

(81) 低級脂肪酸がAnammox細菌の異化・同化代謝に与える影響

栗田 貴宣^{1*}・金田一 智規¹・尾崎 則篤¹・大橋 晶良¹

¹広島大学大学院工学研究科社会環境システム専攻 (〒739-8527広島県東広島市鏡山1-4-1)

* E-mail: m081540@hiroshima-u.ac.jp

本研究は、消化脱離液中に含まれる可能性が高い有機物質である酢酸とプロピオン酸、さらに分子量の比較的小さいギ酸を対象として、有機物質がAnammox細菌の活性に及ぼす影響をAnammox細菌の異化代謝と同化代謝の観点から評価した。ギ酸は10 mMの濃度でAnammox細菌の異化代謝及び同化代謝の活性に阻害影響を示した。酢酸、プロピオン酸は50 mMの濃度においてもAnammox活性に阻害影響を与えなかった。回分試験に用いたバイオマス内には16S rRNA遺伝子の系統解析では、検出されたクローンは2つのグループに分類でき、*Candidatus "Brocadia"* に属し、相同性は97-99%であった。このうち1つのクローングループは酢酸を酸化利用できるAnammox細菌に近縁であった。MAR-FISH法を用いた顕微鏡観察では、Anammox細菌が酢酸由来の有機態または無機態炭素を取り込んでいることが確認された。

Key Words : Anammox, Short chain fatty acid, MAR-FISH, *Candidatus "Brocadia sp.40"*

1. はじめに

排水中に含まれる窒素を微生物除去する場合に有効なプロセスの一つにAnammox (嫌気性アンモニア酸化) がある。Anammoxプロセスは硝化脱窒プロセスと比較して、大幅なエネルギー・コストの削減だけでなく、強温室効果ガスである亜酸化窒素(N_2O) の発生がないことから環境に対してメリットの大きいプロセスである。このAnammoxプロセスに適した排水はメタン発酵や嫌気性処理後の脱離液などのC/N比が低いものが考えられるが、通常、そのような排水にはAnammox反応に必要な十分な亜硝酸性窒素が存在せず、Anammoxプロセスの前段処理として部分硝化(亜硝酸型硝化) プロセスが必要である。本研究で想定している部分硝化プロセスは流入の半量を亜硝酸化し、残りの半量を混合することでアンモニア性窒素：亜硝酸性窒素が1：1となる流入水を考えている。この場合において、Anammoxプロセスに必要なアンモニア性窒素及び亜硝酸性窒素が存在するが、同時に有機物質が含まれる可能性があり、前段の部分硝化プロセスでその一部は分解されると考えられるが、後段のAnammoxプロセスへ及ぼす影響については不明瞭な点が多い。これまでの既往の研究から、回分試験によってAnammox細菌は有機物質に対して耐性が低い¹⁾との報告がされており、特にメタノールやエタノールなどのアルコール類に暴露されると活性がほぼ失われるという報告²⁾がある。これに対し、グルコース、ギ酸、アラニンがAnammox

活性に対して影響を与えず、プロピオン酸はAnammox細菌によって消費される³⁾とも言われている。酢酸に関しては、10 mMまでは活性が増加し、それ以上の濃度になると濃度の増加にともなって活性が減少する^{3,4)}という報告があるのに対し、Kartalらは酢酸の添加によってAnammox活性が上昇すると報告している⁵⁾。このようにAnammoxプロセスに対する有機物質の影響は同じ物質においても異なる結果を示し、Anammox細菌種による違いの可能性がある。

近年、酢酸やプロピオン酸存在下においてこれらの有機物質を酸化利用する菌種が発見されている。*Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* はプロピオン酸を酸化利用できる⁶⁾、*Candidatus "Brocadia fulgida"* は酢酸利用ができる³⁾という報告がある。これらの種は補助的にプロピオン酸または酢酸を電子供与体として利用する。また、有機物質由来の炭素を直接取り込むことはなく他のAnammox細菌と同様に CO_2 を炭素源としている^{2,3,6)}。種類は異なるが、Anammox細菌の一種である*Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*のゲノム解析では、 CO_2 固定経路である還元的acetyl-CoA経路に必要な酵素が完全に検出されたが、その他の炭素固定経路は酵素の遺伝子が不完全である、または完全に欠落しているといった報告⁷⁾からも、無機炭素を炭素源としていることが予想される。また、van de Starらによって、プロピオン酸または酢酸存在下において他のAnammox細菌や従属栄養細菌に対して優占化し、亜硝酸性窒素競合においても優位である⁸⁾と報

告されている。これらのようなAnammox細菌を優占化させ、維持することでAnammoxプロセスの適用範囲を拡大できると考えられる。

以上のように同じ有機物質においても論文によって結果が異なっており、評価方法が異なる、用いたAnammox細菌が異なるなどの論文間での相違点がある。例えば、Anammox活性の評価の指標として窒素ガスの生成量で評価している⁴⁾が脱窒反応と区別がされておらず、また、Anammoxプロセスを用いる本来の目的であるアンモニア除去については考慮されていない点が問題としてあげられる。Anammox細菌の活性評価を行うに当たって考慮すべき点として、直接処理性能の目安となるアンモニアの消費速度や、プロセスの長期安定性に関わるAnammox細菌の増殖能の評価として、無機炭素の取り込み量が考えられる。

そこで本研究では、運転中のラボスケールAnammoxリアクターのバイオマスを対象として、回分試験を行うことで、異化代謝及び同化代謝能の観点から有機物質がAnammox細菌に与える影響について評価を行った。また、影響の詳細を把握するために、優占化しているAnammox細菌の特定及び割合を顕微鏡観察による面積構成比の算出により求め、分子生物学的手法を用いて有機物質の追跡を行った。

2. 実験方法

(1) 回分試験

回分試験に用いるバイオマスは、Anammox細菌の高濃度集積を目的として運転を行った図1に示すリアクターで培養を行った。リアクターはカラム容積207 cm³、内径4.5 cm、長さ13 cmのものをを用いた。担体には不織布を用い、担体有効面積は117 cm²であった。水理学的滞留時間

(HRT)は100日目まで2.1時間であり、それ以降は1.4時間とした。人工無機培地はアンモニア性窒素及び亜硝酸性窒素を1:1となるようにし、その他の基質は表1、2と同様のものをを用いた。また、リアクターの上部と下部における各態窒素濃度の勾配はなかった。回分試験、FISH、クローニングに用いたバイオマスは、運転開始160日目において窒素除去速度が4.25 kg-N m⁻³ day⁻¹のリアクター⁹⁾から採取した。回分試験、FISH、クローニングに用いたバイオマスは図1に示すリアクター上部のA点から採取した。5 mLのガラス製バイアルを用いてゴム栓で密栓して培養し、Anammox細菌の異化代謝能及び同化代謝能を評価した。回分試験の準備は窒素ガスを充填し、嫌気条件を維持したグローブボックス内において採取したバイオマスをホモジナイズし、バイアルにバイオマス、液体培地、有機物質を添加後、ゴム栓で密栓し、37℃で24時間の条件で静置培養を行った。各バイアル内のバイオマス量は乾燥重量1 mg/vialで一定とした。液体培地の組成、Trace Elementの組成をそれぞれ表1と表2に示す。本研究では、異化代謝能として考慮したアンモニアのバイアル中のバイオマス乾燥重量当たりの消費速度からAnammox活性と定義し、有機物質を添加しない系のAnammox活性を100%とした。これは、本研究で用いたバイオマスが混合系であるため、亜硝酸性窒素濃度の消費にはAnammox反応に加えて脱窒反応が関与するのに対し、嫌気条件下でのアンモニアの減少にはAnammoxプロセスのみが関与すると考えたからである。なお、アンモニアを窒素源として固定する場合も考えられるが、バイアル中のアンモニア濃度は高く、Anammox反応速度も速いために、本研究では考慮していない。また、バイアル中のバイオマス乾燥重量当たりの無機炭素取り込み率をAnammox細菌の同化能と定義し、有機物質を添加しない系のAnammox細菌の同化能が100%とした。

用いた有機物質はギ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムの3種類で、0、10、25、50 mMとなるように添加した。さらに、硝酸性窒素存在下かつ酢酸またはプロピオン酸存在下でAnammox細菌の活性が増加するといった報告⁵⁾⁶⁾があることから、本研究でも硝酸性窒素を0、5 mM添加する系を設けた。また、

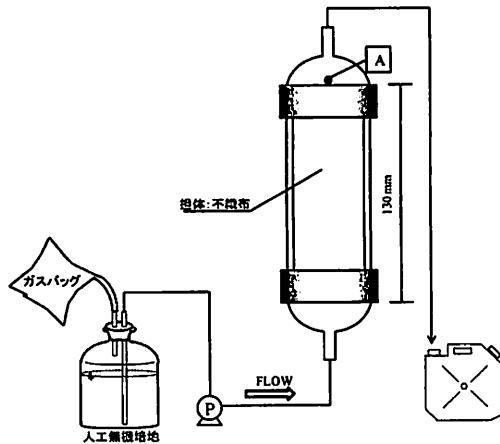


図1 連続通水リアクターの概略図

表1 液体培地の組成		表2 Trace Elementの組成	
基質	濃度	成分	濃度(mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mg-N/L	TE I EDTA・2Na	5
NaNO ₂	100 mg-N/L	FeSO ₄ ・2Na	9
NaNO ₃	0 or 5 mM	TE II EDTA・2Na	15
NaHCO ₃	4000 mg/L	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.25
KHCO ₃	1000 mg/L	Na ₂ SeO ₄	0.11
KH ₂ PO ₄	27.2 mg/L	NiCl ₂ ・6H ₂ O	0.19
MgSO ₄ ・7H ₂ O	300 mg/L	CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.24
CaCl ₂ ・2H ₂ O	180 mg/L	NaMoO ₄ ・2H ₂ O	0.22
		MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.99
TE I	1mL-TE/L	H ₃ BO ₃	0.014
TE II	1mL-TE/L	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.43

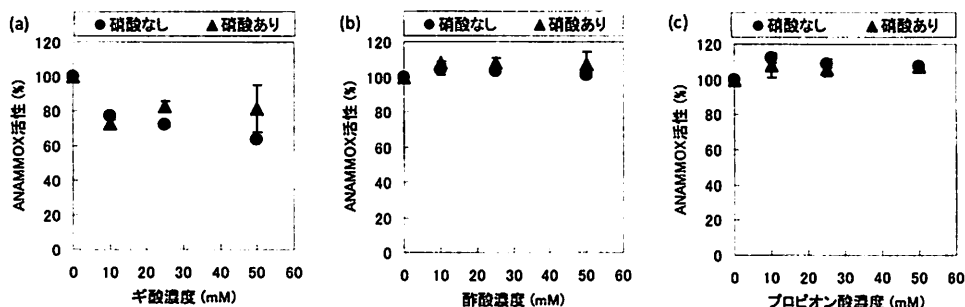


図2 有機物質濃度と Anammox 活性の関係

Anammox 細菌の無機炭素取り込み能力を観察するために、 ^{14}C で標識された 1 mM の炭酸水素ナトリウム(37 MBq) を 10 μl バイアルにシリンジで注入し、最終濃度 10 μM (370 kBq) とした。

培養終了後直ちにイオンクロマトグラフ (HPLC10Avp: SHIMADZU 社製) を用いて各態窒素濃度を測定し、培養前後のアンモニア濃度から Anammox 活性を算出した。また、液体シンチレーションカウンター (LIQUID SCINTILLATION COUNTER LSC-5100, ALOKA 社製) を用いてバイオマスに取り込まれた ^{14}C 由来の放射能を測定し、有機物質を添加しないものと相対比較することで同化能を評価した。

(2) 微生物群集構造解析

(1)の回分実験で用いたバイオマス内に存在する Anammox細菌を特定するために、リアクター運転開始160日目、窒素除去速度が $4.25 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ のバイオマスに対して16S rRNA遺伝子に基づく系統解析を行った。このバイオマスからFast DNA SPIN KIT for soil (Q-BIO gene 社製) を用いてDNAを抽出し、Anammox細菌が属する planctomycetales 目を対象としたPla46^[10]、Univ1390^[11]のプライマーセットを用いてPCR増幅を行い、TOPO-XL cloning kit によりクローニングを行った。PCR増幅は最初の熱変性を94℃で4分、94℃で45秒、58℃で50秒、72℃で3分という一連の反応を行うサイクルを30回繰り返し、最後の伸長を72℃で10分を行う条件を用いて行った。得られたクローンの塩基配列を基に系統樹をNeighbor-Joining 法^[12]を用いて作成した。

(3) FISH 法を用いた顕微鏡観察

取得クローンの解析によって得られた塩基配列と probeBase^[13] 上のデータベースと比較を行い、用いるプローブを決定し、顕微鏡観察を行った。FISH 法は Amann^[14] らの方法に準拠した。用いたプローブは Anammox 細菌である Candidatus “Brocadia”, “Kuenenia” を対象とした Amx820^[15] と今回最も検出数が多かったクロー

ンを視覚的に観察するために ARB プログラム^[16] により新たに設計した Bsp613 (5'-gga tgc cgt tct tcc gtt gag cgc-3') を用いた。プローブ Bsp613 のホルムアミド濃度は TM 値より求めた 45% を用いた。また、EUB338^[17]、EUB338 II^[18]、EUB338 III^[18] をミックスし、全細菌を対象とした EUBmix として用いた。ハイブリダイゼーションは 46℃ で 3 時間行い、その後 48℃ で 20 分間洗浄を行った。ホルムアミド濃度が異なるプローブを組み合わせて用いる際には、ホルムアミド濃度が高いプローブを用いてハイブリダイゼーション及び洗浄を行い、その後もう一方のプローブについてもハイブリダイゼーション及び洗浄を行った。プローブ EUBmix と Amx820 を用いた顕微鏡観察では、Amx820/EUBmix $\times 100(\%)$ によって蛍光面積による構成比を求め、全細菌に占める Anammox 細菌の割合を求めた。面積構成比の算出は、12 視野の平均を用いた。

(4) MAR-FISH 法を用いた有機物質追跡実験

^{14}C で標識された有機物質を用いて回分培養を行い、Anammox 細菌が有機物質を資化しているかどうかを観察した。回分培養は(1)の回分試験で用いた培地に 25 mM のギ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムを用いた。さらに ^{14}C で標識されたギ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムを最終濃度 100 nmol となるようにシリンジで注入した。37℃ で 24 時間の培養後に液体シンチレーションカウンターを用いてバイオマスに取り込まれた放射能を測定し、有機物質由来の炭素が取り込まれているかどうか確認した。取り込み確認後、MAR-FISH 法を用いて顕微鏡観察を行い、どの細菌が有機物質由来の炭素を取り込んでいるかを観察した。MAR-FISH 法は Okabe ら^[19] の方法に準じて行った。用いたプローブは Eubmix, Amx820, Bsp613 を用いた。ハイブリダイゼーションは、(3)と同様に行った。FISH 法を行ったカバーガラスを乳剤 (LM-1) でコーティングし、1~2 日間冷蔵庫で露出させた。露出サンプルを Kodak Professional D-19 (Kodak 社製) を用いて現像を行った。

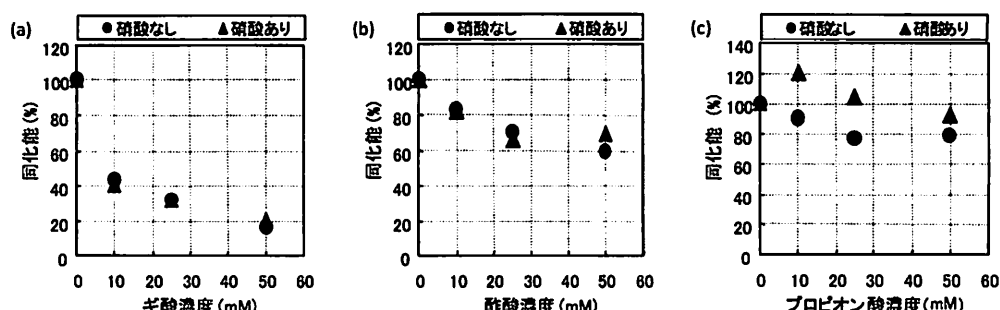


図3 有機物質濃度と Anammox 細菌の同化能の関係

3. 実験結果及び考察

(1) Anammox 活性及び同化能の測定

図2 (a), (b), (c)に有機物質と Anammox 活性の関係を示す。図中のエラーバーは3検体平均の標準偏差を示す。Anammox 活性 100%におけるアンモニア消費速度は $84.3 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、硝酸性窒素存在下では $87.5 \text{ mg-N mg-DW}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。ギ酸添加系において Anammox 活性が減少する傾向が観察され(図2(a)), 最大で40%の活性減少が硝酸なし・ギ酸50 mM 添加系で観察された。硝酸が存在する系においては最大で約20%の減少が確認された。硝酸性窒素が存在する場合の方が活性の減少幅が小さい傾向があった。

酢酸添加系において活性の減少傾向は確認されず(図2(b)), わずかに活性が増加する傾向があった。活性の増加率は全培養系において約10%程度であった。また、硝酸性窒素存在下の方が硝酸性窒素が存在しない場合より活性が高い傾向があった。プロピオン酸添加系において酢酸と同様に活性の増加が確認され(図2(c)), 増加率は約10%であった。プロピオン酸の添加系では硝酸性窒素存在下よりも硝酸性窒素が存在しない場合の方が Anammox 活性が高い傾向が観察された。

Anammox 反応の化学量論³⁾より、反応比はアンモニア性窒素：亜硝酸性窒素：硝酸性窒素=1:1.32:0.26と報告されている。今回の回分試験で得られたアンモニアの消費速度より亜硝酸性窒素の消費速度を算出すると、酢酸25 mM 添加した系では、アンモニア消費速度が $86.8 \text{ mg-N mg-DW}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、反応に使われる亜硝酸性窒素消費速度は $114.6 \text{ mg-N mg-DW}^{-1} \text{ day}^{-1}$ に相当するが、実際には $96.7 \text{ mg-N mg-DW}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、酢酸添加系において理論値よりも亜硝酸性窒素の消費が小さい結果となった。また、硝酸性窒素生成速度は $22.6 \text{ mg-N mg-DW}^{-1} \text{ day}^{-1}$ となるはずであるが、実際の測定結果は $0 \text{ mg-N mg-DW}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。Anammox 反応により生成された硝酸性窒素が全て亜硝酸性窒素に還元された場合、亜硝酸性窒素消費速度は $119.3 \text{ mg-N mg-DW}^{-1}$

day^{-1} となり、Anammox 反応の量論値に近い値となる。このことより、硝酸性窒素還元反応によって生成された亜硝酸性窒素が Anammox 反応に用いられたことで図2(b)に示したように Anammox 活性が増加したと考えられるが、硝酸還元反応を担う細菌がバイオオマス中に存在する脱窒細菌であるか、有機物質を酸化利用する Anammox 細菌かどうかは今回の回分試験では不明である。硝酸性窒素なしの酢酸と亜硝酸性窒素による脱窒反応のみを考えた場合、測定された酢酸消費速度は 153 mM day^{-1} であり、これに相当する亜硝酸性窒素消費速度は $134 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ となるが、実際には、Anammox による反応のみでも亜硝酸性窒素消費速度は $96.7 \text{ mg-N mg-DW}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であるため、酢酸の減少は脱窒反応以外の反応も考えられる。したがって、酢酸、プロピオン酸添加系における Anammox 活性の増加は、各有機物質を利用した硝酸還元が起こっているためであり、酢酸及びプロピオン酸の添加は Anammox 活性に影響を与えないことが示唆された。しかし、ギ酸の添加は酢酸、プロピオン酸添加系とは異なる傾向を示したことから、ギ酸の添加は Anammox 活性に影響を与えることが示唆された。

図3 (a), (b), (c)に有機物質と Anammox 細菌の同化能の関係を示す。Anammox 細菌の同化能 100%における ^{14}C 標識された無機炭素取り込み率は4.2%であり、硝酸存在下では3.8%であった。ギ酸添加系において Anammox 細菌の同化能は減少傾向を示し(図3(a)), ギ酸50 mM 添加系で減少が最大となり、約80%の減少が確認された。また10 mM の添加においても約60%の減少が確認された。このように、ギ酸の存在は Anammox 細菌の同化能に影響を与えることが示唆される結果となった。酢酸添加系においてもギ酸添加系と同様に同化能の減少が確認され(図3(b)), 酢酸50 mM 添加系で約40%の減少があった。また、硝酸性窒素を添加しない系の方が硝酸性窒素を添加する系よりもわずかに同化能が高い傾向があった。プロピオン酸添加系においては硝酸性窒素なしの系では同化能の減少が確認されたが(図3(c)), 硝酸性窒素ありの系においては、プロピオン酸濃度が25 mM までは同化能は

減少せず、50 mM において減少は10%以下であった。また、硝酸添加系の方が硝酸性窒素なしの場合よりも同化能が高い傾向があった。

酢酸及びプロピオン酸添加系において Anammox 活性が増加していることから、Anammox 細菌の同化能が増加すると思われる。しかし、ほとんどの系で同化能が減少傾向にあることから以下のことが考えられる。① Anammox 細菌が有機物質を直接取り込む、②共存する脱窒細菌による硝酸還元によって生成された有機物質由来の無機炭素を Anammox 細菌が取り込んでいる、③有機物質は Anammox 細菌の菌体合成に阻害影響を与える。①は ^{14}C で標識された有機物質に銀粒子が形成されたことを示唆し、②は初期に培地中に存在するノンラベルの CO_2 ではなく、共存する脱窒細菌の反応に由来する $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みを示唆している。これらに関しては ^{14}C で標識された有機物質を用いた MAR-FISH 法を適用することで培地中に存在する炭酸以外の炭素源の存在を確認できると考えられる。また、Candidatus “Kuenenia stuttgartiensis” のゲノム解析より、①は Anammox 細菌は行わないという報告⁷⁾から、②である可能性が高いと考えられるが、今回の MAR-FISH の条件では①と②の区別は難しい。さらに②については、ラベリングされた炭素が脱窒反応によって一旦外部に出てノンラベルの CO_2 に希釈された場合では希釈され、0.1-0.4%程度と考えられるため、この場合の取り込みによって形成された銀粒子の観察は難しいと考えられる。MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察の結果については(5)に示す。

(3) 微生物群集構造解析

回分試験に用いた Anammox リアクター内のバイオマスに対して行ったクローン解析より得られた系統樹を図4に示す。約1300塩基長が得られたクローンは69クローンであり、その全てが Candidatus “Brocadia” に属する Anammox 細菌であった。また、クローンは2種類のグループに分類された。そのうちほとんどのクローンは

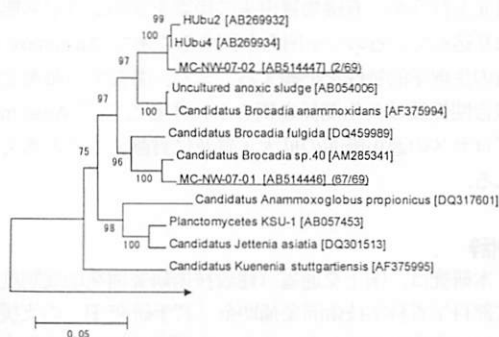


図4 リアクター内に存在する Anammox 細菌のクローン解析結果。()内は検出されたクローン数を示す。

(MC-NW-07-01) は酢酸利用が可能であると報告のある Candidatus “Brocadia fulgida”, “Brocadia sp. 40”²⁰⁾ に近縁(97%の相同性)であった。一方、わずかながら検出されたクローン(MC-NW-07-02) はリアクター運転開始当初に優占化していた Anammox 細菌である HUBu2 及び HUBu4²¹⁾ に近縁(99%の相同性)なものであった。酢酸利用可能な種に近縁な Anammox 細菌が多く存在したことから酢酸存在下での Anammox 活性が減少しなかったことが考えられる。

(4) FISH プローブの決定及び顕微鏡観察

バイオマス内に存在する細菌のうち、Anammox 細菌が占める割合は $94.2 \pm 4.1\%$ であり、Anammox 細菌がバイオマスのほとんどを占めていた。

検出されたクローンの配列とプローブの配列を比較したところ、1塩基異なる部分があり、ミスマッチを修正したプローブ Bsp613 を用いて FISH 法による顕微鏡観察を行った。その結果、Anammox 細菌の形態を持つ細菌が蛍光標識され、視覚的に観察することが可能であった。

Anammox 細菌に特異的なプローブ Amx820 と酢酸利用種に近縁な Anammox 細菌に特異的なプローブ Bsp613 を用いて顕微鏡観察を行った結果、バイオマス内には2種類の Anammox 細菌が観察され、クローン解析と同様の結果となった(図5)。そのほとんどが酢酸利用種に近縁な Anammox 細菌であった。図5(a)に Amx820 と Bsp613 を用いて FISH 法により蛍光標識した FISH 画像及びその拡大図を図5(b)に示す。この2種類の Anammox 細菌の形態的な違いは、Candidatus Brocadia sp. に近縁な方は密なクラスターで存在しており、HUBu4 に近縁なものは分散されたクラスター状態で存在していた。また図5(b)において、Anammox 細菌種間での菌体の大きさの違いはほとんどなかった。顕微鏡付属の画像解析ソフトにより1 cell の大きさを測定したところ、ともに $0.8\text{--}1.0\text{ }\mu\text{m}$ であった。

以上のことより、(5)の MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察は Amx820, EUBmix, Bsp613 の3種類のプローブを組み合わせることにした。

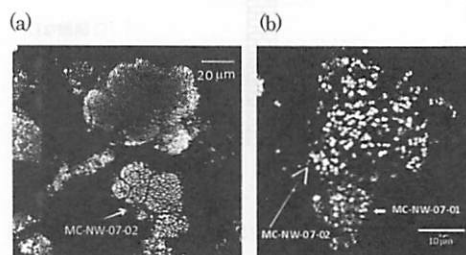


図5 (a)Amx820 と Bsp613 を用いた FISH 画像、(b) 拡大図

(5) MAR-FISH 法を用いた有機物質追跡実験

Anammox 細菌によってギ酸、酢酸、プロピオン酸が炭素源として利用されるかどうかを MAR-FISH 法によって検討した。図 6 に ^{14}C で標識された各有機炭素のバイオマスによる取り込み率の測定結果を示す。3 種類の有機物質においては酢酸添加・硝酸性窒素ありの培養系において比較的高い取り込み率が確認された。

MAR-FISH 法を用いた顕微鏡観察の結果をまとめたものを表 3 に示す。プローブ Amx820 とプローブ EUBmix を用いて顕微鏡観察を行った結果、全培養系において EUBmix で蛍光標識された細菌による有機物質の取り込みが確認された。その中でもギ酸+硝酸性窒素、酢酸、酢酸+硝酸性窒素の 3 つの培養系において Amx820 で蛍光標識された細菌による有機物質由来の炭素の取り込みが確認された。プローブ Amx820 とプローブ Bsp613 を用いた際の顕微鏡観察では、ギ酸+硝酸性窒素、酢酸、酢酸+硝酸性窒素の 3 つの培養系において、Bsp613 で蛍光標識された細菌による有機物質由来の炭素の取り込みが観察された。その中でも酢酸+硝酸性窒素培養系では顕微鏡観察において、取り込みを示す銀粒子の存在が多く観察された。今回の顕微鏡観察では、共存する細菌によるプロピオン酸の取り込みは確認されたが、Anammox 細菌によるプロピオン酸由来の炭素取り込みは観察されなかった。

酢酸添加系において、Anammox 細菌による有機物質由

来の炭素の取り込みが確認されたことから、酢酸添加系における Anammox 活性の増加及び同化能の減少が硝酸還元による亜硝酸性窒素の生成と酢酸の酸化によって生成された無機炭素の取り込みがあると考えられる。また、今回設定した MAR-FISH の条件では Anammox 細菌によるプロピオン酸の取り込みが観察されず、同化能の測定結果とは一致しなかった。この理由としては、プロピオン酸は液体シンチレーションカウンターによる ^{14}C -プロピオン酸由来炭素の取り込みは小さく、今回の露出時間では銀粒子の形成が確認できなかったと考えられる。今回の観察では露出時間を全ての系で統一しており、今後は露出時間を長く設定する、 ^{14}C -プロピオン酸濃度の増加及び培養時間の短縮など条件を最適化し、プロピオン酸由来の炭素取り込みの有無を検討する予定である。

4. まとめ

本研究では有機物質が Anammox プロセスに及ぼす影響について回分試験を行い、顕微鏡観察によって有機物質由来の炭素が Anammox 細菌に取り込まれるかどうかを調査した。本研究で得られた知見を以下に示す。

今回用いたバイオマス内に優占化していた Anammox 細菌は酢酸利用型である *Candidatus "Brocadia fulgida"* に近縁のものであった。ギ酸は Anammox 細菌のアンモニア除去及び菌体維持に関わる同化代謝に阻害影響を示すことが示唆された。また、Anammox 細菌はギ酸由来の炭素を直接または間接的に取り込むことが明らかとなった。酢酸は Anammox 細菌のアンモニア除去及び同化代謝に阻害影響を与えないことが明らかとなった。さらに、酢酸利用型の Anammox 細菌は酢酸由来の炭素(無機炭素を含む)を炭素源として取り込むことが確認できた。プロピオン酸は Anammox 細菌の活性には阻害影響を与えないが、プロピオン酸存在下では同化代謝の面で阻害影響を与えることが示唆された。

今後は Anammox 細菌と共存する細菌のどちらが硝酸還元を行うか、有機物質由来の炭素をどのような形態で取り込んでいるのかを明らかにすることで Anammox 細菌の生理学的特性を把握する。また、共存する細菌との競合関係及び共生関係を明らかにすることで Anammox プロセスの適用範囲の拡大・普及に貢献できると考えられる。

謝辞

本研究は、国土交通省「建設技術研究開発助成制度」、文部科学省科学技術開発補助金「若手研究 B」の支援を受けて実施されました。また、本研究の一部は広島大学ライフサイエンス分析室の共焦点レーザー顕微鏡を利用し、行われました。ここに記して感謝の意を表します。

表 3 各培養系列と細菌による取り込みの有無

	Clone MC-MW-07-01	Clone MC-MW-07-02	coexisting bacteria
ギ酸	—	—	+
ギ酸+硝酸	—	+	+
酢酸	—	+	+
酢酸+硝酸	—	+	+
プロピオン酸	—	—	+
プロピオン酸+硝酸	—	—	+

(+): 取り込みが確認できた、—: 取り込みが確認できなかった)

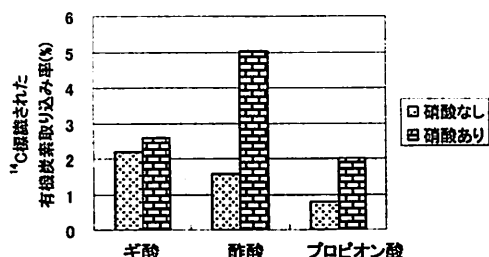


図 6 液体シンチレーションカウンターを用いた ^{14}C で標識された有機炭素の取り込み率測定結果(有機物質名は添加した ^{14}C 標識された有機物質を表す)。

参考文献

- 1) Jianlong, W., Jing, K.: The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor, *Process Biochemistry*, Vol. 40, pp.1973-1978, 2005.
- 2) Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M., and Schmid, I.: Propionate Oxidation by and Methanol Inhibition of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 2, pp. 1066-1071, 2005.
- 3) van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G.: Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized reactor, *Microbiology*, Vol. 142, pp. 2187-2196, 1996.
- 4) Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J.L., Mosquera—Corral, A., Mendez, R. and Jetten, M.S.M.: Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 40, pp. 859-865, 2007.
- 5) Kartal, B., van Niftrik, L., Rattray, J., van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Damste, J.S., Jetten, M.S.M. and Strous, M.: Candidatus 'Brocadia fulgida': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 63, No. 1, pp. 46-55, 2008.
- 6) Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L.A., van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Webb, R.I., Schouten, S., Fuerst, J.A., Damste, J.P., Jetten, M.S.M. and Strous, M.: *Candidatus* "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 30, pp. 39-49, 2007.
- 7) Marc Strous *et al.*: Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome, *Nature*, Vol. 440, pp. 790-794, 2006.
- 8) van der Star, W.R.I., Miclea, A.I., van Dongen, U.G.J.M., Muyzer, G., Picioreanu, C. and van Loosdrecht, M.C.M.: The Membrane Bioreactor: A Novel Tool to Grow Anammox Bacteria as Free Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 101, No. 2, pp. 286-294, 2008.
- 9) 百合昭太, 栗田貴宣, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良: ANAMMOX リアクター内の細菌群集の機能・構造解析, 第45 回環境工学研究フォーラム講演集, pp. 79-81, 2008.
- 10) Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. and Schleifer, K.H. Monitoring a widespread bacterial group in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* Vol. 144, pp. 3257-3266, 1998.
- 11) Zheng, D., Alm, E. W., Stahl, D. A., and Raskin, L. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, pp. 4501-4513.
- 12) Saito, N. and Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 4, pp. 406-425, 1987.
- 13) Loy, A., Maixner, F., Wagner, M., and Horn, M. probeBase-an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Research*, 35, D800-D804, 2007.
- 14) Amann, R.L. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 1-15. In A.D.L. Akkerman, J.D. van Elsas, and F.J. de Bruijn (ed). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- 15) Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M. and Wagner, M. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria implications for phylogeny and in situ detection, *Environmental Microbiology*, Vol. 3, pp. 450-459, 2001.
- 16) Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Buchner, Y.A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. and Schleifer, K.H. ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, No. 4, pp. 1363-1371, 2004.
- 17) Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, pp. 1919-1925, 1990.
- 18) Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M., The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 22, pp. 434-444, 1990.
- 19) Okabe, S., Kindaichi, T. and Ito, T. MAR-FISH — An ecophysiological approach to link phylogenetic affiliation and *in situ* metabolic activity of microorganisms at a single-cell resolution, *Microbes and Environments*, Vol. 70, pp. 83-98, 2004.
- 20) KIELING, D.D., REGINATTO, V., SCHMIDELL, W., TRAVERS, D., MENES, R.J. and SOARES, H.M., Sludge wash-out as strategy for Anammox process start-up, *Process Biochemistry*, Vol. 42, pp. 1579-1585, 2007.
- 21) Tsushima, I., Ogasawara, Y., Kindaichi, T., Satoh, H. and Okabe, S. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactor, *Water Research*, Vol. 41, pp. 1623-1634, 2007.

(2009.5.22 受付)

The Effect of Short-chain Fatty Acid in Catabolism and Anabolism of the Anammox Bacteria

Takanori AWATA¹, Tomonori KINDAICHI¹, Noriatsu OZAKI¹, Akiyoshi OHASHI¹

¹Dept. of Social and Environmental Engineering, Hiroshima University

The effects of short-chain fatty acid on activity of the anammox bacteria both in catabolism and anabolism were investigated in this study, through batch experiments with formate, acetate and propionate. At the concentration 10 mM formate was the inhibitor to the activity of the anammox bacteria in both aspects, while acetate and propionate showed no inhibition even at concentration 50 mM. In phylogenetic analysis, the clones were closely related to *Candidatus "Brocadia sp."* with 97% sequence similarity. MAR-FISH analysis showed that [¹⁴C] acetate is incorporated into the anammox bacteria in the form of either organic or inorganic carbon source.