

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26740035

研究課題名(和文) 海洋性アナモックス細菌の多様な代謝の機構解明

研究課題名(英文) The various metabolic pathway of marine anammox bacteria.

研究代表者

栗田 貴宣 (Awata, Takanori)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・助教

研究者番号：80724905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では海洋性アナモックス細菌の多様な代謝経路を明らかにすることを目的として研究を進めてきた。まず、マンガン酸化、マンガン還元、硫酸還元、鉄酸化、鉄還元に関する活性を調査した。その中で硫酸還元活性が一番高いことを明らかにした。しかしながら、バイオマス中には硫酸還元菌も存在することからそれらの増殖を確認する必要があった。その結果、硫酸還元菌の増殖は観察されなかった。これらのことより、アナモックス細菌は亜硝酸が存在しない環境下などでは硫酸還元によってエネルギーを得ることが可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the various metabolic pathway of marine anammox bacteria were investigated. Firstly, manganese oxidation, manganese reduction, sulfate reduction, iron oxidation, and iron reduction activity of anammox enrichment culture were investigated. The highest activity tested in this study was observed in the sulfate reduction activity test. However, the sulfate reducing bacteria were also contained in the anammox enrichment culture, therefore the growth of sulfate reducing bacteria should be investigated. As a result, no growth of sulfate reducing bacteria was observed. It is indicated that anammox bacteria might be able to obtain the energy from sulfate reduction under no nitrite environments.

研究分野：土木工学、環境微生物学

キーワード：アナモックス活性 硫酸還元

1. 研究開始当初の背景

嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)プロセスは、アンモニアを電子供与体、亜硝酸を電子受容体とし、それらを窒素ガスに変換する微生物反応である。このアナモックス細菌は排水中に含まれる窒素を高効率で除去することが可能であることから現行の硝化脱窒法に変わる処理プロセスとして期待されている。現行の硝化脱窒法では硝化槽において膨大な曝気エネルギーを必要とし、脱窒槽においては有機物質としてのメタノールの添加が必要であることに対し、嫌気性微生物であることから酸素を必要とせず、独立栄養微生物であることから有機物質の添加も必要ないという利点がある。また、余剰汚泥の発生量も70%程度削減可能であり、持続可能な社会を実現させるためには有効といえる。

反応を担うアナモックス細菌は海洋環境、湖沼、下水処理場など様々な環境中に広く存在している。アナモックス細菌は *Planctomycetes* 門に分類され、'*Candidatus Brocadia*', '*Candidatus Kuenenia*', '*Candidatus Jettenia*', '*Candidatus Anammoxoglobus*', '*Candidatus Scalindua*' の5属が提案されているが、その培養の困難さから純粋培養株は得られていない。その中でも '*Candidatus Scalindua*' に属する海洋環境由来のアナモックス細菌は2003年に黒海で発見されたという報告を初めに、ペルー、チリ、ナミビア、アラビア海、日本近海でも発見・報告がされているが、排水処理への適用までは発展していない。海洋環境中に生息する海洋性アナモックス細菌は、海洋環境中の窒素生成の30-70%を担うと言われており(Devol AH., 2003)、系統学的にも他とは大きく離れた1つのクラスターに分類され、ヒドラジン酸化酵素やはしご状の ladderane 脂質のような自然界でも珍しい構造を有しており、この非常に特殊ではあるが窒素循環に大きく関わっている微生物の生態を明らかにすることは「環境浄化への応用」への第一歩であり、循環型社会を目指した環境保全技術に繋がると考える。

我々の研究グループでは、富栄養化が懸念されている広島湾海洋底泥を植種源として上向流カラム式リアクターを用いて海洋性アナモックス細菌の集積培養に成功した(Kindaichi et al., 2011a, b)。この得られたバイオマス内には2種類の海洋性アナモックス細菌が同程度存在しており、それらの至適温度範囲が異なることを利用して培養を継続することでモノカルチャー化に成功した。TEM 画像解析の結果から、海洋性アナモックス細菌の菌体内部の大部分を anammoxosome という細胞内小器官が占めていることが確認でき、さらに鉄粒子の存在も確認できている。海洋性アナモックス細菌

は多種の鉄トランスポーターを有していると言われており、アナモックス細菌にとって鉄成分が重要な物質であることが示唆されている。

以上のように、窒素循環に大きく寄与していると言われる海洋性アナモックス細菌の集積培養およびその生理学的特性を明らかにしてきた。一方で、ゲノム解析によって窒素代謝メカニズムは明らかにされているものの、アナモックス細菌の純粋培養には至っておらず、その他の遺伝子についての知見は殆ど無い。窒素代謝経路以外のメカニズムを解明することは、窒素除去技術の飛躍的な向上だけでなく、自然環境中におけるアナモックス細菌の生態解明につながり、排水処理分野に留まらず地球環境規模の環境保全技術に発展する可能性を秘めている。

淡水性アナモックス細菌のゲノム情報を基に硝酸を電子受容体として鉄を酸化することが可能であることが確認されている(Strous et al., 2006)。一方で、海洋性アナモックス細菌は窒素に対する親和性が非常に高く、より鉄と硝酸を利用した反応を行いやすいと考えられるが、現在得られている知見は応用レベルに達していない。また、海洋性アナモックス細菌は、マンガン酸化を担うマルチカップパーオキシダーゼ遺伝子を有している(van de Vossenberg et al., 2013)が、淡水性のアナモックス細菌は有しておらず、窒素源が少ない海洋環境での生き残り戦略になっている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究は海洋性アナモックス細菌の鉄やマンガンを利用した代謝に関する研究であり、排水処理分野で注目されている窒素代謝以外に有効利用し得る代謝に注目している。海洋性アナモックス細菌は、排水処理場などに生息する淡水性のアナモックス細菌とは異なり、十分な窒素源を得ることが困難な環境に生息していることから、生存戦略としてアンモニア酸化以外の代謝によってエネルギーを起きている可能性が高く、補助的な代謝経路について詳細を明らかにすることは海洋環境の自浄作用や海洋環境浄化技術開発の基礎的な知見を得ることにつながるだけでなく、多種多様な産業排水への適用にも期待できる。

以上のことから本研究では、海洋性アナモックス細菌 '*Candidatus Scalindua sp.*' の集積培養系を用いて、アナモックスプロセスにおける主要な基質の他に海洋環境中で利用可能と考えられるマンガンイオン、マンガン酸化物、酸化鉄、硫酸塩、ギ酸塩、硝酸塩を電子供与体もしくは電子受容体とした場合の代謝活性を回分試験により評価することとした。

3. 研究の方法

(1) バイオマス

回分試験に用いるバイオマスは我々の研究グループで集積した 'Candidatus Scalindua sp.' が優占化しているバイオマスを植種源とした上向流カラムリアクター内で増殖したバイオマスを用いた。培地には人工海水をベースとした塩分含有無機培地を用いて培養を行った。塩分濃度は 2.0% (w/v) とした。上向流カラムリアクターの平均窒素負荷は $0.75 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、平均窒素除去速度は $0.6 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。回分試験に用いる際に、リアクター底部に堆積して基質が十分に供給される部分をシリンジで採取した。このバイオマスをアンモニウムおよび亜硝酸が含まれていない培地で 2 回洗浄を行った後に試験に用いた。

(2) 回分試験

リアクターから採取したバイオマスをホモジナイズし、再懸濁させたものを 20 mL のガラスバイアルに添加した。活性測定のためにアンモニウムおよび亜硝酸を 5 mM になるように添加し、20 時間の試験を行った。

マンガン還元試験では二酸化マンガンを 2 mM、ギ酸ナトリウムを 2.5 mM となるように添加した。マンガン酸化試験では塩化マンガン 0.02 mM 、硝酸ナトリウムを 2.5 mM となるように添加した。マンガンに関する試験に用いた培地はマンガンを含む微量元素溶液 (TE II) を添加しなかった。鉄還元試験ではクエン酸鉄を 0.2 mM、ギ酸ナトリウムを 5 mM となるように添加した。鉄還元試験も同様に、鉄を含む微量元素溶液 (TE I) を添加しなかった。硫酸還元試験では、硫酸イオン濃度が 16 mM、ギ酸ナトリウムを 2.5 mM となるように添加した。上記をバイアルに添加した後にゴム栓およびアルミニウムキャップで密栓した。密栓後、ガス置換装置により窒素ガスを充填し、嫌気条件を再現した。対照系としてバイオマスを添加しない系も同様に行った。

(3) FISH 法を用いた顕微鏡観察

FISH 法は Okabe ら (1999) の方法に準拠した。用いたプローブは全細菌を対象とした EUBmix、アナモックス細菌である 'Candidatus Scalindua wagneri' および 'Candidatus Scalindua sorokinii' を対象とした BS820 を用いた。画像解析ソフト ImageJ を用いて全細菌に占めるアナモックス細菌の割合を算出した。その際、蛍光面積構成比の算出は 24 視野の最大値および最小値をそれぞれ 2 視野ずつ除いた 20 視野の平均を用いた。

4. 研究成果

(1) バイオマスの特徴

FISH 法を用いた顕微鏡によって全細菌に占めるアナモックス細菌の割合を算出した結果、アナモックス細菌の優占度は $85.6 \pm 7.5\%$ であった。また、アナモックス細菌の活性試験を行ったところ、アンモニア酸化速度は $18.9 \text{ nmol mg-protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ であり、淡水性と同程度の活性を有していることを確認した。以上より、本研究で用いたバイオマスは回分試験を行うのに十分なアナモックス活性を有していることを確認できた。

(2) 重金属および硫酸塩の代謝活性

回分試験を行った結果、硫酸還元速度、マンガン酸化速度、マンガン還元速度、鉄還元速度、はそれぞれ $2.05, 0.005, 0.16, 0.01 \text{ nmol mg-protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ であった。この際用いたバイオマスの微生物群集構造解析を行ったところ、アナモックス細菌の優占度は 85% であり、硫酸還元菌の影響が懸念された。そこでリアルタイム PCR によって培養の前後で硫酸還元菌の増殖が起こったかどうかの確認を行ったところ、硫酸還元菌の増殖は確認できず、アナモックス細菌がこれらのプロセスに寄与していることが示唆された。硫酸還元プロセスはマンガン酸化、マンガン還元、鉄還元プロセスと比較してもオーダーレベルで大きく、海洋環境中ではおもに硫酸還元によって不足するエネルギー源をまかなっていることが予想されるが、今回の試験では測定を簡易的に行うこと、実排水への適用のために海洋環境中の硫酸イオン濃度よりも大きく設定したために今後検討が必要である。また、マンガンや鉄に関わる代謝について今回は非常に遅い速度のみ確認されたが、異なる条件についてのさらなる検討が必要と考えられる。

参考文献

Devol AH. 2003. Nitrogen cycle: Solution to a marine mystery, *Nature* 422: 575-576.

Kindaichi T, Awata T, Tanabe K, Ozaki N, Ohashi A. 2011a. Enrichment of marine anammox bacteria in Hiroshima Bay sediments. *Water Sci. Technol.* 63: 964-969.

Kindaichi T, Awata T, Suzuki Y, Tanabe K, Hatamoto M, Ozaki N, Ohashi A. 2011b. Enrichment using an up-flow column reactor and community structure of marine anammox bacteria from coastal sediment. *Microbes Environ.* 26: 67-73.

Okabe S, Satoh H, Watanabe Y. 1999. *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and

the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3182-3191.

Strous M et al. 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. Nature 440: 790-794.

van de Vossenberg J, Woebken D, Maalcke WJM, Wessels HJCT, Dutilh BE, Kartal B, Janssen-Megens EM, Roeselers G, Geerts W, van der Biezen E, Pluk W, Francoijs KJ, Russ L, Lam P, Malfatti SA, Tringe SG, Haaijer SCM, Op den Camp HJM, Stunnenberg HG, Amann R, Kuypers MMM, Jetten MSM. 2013. The metagenome of the marine anammox bacterium 'Candidatus Scalindua profunda' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. Environ. Microbiol. 15: 1275-1289.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

・粟田貴宣、西本一真、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良. 海洋性アナモックス細菌の重金属および硫酸塩代謝活性. 2014.土木学会論文集 G(環境)III_251-III_256.

[学会発表](計 2件)

1. 粟田貴宣、西本一真、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良. 海洋性アナモックス細菌の重金属および硫酸塩代謝活性. 第51回環境工学フォーラム2014年12月20日～22日、山梨大学

2. 粟田貴宣. 微生物の培養と野外注入～Membrane Bio-Reactorを用いた微生物の培養～. 第3回環境保全・バイオ活用研究会2015年1月29日、名古屋大学

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

粟田 貴宣 (AWATA, Takanori)
名古屋大学未来材料・システム研究所・助教
研究者番号：80724905

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：