



评述

厌氧铵氧化细菌的科学发现及启示

——利用科学原理指引科学发现和推动科学发展的经典范例

党宏月*, 黄榕芳, 焦念志

厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005

* E-mail: danghy@xmu.edu.cn

收稿日期: 2015-04-03; 接受日期: 2015-08-11; 网络版发表日期: 2015-12-21

科技部创新方法工作专项项目(编号: 2011IM010700)、国家自然科学基金项目(批准号: 91328209, 91428308)、国家重大科学计划项目(编号: 2013CB955700)、国家海洋局全球变化与海气相互作用专项项目(编号: GASI-03-01-02-05)及中国海洋石油总公司“渤海海洋碳汇时间序列观测”(编号: CNOOC-KJ 125 FZDXM 00TJ 001-2014)和“南海西部海洋碳汇时间序列观测”科技项目(编号: CNOOC-KJ 125 FZDXM 00 ZJ 001-2014)资助

摘要 厌氧铵氧化(anaerobic ammonium oxidation; anammox)是 20 世纪末被发现的氮循环新途径, 这一重大发现不仅改变了生物代谢与物质循环的经典理论, 而且深刻影响了对生物能量来源的认识, 无光深海这个巨大的空间又多了一个可以进行化能自养“固碳”的微生物新成员. 如果说海底热泉自养生物的发现是对“万物生长靠太阳”这一古训的挑战, 广布于各种缺氧环境的 anammox 细菌的发现则可以说是这一古训的完胜. anammox 细菌以 NO_2^- 为最终电子受体氧化 NH_4^+ , 生成 N_2 , 与反硝化微生物相似, 在环境中行使着无机氮去除这一生物地球化学作用. 然而, 与异养的反硝化细菌不同, anammox 细菌为无机化能自养细菌, 从铵的厌氧氧化中获得代谢能形成跨膜质子驱动力(proton motive force; *pmf*)并合成细胞储能分子——三磷酸腺苷(ATP), 进而进行无机碳固定. 虽然 anammox 细菌与随后发现的另一极其重要的海洋氮素转化微生物——氨氧化古菌(AOA)——皆为化能自养微生物, 但是, AOA 以氨(而非铵根离子)为电子供体并以 O_2 为最终电子受体进行能量代谢. 因此, AOA 生态过程主要发生在含氧的海水和沉积物中, 而 anammox 细菌在缺氧的海水和沉积物中分布广泛, 并在一些典型海洋极端环境中(如深海热液和海底冷泉)也有存在. 一些研究显示, 海洋中 30%~70%氮气的产生可能源于 anammox 过程. 在含氮污水处理工程领域, anammox 构成了一种崭新的低能耗、低成本、高效率 and 节能减排技术. 然而, 这一科学发现来之不易, 早在 20 世纪 60 年代就有科学家根据海洋地球化学观测数据提出了 anammox 这一生物地球化学过程存在的可能性, 在 20 世纪 70 年代, 有科学家根据化学反应热力学原理, 预测 anammox 细菌的存在, 但在随后的十几年时间, 该类微生物却一直没有被发现. 作为低氧和缺氧环境中广泛分布的一类重要的氮循环细菌, 是什么因素阻碍了其发现? 又是什么因素最终促成了它的发现? 对这些问题的分析给科学研究带来怎样的启示? 本文从海洋 anammox 细菌生理生态学基础和科学研究规律出发, 对上述问题进行了分析阐释.

关键词 厌氧铵氧化, 海洋氮循环, 无机化能自养, 污水处理, 科学启示

中文引用格式: 党宏月, 黄榕芳, 焦念志. 2016. 厌氧铵氧化细菌的科学发现及启示——利用科学原理指引科学发现和推动科学发展的经典范例. 中国科学: 地球科学, 46: 1-8, doi: 10.1360/N072014-00514

英文引用格式: Dang H Y, Huang R F, Jiao N Z. 2016. Inspirations from the scientific discovery of the anammox bacteria: A classic example of how scientific principles can guide discovery and development. Sci China Earth Sci, doi: 10.1007/s11430-015-5203-6

1 引言

厌氧铵氧化(anaerobic ammonium oxidation; anammox)细菌是1999年被发现的氮循环微生物中一个新的重要成员(Strous等, 1999), 催化以 NH_4^+ 为电子供体以 NO_2^- 为最终电子受体并生成 N_2 这一新颖的生物地球化学过程($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)(Jetten等, 2009). anammox过程现已被发现普遍存在于环境中, 如缺氧的土壤、河流、湖泊、河口湿地、红树林、海洋水体及沉积物中, 在陆地热泉、深海热液及冷泉等极端环境, anammox细菌也有发现(Byrne等, 2009; Jaeschke等, 2009; Russ等, 2013; Shao等, 2014). 尤其在海洋环境, anammox过程构成了低氧和缺氧环境一条重要的脱氮代谢途径. 据初步估计, anammox过程使得全球海洋每年固定的氮的30%~70%又以氮气的形式损失掉(Devol, 2003; Arrigo, 2005), 是海洋及全球氮生物地球化学循环及影响氮营养盐动态变化的一个重要生态过程. anammox细菌的发现改变了过去普遍认为的反硝化是环境中唯一脱氮途径的传统观念, 为更加全面准确地了解海洋及全球氮循环的过程、机理和作用提供了基础(图1).

2 anammox 细菌的系统进化及生理生态特点

anammox细菌是浮霉菌门(*Planctomycetes*)中新发现的一个支系(Strous等, 1999), 隶属于*Brocadiales*

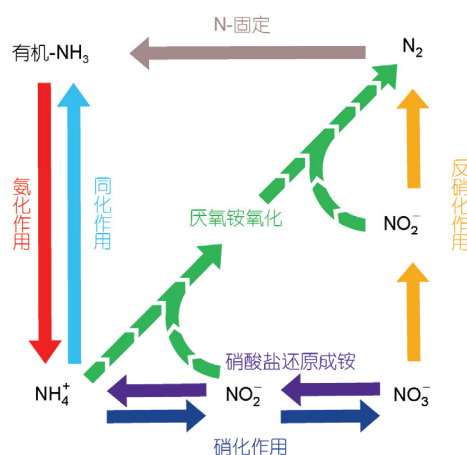


图1 微生物介导的氮循环关键过程

目(Jetten等, 2009), 目前已发现的anammox细菌隶属于5个候选属(*Candidatus genera*)(图2)(Kuenen和Jetten, 2001; Schmid等, 2000; Kuypers等, 2003; Kartal等, 2007; Quan等, 2008). *Ca. Brocadia*属目前已发现有4个种(Kuenen和Jetten, 2001; Kartal等, 2008; Hu等, 2010; Rothrock等, 2011), 皆富集自anammox反应系统(Sonthiphand等, 2014). *Ca. Kuenenia*属目前只有一个种(Schmid等, 2000), 富集于滴滤池生物膜. *Ca. Scalindua*属目前已发现有7个种: 最初发现于污水处理系统并在海洋沉积物中普遍存在的*Ca. Scalindua brodae*和*Ca. Scalindua wagneri*(Schmid等, 2003; Dang等, 2010, 2013; Shao等, 2014), 以及发现于海洋缺氧水体或沉积物中的*Ca. Scalindua sorokinii*(Kuypers等, 2003), *Ca. Scalindua arabica*(Woebken等, 2008), *Ca. Scalindua richardsii*(Fuchsman等, 2012), *Ca. Scalindua profunda*(Vossenberg等, 2013)和*Ca. Scalindua pacifica*(Dang等, 2013). *Ca. Anammoxoglobus*属目前只有1个种(Kartal等, 2007), 富集于一anammox反应器. *Ca. Jettenia*属目前发现有2个种(Quan等, 2008; Ali等,

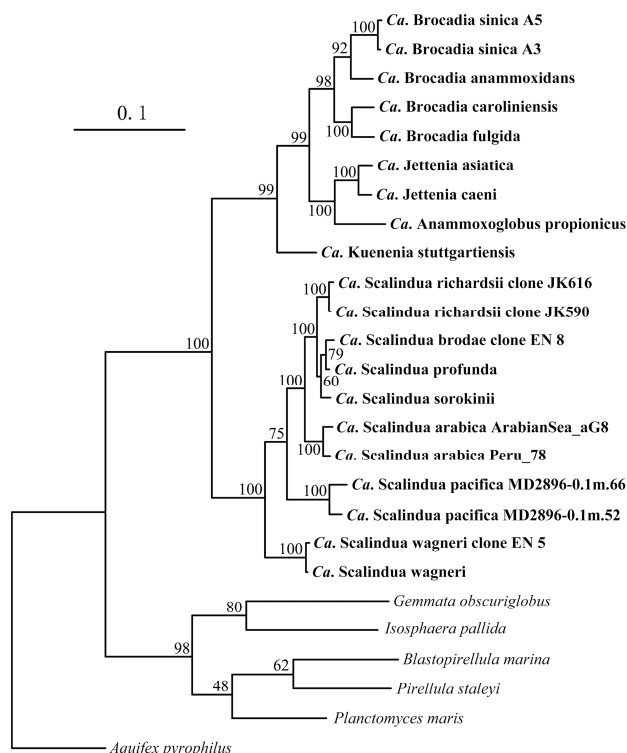


图2 anammox 细菌已知物种 16S rRNA 基因序列系统进化树

2015), 皆富集自anammox反应系统. 与*Ca. Jettenia*标志基因 *hzs*(编码肼氧化还原酶; hydrazine oxidoreductase)序列相似的DNA序列在海湾等海洋环境也有发现(Dang等, 2010), 说明*Ca. Jettenia*细菌可能不止存在于淡水环境, 或者说明海湾中的*Ca. Jettenia*细菌可能来自陆地淡水环境. 因为目前还无法实现纯培养, anammox细菌的分类主要依赖于分子分类方法, 如细菌16S rRNA基因序列系统进化分析(图2). 文献中还报道有其他一些anammox的候选物种, 但尚未被较权威的微生物物种目录(如LPSN, <http://www.bacterio.net/>)接受为有效命名或有效物种.

由于独特的细胞结构及生物化学代谢路径, anammox细菌被描述为一类不寻常的原核生物(unusual prokaryote)(Neumann等, 2011). 虽然anammox细菌是浮霉菌门的一个支系, 但其细胞结构与浮霉菌门中的其他细菌却有一些差别. 如浮霉菌门中的大部分细菌的细胞壁没有肽聚糖(peptidoglycan), 但anammox细菌基因组中有编码肽聚糖合成的基因, 并且生理生化测试表明anammox细菌细胞壁中确有肽聚糖成分和结构(Hu等, 2013). 另外, anammox细菌具有独特的细胞分室(compartmentalization)形成的厌氧氨氧化体(anammoxosome), 在其内部执行重要的anammox过程, 并在厌氧氨氧化体膜上进行与anammox过程偶联的三磷酸腺苷(ATP)的合成, 为anammox细菌进行能量代谢特有的细胞器, 其功能类似真核生物的线粒体(Niftrik和Jetten, 2012; Teeseling等, 2013; Jogler, 2014). anammox细菌的厌氧氨氧化体的膜结构中含有独特的梯烷脂(ladderane lipid), 由三个或五个线性顺式连接的环丁烷形成甘油酯或醚, 使得厌氧氨氧化体具有致密的膜结构(Sinninghe等, 2002, 2005). 因此, 厌氧氨氧化体可以有效地富集anammox过程的反应底物和中间产物, 提高anammox效率, 并且, 厌氧氨氧化体可以有效地隔离anammox反应过程中产生的化学性质极其活跃的有毒有害中间产物(如NO、羟胺和肼等), 防止它们对细胞其他组分和结构的损伤(Sinninghe等, 2002; Boumann等, 2009). 肼为剧毒化合物, 极性及还原性极强, 常用作化工合成原料和人造卫星及火箭的燃料. 在anammox细菌被发现以前, 肼一直被认为是人造化合物, 不存在于自然界中, anammox细菌是目前发现的唯一可以产生肼的生物.

全球每年化工合成的肼水合物(hydrazine hydrate)产量高达1.2万吨, 作为anammox过程的关键中间代谢物, 一个有趣的生态和生物地球化学问题是: 全球海洋中的anammox细菌每年合成和转化多少肼? anammox细菌在细胞分裂的同时, 厌氧氨氧化体也进行分裂, 使每个子细胞都能获得功能相同的厌氧氨氧化体. 但anammox细菌没有一般浮霉菌门细菌所具有的FtsZ分裂蛋白, 却有独特的kustd1438蛋白行使分裂功能(Jogler, 2014). 浮霉菌门中的大部分细菌为异养细菌, 但anammox细菌却为无机化能自养固碳细菌(Strous等, 1999). anammox细菌特殊的细胞结构及其独特的生理生化功能为其生物地球化学作用及环境工程应用提供了基础.

3 anammox 细菌在含氮污水处理中的应用

在含氮污水处理环境工程领域, anammox作为一种低成本及环境友好系统, 具有广泛污水除氮处理应用(Kartal等, 2010). anammox过程可同时去除污水中的氧化态氮(亚硝酸盐和硝酸盐)和还原态氮(铵盐), 突破了硝化-反硝化脱氮这一传统技术思路, 减少供氧能耗, 无需外加有机碳源, 无需碱度补偿, 可大幅提高脱氮效率. 并且, 该污水处理技术在高效脱氮的同时, 还可有效去除部分COD, 减少碳排放, 减小剩余污泥产量, 尤其适用于各类高氨氮水质情况, 处理效果稳定. 与传统的硝化-反硝化工艺相比, 厌氧氨氧化工艺运行成本和CO₂排放可降低90%(Jetten等, 2001), 这一工艺也使污水处理厂的碳足迹降至非常低的水平. 厌氧氨氧化是一种运行成本低、投资回报高、效率高、稳定且可持续、节能减排的创新生物处理工艺, 属世界领先污水脱氮技术. 荷兰、德国、日本、奥地利、瑞士、英国和中国等都在争相进行厌氧氨氧化废水处理技术和工艺的研发, 如荷兰的Paques公司是全球首次将厌氧氨氧化工艺进行工程化并获得应用的公司, 其于2002年在荷兰的鹿特丹污水处理厂建立了世界上首座厌氧氨氧化污水处理反应器. 目前世界上至少已建了十多座厌氧氨氧化污水处理工程, 如在荷兰的鹿特丹、利赫滕福德和奥尔伯根、德国的哈廷根和梅歇尔尼希、日本的三重县、奥地利的斯特拉斯、瑞士的格拉尔内地和克利肯以及英国的皮齐等(陈重军等, 2014). 有理由预测, anammox会成

为未来含氮污水处理的一项全球主流技术。

4 曲折的 anammox 细菌发现历程

1999 年被首次发现以前 (Strous 等, 1999), anammox 细菌一直被认为是不可能存在的 (Teeseling 等, 2013)。的确, anammox 细菌一般都生长很慢, 种群倍增时间 (doubling time) 一般在 7~22 天左右 (Kartal 等, 2013), 而广为熟知的大肠埃希氏菌 (即大肠杆菌; *Escherichia coli*) 在适合生长条件下的种群倍增时间只有 20 min。并且, 如果没有特殊的厌氧氨氧化体的存在, anammox 细菌无法避免 anammox 代谢过程产生的有毒有害中间产物对细胞产生的损伤。然而, 生命进化创造的奇迹使得 anammox 细菌不但克服了自身代谢过程中的种种障碍, 而且使得 anammox 细菌成为低氧和缺氧环境中的一类重要功能菌群, 在海洋及全球氮生物地球化学循环中发挥着重要的生态作用。

传统的海洋生物地球化学研究发现, 海洋中的有机氮矿化过程往往形成氨, 尤其在低氧和缺氧环境, 由于缺乏 O_2 这一重要的电子受体, 氨等还原性无机小分子有可能在环境中被富集, 因此, 海洋中的还原环境往往具有丰富的铵氮营养盐。但是, 早在 1965 年, 就有研究发现, 海洋中的一些缺氧环境中可能积累的铵会无形中消失掉, 据此, Richard (1965) 大胆假设, 认为这种环境中存着一类未知的微生物, 能以硝酸盐为电子受体, 对铵进行厌氧氧化并生成氮气。1977 年, Broda 通过化学反应热力学计算, 证实这类反应是可能发生的, 进一步预测了自然界中无机化能自养 anammox 细菌的存在 (Broda, 1977)。然而, 由于当时人们尚无法设想 anammox 的生化机理, 这些自然科学的发现和预测在当时并没有引起科学界足够的重视, 很长一段时间没有人对此再进行过研究 (Arrigo, 2005)。当时的传统观念认为, 铵的化学性质比较惰性, 其氧化需要 O_2 及加氧酶的共同作用, 绝大多数科学家对 anammox 细菌的存在持怀疑态度, 认为铵的厌氧氧化是不可能的 (Kuenen, 2008)。

直到 20 世纪 90 年代初, 在荷兰 Gist-Brocades N.V. 生物技术公司工作的 Mulder 发现, 在厌氧反硝化污水处理系统中添加硝酸盐可以促进铵的消耗及氮气的产生 (Mulder, 1992), 他将这一过程命名为

anammox (即 anaerobic ammonium oxidation)。但是, 尽管 Mulder 尝试了多种方法, 他始终未能富集、培养和鉴定出引起这一现象的微生物, 也没能明确这到底是个自发的化学反应过程还是个生物催化下的反应过程 (Kuenen, 2008)。随后 Mulder 与荷兰代尔夫特理工大学 (Delft University of Technology) Kuenen 等开展研究合作, 通过 ^{15}N 稳定同位素示踪法, 发现 anammox 反应产物 N_2 中的一个 N 原子来自 NH_4^+ , 而另一个 N 原子则来自 NO_2^- 。并通过灭活实验, 才逐步证实这一过程的确是微生物作用的结果 (Mulder 等, 1995; Graaf 等, 1995), 并对该反应过程的一些中间代谢步骤及中间产物进行了分析研究, 发现亚硝酸盐为 anammox 反应中的真正电子受体而胍是一个关键代谢中间物 (Graaf 等, 1997; Schalk 等, 1998)。但是, anammox 细菌的身份却始终无法被鉴定, 直到 1999 年, Strous 等应用序半连续式反应器 (sequencing fed-batch reactor; SFBR), 获得了较好的 anammox 细菌重现性培养及富集, 并通过 Percoll 密度梯度离心技术, 获得了高达 99.6% 的 anammox 细菌细胞纯化, 使得应用分子生物技术对 anammox 细菌进行分子鉴定成为可能, 并在此基础上, 成功地证明了 anammox 过程由浮霉菌门中的一类化能自养细菌完成 (Strous 等, 1999)。

2002 年, 通过应用 ^{15}N 稳定同位素示踪技术, 自然环境中的 anammox 过程首次在丹麦海洋沉积物中被确证 (Thamdrup 和 Dalsgaard, 2002)。次年, 海洋水体 anammox 过程及 anammox 细菌同时在缺氧的哥斯达黎加杜尔塞湾和黑海被确证 (Kuypers 等, 2003; Dalsgaard 等, 2003)。随后, 相关研究形成快速和普遍发展态势, anammox 过程及 anammox 细菌已在全球多个含氮污水处理厂、土壤、河流、湖泊、地下水、红树林、河口湿地、海洋氧最小带、陆架区、深海、极区、海洋沉积物、陆地热泉、深海热液、深海冷泉和深海天然气水合物赋存区等环境普遍被发现 (Kartal 等, 2013)。由于 anammox 过程同时需要铵根离子及亚硝酸根离子的存在, 海洋环境 anammox 细菌及其催化的 anammox 作用主要出现在沉积物和海水的有氧-缺氧界面处 (Kuenen, 2008)。一些研究结果表明, 在深海有机物比较匮乏的环境, anammox 过程可能发挥着比在浅海有机物丰富的环境更重要的脱氮作用 (Shao 等, 2014)。

5 anammox 细菌发现过程给科学研究带来的启示

从anammox细菌的发现历程不难看出, 该类细菌的存在早在20世纪60年代就已有科学家进行了预测(Richard, 1965), 并在20世纪70年代有科学家更进一步地应用化学反应热力学计算给予了佐证(Broda, 1977). 无论在自然现象的基础观测数据上还是在科学理论上, anammox细菌的存在都是有一定科学基础的. 但是, anammox细菌作为低氧和缺氧环境中广泛分布的一类重要的化能自养氮代谢细菌, 经历了30多年才最终被发现和确认(Strous等, 1999), 是什么因素阻碍了其发现? 又是什么因素最终促成了其发现? 对这些问题的分析给科学研究带来怎样的启示? 纵观anammox细菌发现历程, 我们不难看出, 科学发现不但是建立在科学观察和理论上, 而且科学信念和科学方法对科学发现同样起到重要作用.

对anammox细菌的发现起到关键作用的荷兰科学家 Kuenen, 当读到 Broda 发表的对化能自养 anammox 细菌预测文章时(Broda, 1977), 没有像当时的其他科学家一样对其进行怀疑或置之不理, 而是带领课题组对其进行深入讨论和剖析(Kuenen, 2008). 在 Mulder 找到 Kuenen 请求合作时, 在其时还无法判断 Mulder 发现的所谓“anammox”现象到底是个自发的化学反应过程还是个生物催化下的反应过程这一情况下, 尤其是在当时大多数科学家对 anammox 持怀疑态度情况下, Kuenen 积极响应并提出和进行了应用 ^{15}N 稳定同位素示踪法的深入研究(Kuenen, 2008). 尤其在20世纪90年代初, Gist-Brocades N.V. 生物技术公司关闭了其厌氧氨氧化试验厂, Kuenen 实验室所维持的 anammox 反应体系成了当时全世界唯一的一个厌氧氨氧化系统. 在这样的孤独坚守中, Kuenen 不但自己对 anammox 细菌的存在坚信不疑, 而且, 他带领研究团队及合作者, 对 anammox 开展了多方面的印证研究. 在 anammox 细菌重现性培养、发现、鉴定、系统进化分析、关键代谢路径分析等诸多方面做出了重大贡献(Kuenen, 2008), 并带动了全球自然环境 anammox 细菌生物地球化学过程和作用研究以及污水处理应用研究. 相信科学, 在科学原理和科学数据基础上, 坚定信念, 长期不懈, 并应用合理有效的科

学研究方法, 这可能是 Kuenen 及其团队和合作者在 anammox 细菌研究中发现中最关键的成功要素.

现在我们知道, anammox 细菌无论在细胞结构、生理生化、代谢方式、生长特性及环境要求上都极其特殊, 从1999年 anammox 细菌被确认至今, 人们仍然无法获得 anammox 细菌的纯培养, 这无疑构成了早期应用传统微生物实验方法进行有关 anammox 细菌研究的重要障碍. anammox 细菌的发现, 无疑得益于不依赖纯培养的分子生物技术的发展和应用(Amann 等, 1995), 目标细菌物理富集技术及稳定同位素示踪技术在揭示 anammox 细菌种类及关键代谢步骤方面同样发挥了重要作用(Kuenen, 2008). 现代(宏)基因组、(宏)转录组、(宏)蛋白质组等技术的应用为进一步揭示 anammox 细菌关键代谢路径、生态特征和环境功能提供了技术基础(Kartal 等, 2011, 2013; Strous 等 2006). 科学方法的合理应用无疑使原本被认为不可能存在的 anammox 细菌终于凸现出来.

科学发现存在一定的偶然性, 如果世上没有 Mulder, 如果 Mulder 当时没有在他运转的厌氧反硝化污水处理系统中添加硝酸盐并跟踪铵氮的变化, anammox 反应系统可能要等上若干年才有可能被发现. 如果是这样, Kuenen 是否有机会参与相关研究并成为该科学发现的关键科学家? anammox 细菌最终将以怎样的方式被发现? 这些问题显然很难解答. 但科学发现同样存在其必然性, 现代系统生物学等研究方法(如宏基因组学等)的应用, 加快了科学发现的速度. 如 Venter 等对马尾藻海(Sargasso Sea)环境基因组的测序分析, 使人们首次认识到海洋中可能存在能进行氨氧化的古菌(Venter 等, 2004), 改写了过去大家一直持有的氨氧化细菌是地球各种环境进行需氧氨氧化生物地球化学作用的唯一微生物类群这一错误概念(Stahl 和 Torre, 2004). anammox 细菌在缺氧的自然环境中普遍存在, 有理由预测, 即使不借助 anammox 反应系统的建立, 该类细菌也有可能像氨氧化古菌一样通过环境基因组学或其他研究方法最终被发现. 但 Mulder 和 Kuenen 等科学家无疑通过其敏锐观察和科学思考, 加快了 anammox 细菌的发现和研究的进度.

回顾 anammox 细菌的发现历程, 不难看出, 坚信科学、不畏困难的科研素养是科学发现的前提; 技术方法的创新是突破研究瓶颈的关键; 细致入微的观

测、精准理性的分析、遵循科学原理、突破传统观念束缚、大胆创新探索、持之以恒追求, 是科学研究成功的根本要素. *anammox*细菌的发现历程为我们展现了从科学原理出发通过方法创新实现科学发现的经典范例. *anammox*细菌独特的细胞结构、生理、生化、生态特性和功能, 展示了其科学研究和应用的广泛前景. 该类细菌纯菌株的获得将是该领域研究的一大重要突破, 是了解其物质和能量代谢及其调控的关键和基础. 除了含氮污水处理, 该类细菌在富营养化造成的缺氧海洋水体和沉积物生态修复、肼等化工原料及燃料的生物合成应用方面亦极具潜力. 有理由预测, *anammox*细菌的进一步研究将会给人们带来更多惊喜.

参考文献

- 陈重军, 王建芳, 张海芹, 沈耀良. 2014. 厌氧氨氧化污水处理工艺及其实际应用研究进展. 生态环境学报, 23: 521–527
- Ali M, Oshiki M, Awata T, Isobe K, Kimura Z, Yoshikawa H, Hira D, Kindaichi T, Satoh H, Fujii T, Okabe S. 2015. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium “*Candidatus* Jettenia caeni”. Environ Microbiol, 17: 2172–2189
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, 59: 143–169
- Arrigo K R. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. Nature, 437: 349–55
- Boumann H A, Longo M L, Stroeve P, Poolman B, Hopmans E C, Stuart M C, Sinninghe D J S, Schouten S. 2009. Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria: I. Ladderane phospholipids form highly organized fluid membranes. Biochim Biophys Acta, 1788: 1444–1451
- Broda E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. Z Allg Mikrobiol, 17: 491–493
- Byrne N, Strous M, Cr  peau V, Kartal B, Birrien J L, Schmid M, Lesongeur F, Schouten S, Jaeschke A, Jetten M, Prieur D, Godfroy A. 2009. Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. J ISME, 3: 117–123
- Dalsgaard T, Canfield D, Petersen J, Thamdrup B, Acuna-González J. 2003. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. Nature, 422: 606–608
- Dang H Y, Chen R P, Wang L, Guo L Z, Chen P P, Tang Z W, Tian F, Li S Z, Klotz M G. 2010. Environmental factors shape sediment anammox bacterial communities in hypernutrified Jiaozhou Bay, China. Appl Environ Microbiol, 76: 7036–7047
- Dang H Y, Zhou H X, Zhang Z N, Yu Z S, Hua E, Liu X S, Jiao N Z. 2013. Molecular detection of *Candidatus* Scalindua pacifica and environmental responses of sediment anammox bacterial community in the Bohai Sea, China. PLoS ONE, 8: e61330
- Devol A H. 2003. Solution to a marine mystery. Nature, 422: 575–576
- Fuchsman C A, Staley J T, Oakley B B, Kirkpatrick J B, Murray J W. 2012. Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea. FEMS Microbiol Ecol, 80: 402–416
- Graaf A A, Bruijn P, Robertson L A, Jetten M S M, Kuenen J G. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. Microbiology, 143: 2415–2421
- Graaf A A, Mulder A, Bruijn P, Jetten M S, Robertson L A, Kuenen J G. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. Appl Environ Microbiol, 61: 1246–1251
- Hu B L, Zheng P, Tang C J, Chen J W, Biezen E, Zhang L, Ni B J, Jetten M S, Yan J, Yu H Q, Kartal B. 2010. Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors. Water Res, 44: 5014–5020
- Hu Z, Alen T, Jetten M S, Kartal B. 2013. Lysozyme and penicillin inhibit the growth of anaerobic ammonium-oxidizing planctomycetes. Appl Environ Microbiol, 79: 7763–7769
- Jaeschke A, Op den Camp H J, Harhangi H, Klimiuk A, Hopmans E C, Jetten M S, Schouten S, Sinninghe D J S. 2009. 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs. FEMS Microbiol Ecol, 67: 343–350
- Jetten M S, Niftrik L V, Strous M, Kartal B, Keltjens J T, Op den Camp H J. 2009. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol, 44: 65–84
- Jetten M S, Wagner M, Fuerst J, Loosdrecht M, Kuenen G, Strous M. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (“anammox”) process. Curr Opin Biotechnol, 12: 283–288
- Jogler C. 2014. The bacterial “mitochondrion”. Mol Microbiol, 10: 12814
- Kartal B, Almeida N M, Maalcke W J, Op den Camp H J, Jetten M S, Keltjens J T. 2013. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. FEMS Microbiol Rev, 37: 428–461
- Kartal B, Kuenen J G, Loosdrecht M C. 2010. Sewage treatment with anammox. Science, 328: 702–703
- Kartal B, Maalcke W J, Almeida N M, Cirpus I, Gloerich J, Geerts W, Op den Camp H J, Harhangi H R, Janssen-Megens E M, Francoijs K J, Stunnenberg H G, Keltjens J T, Jetten M S, Strous M. 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. Nature, 479: 127–130
- Kartal B, Niftrik L, Rattray J, Vossenberg J L, Schmid M C, Sinninghe D J, Jetten M S, Strous M. 2008. *Candidatus* “Brocadia fulgida”: An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. FEMS Microbiol Ecol, 63: 46–55

- Kartal B, Rattray J, Niftrik L A, Vossenberg J, Schmid M C, Webb R I, Schouten S, Fuerst J A, Sinninghe D J, Jetten M S, Strous M. 2007. Candidatus "*Anammoxoglobus propionicus*" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 30: 39–49
- Kuenen J G. 2008. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Microbiol*, 6: 320–326
- Kuenen J G, Jetten M S. 2001. Extraordinary anaerobic ammonium oxidising bacteria. *ASM News*, 64: 456–463
- Kuypers M M, Sliekers A O, Lavik G, Schmid M, Jørgensen B B, Kuenen J G, Sinninghe D J S, Strous M, Jetten M S M. 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422: 608–611
- Mulder A. 1992. Anoxic ammonia oxidation. US Patent US5078884 A
- Mulder A, Graaf A A, Robertson L A, Kuenen J G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol*, 16: 177–183
- Neumann S, Jetten M S, Niftrik L. 2011. The ultrastructure of the compartmentalized anaerobic ammonium-oxidizing bacteria is linked to their energy metabolism. *Biochem Soc Trans*, 39: 1805–1810
- Niftrik L, Jetten M S. 2012. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Unique microorganisms with exceptional properties. *Microbiol Mol Biol R*, 76: 585–596
- Quan Z X, Rhee S K, Zuo J E, Yang Y, Bae J W, Park J R, Lee S T, Park Y H. 2008. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ Microbiol*, 10: 3130–3139
- Richard F A. 1965. Anoxic basins and fjords. In: Ripley J P, Skirrow G, eds. *Chemical Oceanography*. Manhattan: Academic Press. 1: 611–645
- Rothrock M J J, Vanotti M B, Szögi A A, Gonzalez M C, Fujii T. 2011. Long-term preservation of anammox bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92: 147–57
- Russ L, Kartal B, Op den Camp H J, Sollai M, Le Bruchec J, Caprais J C, Godfroy A, Sinninghe D J S, Jetten M S. 2013. Presence and diversity of anammox bacteria in cold hydrocarbon-rich seeps and hydrothermal vent sediments of the Guaymas Basin. *Front Microbiol*, 4: 219
- Schalk J, Oustad H, Kuenen J G, Jetten M S. 1998. The anaerobic oxidation of hydrazine: A novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiol Lett*, 158: 61–67
- Schmid M, Twachtman U, Klein M, Strous M, Juretschko S, Jetten M, Metzger J W, Schleifer K H, Wagner M. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol*, 23: 93–106
- Schmid M, Walsh K, Webb R, Rijpstra W I, Pas-Schoonen K, Verbruggen M J, Hill T, Moffett B, Fuerst J, Schouten S, Sinninghe D J S, Harris J, Shaw P, Jetten M, Strous M. 2003. Candidatus "*Scalindua brodae*", sp. nov., Candidatus "*Scalindua wagneri*", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 26: 529–38
- Shao S D, Luan X W, Dang H Y, Zhou H X, Zhao Y K, Liu H T, Zhang Y B, Dai L Q, Ye Y, Klotz M G. 2014. Deep-sea methane seep sediments in the Okhotsk Sea sustain diverse and abundant anammox bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, 87: 503–516
- Sinninghe D J, Rijpstra W I, Geenevasen J A, Strous M, Jetten M S. 2005. Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox). *FEBS J*, 272: 4270–4283
- Sinninghe D J, Strous M, Rijpstra W I, Hopmans E C, Geenevasen J A, Duin A C, Niftrik L A, Jetten M S. 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, 419: 708–712
- Sonthiphand P, Hall M W, Neufeld J D. 2014. Biogeography of anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) bacteria. *Front Microbiol*, 5: 399
- Stahl D A, Torre J R. 2012. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annu Rev Microbiol*, 66: 83–101
- Strous M, Fuerst J A, Kramer E H, Logemann S, Muyzer G, Pas-Schoonen K T, Webb R, Kuenen J G, Jetten M S. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400: 446–449
- Strous M, Pelletier E, Mangenot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Médigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh B E, Op den Camp H J, van der Drift C, Cirpus I, van de Pas-Schoonen K T, Harhangi H R, van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, van de Vossenberg J, Kartal B, Meier H, Frishman D, Huynen M A, Mewes H W, Weissenbach J, Jetten M S, Wagner M, Le Paslier D. 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 440: 790–794
- Teeseling M C, Neumann S, Niftrik L. 2013. The anammoxosome organelle is crucial for the energy metabolism of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 23: 104–117
- Thamdrup B, Dalsgaard T. 2002. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 68: 1312–1318
- Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, Halpern A L, Rusc D, Eisen J A, Wu D Y, Paulsen I, Nelson K E, Nelson W, Fouts D E, Levy S, Knap A H, Lomas M W, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y H, Smith H O A F. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304: 66–74

- Vossenberg J, Woebken D, Maalcke W J, Wessels H J, Dutilh B E, Kartal B, Janssen-Megens E M, Roeselers G, Yan J, Speth D, Gloerich J, Geerts W, van der Biezen E, Pluk W, Francoijs K J, Russ L, Lam P, Malfatti S A, Tringe S G, Haaijer S C, Op den Camp H J, Stunnenberg H G, Amann R, Kuypers M M, Jetten M S. 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
- Woebken D, Lam P, Kuypers M M, Naqvi S W, Kartal B, Strous M, Jetten M S, Fuchs B M, Amann R. 2008. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ Microbiol*, 10: 3106–19