

B-46 海洋底泥から集積された 海洋性アナモックス細菌群集の構造解析

○金田一 智規^{1*}・栗田 貴宣¹・田邊 勝一郎²・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）

²広島大学工学部第四類（〒739-8527広島県東広島市鏡山1-4-1）

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

1. はじめに

アナモックス（嫌気性アンモニア酸化）細菌は下水処理場から15年ほど前に発見され、近年では実規模の処理プロセスが稼働している。一方、アナモックス細菌はアラビア海、黒海、ナミビア沿岸、ペルー沿岸など世界各地の貧酸素水塊や海洋底泥においても発見され、海洋における窒素ガス化の約30-50%を担っているといわれている¹⁾。最近の研究では、深海底熱水噴出孔からもアナモックス細菌が検出されている²⁾。日本国内においても、英虞湾や大阪湾で採取された試料から海洋性アナモックス細菌の存在が確認されている^{3,4)}。これらの海洋性アナモックス細菌は*Scalindua*属として提案されているが、系統学的には淡水性のアナモックス細菌よりも多様であり、現在では二種類のグループに分類されることが報告されている⁵⁾。また、海洋性アナモックス細菌の集積培養に成功した報告例は数件であり、最適培養温度やpHなどの条件については、未だ不明の部分が多い。これらの海洋性アナモックス細菌の特性を解明することによって、高塩濃度排水の窒素除去や閉鎖性水域での窒素除去への適用または海洋における窒素循環システムの解明につながると考えられる。

本研究では広島湾から採取した底泥を植種源とし、難培養微生物を高濃度に保持できる連続式のカラムリアクターを構築することで海洋性アナモックス細菌の集積培養を行うことを目的とした。さらにリアクターの窒素除去性能を把握するとともに、反応に関与する海洋性アナモックス細菌群集の構造を16S rRNAに基づく系統解析およびFISH法による構成比を求め、解析を行った。

2. 実験方法

(1) 海洋性アナモックスリアクターの運転

生物膜リアクターとして図1に示すような不織布シートを微生物担体とした上向流のガラスカラムリアクター

を用いた。リアクター容積は56 mL（内径26 mm、長さ105 mm）、生物膜表面積は52.5 cm²である。リアクターは20℃に設定した恒温器の中に設置した。海洋性アナモックス細菌の集積培養に用いた培地は人工海水（シーライフ、マリンテック社製）に van de Graaf⁶⁾らのアナモックス細菌用の培地を加え、1時間程度窒素ガスでパージすることでDOを0.5 mg/L以下にしたのちにリアクターへ連続通水した。運転開始後、流出の亜硝酸性窒素が枯渇した場合、培地中のアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素濃度を増加させるか、HRTを短くすることで窒素流入負荷を段階的に増加させた。初期HRTは0.9時間とした。植種源は広島湾奥部の海田湾の底泥（表層2 cm、水深7.4 m）をコアサンプラーに採取後、不織布に付着させ、カラムリアクター内に設置した。窒素濃度はイオンクロマトグラフィーを用いて亜硝酸性窒素および硝酸性窒素の濃度を測定し、アンモニア性窒素濃度はHACHにより測定した。得られた濃度とHRTから窒素流入負荷と窒素除去速度を計算した。

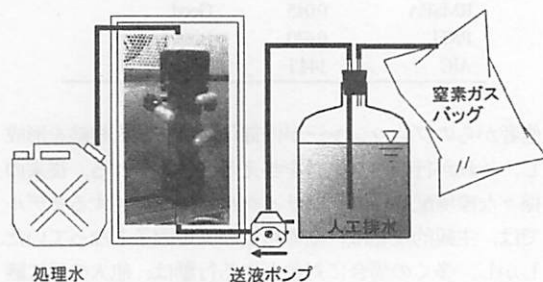


図1 リアクターの概要

(2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

運転開始から222日目にリアクター内のバイオマスを採取し、DNA抽出を行った。16S rRNA遺伝子に基づく系統解析に用いたプライマーセットはアナモックス細菌

が属する *Planctomycetales* 目を対象とした Pla46f-1390r と古細菌を対象とした Arc109f-Arc912r を用いた。得られたクローンの塩基配列をもとに ARB プログラムにより系統樹を作成した。

(3) FISH法による検出と存在割合の解析

FISH 法で用いたプローブは全細菌を対象するプローブ EUB338mix, アナモックス細菌を対象とするプローブ Amx368 を用いた。また、本リアクター内に優占的に存在するアナモックス細菌を対象とするプローブ Scal129a (5'-tac ccg gca caa ccc gct-3') および Scal129b (5'-tac tcg gca tta ccc gat-3') を ARB プログラムにより新規に設計し、FISH 法による可視化を行った。また、顕微鏡観察の結果から、全細菌の蛍光面積に対する設計したプローブの蛍光面積が占める割合を求め、優占種の構成比を求めた。

3. 結果と考察

(1) 集積培養結果とリアクターの窒素除去性能

運転開始から 40 日目でアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素の同時除去が見られ、114 日目には亜硝酸性窒素の除去率が 97% に達した (図 2)。流出の亜硝酸性窒素濃度が枯渇し始めた 119 日目に流入のアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素の濃度をそれまでの 1.5 倍にした。さらに同様の理由から 126 日目、158 日目にもアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素の濃度を 1.5 倍にした。なお、166 日目から 172 日目、276 日目では流入ポンプのトラブルに

より極端に流入窒素負荷が上ってしまった。412 日目には最大窒素除去速度 $1.36 \text{ kg N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成し、340 日以降の平均窒素除去速度は $1.17 \text{ kg N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ であった。また、340 日目を以降アンモニア性窒素の除去量と亜硝酸性窒素の除去量の比は 1 : 1.40 であり、アナモックス反応の化学量論式⁷⁾の比 (1 : 1.32) に近い値を示したことや、バイオマスの一部が赤褐色に変化したことから、リアクター内ではアナモックス反応が起こっており、アナモックス細菌が集積されたと考えられる。

(2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

図 3 にリアクター内から検出されたアナモックス細菌の系統樹を示す。解析できた 93 クローンのうち、クローン同士の相同性が 97% 以上ものを OTU としてまとめた結果、2 つのグループに分けることができた。これら 2 つの OTU はともに *Scalindua* 属に属する結果となった。Clone husup-a2 は *Candidatus Scalindua marina* やスウェーデンのフィヨルド底泥から集積されたクローンに近縁であり、98% の相同性であった。一方、Clone husup-a7 は日本やデンマークの海洋底泥から得られたクローンに近縁であった (97% の相同性)。これらの結果から本リアクター内には少なくとも二種類の海洋性アナモックス細菌が存在しており、うまく集積培養ができたと考えられる。

図 4 にリアクター内から検出された古細菌に関する系統樹を示す。解析できた 88 クローンのうち、OTU としてまとめてまとめた結果、9 つのグループに分けることができた。Clone husua-c3 は *Crenarchaeota* の Marine group 1 に属し、アンモニア酸化古細菌である *Nitrosopumilus*

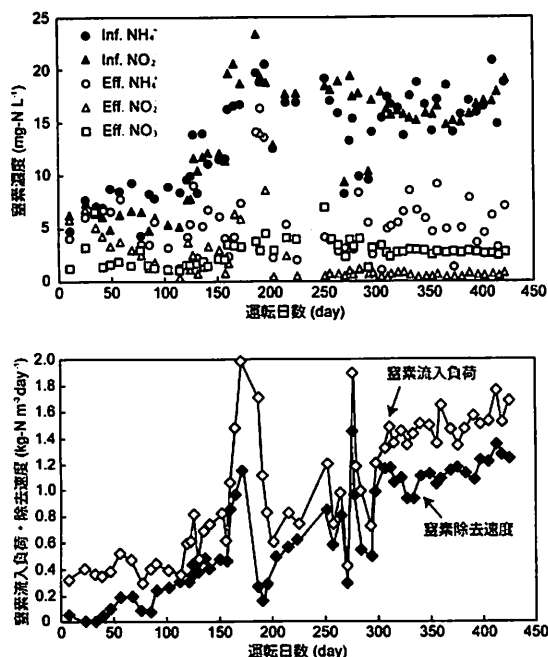


図 2 リアクターの窒素除去性能

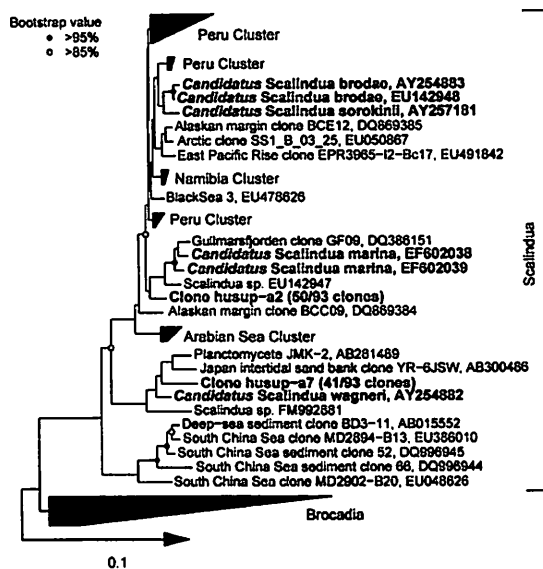


図 3 リアクターの窒素除去性能

maritimus に 99% の相同性であった。他の 8 つのグループは *Euryarchaeota* のクローンクラスターである pISA1 もしくは WCHS3-30 に属する結果となった。これらの OTU に近縁なクローンは海底熱水噴出孔、水田、湖沼底泥など様々な環境中から検出されているが、生理学的特性についてはほとんど明らかとなっていないのが現状である。したがってこれらのクローンがリアクター内でどのような機能を発揮しているのか、なぜアナモックス細菌と共存しているのかについては不明のままであり、今後は FISH 法による可視化を行い、MAR-FISH 法による機能の推定を行う予定である。

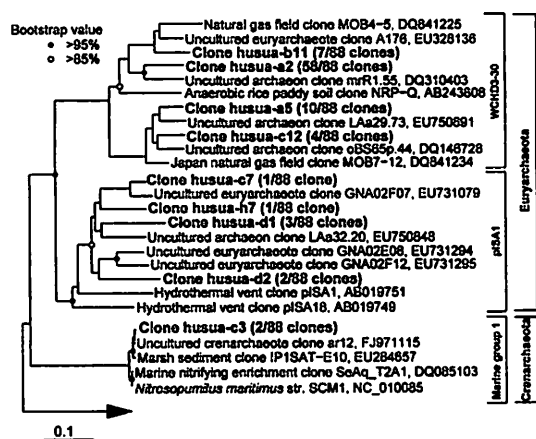


図 4 古細菌の系統樹

(3) FISH法による検出と存在割合の解析

リアクター内に存在する海洋性アナモックス細菌を可視化するために図 2 の塩基配列に基づき、Clone husup-a2 を対象としたプローブ Scal129a および Clone husup-a7 を対象としたプローブ Scal129b を設計した。設計したプローブの最適ホルムアミド濃度はオリゴの塩基配列と Tm 値から決定し、Scal129a は 35%，Scal129b は 20% とした。これらのプローブとアナモックス細菌全体を標的とする Amx368 プローブで二重染色した結果、本研究で検出された 2 種類の海洋性アナモックス細菌を個別に検

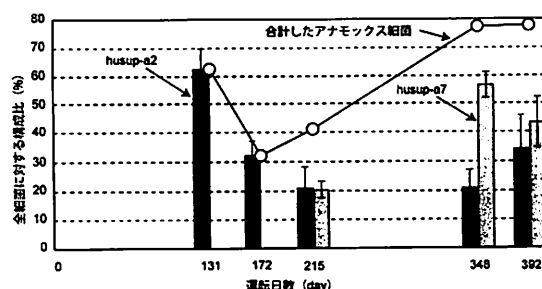


図 5 海洋性アナモックス細菌相の変化

出することができた。

全細菌を標的とするプローブ EUB338mix と新規に設計したプローブ Scal129a および Scal129b を用いて、経目的に構成比を求めたものを図 5 に示す。アナモックス反応が確認され、流入窒素負荷を上昇させた期間では Scal129a プローブで検出されるアナモックス細菌のみであり、全細菌に対して 62% を占めたが、ポンプトラブルにより窒素除去速度が減少した時期 (172 日目) には構成比が 32% まで低下している。一方、215 日目以降は Scal129b で検出されるアナモックス細菌の割合が増え、392 日目には二種類のアナモックス細菌が存在し、Scal129b で検出される細菌の割合のほうが多い結果となった。これらの結果から、Scal129a で検出されるアナモックス細菌は増殖速度が速く (優占化するのが早い)、低窒素負荷を好むグループであると考えられ、Scal129b で検出されるアナモックス細菌は増殖速度は遅く (優占化するのが遅い)、高窒素負荷に対応できると推察される。このように特性が異なる二種類の細菌が存在することで多少の負荷変動にも対応できると考えられる。

4. まとめ

本研究では広島湾から採取した底泥を植種源としてアナモックスリアクターを構築し、海洋性アナモックス細菌の集積培養に成功した。本リアクター内には少なくとも二種類の海洋性アナモックス細菌が存在しており、それらの構成比は流入窒素負荷に応じて変化していることがわかった。今後は共存する古細菌についての解析を進めるとともに、安定的なアナモックス活性維持の条件を検討し、塩分含有排水の窒素除去プロセス開発に繋げていく予定である。

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。

参考文献

- 1) Kuypers *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 6478-6483.
- 2) Byrne *et al.*, (2009) *ISME Journal*, **3**, 117-123.
- 3) Nakajima *et al.*, (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 1159-1166.
- 4) Kawagoshi *et al.*, (2009) *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 61-63.
- 5) Woebken *et al.*, (2008) *Environ. Microbiol.*, **10**, 3106-3119.
- 6) Van de Graaf *et al.*, (1996) *Microbiology*, **142**, 2187-2196.
- 7) Strous *et al.*, (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 589-596.