

# 英虞湾における海洋性アナモックス細菌に関する研究

著者	中島 潤
発行年	2008-01-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10076/10950">http://hdl.handle.net/10076/10950</a>

博士論文

英虞湾における海洋性アナモックス細菌  
に関する研究

平成 21 年 3 月

三重大学大学院  
生物資源学研究所  
資源循環学専攻

中島 潤

## 目次

	頁
略記号.....	5
第 1 章 緒論.....	6
Figures and Tables.....	14
第 2 章 英虞湾における海洋性アナモックス細菌の存在.....	21
序説.....	21
第 1 節 実験方法.....	22
1.1 英虞湾底質の試料採取.....	22
1.2 底質からの環境 DNA 抽出.....	22
1.3 アナモックス細菌の 16S rDNA の PCR 法による増幅.....	22
1.3. PCR 産物のクローニング.....	23
1.4. 海洋性アナモックス菌の塩基配列解析.....	24
第 2 説 結果.....	25
第 3 節 考察.....	25
Figure and Table.....	27
第 3 章 海洋環境からのアナモックス細菌の集積培養.....	30
序説.....	30
第 1 節 実験方法.....	30
1.1. アナモックス細菌含有試料の採取.....	31
1.2. アナモックス細菌集積培養の条件.....	31
1.3. 亜硝酸態窒素の分析.....	31

1.4. アンモニア態窒素の分析 .....	32
第 2 節 結果 .....	32
第 3 節 考察 .....	33
Figures and Tables.....	35
第 4 章 アナモックスリアクターの菌叢解析 .....	41
序説 .....	41
第 1 節 実験方法 .....	41
1.1. バッチ培養によるアナモックス活性測定 .....	41
1.2. 不織布からの DNA 抽出 .....	42
1.3. アナモックス細菌の PCR 法による検索 .....	42
1.4. PCR 産物のクローニング解析 .....	43
1.5. 塩基配列解析 .....	43
1.6. FISH (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization) 法によるアナモックス 細菌の検出 .....	44
1.7. PCR-DGGE 法による海洋性アナモックスリアクター内菌叢の解析	45
第 2 節 結果 .....	47
2.1. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢のアナモックス活性 .....	47
2.2. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢のクローニング解析 .....	48
2.3. 海洋性アナモックス細菌の系統樹解析 .....	50
2.4. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢の FISH 解析 .....	50
2.5. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢の PCR-DGGE 解析 .....	51
第 3 節 考察 .....	51
Figures and Tables.....	55

第 5 章 英虞湾におけるアナモックス細菌の分布 .....	62
序説 .....	62
第 1 節 実験方法 .....	62
1.1. 英虞湾海域の水質及び底質分析 .....	62
1.2. 英虞湾底質の試料採取 .....	63
1.3. 英虞湾底質からの環境 DNA 抽出 .....	63
1.4. アナモックス細菌の PCR 法による検索 .....	63
1.5. PCR 産物のクローニング解析 .....	64
1.6. クローンの塩基配列解析 .....	64
1.7. バッチ培養によるアナモックス活性の検出 .....	64
1.8. FISH 法によるアナモックス細菌の検出 .....	64
第 2 節 結果 .....	65
2.1. 英虞湾海域の水質及び底質分析 .....	65
2.2. 海洋性アナモックス細菌のクローニング解析 .....	65
2.3. 海洋性アナモックス細菌の系統樹解析 .....	66
2.4. 英虞湾底質のアナモックス活性のバッチ培養による検出 .....	67
2.5. FISH 法による英虞湾底質中における海洋性アナモックス細菌の検出 .....	67
第 3 節 考察 .....	68
Figures and Tables .....	71
第 6 章 総合論議 .....	77
Figure .....	85
謝辞 .....	87

引用文献 ..... 88

略記号

Anammox (アナモックス); Anaerobic ammonium oxidation

AVS: Acid volatile sulfides

DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

FISH: Fluorescence *in situ* hybridization

IPTG : Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

PBS : Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

SLS: Sample loading solution

St: Site

TAE buffer : 40mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane-acetic acid-1 mM EDTA buffer (pH8.0)

TE buffer : 10mM Tris-HCl-1mM EDTA (pH8.0)

Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

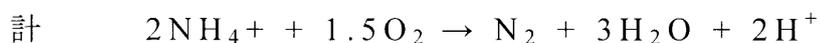
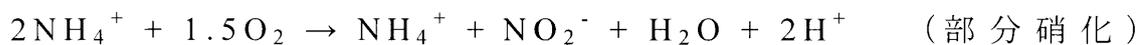
X-gal : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## 第 1 章 緒論

我々を取り巻く大気の 80% を占める主成分は分子状窒素であり、窒素は生物体の核酸やタンパク質を構成する元素の一つである。しかし、ほとんどの生物は大気中の分子状窒素を直接利用することはできない。自然界においては、地球上の窒素循環系を Fig.1 に表したが、この中でシアノバクテリアや根に共生する土壌細菌などの少数の微生物のみが大気中の窒素をアンモニアに固定して利用することができる。固定されたアンモニアは有機態窒素に変換され、物質循環の後再び微生物により無機化されてアンモニアとなり、*Nitrosomonas* 属や *Nitrosococcus* 属などアンモニア酸化細菌によるアンモニアから亜硝酸への酸化 ( $2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+$ ) と *Nitrobacter* 属などの亜硝酸酸化細菌による亜硝酸から硝酸への酸化 ( $2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_3^-$ ) の 2 段階からなる硝化反応により硝酸へと酸化される。硝酸は嫌気条件下で種々の微生物により還元されて亜硝酸やアンモニアに戻るか、または *Pseudomonas* 属や *Paracoccus* 属などの脱窒菌による脱窒反応 ( $\text{NO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ ,  $2\text{NO}_2^- + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{OH}^-$ ) により分子状窒素の形で系外に放出される。これが従来から知られていた、硝化と脱窒による窒素の循環である。しかし、近年、この窒素循環経路とは異なり、アンモニアと亜硝酸から嫌氣的に窒素ガスを生成するアナモックス反応が新たに発見された (Van de Graaf *et al.*, 1995)。

1977 年、Broda(1977) は、脱窒の水素供与体としてアンモニアを用いてエネルギーを獲得する独立栄養性微生物が存在する

ことを熱力学的な検討から予測した。その後、この反応に関与する微生物を自然界から見つけ出す試みが多くの研究者によってなされたが、いずれも失敗に終わった。しかし、1995年にオランダのデルフト工科大学の研究グループから脱窒流動床内部の窒素収支の検討をもとにしてアンモニアを水素供与体とする新しい窒素の代謝経路「アナモックス (Anammox)」が報告された (Mulder *et al.*, 1995)。研究の初期の段階では、アナモックスの反応基質は  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  であると報告されたが、アナモックス細菌の濃度が約 80% にまで達した集積培養液を用いた研究により、真の基質は  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_2^-$  であると訂正された。また、集積培養に成功したことにより、アナモックス細菌の倍加時間は 11 日であることが明らかになった。しかし、現在においてもなお、アナモックス細菌の単離に成功したという報告はない。このアナモックス反応は、窒素固定 → 硝化 → 脱窒という従来窒素循環系に加わる新たな窒素変換経路であり、 $\text{HCO}_3^-$  を炭素源として  $\text{NH}_4^+$  が水素供与体、 $\text{NO}_2^-$  が水素受容体となる独立栄養性の脱窒反応である。発見当初は複雑なアナモックス反応の代謝式が提示されたが、最近は以下のような式でアナモックス反応が説明されるようになった。



Strous *et al.* (1999) は、反応槽から取り出したバイオフィルムを超音波処理し、凝集した細菌を個々の細胞にまでばらばらにし、

Percoll 密度勾配遠心法を行うことにより約 99.5%の純化に成功した。この細胞の集団を使って反応を行った結果アナモックス反応が進行することが確認された。この細胞から抽出したDNAを鋳型として16S rDNAをPCRで増幅し、塩基配列を決定した結果、このアナモックス細菌の16SrDNAはそれまで知られていた最も近い細菌でも塩基配列の相同性が80.2%しかなく、Planctomycetesに属するが、系統発生的に根元で分岐している新規の細菌であることがわかった。この新規の細菌は、後に *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”と命名され、これが最初のアナモックス細菌として認知されるようになった(Kuenen *et al.*, 2001)。

その後、*Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”を用いたゲノムプロジェクトが行われ、ゲノムの全長である約4.3Mbpのほぼすべての解読に成功したことがNature誌(Strous *et al.*, 2006)に報告され、以前から論議があった代謝経路が次第に明らかになった。*Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”のゲノム上には、異化と呼吸系に関する約200の遺伝子が存在し、その中に9個のヒドロキシルアミノキシダーゼ(HAO)をコードすると思われる遺伝子と2つの脱窒に関与する亜硝酸リダクターゼ(Nir)と硝酸リダクターゼ(Nar)をコードする遺伝子が存在していることが明らかにされた。アナモックス細菌は、電子受容体として亜硝酸を用いた嫌氣的アンモニア酸化反応によりエネルギーを獲得していること、二酸化炭素が生育のための主な炭素源であることが明らかになった。二酸化炭素固定はアセチル-CoA経路を經由し、必要な電子は亜硝酸から硝酸への嫌氣的酸化により得ている可

能性が高いことが示された。今後、さらに詳細な代謝経路が明らかにされていくと考えられる。

アナモックス細菌の形態的および生理的特徴は、以下の通りである。生育温度  $6^{\circ}\text{C} \sim 42^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}6.7 \sim 8.3$  の範囲で生育可能であり、 $100\text{mM}$  のアンモニアと硝酸が存在している条件下でもアナモックス反応は阻害されないこと、メタノールの存在下においてアナモックス反応が阻害され、亜硝酸が反応基質であるにも関わらず亜硝酸濃度が  $7\text{mM}$  以上の条件ではアナモックス反応は阻害されることが知られている(Strous *et al.*, 1999)。アナモックス細菌は、 $1\mu\text{m}$  程度の直径を持つ球菌で、Planctomycetes に属す他の細菌と同様に発芽によって増殖する(Strous *et al.*, 1999)。また、細胞内部 (Fig. 2) は、細胞質膜、さらに内側に膜 (intracytoplasmic membrane) が存在し、それに囲まれた領域に DNA が収納されてヌクレオチド (nucleoid) となっており、リボソームを含むリボプラズム (riboplasm)、アナモックス反応に関係するアナモキシソーム (anammoxosome) がそれぞれコンパートメント化されている (Schmid *et al.*, 2003)。アナモキシソームを仕切る膜の脂質成分には、アナモックス細菌特有の特殊な環状構造を有するラダーラン (ladderane) 脂質 (Fig. 3) が含まれている。この脂質は自然界にはほとんど存在せずアナモックス細菌特有の脂質である。アナモックス反応は、アナモキシソームを仕切る膜の両側で進行する。反応の進行が比較的遅いためその反応中間体であるヒドラジンとヒドロキシルアミンなどが容易に拡散すること、また、これらの中間体に毒性があることからラダーラン脂質は密度の高い膜を形成し中間体の拡散を防ぎアナモックス反応の効率的な進

行を助けていると考えられている。アナモックス細菌生体内におけるラダーラン脂質の生合成経路は明らかになっていないが、ゲノム解析によりこの脂質の合成に関与すると予想される遺伝子クラスターが発見されている(Strous *et al.*, 2006)。

自然界において、アナモックス細菌は、様々な環境下に分布することが分かってきている。アナモックス細菌は、最初に発見された *Candidatus "Brocadia anammoxidans"* の 16S rDNA の塩基配列が Gene Bank に登録されて以降、この塩基配列を基にして FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法でアナモックス細菌の検出が可能となった。これにより、アナモックス細菌の生育環境は、排水処理システムに限定されているわけではないことがわかってきた。アナモックス細菌の様々な研究により、世界中で河川、湖、海洋生態系の 30 箇所以上 (Tables 1, and 2) からアナモックス細菌が存在していることが報告されている。これらの研究におけるアナモックス細菌の検出と定量は、集積培養、水質分析、安定同位体を用いた実験、脂質分析、FISH 法、16S rDNA 解析などの微生物学、分子生態学、化学分析などの手法により行われてきている。

アナモックス細菌の自然生態系からの最初の発見は、2003 年のマックスプランク研究所のグループによるものであり、彼らは世界最大の嫌気水域が広がる黒海において水深毎にアナモックス細菌が特異的に有するラダーラン脂質濃度を測定し、その濃度プロファイルとアナモックス活性のプロファイルが一致することを明らかにした。このことは、ラダーラン脂質をマーカーとしてアナモックス細菌を検出できることを強く示唆した(Kuypers *et al.*, 2003)。ア

アナモックス細菌は、嫌気的水域の亜硝酸と硝酸の蓄積が認められる水域に存在し、深層域から上方に拡散するアンモニアを消費している。この結果から、海洋の多くの嫌気的な海域にアナモックス細菌が生存し脱窒のかなりの部分を担っていることが予測される。また、デンマーク国立環境研究所 Dalsgaard らの研究グループは、中米コスタリカ Golfo Dulce の深層域でアナモックス反応の起こる環境が整っていることに注目し、窒素安定同位体を含むアンモニアあるいは硝酸を用いてアナモックス活性と脱窒活性測定した。その結果、この水域においてアナモックス反応が起こっていることが確かめられた。さらに、この湾内において、全く見過ごされてきたアナモックス反応による窒素除去が調査海域で窒素除去の実に約 50%を占め、アナモックスが窒素に汚染された海域における窒素サイクルの中で重要な役割を果たしていることが見出された(Dalsgaard *et al.*, 2003)。その後も海洋におけるアナモックス細菌の研究が、様々な海域で行われ、嫌気的底質や嫌気的水域において総  $N_2$  生産の 20%~79%を担っていることが示唆されている(Table 2)。

アナモックス細菌の 16S rDNA の塩基配列は、全長である約 1.5kbp から部分塩基配列まで多くの塩基配列が核酸データベース(DDBJ、Gen Bank、EMBL) に登録されている。これらデータベースには、高濃度培養に成功したアナモックス細菌の 16S rDNA 塩基配列から自然界に存在するアナモックス細菌のクローン解析による塩基配列まで様々含まれている。登録されている塩基配列の系統的解析により(Fig. 4)、アナモックス細菌は *Candidatus Scalindua*, *Candidatus Brocadia*, *Candidatus*

Kuenernia の 3 つのグループに分類できる。黒海から発見された *Candidatus Scalindua sorokinii* (AY257181) や南極海の大陸棚から発見されたクローンである *Uncultured planctomycete MERTZ\_2CM\_127* (AF424463) などの多くの海洋性アナモックス細菌が *Candidatus Scalindua* のグループに近縁であることが報告されている (Bowman *et al.* 2003)。また、*Candidatus Scalindua* のグループには、浸出水の処理プラントから発見された *Candidatus Scalindua brodae* (AY254883)、*Candidatus Scalindua wagneri* (AY254882) とそれ以外の淡水性のクローンも含まれる。しかし、ボルチモア湾の底質から、現在までに発見されているアナモックス細菌とは異なる新規の分岐を示す可能性があるクローンが報告されていることから (Tal *et al.*, 2005)、アナモックス細菌は複数の属から構成されるかなり多様な一群の細菌であり、今後新規のアナモックス細菌がまだまだ発見されることが予想される。

本研究の対象である英虞湾は、三重県志摩半島の南部に位置し、西部を熊野灘に開いているリアス式の湾である。湾内では、多数の島々が存在し真珠養殖が日本で初めて行われた場所として有名である。真珠養殖は、県下の年間真珠生産額約 87 億円の大半を生産し、地域の産業基盤として極めて重要な水域と位置付けられている。閉鎖海域である英虞湾の状態は貧酸素水塊や赤潮が頻繁に発生し、三重県を代表する真珠養殖産業も切迫した状態にある。海域の環境汚染の指標として、一般に COD 値が用いられている。英虞湾では、年々水質の COD 値は増減を繰り返しながら横這い傾向であるのに対して底

質のCOD値は年々増加傾向であり、環境の悪化が進んでいる。つまり、これは英虞湾の負荷量が浄化量を上回る状態になっており、それによって順に底質悪化、貧酸素化、硫化水素発生、生物死滅、生物的浄化機能の低下、そしてさらなる底質悪化の加速、という負の循環に陥っていると言える。また、近年閉鎖性海域の窒素濃度が上昇していることから、今後の沿岸環境管理のために海洋の窒素循環経路を解明することが重要である。

アナモックス細菌は、自然界に広く分布し窒素循環において重要な役割を担っているが、日本近海におけるアナモックス細菌についての情報はわずかである。しかし、世界の海洋において自然環境が異なる様々な地点からアナモックス細菌が発見され窒素循環の重要性が示されていることから、日本近海にアナモックス細菌が生育し窒素循環の重要な役割を担っていることが考えられる。そこで、本論文の目的は、海洋環境下におけるアナモックス細菌について研究することにより、海洋生態系におけるアナモックス細菌の重要性について明らかにすることを目的とした。そこで、本論文は、リアス式海岸が広がり閉鎖性水域である英虞湾底質に生息するアナモックス細菌の集積培養及びその菌叢解析と、英虞湾における海洋性アナモックス細菌の検出を行った。

## Figures and Tables

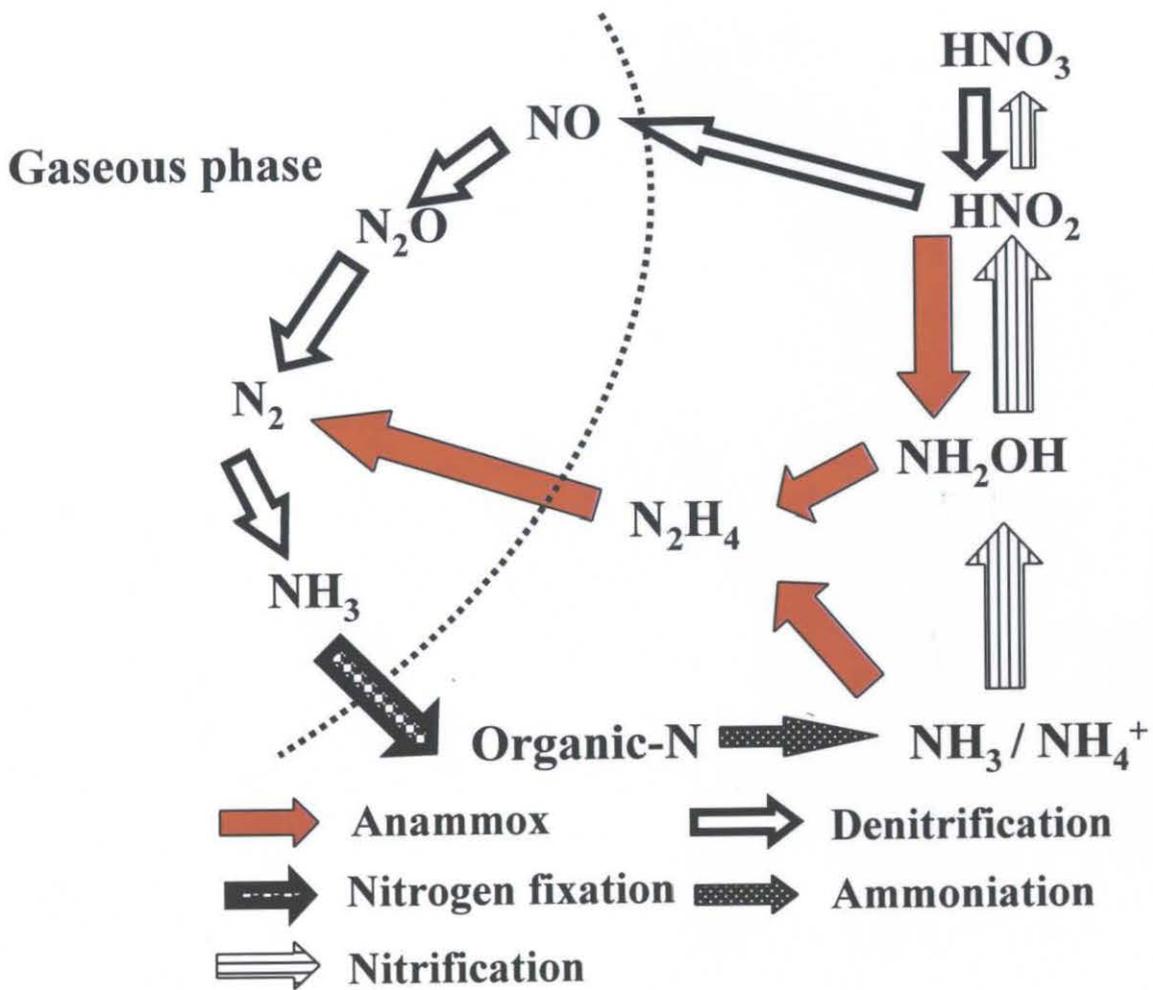


Fig. 1. Denitrification reaction system and anammox reaction.

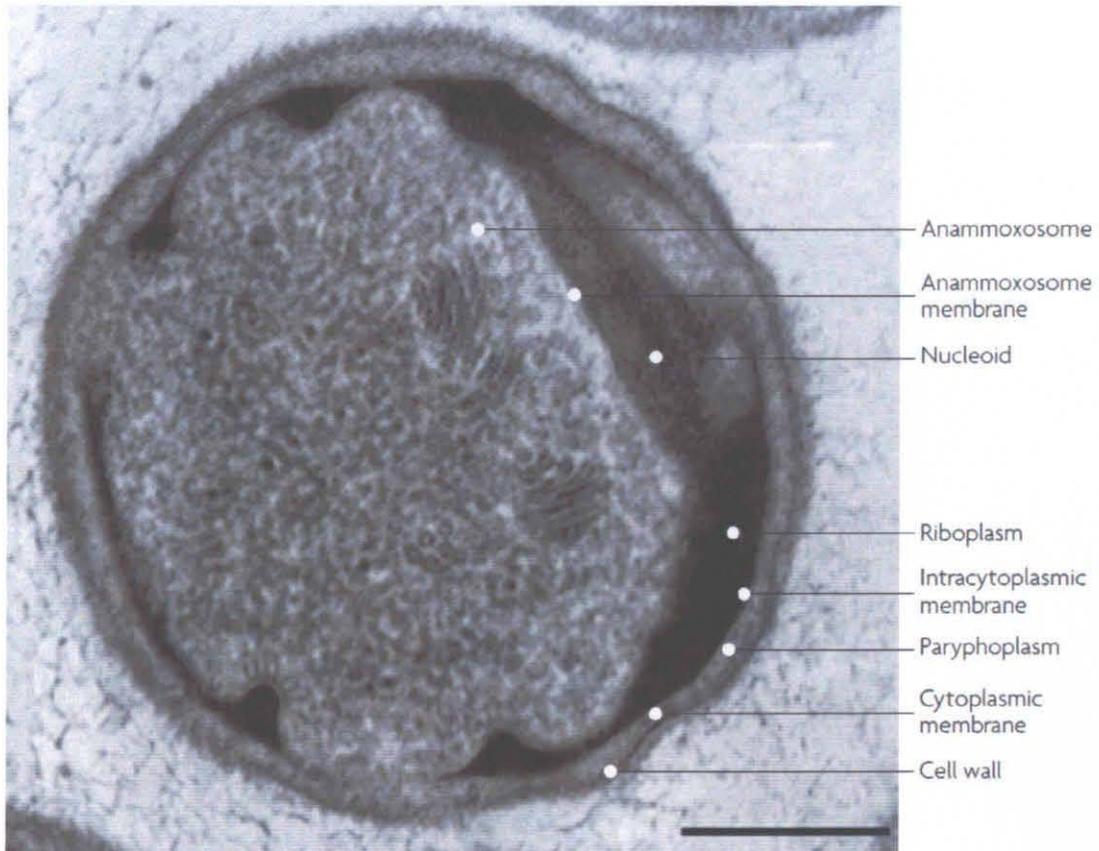
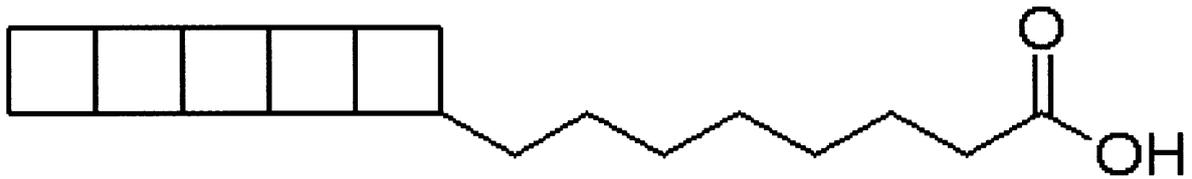


Fig. 2. Transmission electron micrograph of a *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* cell. *Candidatus K. stuttgartiensis* contains subcellular compartments, including the anammoxosome, where energy conservation takes place. The riboplasm is the equivalent of the ribosome-containing cytoplasm in most other bacteria. The scale bar represents 200 nm. (Kuenen *et al.*, 2008)



**C<sub>20</sub>-[5]-ladderane**

Fig. 3. Structure of the anammox ladderane membrane lipid.

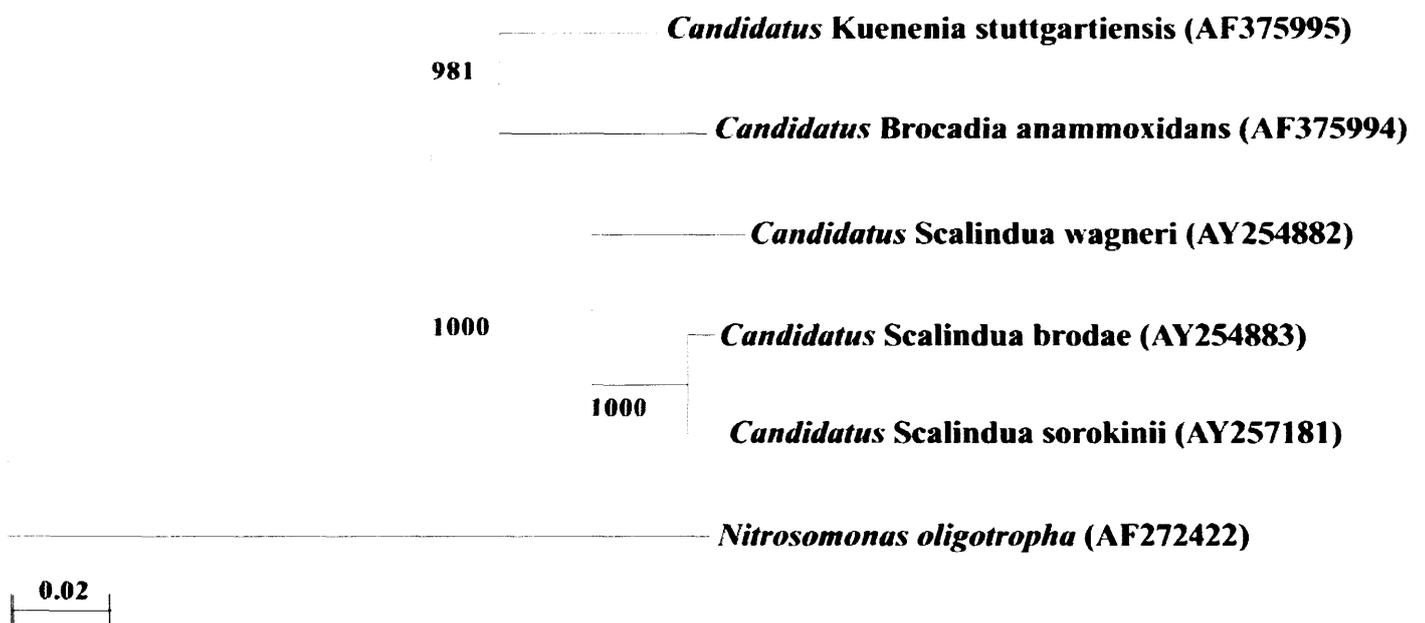


Fig. 4. A 16S rRNA-gene -based phylogenetic tree of authentic anammox bacteria. The bar represents 2% estimated distance of sequence divergence.

Table 1. Distribution of anammox bacteria in man-made systems around the world.

Place	Method of detection	Reference
Delft/Nijmegen, The Netherlands	$^{15}\text{N}$ , enrichment, FISH, lipids, clone library	Strous <i>et al.</i> , 1999 Muder <i>et al.</i> , 1995 Schmid <i>et al.</i> , 2005 Damsté <i>et al.</i> , 2002 Kartal <i>et al.</i> , 2004
Stuttgart, Germany	Enrichment, FISH, clone library	Schmid <i>et al.</i> , 2000
Dubendorf, Switzerland	Enrichment, FISH, clone library	Egli <i>et al.</i> , 2001
Hannover, Germany	Enrichment, FISH	Helmer-Madhok <i>et al.</i> , 2001
Kumamoto, Japan	Enrichment, FISH	Fujii <i>et al.</i> , 2002
Sydney, Australia	Enrichment	Toh <i>et al.</i> , 2002
Athens, GA, U.S.A.	Enrichment	Dong <i>et al.</i> , 2003
Ghent, Belgium	Enrichment, FISH, clone library	Pynaert <i>et al.</i> , 2003
Pitsea, U.K.	Enrichment, FISH, lipids, clone library	Schmid <i>et al.</i> , 2003
Kirinya, Jinja, Uganda	FISH	Jetten <i>et al.</i> , 2003
Hangzhou, China	Enrichment	Zheng <i>et al.</i> , 2004
Kanagawa, Japan	Enrichment, FISH	Imajo <i>et al.</i> , 2004
Lyngby, Denmark	Enrichment	Schmidt <i>et al.</i> , 2004
Mechernich, Germany	Enrichment	Li <i>et al.</i> , 2004
Santiago de Compostela, Spain	Enrichment, FISH	Dapaena-Mora <i>et al.</i> , 2004
Yongin, Korea	Enrichment, FISH	Liu <i>et al.</i> , 2005
Beijing, China	Enrichment	Wanget <i>et al.</i> , 2005
Chiba, Japan	Enrichment, FISH	Isaka <i>et al.</i> , 2005
Perth, Australia	Enrichment, FISH	Third <i>et al.</i> , 2005

Table 2. Distribution of anammox bacteria in natural systems around the world.

<b>Place</b>	<b>Method of detection</b>	<b>Reference</b>
Skagerak (North Sea)	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles	Thamdrup <i>et al.</i> , 2002
Black Sea	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles, FISH, lipids, clone library	Kuypers <i>et al.</i> , 2003
Golfo Dulce, Costa Rica	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles	Schmid <i>et al.</i> , 2003
Thames Estuary, U.K.	$^{15}\text{N}$	Trimmer <i>et al.</i> , 2003
Arctic Sea (East Greenland)	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles	Rysgaard <i>et al.</i> , 2004
Arctic Sea (NW Greenland)	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles	Rysgaard <i>et al.</i> , 2004
Mertz Sea Antarctica	Clone library	Bowman <i>et al.</i> , 2003
Randers Fjord, Denmark	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles, FISH, clone library	Rysgaard-Penterson <i>et al.</i> , 2004
Benguela OMZ, Namibia	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles, FISH, lipids, clone library	Kuypers <i>et al.</i> , 2005
Chesapeake Bay, U.S.A.	$^{15}\text{N}$ , FISH, clone library	Tal <i>et al.</i> , 2005
Gullmarsfjorden, Sweden	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles	Engström <i>et al.</i> , 2005
Long Island, U.S.A.	$^{15}\text{N}$ , nutrient profiles	Engström <i>et al.</i> , 2005
Seto Inland Sea, Osaka Bay and Ise Bay, Japan	$^{15}\text{N}$ , clone library	Amano <i>et al.</i> , 2007

## 第 2 章 英 虞 湾 における 海 洋 性 ア ナ モ ッ ク ス 細 菌 の 存 在

### 序 説

新しい窒素の代謝経路である「アナモックス反応」が発見されて以降、アナモックス細菌の分布について多くの研究者により研究が行われてきた。現在までに、アナモックス細菌は、排水処理施設、海洋、湖沼などの様々な環境下に存在し、窒素循環において重要な役割を担っていることがわかっている。そこで、筆者はアナモックス細菌を英虞湾底質から集積培養をするための予備調査として、底質にアナモックス細菌が存在するのか否かを分子生物学的手法を用いて調べた。

諸論で述べたように、最初に発見されたアナモックス細菌である *Candidatus Brocadia anammoxidans* の 16S rDNA の塩基配列が核酸データベースに登録され、この塩基配列を基にして PCR 法、FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法によるアナモックス細菌の検出が可能となっている。この技術を用いて自然界にアナモックス細菌が広く分布していることが明らかにされている。さらに、自然界から検出された多くのアナモックス細菌の 16S rDNA 塩基配列が核酸データベースに登録され、アナモックス細菌の 16S rDNA を特異的に増幅するプライマーが開発された (Schmid *et al.*, 2003)。本研究では、アナモックス細菌を特異的に増幅するプライマーを用いて海洋性アナモックス細菌の検出を行った。

## 第 1 節 実験方法

### 1.1 英虞湾底質の試料採取

英虞湾の 5 地点、St. 4 (34° 16.5' N, 136° 47.4' E)、St. 6 (34° 19.0' N, 136° 48.0' E)、St. 10 (34° 17.1' N, 136° 51.3' E)、St. 12 (34° 17.3' N, 136° 50.2' E)、St. 20 (34° 17.0' N, 136° 45.0' E) の地点 (Fig. 5) から 2004 年 8 月にエクマンバージ採泥器により底質を採取した。

### 1.2 底質からの環境 DNA 抽出

底質 0.5g から Ultra Clean Soil DNA isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) により DNA 抽出を行った後、粗 DNA を QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) により精製した。

### 1.3 アナモックス細菌の 16S rDNA の PCR 法による増幅

前項で抽出した DNA を鋳型として 16S rDNA の増幅を行った。増幅には、*Planctomycetales* の 16S rDNA に特異的なプライマー Pla46f (5'-GGA TTA GGC ATS CAA GTC-3') とアナモックス細菌の 16S rDNA に特異的なプライマー Amx820 (5'-AAA ACC CCT CTA CTT AGT G-3') のプライマーセット (Schmid *et al.*, 2005) を用いた。

サーマルサイクラーには、iCycler Thermal Cycler (BIO-RAD) を用いた。200  $\mu$ l 用の PCR チューブに 10 $\times$ Ampli Taq Gold buffer (Applied Biosystems) 5.0  $\mu$ l, dNTP mixture (dA, dC, dG, dT, 各 2.0 mM; Applied Biosystems) 5.0  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25.0 mM, Applied Biosystems) 6.0  $\mu$ l, PCR primer: Pla46f (10.0 pmol/ $\mu$ l) 2.0  $\mu$ l, Amx820 (10.0

pmol/ $\mu$ l) 2.0  $\mu$ l、DNA 溶液 1  $\mu$ l、滅菌水 28.5  $\mu$ l、AmpliTaq Gold (5.0 U/ $\mu$ l, Applied Biosystems) 0.5  $\mu$ l 入れ、計 50.0  $\mu$ l としたものを PCR 反応液とした。ネガティブコントロールには、DNA の代わりに滅菌水を加えた。PCR 条件はプレラン (95 $^{\circ}$ C、4 分) を行った後、熱変性 (95 $^{\circ}$ C、1 分)、アニーリング (50 $^{\circ}$ C、1 分)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C、90 秒) を 35 サイクルした後、ポストラン (72 $^{\circ}$ C、10 分) を行った。PCR により目的配列が増幅されたことを確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲルは、アガロース S (和光純薬) を 1 $\times$ TAE (40mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane -acetic acid-1 mM EDTA buffer、pH8.0) に 2% となるように溶解させて作成した。また、サイズマーカーには、100 bp DNA Ladder (TAKARA) を用いた。泳動後にエチジウムブロマイドでゲルを 20 分染色し、紫外線 (UV) を照射し PCR 産物を確認した。

### 1.3. PCR 産物のクローニング

PCR 産物のクローニングには、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) を用いた。前項の PCR 産物を 1  $\mu$ l、TOPO2.1 vector 1  $\mu$ l、Salt Solution 1  $\mu$ l、Sterile Water 3  $\mu$ l を入れゆっくり攪拌し、室温で 5 分静置した。その後、氷上で溶かした TOP10 (Invitrogen) のコンピテントセルに、2  $\mu$ l の TOPO Cloning reaction を加え、氷上で 5 分静置した。それを 42 $^{\circ}$ C で 30 秒間ヒートショック処理し形質転換を行った。50  $\mu$ g/ml のアンピシリンと 30  $\mu$ g/ml の X-gal を含む LB(Lennox broth) 平板培地に形質転換体を塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。出現した

白いコロニーを 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む LB 液体培地に植菌し 37°C で一晩培養した。その培養液を遠心 (14,000 rpm、4°C、5 分) を行い QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド抽出を行った。得られたプラスミドをアガロースゲル (1%) で電気泳動を行い、目的の DNA 断片が挿入されていることを確認するとともに挿入されていたプラスミドの濃度を推定した。

#### 1.4. 海洋性アナモックス菌の塩基配列解析

前項で得られたプラスミドを鋳型として、プラスミドに挿入された断片の塩基配列を GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (BECKMAN COULTER) を用いて決定した。酵素反応条件は、熱変性 (96°C、20 秒)、アニーリング (50°C、20 秒)、伸長反応 (60°C、1 分) を 40 回繰り返した。得られた各サンプルに Stop solution [100 mM EDTA 2  $\mu\text{l}$  (ナカライテスク)、3 M 酢酸ナトリウム 2  $\mu\text{l}$  (ナカライテスク)、Glycogen 1  $\mu\text{l}$  (BECKMAN COULTER)] を 5.0  $\mu\text{l}$  添加し、99.5% (v/v) エタノール (ナカライテスク) を 60.0  $\mu\text{l}$  加え沈殿物を得た。得られた沈殿物を 70% (v/v) エタノール 200  $\mu\text{l}$  で 2 度洗浄し、エタノールを除き乾燥させ、SLS 40.0  $\mu\text{l}$  (BECKMAN COULTER) に沈殿物を溶解させた。これをマルチキャピラリー DNA 解析システム CEQ2000XL (BECKMAN COULTER) により塩基配列解析を行った。その後、決定された塩基配列を用いて DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) の BLAST プログラムにより相同性検索を行った。

## 第 2 説 結果

英虞湾 5 地点 (Fig.5) の底質サンプルから DNA を抽出し、その DNA を鋳型として *Planctomycetales* の 16S rDNA に特異的な Pla46f とアナモックス細菌の 16S rDNA に特異的な Amx820 のプライマーセット (Egli K *et al.*, 2001) を用いて PCR を行った。PCR の結果、St.6 のサンプルから増幅した DNA 断片が確認された。また、St.12、St.20 のサンプルからもほぼ同程度の増幅が見られたが、St.4、St.10 のサンプルからは増幅しなかった。その結果、St.6、St.12、St.20 の PCR 産物をクローニングし、各地点から 4 クローンを選択し、その塩基配列解析を行った。その結果、St.6 の底質サンプルから得たクローン 1 が、アナモックス細菌である *Candidatus Scalindua wagneri* (Schmid M *et al.*, 2003) と 93% と相同性を示した (Table 3)。また、クローン 4、8 及び 9 もアナモックス細菌と近縁種である *Planctomycetes* と比較的高い相同性を示すことがわかった。

## 第 3 節 考察

アナモックス細菌を自然環境の中から検出するために、様々なプライマーが開発されている (Schmid *et al.*, 2005)。その中でも、Pla46f -Amx820 のプライマーセットを用いた場合、様々な環境下からのアナモックス細菌の検出が成功している。そこで、各地点の底質から DNA を抽出し、Pla46f-Amx820 のプライマーセットを用いた PCR 法によりアナモックス細菌の検出を行った。その結果、St.6 のサンプルから一番効率のよい増幅が見られたことから、多くのアナモックス細菌が存在している可能性が示唆された。ま

た、St.6 に次いで St.12、 St.20 のサンプルからも効率的な増幅が見られた。そこで、St.6、St.12、St.20 の底質サンプルを用いてクローニング解析を行った結果 (Table 3)、St.6 のクローンがアナモックス細菌である *Candidatus Scalindua wagneri* (Schmid M *et al.*, 2003) と 93% と相同性を示した。また、クローン 4、8、9 はアナモックス細菌と近縁種である *Planctomycetes* であることがわかった。これまでに、国内外の様々な自然環境中からアナモックス細菌が検出され、また自然界における窒素循環にアナモックス反応が極めて重要な役割を担っていることが推定されている (Table 2)。英虞湾底質サンプルよりアナモックス細菌と相同性を示すクローンが得られたことは、アナモックス細菌が英虞湾に広く分布し窒素循環の一部を担っている可能性が示唆された。

## Figure and Table

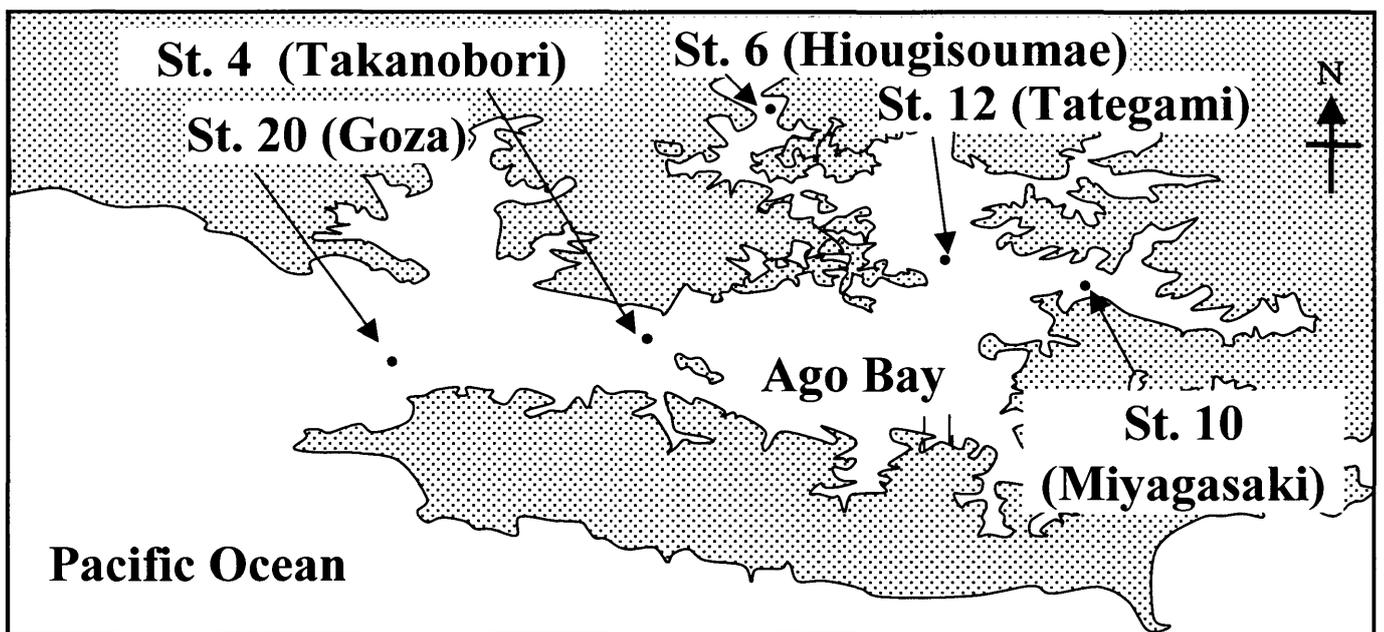


Fig. 5. Sampling sites in Ago Bay

Table 3. Bacteria identification with Pla46f-Amx820 primers for anammox bacteria detection from Ago Bay.

Clone	Bacterium with highest identity	Identity (%)	Accession No.	
St.6	1	<i>Candidatus Scalindua wagneri</i>	93	AY254882
	2	Uncultured gamma proteobacterium	97	AY515459
	3	Uncultured bacterium	93	AY592675
	4	Uncultured <i>planctomycete</i>	89	BX294875
St.10	5	Uncultured Verrucomicrobia bacterium	92	AY515493
	6	Uncultured soil bacterium	92	AJ390447
	7	Uncultured Verrucomicrobia bacterium	92	AY515493
	8	Uncultured <i>planctomycete</i>	88	AY266449
St.12	9	Uncultured <i>planctomycete</i>	86	AY266449
	10	Uncultured bacterium	91	AY592675
	11	Unidentified bacterium	93	AF317763
	12	Unidentified bacterium	93	AF317763

### 第 3 章 海洋環境からのアナモックス細菌の集積培養

#### 序説

アナモックス反応の発見以降、アナモックス細菌の集積培養の試みが様々な研究者により行われた。しかし、アナモックス細菌は、倍加時間が約 11 日と非常にゆっくりと生育することと、増殖のための基質がわかっていなかったことから多くの研究者が集積培養に失敗した。その後、デルフト工科大学の研究グループが排水処理施設からアナモックス細菌の集積培養に成功し、アナモックス細菌は亜硝酸を電子受容体として、アンモニアを電子供与体として用いることを明らかにした(Mulder *et al.*, 1995)。この報告を基にして、熊本大学の Furukawa *et al.* (2002)は脱窒汚泥から上向流カラムリアクターを用いて連続的に亜硝酸とアンモニアを流入させることにより日本国内で初めてアナモックス細菌の培養に成功した。一方、自然界からのアナモックス細菌の培養は、バッチ培養法によりアナモックス細菌を培養したとの報告はあるものの、連続的培養により集積培養に成功した例はほとんどなかった。そこで、筆者は、英虞湾に生息するアナモックス細菌を集積し、そのアナモックス細菌による窒素除去能を明らかにするために、Furukawa *et al.* (2002)が用いた上向流カラムリアクターを用いて、第 2 章の結果よりアナモックス細菌が生育している可能性が高い英虞湾 St.6 の底質からアナモックス細菌の集積培養を試みた。

#### 第 1 節 実験方法

### 1.1. アナモックス細菌含有試料の採取

2004年11月、英虞湾のSt.6(Fig.5)に菊花状の不織布(一片2×34cm、厚さ0.7cm、日本バイリーン)2本を固定したものを海底に沈めた(Fig.6)。2005年2月、海底で上向流カラム型リアクター(内径9cm、高さ43cm)に不織布を海水とともに酸素とできる限り接触しない状態で引き上げを行った。

### 1.2. アナモックス細菌集積培養の条件

英虞湾海底より引き上げた不織布を充填した上向流カラム型リアクター(反応部容積2.5L; Fig.7)(Furukawa *et al.*, 2002)を実験室内に設置し、無機塩培地(Table4)を流入量2.5L/dayの上向流にて流入させ、培養温度25℃でアナモックス細菌の集積培養を行った。なお、無機塩培地はあらかじめpH8.0、ORP値0mV以下に調整した。

### 1.3. 亜硝酸態窒素の分析

亜硝酸態窒素の分析はGriess-Romijn(1966)の方法に従った。試料10mlに対してスルファニルアミド溶液0.4ml[蒸留水50mlに10mlのHClを加え、スルファニルアミド(21g/100ml C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>NH)]を加え、よく攪拌した。5分後、N-1ナフチルアミン二塩酸塩溶液(0.1g/100ml N-1ナフチルアミン二塩酸塩 C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·2HCl)を加え攪拌し、10分~120分後にBiospec-1600(島津)を用いて540.0nmの波長で吸光度を測定した。ブランクには、試料水の代わりに蒸留水を用いて、標準溶液により検量線を作成し、試料水中の濃度を算出した。

#### 1.4. アンモニア態窒素の分析

アンモニア態窒素の分析は、Searle (1984)の方法に従った。フェノール溶液は、500g のフェノール（ナカライテスク）に約 0.5mg の亜鉛粉末を加え、減圧蒸留してフェノールを精製し、褐色のアンプールに 5 g ずつ封入して保存した。使用に際しては、フェノール・アンプールを破壊し、三角フラスコにアンプールごと投入し、200ml の蒸留水を加えて溶かした。その溶液にニトロプルシッド 25mg を加えてよく混合した。また、アンチフォルミン溶液は、活性塩素 3~5%を有するアンチフォル溶液 5ml に 100ml の水酸化ナトリウム溶液を加え、蒸留水で 200ml にメスアップした。その後、100ml の三角フラスコに 50ml の試料液を入れ、2ml のフェノール溶液を加えてよく振り混ぜた。さらに 2ml のアンチフォルミン溶液を加えて混合し、室温で 4 時間静置して十分に発色させた。発色後、Biospec-1600 を用いて 630nm の波長で測定を行った。ブランクには、試料水の代わりに蒸留水を用いて、標準溶液により検量線を作成し、試料水中の濃度を算出した。

## 第 2 節 結果

2004 年 11 月、St.6 (Fig. 5) の海底に不織布を沈め (Fig. 6)、約 3 カ月間放置した後に海底から空気に触れないように円筒状カラムに詰めて引き上げた。海洋性アナモックス細菌の集積のため、上向流カラム型リアクターとして無機塩を添加した海水無機塩培地 (Table 4) を上向流にて 2.5L/day の流量で供給し、25℃で連続的に 1 年以上培養を行った。連続培養期間の海洋性アナモックス細菌リアクターにおける流入水と排出水の窒素成分の変化を Fig. 8 に示した。培養開始初期は、低濃度のアンモ

ニア態窒素 (13.1 mg/l) と亜硝酸態窒素 (10.1 mg/l) を連続的に流入させたが、排出水中のそれぞれの減少がほとんどなかった。しかし、8 ヶ月後に亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素は減少した。その後も、同濃度で3 ヶ月間 (8 ヶ月から11 ヶ月) 培養を行った。さらなるアナモックス細菌の集積をはかるために、二段階にわたって亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素の濃度を上昇させた。11 ヶ月目から15 ヶ月目の期間はアンモニア態窒素 (26.1 mg/l) と亜硝酸態窒素 (20.3 mg/l) の濃度で連続的に流入させ、15 ヶ月目からはアンモニア態窒素 (40 mg/l) と亜硝酸態窒素 (40 mg/l) を流入させた。培養開始から11 ヶ月目には、排出水の亜硝酸態窒素濃度が流入水の約 1/4 にアンモニア態窒素濃度は約 1/5 に減少した。また、窒素除去率 (Fig. 9) は、培養開始時の 0 mg-N/l-day から、16 ヶ月目には 70 mg-N/l-day に上昇した。

### 第3節 考察

英虞湾において、アナモックス細菌が存在し窒素代謝経路に関与しているのかを調べる目的で、英虞湾底質からアナモックス細菌の集積培養を行った。第2章の結果より、英虞湾の St.6 (Fig. 5) の底質にアナモックス細菌である *Candidatus Scalindua wagneri* と 93% の相同性を示す細菌の存在が予想されたことから、St.6 の底質を用いて集積培養をすることを試みた。実験開始初期の2004年8月、St.6 の底質を採取した後、2.5L の上向流カラムリアクターに不織布を充填し、不織布に底質 10.0g を吸着させた。そのリアクターに亜硝酸ナトリウムと塩化アンモニウムを含む無機塩培地を流入量 2.5L/day の上向流にて流

入させ 25℃でアナモックス細菌の集積培養を行った。しかし、6ヶ月連続培養を続けたが亜硝酸体窒素とアンモニア態窒素の減少が見られず失敗に終わった Kuypers *et al.*(2003) は、黒海の亜硝酸とアンモニアが存在する嫌気水域でアナモックス細菌を FISH 法により検出した結果、アナモックス細菌密度は DAPI により染色された全細胞数の 0.75%であった。また、Tal *et al.*(2005) は FISH 法によりボルチモア湾の底質からアナモックス細菌の検出を行った結果、底質中のアナモックス細菌密度は 0.4%から 0.7%であったと報告している。このことから、リアクターの立ち上げに失敗した原因は、リアクターに充填した底質中のアナモックス細菌数が少なかったためであると考えられた。そこで、リアクターの立ち上げに成功させるためには、より多くのアナモックス細菌を効率的に不織布に吸着させる必要であると考え、不織布を St.6 の海底底質に接する形で固定し 3ヶ月間その状態を維持した。3ヶ月後、海底から引き上げを行い 2.5L のリアクターに不織布を充填しアナモックス細菌の集積培養を行った。長期間にわたり連続培養を行った結果 (Fig. 8)、8ヶ月後には亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素の減少が見られ、11ヶ月目には亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素をモル比で約 1:1 の割合で減少するようになった。この結果は、既知のアナモックス細菌 (Jetten *et al.*, 1998) がアンモニアと亜硝酸を減少させるモル比と同じであったことから、リアクター内でアナモックス反応が起きており、アナモックス細菌が集積している可能性が示唆された。

## Figures and Tables



Fig. 6. Appearance of unwoven cloth in bottom of the sea

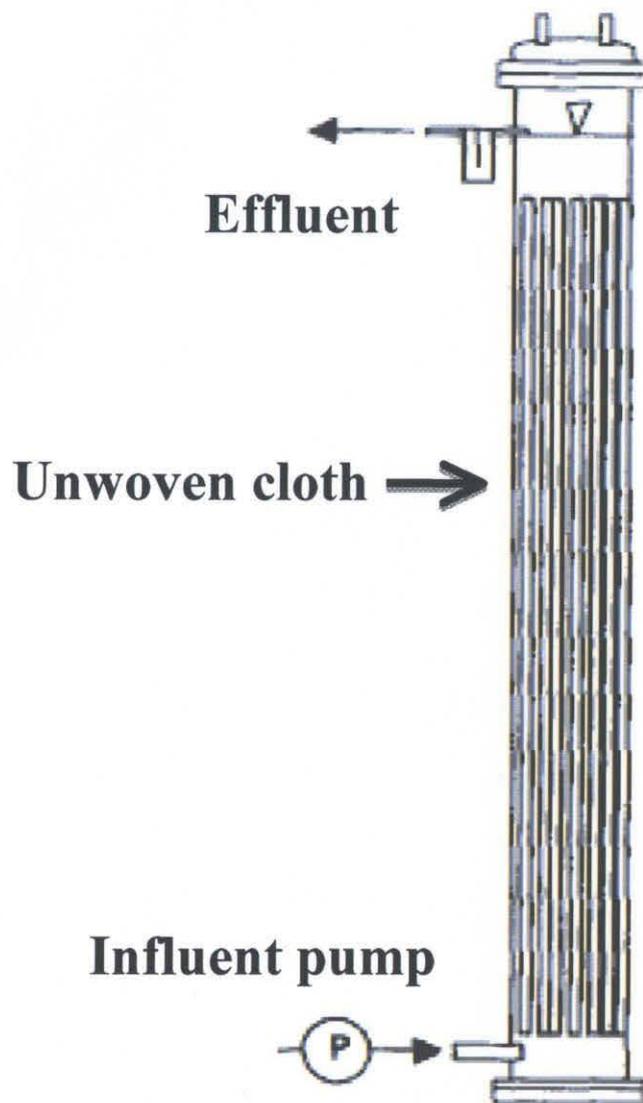


Fig. 7. Schematic illustration of the reactor for cultivation of marine anammox bacteria. Acrylic resin reactor with 12 cm diameter. Height to effluent port, 43 cm.

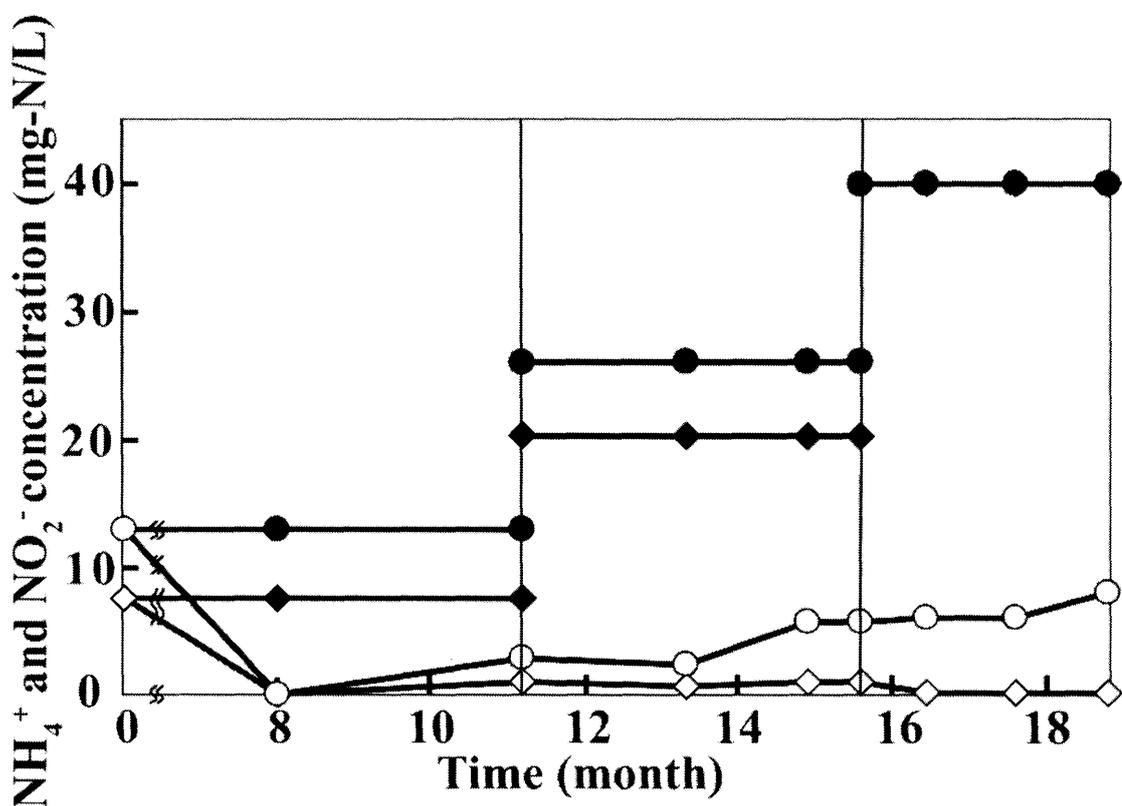


Fig. 8. Changes in concentrations of nitrogenous compounds during enrichment culture. The mineral medium containing unlabeled  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{Na}_2\text{NO}_2$  at different concentrations were supplied to the reactor during the enrichment process, and the concentrations of ammonium and nitrite ions in the influent and effluent were determined. Closed circle, ammonium ion in influent; open circle ammonium ion in effluent; closed rhombus, nitrite ion in influent; open rhombus, nitrite ion in effluent.

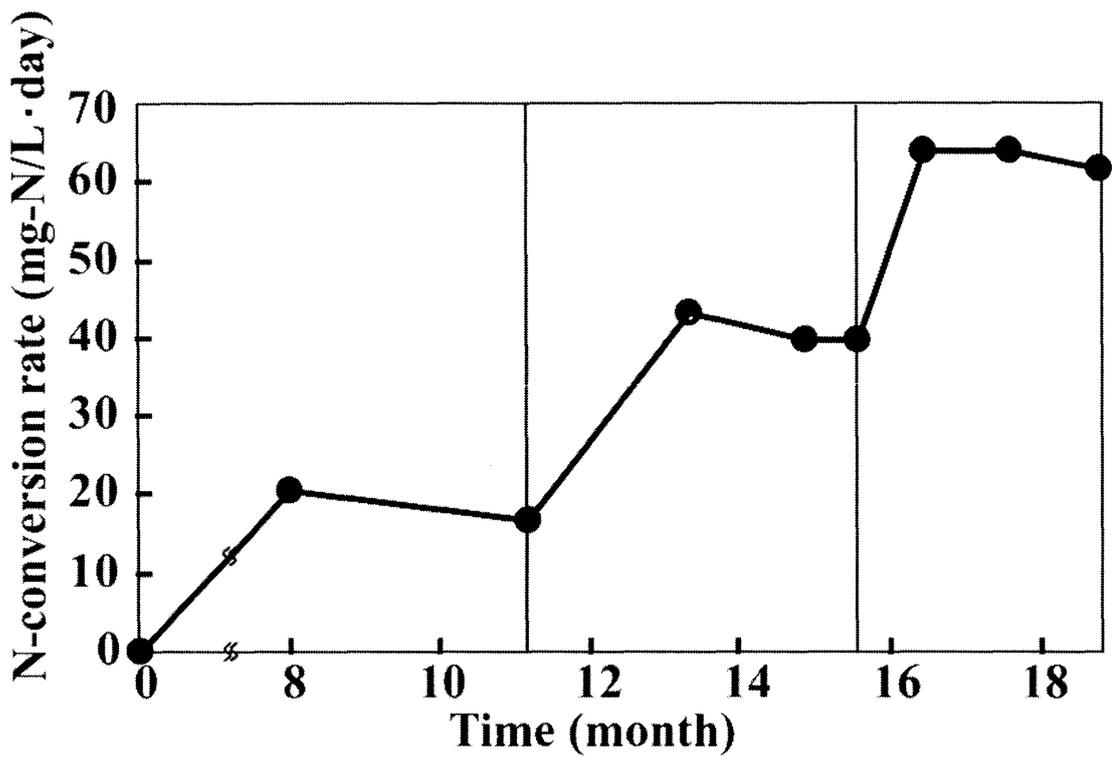


Fig. 9. Nitrogen conversion rate in marine anammox bacteria reactor.

$$\text{N-conversion rate (mg-N/ L} \cdot \text{day)} = [(\text{NH}_4^+ - Ni + \text{NO}_2^- - Ni) - (\text{NH}_4^+ - Ne + \text{NO}_2^- - Ne)] / \text{day}$$

$\text{NH}_4^+ - Ni$ , ammonium ion in influent (mg-N/L);  $\text{NO}_2^- - Ni$ , nitrite ion in influent (mg-N/L);  $\text{NH}_4^+ - Ne$ , ammonium ion in effluent (mg-N/L);  $\text{NO}_2^- - Ne$ , nitrite ion in effluent (mg-N/L).

Table 4. The mineral medium for enrichment culture.

<b>Component</b>	<b>Amount</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	<b>50~152 mg</b>
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	<b>50~200 mg</b>
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	<b>125 mg</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>54 mg</b>
<b>Micro Fe/EDTA*</b>	<b>1.0 ml</b>
<b>Na<sub>2</sub>S/9H<sub>2</sub>O</b>	<b>125 mg</b>
<b>Deep sea water**</b>	<b>1 L</b>

**Final pH 8.0, ORP 0 mV or below**

**\*FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O = 9 g / L, EDTA·2Na = 5 g / L**

**\*\*Drawn up from 400 m depth**

## 第 4 章 アナモックスリアクターの菌叢解析

### 序説

第 3 章で述べたように、アナモックス細菌の集積培養の結果、リアクター内で亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素はモル比で約 1:1 の割合で減少した。これは、アナモックス反応で見られる現象と一致していることから、リアクター内にアナモックス細菌が集積培養されていると予想された。そこで、リアクター内の反応がアナモックス反応であることを確かめるためにトレーサー実験を行った。トレーサー実験は、安定同位体である  $^{15}\text{N}$  で標識した塩化アンモニウムと  $^{14}\text{N}$  の亜硝酸ナトリウムを基質として培地中に添加することにより微生物が発生させる窒素ガス成分を分析する方法である。

近年、多くのアナモックス細菌の 16S rDNA の塩基配列が GenBank に登録されたことで、クローニング解析、FISH 法などの分子生態学的手法がアナモックス細菌の検出に用いられるようになった。FISH 法は、目的とする生物の特異的な遺伝情報 (DNA 配列、RNA 配列) を見つけ出し、それに結合する相補的な DNA (RNA) 断片 (DNA プローブ、RNA プローブ) を作成し、目的の生物の DNA (RNA) とハイブリダイズさせることによって検出する方法である。そこで、クローニング解析と FISH 法を用いてリアクター内に存在するアナモックス細菌の解析を行った。

### 第 1 節 実験方法

#### 1.1. バッチ培養によるアナモックス活性測定

アナモックス活性を測定するための培地として Table 5 に示した

無機塩培地を使用した。この培地には、原子量 15 の安定同位体窒素で標識した  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (40 mg-N/l) を添加した。この培地 100 ml を 120 ml のガラスビンに入れ、アルゴンガス (99.99%) により 20 分間脱気した。その後、ブチルゴム栓でガラスボトルを密閉しオートクレーブを用いて滅菌した。18 ヶ月間連続培養を行っていた海洋性アナモックス細菌リアクターから不織布約 1.0 g を切り出し、直ちに無機塩培地に移植した。これを 25°C、暗所に静置し培養を行った。15 日間培養後、ヘッドスペースのガスをシリンジで回収し日立 RMI-2 質量分析計 (磁場走査型) により窒素ガス成分を分析した。

### 1.2. 不織布からの DNA 抽出

不織布からの DNA 抽出には、Ultra Clean Soil DNA isolation Kit (MO BIO Laboratories, inc.) を用いた。不織布 0.5 g からプロトコールに従い DNA を抽出した。

### 1.3. アナモックス細菌の PCR 法による検索

前項で抽出した DNA を鋳型として、PCR により 16S rDNA の増幅を行った。オリゴヌクレオチドプライマーには、*Planctomycetales* の 16S rDNA に特異的な Pla46f (5'-GGATTAGGCATSCAAGTC-3') と細菌の 16S rDNA に特異的な 1406R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') (Ferris *et al.*, 1996) のプライマーセットを用いた。

200  $\mu\text{l}$  用の PCR チューブに 10 $\times$ Gold Taq buffer in  $\text{MgCl}_2$  (Applied Biosystems) 5.0  $\mu\text{l}$ , dNTP (mixture dA, dC, dG, dT, 各 2.0 mM; Applied Biosystems) 5.0  $\mu\text{l}$ , PCR primer: Pla46f

(10.0 pmol/ $\mu$ l) 2.0 $\mu$ l, 1406R (10.0 pmol/ $\mu$ l) 2.0  $\mu$ l、DNA サンプル 2  $\mu$ l、滅菌水 33.5  $\mu$ l、AmpliTaq Gold (5.0 U/ $\mu$ l, Applied Biosystems) 0.5  $\mu$ l 入れ、計 50.0  $\mu$ l としたものを PCR 反応液とした。PCR 条件はプレラン(94 $^{\circ}$ C、7 分) を行った後、熱変性 (94 $^{\circ}$ C、1 分)、アニーリング (65-55 $^{\circ}$ C、1 分)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C、2 分) を 20 サイクル (1 サイクル毎にアニーリング温度が 0.5 $^{\circ}$ C 下がるように設定) した後、さらに熱変性 (94 $^{\circ}$ C、1 分)、アニーリング (55 $^{\circ}$ C、1 分)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C、2 分) を 15 サイクル行い、その後ポストラン(72 $^{\circ}$ C、10 分) を行った。

その後、PCR により目的配列が増幅されたことを確認するためにアガロースゲル電気泳動を行った。ゲルは 1%アガロース、泳動用緩衝液は 1 $\times$ TAE、サイズマーカーには、100 bp DNA Ladder (TAKARA) を用いた。泳動後にエチジウムブロマイドでゲルを 20 分間染色し、紫外線 (UV) を照射し蛍光バンドを検出した。

#### 1.4. PCR 産物のクローニング解析

クローニングは、前項の PCR 産物 1  $\mu$ l を用いて、第 2 章第 1 節第 2 項と同様の方法でクローンライブラリーを構築した。そのライブラリーから得られたクローンを以後の実験に用いた。

#### 1.5. 塩基配列解析

前項で得られたプラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列は、第 2 章第 1 節 1.5 に記載した方法で塩基配列を決定した。決定した塩基配列を用いて NCBI (The National Center for Biotechnology Information、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLAST プログラムによる相

同性検索を行った。また、DDBJ の CLUSTAL W プログラムを用いて解析し、近隣結合法 (neighbor-joining method) により系統樹を作成した。

#### 1.6. FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法によるアナモックス細菌の検出

FISH 法は、Amann *et al.* (1990) の方法に基づいて行った。

アナモックスリアクターから不織布を切り出し、2.0 ml のエッペンチューブに移し PBS (145 mM NaCl, 8.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4) 500 μl 加え、超音波処理により菌体を拡散させた後、遠心 (14000 rpm、4°C、15 分) を行うことにより菌体を含む沈殿を回収した。得られた菌体に PBS 500 μl 加え攪拌後、遠心 (14000 rpm、4°C、15 分) により得られた沈殿を回収した。この操作は、2 度繰り返した。その菌体に、4%パラホルムアルデヒド固定液 100 μl 加え、ボルテックスにより攪拌し 4°C で 5 時間以上インキュベートを行った。その後、遠心 (14000 rpm、4°C、15 分) を行い、4%パラホルムアルデヒド固定液を除去した。固定化した菌体約 8 μl をゼラチンコート済みスライドガラス上に滴下し、スライドガラスを室温で乾燥させた。50%、80%、99%エタノールに各 3 分間浸すことによって菌体を脱水し、室温で乾燥させた。キムワイプを 50 ml の遠心チューブ内に入れ、それにハイブリダイゼーションバッファー (40% formamide、0.9M NaCl、0.01% SDS、20mM Tris-HCl、pH7.2) によりチューブ内を飽和させた。インキュベーター内に移動し 46°C で平衡にさせ、モイスキローチャンバーとした。各スライドガラス上にハイブリダイゼーションバッファー 8 μl と蛍光オリゴヌクレオチドプローブ 50 ng をスライドガラス上に

滴下した。蛍光オリゴヌクレオチドプローブには、*Planctomycetales* の 16S rDNA に特異的な Pla46f (5'-GG ATTAGGCATSCAAGTC-3') (Neef *et al.*,1998)を FITC で標識したプローブとアナモックス細菌の 16S rDNA に特異的な AmxBS820 (5'-AATTCCTCTACTTAGTGCCC-3') (Kuypers *et al.*,2003) を Cy3 で標識した 2 種類のプローブを用いた。46°C のチャンバーで 3 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、チャンバーからスライドグラスを取りだし、48°C に温まったウォッシングバッファー(40% formamide, 56mM NaCl, 0.01% SDS, 20mM Tris-HCl, pH7.2)によりスライドグラス上のプローブをリンスすることによって、ハイブリダイゼーションを停止させた。ウォッシングバッファー50ml により満たした 50ml の遠心チューブにスライドグラスを浸し、48°C のウォーターバスで 20 分間インキュベートを行い、滅菌水によりスライドグラスをリンスし、直ちに室温で乾燥させた。

また、スライドグラス上に DAPI 染色液 (10 µg/ml) を約 10 µl を滴下し、5 分間室温で染色した後、スライドグラス上の DAPI 染色液を ddH<sub>2</sub>O によりリンスした。直ちに、スライドグラスを室温で乾燥させ Zeiss Axioplan 2 MOT epifluorescence microscope (Zeiss) を用いて観察した。

#### 1.7. PCR-DGGE 法による海洋性アナモックスリアクター内菌叢の解析

不織布より抽出した DNA を鋳型として、PCR 法により 16S rDNA の領域を増幅した。オリゴヌクレオチドプライマーには、1055F (1055F (5'-TGGCTGTCGTCAGCT-3')と 1392R-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCCGC

CCACGGGCGGTGTGTAC-3')を使用した。200  $\mu$ l 用の PCR チューブに、10 $\times$ AmpliTaq Gold buffer in MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems) 5  $\mu$ l, dNTP mixture (dA、dC、dG、dT、各 2.0 mM; Applied Biosystems) 5  $\mu$ l、PCR primer: forward 1055F (10 pmol/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, reverse 1392R-GC (10 pmol/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l、DNA サンプル 2  $\mu$ l、滅菌水 33.5  $\mu$ l、AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu$ l, Applied Biosystems) 0.5  $\mu$ l 入れ、計 50  $\mu$ l としたものを PCR 反応液とした。PCR 条件はプレラン(94 $^{\circ}$ C、7 分)を行った後、熱変性(94 $^{\circ}$ C、1 分)、アニーリング(64~54 $^{\circ}$ C、1 分)、伸長反応(72 $^{\circ}$ C、2 分)を 20 サイクル(1 サイクル毎にアニーリング温度が 0.5 $^{\circ}$ C 下がるように設定)した後、さらに熱変性(94 $^{\circ}$ C、1 分)、アニーリング(54 $^{\circ}$ C、1 分)、伸長反応(72 $^{\circ}$ C、2 分)を 15 サイクル行い、その後ポストラン(72 $^{\circ}$ C、10 分)を行った。

PCR により目的配列が増幅されたことを確認するために、2%アガロースゲルと 1 $\times$ TAE を用いて電気泳動を行った。分子量マーカーには、100 bp DNA Ladder を用いた。泳動後にエチジウムブロマイドで DNA を染色し、紫外線(UV)を照射し DNA バンドを検出した。

その後、アナモックス細菌リアクター内の菌叢は、増幅した PCR 産物を用いて変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法(Muyzer *et al.*, 1993)により解析を行った。DGGE には、Dcode system (BIO-RAD) を使用した。ゲルは、変性剤として尿素とホルムアミドを用いて 20%から 60%の濃度勾配をつけ、6%から 12%の濃度勾配をかけたポリアクリルアミドゲルを用いた。増幅した PCR 産物 20  $\mu$ l を泳動に供した。また、マーカーとして、DGGE

Marker(NIPPON GENE)を使用した。泳動は 61°C、200 V、5 時間の条件で行った。その後、ポリアクリルアミドゲルを 0.5×TAE バッファーで 10,000 倍希釈した Syber Gold (TAKARA)により 20 分間染色を行い、紫外線 (UV) を照射し蛍光バンドを検出した。得られた DNA バンドは、メスを用いて切り出した。その後、DNA を含むアクリルアミドゲルを PCR チューブ内でチップの先端で磨り潰し、それを鋳型として PCR により 16S rDNA を増幅した。プライマーは、1055F (5'-TGGCTGTCGTCAGCT-3')と 1392R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3')を使用した (Ferris *et al.*, 1996)。上記の PCR 条件で PCR を行った後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、切り出しを行った。切り出した DNA バンドは、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) により精製した。

精製した PCR 産物 1 µl 用いて、第 2 章第 1 節 1.4 と同様の方法でクローニングを行い、得られたプラスミドを用いて第 2 章第 1 節第 3 項の方法でシーケンス解析を行った。

## 第 2 節 結果

### 2.1. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢のアナモックス活性

アナモックス活性を測定するために、構築した海洋性アナモックスリアクターから取り出した不織布を  $^{15}\text{N}$  で標識した塩化アンモニウムと  $^{14}\text{N}$  の亜硝酸ナトリウムを含む無機塩培地に移植し、バッチ培養を行った。培養開始から 15 日後、密閉されたボトル内のヘッドスペースに含まれる気体の窒素ガス成分について同位体分析を行った。その結果 (Table 6)、 $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$  および  $^{30}\text{N}_2$  がそ

れぞれ 42.9%、50.0%、7.1%の割合であった。コントロールとして、無機塩培地のみを同様の条件でインキュベートした結果、 $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$  および  $^{30}\text{N}_2$  が 98.7%、1.0%、0.3%であった。このことから、不織布を植菌した培養液では  $^{29}\text{N}_2$  が発生していることは明らかであり、アナモックス反応が進行していることが示された。

## 2.2. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢のクローニング解析

培養槽内から不織布を取り出し、その不織布から DNA 抽出した。その DNA を鋳型として、Planctomycete の 16S rDNA を特異的に増幅する Pla46F と 1406R のオリゴヌクレオチドを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により増幅を確認した。その後、PCR で増幅が確認された PCR 産物を用いてクローニング解析を行った結果、リアクター内にアナモックス細菌と相同性の高い anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete JMK-1 (DDBJ accession no. AB281488) と JMK-2 (AB281489) の 2 種類のアナモックス細菌が生育していることがわかった。その 2 種類のアナモックス細菌 (JMK-1 と JMK-2) 間の相同性は 86%であった。クローニング解析を行った全 62 クローン中、JMK-1 は 44 クローン (71%) であり、JMK-2 が 3 クローン (5%) であった。BLAST 解析の結果から、JMK-1 は養殖場の海水循環システムから発見された (Tal *et al.*, 2006) uncultured planctomycete clone 3-8b6 (AY769988) と 99% の相同性を示した。一方、JMK-2 は排水処理施設から発見された *Candidatus Scalindua wagneri* (AY254882) と 97% の相同性を示した。海洋性アナモックス細菌リアクターに生育し、アナモックス細菌と高い相同性を示した 2

クローン (JMK-1 及び JMK-2) は、既知のアナモックス細菌 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (AF375995)、*Candidatus Scalindua brodae* (AY254883)、*Candidatus Brocadia anammoxidans* (AF375994) 及び黒海から発見された海洋性アナモックス細菌である *Candidatus Scalindua sorokinii* (AY257181) と 89% から 95% の相同性を示した。

既知のアナモックス細菌の 16S rDNA には、様々なコンセンサス配列が存在する。そのコンセンサス配列である Amx368、Amx820、Amx1240 の領域において、JMK-1、JMK-2 及び既知のアナモックス細菌の塩基配列を比較した (Fig. 10)。Amx368 領域では、アナモックス細菌の保存領域であり、JMK-1 と JMK-2 も既知のアナモックス細菌と塩基配列が一致していた。JMK-1 と 99% の相同性を示した uncultured planctomycete clone 3-8b6 の Amx820 領域は、Amx820 のコンセンサス配列と完全に一致していた。しかし、JMK-1 においては Amx820 コンセンサス配列と 1 塩基が異なっていた。JMK-2 においても、Amx820 コンセンサス配列と 3 塩基が異なっていたが、*Candidatus Scalindua wagneri*、*Candidatus Scalindua sorokinii* および *Candidatus Scalindua brodae* の Amx820 領域の塩基配列と一致していた。また、JMK-1 の Amx1240 領域の塩基配列は、Amx1240 コンセンサス配列と 2 塩基が異なっており、uncultured planctomycete clone 3-8b6 と 1 塩基が異なっていた。JMK-2 の Amx1240 領域の塩基配列は、Amx1240 のコンセンサス配列と多くの塩基が異なっていたが、*Candidatus Scalindua wagneri* の Amx1240 領域と一致していた。

### 2.3. 海洋性アナモックス細菌の系統樹解析

代表的な *Planctomycetales*、既知のアナモックス細菌及び本研究で新規に発見した JMK-1 と JMK-2 の 16S rDNA 配列を近隣結合法 (neighbor-joining method) により系統樹解析を行った (Fig. 11)。JMK-1 は uncultured planctomycete clone 3-8b6 と類似した分岐を示したことから、これら二つのクローンは *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 及び *Candidatus Brocadia anammoxidans* と近縁であることがわかった。一方、JMK-2 は、*Candidatus Scalindua wagneri*、*Candidatus Scalindua sorokinii* 及び *Candidatus Scalindua brodae* を含むアナモックスグループに分岐を示した。

### 2.4. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢の FISH 解析

クローニング解析によりリアクター内でアナモックス細菌の存在が確認されたことから、その存在をより直接的に検出するために FISH 解析を行った。アナモックス細菌に特異的な Cy3 で蛍光標識した Amx-BS820 プローブを用いて FISH を行い、その後 DAPI 染色を行った結果を Fig. 12 に示した。DAPI 染色により不織布に生育している細菌の全体像が観察された。その後のアナモックス細菌に特異的な AmxBS820 のプローブを用いた方法においてアナモックス細菌が検出され、DAPI により染色された細胞数 (前細胞数; Fig. 12A) と AmxBS820 プローブにより標識された細胞数 (アナモックス細菌数; Fig. 12B) を比較した結果、リアクター内において、海洋性アナモックス細菌が全細菌数の 67% まで集積されたことが分かった。

## 2.5. 海洋性アナモックス細菌リアクター内菌叢の PCR-DGGE 解析

クローニング解析及び FISH 解析の結果よりアナモックス細菌が生育していることが確認できたことからアナモックス細菌と共生している細菌数を調べる目的で、不織布から抽出した DNA を鋳型として 16S rDNA を PCR により増幅させた産物を用いて PCR-DGGE 法を行った結果を Fig. 13 に示した。DGGE の結果、DNA バンドが 8 本得られたことからリアクター内に 8 種細菌が存在し、アナモックス細菌と相同性を示した JMK-1 が優先種であることがわかった。

## 第 3 節 考察

第 3 章第 2 節の海洋環境からのアナモックス細菌の集積培養において、培養開始から 11 ヶ月目に亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素をモル比で約 1:1 の割合で減少するようになった。この反応は、既知のアナモックス細菌がアンモニアと亜硝酸を減少させるモル比と同じであったことから、リアクター内でアナモックス反応が進行している可能性が示唆された。そこで、リアクター内で亜硝酸とアンモニアから  $N_2$  を生成していることを明らかにするためにバッチ培養によるアナモックス活性の測定を行った。 $^{15}N$  で標識した塩化アンモニウムと  $^{14}N$  の亜硝酸ナトリウムを添加し培養行うことにより発生した  $^{28}N_2$ 、 $^{29}N_2$  及び  $^{30}N_2$  を測定した。その結果、 $^{29}N_2$  の明らかな蓄積が確認された (Table 6)。これは、既知のアナモックス細菌が [ $^{15}N$ ]-アンモニア態窒素と [ $^{14}N$ ]-亜硝酸態窒素をモル比で約 1:1 の割合で減少させて  $^{29}N_2$  を発生するという結果と

一致していた(Schmid *et al.*, 2005)。しかし、この実験の結果において $[^{14}\text{N}]$ -亜硝酸態窒素から多くの $^{28}\text{N}_2$ が発生していたことから、アナモックス反応と同時に通常の脱窒反応も起きていることが示唆された。このような現象は、以前にも報告されている(Kuyper *et al.*, 2003、Tal *et al.*, 2005)。アナモックス反応と脱窒反応が同時に起きたことは、FISH (Fig. 12) 及び DGGE (Fig. 13) 解析の結果から、リアクター内にアナモックス細菌以外の細菌も生育していることが原因であると考えられた。一方、 $[^{15}\text{N}]$ -アンモニア態窒素由来の $^{30}\text{N}_2$ が発生していた。Sliemers *et al.* (2003) は、酸素の存在下では $[^{15}\text{N}]$ -アンモニアが $[^{15}\text{N}]$ -亜硝酸に酸化され、アナモックス細菌が $[^{15}\text{N}]$ -アンモニア及び $[^{15}\text{N}]$ -亜硝酸から $^{30}\text{N}_2$ を発生させると報告していることから、 $^{30}\text{N}_2$ の発生はアナモックス反応により発生した可能性が考えられる。しかし、本実験は嫌気条件下で行っているため、多量の酸素の混入は考えにくく、 $^{30}\text{N}_2$ の発生の原因は必ずしも明らかでない。

近年、アナモックス細菌の16S rDNAの塩基配列がGenBankなどの核酸データベースに多く登録され、この塩基配列を基にしてFISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法及びクローニング解析でアナモックス細菌の検出が可能になった。このことから、リアクター内にアナモックス細菌が生育していることを確認するために分子生物学的手法をリアクター内の菌叢解析に用いた。筆者は、16S rDNA 塩基配列のクローニング解析により海洋性アナモックス細菌リアクター内に培養されている微生物菌叢から、アナモックス細菌であるJMK-1とJMK-2を同定した。JMK-1とJMK-2の16S rDNA 塩基配列は、アナモックス細菌のコンセンサ

ス配列である Amx820 (Schmid *et al.*, 2000) と完全には一致していなかったが、既知のアナモックス細菌のその塩基配列と高い相同性を示した (Fig. 10)。しかし、FISH (Fig. 12) の結果は、海洋性アナモックス細菌リアクター内に生育している菌叢の優占種がアナモックス細菌であることを示した。そして、海洋性アナモックス細菌リアクター内においてアナモックス細菌が優占種であることは、ユニバーサルプライマーを用いた PCR-DGGE 法の結果から明らかであった (Fig. 13)。

JMK-1 は、16S rDNA 塩基配列の系統樹解析において *Candidatus Scalindua* グループではなく、*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 及び *Candidatus Brocadia anammoxidans* グループに属していることが示された (Fig. 11)。Fig. 11 に示されているように、多くのアナモックス細菌がこれまでに報告されている。その中で、黒海から発見された *Candidatus Scalindua sorokinii* と養殖場の海水循環システムから発見された clone 3-8b6 が、海水環境由来のアナモックス細菌である。一方、淡水である湖沼や河川から発見されているほぼすべてのアナモックス細菌が *Candidatus Kuenenia* 及び *Candidatus Brocadia* グループである。JMK-1 は、16S rDNA レベルで clone 3-8b6 と 99% と高い相同性を示した。これら 2 種のアナモックス細菌は異なる海洋環境から発見されていることから、このグループの細菌は海洋域に広く分布している可能性が示唆された。一方、JMK-2 は、海洋性アナモックス細菌リアクターにおいてマイナーな細菌ではあったが、アナモックス細菌の代表種である *Candidatus Scalindua wagneri* と高い相同性を示したことから新規の海洋

性 アナモックス細菌 であることが示唆された。

## Figures and Tables

<b>A</b>	
Amx368	TTCGCAATGCCCGAAAGG
<b>B</b>	
Amx820	GGGCACTAAGTAGAGGGGTTTT
JMK-1	-----C-----
<i>S. wagneri</i>	-----AA--A
<i>S. sorokinii</i>	-----AA--A
JMK-2	-----AA--A
<i>S. brodae</i>	-----AA--A
<b>C</b>	
Amx1240	GGTTGGTACAAAGGGATGCTAAA
<i>K. stuttgartiensis</i>	---C-----G
3-8b6	---C-----G
JMK-1	---C-A-----
<i>S. wagneri</i>	---C-----A--A--A-G-
<i>S. sorokinii</i>	---C-----A--A--G--G
JMK-2	---C-----A--A--A-G-
<i>S. brodae</i>	---C-----A--A--G--G
KOLL2a	---C-----G
KU2	---C-----G

Fig. 10. Comparison of anammox signature region sequences in 16S rRNA genes from some anammox Planctomycetales. The Amx368, Amx820, and Amx1240 sequences were aligned with corresponding sequences from 16S rRNA genes of microorganisms shown in Fig. 10 except *Nitrosomonas* species. In a, all the sequences from microorganisms shown in Fig. 10 were identical to the Amx368 signature sequence. In b and c, only the sequences having nonconserved sequences were aligned.

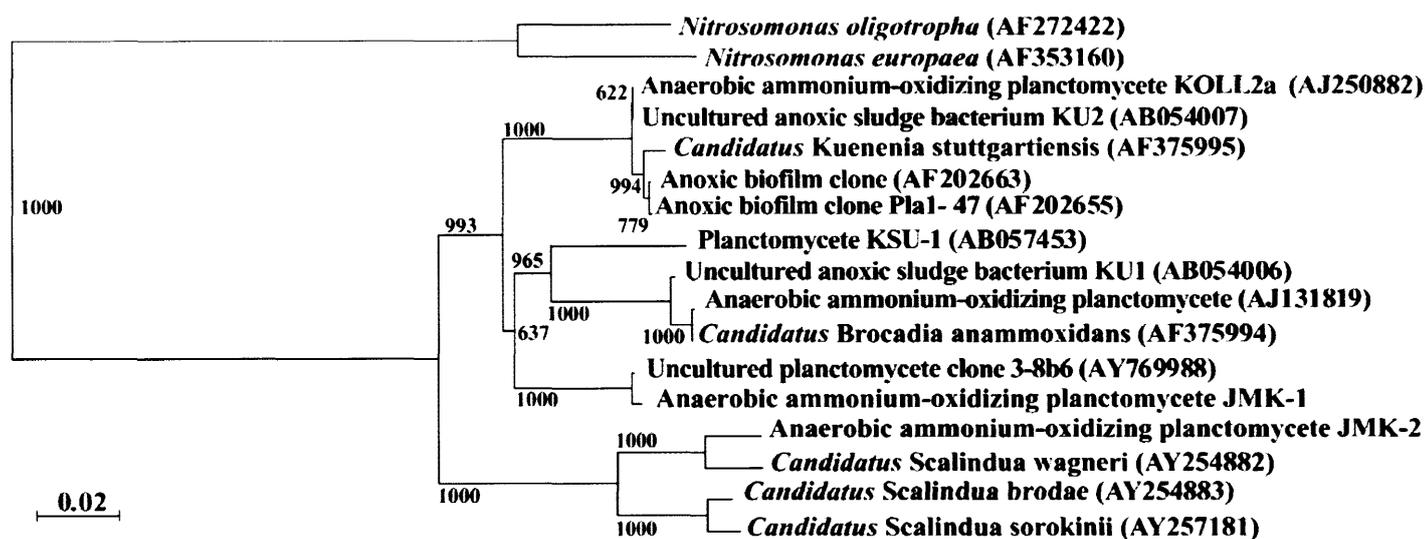


Fig. 11. Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of JMK-1, JMK-2, and authentic anammox bacteria. The 16S rRNA gene sequences derived from the enrichment culture of MAB in this study were compared with those of well-characterized anammox bacteria, several uncultured clones, and aerobic ammonia-oxidizing bacteria as controls (Outgroup), which were obtained from the DDBJ database. The bar represents 2% estimated distance of sequence divergence. Respective sequence accession numbers are given in parentheses.

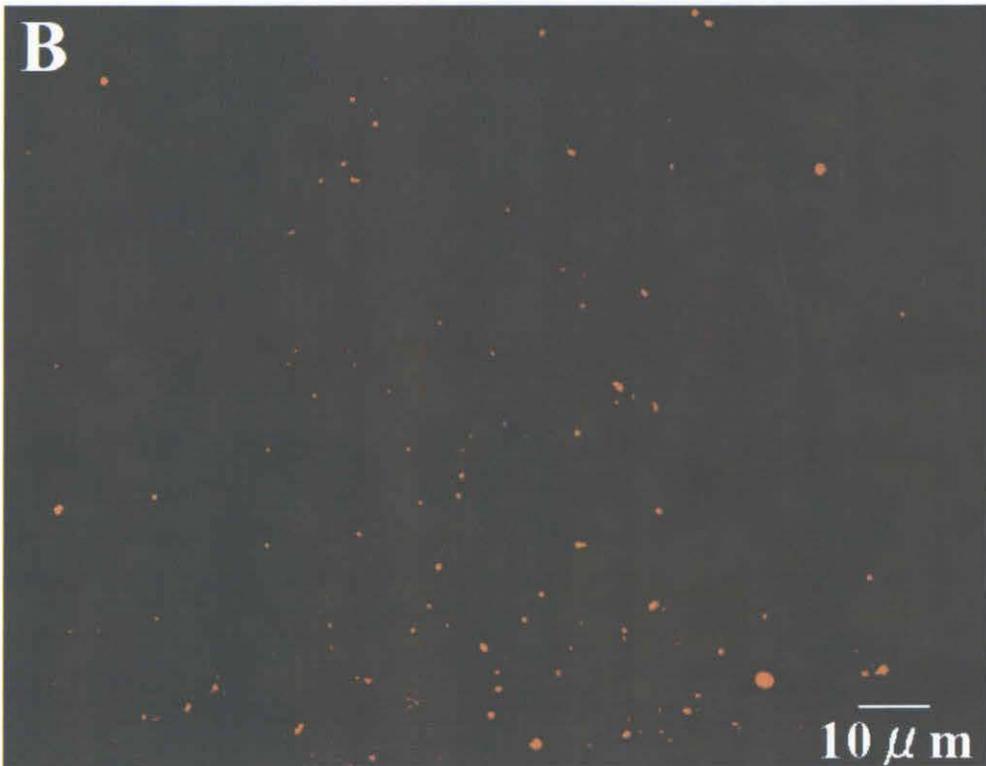


Fig. 12. FISH image of anammox bacteria from the MAB reactor. Cells recovered from the fabric in the MAB reactor by centrifugation were visualized after staining by DAPI (A) and hybridization with anammox-specific Amx-BS820 (B) probe. Bar=10  $\mu$ m

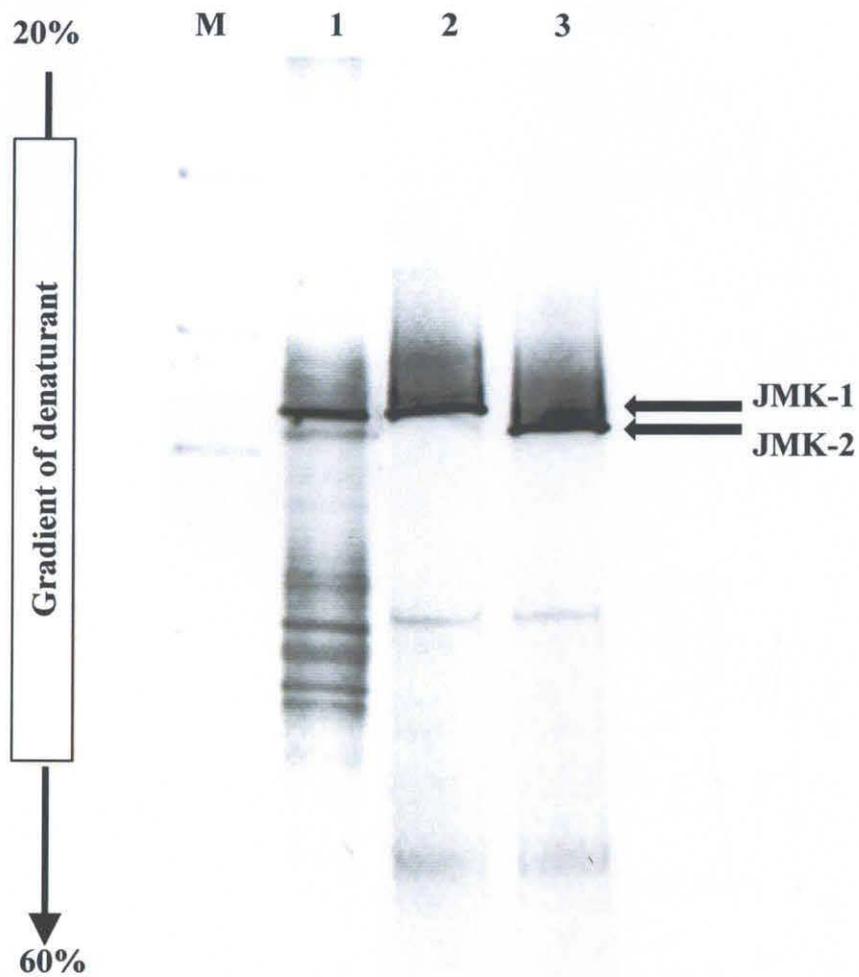


Fig. 13. DGGE profiles of 16S rRNA genes amplified from bacterial DNA from the MAB reactor. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 200 V at 61°C for 5 h. The gel was stained with SYBR Gold (Invitrogen). Lane 1 The MAB reactor; 2 clone JMK-1; 3 clone JMK-2.

Table 5. The mineral medium for batch culture of marine anammox bacteria

<b>Component</b>	<b>Amount</b>
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	50 mg
$^{14}\text{NaNO}_2$	64 mg
$\text{KHCO}_3$	125 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	54 mg
Micro Fe/EDTA <sup>*</sup>	1.0 ml
$\text{Na}_2\text{S}/9\text{H}_2\text{O}$	125 mg
Deep sea water <sup>**</sup>	1L

**Final pH 8.0, ORP 0 mV or below**

**\* $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 9 \text{ g / L}$ ,  $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} = 5 \text{ g / L}$**

**\*\*Drawn up from 400 m depth**

Table 6. N<sub>2</sub> production from <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (13 mg-N ) and <sup>14</sup>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (13 mg-N ) in 100 ml batch culture.

	<sup>28</sup> N <sub>2</sub>	<sup>29</sup> N <sub>2</sub>	<sup>30</sup> N <sub>2</sub>
	(% )		
Control*	98.7	1.0	0.3
Batch culture	42.9	50.0	7.1

\*The mineral medium was incubated without non-woven fabric.

## 第 5 章 英 虞 湾 におけるアナモックス細菌の分布

### 序 説

世界各地の様々な環境下にアナモックス細菌が生息することが報告されている(Table 2)。しかし、日本においては水処理場や地下水におけるアナモックス細菌の生育が確認されているものの海洋におけるアナモックス細菌の存在についてほとんど報告されていない。アナモックス反応は、アンモニウムイオンを電子供与体、亜硝酸を電子受容体として用いる反応である。アナモックス反応による窒素ガスの生成(Fig. 1)は、アンモニア態窒素と亜硝酸態窒素の両方から生成される。筆者は、アナモックス細菌を英虞湾から集積培養することに成功した。そこで、英虞湾底質におけるアナモックス細菌の分布と多様性について明らかにすることを目的に分子生物学的研究を行った。

### 第 1 節 実験方法

#### 1.1. 英虞湾海域の水質及び底質分析

英虞湾の St. 4、St. 6、St. 10、St. 12 および St. 20 (Fig. 5)において、海底の水質分析を行った。調査項目と方法は、水温、塩分、溶存酸素(DO)、pH 及びクロロフィル量であり、測定にはクロロテック(アレック電子 ACL1150-DK)を用いた。また、海水中のアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、リン酸濃度の測定には TRAACS2000 (BRAN+LUEBBE, BL TEC)を用いた。また、底質の AVS(酸揮発性硫化物)の測定はヘドロテック S(ガステック)により行った。

## 1.2. 英虞湾底質の試料採取

英虞湾の5地点(St. 4、St. 6、St. 10、St. 12、St. 20)からアクリルコア(直径 11cm)を用いて潜水作業により底質コアを採取し、底質コアの上部から 2-5cm の底質を以後の実験に用いた。

## 1.3. 英虞湾底質からの環境 DNA 抽出

第2章第1節 1.2 にと同様の方法を用いて DNA 抽出を行った。

## 1.4. アナモックス細菌の PCR 法による検索

前項で抽出した DNA を鋳型とした。16S rDNA の増幅には、*Planctomycetales* の 16S rDNA に特異的な Pla46f (5'-GGATTAGGCATSCAAGTC-3') と Amx820(5'-AAAACCCTCTACTTAGTG-3')のプライマーセット、Pla46f (5'-GGATTAGGCATSCAAGTC-3') と BS820(5'-TAATTCCTCTACTTAGTGCCC -3')のプライマーセット(Schemid *et al.*, 2005)、Brod541F (5'-GAGCACGTAGGTGGGTTTGT-3') と Brod1260R (5'-GGATTCGCTTCACCTCTCGG-3')のプライマーセット(Penton *et al.*, 2006)を用いた。200 µl 用の PCR チューブに、10×Gold Taq buffer (Applied Biosystems) 5.0 µl、dNTP mixture (dA、dC、dG、dT、各 2.0 mM; Applied Biosystems) 5.0 µl、MgCl<sub>2</sub> (25.0 mM、Applied Biosystems) 6.0 µl、PCR primer(10.0 pmol/µl)それぞれ 2.0 µl、DNA 溶液 2.0 µl、滅菌水 28.5 µl、AmpliTaq Gold (5.0 U/µl、Applied Biosystems) 0.5 µl 入れ、計 50.0 µl としたものを PCR 反応液とした。ネガティブコントロールとして DNA 溶液の

代わりに滅菌水を加えた。PCR 条件は、プレラン (94°C、7 分) を行った後、熱変性 (94°C、1 分)、アニーリング (Pla46-Amx820; 50°C、Pla46-BS820; 55°C、Brod541F- Brod1260; 60°C、1 分)、伸長反応 (72°C、2 分) を 35 サイクル行い、ポストラン (72°C、10 分) を行った。以下は、第 2 章第 1 節 1.3 と同様の方法で実験を行った。

#### 1.5. PCR 産物のクローニング解析

クローニング解析は、第 2 章第 1 節第 3 項と同様の方法で行った。クローニング解析において、Pla46-Amx820、Pla46-BS820 及び Brod541F-Brod1260 のプライマーセットにより得られたクローンをそれぞれ clone Am、clone BS 及び clone Br と命名した。

#### 1.6. クローンの塩基配列解析

前項で得られたプラスミドをテンプレートとし、第 2 章第 1 節 1.4 と同様の方法で塩基配列解析を行った。その後、第 4 章第 1 節 1.5 の方法により系統樹の作成を行った。

#### 1.7. バッチ培養によるアナモックス活性の検出

英虞湾の 5 地点 (St.4、6、10、12、20) の底質サンプル 2 g (湿重量)を加え、第 4 章第 1 節 1.1 の方法に従い実験を行った。窒素ガスの分析は、培養 2 週間後に測定を行った。

#### 1.8. FISH 法によるアナモックス細菌の検出

底質 10 g に PBS バッファー 15 ml を加え、超音波処理を 3 分間行った。その後、遠心 (800 rpm、4°C、10 分)を行い、上清を新しいチューブに移した。PBS buffer で 2 度洗浄し、4800 rpm、30 分間遠心により集菌を行った。サンプルと同量の 4%パラホル

ム固定液を加え、4°Cで一晩インキュベートした。蛍光オリゴヌクレオチドプローブには、Alexaにより標識した *Planctomycetales* の 16S rDNA に特異的な Pla46f (5'-GGATTAGGCATSCAAGT C-3')、アナモックス細菌の 16S rDNA に特異的な Amx820 (5'-AAAACCCCTCTACTTAGTG-3') 及び BS820 (5'-TAAT TCCCTCTACTTAGTGCCC -3') を Cy3 で標識したプローブを用いた。以降の FISH 法の実験操作は、第 4 章第 1 節 1.6 の方法に従った。

## 第 2 節 結果

### 2.1. 英虞湾海域の水質及び底質分析

英虞湾の 5 地点 (St. 4、St. 6、St.10、St. 12 及び St. 20) における水質分析を行った結果を Table 7 に示した。AVS 濃度は St.10 で非常に高かった。硝酸態窒素濃度は St. 10 のみ他の地点より低く、亜硝酸態窒素濃度は St. 6 が他の地点より高く、アンモニア態窒素濃度は St. 6、St. 20 において他の地点より高かった。

### 2.2. 海洋性アナモックス細菌のクローニング解析

英虞湾の 5 地点 (St.4、St.6、St.10、St.12、St20) から底質をサンプリングし環境 DNA を抽出した。アナモックス細菌グループを標的とした 16S rDNA の増幅には、アナモックス細菌の 16S rDNA を特異的に増幅させる Brod541F-Brod1260R、Pla46-Amx820 及び Pla46-BS820 のオリゴヌクレオチドプライマーセットを用いた。St.20 由来の環境 DNA を鋳型とした場合のみ、すべてのプライマーセットで予想された 16S rDNA フラグメントが得

られた。しかし、他の DNA サンプルを使用した場合には、Pla46-Amx820 プライマーセットを用いた時のみ予想された 16S rDNA フラグメントが得られたが、他のプライマーセットでは PCR 産物は得られなかった。各地点から増幅したフラグメントを用いてクローニングライブラリーを作成し、塩基配列を決定した。この解析には、200 以上のインサートが導入されたプラスミドを用いた。その結果、Pla46-Amx820 プライマーセットにより増幅されたフラグメントからアナモックス細菌として報告された *uncultured planctomycete clone A6* (AY266449) と *uncultured planctomycete clone Anam-09* (DQ664516) と相同性を示すクローンが多く検出された。Pla46-BS820 プライマーセットにより得られたクローからは、*Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete JMK-2* (AB281489) と *uncultured planctomycete clone A6* (AY266449) に相同性を示すクローンが得られた。また、Brod541F-Brod1260R のプライマーセットによる解析では、*uncultured planctomycete clone 64* (DQ534738) と 99% の相同性を示すクローンが得られた。

### 2.3. 海洋性アナモックス細菌の系統樹解析

前項でアナモックス細菌と相同性を示した 16S rDNA 塩基配列と *Candidatus Scalindua*、*Candidatus Kuenenia* 及び *Candidatus Brocadia* グループに属しているアナモックス細菌の 16S rDNA 塩基配列を用いて系統樹解析を行った(Fig. 14)。その結果、Pla46-Amx820 により増幅したフラグメントから得られた 15 クローン(clone Am4-34、Am6-55、Am6-57、Am6-61、

Am6-62、Am6-63、Am6-8、Am6-93、Am10-138、Am12-170、Am12-169、Am20-225、Am20-226、Am20-229、Am20-232) 及び Pla46-BS820 の 2 クローン(clone BS20-1、BS20-38) がクラスターを形成しており、既知のアナモックス細菌とは異なる新規のクラスターを形成した。一方、Brod541F-Brod1260R により増幅したフラグメントから得られた clone Br20-2、clone Br20-8 及び clone Br20-25 の 3 クローンは、*Candidatus Scalindua* グループにクラスターを形成した(Fig. 15)。

#### 2.4. 英虞湾底質のアナモックス活性のバッチ培養による検出

5 地点の底質を  $^{15}\text{N}$  で標識した塩化アンモニウムと  $^{14}\text{N}$  の亜硝酸ナトリウムを含む無機塩培地に厳密な嫌氣的条件下で植菌しバッチ培養を行った。培養開始から 2 週間後、亜硝酸とアンモニアの濃度を測定したところ、明らかな減少がみられた。さらに本章において、アナモックス細菌をターゲットとした PCR 法により 16S rDNA の増幅がみられた St.6 と St.20 のサンプルを解析したところ(Talbe 8)、St.6 と St.20 のサンプルのヘッドスペースに  $^{29}\text{N}_2$  と  $^{30}\text{N}_2$  が蓄積していた。全  $\text{N}_2$  に対する  $^{29}\text{N}_2$  の割合は、底質を加えずに無機塩培地のみでバッチ培養したコントロールで 0.8%であるのに対して、St.6 と St.20 ではそれぞれ 6.1%と 3.9%であった。

#### 2.5. FISH 法による英虞湾底質中における海洋性アナモックス細菌の検出

前項で述べたように、St.6 と St.20 の底質にアナモックス活性が検出されたことから、St.6 と St.20 の底質サンプルから集積培

養することなく直接 FISH 法によりアナモックス細菌の検出を行った。FISH 解析には、Amx820 と BS820 のアナモックス細菌に特異的なプローブを使用した。その結果、St.6 と St.20 の底質からアナモックス細菌が検出された(Fig. 16)。また、DAPI で染色された細胞数あたりの検出されたアナモックス細菌数が占める割合は、St.6 で 1.1%、St.20 で 0.5%であった。

### 第 3 節 考察

第 4 章で述べたように英虞湾底質から海洋性アナモックス細菌の集積培養に成功した。集積培養を行う前にアナモックス細菌の存在は予測されていたが(第 2 章)、さらに詳細に英虞湾底質におけるアナモックス細菌の分布を調べる目的で英虞湾底質からアナモックス細菌の検出を行った。

英虞湾 5 地点の底質から環境 DNA を抽出し、PCR によりアナモックス細菌の 16S rDNA を特異的に増幅することによりアナモックス細菌の検出を行った。Pla46-Amx820 及び Pla46-BS820 プライマーセットを用いてクローニング解析を行ったところ、アナモックス細菌と相同性を示した 17 クローンが得られ、そのクローンはアナモックス細菌の新規クラスターを形成していた(Fig. 14)。新規クラスターを形成したクローンの内 8 クローンは、Uncultured planctomycete clone A6 (AY266449) の 16S rDNA 塩基配列と比較的高い相同性を示した。Uncultured planctomycete clone A6 は、Tal らにより海洋底質には既知のアナモックス細菌の 16S rDNA の系統樹とは異なる新規クラスターを示すアナモックス細菌として報告されたものである(Tal *et al.*, 2005)。その結

果と同様に筆者の系統樹解析の結果においても海洋（英虞湾）底質から新規クラスターを示すアナモックス細菌が得られたことは、既知のアナモックス細菌以外にも様々な新規クラスターを示すアナモックス細菌が自然環境に多く存在する可能性を示唆する。また、Pla46-BS820 プライマーセットにより増幅されたフラグメントから得られた clone BS20-30 は、本研究において集積に成功したアナモックス細菌の JMK-2(第 4 章参照) の 16S rDNA と一致していた。JMK-2 はアナモックス細菌として確証のある *Candidatus Scalindua wagneri* と高い相同性を示し、本菌は、英虞湾においてアナモックス反応を担う重要な海洋性細菌である可能性が考えられた。一方、Brod541F-Brod1260R により得た 3 クローンは、*Candidatus Scalindua* グループ内にクラスターを形成した(Fig. 15)。この結果は、Brod541F-Brod1260R のプライマーセットは、一般的にアナモックス細菌の検出に使用されているプライマーではないが、日本の海洋底質に生息するアナモックス細菌の検出に有効なプライマーであることを示唆した。

Pla46-Amx820 のプライマーセットを用いたクローニング解析によりアナモックス細菌と相同性を示したクローン数は、St.6 から得られたものがもっとも多く 43 クローン中 23 クローン(53%) であり、次いで St.20 から 35 クローン中 5 クローン(14%) であった。また、Pla46-BS820 と Brod541F-Brod1260R のプライマーセットによりアナモックス細菌と相同性を示すクローンを得たのは St.20 のみであった。これらのことから、St.6 と St.20 の底質には、多数のアナモックス細菌が生息していることが示唆された。また、バッチ培養によるアナモックス活性試験においても、St.6 と St.20 の 2 地点のサン

プルから  $^{29}\text{N}_2$  と  $^{30}\text{N}_2$  の蓄積がみられた。この結果は、第 4 章において述べたように、 $^{29}\text{N}_2$  はアナモックス反応によるものであることから St.6 と St.20 の底質では窒素循環にアナモックス細菌が関与していることが示唆された。また、 $^{30}\text{N}_2$  の蓄積していたことから、 $^{30}\text{N}_2$  は、アナモックス細菌により発生したか、もしくはマンガン酸化物が存在する嫌気条件において、 $^{15}\text{N}$ -アンモニウムイオンの酸化により生産された可能性が考えられた (Mortimer *et al.*, 2004)。

更に、FISH 法により、St.6 と St.20 の底質にアナモックス細菌がそれぞれ 1.1% と 0.5% (DAPI で染色された細胞数あたりのアナモックス細菌に特異的なプローブにより検出された細胞数の割合) 存在していることを明らかとなった (Fig. 16)。英虞湾の St.6 と St.20 における相対的なアナモックス細菌数は、黒海 (0.75%) (Kuyper *et al.*, 2003)、ベンゲラの湧昇水域 (0.5%-1.3%) (Kuyper *et al.* 2005) 及びボルチモア湾の底質 (0.4%-0.6%) (Tal *et al.*, 2005) に匹敵する値であった。このことから、英虞湾にアナモックス細菌が存在することが明らかになった。

以上のことから、英虞湾には多くの種類のアナモックス細菌が存在し、窒素循環に貢献している可能性が示唆された。これまで、日本近海においてアナモックス細菌が生育しているという報告は 1 例のみであり (Amano *et al.*, 2007)、そこで検出されたアナモックス細菌とは異なる細菌が英虞湾から検出されたことから、本研究成果は、アナモックス細菌の普遍的な存在と同時に多様性を示すものである。

## Figures and Tables

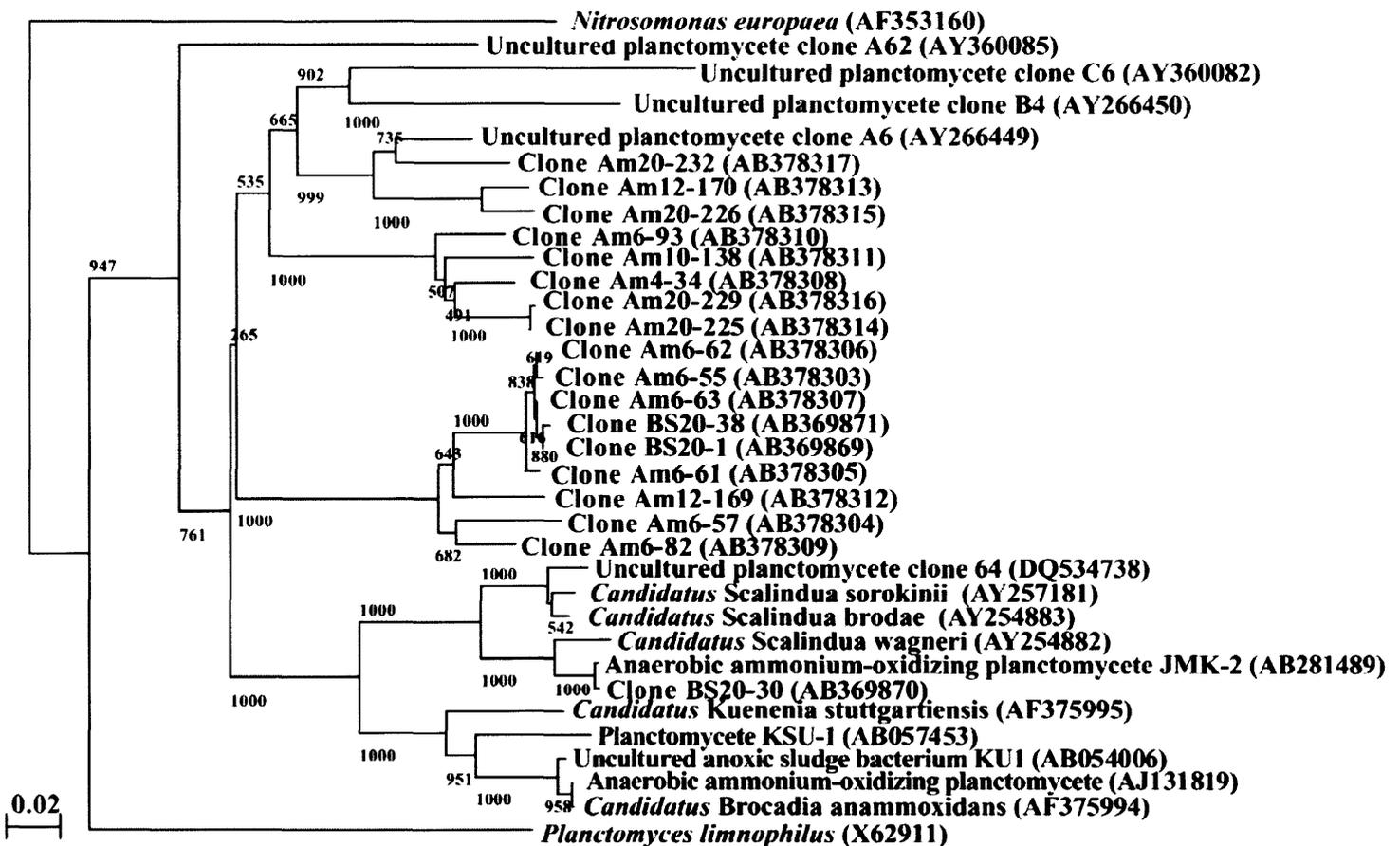


Fig. 14. Phylogenetic trees of 16S rRNA genes obtained with Pla46F-Amx820 and Pla46F-BS820 primer sets. The 16S rRNA gene sequences derived from the sediments in this study were compared with those of well-characterized anammox bacteria, Planctomycetes and several uncultured clones. The bar represents 2% estimated distance of sequence divergence. Respective sequence accession numbers are given in parentheses.

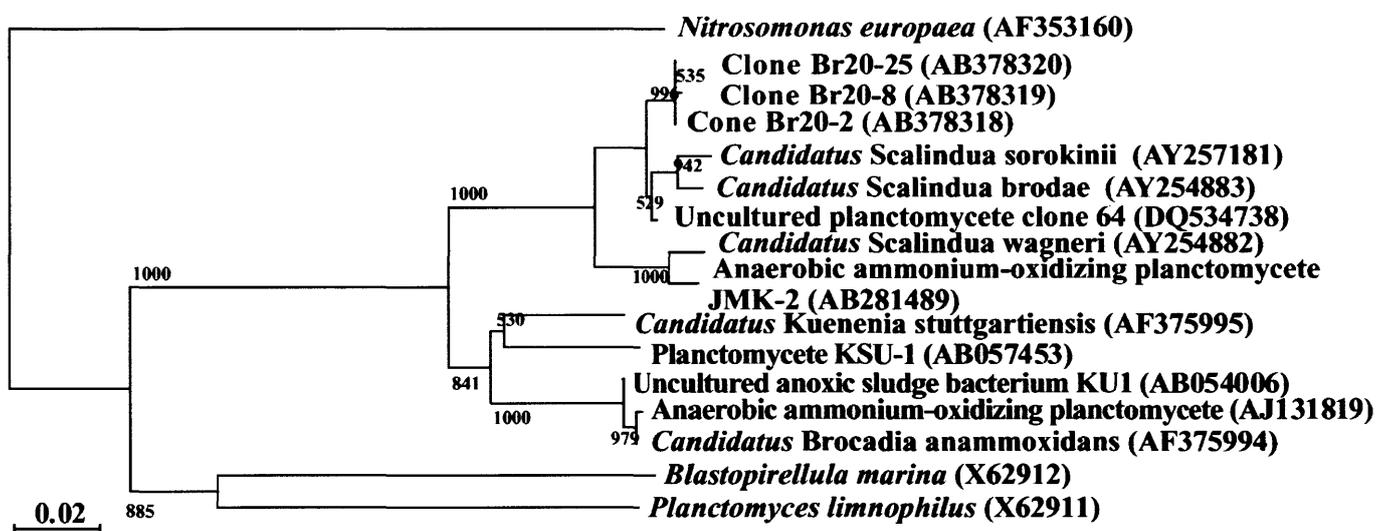


Fig. 15. Phylogenetic trees of 16S rRNA genes obtained with Brod541F-Brod1260 primer set. The 16S rRNA gene sequences derived from the sediments in this study were compared with those of well-characterized anammox bacteria, Planctomyces, several uncultured clones. The bar represents 2% estimated distance of sequence divergence. Respective sequence accession numbers are given in parentheses.

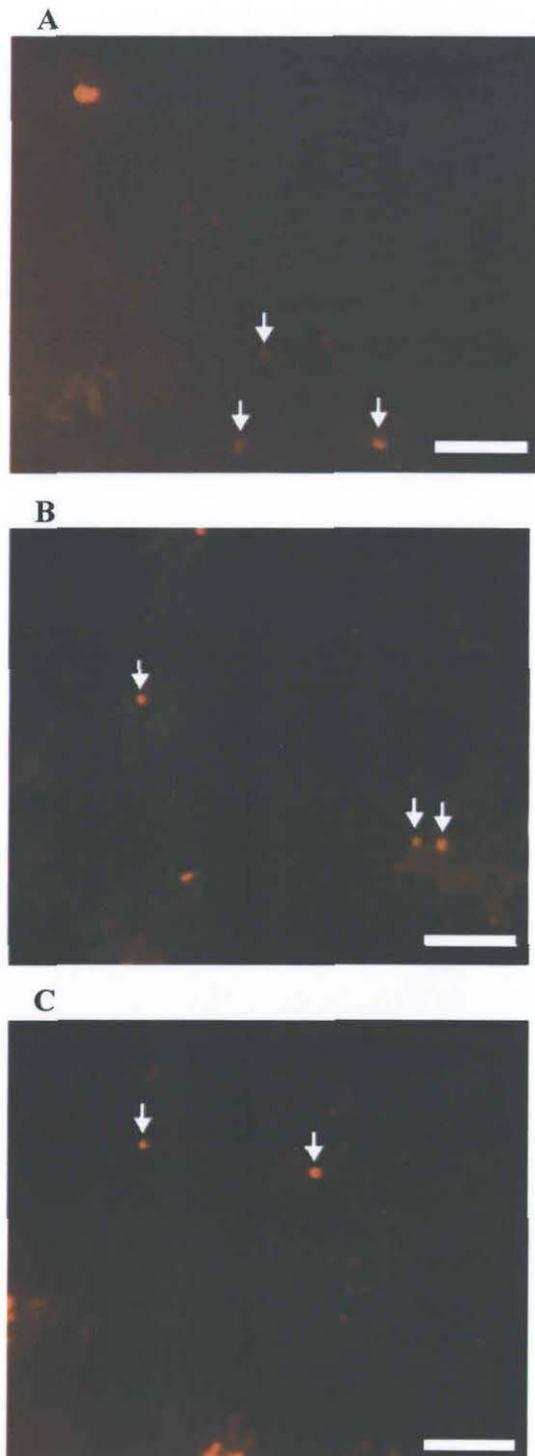


Fig. 16. FISH image of anammox bacteria from St. 6 (A) and St. 20 (B, C) sediments. Cells were visualized after hybridization with probe Cy3 -labeled Amx820 (A, B) or Cy3 -labeled BS820 (C). White arrows indicate representative Amx820, BS820 (Cy3) or Pla46 (Alexa) hybridized-cells that were also stained with DAPI. Scale bar indicates 10  $\mu$ m.

Table 7. Nutrient profiles of bottom water in sampling sites and characteristics of the sediment samples.

Site	Depth (m)	Bottom water						Sediment
		Temperature (°C)	pH	DO (mg L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (uM)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (uM)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (uM)	AVS (mg g-dw <sup>-1</sup> )
St.4	18.4	16.8	8.2	7.3	1.2	0.5	0.3	0.3
St.6	6.7	17.1	8.2	6.9	2.7	0.3	0.3	1.2
St.10	6.0	16.7	8.2	7.3	1.2	0.1	0.2	2.7
St.12	9.5	16.5	8.2	7.3	1.1	0.5	0.1	0.3
St.20	15.0	17.2	8.2	7.5	2.3	0.5	0.2	0.0

Table 8. N<sub>2</sub> production from <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (13 mg-N ) and <sup>14</sup>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (13 mg-N ) in 100 ml batch culture.

	<sup>28</sup> N <sub>2</sub>	<sup>29</sup> N <sub>2</sub>	<sup>30</sup> N <sub>2</sub>
	(%)		
<b>Control*</b>	<b>99.1</b>	<b>0.8</b>	<b>0.1</b>
<b>St.6</b>	<b>17.0</b>	<b>6.1</b>	<b>76.9</b>
<b>St.20</b>	<b>49.7</b>	<b>3.9</b>	<b>46.4</b>

\*The mineral medium was incubated without sediment.

## 第 6 章 総合論議

英虞湾のような閉鎖性海域では、窒素濃度が増加傾向にある。その上昇を食い止めるためには、その海域における窒素循環メカニズムを明らかにすることが重要である。本研究で、新しい窒素代謝経路であるアナモックス反応に注目した。このアナモックス反応は、嫌気条件下でアンモニアと亜硝酸を窒素ガスと水に変換する反応である。また、アナモックス細菌は自然界に広く分布し、様々な環境条件下で生育していることが明らかになっている (Table 2)。海洋性アナモックス細菌は、海洋の底質および嫌気的水域において窒素代謝経路の窒素ガス総生産量の 20%～79%を担っていることが明らかにされている (Schmid *et al.*, 2005)。また、近年の研究により従来提唱された窒素循環経路とは異なる新たな窒素循環経路が提唱されている。その新たな窒素循環経路は (Fig. 17)、硝化細菌との相互作用により窒素循環の一部をアナモックス細菌が担っていることを示した (Kuenen *et al.*, 2008)。そこで、本研究では英虞湾におけるアナモックス細菌の窒素循環への関与及びアナモックス細菌の分布を明らかにすることを目的として、(1)英虞湾に生息するアナモックス細菌の集積培養及びその菌叢解析と、(2)英虞湾における海洋性アナモックス細菌の検出を行った。

### (1)英虞湾に生息するアナモックス細菌の集積培養及びその菌叢解析

英虞湾の 5 地点からアナモックス細菌を検出するためにクローニング解析を行ったところ、St.6 の底質からアナモックス細菌を検出

した。そこで、英虞湾 St.6 海底に菊花状のポリエステル製不織布を固定し(Fig. 6) 3 ヶ月後に回収した。アナモックス細菌は、亜硝酸イオンとアンモニウムイオンを窒素源に、炭酸イオンを炭素源に利用することと、既知のアナモックス細菌の集積培養において酸化還元電位を低く培地を調整することが重要であることが分かっていた(Furukawa *et al.*, 2002)。培養開始時、海洋性アナモックス細菌の培養に関する報告はわずかであり、リアクターを用いた集積培養については誰も成功していなかった。このことから、海洋性アナモックス細菌の培地に関する詳細な情報が得られていなかった。そこで、海洋性アナモックス細菌の培地には、微量元素が豊富に含まれる深層水に亜硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、炭酸ナトリウムなどを添加した培地を用いた(Table 4)。海底から回収した不織布を上向流型リアクターに充填し、無機塩培地を連続的に流入させ集積培養した。

16 ヶ月間の培養後、流入水と比べ排水では亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素が同時に減少しており(Fig. 8)、そのモル比は約 1:1 であった。この結果は、アナモックス反応(Schmid *et al.*, 2005)と同様の減少率であったことから、リアクター内でアナモックス反応が起きている可能性が示唆された。そこで、リアクター内のポリエステル製不織布を一部切り出し、 $^{14}\text{N}$ -アンモニアと $^{15}\text{N}$ -亜硝酸を窒素源として完全な嫌気的条件下でアナモックス活性テストを行った。発生したガスの分析を行ったところ、 $^{29}\text{N}_2$  が検出されたことからリアクター内でアナモックス反応が起きていることが確認された(Table 6)。海洋には、多くの細菌が生育している。その環境からアナモックス細菌を集積するには、硝化細菌及び

脱窒細菌を優先的に生育させないために有機物濃度を低く維持する必要がある。そこで、合成無機塩培地を連続的に流入させたことがアナモックス細菌の集積に成功した要因であったと考えられる。また、Van de Vossenberg *et al.* (2008) は、人工海水により作成した培地を用いて海洋性アナモックス細菌の集積培養を行ったが失敗に終わった。このことから、筆者が培地の作成に用いた深層水には、海洋からの海洋性アナモックス細菌の集積培養に貢献する何らかの因子が含まれており、海洋性アナモックス細菌の集積培養に成功するには、培地に淡水由来のアナモックス細菌に適した培地とは異なる栄養素が必要である可能性がある。

リアクター内のアナモックス細菌を検出するためにクローニング解析を行った結果、アナモックス細菌と相同性の高い2種類の細菌、JMK-1 (AB281488) と JMK-2 (AB281489) が生育していることがわかった。JMK-1は、ボルチモアにある魚の養殖場海水循環システムから発見された clone 3-8b6 (AY769988) と99%の相同性を示し、JMK-2はイングランド(Pitsea)の排水処理施設(淡水)から発見された *Candidatus Scalindua wagneri* (AY254882) と97%の相同性を示した。これらの細菌の系統学的解析を行ったところ、JMK-1及びJMK-2は新規の海洋性アナモックス細菌であることが明らかになった。しかし、海洋から検出されたアナモックス細菌は、現在のところほぼすべてが *Candidatus Scalindua* に属することを報告されているが (Penton *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2007)、JMK-1は系統樹において *Candidatus Scalindua* とは異なるところに位置していた(Fig. 11)。

このことから、海洋環境において海洋性アナモックス細菌が多様性を示すことが示唆された。さらに、アナモックス細菌に特異的なプローブを用いた FISH 解析によって、リアクター内にアナモックス細菌が全細菌の 67%を占めるまで集積されていることが示された(Fig. 12)。

Fujii *et al.* (2002) は、アナモックス細菌の集積培養を行ったアナモックス反応槽(淡水)の汚泥を対象に、クローニング法とリアルタイム PCR による菌叢解析を行った。その結果、6種類のクローンを検出し、汚泥の菌叢の 70%をアナモックス細菌が占め、次にアナモックス細菌の生育を助けている可能性がある *Zoogloea* 類縁菌が約 10%を占めていたと報告している。このように、既知のアナモックス細菌は、数種の細菌と共生環境を形成していることが明らかにされている。そこで、リアクター内の微生物菌叢を PCR-DGGE 法により解析したところ、主要な DNA バンドが 8 本得られ、複数種の細菌が存在していることが明らかになった。クローニング解析及び PCR-DGGE 解析から JMK-1 が、主要なアナモックス細菌であることは疑いがないことから、リアクター内には同定したアナモックス細菌以外に他の細菌が生育しており、アナモックス細菌と共生環境を形成していることが示唆した。

リアクターを用いた海洋性アナモックス細菌の集積培養は本研究が初めての成功例である。

## (2) 英虞湾に生息する海洋性アナモックス細菌の検出

近年の研究により、アナモックスが自然環境中の窒素循環においてキープロセスであることがわかってきた。Kuypers らが黒海に

におけるアナモックス細菌の存在を報告 (Kuypers *et al.*, 2003) して以降、アナモックス細菌が様々な自然環境下に生息していることが水質分析、脂質分析、 $^{15}\text{N}$  によるトレース実験、PCR 及び FISH 法を用いることにより明らかになっている。しかし、日本沿岸海域におけるアナモックス細菌の存在についてはほとんどわかっていない。多くの海洋性アナモックス細菌が、好気と嫌気の境界である亜酸化帯で検出されている。その亜酸化帯は、深度の深い海水中と底質に存在し、亜硝酸とアンモニアが共存している環境である。そこで、アナモックス細菌の分布と多様性を明らかにすることを目的に、英虞湾底質におけるアナモックス細菌の検出を行った。

英虞湾 5 地点の底質サンプルから直接 DNA を抽出した。その DNA を鋳型に用いてアナモックス細菌の 16S rDNA に特異的な Pla46f-Amx820、Pla46f-BS820 及び Brod541F-Brod1260R のプライマーセットにより PCR を行った。プライマーに用いた Amx820 及び BS820 は、アナモックス細菌 16S rRNA の保存領域であり、アナモックス細菌のバイオマーカーとして用いられるプライマーである (Schmid *et al.*, 2005)。また、Brod541F-Brod1260R のプライマーセットは、バイオマーカーに用いられる他のプライマーより環境中のアナモックス細菌の検出に優れている (Penton *et al.*, 2006)。St.20 の試料を鋳型とした場合、すべてのプライマーセットにより予想したフラグメントが得られた。その他の 4 地点 (St.4、St.6、St10 及び St.12) の試料を用いた解析では、Pla46-Amx820 プライマーセットを用いた場合のみに 16S rDNA の増幅が見られた。その後、各地点の環境 DNA から

増幅したフラグメントを用いてクローニング解析を行った。Pla46-Amx820 で得られた 16S rDNA の解析では、アナモックス細菌として報告された *uncultured planctomycete clone A6* (AY266449) および *clone Anam-09* (DQ664516) と相同性を示すクローンが多く検出された。Pla46-BS820 による解析では、本研究の集積培養中に検出された JMK-2 (AB281489) と上記 *clone A6* に相同性を示すクローンが得られた。

Pla46-Amx820 及び Pla46-BS820 プライマーセットにより得られたアナモックス細菌クローンの塩基配列を用いて系統樹解析を行ったところ、英虞湾底質には既知のアナモックス細菌クラスターに属するアナモックス細菌と、既知のアナモックス細菌とは異なるクラスターに属するアナモックス細菌が存在することが示唆された (Fig. 14)。また、Brod541F-Brod1260R を用いた解析では、*uncultured planctomycete clone 64* (DQ534738) と 99% の相同性を示すクローンが得られた。これらのクローンを系統的に解析した結果、海洋における報告が多い *Candidatus Scalindua* のクラスター付近に分岐していた (Fig. 15)。現在までに発見されているアナモックス細菌のクラスターは、淡水に分布するアナモックス細菌と海水に分布するアナモックス細菌では系統的に異なるクラスターを形成している。淡水由来のアナモックス細菌は、*Candidatus Kuenenia*、*Candidatus Anammoxglobus*、*Candidatus Brocadia* のクラスターに属する。一方、海水由来のアナモックス細菌は、*Candidatus Scalindua* のクラスターに属する。しかし、Tal *et al.* (2005) は、ボルチモア湾底質に生育するアナモックス細菌が既知のアナモックス細菌のクラスターとは異なる

る新規のアナモックス細菌クラスターを形成したことを示した。これと同様に、本研究により英虞湾底質から得たクローンが新規のアナモックス細菌クラスター形成していたことは、海洋に分布するアナモックス細菌のクラスターは *Candidatus Scalindua* のクラスターだけではなく多岐に分岐している可能性が示唆された。また、英虞湾底質におけるアナモックス反応を検出する目的で、アナモックス細菌が検出された St.6 と St.20 の底質を用いて安定同位体によるトレーサー実験を行った。その結果、気相に  $^{29}\text{N}_2$  が検出され、アナモックス反応が起きていることが確認された (Table 8)。さらに FISH 法により St.6 と St.20 の底質試料中にアナモックス細菌が検出された (Fig. 16)。

以上のことから、英虞湾には多くの種類のアナモックス細菌が存在し、英虞湾における窒素循環に貢献している可能性が示された。さらに、アナモックス細菌が普遍的に存在することと同時にその多様性を示した。

近年のアナモックス細菌の研究により *Candidatus Kuenenia* と *Candidatus Anammoxoglobus* は、電子受容体として有機酸を利用して亜硝酸または硝酸からアンモニアへ還元できることが明らかにされた (Kartal et al., 2007)。しかし、海洋性アナモックス細菌である *Candidatus Scalindua* が、有機酸を利用できるのかは明らかにされていないが、淡水由来のアナモックス細菌が有機酸を利用できることはアナモックス細菌の多様性を示すものである。このようなアナモックス細菌の多様性が、海洋生態系の広い範囲に分布することを可能にしているのかもしれない。現在、自

自然界から発見されているアナモックス細菌は全体の一部である可能性があり、海洋性アナモックス細菌の諸性質についてはほとんどわかっていない。本論文で示したアナモックス細菌の集積培養と、日本近海におけるアナモックス細菌の分布と多様性に関する知見は今後の更なるアナモックス細菌の研究に繋がるものである。今後、アナモックス反応の詳細なメカニズムの解明により海洋における窒素循環経路におけるアナモックス細菌の真の役割が明らかにされることを期待する。

Figure

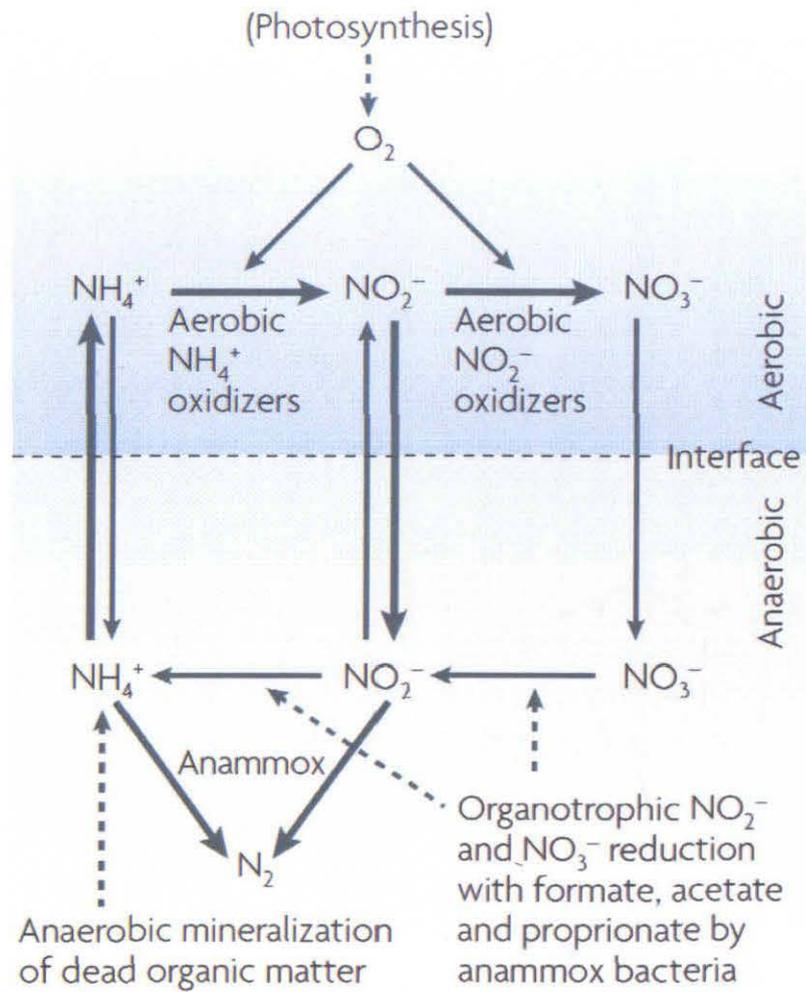


Fig . 17. Interaction and competition among aerobic and anaerobic nitrifiers. (Kuenen *et al.*, 2008)

## 謝 辞

本研究を進めるに当たり、終始熱心なご指導を賜りました栗冠和郎教授、木村哲哉准教授、栗冠真紀子研究員に心から御礼申し上げます。また、英虞湾底質のサンプリングに関しましては三重県水産研究所の皆様、FISH法に関しましては奥村克純教授、杉村和人助教、株式会社西原環境テクノロジーの土肥哲哉氏、水質分析に関しましては三重県総合企画局科学技術振興センターの岩崎誠二氏、系統樹解析に関しましては前橋工科大学の林秀謙講師、Benson Munyali Wamalwa氏、微生物工学研究室の皆様に変にお世話になりましたことを御礼申し上げます。

本稿をとりまとめるにあたり、綿密な査読とご指導を賜りました伊藤進一郎教授、後藤正和教授に深く感謝を申し上げます。

## 参考文献

- Amann, R. I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1919-1925.
- Amano, T., Yoshinaga, I., Okada, K., Yamagishi, T., Ueda, S., Obuchi, A., Sako, Y., Suwa, Y. (2007) Detection of anammox and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microbes Environ.*, 22, 232-242.
- Bowman, J.P., McCuaig, R.D., (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2463-2483.
- Dapena-Mora, A., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M.S. and Mendez, R. (2004) Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. *J. Biotechnol.*, 110, 159-170.
- Dong, X. and Tollner, E.W. (2003) Evaluation of Anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure. *Bioresour. Technol.*, 86, 139-145.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J., Siegrist, H., van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a

- rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.*, 175, 198-207.
- Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B., Acuna-Gonzalez, J. (2003) N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, 422, 606-608.
- Engström, P., Dalsgaard, T., Hulth, S., Aller, R.C. (2005) Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): Implications for N<sub>2</sub> production in coastal marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 2057-2065.
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 340-346.
- Fujii, T., Sugino, H., Rouse, J.D., Furukawa, K. (2002) Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier. *J. Biosci. Bioeng.*, 94, 412-418.
- Furukawa, K., Rouse, J.D., Bhatti, Z.I., Imajo, U., Nakamura, K., Ishida, H. (2002) Anaerobic oxidation of ammonium confirmed in continuous flow treatment using a nonwoven biomass carrier. *Jpn. J. Water Treat. Biol.*, 38, 87-94.

- Griess-Romijn, van. Eck., (1966) Physiological and Chemical Tests for Drinking Water. NEN 1056, IV-2, Nederlands Normalisatie Instituut Rijswijk.
- Helmer, C., Tromm, C., Hippen, A., Rosenwinkel, K.H., Seyfried, C.F., Kunst, S. (2001) Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Water Sci. Technol.*, 43, 311-320.
- Imajo, U., Tokutomi, T., Furukawa, K. (2004) Granulation of Anammox microorganisms in up-flow reactors. *Water Sci. Technol.*, 49, 155-163.
- Isaka, K., Date, Y., Sumino, T., Yoshie, S., Tsuneda, S. (2006) Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70, 47-52.
- Jetten, M.S., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, U.G., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C. Kuenen, J.G. (1998) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 421-437.
- Jetten, M.S., Sliemers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., Op den Camp, H.J., Hulth, S., Nielsen, L.P., Abma, W., Third, K., Engstrom, P., Kuenen, J.G., Jorgensen, B.B., Canfield, D.E.,

- Sinninghe Damste, J.S., Revsbech, N.P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmidt, I., Schmid, M., Strous, M. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 63, 107-114.
- Kartal, B., van Niftrik, L., Sliekers, O., Schmid, M.C., Schmidt, I., van de Pas-Schoonen, K., Cirpus, I., van der Star, W., van Loosdrecht, M., Abma, W., Kuenen, J.G., Mulder, J.-W., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H., Strous, M., van de Vossenberg, J. (2004) Application, eco-physiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. Review, *Environ. Sci. Bio/Technol.*, 3, 255-264.
- Kartal, B., Kuypers, M.M., Lavik, G., Schalk, J., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Strous, M. (2007) Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ. Microbiol.*, 9, 635-642.
- Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (2001) Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *ASM News*, 67, 456-463
- Kuenen, J.G. (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 320-326.
- Kuypers, M.M., Sliekers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.B., Kuenen, J.G., Sinninghe Damste, J.S.,

- Strous, M., Jetten, M.S. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422, 608-611.
- Kuypers, M.M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B.M., Amann, R., Jorgensen, B.B., Jetten, M.S. (2005) Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 6478-6483.
- Li, X., Zen, G., Rosenwinkel, K.H., Kunst, S., Weichgrebe, D., Cornelius, A., Yang, Q. (2004) Start up of deammonification process in one single SBR system. *Water Sci. Technol.*, 50, 1-8.
- Liu, Y., Du, B., Si, Y.A., Sun, Y.L. and Shen, L.X. (2005) [Cultivation of ANAMMOX bacteria and the ammonium anaerobic oxidation technology in the plug flow bio-reactor]. *Huan Jing Ke Xue*, 26, 137-141.
- Mortimer, J.T. Staff, J. (2004) Early work as a source of developmental discontinuity during the transition to adulthood. *Dev. Psychopathol.*, 16, 1047-1070.
- Mulder, A, Graff, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16. 177-184.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by

- denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K.H. (1998) Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, 144 ( Pt 12), 3257-3266.
- Penton, C.R., Devol, A.H., Tiedje, J.M. (2006) Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6829-6832.
- Pynaert, K., Smets, B.F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S.D. Verstraete, W. (2003) Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3626-3635.
- Risgaard-Peterson, N., Meyer, R.L., Schmid, M., Jetten, M.S.M., Enrich-Prast, A., Rysgaard, S., Revsbech, N.P. (2004) Anaerobic ammonium oxidation in an estuarine sediment. *Aquat. Microb. Ecol.*, 36, 293-304.
- Rysgaard, S., Glud, R.N., Risgaard-Petersen, N., Dalsgaard, T. (2004) Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 49, 1493-1502.
- Schmid, M., Twachtmann, 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., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damste, 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, 529-538.
- Schmid, M.C., Maas, B., Dapena, A., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, J., Kartal, B., van Niftrik, L., Schmidt, I., Cirpus, I., Kuenen, J.G., Wagner, M., Sinninghe Damste, J.S., Kuypers, M., Revsbech, N.P., Mendez, R., Jetten, M.S., Strous, M. (2005) Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1677-1684.
- Schmid, M.C., Risgaard-Petersen, N., van de Vossenberg, J., Kuypers, M.M., Lavik, G., Petersen, J., Hulth, S., Thamdrup, B., Canfield, D., Dalsgaard, T., Rysgaard, S., Sejr, M.K., Strous, M., den Camp, H.J., Jetten, M.S. (2007) Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ. Microbiol.*, 9, 1476-1484.

- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S., Strous, M. (2003) New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol Rev.*, 27, 481-492.
- Schmidt, J.E., Batstone, D.J., Angelidaki, I. (2004) Improved nitrogen removal in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by incorporation of Anammox bacteria into the granular sludge. *Water Sci. Technol.*, 49, 69-76.
- Searle, P.L. (1984) The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen: a review. *Analyst*, 109, 549-568.
- Sinninghe Damste, J.S., Strous, M., Rijpstra, W.I., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A., van Duin, A.C., van Niftrik, L.A., Jetten, M.S. (2002) Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, 419, 708-712.
- Sliemers, A.O., Third, K.A., Abma, W., Kuenen, J.G., Jetten, M.S. (2003) CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 339-344.
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S. (1999) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ. Microbiol.*, 65, 3248-3250.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner,

- A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Medigue, 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.
- Tal, Y., Watts, J.E., Schreier, H.J. (2005) Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1816-1821.
- Tal, Y., Watts, J.E., Schreier, H.J. (2006) Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2896-2904.
- Thamdrup, B., Dalsgaard, T. (2002) Production of N<sub>2</sub> through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1312-1318.
- Third, K.A., Paxman, J., Schmid, M., Strous, M., Jetten,

- M.S., Cord-Ruwisch, R. (2005) Enrichment of anammox from activated sludge and its application in the CANON process. *Microb. Ecol.*, 49, 236-244.
- Toh, S.K., Webb, R.I., Ashbolt, N.J. (2002) Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters. *Microb. Ecol.*, 43, 154-167.
- Trimmer, M., Nicholls, J.C., Deflandre, B. (2003) Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6447-6454.
- Van de Graaf, A.A., Mulder, A., de 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.
- van de Vossenberg, J., Rattray, J.E., Geerts, W., Kartal, B., van Niftrik, L., van Donselaar, E.G., Sinninghe Damste, J.S., Strous, M. Jetten, M.S. (2008) Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. *Environ. Microbiol.*, 10, 3120-3129.
- Wang, J., Kang, J. (2005) The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (Anammox) by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Biochem.*, 40, 1973-1978.
- Zheng, P., Lin, F.M., Hu, B.L. and Chen, J.S. (2004) Start-up of anaerobic ammonia oxidation bioreactor with

nitrifying activated sludge. J. Environ. Sci. (China), 16,  
13-16.