

微生物学的廃水処理リアクターを利用した難培養性深海メタン生成アーキアの分離・培養

水圏土壌環境制御研究室 青井 健

指導教員 山口隆司

1. はじめに

深海底を含めた地殻内環境から莫大な量で生成されるメタンの約半分は炭素同位体比の解析結果等から生物起源であると推定されている。しかしながら、実際に生物学的にメタンの生成が起きている深海底堆積物やメタンハイドレートを含まないコアサンプルを分子遺伝学的な手法で解析しても今までに知られているメタン生成アーキアに近縁な配列が検出されることは極めて稀であり、どの微生物が深海底環境においてメタンの生成に寄与しているのか十分に理解されていないのが現状である。その謎を解明するための1つのアプローチとして深海底堆積物からメタン生成アーキアを培養し、その多様性および生理学的・遺伝学的特徴を捉えることが必要であると考えられる。しかしながら、従来のバッチ式の培養法(バイアル瓶等を使った閉鎖条件下での培養方法)に依存した方法では安定的に深海底メタン生成アーキアを増殖させることは非常に困難であることが経験的に知られている。そこで本研究では、このような状況を打破すべく新規な培養技術を開発・導入することで、これまで困難とされてきた深海底メタン生成アーキアの分離・培養を試みた。その培養方法として微生物学的廃水処理リアクターの1つである下降流懸垂型スポンジ(down-flow hanging sponge: DHS)リアクターを用いて深海底堆積物からメタン生成アーキアの培養を試みた。数ある微生物学的廃水処理リアクターの形式の中から、DHSリアクターに着目した理由は、(1) DHSリアクターはスポンジ担体を微生物の固定担体として用いることから、増殖が極度に遅いと考えられる海底下微生物群をリアクターの内部に長期間に渡って保持することが可能であること、(2) DHSリアクターの特性としてスポンジ担体が気相中にさらされていることから、液体状および気体状基質をスポンジの内部にまで効率的に供給することができるため、その結果として菌体量を稼ぐことができること、(3) 加えて、DHSリアクターに限らずリアクターのようなflow-through型の培養方法は低濃度の基質を連続的に供給することができるため、エネルギーフラックスの低い海底下環境に準じた条件で培養が可能であること、代謝産物による増殖抑制や阻害の軽減をすることができる等のメリットがある。そこで本研究では、DHSリアクターで連続培養することにより代謝活性の高くなった深海底堆積物スラリーを植種源として、メタンを生成する嫌気性微生物群集培養および分離を試みた。

2. 実験方法

DHSリアクターに植種した深海底堆積物は地球深部探査船「ちきゅう」により下北半島東方沖で採取されたコアサンプル(水深1,180 m)を用いた。本研究で使用したDHSリアクターは、高さ1.5 m、断面10 cm×10 cmの密閉型アクリル製リアクターを使用し、内部にポリプロピレン製のネットリングにポ

リウレタンスポンジをはめ込んだスポンジ担体(size:φ27 mm×32 mm)150個をランダムに充填した(Fig.1)。水理的滞留時間は84時間に設定し、10°Cに保った恒温器内で連続運転を行った。リアクターにはグルコース、酢酸、プロピオン酸および酵母エキスを含む人工海水(4.5:2.25:2.25:1、COD比、流入濃度200 mg-COD/L, pH7.5)を通水した。

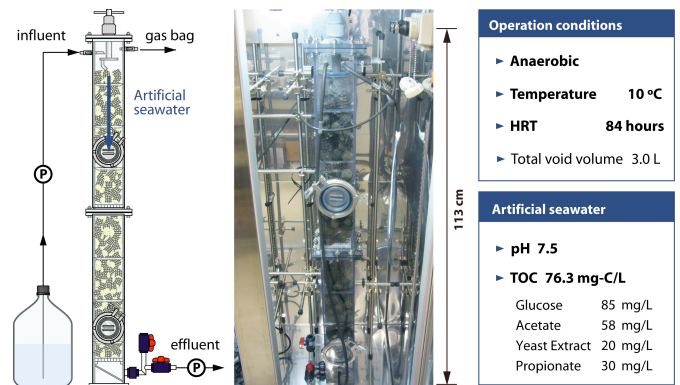


Fig.1 Schematic of DHS reactor for cultivation of methanogenic microbial community.

3. 実験結果および考察

3-1. DHSリアクターを利用した深海底微生物の連続培養

現在、DHSリアクターは約950日間連続運転を行っている。毎日流出水のpHとORPの測定を行い、pHは7.2-7.6程度で推移し、ORPは-300 - -400 mV程度とメタン生成アーキアが生育可能な嫌気状態が保たれていた。加えて、運転開始179日目以降から2ヶ月毎に流入および流出水の詳細な水質分析およびリアクター気相中気相部のガス組成の分析を行った(Table1)。メタンはDHSリアクターの運転開始から289日目で初めて検出された。生成されたメタンの炭素同位体比を測定した結果、-68- -78‰と“同位体的に軽い”メタンが生成されていることから、リアクター内部で生成されているメタンは生物由来であることが推察された。水質分析の結果では、グルコースが完全に消費されていることがリアクターの運転初期から確認されたが、酢酸とプロピオン酸は運転開始631日目で初めて減少が観察された。また、運転開始から560日目までにおいて酢酸の濃度は流出水の方が高くなっていることから、グルコースが微生物により代謝されて酢酸が生成されていると考えられた。これらガス分析と水質分析の結果、そしてメタンの炭素同位体比の値が軽くなっているという結果から、本リアクター内では水素資化性のメタン生成アーキアが優占的にメタン生成を担っていたと考えられた。従来の研究においても深海底環境から生成するメタンの大部分は水素由来のメタン生成と考えられており、本DHSリアクターは実際の深海底堆積物環境を模擬できていると考えられる。

Table 1 Changes of substances concentrations during the DHS reactor operation.

	Theoretical values of influent	Sampling day of effluent										
		179	230	289	357	420	491	560	631	693	761	826
TOC (mg-C/l)	76.17	59	69	52	68	17	42	45	17	16	21	23
Glucose (mg-C/l)	34.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yeast extract (mg-C/l) ^a	10.47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetate (mg-C/l)	17.06	31	36	28	40	28	31	23	16	20	18	10
Propionate (mg-C/l)	14.46	12	19	11	18	11	12	12	7	8	6	5
Dissolved CH ₄ in effluent (mg-C/l)		0.01	0.02	ND	0.1	0.2	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.2
CH ₄ in gas collection bag (mg-C/l)		0	0	1.5	3.5	3.6	8.4	10.1	8.0	5.9	9.0	3.6
δ ¹³ C-CH ₄ (‰)		—	—	—	-75.0	-78.1	-64.5	-60.1	-60.9	-61.7	-62.8	-64.4
δ ¹³ C-CO ₂ (‰)		—	—	—	—	-15.0	-15.6	-15.7	-15.7	-14.7	-15.5	-15.9

—, not measured. ^aYeast extract was calculated on the assumption that the chemical component is C₅H₇NO₂.

3-2. 微生物種の同定

培養されてきた微生物種の同定を行うため、運転開始 358 日目と 560 日目、761 日目にリアクターからスポンジ担体を採取し、FISH 法とクローン解析を行った。バクテリアおよびアーキアの 16S rRNA に特異的なプローブを用いて FISH 法を行った結果、様々な細胞形態を持つ微生物を検出することに成功した。通常、深海底堆積物のような微生物の代謝活性が著しく低いサンプルに通常の FISH 法を適用し検出することは不可能である。続いて、RNA および DNA を抽出し、それらを鋳型にして 16S rRNA および mcrA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った (Fig.2)。その結果、多様な系統分類群に属する微生物がリアクター内に培養されていることが示唆された。加えて、検出されたクローンの多くは深海底環境から頻繁に検出されるクローンに近縁であった。クローンの近縁種の多くは糖類を分解してエネルギーを得るような代謝様式を持つ通性あるいは偏性嫌気性のバクテリアであり、グルコースが分解されているという水質分析の結果と一致するものであった。一方、アーキアの多くは従来知られているメタン生成アーキアが属するグループに近縁なクローンであったが、DSAG や Rice Cluster III と呼ばれる、深海底堆積物に普遍的かつ優占的に存在し、深海底環境において重要な役割を果たしていることが推定されている未培養アーキアも検出された。これらの結果は、本リアクター内には代謝活性が高く多様な微生物が培養されていることを強く示唆するものであった。

3-3. 純粋分離株の取得

続いて、リアクター内から採取したスポンジを植種源として、従来のバッチ式の集積培養法によってメタン生成アーキア等の各種微生物の純粋分離株の取得を試みた。メタン生成アーキアの培養は、水素やギ酸などのメタン生成アーキアが一般的に利用する基質を用いて培養を行った。その結果、先のクローン解析において優占種として検出された *Methanobacterium* 属および *Methanococcoides* 属、*Methanosarcina* 属に属するメタン生成アーキアの分離に成功した (Fig.3)。さらに、深海底堆積物の優占種であり培養が困難とされている嫌気性バクテリア 2 種の分離に成功した。さらに、深海底堆積物に対してクローン解析を行うと優占的に検出される DSAG の分離を試みた結果、現在までに純粋分離はできていないが、バッチ式の培養に成功し、水素、ギ酸を基質として利用可能であり、抗生物質はアンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、バンコマイシンに耐性がある直径 0.4 μm 以下の小さい微生物である可能性が高いと示唆された。また、10-30 °C の温度条件で増殖可能であった。

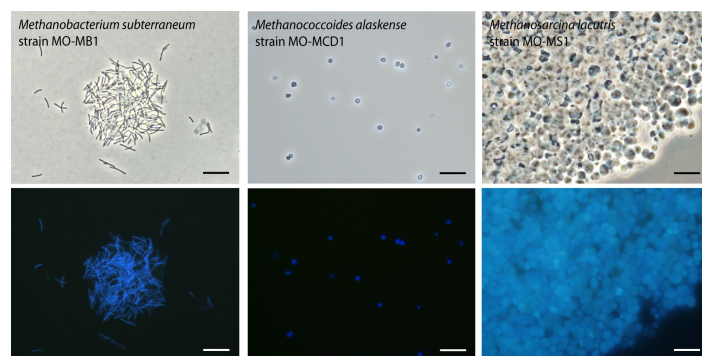


Fig. 3. Photomicrographs of Methanogens cultivated from the DHS reactor. Phase Contrast (upper) and epifluorescent micrograph (lower) indicating F420 autofluorescence methanogen-like cells for an identical field. Bars, 10μm.

4. まとめ

微生物学的廃水処理リアクターを用いて、深海底環境において重要なメタン生成アーキアを代謝活性が高い状態で培養することができた。DHSリアクター内のスポンジを植種源とし、従来のバッチ式の集積培養法でメタン生成アーキアの培養に成功した。以上の結果より、DHS リアクターのような廃水処理リアクターを用いた連続培養法は深海底メタン生成アーキア等の難培養微生物の培養に非常に有効な方法の 1 つであることが強く示唆された。

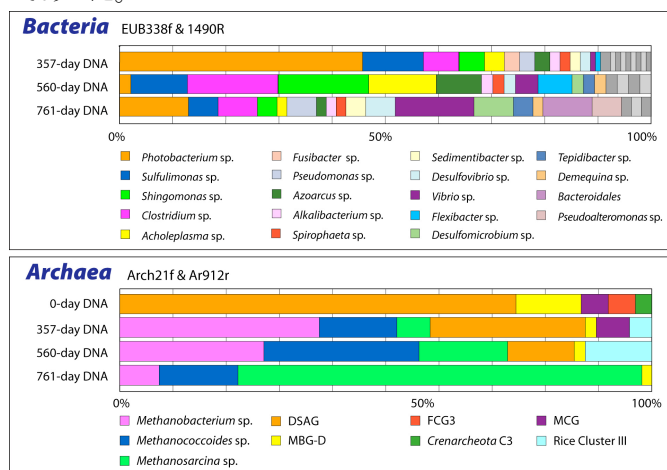


Fig. 2. Bacterial and Archaeal Phylogenetic distribution of 16S rRNA gene clone from the DHS reactor.