

活性汚泥からのANAMMOX微生物の集積培養

今 城 麗* 安 井 英 齊* 石 田 浩 昭*
藤 井 隆 夫** 杉 野 浩 幸** 古 川 憲 治***

Detection and Enrichment of ANAMMOX Microorganisms from Activated Sludges

Urara IMAJO*, Hidenari YASUI*, Hiroaki ISHIDA*,
Takao FUJII**, Hiroyuki SUGINO** and Kenji FURUKAWA***

* Kurita Water Industries Ltd., 7-1 Wakamiya, Morinosato, Atsugi-city, Kanagawa 243-0124, Japan

** Dept. of Applied Life Science, Faculty of Engineering, Sojo Univ., Ikeda 4-22-1 Kumamoto-city 860-0082, Japan

*** Dept. of Civil Engineering and Architecture, Kumamoto Univ., Kurokami 2-39-1 Kumamoto-city 860-8555, Japan

Abstract

Anaerobic ammonium removal was observed in batch tests using a denitrifying sludge from an industrial wastewater treatment plant and an intermittent nitrifying-denitrifying sludge from a mixed piggery domestic wastewater treatment plant after 92 and 84 days, respectively. The simultaneous removals of ammonium and nitrite with nitrate production at ratios corresponding to that reported for the Anammox process were observed. Their specific ammonium conversion rates following one year of incubation after the first detection were 0.260 and 0.281 g N·g protein-d⁻¹, respectively. Using 16S rDNA sequence analysis, one of the sludges was confirmed to have an organism with a 99.2% similarity to the first reported Anammox bacterium, a deeply branching planctomycete, *Candidatus* Brocadia anammoxidans. In addition, the other sludge contained an organism with a 98.9% similarity to the Anammox planctomycete, *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis.

Key words : ANAMMOX, anaerobic ammonium oxidation, ammonium, nitrite, denitrification

1. はじめに

一般に生物学的窒素除去法と言えば、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌を用いて好気条件でNH₄-Nを酸化する硝化工程と、脱窒細菌を用いて嫌気条件でNO₂-N・NO₃-Nを窒素ガスに還元する脱窒工程とを組み合わせた硝化/脱窒法が最もよく知られている。しかし、硝化工程においては排水中のNH₄-Nを完全に硝化するための曝気動力とアルカリ添加のための運転コストが高いこと、また脱窒工程においては脱窒反応の電子供与体となる有機物としてメタノールを添加するコストが高いことが指摘されている。これまでに、これらの硝化/脱窒法の欠点を補うために、微生物の保持方法、好気槽・嫌気槽の配列方式、流動形式等に検討が加えられ、硝化液循環法、ステップ脱窒法、担体添加法といった様々な変法が開発されてきた。しかし、いずれも硝化工程と脱窒工程の組み合わせであり、利用される生物種はほぼ同じであるため、運転コストの大幅な削減には至っていない。ここ数年、従来の硝化/脱窒とは異なる微生物種、

あるいは代謝経路による窒素除去反応が注目されており、関連する発表が数多く出されている^{1~5)}。その中でANAMMOX（嫌気的アンモニア酸化：ANAerobic AMMonium OXidation）は、オランダ・デルフト工科大学の研究グループにより発見された新規な生物学的窒素除去プロセスである^{6~8)}。この反応を司る微生物は1999年にPlanctomyceteの一種であると同定された⁹⁾。ANAMMOX反応は無酸素条件下でNO₂-Nを電子受容体としてNH₄-Nを酸化し、ヒドラジンを中間生成物として窒素ガスへ変換する、微生物による酸化還元反応であり、代謝経路および菌体の増殖を加味した反応式（実験式）は以下のように表されている^{10, 11)}。

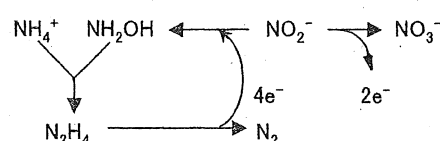
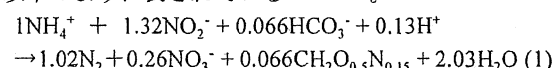


Fig. 1 The metabolic pathway of ANAMMOX process

* 栗田工業（株）技術開発センター 〒243-0124 神奈川県厚木市森の里若宮7-1

** 崇城大学応用生命科学科 〒860-0082 熊本市池田4丁目22-1

*** 熊本大学工学部環境システム工学科 〒860-8555 熊本市黒髪2丁目39-1

すなわち、1モルの $\text{NH}_4\text{-N}$ を除去するために1.32モルの $\text{NO}_2\text{-N}$ を必要とし、結果として1.02モルの窒素ガスと0.26モルの $\text{NO}_3\text{-N}$ を生成する。この反応は無酸素条件下で起こること、また有機物を必要としない独立栄養性生物による反応であることから、従来の硝化/脱窒法とは全く異なった反応である。脱窒工程にANAMMOXを利用する場合には、前段の硝化工程では流入 $\text{NH}_4\text{-N}$ の約半量を $\text{NO}_2\text{-N}$ へ酸化する（部分亜硝酸化）だけの酸素が供給されればよく、理論必要酸素量は約6割低減できる。ANAMMOX反応で生成する硝酸を除去するための有機物添加量は、従来の脱窒の約1割である。また硝化反応、ANAMMOX反応ともに独立栄養性微生物による反応であるため、発生汚泥量にも約8割の低減が見込める。したがって、部分亜硝酸化—ANAMMOXプロセスは、運転コストの大幅な低下が期待できる、従来の硝化/脱窒法に代わる有望な窒素除去法である。

1995年のデルフト工科大からの発表以来ANAMMOX反応に対する注目は非常に大きく、他の研究グループからもこの反応に関する発表が数報出されている^{12~17)}。その結果、数種類のANAMMOX微生物が存在すること、またこの微生物が環境中に広く存在し、窒素代謝に大きく貢献している可能性が示唆されつつある。しかし、主に生物膜中に存在していたANAMMOX微生物を種汚泥とした報告^{7,8,11~13,15,18,19)}が多く、活性汚泥からの回分培養によるANAMMOX微生物の集積培養はこれまでに報告例がない。

ANAMMOX微生物は $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ を基質とするという性質の他に、倍加時間が約11日と増殖速度が非常に遅い、酸素への暴露により阻害を受けるといった性質を有する²⁰⁾。これらの性質を考慮すると、ANAMMOX微生物が増殖するのに適した環境は、長いSRTが確保できる、基質となる窒素化合物が存在する、無酸素条件が存在する場所であると考えられる。これまで報告されている水処理系でのANAMMOX微生物の存在は、回転円盤や流動床等の生物膜システム中が主であり、これらの条件を満たしていると言える。我々は、長いSRT、アンモニアと亜硝酸の共存、無酸素という条件を満たしていれば、活性汚泥中にもANAMMOX微生物が存在すると考え、活性汚泥からの本微生物の集積培養を試みた。本論文の目的は、活性汚泥からのANAMMOX微生物の集積培養方法を示すとともに、16S rDNA解析による系統解析結果から、活性汚泥中の複数のANAMMOX微生物の存在と、その系統的な位置付けを示すことである。

2. 実験方法

2.1 種汚泥

ANAMMOX微生物の $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ を基質とする性質から、硝化/脱窒プロセスを有する排水処理プラントに着目した。また、その成育速度の遅さを考慮し、SRTの長い運転が行われ、酸素が無く、アンモニアと亜硝酸が共存するという

ANAMMOXに適した環境を有していると予想される4つの排水処理プラントの活性汚泥を種汚泥に用いた。各処理プラントの運転条件をTable 1に示す。汚泥Aは硝酸廃

液をメタノール添加により処理する脱窒プラントから、汚泥Bはアンモニアと硝酸を主要な処理対象とする工業廃水の処理プラントから、汚泥Cは養豚排水と家庭排水の混合液を処理する、間欠曝気により硝化を行う硝化脱窒プラントから、汚泥Dはし尿処理プラントから採取した。

2.2 培養方法

微生物の流出を防ぐため、回分式培養を行った。採取した汚泥は、Working Volume 1lで気相部0.13 lには窒素ガスを充填した密閉フラスコ中で、 $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ を含む無機合成培地を用いて培養した。培地の組成をTable 2に、培養装置図をFig. 2に示す。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が消費された場合には、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液、 NaNO_2 溶液を添加した。また、部分的に新しい培地に交換する操作も行った。フラスコは発生ガスを収集するシリンジを有しており、このシリンジに充填した窒素ガスと置換してサンプルを採取し、分析に供した。温度条件はANAMMOX活性が高いとされる範囲内の30℃とした¹⁹⁾。また、ANAMMOX微生物は細胞濃度が $10^{10} \sim 10^{11} \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上の場合のみ活性を示したという既報の知見から、激しい攪拌を避け、基質を拡散する目的で一日に1~2回手動で攪拌した⁹⁾。また1N H_2SO_4 、1N NaOH によりpHを7.0~8.5に調整した。

Table 1 The characteristics of the wastewater treatment plants for source of test sludges

Sludge	Type of wastewater treatment plant	SRT
A	Denitrification sludge from industrial wastewater treatment plant	Approximately 1 month
B	Nitrification + Denitrification sludge from industrial wastewater treatment plant	Longer than 1 month
C	Intermittent Nitrification + Denitrification sludge from piggery wastewater and domestic wastewater treatment plant	Approximately 2 months
D	Sludge from night soil treatment plant	Longer than 1 month

Table 2 Composition of medium for cultivation

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	118 ~ 566mg		
NaNO_2	123 ~ 591mg		
NaNO_3	121 ~ 182mg		
KHCO_3	500mg		
KH_2PO_4	27.2mg		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	180mg		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	120mg		
Trace element I	1ml		
Trace element II	1ml		
water	1l		
Trace element I ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)			
EDTA	5		
FeSO_4	5		
Trace element II ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)			
EDTA	15	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.22
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.43	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.19
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.24	$\text{NaSeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.21
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.99	H_3BO_4	0.014
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25		

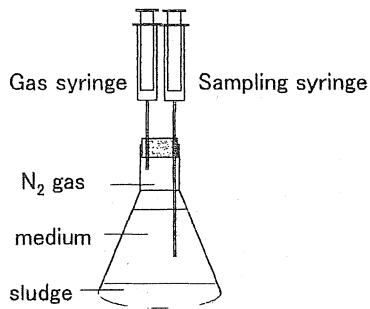


Fig. 2 Experimental device for cultivation

2.3 16S rDNA解析

汚泥Aについては、同じ汚泥を培養した別のリアクターからDNAを抽出して16S rDNAの解析を行い、その結果を採用した²¹⁾。

汚泥Cについては、フラスコ中の汚泥のDNAを抽出し、PCRにより全長16S rDNAを増幅、増幅された16S rDNAをプラスミドベクターへクローニングしてクローンを取得し、遺伝子シーケンシングにより塩基配列を決定した。

DNA抽出にはISOPLANT Kit (ニッポンジーン) を使用した。全長16S rDNAの増幅には、プライマーに16S-5'II (5'-TGGCGGCGTGGTTTAGGC-3') と 16S-3' (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3') を用いた。プライマーは Planctomycete に属する菌の、AB015552, AF202655, AF202659, AJ131819, AJ250882 (全て Accession Number) のデータベースを比較し、保存されている部分を選んだ。16S-5'IIプライマーはAB015552の30bp~47bpの部分とした。16S-3'プライマーはAJ250882の1534bp~1551bpの部分の相補的なものとして設計した。PCR条件は、pre-heating;94°C,2分につき、第1段階;94°C,15秒、第2段階;55°C,2秒、第3段階;68°C,1分を40サイクル繰り返した。PCR産物はpBluescript KS (+) (Toyobo)のHinc IIサイトに挿入し、構築されたプラスミドは *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) competent cellsを形質転換してクローンを取得した。得られたクローンからDNAを抽出し、遺伝子シーケンシングによる解析を行った。

得られたそれぞれの塩基配列を、インターネット上で遺伝子データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録された塩基配列と比較し、Clustal W²²⁾ により系統解析を行い、Treeview²³⁾ により系統樹を作成した。

2.4 分析方法

アンモニアは比色法²⁴⁾、亜硝酸と硝酸はイオンクロマトグラフ (ICS-A23, Yokogawa)により測定した。汚泥のタンパク濃度はFolin-Ciocalteu's試薬を用いたLowry法により測定した。

3. 実験結果と考察

3.1 培養結果

汚泥Aと汚泥Cの培養液中のアンモニアと亜硝酸の濃度変化をFig. 3に示す。培養後約80日間は、汚泥A~Dの全ての汚泥培養液中のアンモニア濃度は増加し、亜硝酸濃度は減少した。アンモニアは供試汚泥中の微生物の自己消化により生成され、亜硝酸は自己消化によって生じた有機物を用いた通常の脱窒反応により除去されたと推察される。アンモニア濃度の増加速度、亜硝酸濃度の

減少速度は経時的に小さくなる傾向がみられた。これは自己消化が進むことにより自己消化する微生物の存在量が徐々に減少したためと推察される。その後アンモニア濃度はほぼ横這いとなり、培養開始後92日後に汚泥A、84日後に汚泥Cにおいて、初めて培養液中のアンモニア濃度の減少が観察された。しかし、汚泥Bおよび汚泥Dの培養液中アンモニア濃度は100日以上経っても増加し続けた。そこで汚泥Aと汚泥Cに着目し、これらの汚泥を新しい培地に入れ替えて培養を継続したところ、両汚泥ともにアンモニアと亜硝酸を同時に除去し、硝酸を生成した。この後アンモニアおよび亜硝酸の除去速度、硝酸の生成速度は経時的に上昇した。

汚泥Aと汚泥Cのアンモニアと亜硝酸の除去速度および硝酸の生成速度の経時変化グラフをFig. 4に示す。横軸の0日はANAMMOX反応開始日、すなわちアンモニアの低下が初めて確認された日を示す。アンモニアと亜硝酸の除去速度および硝酸の生成速度は経時的に上昇し、ANAMMOX活性を有する微生物の増殖が示唆された。Fig. 4に示した除去速度から算出した、1モルのアンモニア除去に対する亜硝酸除去量と硝酸生成量の割合は、汚泥A、汚泥C各々1.14 : 0.19, 1.20 : 0.19であった。報告されているANAMMOX反応式の値である1.32 : 0.26よりわずかに低い値となったのは、残存する微生物の自己消化による内生脱窒のためにNO_xが消費されたことが原因であると推察される。

培養初期においては、ANAMMOX微生物以外の生物体の自己消化がリアクター内の主要な反応になると考えられる。供試汚泥中にわずかなANAMMOX微生物が存在しても、そのわずかな微生物が起こすアンモニアと亜硝酸の除去は、自己消化によるアンモニア生成と、亜硝酸の無酸素還元完全にマスクされてしまう。したがって、ANAMMOX微生物によるアンモニアと亜硝酸の同時除去を確認するためには、自己消化によるアンモニアの生成が無視できるようになるまで培養を継続する必要があると言える。しかし、アンモニアの生成が少なくなっても汚泥B、Dのように低下に転じない場合には、元の汚泥にANAMMOX微生物が存在していなかったと考えるのが妥当と思われる。

また、汚泥Aを採取した同じプラントで、SRTを約10日に変更した後の汚泥を採取し、同様の回分培養を100日以上にわたり行ったが、アンモニアの除去は観察されなかった。このことから、供試汚泥の選択に際しては長いSRTを有することが必要条件であると言える。

集積の度合いを比較するために、ANAMMOX反応確認後約1年間の培養後に、汚泥タンパクあたりのアンモニアの除去速度を、報告された値と比較した¹⁰⁾。両方の汚泥に対する値をTable 3に示す。汚泥Aと汚泥Cの値は近いものであったが、既報の値の約3.2~3.5分の1であった。したがって、1年の培養後であっても、培養汚泥中のANAMMOX微生物の存在割合は低いことが示唆された。ANAMMOX微生物の増殖速度が遅いことに加え、回分培養であるために、細胞代謝物の有機成分が系外へ排出されず従属栄養性微生物の増殖が継続し、相対的にANAMMOX微生物の割合が低くなるのではないかと考えられる。

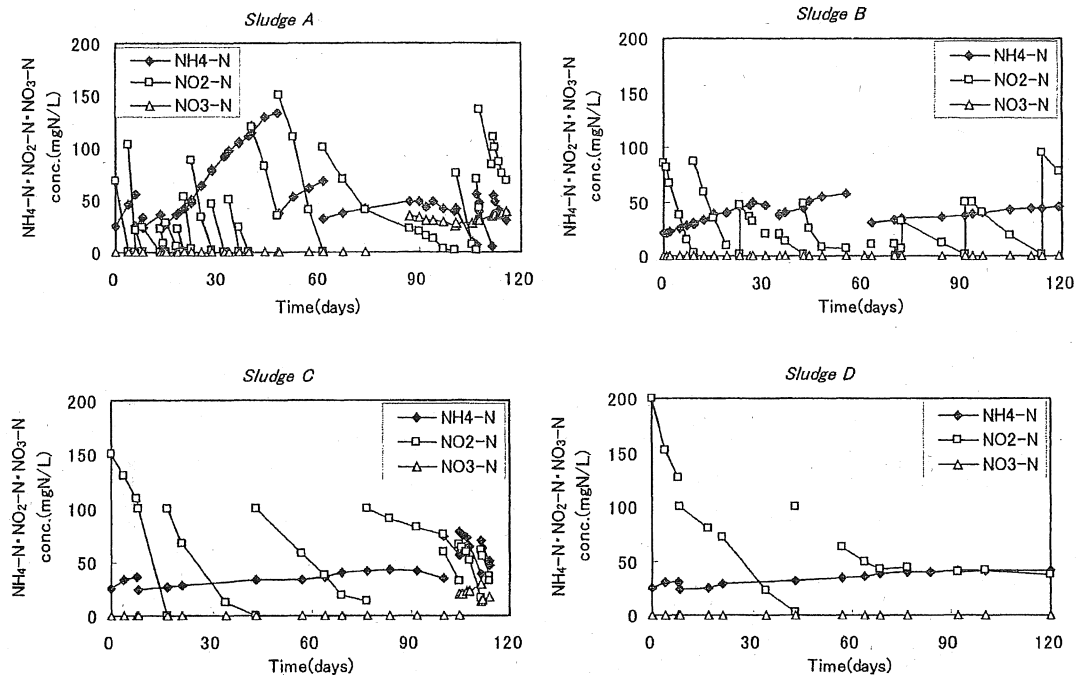


Fig.3 The change of nitrogen concentration during 120 days of incubation

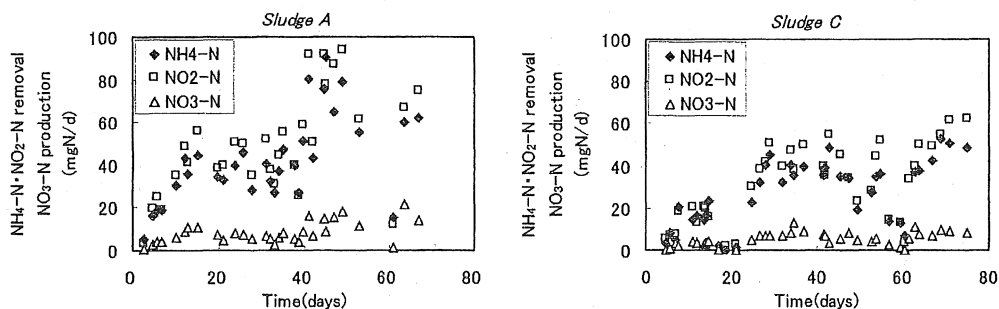


Fig.4 The change of ammonium and nitrite removal rate and nitrate production rate after the detection of ammonium removal

Table 3 Specific ammonium conversion rate for two acclimated sludges

Sludge	Specific ammonium conversion rate (g NH ₄ -N · g Protein ⁻¹ · day ⁻¹)
Sludge A	0.260
Sludge C	0.281
Reported microorganism (Strous et al., 1998)	0.907

3.2 集積培養した微生物の位置付け

ANAMMOX微生物はPlanctomyceteに属しており、データベースには25種類以上の微生物の塩基配列が登録されている。Fig. 5は一部の塩基配列のみの登録も含め、ANAMMOX反応を司る微生物として、あるいは近縁のPlanctomyceteとして登録されている26種の微生物の関係を示す系統樹である。図中の番号はデータベースのAccession Numberを表す。この中で、これまでに同定・命名されたのは2種類であり、それぞれ*Candidatus Brocadia anammoxidans* (Accession Number: AF375994)^{2,5)},

Candidatus Kuenenia stuttgartiensis(AF375995他9クローン)^{2,6)}である。これら2種類はANAMMOX微生物の中で異なった系統のグループを形成している。集積された汚泥A由来の16S rDNA塩基配列は、*Candidatus Brocadia anammoxidans*に99.2%の塩基の一致が確認され、汚泥C由来の16S rDNA塩基配列は*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*に98.9%の相同性が確認された。したがって、汚泥A、汚泥C由来のANAMMOX微生物は、系統学的に異なっており、国内の排水処理プラント汚泥から2種類の異なったANAMMOX微生物が集積されたことが明らかとなった。また、日本国内では、熊本県で採取され熊本の地下水を用いて培養された汚泥中にANAMMOX微生物 (Accession Number: AB057453)が発見されており、同定された2種類の微生物とはまた別の系統に属することが確認された^{2,7)}。これらの結果より、日本国内に多数種のANAMMOX微生物が存在することが示された。また、その存在場所は生物膜に限らず、活性汚泥中にも存在することが明らかとなった。

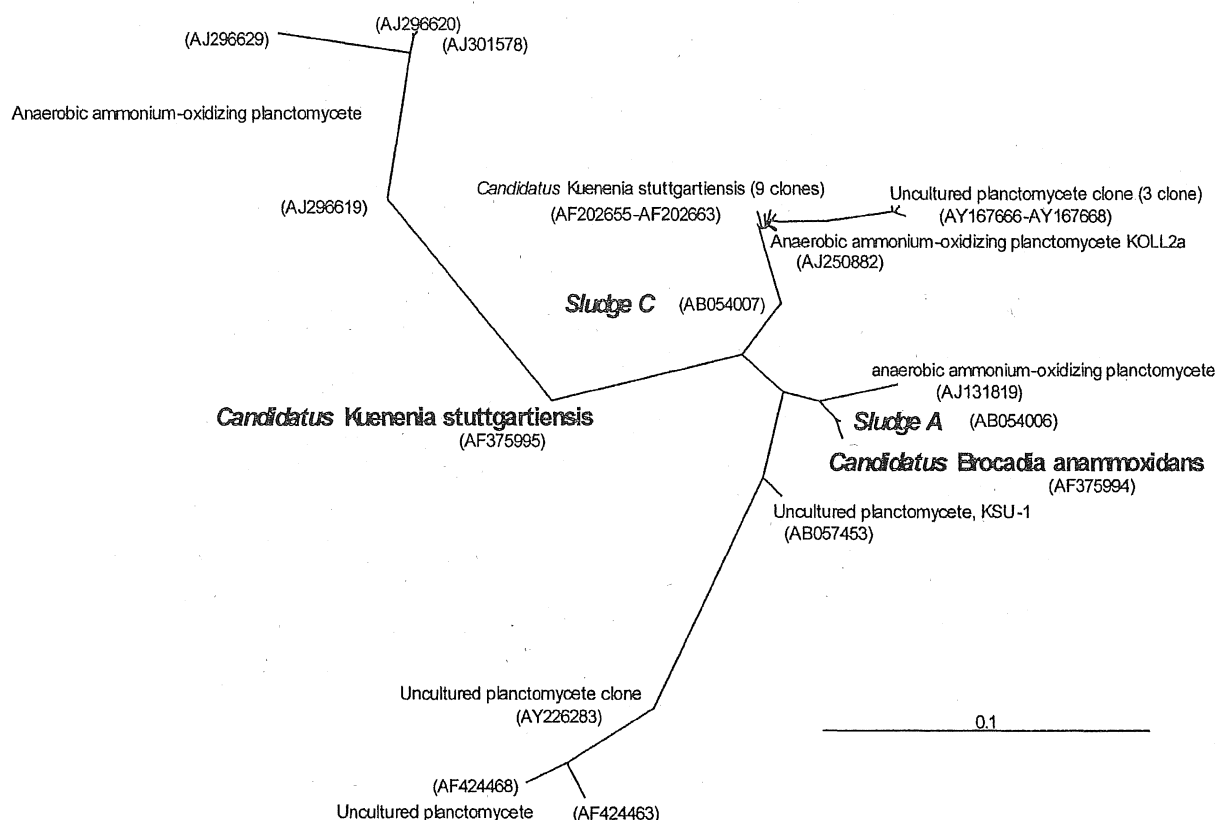


Fig.5 Phylogenetic tree reflecting the relationships of microorganisms having ANAMMOX activity

4. まとめ

活性汚泥から、約3ヶ月間の回分培養によりANAMMOX活性を検出し、その後の回分培養によりANAMMOX微生物を集積培養することができた。4種類の汚泥のうち2種類からANAMMOX活性が確認できたことから、長いSRTで運転されている硝化/脱窒プラントの汚泥に着目することがANAMMOX微生物を探索するのに有効であること、またANAMMOX反応によるアンモニアの減少を検出するためには、自己消化によるアンモニア生成を終了させるために長い時間を要することが示唆された。活性観察後1年間の培養後にも汚泥あたりアンモニア除去速度は報告されている値よりも低く、汚泥中のANAMMOX微生物の割合が低いことが示された。回分培養であるため、生物代謝物が系外へ排出されないためと考えられる。

培養された汚泥の16S rDNA解析により、それぞれの汚泥には *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* に近縁の、別の系統に属するANAMMOX微生物が存在することが確認された。

本研究により、活性汚泥からのANAMMOX微生物の集積培養が可能であり、国内に複数種のANAMMOX微生物が存在していることが示された。今後は、本微生物を実際の排水処理に適用するため、培養条件の検討を行うとともに、装置形状の検討を行っていく予定である。

(原稿受付 2003年9月3日)

(原稿受理 2004年4月5日)

参 考 文 献

- 1) Abeliovich, A. and Vonshak, A. (1992) Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*, *Arch Microbiol.*, **158**, 267-270.
- 2) Schmidt, I. and Bock, E. (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*, *Arch Microbiol.*, **167**, 106-111.
- 3) Poth, M. (1986) Dinitrogen production from Nitrite by *Nitrosomonas* Isolate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(4), 957-959.
- 4) Pel, R., Oldenhuis, R., Brand, W., Vols, A., Gottschal, J.C. and Zwart, K.B. (1997) Stable isotope analysis of a combined nitrification-denitrification sustained by thermophilic methanotrophs under low-oxygen conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 474-481.
- 5) Robertson, L.A., Van Niel, E.J.W., Torremans, R.A.M. and Kuenen, J.G. (1988) Simultaneously nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2812-2818.
- 6) Van de Graaf, A.A., Mulder, A., Slijkhuys, H., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1990) Anoxic ammonium oxidation, *Proc. 5th European Congress on Biotechnology*, **1**, 388-391.
- 7) Van de Graaf, A.A., Mulder, A., De Bruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(4), 1246-1251.
- 8) Mulder, A., Van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 177-184.
- 9) Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., Van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete, *Nature*, **400**, 446-449.
- 10) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly

- growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 589-596.
- 11) Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1997) Metabolic Pathway of anaerobic oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor, *Microbiology*, **143**, 2415-2421.
 - 12) Helmer, C., Tromm, C., Hippen, A., Rosenwinke, K.-H., Seyfried, C.F. and Kunst, S. (2000) Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems, *1st World Water Congress of the IWA in Paris, conference reprint*, **6**, 130-137.
 - 13) Siegrist, H., Reithaar, S., Koch, G. and Lais, P. (1998) Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon, *Wat. Sci. Tech.*, **28**(8-9), 241-248.
 - 14) Koch, G., Egli, K., Van der Meer, J.R. and Siegrist, H. (2000) Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor, *Wat. Sci. Tech.*, **41**(4-5), 191-198.
 - 15) Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate, *Arch. Microbiol.*, **175**, 198-207.
 - 16) Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B.O. and Acuna-Gonzalez, J. (2003) N_2 production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica, *Nature*, **422**, 606-608.
 - 17) Kuypers, M.M.M., Slikers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.O., Kuenen, J.G., Damste, J.S.S., Strous, M. and Jetten, M.S.M. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea, *Nature*, **422**, 608-611.
 - 18) Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor, *Microbiology*, **142**, 2187-2196.
 - 19) Strous, M., Van Gerven, E., Zheng, P., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations, *Wat. Res.*, **31**(8), 1955-1962.
 - 20) Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(6), 2446-2448.
 - 21) Furukawa, K., Rouse, J.D., Imajo, U., Nakamura, K. and Ishida, H. (2002) Anaerobic ammonium oxidation confirmed in continuous flow treatment using a non-woven biomass carrier, *Jpn. J. Wat. Treat. Biol.*, **38**, 87-94.
 - 22) Heringa, J. (1999) Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induce multiple alignment, *Comput. Chem.*, **15**, 341-364.
 - 23) Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Applic. Biosci. Appl.*, **12**, 357-358.
 - 24) 日本下水道協会編 (1997) 下水試験方法, pp.162-163, 東京.
 - 25) Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M. and Wagner, M. (2001) 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection, *Environ. Microbiol.*, **3**(7), 450-459.
 - 26) Schmid, M., Twachtman, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Shleifer, K.H. and Wagner, M. (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation, *System. Appl. Microbiol.*, **23**, 93-106.
 - 27) Fujii, T., Sugino, H., Rouse, J.D. and Furukawa, K. (2002) Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a non-woven biomass carrier, *J. Biosci. Bioeng.*, **94**(5), 412-418.