

## 嫌氣的メタン酸化脱窒反応を担う微生物群集の集積培養

長岡技術科学大学 ○学生会員 木村晶典  
 正会員 幡本将史, 高橋優信, 山口隆司  
 阿南工業高等専門学校 正会員 川上周司  
 長岡工業高等専門学校 正会員 荒木信夫

## 1. はじめに

嫌気環境下においてメタン酸化反応の電子受容体として硝酸, 亜硝酸を用いる微生物が注目を集めている<sup>1,2)</sup>. この嫌氣的メタン酸化脱窒反応を担う微生物はNC10という門レベルで未培養な系統分類群に属する細菌 (NC10バクテリア) であると報告されている<sup>1)</sup>. 近年NC10バクテリアの集積培養系をもととしたゲノム解析が行われ, NC10バクテリアはメタン酸化脱窒反応において中間体として亜酸化窒素を生成しないことが示唆された<sup>2)</sup>. したがって, 本反応を嫌気廃水処理へ適用できればメタンを電子供与体とした, 亜酸化窒素の排出が無い温室効果ガス排出低減型脱窒プロセスとなり得るものである. しかしながら, 本反応を担うとされるNC10バクテリアの分離例は未だに報告されておらず, 最適な培養条件等の基礎的情報が不足しているのが現状である.

そこで本研究では嫌氣的メタン酸化脱窒の基礎的な情報収集を目的として, NC10バクテリアの集積培養実験を行った. 培養を行うにあたり水田土壌を対象に菌叢解析を行い, NC10バクテリアを確認した土壌サンプルを植種源に使用した. また本反応に関わる電子受容体の影響を調査するため, 添加する窒素源を亜硝酸, 硝酸とした培養をそれぞれ行った. さらに, 集積培養を行った汚泥に対しFluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法によるNC10バクテリアを標的とした菌叢解析を行った.

## 2. 実験方法

## (1) DNA 抽出, PCR, クローニングおよび分子系統解析

水田土壌からのDNA抽出にはFastDNA SPIN Kit for Soilを使用した. 抽出したDNAをテンプレートとして, NC10バクテリアの16S rRNA遺伝子を標的としたプライマーセットを用いてPCR増幅を行った. 使用したプライマーはBac8Fmix, NC10-1043R, NC10-202FおよびUNIV1492Rであり, PCRの反応条件は既報に準じた<sup>2)</sup>. 増幅産物は精製後, TOPO TA Cloning kitを用いてクローンライブラリーを作成し塩基配列の解析を行った. 得られた塩基配列は, BLAST searchにより相同性検索を行った後にARBプログラムを使用し分子系統解析を行った.

## (2) 培養方法

メタン酸化脱窒微生物の培養法には連続培養を採用し, 容積255 cm<sup>3</sup>の円筒形ガラスカラム内部に汚泥保持担体として9 cm×5 cm×1 cmのスポンジを2個配置したバイオリクターを用いた. 基質には既報<sup>1)</sup>に従い無機合成培地用い, 窒素源の濃度は0.5 mMとし, 運転温度は30°Cとし上向流で流入させた. HRTは実験190日目までは4.2時間とし, 以降は送液チューブより混入する酸素の影響を低減するために2.1時間に短縮した. 基質はメタンガスでパージを行い, 嫌気状態にすると共にメタンを飽和濃度まで溶存させた.

## (3) FISH法によるNC10バクテリアの検出

NC10バクテリアのFISH法による検出には, NC10バクテリアの16S rRNA遺伝子を標的としたDNAプローブであるDBACT-0193, DBACT-0447, NC10-1162, およびバクテリアに特異的なDNAプローブであるEUB338を使用した. 各DNAプローブにはAlexa488あるいはAlexa555を蛍光標識として付加した.

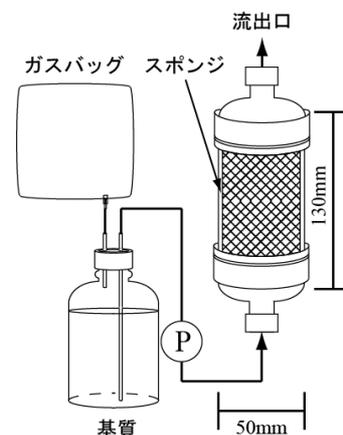


図1 実験装置概要

キーワード 嫌氣的メタン酸化, 脱窒, NC10バクテリア, 集積培養

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学大学院環境システム工学専攻 TEL 47-1611-6646

### 3. 結果

#### (1) 分子生物学的手法による植種底泥の解析

NC10 バクテリアの存在する水田土壌を植種源とするため、NC10 バクテリアの 16S rRNA 遺伝子を標的としてクローン解析を行った。その結果、2 か所の土壌より NC10 門に属する細菌の存在が確認された (図 2: clone A, B, C)。本研究で得られたクローン配列は、Ettwig ら<sup>1)</sup>が農業用排水路の堆積物中の微生物より検出した NC10 門に属する細菌の 16S rRNA 遺伝子配列と近縁であり、95%程度の相同性を示した。そこで、NC10 バクテリアの存在を確認した土壌の混合物を植種源に用いて、集積培養を行うこととした。

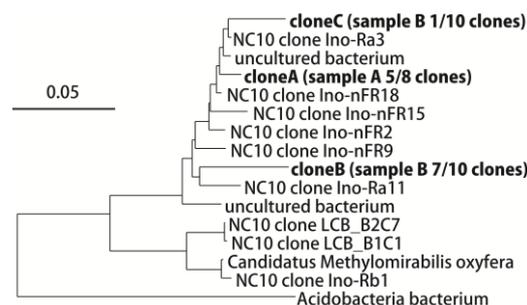


図 2 水田土壌から検出された NC10 門に属する細菌および近縁種の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹

#### (2) 集積培養結果

集積培養実験における亜硝酸、硝酸の消費量の経日変化を図 3 示す。本実験では HRT を 4.2 時間とした期間を Phase 1, HRT4.2 時間でビタミンを添加した期間を Phase 2, HRT2.1 時間に短縮し還元剤 (塩化チタン) を添加した期間を Phase 3 とした。亜硝酸を窒素源としたリアクターでは窒素消費量は Phase 1 : 0.42, Phase 2 : 1.14, Phase 3 : 1.94 mmol/L/day と段階的な増加が確認された。その一方、硝酸を添加したリアクターの窒素消費量は Phase 1 : 0.48, Phase 2 : 0.39, Phase 3 : 1.14 mmol/L/day と亜硝酸添加リアクター程の窒素消費量の変化は確認できなかった。Hu らは、NC10 バクテリアは硝酸より亜硝酸を優先して電子受容体に用いると報告している<sup>3)</sup>。本実験においても硝酸より亜硝酸の消費量が多く、亜硝酸のほうが嫌氣的メタン酸化脱窒反応の電子受容体に適していることが示唆された。

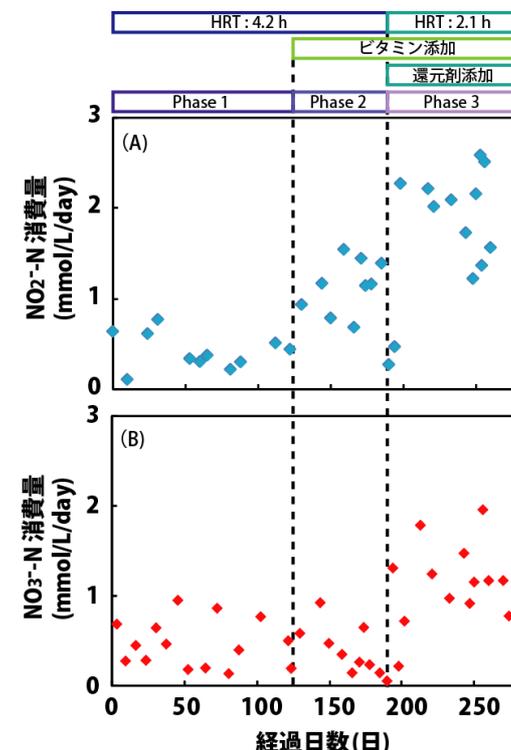


図 3 連続培養系における亜硝酸 (A)、硝酸 (B) の消費量

#### (3) FISH 法による NC10 バクテリアの検出結果

培養開始 270 日の汚泥をサンプルとし、FISH 法を用いて NC10 バクテリアの検出を試みたところ、両リアクターともに NC10 バクテリアの存在を確認できた。現在のところ NC10 バクテリアの一種である“*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”のゲノム解析結果から、NC10 バクテリアは亜硝酸を利用してメタンを酸化すると考えられており、また、既報において硝酸は古細菌により亜硝酸へ還元されてから NC10 バクテリアによって消費されることが示唆されている<sup>3)</sup>。したがって、本研究において硝酸の消費速度が亜硝酸より低いのは、硝酸がメタン酸化へ使用される際に亜硝酸へ還元される工程を経るためではないかと考えられる。

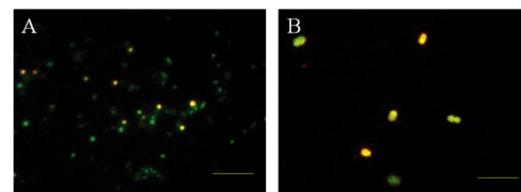


図 4 FISH 法による培養 270 日目における亜硝酸添加リアクター (A)、硝酸添加リアクター (B) の NC10 バクテリア検出結果 ; DNA プローブ, EUB338 I - III (緑), DBACT - 0193, DBACT - 0447, NC10 - 1162 (赤), NC10 バクテリアは黄で蛍光

#### 4. まとめ

NC10 バクテリアを検出した水田土壌を植種源とし、亜硝酸、硝酸を添加し集積培養を行った結果、亜硝酸を添加した培養において顕著な脱窒反応を確認した。培養サンプルの菌叢解析結果より、添加した窒素源の差異に関わらず NC10 バクテリアの存在が確認できたが、嫌氣的メタン酸化脱窒反応の進行には亜硝酸を電子受容体としたほうが顕著な反応を示すことが示唆された。

#### 参考文献

- 1) Ettwig, K. F. et al., (2009) *Environmental Microbiology*, **75**, 3656-3662. 2) Ettwig, K. F. et al., (2010) *Nature*, **64**, 543-550.  
3) Hu, S. et al., (2009) *Environmental Microbiology Reports*, **1**, 377-384.