

分子生物学的手法を用いた硝化細菌生物膜内における 硝化細菌の動態と生態学的相互作用の解析

学位論文内容の要旨

生物学的窒素除去プロセスは硝化細菌と脱窒細菌により達成されるが、硝化細菌は独立栄養細菌であるために、増殖速度が低く、外的環境因子の変動に弱いことから安定性に欠けることが問題となっている。硝化細菌の活性を強化し、安定した窒素除去プロセスを構築するためには、従来のように経験に基づくリアクターへの入出力操作だけでは不十分である。リアクターの運転条件や処理性能と反応を担う微生物群集の構造・機能・活性は密接に関連していると考えられ、生物膜内における細菌群の存在形態および空間的分布といった生態学的構造や増殖速度等、微生物の生理・生態を考慮した解析を行い、得られた知見をリアクターに適用することで安定的なプロセスが達成されると考えられる。

近年の分子生物学的手法の排水処理分野への適用により、処理システム内には多くの未同定の細菌が存在することが明らかとなっているが、培養が困難であるために生理学的特性が把握できない場合が多い。もし分離・培養ができたとしても、複合生物系における構造や機能を必ずしも反映しているとはいえない。したがって、できるだけ実際の環境(*in situ*)での生理学的特性を解析することが重要である。

本研究では、Full cycle rRNA approach を軸として、生物膜内における硝化細菌の構造および動態を解明することを目的とした。また、硝化細菌生物膜内に共存する従属栄養細菌の生態学的役割を明らかにし、生物膜全体としてどのような機能を有しているかを解析すること目的とした。まず、Full cycle rRNA approach により硝化細菌生物膜内に存在する硝化細菌および従属栄養細菌を検出・同定した。その後、Real-Time PCR 法を用いて硝化細菌の定量・動態および動力学的定数の推定を行った。また、MAR-FISH 法を用いて硝化細菌生物膜内に存在する細菌の基質利用特性を把握し、生物膜全体としての物質循環について考察した。

本論文の各章の内容は以下のようになっている。

第1章では、本研究の背景、目的および論文の構成について述べた。

第2章では、窒素循環と関与する細菌に関する知見をまとめるとともに、最新の分子生物学的手法として Real-Time PCR 法と MAR-FISH 法について述べた。

第3章では、FISH 法および Real-Time PCR 法を用いて、生物膜内の硝化細菌の定量を行い、従来の培養法では困難であった実際の生物膜内での動力学的定数の推定を行った。生物膜内では水質の結果と一致するようにアンモニア酸化細菌の増殖のあとに亜硝酸酸化細菌が増殖するといった硝化細菌の動態が確認できた。硝化細菌の最大比増殖速度は浮遊生物系よりも生物膜系のほうが低く、細菌間の競合やストレスによるものであると考えられる。生物膜内では浮遊生物系よりも多くの菌体数が必要であることが示唆された。

第4章では、硝化細菌生物膜内に存在する従属栄養細菌を対象として、Full cycle rRNA approach により従属栄養細菌の同定および生物膜内における硝化細菌との空間的位置関係を検討した。さらに MAR-FISH 法により従属栄養細菌の基質利用特性を把握した。その結

果、硝化細菌生物膜内に共存する従属栄養細菌は、硝化細菌のクラスターに存在するグループや生物膜全体に分布するグループといった硝化細菌との空間的位置関係に違いが見られた。 α -*Proteobacteria* と γ -*Proteobacteria* は ^{14}C acetic acid および ^{14}C amino acids を優占的に利用したことから生物膜内において低分子の有機物の分解に関与していることが示唆された。CF グループと *Chloroflexi* は生物膜内の構成比が低いにも関わらず、 ^{14}C NAG を優占的に利用し、生物膜内において高分子の有機物の分解に関与していることが示唆された。

第 5 章では、第 4 章を発展させ、硝化細菌の菌体を ^{14}C 標識し、硝化細菌由来の有機物を利用する従属栄養細菌群集を MAR-FISH 法により解析した。その結果、*Chloroflexi* グループは死滅した菌体由来の有機物を優占的に利用し、CF グループでは代謝由来の有機物を利用することが示唆された。 α -*Proteobacteria* は生物膜内において硝化細菌由来の有機物が分解された低分子の有機物を利用すると考えられた。MAR-FISH 法は複合生物系における基質利用特性・活性・物質循環の把握に有効な手法であり、環境中での挙動が未知である *Chloroflexi* 門の細菌の生理学的特性に関する知見が得られた。第 4 章と第 5 章から生物膜内では系統学的に異なる従属栄養細菌が多く存在し、硝化細菌由来の有機物を効率的に代謝することで、生物膜内で硝化細菌と共存関係が成り立ち、安定した生物膜生態系が形成されていると推察された。

第 6 章では、硝化反応の中間生成物であるヒドロキシルアミンが亜硝酸酸化細菌の増殖を阻害することを利用し、生物学的亜硝酸脱窒による窒素除去プロセスについて検討を行った。また、硝化細菌に及ぼすヒドロキシルアミン添加の影響についても検討した。その結果、低濃度のヒドロキシルアミンの連続添加によって亜硝酸酸化細菌の増殖を完全に阻害することができた。ヒドロキシルアミンの間欠添加では亜硝酸酸化細菌の増殖を完全に抑制できなかった。また、ヒドロキシルアミンの添加によって生物膜内における *Nitrosomonas* 属の存在形態 (増殖パターン) が球状のクラスターから分散状のシングルセルへと変化した。また、ヒドロキシルアミンの添加によってアンモニア平均消費速度は大きくなり、アンモニアの酸化が促進されることが示唆された。

第 7 章では、実際の環境中での硝化細菌の分布および多様性を評価する研究の一例として、様々な施設から採取した試料中のアンモニア酸化細菌群集に対して 16S rDNA に基づく系統解析を行い、優占種の特定と多様性を評価した。高アンモニア性窒素濃度では *Nitrosomonas europaea* が、低濃度では *Nitrosomonas oligotropha* が優占種となり、高塩濃度の環境下では、*Nitrospira* sp. が優占種となった。また、アンモニア性窒素濃度が極端に高濃度 (1000 mg-N/L) あるいは低濃度 (1 mg-N/L) である環境条件下では菌相が単純化し、中程度 (1-10 mg-N/L) のアンモニア性窒素濃度の環境下では、菌相に多様性がみられ、多様なアンモニア酸化細菌が反応を分担することで、外的環境要因の変動に柔軟に対応していることが示唆された。

第 8 章では、本研究で得られた結論を総括し、今後の研究の展望について記した。

本研究では生物膜内における硝化細菌の動態を明らかにすることができ、この結果から生物膜内における動力的定数を推定することができた。硝化細菌生物膜内に存在する従属栄養細菌は多様であり、生物膜内での硝化細菌との空間的分布や基質利用特性が異なることが明らかとなった。このように多様な細菌の関与によって生物膜全体として機能を持ち、安定した生物膜生態系が構築されていると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 義 公
副 査 教 授 高 桑 哲 男
副 査 教 授 眞 柄 泰 基
副 査 助 教 授 岡 部 聡

学 位 論 文 題 名

分子生物学的手法を用いた硝化細菌生物膜内における 硝化細菌の動態と生態学的相互作用の解析

生物学的窒素除去プロセスは硝化細菌と脱窒細菌により達成されるが、硝化細菌は独立栄養細菌であるために、増殖速度が低く、外的環境因子の変動に敏感であることから安定性に欠けることが問題である。硝化細菌の活性を強化し、安定した窒素除去プロセスを構築するためには、従来のように経験に基づくリアクターへの入出力操作だけでは不十分である。リアクターの運転条件や処理性能と反応を担う微生物群集の構造・機能・活性は密接に関連していると考えられ、生物膜内における細菌群の存在形態および空間的分布などの生態学的構造や微生物の生理・生態および増殖パターンを考慮した解析を行い、得られた知見をリアクターに適用することで安定的なプロセスが達成されると考えられる。

近年の分子生物学的手法の排水処理分野への適用により、処理システム内には多くの未同定の細菌が存在することが明らかとなっているが、培養が困難であるために生理学的特性が把握できない場合が多い。もし分離・培養ができたとしても、複合生物系における構造や機能を必ずしも反映しているとはいえない。したがって、できるだけ実際の環境 (*in situ*) での生理学的特性を解析することが重要である。

そこで、本研究では、フルサイクル rRNA アプローチを軸として、生物膜内における硝化細菌の構造および動態を解明すること、および、硝化細菌生物膜内に共存する従属栄養細菌の生態学的役割を明らかにし、生物膜全体としての機能を解析することを目的としている。まず、フルサイクル rRNA アプローチにより硝化細菌生物膜内に存在する硝化細菌および従属栄養細菌を検出・同定し、その後、Real-Time PCR 法を用いて硝化細菌の定量・動態および動力学的定数の推定を行っている。最後に、MAR-FISH 法を用いて硝化細菌生物膜内に存在する細菌の基質利用特性を把握し、生物膜全体としての物質循環について考察しており、新規性に富む研究である。

本論文の各章の内容は以下のようにになっている。

第 1 章では、本研究の背景、目的および論文の構成について述べた後、第 2 章では、窒素循環と関与する細菌に関する知見をまとめるとともに、最新の分子生物学的手法として Real-Time PCR 法と MAR-FISH 法について述べている。

第 3 章では、FISH 法および Real-Time PCR 法を用いて、生物膜内の硝化細菌の定量を行い、従来の培養法では困難であった実際の生物膜内での動力学的定数の推定を行っている。水質変化に対応するように、生物膜内ではアンモニア酸化細菌が増殖した後に、亜硝酸酸

化細菌が増殖することを確認している。酸素や基質の輸送律速、細菌間の競合やストレスのため、生物膜内における硝化細菌の平均比増殖速度は浮遊生物系よりも小さくなることを示している。

第4章では、硝化細菌生物膜内に存在する従属栄養細菌を対象として、Full cycle rRNA approachにより従属栄養細菌の同定および生物膜内における硝化細菌との空間的位置関係を検討している。さらにMAR-FISH法により従属栄養細菌の基質利用特性についても検討している。その結果、硝化細菌生物膜内に共存する従属栄養細菌は、硝化細菌のクラスター内に存在するグループや生物膜全体に分布するグループなど、硝化細菌との空間的位置関係に違いが見られることを示している。 α -Proteobacteriaと γ -Proteobacteriaは、 $[^{14}\text{C}]$ acetic acidおよび $[^{14}\text{C}]$ amino acidsを優占的に利用したことから、生物膜内において低分子の有機物の分解に関与していることを示唆している。CFグループとChloroflexiは生物膜内の構成比が低いにも関わらず、 $[^{14}\text{C}]$ NAGを優占的に利用し、生物膜内において高分子の有機物の分解に関与していることを明らかにしている。

第5章では、第4章を発展させ、硝化細菌の菌体を $[^{14}\text{C}]$ 標識し、硝化細菌由来の有機物を利用する従属栄養細菌群集をMAR-FISH法により解析している。その結果、Chloroflexiグループは、死滅した菌体由来の有機物を優占的に利用し、CFグループは、代謝由来の有機物を主に利用することを明らかにしている。 α -Proteobacteriaは、生物膜内において硝化細菌由来の有機物が分解され生じた低分子有機物を主に利用している。MAR-FISH法は複合生物系における基質利用特性・活性・物質循環の把握に有効な手法であり、環境中での挙動が未知であるChloroflexi門の細菌の生理学的特性に関する知見が得られており、微生物生態学的に大変興味深い結果である。第4章と第5章から生物膜内では系統学的に異なる従属栄養細菌が多く存在し、硝化細菌由来の有機物を効率的に代謝することで、生物膜内で硝化細菌と共存関係が成り立ち、安定した生物膜生態系を形成すると結論付けている。

第6章では、硝化反応の中間生成物であるヒドロキシルアミンが亜硝酸酸化細菌の増殖を阻害することを利用し、生物学的亜硝酸脱窒による窒素除去プロセスについて検討を行っている。その結果、低濃度のヒドロキシルアミンの連続添加によって亜硝酸酸化細菌の増殖を完全に阻害することができるうえ、ヒドロキシルアミンの添加によって生物膜内におけるNitrosomonas属の存在形態(増殖パターン)が、球状のクラスターから分散状のシングルセルへと変化することを明らかにしている。

第7章では、実際の環境中での硝化細菌の分布および多様性を評価する研究の一例として、様々な施設から採取した試料中のアンモニア酸化細菌群集に対して16S rDNAに基づく系統解析を行い、優占種の特定と多様性を評価している。その結果、アンモニア性窒素濃度が極端に高い(1000 mg-N/L)あるいは低い(1 mg-N/L)環境では、存在するアンモニア酸化細菌の菌相が単純化し、中程度(1-10 mg-N/L)の濃度環境下では、多様なアンモニア酸化細菌が存在することができ、外的環境要因の変動に柔軟に対応できることを示している。

第8章では、本研究で得られた結論を総括し、本研究で得られた知見の関連分野における位置づけを示して、今後の研究課題や問題点についても述べている。

これを要するに、著者は、最新の分子生物学的手法とマイクロオートラジオグラフィーを併用し、これまでブラックボックスとして取り扱われてきた硝化細菌生物膜内部を解析した結果、生物膜内には分子系統学的に異なる様々な従属栄養性細菌が存在し、硝化細菌由来の有機物を効率的に代謝することにより、硝化細菌との共存関係を確立し、安定した生物膜生態系を構築していることを実証したものであり、環境工学、水処理工学および環境微生物工学の新展開に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。