

アナモックス細菌の代謝の多様性

広島大学大学院工学研究科	学生会員	○西本一真
名古屋大学エコトピア科学研究所	正会員	栗田貴宣
広島大学大学院工学研究院	正会員	金田一智規
広島大学大学院工学研究院	正会員	尾崎則篤
広島大学大学院工学研究院	正会員	大橋晶良

1 研究背景・目的

嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)プロセスはアンモニアと亜硝酸を窒素ガスへ変換する生物学的プロセスである。プロセスを担うアナモックス細菌は下水処理場のような淡水環境だけでなく、黒海やペルー湾などの海洋環境中においても存在が確認されている¹⁾。淡水性アナモックス細菌と海洋性アナモックス細菌の生理学的特性は大きく異なっていることが明らかとなっている。例えば、淡水性アナモックスの至適温度は37°Cであるが、海洋性アナモックス細菌の至適温度は28°Cである¹⁾。また両細菌のゲノム解析の結果から、海洋性アナモックス細菌のみ有する遺伝子が発見されている^{2,3)}。

酸素極小領域の海洋環境中にはアナモックスプロセスに必要なアンモニウムはわずかながら存在するものの、亜硝酸はほとんど存在していない。このことから、海洋性アナモックス細菌は生存戦略としてアナモックス経路以外の代謝経路である、重金属の代謝などを行っていることが示唆される。

従来の窒素除去プロセスである硝化・脱窒法と比較すると、アナモックスプロセスは酸素曝気及び外部炭素添加のコストを大幅に削減できる。また、塩分含有排水中の窒素除去も海洋性アナモックス細菌を用いることで処理が可能になる。アナモックス細菌の持つ重金属代謝能を明らかにすることで重金属もしくは有機酸含有排水にもアナモックスプロセスが適用可能となる。

本研究ではゲノム解析の結果から代謝をする可能性があるマンガン及び鉄の酸化/還元能、有機酸の代謝能、硫酸還元能の3つの性質についてそれぞれ回分試験によって評価を行った。淡水性アナモックス細菌では、マンガンや鉄の酸化還元速度について一部報告されている⁴⁾ため、これらと比較し評価した。

2 実験方法

2.1 菌体の集積培養

本研究では、ラボスケールリアクターで培養されている、海洋性アナモックス細菌と淡水性アナモックス細菌を用いた。回分試験に用いる際に十分量の菌体が必要であり、up-flow column リアクターを用いて培養を行った。

リアクターは有効容積900 mLのものを用いた。培養には人工無機培地を使用し、水理的滞留時間(HRT)は5.0 h以下とした。淡水性アナモックス細菌の培養には微量元素を添加した人工無機培地を使用し、海洋性アナモックス細菌の培養では人工無機培地に人工海水塩(SEA LIFE)を添加した。塩分濃度はこれまでの研究によって得られた最適塩分濃度2.8%¹⁾を採用した。基質のpHは7.5とした。リアクターの運転温度は28°Cで行った。窒素負荷は流出水の亜硝酸濃度が5 mg-N L⁻¹となるようにし、負荷の増加はHRTの減少によって行った。

菌叢解析の結果¹⁾、図1に示すように海洋性アナモックス細菌は*Candidatus Scalindua wagneri*に近縁であり、淡水性アナモックス細菌は*Candidatus Brocadia sinica*に近縁であった。

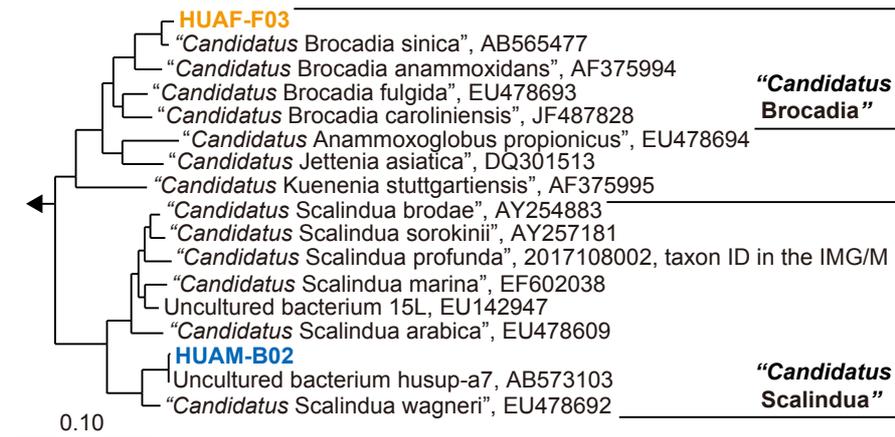


図1 菌叢解析結果

2.2 FISH法を用いた菌体構成比解析

リアクター内のアナモックス細菌の集積度を調べるために、FISH法を用いた顕微鏡観察を行った。FISH法では、海洋性アナモックス細菌に対して海洋性アナモックス細菌を特異的に蛍光標識するBS820と全細菌を特異的に蛍光標識するEUB338、EUB338II及びEUB338IIIを混合したEUB338mixを使用し、淡水性アナモックス細菌に対して淡水性アナモックス細菌を特異的に蛍光標識するAMX820及び上述のEUB338mixを使用した。その後、画像解析ソフトであるImage Jを用いて蛍光面積定量により菌体構成比を算出した。

2.3 回分試験

回分試験の条件を既往の知見に基づき電子供与体、電子受容体を確認項目により表1のように設定した。

表1 確認項目

確認項目	電子供与体	電子受容体
アナモックス活性	NH_4^+	NO_2^-
マンガン酸化物還元	HCOONa	MnO_2
マンガン酸化	Mn^{2+}	NO_3^-
硫酸還元	HCOONa	SO_4^{2-}
鉄還元	HCOONa	クエン酸鉄

表1に示すように、5種類の代謝について回分試験を実施した。回分試験は20 mLのバイアル瓶を用い、化学的な反応ではないことを確認するために菌体を入れない系をすべての回分試験で行った。各サンプルのばらつきを考慮するために全ての実験系列を3系列(n=3)として回分試験を行った。バイアル瓶内部の気相部分は高純度窒素ガスで置換し、嫌気状態を維持した。回分試験に用いる菌体をリアクターから採取し、確認項目の電子供与体と電子受容体を含まない培地で2回洗浄を行った。回分試験開始時のpHは7.5付近に設定し、培養温度は海洋性アナモックス細菌の活性が最も高い28°Cとした。マンガン酸化の系のみ培養液量を20 mLとし、その他の系は10 mLとした。培養終了時にはすべてのバイアル瓶内部の培養液を0.45 μmフィルターでろ過し、各測定に用いた。バイアル瓶に封入する菌体量はタンパク質濃度で評価し、約0.066-0.144 mg-protein vial^{-1} とした。本研究では全ての系において静置培養を行った。

3 結果と考察

FISH 法による顕微鏡観察の結果、海洋性アナモックス細菌の存在割合は $85.6 \pm 7.5\%$ であった。

回分試験の結果、アナモックス活性は $15.43 \text{ nmol mg-protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ であった。海洋性アナモックス細菌の最大比活性は $65 \text{ nmol mg-protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ と報告がある⁴⁾が、この値は連続式リアクターでの培養であり、基質の枯渇がないために高い値になったと考えられる。表 2 に本研究で得られた海洋性アナモックス細菌(*Candidatus Scalindua* sp.)の代謝速度とこれまでに報告されている淡水性アナモックス細菌(*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 及び *Candidatus Brocadia sinica*)の代謝速度を示す。マンガン酸化においては 1 週間の培養でもマンガン酸化速度は極めて小さいものであった。そのためマンガン酸化試験の実験デザインについて再度検討する必要はある。硫酸還元速度は $0.68 \text{ nmol mg-protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ であった。硫酸還元試験では培養終了時には菌体が黒変し、硫化水素臭が確認できたことから培養中に硫化水素が生成されている可能性があった。FISH 法の結果を考慮すると、実験に用いたタンパク質はすべてがアナモックス細菌ではないので、数%共存する硫酸還元菌が反応を担っているかどうか、培養終了時のバイオマスに対してアナモックス活性試験及び FISH 法による優占種の確認を行う必要がある。

表 2 淡水性及び海洋性アナモックス細菌のマンガン酸化/還元速度及び鉄還元速度、硫酸還元速度

回分試験	代謝速度($\text{nmol mg-protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$)		
	Ca. <i>Brocadia sinica</i>	Ca. <i>Scalindua</i> sp.	Ca. <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> ⁴⁾
アナモックス活性	16.0	15.4	—
マンガン還元	0.3	0.1	0.4
マンガン酸化	0.006	0.005	—
鉄還元	0.002	0.06	0.9
硫酸還元	0.45	0.33	—

4 まとめ

本実験で行った新規代謝の項目では、速度の差はあるものの全ての系で反応が確認され、海洋性アナモックス細菌は様々な代謝経路を有していることが示唆された。すべての代謝の中で代謝速度がアナモックス活性に次いで大きかった代謝は淡水性・海洋性ともに硫酸還元であり、海洋中に豊富に存在する硫酸を予備的な代謝として備えていると考えられたが、今後培養中の微生物叢の変化の有無を確認する必要がある。

参考文献

- 1) Awata et al.: Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium belonging to the "*Candidatus Scalindua*" group. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 79, 4145-4148, 2013
- 2) Strous M. et al.: Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, Vol. 440, 790-794, 2006.
- 3) van de Vossenberg J. et al.: The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environmental Microbiology*, Vol. 5, 1275-1589, 2013.
- 4) Strous M. et al.: Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, Vol. 440, 790-794, 2006.