

# 嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 細菌の生態と生理

中島 潤・栗冠真紀子・木村 哲哉・栗冠 和郎

三重大学大学院生物資源学研究科 資源循環学専攻 循環生物学講座 微生物工学研究室

## Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria

Jun NAKAJIMA, Makiko SAKKA, Tetsuya KIMURA, Kazuo SAKKA

Laboratory of Applied Microbiology, Graduate School of Bioresources, Mie University

### Abstract

Anaerobic ammonium oxidation (anammox) was first discovered as the novel pathway of the microbial nitrogen cycle under anoxic conditions and it was proved to be the oxidation of ammonium with nitrite as the electron acceptor under anoxic conditions, resulting in the production of nitrogen gas. After the first discovery, anammox reactions were reported in various wastewater treatment facilities including landfill leachate treatment plants. Currently, it is estimated that anammox bacteria contributes up to 50% to the removal of fixed nitrogen from the oceans globally. In this review, we summarize nitrogen cycle in natural environment, discovery of anammox reaction and bacteria, morphological and physiological characteristics of anammox bacteria, application of anammox bacteria in wastewater treatment, and ecological and taxonomical studies on anammox bacteria. In addition, we describe our results concerning anammox bacteria found in Ago bay: detection and enrichment culture of anammox bacteria.

### はじめに

自然界における窒素循環において、大気中の分子状窒素はシアノバクテリウムや根に共生する土壤細菌などの微生物によってアンモニアに還元され、さらに有機態窒素（アミノ酸）に変換される。窒素固定能のない他の生物は、これらの微生物により固定化された窒素を利用する。生物体内の有機態窒素はその死後、微生物により分解されアンモニアから亜硝酸、硝酸を経て脱窒菌により窒素ガスとして大気中に放出されると考えられてきた。しかし、近年になり従来の窒素循環に加えて、嫌気的にアンモニアと亜硝酸から脱窒する経路が見いだされた。これが、いわゆる Anammox (Anaerobic ammonium oxidation) 反応である (図1)。

Anammox 反応の存在が明らかにされて以来、廃水処理への Anammox プロセスの導入と反応メ

カニズムに関する研究が様々なアプローチにより活発に行われ、その研究の過程で、Anammox 反応を行う微生物 (Anammox 細菌) の存在が多数明

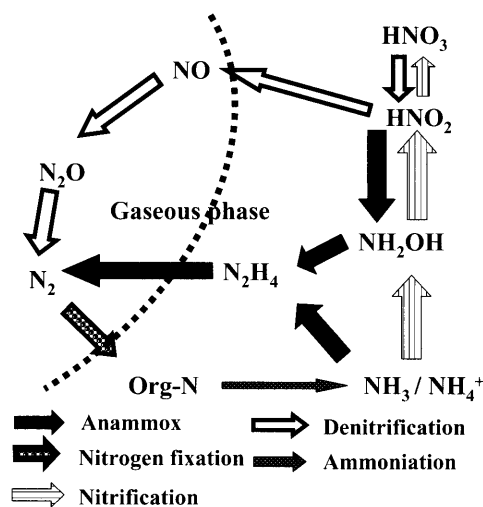


図1. 自然環境における窒素代謝経路

らかになってきた。16S rRNA 遺伝子 (rDNA) の解析により Anammox 細菌は *Planctomycetes* に属しており、系統学的解析により既知の細菌とは異なる分岐を示す新規の細菌であることが示された<sup>1,3)</sup>。Anammox 細菌の細胞には特異な形態的特徴がある。すなわち、細胞壁にはペプチドグリカンが存在せず、特有の「ladderane 脂質」と呼ばれる膜脂質が存在する。この Anammox 細菌特有の ladderane 脂質と 16S rDNA の特異的部位をバイオマーカーとして用いることにより Anammox 細菌が自然界に広く存在していることがわかってきた<sup>4)</sup>。特に、海洋においては Anammox 反応による脱窒が進行していることが確認され、Anammox 細菌が海洋における窒素循環の重要な役割を担っていることが判明し、Anammox 反応が地球上の窒素循環に重要な位置を占めていることが明瞭になりつつある<sup>5)</sup>。本総説では、近年急送に進みつつある Anammox 細菌の生態や生理の研究についてまとめた。さらに、筆者らが、英虞湾を対象に行った Anammox 細菌の調査や集積培養の結果についても紹介したい。

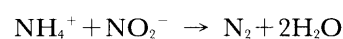
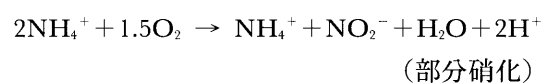
## 1. 自然界における窒素循環

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、図 1 に表したようにシアノバクテリアや根に共生する土壤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 ( $\text{NO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ ,  $2\text{NO}_2^- + 3\text{H}_2$

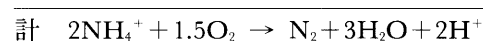
$\rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{OH}^-$ ) により分子状窒素の形で系外に放出される。これが従来から知られていた、硝化と脱窒による窒素の循環である。しかし、近年この窒素循環経路とは異なる、アンモニアと亜硝酸から嫌氣的に窒素ガスを生成する Anammox 反応が新たに発見された<sup>6)</sup>。

## 2. Anammox 細菌と Anammox 反応の発見

1965 年、海洋生態系におけるレッドフィールド比を基にした計算により嫌気性条件下でアンモニアが酸化されていることが推測された<sup>7)</sup>。1977 年に Broda らは、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<sup>6)</sup>。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りなされたが、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「嫌気性アンモニア酸化 (Anammox)」が報告された<sup>8)</sup>。研究の初期の段階では、Anammox の反応基質は、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  であると報告されたが、Anammox 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、集積に成功したことにより、Anammox 細菌の倍加時間は 11 日であることがわかったが、現在においてもなお Anammox 細菌の単離に成功したという報告はない。この Anammox 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 Anammox 反応の代謝式が提示されたが、最近では以下のような式で Anammox 反応が説明されるようになった。



(Anammox 反応)

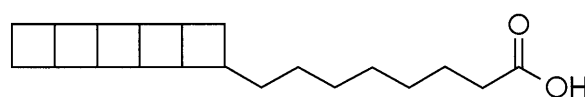


デルフト工科大学の Strous の研究グループは、反応槽から取り出したバイオフィルムを超音波処理し、凝集した細菌を個々の細胞にまでばらばらにし、Percoll 密度勾配遠心法を行うことにより約 99.5% の純化に成功した。この細胞の集団を使って反応を行った結果 Anammox 反応が進行することが確認された<sup>9)</sup>。この細菌を同定するため、細胞から抽出した DNA を使って 16S rDNA を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。この Anammox 細菌の 16S rDNA はそれまで知られていた最も近い細菌でも塩基配列の相同性が 80.2% しかなく、*Planctomyces* 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。後に、この Anammox 細菌は *Candidatus "Brocadia Anammoxidans"* と命名され、これが最初の Anammox 細菌として認知されるようになった<sup>10)</sup>。

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 4.3 Mbp のほぼすべての解読に成功したことが Nature 誌<sup>11)</sup> 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ンオキシダーゼ (HAO) のようなタンパク質をコードしている遺伝子と 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た。Anammox 細菌は、電子受容体として亜硝酸を用いての嫌気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の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 経路を経由し、必要な電子は亜硝酸から硝酸への嫌気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。

### 3. Anammox 細菌の形態的および生理的特徴

Anammox 細菌は、生育温度 6°C~42°C、pH 6.7~8.3 の範囲で生育可能であり pH 8.0 が最適 pH である。また、それぞれ 100 mM のアンモニアと硝酸が存在している条件下でも Anammox 反



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

図 2. Anammox 細菌に特徴的な Ladderane 脂質の構造の一例

応は阻害されない。しかし、メタノールの存在下において Anammox 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 mM 以上の条件では Anammox 反応は阻害される<sup>12)</sup>。

Anammox 細菌は、1 μm 程度の直径を持つ球菌で、*Planctomyces* に属す他の細菌と同様に発芽によって増殖する<sup>9)</sup>。また、細胞内部は、細胞質膜の内側に intracytoplasmic membrane があり、それに囲まれた領域に DNA が収納されて nucleoid となっており、リボソームを含む riboplasm、Anammox 反応に関係する Anammoxosome がそれぞれコンパートメント化されている<sup>11)</sup>。Anammoxosome を仕切る膜の脂質成分には、Anammox 細菌特有の特殊な環状構造を有する ladderane 脂質 (図 2) 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 Anammox 細菌特有の脂質である。Anammox 反応は、Anammoxosome 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 ladderane 脂質は密度の高い膜を形成し中間体の拡散を防ぎ Anammox 反応の効率的な進行を助けていると考えられている。Anammox 細菌生体内における ladderane 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<sup>13)</sup>。

### 4. Anammox 細菌の廃水処理への応用

閉鎖性水域における富栄養化を抑制するためには、水域へ排出される廃水中の栄養塩の削減が重要である。栄養塩の中でも、富栄養化原因物質の一つであるアンモニアを廃水中から除去する技術として多くの下水処理場を中心とした施設で硝化脱窒法が普及している。硝化脱窒法は、硝化細菌群と脱窒細菌群の特性を活かした生物学的処理プロ

セスである。流入するアンモニアを好氣的に亜硝酸、硝酸へと酸化する硝化反応とそれらを窒素ガスへと還元する脱窒反応を組み合わせた方法である。しかし、硝化には極めて高効率の酸素供給を要し、脱窒には電子供与体としてメタノールなどのエネルギー源が必要とされるためコストがかかる。一方、Anammox 反応は、独立栄養性の脱窒反応であるので、現在排水処理で広く使われている従属栄養性脱窒反応のように脱窒反応の水素供与体としてメタノールのような有機炭素化合物を外部から補填する必要はない。しかし、Anammox 反応を産業に応用して排水の窒素除去を行うには、Anammox 反応に先立って排水中の  $\text{NH}_4^+$  を  $\text{NO}_2^-$  に酸化する亜硝酸化処理が必要となる。しかし、 $\text{NH}_4^+$  の全量を  $\text{NO}_2^-$  に酸化する必要はなく排水中に存在する  $\text{NH}_4^+$  の約半量を  $\text{NO}_2^-$  に酸化すればよいことから、これまでの硝化-脱窒反応を利用する窒素除去法に比べて大幅に酸素供給量を削減できるため 7~8 割のコストの削減が可能である。この亜硝酸化処理技術については、すでにデルフト工科大学を中心とした SHARON システムや熊本大学を中心とした SNAP などの方法が開発されている。また、ヨーロッパでは、デルフト工科大学の研究グループを中心として実用化試験が行われており、世界初 70 m<sup>3</sup> スケールの Anammox リアクターはロッテルダムに設けられている。そのリアクターは、研究室スケールでの培養から 70 m<sup>3</sup> スケールへ直接スケールアップされた。リアクターの立ち上げには長期間必要であったが、現在 750 kg-N/d の処理に成功し、リアクターのスタートアップに関する様々な知見が得られている<sup>14)</sup>。

## 5. 自然界における Anammox 細菌の分布

最初に発見された Anammox 細菌である *Candidatus "Brocadia Anammoxidans"* の 16S rDNA の塩基配列が報告されたことから、この塩基配列を基にして FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法で Anammox 細菌の検出が可能となった。これにより、Anammox 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。Anammox 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 箇所以上から Anammox 細菌が存在していることが報告されて

いる<sup>5)</sup>。これらの研究における Anammox 細菌の検出と定量は、集積培養、水質分析、安定同位体解析、ladderane 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なされている。

Anammox 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 Anammox 細菌が特異的に有する ladderane 脂質濃度を測定し、その濃度プロファイルと Anammox 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、ladderane 脂質をマーカーとして Anammox 細菌を検出できることを強く示唆した<sup>4)</sup>。Anammox 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ており、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 Anammox 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た<sup>1)</sup>。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 Anammox 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 Anammox 活性と脱窒活性測定した。その結果、この水域において Anammox 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 Anammox 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、Anammox 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はたしていることが見出された<sup>15)</sup>。その後も海洋における Anammox 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  $\text{N}_2$  生産の 20%~79% を担っていることが示唆されている<sup>1, 16-21)</sup>。

## 6. Anammox 細菌の系統学的分類

Anammox 細菌の 16S rDNA の塩基配列は、全長である約 1.5 kbp 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に登録されている。このデータベースには、高濃度培養に成功した Anammox 細菌の 16S rDNA 塩基配列から自然界に存在する Anammox 細菌のクローン解析による

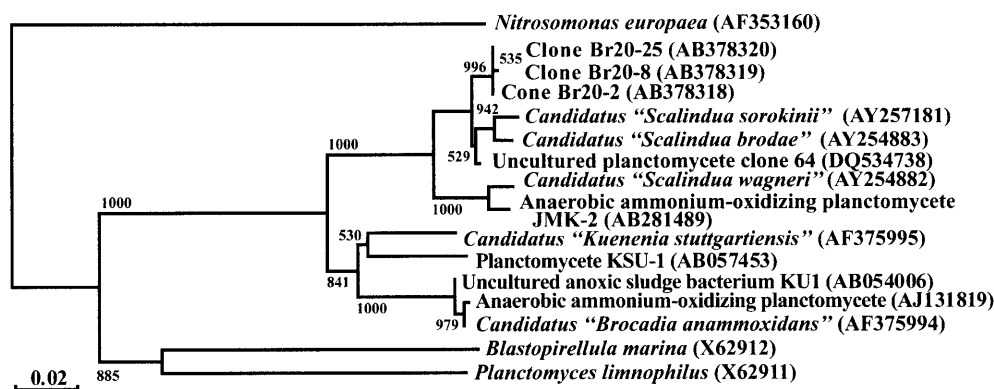


図3. Anammox 細菌の 16S rDNA 541-1260 領域の系統樹

Anammox 細菌の 16S rDNA 541-1260 領域の塩基配列を CLUSTALW プログラムで解析し NJ プロットを用いて系統樹を作成した。バーはシーケンスの 2% の違いを示す。カッコ内に DNA データベースの登録番号を示した。

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学的解析により、Anammox 細菌は *Candidatus "Scalindua"*, *Candidatus "Brocadia"*, *Candidatus "Kuenenia"* の 3 つのグループに分類できることが示されている (図 3)。黒海から発見された *Candidatus "Scalindua sorokinii"* (AY 257181) 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\_2 CM\_127 (AF 424463) などの多くの海洋性 Anammox 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<sup>22)</sup>。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"* (AY 254883), *Candidatus "Scalindua wagneri"* (AY 254882) 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 Anammox 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<sup>23)</sup>、Anammox 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 Anammox 細菌がまだまだ発見されることが予想される。

## 7. 英虞湾に生息する海洋性 Anammox 細菌の検出

世界では、自然界から様々な環境下に Anammox 細菌が生息することが報告されている。しかし、日本においては水処理場や地下水における Anammox 細菌の生育が確認されているものの海洋

における Anammox 細菌の存在についてあまり報告されていない。そこで、筆者らが英虞湾における Anammox 細菌の存在を示すことに成功した研究について紹介する<sup>24)</sup>。英虞湾は、真珠養殖や風光明媚な地として有名であるが、典型的な閉鎖性海域であり、近年水質悪化に悩まされている。英虞湾の 5 地点 (st.4, st.6, st.10, st.12, st.20; 図 4) を分析の対象として底質サンプルを採取し、DNA を抽出した。16S rDNA の増幅には、Planctomycetales の 16S rDNA に特異的な Pla 46 f (5'-GGATTA GGCATSCAAGTC-3') と Amx 820 (5'-AAAAC CCCTCTACTTAGTG-3') のプライマーセット、Pla 46 f (5'-GGATTAGGCATSCAAGTC-3') と BS 820 (5'-TAATTCCTCTACTTAGTGCCC-3') のプライマーセットおよび Brod 541 F (5'-GAG CACGTAGGTGGGTTTGT-3') と Brod 1260 R (5'-GGATTCGCTTCACCTCTCGG-3') のプライマーセットを用いた。Pla 46-Amx 820 プライマーセットを用いた PCR の結果、すべての地点のサンプルから増幅がみられ、クローン解析の結果 Anammox 細菌として報告された Uncultured planctomycete clone A 6 (AY 266449) と Uncultured planctomycete clone Anam-09 (DQ 664516) と相同性を示すクローンが多く検出された。Pla 46-BS 820 プライマーセットを用いた場合には、St.20 のみで増幅が確認され、Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete JMK-2 (AB 281489) と Uncultured planctomycete clone A 6 (AY 266449) に相同性を示すクローンが得られ、その塩基配列を用いて系統学的解析を行った (図 5)。その結果、

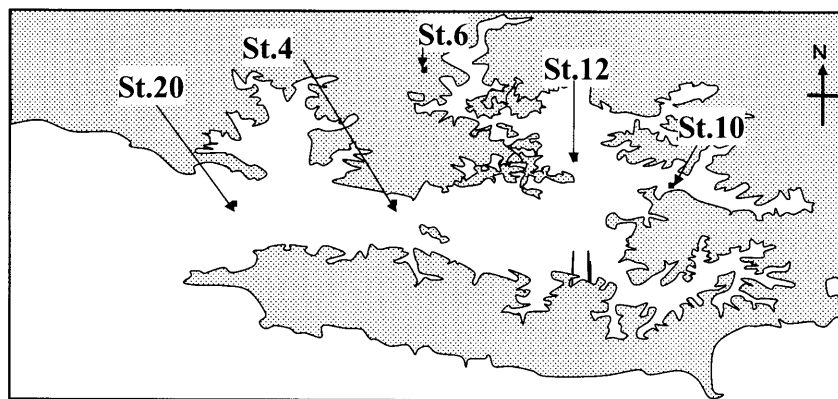


図4. 底質サンプリング地点の地図 (三重県英虞湾)

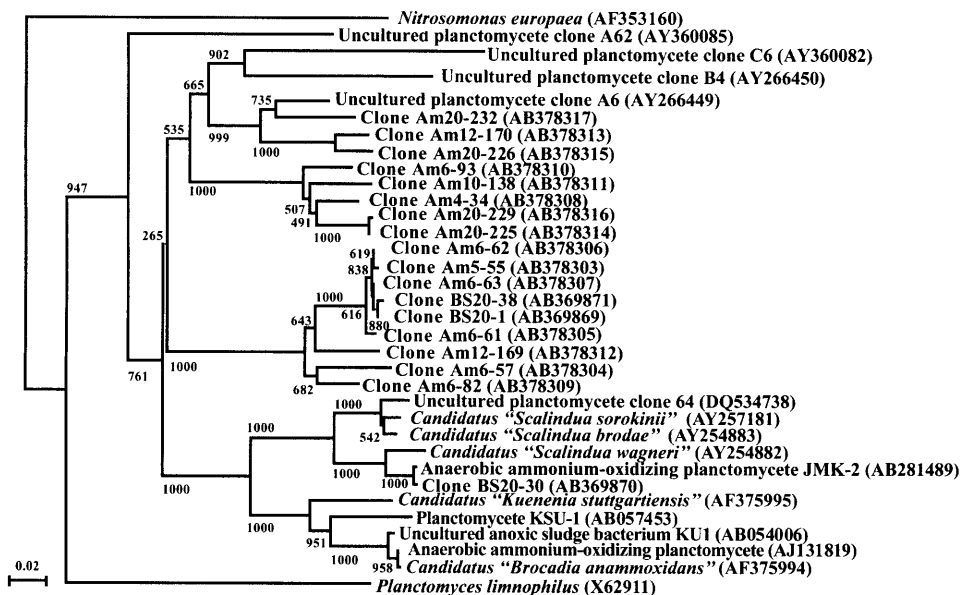


図5. Pla 46-Amx 820 と Pla 46-BS 820 のプライマーセットを用いた 16S rDNA のクローニング解析による系統樹

St. 6 および St. 20 の底質サンプルより抽出した DNA を鋳型に、Pla 46-BS 820 のプライマーセットを用いて 16S rDNA を増幅した。クローニング解析で得た塩基配列により CLUSTALW プログラムで解析を行い NJ プロットを用いて系統樹を作成した。系統樹中のクローンは、Pla 46-Amx 820 プライマーセットを用いて St. 6 から検出されたクローンを Clone Am 6- の様に表示した。また、*Nitrosomonas europaea* をアウトグループとして加えた。バーはシーケンスの 2% の違いを示す。カッコ内に DNA データベースの登録番号を示した。

得られたクローンの塩基配列は、既知の Anammox 細菌とは異なる新規の分岐であることがわかった。このことから得られたクローンは、新規の Anammox 細菌である可能性が示唆された。また、Brod 541 F-Brod 1260 R のプライマーセットを用いた PCR では、St. 20 のサンプルのみから増幅が確認された。そのクローニング解析により、Uncultured planctomycete clone 64 (DQ 534738) と 99% の相同性を示すクローンが得られた。これを系統的に解析した結果、海洋における報告が多い "*Candidatus Scalindua*" 付近に分岐していることが

わかった (図 3)。Tal らにより、海洋底質または自然界には、既知の Anammox 細菌の 16S rDNA の系統樹とは異なる新規の分岐を示す Anammox 細菌が存在することが報告されているが、それと同様に英虞湾底質のクローニング解析により、英虞湾からも新規の分岐を示す Anammox 細菌が得られた。英虞湾底質の調査により、既知の Anammox 細菌以外にも様々な新規の分岐を示す Anammox 細菌が多く存在する可能性が示された。

また、Anammox 反応を検出するため、PCR 法により 16S rDNA の増幅がみられた St. 6 と St. 20



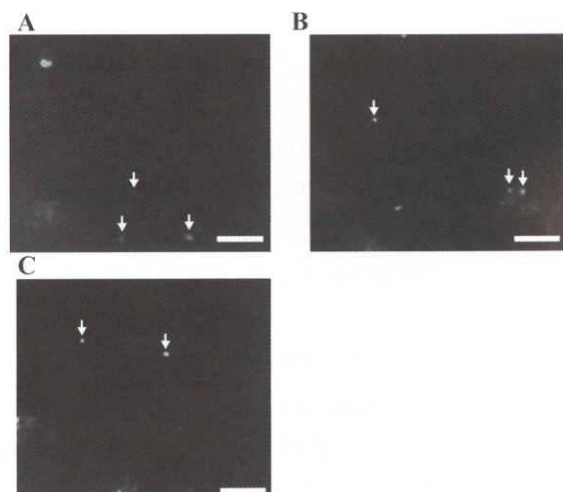


図6. St.6 (A) と St.20 (B, C) の底質の FISH 解析  
Cy3 でラベルした Amx 820 (A, B), BS 820 プローブ (C) を用いた。矢印は Amx 820, BS 820, Pla 46 および DAPI の全てで染色された細胞を示す。サイズバーは  $10\mu\text{m}$  を示す。

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。 $^{15}\text{NH}_4^+$  と  $^{14}\text{NO}_2^-$  を用いて 2 週間底質を培養した結果、St.6 と St.20 の底質において、気相に  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  が検出され Anammox 反応が起きていることが明らかになった。さらに FISH 法により St.6 と St.20 の底質サンプル中における Anammox 細菌の検出を試みた。FISH 解析には、Amx 820 と BS 820 の Anammox 細菌に特異的なプローブを使用した。その結果、St.6, St.20 両方のサンプリング地点の底質から Anammox 細菌が検出された (図6)。

以上の解析により、英虞湾には多くの種類の Anammox 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唆された。これまで、日本近海において Anammox 細菌が生育しているという報告は 1 例のみであり<sup>25)</sup>、そこで検出された Anammox 細菌とは異なる細菌が英虞湾から検出されていることから、我々の研究成果は、Anammox 細菌の普遍的な存在と同時に多様性を示すものである。

## 8. 英虞湾に生息する海洋性 Anammox 細菌の集積培養とその菌叢解析

英虞湾のような閉鎖性海域では、外部からの有機物の流入による水質の悪化とそれに伴った貧酸素が進みやすい。一方、Anammox 細菌は、海洋の窒素除去において重要な役割を担っていること

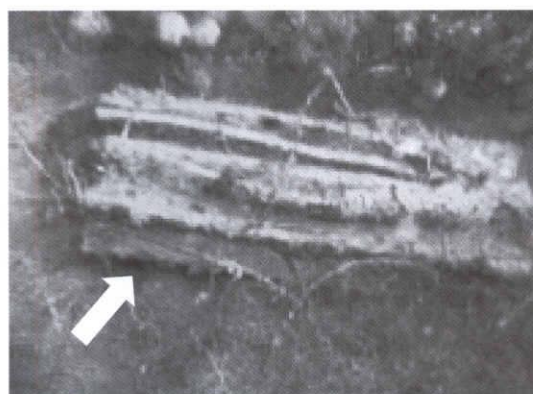


図7. St.6 の海底に沈めた不織布の様子

不織布を矢印で示した。不織布は、厚さ  $0.7\text{mm}$ 、 $4\times 34\text{cm}$  の短冊 8 枚を放射状にあわせた。

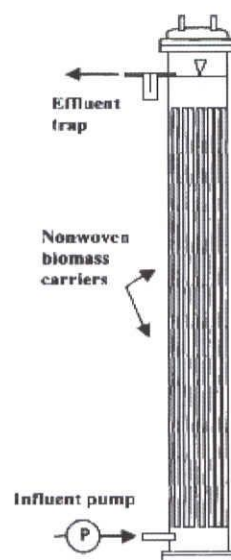


図8. 集積培養に用いた上向流カラム型培養槽の模式図

が明らかになっている。このことから、英虞湾に生息する Anammox 細菌を集積培養し、嫌氣的脱窒による過剰窒素分の除去を試みることを目的として研究を行った<sup>26)</sup>。

St.6 (図4) に 2004 年 11 月短冊状 ( $4.5\times 34\text{cm}$ ) にカットした厚さ  $7\text{mm}$  の不織布を海底に沈め (図7)、2005 年 2 月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。Anammox 細菌の集積のため、上向流カラム型培養槽 (直径  $9\text{cm}$ 、高さ  $43\text{cm}$ 、カラム容積  $2.5\text{L}$ ; 図8) として無機塩を添加した海水培地 (表1) を上向流にて  $2.5\text{L/day}$  の流量で供給し、 $25^\circ\text{C}$  で連続的に培養を行った。その結果、9 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

るようになった (図9)。11ヶ月目には培養液の亜硝酸態窒素濃度が約1/4にアンモニア態窒素濃度は約1/5に減少した。また、培養槽内では、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の割合で減少し、Anammox反応が進んでいる可能性が示唆された。そこで、培養槽から不織布の一部をとり、そのAnammox活性について安定同位体<sup>15</sup>Nでラベル化した<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>ClとNa<sup>14</sup>NO<sub>2</sub>を培養液に添加することにより、発生する分子状窒素について分析を行った。その結果、生じた分子状窒素の50%がAnammox反応において発生する<sup>14</sup>N<sup>15</sup>Nであったことから、培養槽でAnammox細菌が集積されていることが明らかになった。

Anammoxリアクター内でAnammox反応が行っていることが示唆されたことから、プライマーとして *Planctomyces* 属に特異的な領域の Pla 46 F

表1 無機塩添加海水培地の組成

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

pH8.0・ORP 0 m V 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

(5'-GGATTAGGCATSCAAGTC-3')<sup>27)</sup>と細菌に共通な領域の1406 R (5'-ACGGGCGGTGTGTGTRC-3')を用いて16S rDNAによる培養槽内の菌叢解析を試みた。その結果、リアクター内にAnammox細菌と相同性の高いAnaerobic ammonium-oxidizing planctomycete JMK-1 (AB 281488)とJMK-2 (AB 281489)の2種類の細菌が生育していることがわかった。JMK-1は、アメリカ、ボルチモアにある魚の養殖場の海水循環システムから発見された clone 3-8 b 6 (AY 769988)と99%の相同性を示し、JMK-2は淡水の廃水処理場から発見された *Candidatus "Scalindua wagneri"* (AY 254882)と97%の相同性を示した。これらの系統学的解析を行った結果 (図10)、JMK-2

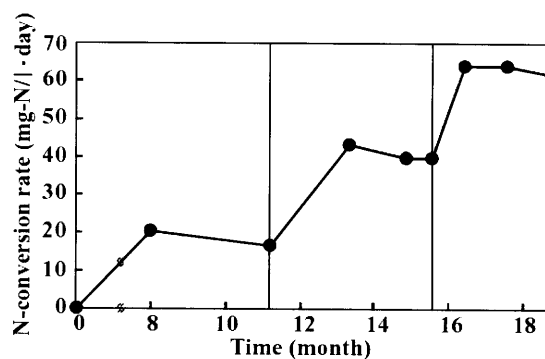


図9. 連続培養による無機塩添加海水培地からの窒素除去

培養槽から排出された無機塩添加海水培地に残存するアンモニアと亜硝酸の量から、1リットルの培養液1日あたりに除去された窒素量を算出した。

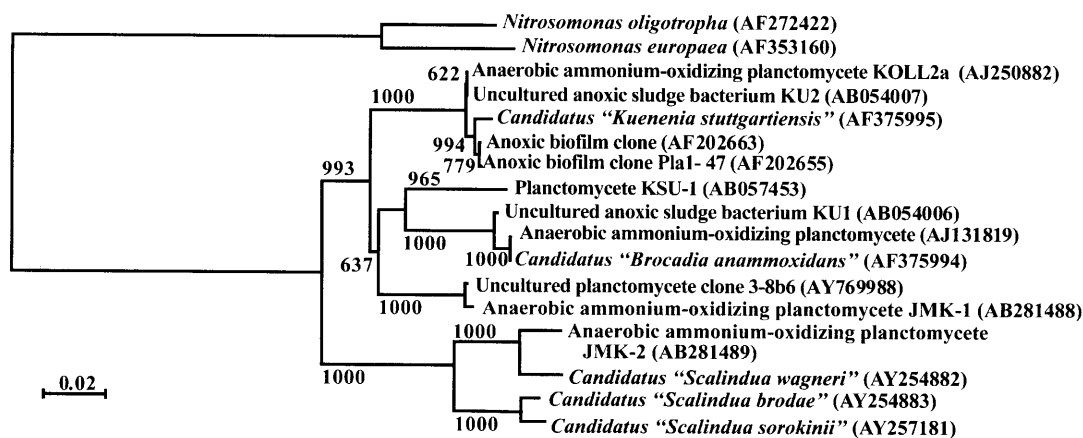


図10. JMK-1とJMK-2とAnammox細菌の16S rDNA配列の系統樹

上向流カラム型培養槽の不織布から抽出したDNAを鋳型にPla 46-1406 Rプライマーセットを用いて16S rDNAを増幅した。クローニング解析で得た塩基配列によりCLUSTALWプログラムで解析を行いNJプロットを用いて系統樹を作成した。バーはシーケンスの2%の違いを示す。カッコ内にDNAデータベースの登録番号を示した。



は新規の海洋性 Anammox 細菌である可能性が示唆された。

さらに、Anammox 細菌に特異的な Amx 820 プロブを用いて FISH 法と DAPI 染色にて Anammox 細菌の検出を行った。その結果、リアクターには Anammox 細菌が集積されていることが示された (図 11)。

現在までに発見されている Anammox 細菌の多くは、数種の細菌と共生環境を作りバイオフィルムを形成していると報告されている。そこで、Anammox 細菌が生育していることが確認できたリアクターから DNA を抽出し、Anammox 細菌と共生環境を作っている微生物をプライマーとし

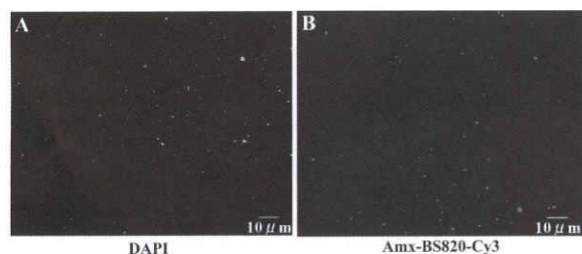


図11. 集積培養リアクター内菌叢の DAPI および BS 820 プロブを用いた FISH 解析

Cy 3 でラベルした BS 820 プロブを用いた。サイズバーは 10  $\mu$ m を示す。

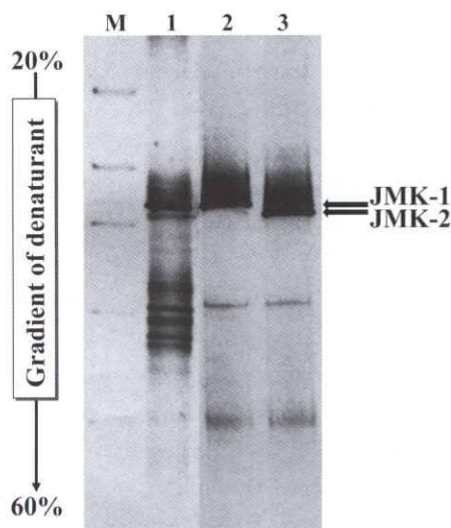


図12. 1055 F-1392 R プライマーセットによる集積培養リアクター内菌叢の PCR-DGGE 解析

ポリアクリルアミド 6-12%, 変性剤 20-60% の濃度で濃度勾配をかけたゲルで、61°C, 200 V, 5 時間泳動した。泳動後ゲルは SYBR Gold (Invitrogen) で染色した。Lane 1, 集積培養の菌叢; 2, クローン JMK-1; 3, クローン JMK-2.

て細菌に共通な領域の 1055 F (5'-TGGCTGTCG TCAGCT-3') と GC クランプを付けた 1392 R-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCG CCGCCCCGCCCACGGGCGGTGTGTAC-3') を用いて PCR-DGGE 法により解析した。その結果、主要な DNA バンドが 8 本得られたことから (図 12) リアクター内には複数種の細菌が存在し、バンドの濃さから JMK-1 が主要な細菌であることがわかった。このことから、リアクター内には Anammox 細菌の他にも細菌が生育しており、Anammox 細菌と共生環境を形成していることが示唆された。

Anammox 細菌については最初の論文発表<sup>8)</sup>当初から窒素の循環や窒素除去に関心の高い研究者の注目を集め多くの追試が行われた。デルフト工科大学のグループが廃水処理場の汚泥を種汚泥として集積培養した結果、培養に成功し Anammox 細菌に関する様々な知見が得られるようになった。その後も淡水からの Anammox 細菌の集積培養に成功したとの報告があるものの、リアクターを用いた海洋性 Anammox 細菌の集積培養に成功したという報告はこれまでになく、我々の研究が初めての成功例である。

## おわりに

現在、Anammox 細菌の研究が、ヨーロッパを中心にまた日本国内においても急速に進められている。Anammox 細菌を廃水処理に利用する目的で、実証プラントが作られ実用化に向けて運転試験が行われている<sup>9)</sup>。今後、現在の廃水処理法から Anammox 細菌を利用した廃水処理へ移行する可能性もある。Anammox 細菌の検出法が確立されつつあるため、Anammox 細菌が淡水海水を問わず、自然界に広く生息することが明らかになってきている。これまで Anammox 細菌が完全に単離された例はないが、高濃度に濃縮することは可能であり、今後 Anammox 反応の生化学的な手法による解明が期待される。

本総説で述べた英虞湾の Anammox 細菌に関する研究は「三重県地域結集型共同研究事業」の一環として科学技術振興機構から補助金を得て行ったものである。

## 引用文献

- 1) KUYPERS, M., M., SLIEKERS, A. O., LAVIK, G., SCHMID, M., JØRGENSEN, B. B., KUENEN, J. G., SINNINGHE DAMSTÉ, J. S., STROUS, M. and M. S. JETTEN. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, **422**: 608-611 (2003).
- 2) SCHMID, M., U. TWACHTMANN, M. KLEIN, M. STROUS, S. JURETSCHKO, M. S. M. JETTEN, J. METZGER, K.-H. SCHLEIFER, WAGNER, M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.*, **23**: 93-106 (2000).
- 3) SCHMID, M., K. WALSH, R. WEBB, W. I. C. RIJPSRA, K. T. VAN DE PAS-SCHOONEN, M. J. VERBRUGGEN, T. HILL, B. MOFFETT, J. FUERST, S. SCHOUTEN, J. S. SINNINGHE DAMSTÉ, J. HARRIS, P. SHAW, M. S. M. JETTEN, and STROUS, M. *Candidatus* "Scalindua brodae," sp. nov., *Candidatus* "Scalindua wagneri," sp. nov.: two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**: 529-538.
- 4) 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 DAMSTÉ, J. S., KUYPERS, M., REVSBECH, N. P., MENDEZ, R., JETTEN, M. S., STROUS, M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(4): 1677-1684 (2005).
- 5) OP DEN CAMP, H. J., KARTAL, B., GUVEN D., VAN NIFTRIK, L. A., HAAIJER, S. C., VAN DER STAR, W. R., VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T., CABEZAS, A., YING, Z., SCHMID, M. C., KUYPERS, M., VAN DE VOSSENBERG, J., HARHANGI, H. R., PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M. C., KUENEN, J. G., STROUS, M., JETTEN, M. S. Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**: 174-178 (2006).
- 6) BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiol.*, **17**: 491-493 (1997).
- 7) RICHARDS, F. A. Anoxic basins and fjords. In Riley, J. P. & G. Skirrow (eds), *Chemical Oceanography*. Academic Press, London, **1**: 611-645 (1965).
- 8) MULDER, A., VAN DE GRAAF, A. A., ROBERTSON, L. A. and J. G. KUENEN. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **16**: 177-184 (1995).
- 9) STROUS, M., FUERST, J., KRAMER, E., LOGEMANN, S., MUYZER, G., VAN DE PAS, K., WEBB, R., KUENEN, J. G., and M. S. M. JETTEN. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, **400**: 446-449 (1999).
- 10) BROCHIER, C. and H. PHILIPPE. A non-hyperthermophilic ancestor for bacteria. *Nature*, **417**: 244 (2002).
- 11) 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., MEDIGUÉ, 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., WEISSENBAACH, J., JETTEN, M. S., WAGNER, M. and D. LE PASLIER. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, **440**: 790-794 (2006).
- 12) STROUS, M., KUENEN, J. G. and M. S. JETTEN. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7): 3248-3250 (1999).
- 13) 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., 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., WEISSENBAACH, J., JETTEN, M. S., WAGNER, M., LE PASLIER, D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, **440**: 790-794 (2006).
- 14) VAN DER STAR, W. R., ABMA, W. R., BLOMMERS, D., MULDER, J. W., TOKUTOMI, T., STROUS, M., PICIOREANU, C. and M. C. VAN LOOSDRECHT. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.*, **41**: 4149-4163 (2006).
- 15) DALSGAARD, T., CANFIELD, D. E., PETERSEN, J.,

- THAMDRUP, B. and J. ACUNA-GONZALEZ.  $N_2$  production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, **422**: 606-608 (2003).
- 16) ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, **437**: 349-355 (2005).
- 17) DALSGAARD, T., THAMDRUP, B. and D. E. CANFIELD. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Res. Microbiol.*, **156**: 457-464 (2005).
- 18) THAMDRUP, B. and T. DALSGAARD. Production of  $N_2$  through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 1312-1318 (2002).
- 19) TRIMMER, M., NICHOLLS, J. C. and B. DEFLANDRE. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 6447-6454 (2003).
- 20) Risgaard-PETERSEN, N., NICOLAISEN, M. H., REVSBECH, N. P. and B. A. LOMSTEIN. Competition between ammonia-oxidizing bacteria and benthic microalgae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 5528-5537 (2004).
- 21) RYSGAARD, S., GLUD, R. N., RISGAARD-PETERSEN, N. and T. DALSGAARD. Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol. Oceanogr.*, **49**: 1493-1502 (2004).
- 22) BOWMAN, J. P., MCCUAIG, R. D. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(5): 2463-83 (2003).
- 23) TAL, Y., WATTS, J. E. and H. J. SCHREIER. Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 1816-1821 (2005).
- 24) NAKAJIMA, J., SAKKA, M., KIMURA, T. and K. SAKKA. Detection of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Ago Bay sediments. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**(8): 2195-2198 (2008).
- 25) AMANO, T., YOSHINAGA, I., OKADA, K., YAMAGISHI, T., UEDA, S., OBUCHI, A., SAKO, Y. and Y. SUWA. Detection of anammox and diversity of anammox bacteria-related 16 S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microbes. Environ.*, **22**(3): 232-242 (2007).
- 26) NAKAJIMA, J., SAKKA, M., KIMURA, T., FURUKAWA, K. and K. SAKKA. Enrichment of anammox bacteria from marine environment for the construction of a bioremediation reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**(5): 1159-1166 (2008).
- 27) NEEF, A., AMANN, R., SCHLESNER, H. and K. H. SCHLEIFER. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16 S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, **144**: 3257-3266 (1998).