1476–1484.
 - 66) Schmid, M.C., A.B. Hooper, M.G. Klotz, D. Woebken, P. Lam, M.M.M. Kuypers, A. Pommerening-Roeser, H.J.M. op den Camp, and M.S.M. Jetten. 2008. Environmental detection of octahaem cytochrome *c* hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environ. Microbiol.* 10: 3140–3149.
 - 67) Shimamura, M., T. Nishiyama, H. Shigetomo, T. Toyomoto, Y. Kawahara, K. Furukawa, and T. Fujii. 2007. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1065–1072.
 - 68) Shimamura, M., T. Nishiyama, K. Shinya, Y. Kawahara, K. Furukawa, and T. Fujii. 2008. Another multiheme protein, hydroxylamine oxidoreductase, abundantly produced in an anammox bacterium besides the hydrazine-oxidizing enzyme. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 243–248.
 - 69) Strous, M., E. van Gerven, P. Zhen, J. Gijs Kuenen, and M.S.M. Jetten. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Res.* 31: 1955–1962.
 - 70) Strous, M., J. Gijs Kuenen, and M.S.M. Jetten. 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *AEM* 65: 3248–3250.
 - 71) Strous, M., J. Fuerst, E. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K. van de Pas-Schoonen, R. Webb, J. Kuenen, and M. Jetten. 1999. Missing lithotroph identified as new *planctomycete*. *Nature* 400: 446–449.
 - 72) Strous, M., E. Pelletier, S. Manganot, T. Rattei, A. Lehner, M. Taylor, M. Horn, H. Daims, D. Bartol-Mavel, P. Wincker, V. Barbe, N. Fonknechten, D. Vallenet, B. Segurens, C. Schenowitz-Truong, C. Medigue, A. Collingro, B. Snel, B. Dutilh, H. Op den Camp, C. van der Drift, I. Cirpus, K. van de Pas-Schoonen, H. Harhangi, L. van Niftrik, M. Schmid, J. Keltjens, J. van de Vossenberg, B. Kartal, H. Meier, D. Frishman, M. Huynen, H. Mewes, J. Weissenbach, M. Jetten, M. Wagner, and D. Le Paslier. 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440: 790–794.
 - 73) Thamdrup, B. and T. Dalsgaard. 2002. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1312–1318.
 - 74) Toh, S.K., R.I. Webb, and N.J. Ashbolt. 2002. Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters. *Microbiol. Ecol.* 43: 154–167.
 - 75) Tojo, F., Y. Itoh, S. Okabe, and M. Morikawa. 2011. Analyses of three dominant membrane proteins from anammox *Planctomycete Candidatus* ‘Brocadia sinica’. *J. Environ. Biotechnol.* 11: 1–5.
 - 76) Trimmer, M., N. Risgaard-Petersen, J.C. Nicholls, and P. Engström. 2006. Direct measurement of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in intact sediment cores. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 326: 37–47.
 - 77) Tsushima, I., T. Kindaichi, and S. Okabe. 2007. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Res.* 41: 785–794.
 - 78) Tsushima, I., Y. Ogasawara, M. Shimokawa, T. Kindaichi, and S. Okabe. 2007. Development of a super high-rate anammox reactor and *in situ* analysis of biofilm structure and function. *Water Sci. Technol.* 55: 9–17.
 - 79) Tsushima, I., Y. Ogasawara, T. Kindaichi, H. Satoh, and S. Okabe. 2007. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Res.* 41: 1623–1634.
 - 80) van de Graaf, A.A., A. Mulder, P.D. Bruijn, M.S.M. Jetten, L.A. Robertson, and J. Gijs Kuenen. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1246–1251.
 - 81) van de Graaf, A.A., P. de Bruijn, L.A. Robertson, M.M. Jetten, and J. Gijs Kuenen. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 143: 2415–2421.
 - 82) van der Star, W.R.L., W.R. Abma, D. Blommers, J.W. Mulder, T. Tokutomi, M. Strous, C. Picioreanu, and M.C.M. van Loosdrecht. 2007. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.* 41: 4149–4163.
 - 83) van Niftrik, L., W.J.C. Geerts, E.G. van Donselaar, B.M. Humbel, A. Yakushevska, A.J. Verkleij, M.S.M. Jetten, and M. Strous. 2008. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: A membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *J. Struct. Biol.* 161: 401–410.
 - 84) van Niftrik, L., M. van Helden, S. Kirchen, E.G. van Donselaar, H.R. Harhangi, R.I. Webb, J.A. Fuerst, H.J.M. Op den Camp, M.S.M. Jetten, and M. Strous. 2010. Intracellular localization of membrane-bound ATPases in the compartmentalized anammox bacterium ‘*Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis’. *Mol. Microbiol.* 77: 701–715.
 - 85) van de Vossenberg, J., J.E. Rattray, W. Geerts, B. Kartal, L. van Niftrik, E.G. van Donselaar, J.S. Sinninghe Damsté, M. Strous, and M.S.M. Jetten. 2008. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global ni-

- trogen gas production. *Environ. Microbiol.* 10: 3120–3129.
- 86) van de Vossenberg, A., D. Woebken, S.W.J. Maalcke, H.J.C.T. Wessels, B.E. Dutilh, B. Kartal, E.M. Janssen-Megens, G. Roeselers, J. Yan, D. Speth, J. Gloerich, W. Geerts, E. van der Biezen, W. Pluk, K.-J. Francoijs, L. Russ, P. Lam, S.A. Malfatti, S.G. Tringe, S.C.M. Haaijer, H.J.M. Op den Camp, H.G. Stunnenberg, R. Amann, M.M.M. Kuypers, and M.S.M. Jetten. 2013. The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua Profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environ. Microbiol.* 15: 1275–1289.
- 87) Wakeham, S.G., R. Amann, K.H. Freeman, E.C. Hopmans, B.B. Jørgensen, I.F. Putnam, S. Schouten, J.S. Sinninghe Damsté, H.M. Talbot, and D. Woebken. 2007. Microbial ecology of the stratified water column of the Black Sea as revealed by a comprehensive biomarker study. *Org. Geochem.* 38: 2070–2097.
- 88) Woebken, D., P. Lam, M.M.M. Kuypers, S.W.A. Naqvi, B. Kartal, M. Strous, M.S.M. Jetten, B.M. Fuchs, and R. Amann. 2008. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ. Microbiol.* 10: 3106–3119.
- 89) Zhu, G.B., S.Y. Wang, W.D. Wang, Y. Wang, L.L. Zhou, B. Jiang, H.J.M. Op den Camp, N. Risgaard-Petersen, L. Schwark, Y.Z. Peng, M.M. Hefting, M.S.M. Jetten, and C.Q. Yin. 2013. Hotspots of anaerobic ammonium oxidation at land-freshwater interfaces. *Nat. Geosci.* 6: 103–107.