

身近で活躍する有用微生物 環境と有用微生物3.

窒素循環にかかわる硝化微生物

たか はし れい じ
高橋 令二
Reiji TAKAHASHI

はじめに

微生物には発酵により我々の食生活を豊かにしてくれる一群がおり、科学の発達する以前より、人間に恩恵をもたらしてきている。また、病原菌は今までに無数の人類の命を奪ってきた憎むべき強敵である。一方、人体には表皮上に種々の常在菌が存在し、また体内には膨大な量の腸内細菌が棲息しており、我々の一生に寄り添い共に生活している。

一般的にはあまり身近に感じられていないが、我々を取り巻く環境中には多種多様な微生物が存在し、地球環境の維持とその清浄化に大きく貢献してくれているのである。それらは「環境微生物」と総称され、100年以上前に発見されて以来、綿々と研究が続けられ、近年ではその一端として特殊環境に生息する菌株から有用な知見も多数報告されている。

本項では、環境微生物研究の初期に発見された微生物種の一つであり、現在でも重要な役割を担っている環境中の窒素循環に関わる硝化微生物に焦点を当て紹介していきたい。

また、現在ではメタゲノム解析や分子生態学等の非培養系解析が盛んに行われているが、本稿では菌体を取り扱う培養を中心に述べていきたい。

I. 元素循環と微生物

地球は誕生以来、様々な状態、すなわち硫酸の海に覆われた時代、全球氷結の時代等々を経て、酸素の発生や生物の誕生を迎えて現在の地球環境が形成されるまで、気の遠くなるような時間がかかっているのは周知のとおりである。現在、炭素、窒素、硫

黄等の主要な元素はそれぞれ形態を変えて化学的、生物的に変換され「閉じた地球環境」内で循環している。炭素を例に挙げれば、二酸化炭素の形態で存在する炭素化合物が突出して蓄積したため、近年の地球温暖（高温）化を招いたことは既に言い尽くされている。化石燃料の燃焼による二酸化炭素の発生に対し、消費するのは植物が最も良く知られているが、微生物にも「独立栄養性」（植物と同様に二酸化炭素を炭素源として生育する）のものが多種多様に存在し、少なからず二酸化炭素の消費者として貢献している。先に述べた100年以上前に発見された環境微生物の一つはこの独立栄養性のバクテリアであった¹⁾。

微生物の関わる窒素循環には窒素固定、硝化、脱窒（硝酸還元）の3過程が知られており、窒素固定はマメ科植物に感染し根粒を形成して共生する窒素固定菌が良く知られており、空気中の窒素からアンモニアを生成する。硝化はアンモニアをアンモニア酸化バクテリア（ammonia oxidizing bacteria 以下 AOB）が亜硝酸に酸化し、引き続き亜硝酸酸化バクテリア（nitrite oxidizing bacteria 以下 NOB）が亜硝酸を硝酸にまで酸化する。脱窒（硝酸還元）は脱窒菌により硝酸が最終的には分子状窒素にまで還元される（図1）。

人間との直接的な関りという点では、日本では遡ること戦国時代あたり、いわゆる火縄銃が多用され始めたころ、その火薬はどのように作られていたかという、さまざまな説はあるものの、以下の方法が一つの有力な説と考えられているようである。火薬原料として用いられていたのは硝石と呼ばれた硝酸カリウムである。土壌中の有機物や人間を含む動物の排泄物中の尿素やそれから派生するアンモニア

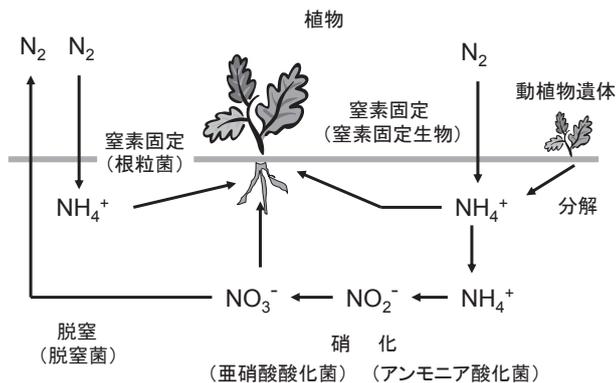


図1 微生物の関わる自然界での窒素循環

などの窒素化合物が、後で述べる自然環境下に棲息する硝化微生物である、アンモニア酸化バクテリアや亜硝酸酸化バクテリアが関与する分解過程で硝酸イオンに酸化され、カリウムイオンとの塩形成によって得られたと考えられている。ただし、硝酸カリウムは水溶性であるがゆえに降雨によって拡散したり、窒素源として植物にも利用されたりするため、硝石の製造や採取はこれらの条件が排除され得る乾燥地帯や床下や蔵の土間などの土により行われていた。

II. 硝化微生物

前項で述べた通り、硝化微生物には硝化の前段を担うAOBと後段を担うNOBとが存在することが広く知られている。いずれも二酸化炭素を炭素源として、窒素化合物（前者はアンモニア、後者は亜硝酸の酸化によりエネルギーを獲得する化学合成独立栄養バクテリアである（表1）。

AOBは分類上βプロテオバクテリアである*Nitrosomonas*、*Nitrosospira*、*Nitrosovibrio*、γプロテオバクテリアである*Nitrosococcus*の4属が知られており、アンモニアモノオキシゲナーゼ（ammonia monooxygenase : AMO）がアンモニアをヒドロキシルアミンに、引き続きヒドロキシルアミンオキシ

ドレクターゼ（hydroxylamine oxidoreductase : HAO）により亜硝酸へ酸化される。一部の菌株はウレアーゼを持っており、尿素をアンモニアに変換する能力も持っている（図2 A）。

アンモニア濃度の比較的高い環境（下水、堆肥、高濃度に施肥された耕地等）に棲息する*Nitrosomonas*属、低濃度アンモニア環境（淡水域、未耕地土壌等）に棲息する傾向がある*Nitrosospira*属、海水域、植物根圏（陸生、水生）等々多様な生息環境に分布している。

2005年にKönnekeらにより、初めて独立栄養性のアンモニア酸化アーキア（ammonia oxidizing archaea 以下AOA）が水族館の水槽から分離された²⁾ことは非常に大きなトピックであった。それ以降、各種環境からAOAが分離され始め、それまで長らく「環境中のアンモニア酸化はAOBによって担われている」というのが定説であったが、AOAの存在とそのアンモニア酸化能が無視し得ない量であることが明らかとなってきている。

NOBは分類上αプロテオバクテリアの*Nitrobacter*、γプロテオバクテリアの*Nitrococcus*、ニトロスピラ門ニトロスピラ綱の*Nitrospira*が知られており、亜硝酸酸化酵素により亜硝酸が硝酸に酸化される（図2 B）。一般的な環境からは*Nitrobacter*属

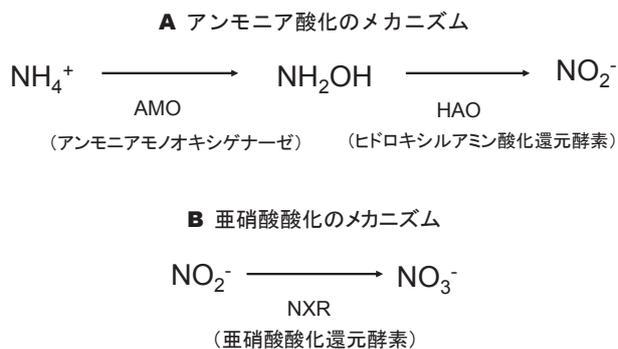


図2 硝化微生物の硝化過程の概要

A: アンモニア酸化のメカニズム B: 亜硝酸酸化のメカニズム

表1 微生物の炭素源とエネルギー源による区分

	炭素源	エネルギー源
独立栄養性細菌	光合成細菌 化学合成細菌	二酸化炭素 光 無機化学物質
従属栄養性細菌	光合成細菌 化学合成細菌	有機炭素化合物 光 有機物

が優占的に生息していると考えられている。AOBよりは生育環境の至適 pH 範囲が狭いと考えられており、AOB と NOB の活性のアンバランスから古くからビニールハウス内のアンモニアガス、亜硝酸ガス蓄積事故の原因となる現象も生じている。

「完全なアンモニア酸化 (complete ammonia oxidation ; comammox)」を行う NOB の 1 群である *Nitrospira* 属の細菌が発見され、従来型の AOB と NOB が連携して構築していたアンモニアから硝酸への硝化を、単独の 1 菌種のみによって成立させることが見出され、これも大きなトピックであった。この菌のゲノムは、アンモニア酸化経路と亜硝酸酸化経路の双方をコードしており、この両経路は、アンモニアから硝酸への酸化に伴い同時に発現されることが示された³⁾。

また、近年になって、嫌気性アンモニア酸化 (anaerobic ammonium oxidation : Anammox)⁴⁾ が注目されており、下水処理の分野での応用が期待されている。従来型の硝化脱窒法では、硝化過程で大量の酸素供給 (曝気) に係るエネルギーコスト、脱窒過程でメタノール等の有機物の添加と大量の余剰汚泥発生がネックとなる場合が多い。Anammox 法では Anammox 菌 (現在までに種々の菌株が見出されている: 従来の AOB、NOB とは全く異なる菌) を使用することにより上記のデメリットが生じない (副生物として硝酸の発生が増加する)。系全体のコントロールが難しい側面があるが、一部の自治体の下水処理事業等で採用されつつあり、今後のさらなる改良と応用が期待される。その他にも各自治体や各地の下水道公社等では、多孔質担体を利用した新しい機構の下水処理システムを積極的に導入している例も多く見受けられるようになっている。

また、硝化微生物は植物の生育における窒素源の供給者として、植物との関係性も古くから研究されている。中でも硝化微生物の有害菌としての関わりも無視できない。ただし、有害菌といっても病害を発生させるというようなことではなく、次のようなメカニズムである。畑作物等の植物にとってはアンモニアより硝酸の方が利用しやすいが、土壌はマイナスの荷電をもつため、アンモニアは土壌中に留まることができるのに対して、硝酸は速やかに流亡する。そのため、窒素肥料はほとんどがアンモニア態で施用される。ところがアンモニア態窒素は AOB

にとってもエネルギー源であるため、せっかく施肥した窒素肥料が作物に吸収されるより前に硝化微生物により硝酸まで酸化され、流亡し、最終的に地下水の硝酸汚染の原因となってしまう。この現象は、日本国内では江戸時代から茶栽培の盛んだった地域で起こっていた。これを防ぐために、土壌中の硝化微生物 (主に AOB) の生育を抑制するための硝化抑制剤の施用や、硝化が起こりにくく、土壌中に長く残留できるように加工した尿素などの緩効性肥料などが用いられている。このように状況によって有益菌や有害菌となり、両面性を持つ硝化微生物は後述べる環境浄化の場面においてもきわめて重要な存在である。

Ⅲ. 硝化微生物の純粋分離と培養

ここまで述べてきた硝化微生物は、大腸菌や乳酸菌、納豆菌 (枯草菌) 等の有機物を利用して生育する従属栄養細菌と異なり、自然界からの純粋分離やその培養については少々困難が伴う。現在では、分子生物学的手法により培養が不可能な微生物についてもその存在や分布が明らかとなり、菌種の同定も可能となっている。しかしながら、純粋分離した培養菌体を用いないと解明できない生理・生態、分類学的研究は重要であり、培養菌体はその機能等の応用化においても重要であることは言うまでもない。

独立栄養細菌生育が緩慢で生育菌体量が少ないものが多いが、AOB、NOB は倍加時間が 8 ~ 24 時間⁵⁾ であり、10L、1 週間程度の培養で得られる菌体は 0.5g 程度である。また、従属栄養細菌等の純粋分離で多用される希釈平板法では、硝化微生物は寒天を用いた平板培地でのコロニー形成はほとんど認められないため、著者らは集積培養を含めて最短 1 か月程度でコロニーを形成させることに成功し純粋分離菌株を得られるまでになった^{6,7)}。

硝化微生物のうち AOB の培養においては、自らが生成した亜硝酸により pH の低下を生じ、酸性化によるダメージにより生育活性が低下する。それを回避するために、かつてはリン酸塩や炭酸カルシウム等を pH 緩衝剤として用いていたが、かえって高濃度のリン酸による生育阻害や、不溶性の炭酸カルシウムの沈殿が、培養後の菌体回収に障害を起こすなどの理由により好ましくないことが認識されて

いた。その後、これらの問題点を解決するために Good's 緩衝剤、特に AOB の生育至適 pH 付近に緩衝域をもつ HEPES (2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid) が広く用いられている⁸⁾ (表 2)。HEPES を用いた完全無機塩培地による集積培養を経て、純粋分離菌株を得るには、MPN (最確値) 法を使った限外希釈法⁹⁾、密度勾配¹⁰⁾、寒天平板¹¹⁾ などの様々な方法により行われ、セルソーターなどによる単一細胞分取¹²⁾ による純粋分離法も検討されてきた。

純粋分離菌株は平板培養で生育した単一コロニーから獲得した菌株のことであり、微生物の分離法のなかで R. Koch が考案した平板希釈法は古典的方法として扱われているにもかかわらず、微生物分離の過程で誰もが手軽に実施できる簡便な方法として現在も多用され、この方法を凌駕するものは出現していない。この点は著者らが硝化微生物の分離において、S. Winogradsky が希釈平板法によって最初に成功させたことに従い、達成できた理由であった。ただし、前述のように古くから寒天を用いた平板培地上では硝化微生物のコロニーが形成されないことは周知の事実であったが、著者らは AOB の純粋分離においてゲランガムをゲル化剤として使用することによって、釣菌可能な直径 0.5 ~ 1.0 mm 程度の赤色透明なコロニーを形成させることに成功した^{6, 13)}。それ以来、我々の研究室ではこの方法により、卒業研究の学生によって毎年多数の純粋分離菌株が得られており、新規に純粋分離した硝化微生物は AOB、NOB 合わせて複数の属にわたり百数十株を超えており、一部は NBRC (製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター: NITE Biological Re-

source Center) への菌株供託に至っている。これらの多種多様な純粋培養菌株の分離によって、今までごく限られた菌株のみで行われていた培養菌体を使用した硝化微生物の生理・生化学、分類学的研究に飛躍的な展開をもたらすに至った。最近では堆肥生成過程の分離源から、高濃度のアンモニア分解能を有する *Nitrosomonas stercoris* KYUHI-S 株を分離し、新種登録、全ゲノム解析に至った^{14, 15)}。

なお、AOA については依然として固形培地上でのコロニー形成は困難であり、MPN 法等により純粋化を試みるケースが多く、著者らが国内沿岸の海草 (アマモ) 生育地の海底から純粋分離した AOA も MPN 法によるものであった¹⁶⁾。また、微好気性であるものが多く認められ、その酸素供給のコントロールに培養上注意が必要である。

IV. 硝化微生物の菌株保存

硝化微生物について特に単一菌の研究が制限される大きな理由の 1 つに、菌株を安定に長期間保存することがきわめて難しいことがあげられる。他の微生物でももちろんであるが、いかに長期間にわたって菌株を安定に保存できるかということは硝化微生物にとっては非常に重要な解決すべき大きな課題である。

液体培養を基本とする硝化微生物は、数日ごとに液体培養を継代することが菌株を保存するためのもっとも確実な方法であるが、頻繁な継代は変異や雑菌混入の影響を受けやすく手間もかかるため、長期間の菌株維持には適していない。一般的に多くの微生物の保存は凍結乾燥によって行われ、各研究機関に分譲されている。硝化細菌の場合、凍結乾燥による保存および復元は行われてはいるが¹⁷⁾、菌株によっては安定な保存を行うことが困難であるため、硝化微生物の一般的な保存法としてまだ普及する段階には至っていない。世界最大の生物材料バンクである ATCC (American Type Culture Collection) をはじめ、*Nitrosomonas* 属菌には 10 ~ 15% のグリセロール溶液に菌体を懸濁させ、液体窒素や -80°C での凍結保存が行われている¹⁸⁾。その他の硝化微生物でも凍結乾燥標品が分譲されてはいるが、その品質は不安定であり、復元を試みても生育しないことが少なくない。著者らの試みでは現在のところ、硝化

表 2 HEPES 培地の組成

HEPES	11.92 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
NaHCO ₃	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5mg
EDTA-Fe (III)	1mg
bromothymol blue solution ^a	5mL
trace elements ^b	5mL

up to 1000 mL of deionized water.

The pH of the HEPE medium was adjusted to 8.2±0.2.

^a bromothymol blue 1 mg mL⁻¹, Na₂HPO₄ 945 mg mL⁻¹, and K₂PO₄ 0.49 mg mL⁻¹ in deionized water

^b NaMoO₄·2H₂O 10 mg, MnCl₂·4H₂O 20 mg, CoCl₂·6H₂O 0.2 mg, CuSO₄·5H₂O 2 mg, ZnSO₄·7H₂O 10 mg, FeSO₄·7H₂O 770 mg, and EDTA·2Na 1.03 g in 1,000 mL of deionized water.

細菌の長期間保存には菌体懸濁液を超低温下でシリカゲル粉末に吸着させるシリカゲル冷凍保存法が適しており、10年間以上の長期にわたる保存に成功している（未発表）。

このように研究室内では長期間保存の実績があるが、常時 -80°C の超低温保存が必要であり、停電が発生する非常時や災害時にも対応し得るバックアップストックを蓄える必要性や、輸送中の温度変化によって復元が不能になることもあるため、国内外を問わず菌株の分譲には困難が伴い課題が残っている。菌株の安定保存および供給ができるようにするために、現在は保存後の温度変化に安定な凍結乾燥法および担体を利用した保存法の改良、様々な添加剤の試用や複数の保存法の組み合わせなど、試行錯誤を重ねて期待できる結果が得られつつある。

V. 環境浄化と硝化微生物

アンモニアは生活廃水・都市下水や家畜糞尿をはじめとする種々の有機性廃棄物の厩・堆肥化に伴い発生する悪臭の主な成分であり、自治体等の法規制により悪臭の環境中への漏えい防止やその除去が義務づけられている。そのためAOBは都市下水処理場や汚水処理槽、養豚・養鶏場におけるアンモニアの脱臭装置などにおいても利用されるなど、生活環境の維持に役立っている。

著者が養鶏場の脱臭装置から分離した菌株は高濃度のアンモニアを酸化する能力を有していた⁸⁾。また、冬場のアンモニア酸化能力が低下する寒冷地での脱臭装置から分離したAOBは低温でのアンモニア酸化に適応する傾向を示した¹⁹⁾。その菌株の電子顕微鏡写真を図3に示した。さらに我々の最近の知見では、比較的新しいタイプである前述した担体を利用する方式の都市下水処理場の処理層内の微生物菌群構造解析において興味深い知見が得られている²⁰⁾。

地球環境にとって、硝化微生物は、窒素循環の担い手として、二酸化炭素の消費者として、また、下水処理施設での水質浄化への貢献等プラスとなる側面がある一方、植物への窒素減の供給の観点ではプラスマイナスの両面があることを前述した。さらに硝化微生物にはまた別のマイナスの一面もあることが知られるに至った。温室効果ガスの一つで、二酸

化炭素よりもその影響が大きいと考えられている亜酸化窒素(N_2O)が硝化と脱窒の過程で発生することが突き止められた²¹⁾。

硝化過程では、アンモニア酸化の前段ヒドロキシルアミンが生じるが、これが N_2O に酸化される。また、脱窒過程では亜硝酸、一酸化窒素、亜酸化窒素と還元が進み、亜酸化窒素を還元する亜酸化窒素還元酵素の活性が低下すると亜酸化窒素は放出される(図4)。水処理プロセスにおける N_2O 生成は、AOB、NOB、脱窒細菌のいずれも行うことが明らかにされているが、特に主要な経路はAOBによる亜硝酸の好気脱窒であるとされている²⁰⁾。

基本的に農耕地では、窒素肥料の施用が発生を促進傾向に傾かせると考えられており、酸性環境では硝化過程が進行し、弱い還元状態では脱窒過程が進み、それぞれ N_2O の発生を生じさせる。水田において十分な還元状態である湛水時には、脱窒過程が最後まで進行して窒素生成に至る。

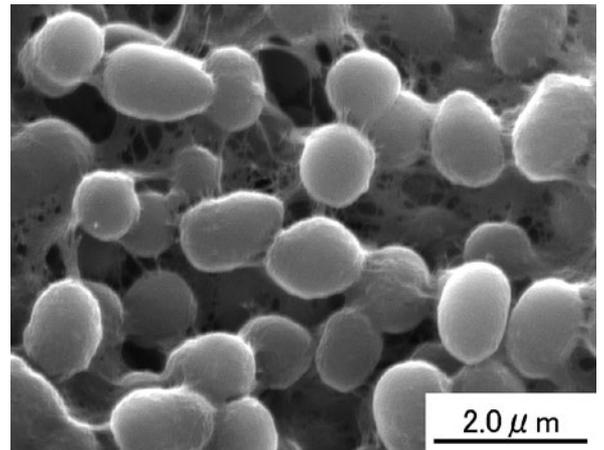


図3 寒冷地(岩手県)に設置された養鶏場の脱臭装置から分離された*Nitrosomonas* sp. IWT514株の走査型電子顕微鏡写真

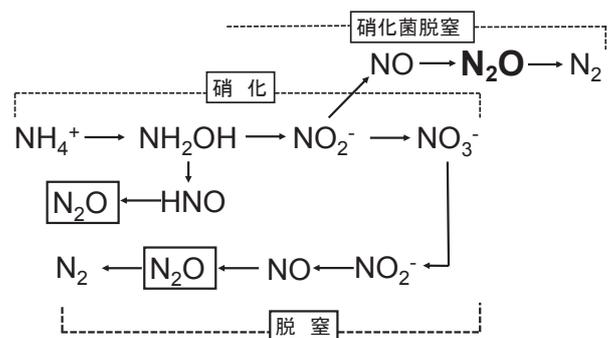


図4 硝化微生物、脱窒微生物が関与する N_2O 発生

おわりに

硝化微生物はマクロな視点では地球環境の維持に大きくかかわっており、身近なところでは我々の生活から出る環境負荷物質の変換に関わっている重要な菌種である。硝化微生物についてその培養を中心に述べてきたが、他の微生物と同様に研究の主流はメタゲノム解析等にその主軸を移してきていることは言うまでもない。ただし、微生物学研究において、単一の菌体をとらえてそれを対象に研究を進めるという点はパスツールの時代から現在においてもなお変わることのない重要な観点のひとつである。また難培養性微生物の1つとして、著者らをはじめ、硝化微生物研究者のたどってきた道のりの一端を知っていただき、この微生物に興味を持っていただければ著者の大きな喜びである。

文 献

- 1) Winogradsky S. Recherches sur les organismes de la nitrification. Annales de l'Institut Pasteur. 1890; 4: 213-231, 257-275, 760-771.
- 2) Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J E et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature. 2005; 437: 543-546.
- 3) Daims H, Lebedeva E V, Pjevac1 P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. Nature. 2015; 528: 504-509.
- 4) Mulder A., Van de Graaf A A, Robertson L A, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. FEMS Microbiology Ecology. 1995; 16: 177-184.
- 5) Watson S W, Valois F W, Waterbury J B, "The prokaryotes", Springer-Verlag Berlin, ed. by Balows A, Schlegel H G, 1981, pp.1005.
- 6) Takahashi R, Kondo N, Usui K, et al. Pure isolation of a new chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium on Gellan Gum plate. Journal of Fermentation and Bioengineering. 1992; 74: 52-54.
- 7) Tokuyama T, Mine A, Kamiyama K, et al. *Nitrosomonas communis* strain YNSRA, an ammonia-oxidizing bacterium, isolated from the reed rhizoplane in an aquaponics plant. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2004; 98: 309-312
- 8) Hatayama R, Chiba K, Noda K, et al. Characteristics of a high-concentration-ammonium sulfate-requiring ammonia-oxidizing bacterium isolated from deodorization plants of chicken farms. Journal of Bioscience and Bioengineering. 1999; 87: 245-248.
- 9) Jiang Q Q, Bakken L R, Comparison of *Nitrospira* strains isolated from terrestrial environments. FEMS Microbiology Ecology. 1999; 30: 171-186.
- 10) Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, et al. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. Archives of Microbiology. 1995; 164: 16-23.
- 11) Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, et al. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. Applied and Environmental Microbiology. 1998; 64: 3042-3051.
- 12) Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von Caron G, Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. FEMS Microbiology Reviews. 2000; 24: 429-448.
- 13) Tomiyama H, Ohshima M, Ishii S, et al. Characteristics of newly isolated nitrifying bacteria from rhizoplane of paddy rice. Microbes and Environments. 2001; 16: 101-108.
- 14) Nakagawa T, Takahashi R, *Nitrosomonas stercoris* sp. nov., a chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium tolerant of high ammonium isolated from composted cattle manure. Microbes and Environments. 2015; 30: 221-227.
- 15) Nakagawa T, Tsuchiya Y, Takahashi R. Whole-genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas stercoris* type strain KYUHI-S, isolated from composted cattle manure. Microbiology Resource Announcements. 2019;8/ 34, e00742-19
- 16) Matsutani N, Nakagawa T, Nakamura K, et al. Enrichment of a novel marine ammonia-oxidizing archaeon obtained from sand of an eelgrass zone. Microbes and Environments. 2011; 26: 23-29.
- 17) Satoh K, Tanaka T, Oguro Y, et al. Improvement of preservation method for ammonia-oxidizing bacteria by freeze-drying. Soil Science and Plant Nutrition. 2004; 50: 777-781.
- 18) Ensign S A, Hyman M R, Arp D J, In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. Journal of Bacteriology. 1993; 175: 1971-1980.
- 19) Satoh K, Takizawa R, Sarai M, Two kinds of ammonia-oxidizing bacteria isolated from biologically deodorizing plants in cold district. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2004; 98: 207-210
- 20) Tsuchiya Y, Nakagawa T, Takahashi R, Quantification and phylogenetic analysis of ammonia oxidizers on biofilm carriers in a full-scale wastewater treatment plant. Microbes and Environments. 2020;35/2,ME19140 (doi:10.1264/jsme2.ME19140)
- 21) Remde A, Conrad R, Production of nitric oxide in *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrite. Archives of Microbiology. 1990; 154: 187-191.