

B-22 ANAMMOXリアクター内の細菌群集の 機能・構造解析

○百合 昭太^{1*}・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: yuri072682@hiroshima-u.ac.jp

1. はじめに

硝化脱窒法に代わる生物学的窒素除去プロセスとして、嫌気性アンモニア酸化 (ANAMMOX) についての研究が世界中で行われている。しかしながら、ANAMMOX反応を担う細菌は増殖速度が小さく培養が困難であるという問題点を有しており、リアクターの運転にはリアクター内に高濃度に菌体を保持することが重要な鍵となる。本研究室において運転しているANAMMOXリアクター内の汚泥に対してFISH法を用いて微生物群集の構造解析を行った結果、高濃度にANAMMOX細菌が集積していたにもかかわらず、リアクター内にはANAMMOX細菌以外にも多種多様な細菌が存在することが明らかとなっている。ANAMMOX細菌と共存するこれらの細菌を同定し、機能を明らかにすることは、ANAMMOXリアクターによる窒素処理の更なる安定化・高効率化に繋がると考えられる。本研究では、共存細菌の同定、生態学的役割の把握のために16S rRNA遺伝子に基づく系統解析とMAR-FISH法を行い、リアクター内でANAMMOX細菌と共存関係にある細菌の特定とその機能についての解析を行った。

2. 実験方法

(1) ANAMMOX細菌の集積培養

ガラス製のカラムをup-flow式の生物膜リアクターを用いてANAMMOX細菌の集積培養を行った。生物膜担体として園芸用ネットを用いた。植種源として長期間運転していた同様のANAMMOXリアクターから汚泥を採取し、園芸用ネットに付着させ、人工無機栄養塩培地¹⁾を流入させて運転を開始した。なお、人工無機栄養塩培地は窒素ガスでパージすることによって溶存酸素濃度が

0.5 mg L⁻¹以下になるようにした。カラムの容積は207 cm³、水理学的滞留時間 (HRT) は1～2時間、担体表面積は117 cm²、運転温度は37度である。流入窒素負荷はアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素を段階的に増加させるか、またはHRTを段階的に短縮することによって調節した。流入・流出における各態窒素濃度をイオンクロマトグラフィーにより測定し、窒素除去能力の把握を行った。

(2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

窒素除去速度が約6 kgTN m⁻³ day⁻¹のANAMMOXリアクター内の汚泥からFast DNA SPIN KIT for soil (Q-BIO gene)を用いてDNAを抽出し、全細菌を対象としたBact11f- Univ1390rのプライマーセットを用いてPCR増幅し、TOPO Cloning and Transformation (Invitrogen)を用いてクローニングを行った。得られたクローンの塩基配列を基にneighbor-joining法²⁾で系統樹を作成した。

(3) MAR-FISH法

ANAMMOX細菌に由来する有機物 (菌体成分や代謝産物) を基質として利用する共存細菌を¹⁴Cで標識し、同定するために2段階に分けて以下の実験を行った。FISH法の過程において用いたプローブを表1に示す。

1) ¹⁴CによるANAMMOX細菌の標識実験 (培養第1段階)

嫌気状態を保つことのできるようにブチルゴム栓で密閉可能な5 mLのバイアル瓶にリアクターの運転と同様な人工無機栄養塩培地5 mLと、乾燥重量に換算して約14 mgのANAMMOX汚泥を添加し、37度で24時間培養した。アンモニア性窒素及び亜硝酸性窒素濃度はそれぞれ200 mgN L⁻¹と190 mgN L⁻¹とし、トレーサーとしてNaH¹⁴CO₃を100 μCi添加した。培養終了後に遠心分離を行い、ANAMMOX細菌に取り込まれずに培地中に残留した¹⁴Cを除去し、さらに分散・濃縮を行い、¹⁴Cで標識されたANAMMOX細菌の混合液を得た。この時点のサンプル

表1 MAR-FISH法で用いたプローブ

Probe	Sequence (5' to 3')	FA (%)	Specificity	Reference
EUB338	gct gcc tcc cgt agg agt	0-50	Most bacteria	Amann <i>et al.</i> (1990) ³⁾
EUB338II	gca gcc acc cgt agg tgt	0-50	Planctomycetales	Daims <i>et al.</i> (1999) ⁴⁾
EUB338III	gct gcc acc cgt agg tgt	0-50	Verrucomicrobiales	Daims <i>et al.</i> (1999) ⁴⁾
Amx820	aaa acc cct cta ctt agt gcc c	40	anammox bacteria	Schmid <i>et al.</i> (2001) ⁵⁾
GNSB-941	aaa cca cac gct ccg ct	35	<i>Chloflexi</i>	Gich <i>et al.</i> (2001) ⁶⁾
GSB581y	ctc tct cca ttc cgc ctg	25	<i>Chlorobi</i>	this study
GNSB656y	cca ttt tcc tct atc gct	15	<i>Chloflexi</i>	this study
WS6-630y	agg cga tat tcc ctc ccc	25	<i>Candidate division WS6</i>	this study
BPB580y	tct tAt agA gcc gcc tgc	20	<i>Betaproteobacteria</i>	this study
BPB208y	ata Aca cga ggt cgt tgc	15	<i>Betaproteobacteria</i>	this study

を採取し、液体シンチレーションカウントによって $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ の菌体への取り込み率を算出し、さらにMAR-FISH法を行うことによってANAMMOX細菌のみが ^{14}C の無機炭素を取り込むことを確認した。

2) ANAMMOX 細菌由来 ^{14}C による共存細菌の標識 (培養第2段階)

1)で得られた混合液中のANAMMOX細菌由来の ^{14}C を炭素源としてANAMMOXリアクターの汚泥を培養した。培養時間は24 時間、72時間、7日とし、MAR-FISH画像にて共存細菌による ^{14}C の取り込みを観察した。

3. 結果と考察

(1) リアクターの窒素除去性能

図1にリアクターの窒素除去速度の経時変化を示す。植種してから17日目にANAMMOX反応によるアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の同時除去が見られ、約200日目で窒素除去速度が最大となった。その後除去速度の急激な低下が見られたが、これはANAMMOX反応によって発生した窒素ガスが滞留したことにより、局所的に基質が行き届かなくなり一部のANAMMOX細菌が活性を失ったためと考えられる。400日目以降は比較的一定の除去速度(約 $8 \text{ kg N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$)が得られた。

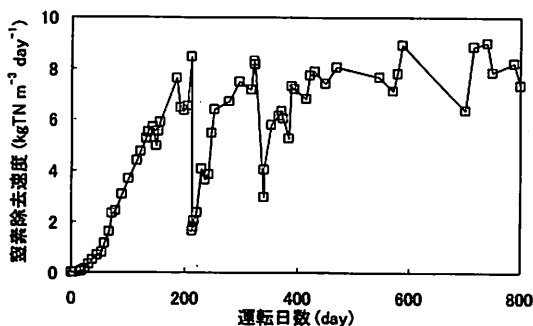


図1 リアクターの窒素除去速度の経時変化

(2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

図2に検出されたクローンを基に作成した系統樹を示す。全細菌を対象としたプライマーセットで91クローンについて16S rRNA遺伝子のほぼ全長(1517塩基)を解析した。その結果、*Chloroflexi*, *Betaproteobacteria*, *Chlorobi*に近縁なクローンが多く検出された。*Chloroflexi* (緑色非硫黄細菌) は糸状性を示し無酸素条件下で有機化合物を用いて光合成を行って増殖し⁷⁾、活性汚泥槽の中に広く分布する。*Betaproteobacteria*については、その機能は多岐にわたるが、本研究の系統解析によって検出された*Betaproteobacteria*はANAMMOXリアクターの中から広く検出されていることから、アンモニア酸化、亜硝酸酸化

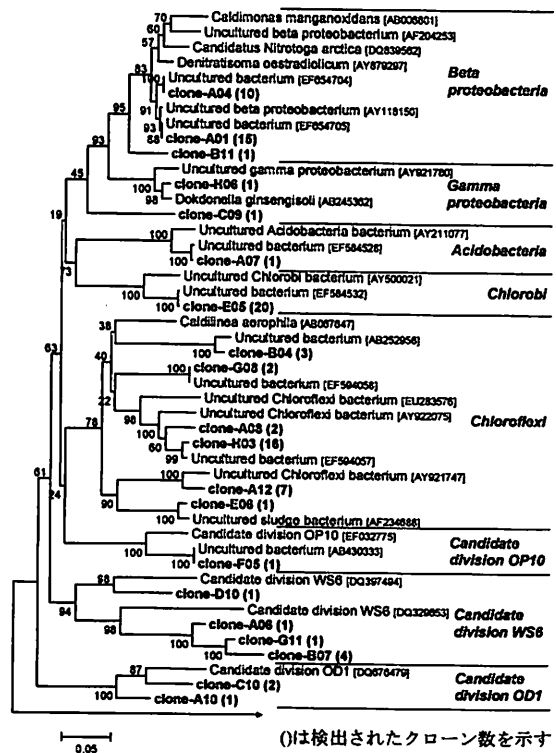


図2 検出されたクローンの系統樹

あるいは脱窒反応の窒素循環に関わっている可能性が高い。*Chlorobi* (緑色硫黄細菌) は偏性嫌気性の光合成細菌であり、一般的には桿菌である。また、有機物質を同化する能力を有している⁹⁾。

系統解析の結果を受けて、リアクター内の微生物群集の機能・構造をMAR-FISH法で解析するために、比較的多く検出された*Chloroflexi*, *Betaproteobacteria*, *Chlorobi*, *Candidate division WS6*を検出するFISHプローブを設計した。

(3) MAR-FISH法による基質利用特性の解析

まず、系統解析の結果をもとに設計したプローブを用いてFISH法を行った。*Chloroflexi*, *Betaproteobacteria*, *Chlorobi*を対象にしたプローブについては蛍光シグナルが観察され、ANAMMOXリアクター内に存在することが確認されたが、*Candidate division WS6*を対象にしたプローブでは蛍光シグナルが観察されず、リアクター内での存在数が少なかったためか、もしくはプローブの設計に問題があったためということが考えられる。

$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を用いてANAMMOXリアクターの汚泥を24時間培養した培養第1段階について、MAR-FISH画像を観察したところ、ANAMMOX細菌のみによる ^{14}C の取り込みが観察された。その際のANAMMOX細菌による $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ の取り込み率は約18.9%であった。その後、培養第1段階で作成した混合液を炭素源として汚泥を培養した。その結果、培養時間が72時間および7日のサンプルにおいて、糸状性の*Chloroflexi*によるANAMMOX細菌由来の ^{14}C の取り込みが観察された(図3, 4)。図3においてFISH法で検出された*Chloroflexi*の位置に図4において銀粒子の形成が見られたことから、*Chloroflexi*はリアクター内でANAMMOX細菌由来の有機物質を同化する能力を有していることが考えられる。*Chlorobi*および*Betaproteobacteria*についてはANAMMOX細菌のクラスターの内部に存在することが観察されたが、培養時間が24時間、72時間、7日のいずれの場合においても銀粒子の形成が確認されず、ANAMMOX細菌由来の ^{14}C の取り込みは観察されなかった。

4. まとめ

^{14}C で標識されたANAMMOX細菌を炭素源として用いたMAR-FISH法では、ANAMMOX細菌由来の ^{14}C を取り込んだ*Chloroflexi*が観察されたことからリアクター内において*Chloroflexi*からANAMMOX細菌への炭素フローがあることが明らかとなった。*Betaproteobacteria*と*Chlorobi*はANAMMOX細菌由来の有機物質の取り込みは観察されなかったものの、ANAMMOX細菌のクラスターの内部に存在していることが確認され、ANAMMOX細菌と密接な位置関係にあることが観察された。

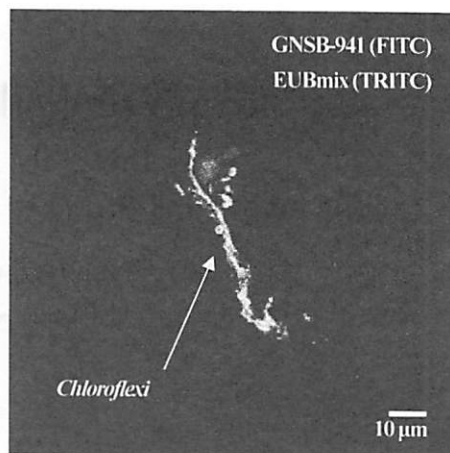


図3 第2段階におけるFISH画像

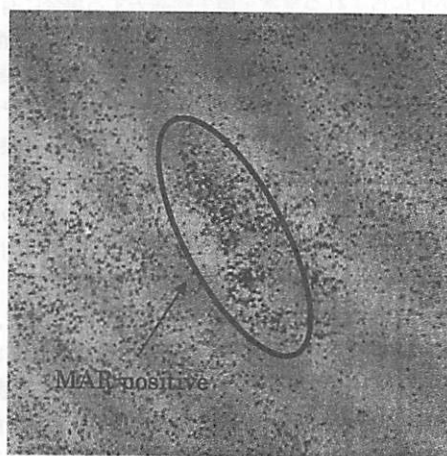


図4 第2段階におけるMAR画像

参考文献

- ¹⁾ Van de Graaf *et al.* (1996) *Microbiology*, **142**:2187-2196
- ²⁾ Saito *et al.* (1987) *Molecular Biology and Evolution*, **4**:406-425
- ³⁾ Amann *et al.* (1990) *Applied and Environmental Microbiology*, **56**:1919-1925
- ⁴⁾ Daims *et al.* (1999) *Systematic and applied microbiology*, **22**:434-444
- ⁵⁾ Schmid *et al.* (2001) *Environmental microbiology*, **3**:450-459
- ⁶⁾ Gich *et al.* (2001) *Archives of microbiology*, **177**:1-10
- ⁷⁾ Madigan *et al.* Brock微生物学 第9版

謝辞

本研究の一部は、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。ここに記して感謝の意を表します。