

(33) 嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養と その微生物群集に与える電子受容体の影響

木村 晶典¹・幡本 将史^{1*}・高橋 優信¹
川上 周司^{1,2}・荒木 信夫³・山口 隆司¹

¹長岡技術科学大学 環境システム工学専攻 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

²阿南工業高等専門学校 建設システム工学科 (〒774-0017 徳島県阿南市見能林町青木265)

³長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町888)

* E-mail: hatamoto@vos.nagaokaut.ac.jp

嫌気環境下でメタン酸化と脱窒を行う微生物の集積培養を亜硝酸、硝酸を電子受容体としてそれぞれ単一で添加し、連続培養と回分培養を用いて行った。培養の結果、亜硝酸を添加した連続培養で顕著な嫌氣的メタン酸化脱窒反応が確認できた。連続培養 270 日の汚泥をサンプルとした *Fluorescence in situ hybridization* 法による菌叢解析では、亜硝酸添加系だけではなく硝酸添加系からも嫌氣的メタン酸化脱窒細菌を検出した。亜硝酸を添加した連続培養では全細胞に対しバクテリアの存在比が 68%で、アーキアは存在しなかったが、硝酸添加系ではバクテリア 58%、アーキアが 7%とアーキアが程度存在しており、使用した電子受容体により微生物叢は大きく異なっていた。

Key Words : *Anaerobic methane oxidation, Denitrification, NC10 bacteria, Enrichment culture, Fluorescence in situ hybridization (FISH)*

1. はじめに

これまで嫌気環境下におけるメタン酸化は嫌氣的メタン酸化古細菌と、硫酸塩還元細菌によりメタンと硫酸を利用して反応が進行すると考えられてきた¹⁻³⁾。また、硝酸塩還元細菌等との共生、もしくは硝酸を直接電子受容体に用いるメタン酸化菌が存在する可能性も推測されてきたが、長らくその存在は確認されていなかった。しかし2006年に、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群集が農業用水路の堆積物中より集積された⁴⁾。当初、この嫌氣的メタン酸化脱窒反応はアーキアとバクテリアの共生により進行するものと考えられていたが、その後の研究⁵⁻⁶⁾によりアーキアが存在しない状況においても嫌氣的にメタン酸化脱窒反応が進行することが確認され、この反応を担う主要な微生物はNC10という門レベルで未培養な系統分類群に属するバクテリア (NC10バクテリア) であることが判明した^{5,7)}。2010年にはNC10バクテリアの集積培養系をもとにしたゲノム解析が行

われ、NC10バクテリアの一種である“*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”の全ゲノムが解析された。その結果、“*M. oxyfera*”は好氣的メタン酸化反応を担う遺伝子を保持していること、亜酸化窒素を還元する遺伝子を持たないことが確認された。また“*M. oxyfera*”の脱窒反応は一般的な中間体である亜酸化窒素を経由せず亜酸化窒素を生成しない新規な脱窒反応であると報告されている⁸⁾。したがって、嫌氣的メタン酸化脱窒反応を排水等の脱窒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脱窒プロセスの足がかりと成りえる。また、本反応を担う微生物の生態を解明することは自然界の炭素および窒素循環の解明にも寄与するものである。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、適切な培養条件等の基礎的な情報が不足している。Huら⁷⁾は嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の最適培養温度に関する研究を行い、22, 35, 40℃のなかで、35℃が順調な培養を確認したと報告している。また、NC10バクテリアの培養ではこれまで電子受容体と

表-1 本研究で FISH 法に使用した 16S rRNA 標的の DNA プローブ

Probe name	Target group	Probe sequence (5' to 3')	FA (%)	Reference
NC10 1162	NC10 bacteria	GCCTTCCTCCAGCTTGACGCTG	40	7
DBACT0193	NC10 bacteria	CGCTCGCCCCCTTTGGTC	40	4
DBACT0447	NC10 bacteria	CGCCGCCAAGTCATTCGT	40	4
ARC915	Archaeae	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	40	10
EUB338 I	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	40	11
EUB338 II	Bacteria	GCAGCTCCCGTAGGTGT	40	12
EUB338 III	Bacteria	GCAGCCACCCGTAGGTGT	40	12
Ma450	Aerobic methanotrophs(α -proteobacteria)	TAGGTCCATGGCAGTAATAG	20	13
My705	Aerobic methanotrophs(γ -proteobacteria)	GACCACAAGGAAGTCTAG	20	13

して硝酸のみを添加した事例⁷⁾, 亜硝酸と硝酸の双方を添加した事例⁴⁻⁶⁾のいずれでも嫌氣的メタン酸化脱窒反応は確認されており, また亜硝酸消費速度の方が硝酸消費速度よりも高いという事も報告されている⁵⁻⁶⁾。しかしながら, 亜硝酸のみを添加し培養を確認したという報告はない。

そこで本研究では嫌氣的メタン酸化脱窒反応の基礎的な情報収集を目的として, 本反応に関わる電子受容体の影響を調査するため, 添加する電子受容体を亜硝酸または硝酸として NC10 バクテリアの集積培養実験を行った。まず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。さらに, 集積培養を行った汚泥に対し Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法による菌叢解析を行い, 電子受容体の違いによる微生物叢への影響を調査した。

2. 実験方法

(1) 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリの作成

水田土壌からの DNA 抽出には FastDNA 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, 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 (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'), NC10-1043R (5'-TCTCCACGCTCCCTTGCG-3'), NC10-202F (5'-GACCAAAGGGGGCGAGCG-3') および UNIV1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') であり, PCR の反応条件は既報に準じた⁶⁾。増幅産物は MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製を行った後, TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) を用いてクローンライブラリーを作成した。

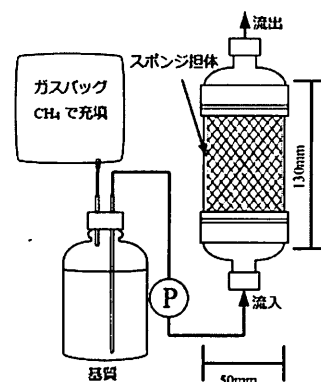


図-1 連続培養に用いた培養装置の概要

(2) 塩基配列の決定と分子系統解析

クローン化した 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定するにあたり, クローンライブラリよりランダムに選択した 10 クローンについて *Hae*III を用いて制限断片長多型解析を行った。この解析により得られた電気泳動の断片長パターンに基づいてクローンのグループ化を行い, 各グループよりそれぞれ 1 クローンを選択し, その全塩基配列を GenomeLab™ DTCS Quick start Mix (BECKMANCOULTER) と塩基配列自動解析装置 (CEQ-2000 : BECKMANCOULTER) を用いて決定した。得られた塩基配列は BLAST search によって相同性検索を行った。その後 ARB プログラムを使用して分子系統樹解析を行った。分子系統樹解析では, アライメントを行った後, 近隣結合法を用いて系統樹の推定を行った。系統樹の樹形の確からしさは 1,000 回のブートストラップ解析により検証した。

(3) 集積培養

嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養には連続培養および回分培養を採用した。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(図-1)。基質はこれまでに最も短期間で嫌氣的メタン酸化脱窒反応を確認したEttwigら⁶⁾の無機合成培地を用い、亜硝酸、硝酸の濃度は0.5 mM、運転温度は30℃とし上向流で流入させた。HRTは実験190日までは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時間に短縮するとともに、嫌氣的メタン酸化脱窒反応の促進を目的として還元剤(塩化チタン)を添加した。基質はアルゴンガスおよびメタンガスで20分ずつパージを行い、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。

回分培養では容積720 mlのバイアル瓶を用い、気層部をメタンで充填し30℃の振とう器内で培養を行った。植種として連続培養と同じ水田土壌と活性汚泥を用いた。基質は連続培養と同様のものを使用し、亜硝酸、硝酸の濃度は1.0 mMとした。前培養として、植種由来の持ち込み有機物を利用した脱窒の影響を排するための期間を設け、この間は投入した亜硝酸、硝酸が完全に消費される度に基質の交換を行った。亜硝酸、硝酸とともにメタンの消費が確認された後に培養実験を開始した。なお、連続培養、回分培養ともに、投入する電子受容体の違いが培養におよぼす影響を調査するため、亜硝酸、硝酸を添加した実験系を用意した。連続培養において亜硝酸を添加した実験系をリアクターA、硝酸を添加したものをリアクターB、回分培養においても亜硝酸を添加したものをバッチA、硝酸を添加したものをバッチBとした。

(3) Fluorescence *in situ* hybridization 法

FISH法はAmannら⁹⁾の方法に準拠して行った。本研究で使用した16S rRNA標的のオリゴヌクレオチドプローブ(DNAプローブ)を表-1に示す。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。バクテリアに特異的なDNAプローブを使用する際は、表中のEUB338 I-III¹¹⁻¹²⁾を等モルで混合したものを使用した(以下混合プローブをEUB338と表す)。ハイブリダイゼーションの条件はハイブリダイゼーションバッファーにホルムアミドを添加することで調整した。解析には、リアクターA、Bの培養270日目の汚泥を使用した。菌数計測では、固定サンプルをアガロース(1% lowmelting agarose in PBS, 0.001% SDS)で包埋してスライドガラスに固着させた。EUB338およびARC915で検出される菌体の割合は4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で検出される菌体数を基準とし、無作為に

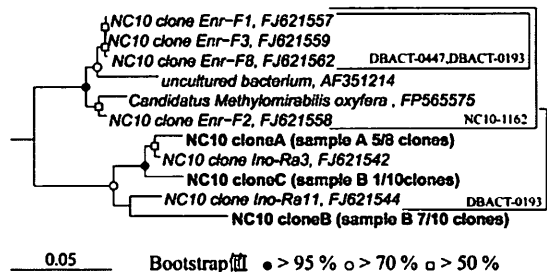


図-2 水田土壌から検出された NC10 門に属するバクテリアおよび近縁種の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹。本実験で得た配列は太字で示す。本系統樹は近隣結合法を用いて作成した。系統樹外に各バクテリアを検出可能な DNA プローブを示す。

30視野撮影し、その平均値より算出した。

(4) 分析方法

亜硝酸、硝酸濃度の測定には高速液体クロマトグラフ (SPD-10A, Shimadzu) を使用し、メタン濃度は TCD 検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-8A, Shimadzu) を用いて測定した。溶存メタン濃度はヘッドスペース法および、ヘンリーの法則に従って算出した。また、微生物の観察には蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX53) および CCD カメラ (OLYMPUS DP70) を用いた。

3. 結果および考察

(1) 分子生物学的手法による植種土壌の解析

集積培養を行うにあたり NC10 バクテリアが存在するサンプルを植種源とし、効率的に培養を進めるため環境中より NC10 バクテリアの探索を行った。これまでに NC10 バクテリアは淡水水路や農業用水路の堆積物中より検出され、またそれを植種源として集積されている^{4,5,7)}。そこで本研究では、3 箇所の水田土壌をサンプルとし 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、NC10-202F, UNIV1492R のプライマーセットで作成したクローンライブラリからは *Chloroflexi* 門に属するバクテリアが検出され、NC10 門に属するバクテリアは検出されなかったが、Bac8Fmix, NC10-1043R のプライマーセットを用いて作成した 2 箇所の水田土壌のクローンライブラリより NC10 門に属するバクテリアが検出された(図-2: clone A, B, C)。本研究で得られたクローン配列は Ettwig ら⁶⁾が農業用水路の堆積物中より検出した NC10 バクテリアの 16S rRNA 遺伝子配列と近縁で

表-2 連続培養実験(リアクターA, B)の硝酸・亜硝酸および溶存メタンの消費速度(326から341日までの平均値)

培養装置 (リアクター)	電子受容体	亜硝酸・硝酸消費速度 (mmol/L/day)	溶存メタン消費速度 (mmol/L/day)	溶存メタン消費速度理論値※ (mmol/L/day)
A	亜硝酸	2.27±0.56	1.06±0.39	0.87±0.06
B	硝酸	1.18±0.30	1.25±0.76	0.86±0.38

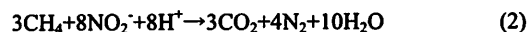
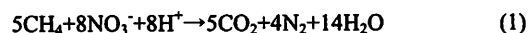
※亜硝酸・硝酸消費量より算出⁴⁾

あり, clone AおよびCはNC10 clone Ino-Ra 3とそれぞれ 97, 94%程度の相同性を示し, clone BはNC10 clone Ino-Ra 11と95%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。

(2) 嫌気的メタン酸化脱窒微生物の集積培養

a) 連続培養結果

連続培養における硝酸および亜硝酸の消費速度を図-3に示す。亜硝酸を添加したリアクターAは培養開始150日目付近より亜硝酸消費速度の増加が見られ, HRTを4.2時間から2.1時間へ短縮した後は亜硝酸消費速度が最大4.62 mmol/L/dayまで増加した。硝酸を添加したリアクターBの硝酸消費速度はリアクターAとは異なり経時的な増加が見られず, 最大硝酸消費速度も2.06 mmol/L/dayとリアクターAの5割程度であった。また, 連続培養系の流入水と流出水の溶存メタン濃度を測定したところ(表-2), リアクターA, Bともに投入窒素の減少に伴う溶存メタンの減少が見られ, 嫌気的メタン酸化脱窒反応の進行が推測された。しかしながら, 両リアクターの溶存メタンの減少量が理論式(式1, 2)⁴⁾より算出される値より過大であり, 嫌気的メタン酸化以外の要因によりメタンが消費された可能性が考えられた。



本実験において嫌気的メタン酸化脱窒反応が確認されたのは, リアクターAでは培養開始より100から150日目付近であり(図-3), 既報⁴⁻⁷⁾において反応を確認するまでに要した期間が半年から1年以上であることを考慮すると比較的早期に反応を確認できたと考えられる。一方リアクターBでは培養300日目においても安定した嫌気的メタン酸化脱窒反応の進行が確認できなかった。硝酸のみを電子受容体に用いたHuら⁷⁾の報告でも, 反応の確認に約8ヶ月かかっており, 硝酸のみを用いた培養では, 嫌気的メタン酸化脱窒反応の確認に亜硝酸を用いた培養よりも長

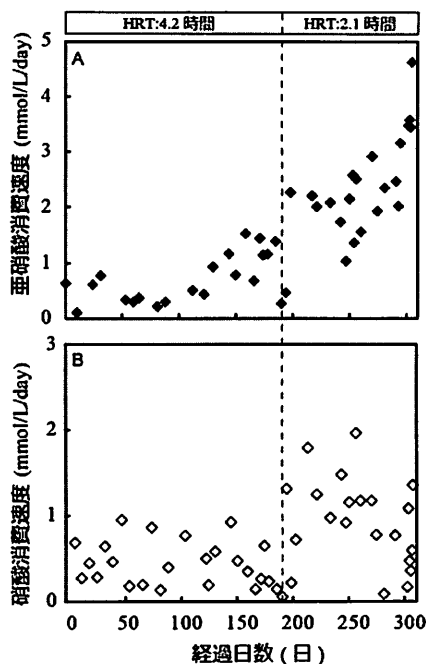


図-3 連続培養実験(リアクターA, B)における亜硝酸(A), 硝酸(B)の消費量の経日変化

い培養期間を要することが推測される。また, 亜硝酸の消費速度が硝酸より速い点に関して, 嫌気的メタン酸化脱窒反応を担うNC10バクテリアは硝酸よりも亜硝酸を消費しやすいことが知られており⁴⁻⁷⁾, Ettwigら⁵⁾は亜硝酸と硝酸を添加していた培養系において, 亜硝酸の添加を止めた後, メタン酸化活性が著しく低下し, 亜硝酸が嫌気的メタン酸化と密接に関係していることを報告している。本実験においても, 亜硝酸を添加した培養系は硝酸を添加した培養系の2倍程度の電子受容体消費速度を示しており, 嫌気的メタン酸化微生物の電子受容体には亜硝酸が適していることが確認できた。

b) 回分培養結果

回分培養におけるバッチA, Bの培養203から209日目までの7日間の測定結果より算出したの硝酸,

表-3 回分培養実験 (バッチ A, B) におけるの硝酸, 亜硝酸, およびメタン消費速度と窒素ガス生成速度 (203 から 209 日までの7日間より算出)

培養装置 (バッチ)	電子受容体	亜硝酸・硝酸消費速度 (mmol/L/day)	窒素ガス生成速度 (mmol/L/day)	溶存メタン消費速度 (mmol/L/day)	溶存メタン消費速度理論値* (mmol/L/day)
A	亜硝酸	0.13	0.11	0.03	0.04
B	硝酸	0.11	0.10	0.06	0.07

※亜硝酸・硝酸消費量より算出⁴⁾

亜硝酸とメタンの消費速度, 窒素ガスの生成速度を表-3に示す. なお, バッチA,Bの亜硝酸, 硝酸の濃度は培養203日目に基質の交換を行い, 1 mMとなるよう調整した. 嫌氣的メタン酸化脱窒反応の理論式(式 1, 2)⁴⁾と比較した場合, 窒素ガスの生成速度が過大であるが, 亜硝酸, 硝酸の消費に伴う溶存メタンの減少速度は理論値と近似しており嫌氣的メタン酸化脱窒反応が起こっているであろうと考えられた. しかしながら, 回分培養では連続培養とは異なり亜硝酸, 硝酸の消費速度は同程度であり, 電子受容体の違いによる影響は確認できなかった. また, 回分培養では嫌氣的メタン酸化脱窒反応の確認に両バッチとも150日程度を要した. この日数は亜硝酸を用いたリアクターAとはほぼ同程度であったが, 硝酸を用いたリアクターBよりは早期に反応が確認できた. 以上の結果から連続培養と回分培養という培養方法の差異が嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の増殖あるいはその微生物群集構造に影響を与えていることが推察されるが, その違いの解明には更なる研究が必要である.

(3) FISH法による集積培養サンプルの菌叢解析

a) NC10パクリアの検出

連続培養 270 日の汚泥をサンプルとし, FISH 法を用いて菌叢解析を行った. その結果, リアクターA, BともにNC10パクリアの存在を確認できた. リアクターAにおいて検出されたNC10パクリアは縦1 μm , 横0.5 μm 程度の桿菌であったのに対し, リアクターBでは縦3 μm , 横1.5 μm 程度の大きさであり, 双方のリアクターで検出されるNC10パクリアの形態が異なっていた(図-4). 本研究と同じプローブを使用した以前の報告⁶⁾で検出されたNC10パクリアは, 縦1 μm , 横0.5 μm ほどの桿菌で, リアクターAより検出されたNC10パクリアと似た形状であった. また, NC10パクリアを標的とした3種のDNAプローブを個別に使用したところ, リアクターAではDABCT0193およびNC10 1162においてNC10パクリアが検出され,

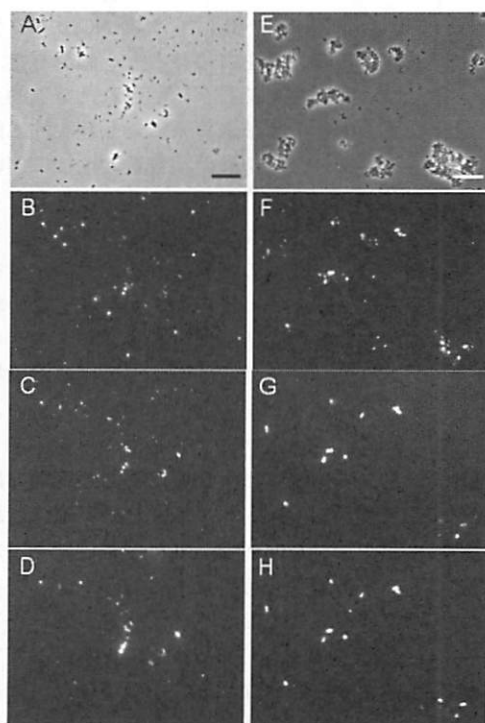


図-4 FISH 法による培養 270 日目におけるリアクターA (A-D), リアクターB (E-H) のパクリアおよびNC10パクリア検出結果, A-D, E-Hはそれぞれ同一視野で撮影: 位相差 (A, E), DAPI (B, F), EUB338 (C, G), DBACT0193, DBACT0447, NC10-1162を混合して使用 (D, H), スケールバー: 10 μm

リアクターBではDBACT0193およびDBACT0447において検出を確認した. したがって, 電子受容体の違いにより優占するNC10パクリアが異なる可能性が考えられた.

好気メタン酸化細菌の検出を行った結果, α プロテオバクテリア綱に属する好気メタン酸化細菌がリアクターA, Bで確認された. したがって両リアクターにおいて溶存メタンが過剰に消費された要因の1つとして, リアクター内に微量混入した酸素を利用した好氣的メタン酸化が影響していると考えら

れた。

b) バクテリアとアーキアの存在比

リアクター A, B において EUB338 および ARC915 により検出される菌体数を計測した。菌叢解析の結果、リアクター A ではアーキアがまったく存在せずバクテリアの割合が DAPI で染色される全細胞に対して 68%であった。リアクター B ではバクテリアが 58%, アーキアが 7%と僅かながらアーキアの存在を確認した。また各々のリアクターのバクテリアに対する NC10 バクテリアの割合は、リアクター A は 73%, リアクター B は 65%と NC10 バクテリアがバクテリアの大半を占めることを確認した。Ettwig ら⁵⁾は、亜硝酸の消費が確認された嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の集積培養系に対し経時的に菌叢解析を行った結果、亜硝酸の消費量の増加に伴い、アーキアが減少し、最終的にバクテリアのみとなった状態でも嫌氣的メタン酸化脱窒反応が進行したことを報告していた。我々の実験においても亜硝酸を添加したリアクター A ではアーキアが存在しない状態で嫌氣的メタン酸化脱窒が進行していたと考えられる。したがって、電子受容体として亜硝酸が添加されているとバクテリアが優占的に増殖するものと考えられる。一方 Hu ら⁷⁾による硝酸のみを添加して嫌氣的メタン酸化脱窒微生物を培養した実験では、温度を 22℃とした培養系ではアーキアが確認されず、硝酸の消費量も 0.065 mmol/L/day 程度であったのに対し、35℃で培養を行ったものはバクテリアとアーキアがほぼ等量であり (バクテリア : アーキア比, 3 : 4)、硝酸消費量は 2.0 mmol/L/day と 22℃で行った培養系よりも顕著な反応を示していた。また、彼らはアーキアが硝酸を亜硝酸へ還元した後に、生成された亜硝酸を NC10 バクテリアが嫌氣的メタン酸化脱窒に使用しているのではないかと推測していた⁷⁾。したがって硝酸のみを電子受容体としている場合、アーキアの存在が嫌氣的メタン酸化脱窒反応の重要なファクターとなっている可能性が高いと考えられる。本研究の連続培養系において硝酸の消費速度が亜硝酸のそれより遅いのは、硝酸が嫌氣的メタン酸化脱窒反応へ使用される際に亜硝酸へ還元される過程を経るが、アーキアの割合が低いため律速となっている可能性が考えられる。一方、回分培養系において亜硝酸、硝酸の消費量に差が生じなかったのは、バッチ B において硝酸を亜硝酸へ還元する微生物が増殖したからではないかと推測される。したがって今後は、回分培養系の菌叢解析を行い硝酸還元に寄与する微生物の検出を試みる予定である。

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て用い、メタンを唯一の炭素源とし、亜硝酸または硝酸を電子受容体として集積培養を行った。その結果、亜硝酸を電子受容体として用いた連続培養において顕著な嫌氣的メタン酸化脱窒反応が確認でき、この反応の電子受容体には硝酸より亜硝酸が適していることが確認できた。培養サンプルの菌叢解析の結果、添加した電子受容体の違いに関わらず NC10 バクテリアの存在が確認できた。また、亜硝酸を添加した連続培養系ではバクテリアのみしか検出されなかったが、硝酸を添加したものではアーキアが検出され、アーキアの存在が硝酸を使用した嫌氣的メタン酸化脱窒反応の進行に関与している可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G. and Delong, E. F.: Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments, *Nature*, Vol. 398, pp. 802-805, 1999.
- 2) Orphan, V. J., Hinrichs, K. U., Ussler, W., Paull, C. K., Taylor, L. T., Hayes, J. M. and Delong, E. F.: Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediment, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, pp. 1922-1934, 2001.
- 3) Niemann, H., Elvert, M., Hovland, M., Orcutt, B., Judd, A., Suck, I., Gutt, J., Joye, S., Damm, E., Finster, K. and Boetius, A.: Methane emission and consumption at a north sea gas seep (Tommelten area), *Biogeosciences Discussions*, Vol. 2, pp. 1197-1241, 2005.
- 4) Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Danmste, S. S. J., Op den Camp, M. J. H., Jetten, M. S. M. and Strous, M.: A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification, *Nature*, Vol. 440, pp.918-921, 2006.
- 5) Ettwig, K. F., S. Shima, K. T. van de Pas-Schoonen, J. Kahnt, M. H. Medema, H. J. M. op den Camp, M. S. M. Jetten. and M. Strous.: Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of *Archaea*, *Environmental Microbiology*, Vol. 10, pp. 3164-3173, 2008.
- 6) Ettwig, K. F., van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K. T., Jetten, M. S. M. and Strous, M.: Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic

- bacteria of the NC10 phylum, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, pp. 3656-3662, 2009.
- 7) Hu, S., Zeng, J. R., Burow, C. L., Lant, P., Keller, J. and Yuan, Z.: Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms, *Environmental Microbiology Reports*, Vol. 1, pp. 377-384, 2009.
 - 8) Ettwig, K. F., M. K. Butler, D. Le Paslier, E. Pelletier, S. Mangenot, M. M. Kuypers, F. Schreiber, B. E. Dutilh, J. Zedelius, D. de Beer, J. Gloerich, H. J. essels, T. van Alen, F. Luesken, M. L. Wu, K. T. van de Pas-Schoonen, H. J. Op den Camp, E. M. Janssen- Megens, K. J. Francoijs, H. Stunnenberg, J. Weissenbach, M. S. Jetten. and M. Strous.: Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria, *Nature* Vol. 464, pp. 5436-548, 2010.
 - 9) Amann, R.I.: In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual*, pp. 1-15, 1995.
 - 10) Stahl, D. A. and Amanm, R. I.: Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley, Chichester, United Kingdom, 1991.
 - 11) Amann, R.I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. and Stahl, D. A.: Combination of 16S rRNA-tardeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial population, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, pp. 1919-1925, 1990.
 - 12) Daims, H., Brul, A., Amann, R. I., Schleifer, K. and Wagner, M.: The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of a more comprehensive probe set, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 22, pp. 434-444, 1999.
 - 13) Gundula, E., Stubner, S. and Frenzel, P.: Group-specic 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 198, pp. 91-97, 2001.

(2011. 5. 30 受付)

Enrichment and molecular analysis of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms using nitrate or nitrite as electron acceptor

Masafumi KIMURA¹, Masashi HATAMOTO¹, Masanobu TAKAHASHI¹,
Shuji KAWAKAMI^{1,2}, Nobuo ARAKI³, and Takashi YAMAGUCHI¹

¹ Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

² Dept. of Construction Systems Engineering, Anan National College of Technology

³ Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology

Denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms were enriched using continuous and batch cultures fed with nitrate or nitrite as electron acceptor. After the several month of cultivation, continuous enrichment cultures using nitrite showed remarkable simultaneous methane oxidation and nitrite reduction. Denigrifying anaerobic methane oxidizing bacteria belonging to uncultured phylum NC10 was detected in not only nitrite-fed bioreactor but also nitrate-fed bioreactor by fluorescence *in situ* hybridization. In nitrite-fed bioreactor, about 68% of total microbial cell was bacteria and no archaeal cell was detected. But for nitrate-fed bioreactor, 58% of toal microbial cell was bacteria and archaeal cell was accounted in 7% of total cell numbers. These results indicate that nitrogen source strongly affected the microbial community structures in denitrifying anaerobic methane oxidizing consortia.