

嫌氣的メタン脱窒反応を担う微生物の集積とその微生物群集解析

長岡技術科学大学 学生会員 ○小泉真登, 木村晶典
 正会員 幡本将史, 中村明靖, 山口隆司
 東北大学 正会員 高橋優信

1. はじめに

嫌氣的メタン酸化脱窒微生物は、硝酸、亜硝酸をメタン酸化の電子受容体として用いて脱窒を行う微生物であり、その反応経路は、一般的な脱窒の中間体である亜酸化窒素を経由しない新規な脱窒反応であると推定されている¹⁾。従って本微生物を用いる事で亜酸化窒素の排出がない新規な脱窒プロセスを構築できる可能性がある。この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であると報告されている²⁾。しかしながら、嫌氣的メタン脱窒微生物の分離例の報告は未だに無く、集積培養やその菌叢解析の報告例も少ない。よって、今後嫌氣的メタン脱窒反応を新たに排水処理等に適用していくためにも、さらなる情報の蓄積が必要である。

そこで本研究では、NC10 門に属する嫌氣的メタン脱窒微生物の存在を確認した水田土壌のバッチ培養を行い、16S rRNA と *pmoA* 遺伝子を標的とした解析を行った。また以前の研究で嫌氣的メタン脱窒微生物の集積培養を行った連続培養リアクター³⁾の菌叢解析も行い、それらの比較を行うことで嫌氣的メタン酸化脱窒微生物群集に与える電子受容体や培養方法による影響を調査した。

2. 実験方法

2. 1. DNA 抽出, PCR, クローニング, 分子系統解析

DNA の抽出には Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を使用した。抽出した DNA をテンプレートとして、細菌及び古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーセット (細菌: EUB338F - UNIV1492R, 古細菌: Arc109F - UNIV1492R), 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 (NC10 - 202F, UNIV1492R), 及び *pmoA* 遺伝子を標的としたプライマーセット (A189bF, cmo682F, cmo182F 及び cmo568R) を用いて PCR 増幅を行った。PCR の反応条件は既報に準じた¹⁾。増幅産物は精製後、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) を用いてクローンライブラリを作成し塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列は RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) の Classifier program 及び ARB プログラムを使用して解析した。

2. 2. バッチ培養

容量 720 ml のバイアル瓶を用い、気層部をメタンで充填し 30°C の振とう器内で培養を行った。植種は連続培養と同じ水田土壌を使用した。水田土壌由来の有機物を利用した脱窒の影響を排除するための前培養を行い、メタンの消費が確認された後に培養実験を開始した。培地は既報¹⁾に従い無機合成培地を用いた。投入する電子受容体の違いが培養におよぼす影響を調べるため、亜硝酸および硝酸をそれぞれ別々に用いた実験系を用意し、各濃度は 1.0 mM とした。上記の条件で培養を行ったところ嫌氣的メタン酸化反応が顕著に見られたため、培養 115 日目に継代培養を行い、継代培養開始から 219 日後にサンプリングを行った。

2. 3. 解析に用いた連続培養リアクターサンプル

連続培養には、容積 255 cm³ の円筒形ガラスカラム内部に汚泥保持担体とした 9 cm×5 cm×1 cm のスポンジを 2 個配置したバイオリアクターを用いた。植種源には水田土壌を使用した。運転温度は 30°C とし上向流で流入させ、基質にはバッチ培養と同じ培地を用い、窒素源の濃度は 0.5 mM とした。また、基質はアルゴンおよびメタンガスでそれぞれパージを行い、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。バッチ培養と同様に硝酸および亜硝酸をそれぞれ別々に供給し、培養開始後 513 日目に汚泥を採取し解析に用いた。

キーワード 嫌氣的メタン酸化, 脱窒, NC10 バクテリア, バッチ培養

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 環境・建設 TEL 0258-47-9642

3. 結果

3. 1. 連続培養およびバッチ培養の結果

連続培養の結果、亜硝酸リアクターは培養 100 日付近から、硝酸リアクターは培養 300 日付近から、亜硝酸及び硝酸の除去率が増加し始め、それぞれ最終的に 76.8%, 65.2%の除去率を示した。一方、バッチ培養の結果、それぞれの培養系では電子受容体の減少に伴う溶存メタンの減少が確認された。特に培養 200 日以降(図 1) では理論値に近いメタンと硝酸・亜硝酸の消費を確認したことから、嫌氣的メタン酸化脱窒反応が発生している事が考えられた。亜硝酸を基質とするバッチ培養の亜硝酸消費速度は硝酸を用いたバッチ培養の硝酸消費速度よりも小さいものであった。

3. 2. バッチ培養サンプルの菌叢解析

嫌氣的メタン酸化脱窒反応を確認したバッチ培養サンプルにおける微生物叢を調査するため、*pmoA* 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いてクローン解析を行った。その結果、それぞれ 3 種のクローンが確認された。それぞれのクローンは嫌氣的メタン脱窒微生物として知られている “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*” の *pmoA* 遺伝子配列と 90-93%程度の相同性であった。また、植種源として用いた水田土壌より検出されたクローン配列とも 90%程度の相同性であった。

細菌の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った結果(表 1), 硝酸を用いたバッチ培養では脱窒細菌が検出されたが、亜硝酸を用いたバッチ培養では、既存の系統分類群に属さない微生物が多数を占めた。従って、電子受容体が違うことによって菌叢が変化することが考えられた。

3. 3. 連続培養サンプルの菌叢解析

バッチ培養サンプルと比較を行うため、連続培養 513 日目の汚泥サンプルの *pmoA* 遺伝子のクローン解析を行った。その結果、硝酸を用いたリアクターからは 3 種類、亜硝酸を用いたリアクターからは 2 種類のクローンが検出され、うち 1 つが優占的(10 クローン中 9 クローン)に検出された。また、両培養系から検出されたクローンは全て、既報の嫌氣的メタン脱窒微生物の集積培養系から採取されたクローンと 90%程度の相同性を示した。

4. まとめ

本研究では培養方法が異なる 4 つの嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養系を用い、*pmoA* 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子を標的とした菌叢解析を行った。その結果、電子受容体や培養方法によって優占種が変化し、形成される微生物叢が変化することが考えられた。今後はさらに詳細な微生物解析を行い、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物群集に与える電子受容体や培養方法の影響を明らかにする予定である。

参考文献

- 1) Ettwig, K. F. *et al.*, (2010) *Nature*, 64, 543-550.
- 2) Ettwig, K. F. *et al.*, (2009) *Environmental Microbiology*, 75, 3656-3662.
- 3) 木村晶典 他, (2011) 土木学会論文集 G (環境), 67, III_277-III_28

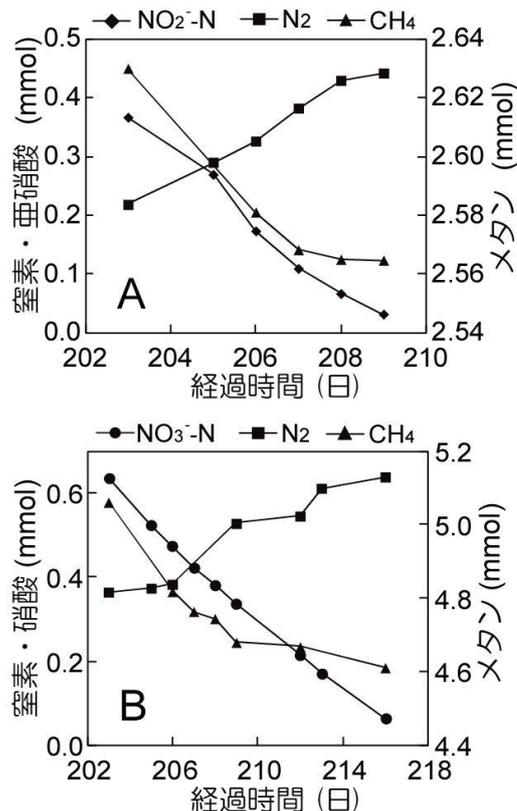


図 1 バッチ培養における硝酸，亜硝酸，メタンの消費量およびメタンの生成量. A が亜硝酸を，B が硝酸を基質とした培養系.

表 1 亜硝酸，硝酸を基質としたバッチ培養から検出された細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統分類

Phylogenetic group	クローン数 (%)	
	亜硝酸	硝酸
<i>Acidobacteria</i>		
<i>Holophagae</i>	0	1 (1.1%)
<i>Actinobacteria</i>		
<i>Actinobacteria</i>	1 (1.3%)	0
<i>Armatimonadetes</i>	0	9 (9.8%)
<i>Bacteroidetes</i>		
<i>Bacteroidia</i>	3 (3.8%)	0
<i>Chlorobi</i>		
<i>Ignavibacteria</i>	16 (20.0%)	0
<i>Chloroflexi</i>		
<i>Anaerolineae</i>	4 (5.0%)	1 (1.1%)
<i>Firmicutes</i>		
<i>Clostridia</i>	1 (1.3%)	1 (1.1%)
<i>Bacilli</i>	0	1 (1.1%)
<i>Gemmatimonadetes</i>		
<i>Gemmatimonadetes</i>	0	2 (2.2%)
<i>Proteobacteria</i>		
<i>Alphaproteobacteria</i>	1 (1.3%)	4 (4.3%)
<i>Betaproteobacteria</i>	32 (40.0%)	29 (31.5%)
<i>Deltaproteobacteria</i>	6 (7.5%)	0
<i>Gammaproteobacteria</i>	1 (1.3%)	1 (1.1%)
unclassified <i>Bacteria</i>	12 (15.0%)	30 (32.6%)
other	3 (3.8%)	13 (14.1%)
total	80 (100%)	92 (100%)