

難培養性亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* を標的とした新規な分離培養戦略

A Novel Cultivation and Isolation Strategy for Uncultured Nitrite-Oxidizing Bacteria of the Genus *Nitrospira*

藤谷 拓嗣, 常田 聡*

HIROTSUGU FUJITANI and SATOSHI TSUNEDA

早稲田大学先進理工学部生命医科学科 〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2

* TEL & FAX: 03-5369-7325

* E-mail: stsuneda@waseda.jp

Department of Life Science and Medical Bioscience, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University,
2-2, Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan

キーワード: 硝化, 培養, マイクロコロニー, セルソーター

Key words: nitrification, cultivation, microcolony, cell sorter

(原稿受付 2015年3月9日/原稿受理 2015年3月15日)

1. はじめに

環境中には細菌や古細菌などの多種多様な微生物が雑多に存在し、複合微生物系を形成している。近年、遺伝子ベース (特に 16S rRNA 遺伝子) で解析する分子生物学的手法の発展に伴い、環境中に生息する微生物の数、多様性、群集構造などの知見が多く得られている。一方、新規で有用な微生物の取得や個々の微生物の機能解明を行うためには、環境中から微生物を純菌株として取得することが必須である。したがって、微生物を分離培養する技術はいつの時代でも普遍的に必要とされている。しかし、微生物の分離培養技術は、近代細菌学の開祖 Robert Koch が開発した寒天プレートに代表される純粋培養法に端を発するものの、100年以上経った今もなお、大きな技術革新には至っていない。その結果、地球上に生息する 99%以上の微生物は未だ培養できない難培養性微生物として認識されている。したがって、“欲しい微生物が存在しているのに、ほとんどが培養できない”という根本的な問題を解決するためには、新しい分離培養手法を開発することが必要である。そこで本稿では、難培養性微生物の代表種で、窒素循環の硝化反応を担う亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* を標的とした新規な分離培養戦略を紹介したい。

2. 活性汚泥中に生息する難培養性亜硝酸酸化細菌

Nitrospira

亜硝酸酸化細菌 (nitrite-oxidizing bacteria: NOB) は排水処理施設の生物学的窒素除去プロセスにおいて、重要な反応段階を担っている。排水処理施設の活性汚泥中において優占種として確認されている亜硝酸酸化細菌は、*Nitrospirae* 門もしくは *Nitrobacter* 属に属しているグルー

プである。一般的に、分離培養解析が主流であった時代では、活性汚泥由来の *Nitrobacter* が実験室で繰り返し培養されていたために、*Nitrobacter* が亜硝酸酸化に参与していると考えられていた。しかしながら、培養に依存しない分子生物学的手法^{3,20}や免疫学的技術¹の発展により、*Nitrospirae* 門に属している未培養の細菌が、海洋、実験室規模の硝化反応槽、大規模な排水処理施設において優占的な亜硝酸酸化細菌であることが明らかになってきた。

分子生物学的なアプローチを適用することで、生理学的特性に関する見識が得られてきたものの^{4,16,17,21}、*Nitrospira* に関する詳細な生化学的な解析や遺伝子レベルの解析を行うためには、高度に集積培養を行うか、純粋培養を行うことが依然として必要である。このような理由から、Bartosch ら¹は、低濃度の亜硝酸 (3 mM) を含んだ混合栄養の培地で、活性汚泥から *Nitrospira* を選択的に濃縮し、高濃度の亜硝酸 (30 mM) を含んだ培地で、*Nitrobacter* が *Nitrospira* より優位に増殖することを見出した。後に、抗生物質アンピシリンを利用した濃縮実験で、*Nitrospira* の占有率が全細菌数に対して約 86%まで濃縮され¹⁸、*Nitrospira defluvii* を対象としたメタゲノム解析により、亜塩素酸分解酵素の存在、さらには進化的に *Nitrospira* 属と嫌気性アンモニア酸化を担う *Planctomycetes* 門の間における遺伝子水平伝播が起きていることが報告された^{13,15}。しかし、現在までに得られている純菌株には限りがあり^{6,10-12,22}、未だに排水処理施設の活性汚泥からは得られていない。

Nitrospira の純粋培養が難しい理由として、高濃度の遊離亜硝酸による阻害を受けること²、増殖速度が遅いこと¹⁴、従属栄養性微生物など他の微生物と凝集体を形成していること¹¹、などが挙げられる。そこで筆者らは、これらの問題点を克服し、活性汚泥中に生息する

Nitrospira の純粋培養を目指して、2つのステップからなる新しい分離培養手法を開発した。まず、1) 亜硝酸塩を含有する無機性の基質を連続的に供給した集積培養槽内で *Nitrospira* の高度集積化を行った。つづいて、2) セルソーターを使用し、集積サンプル中に存在している *Nitrospira* のマイクロコロニー (10–100 細胞) の大きさと凝集構造に着目し、蛍光標識を用いずに分画することで、マイクロコロニーだけを“生きたまま”特異的に分取することを目指した。分取したマイクロコロニーを 96 ウェルプレートに一つずつ分注し、亜硝酸塩を含有した培地で培養することで、*Nitrospira* の純粋培養を実現した。その後、継代培養と保存方法を確立し、詳細な生理学的特性について解析した。

3. 連続流入式の高度集積培養槽を用いた *Nitrospira* の集積化

3.1 活性汚泥からの *Nitrospira* の集積化

低濃度の亜硝酸を連続的に供給することが可能な混合型集積培養槽を設計し *Nitrospira* の高度集積化を試みた (図 1)。2009 年 2 月に都市下水処理施設より採取した活性汚泥を種汚泥とし、亜硝酸を含有する無機性基質を連続的に供給し培養を行った。微生物固定化担体として不織布を用いることで⁹⁾、汚泥中の *Nitrospira* を付着させた。培養は好気条件下で行い、pH は 7.5 から 8.1 の範囲で調整した。流入する亜硝酸態窒素濃度および流速を上げることで、負荷量を上昇させた。ただし、遊離亜硝酸による阻害の影響を防止するために槽内の亜硝酸態窒素濃度が最大 10 mg-N L^{-1} を越えないように制御した。培養期間は 400 日とし、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法により、定期的に細菌数をモニタリングした。FISH 法で用いたプローブは、*Nitrospira*, *Nitrobacter* をそれぞれ特異的に標識する Ntspa 662, Nit 3 とした^{4,20)}。つづいて、*Nitrospira* 集積培養槽より採取したサンプルから DNA を抽出した。抽出 DNA から細菌由来の 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマー、27F, 1492R を用いて PCR 増幅を行った。16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリーを作成し、集積培養槽内の群集組成について調査した。

培養期間中、負荷と槽内の亜硝酸濃度、全微生物数に占める *Nitrospira* の割合 (占有率) をモニタリングした (図 2)。*Nitrospira* を集積するために、一定期間ごとに

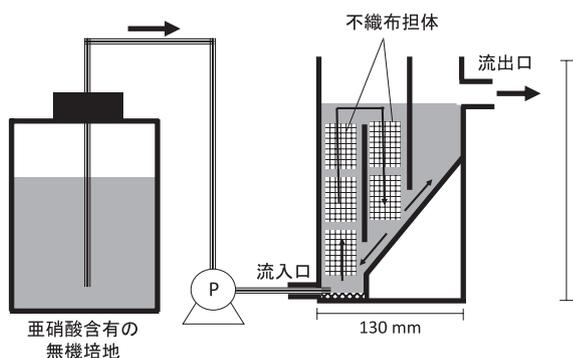


図 1. 高度集積培養槽の概略図

負荷を上昇させ、槽内の亜硝酸濃度は 10 mg-N L^{-1} 以下にコントロールした。元の活性汚泥サンプルにおける占有率は 1% 以下であった。初期汚泥から運転を行い、培養日数 100 日を経過してから、*Nitrospira* の占有率の上昇が確認された。その後も揺らぎを起ししながら上昇を続け、培養 342 日目で占有率 69.2% に到達した。その後、集積サンプルは 2 年以上に渡り、高い占有率を維持することができた (平均占有率 80%, 最高値 96%)。一方、培養期間を通して *Nitrobacter* の存在は FISH で確認できなかった。*Nitrospira* を選択的に集積する過程において、同じ亜硝酸酸化細菌である *Nitrobacter* や他の従属栄養性微生物の増殖を抑えることは重要である。基質である亜硝酸をめぐる競合において、*Nitrospira* は K-戦略、*Nitrobacter* は r-戦略をとることが知られている^{17,21)}。*Nitrospira* は *Nitrobacter* より亜硝酸に対する感受性が高いことから、本実験のように低濃度の基質を連続的に供給することによって、効率的かつ選択的に *Nitrospira* が集積されたと示唆される。また、集積サンプルから得られた全 83 クローンのうち、32 クローンが *Nitrospirae* 門に属していた。そのうち、28 クローンは sublineage I に属し、4 クローンは sublineage II に属することが確認され、培養槽内には系統学的に異なる 2 種類の *Nitrospira* が集積されていることが判明した。

3.2 系統学的に異なる 2 種類の *Nitrospira* の選択的集積化

集積培養槽内の亜硝酸濃度を制御することで、系統学的に異なる 2 種類の *Nitrospira* (sublineage I, II) を選択的に集積することを目指した。2 種類の *Nitrospira* で、亜硝酸に対する親和性や感受性の違いから優位に増殖する条件が異なるのではないかと、という仮説を立てた^{5,14)}。3.1. で集積したサンプルを用い、図 1 で示された集積培養槽と同じタイプの培養槽を設置した。培養期間中は、

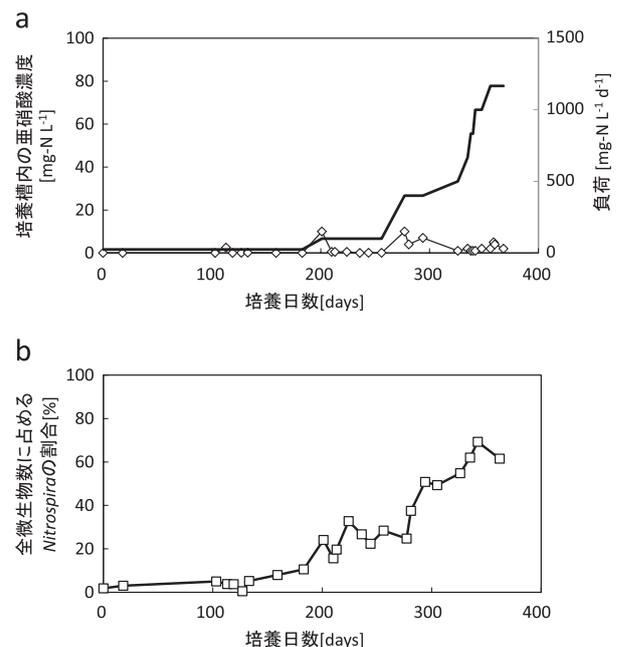


図 2. 集積培養における経日変化 (a) 槽内の亜硝酸濃度 (◇) と負荷 (直線), (b) *Nitrospira* 占有率

FISH 法により定期的に細菌数をモニタリングした。FISH 法で用いたプローブは, *sublineage I, II* をそれぞれ特異的に標識する *Ntspa 1431, Ntspa 1151* とした¹⁴⁾。

集積培養槽内の亜硝酸濃度は流速と流入の亜硝酸濃度によって制御した。236 日まで槽内の亜硝酸濃度が平均 3.8 mg-N L^{-1} で維持された。その間, *sublineage I* の占有率は高く維持され, 111 日目で最大 88.3% を記録した。237 日以降, 槽内の亜硝酸濃度を 1 mg-N L^{-1} 以下 (平均 0.24 mg-N L^{-1}) に制御すると, *sublineage I* の占有率が減少し, *sublineage II* の占有率が上昇し, 355 日目で最大 53.8% に到達した。以上の結果から, 集積培養槽内の亜硝酸濃度を低い値で厳密に制御することで, 系統学的に異なる 2 種類の *Nitrospira* を選択的に集積することに成功した。また, 2 種類の *Nitrospira* で亜硝酸に対する親和性や感受性に違いがあることが確認された⁷⁾。

4. セルソーターによるマイクロコロニーの選択的分取

集積培養により *Nitrospira* の占有率を高めても, 培養に基づいたアプローチだけでは他の微生物を完全に除去することはできない。したがって, *Nitrospira* を選択的に分取することが, 次なる課題であった。集積サンプルを超音波で分散すると, 形態的な特徴から大きく 3 つの種類に大別される。すなわち, *Nitrospira* の細胞からなるマイクロコロニー (10–100 細胞), 複数種の菌体からなる凝集体, 浮遊したシングルセルである。このような形態の違いから, 培養を介さないで物理化学的に *Nitrospira* のマイクロコロニーを分取することが可能ではないか, と着想した (図 3)。

集積培養槽から 413 日目にサンプルを採取し, 超音波処理を行い, フロックを粉碎した。その後, 孔径 $35 \mu\text{m}$ のセルストレーナーによりろ過し, 粉碎しきれなかったフロックを除去した。分散したサンプルをセルソーターに供試し, *Nitrospira* の分取を試みた。パラメーターは, 凝集体の大きさを示す前方散乱光 (Forward scatter; FSC) と凝集構造を示す側方散乱光 (Side scatter; SSC) とした。最終的に純粋培養を行うため, 生きたまま細胞を分取する必要があり, 蛍光染色を必要としないパラメー

ターを用いた。分取前と後のサンプルにおいて, FISH 法により *Nitrospira* の占有率を評価した。

集積サンプルをセルソーターに供試したところ, 特徴的なドットプロットが得られた。FSC と SSC の値に基づき, エリアを設定した。SSC が大きいエリアでは複数種の菌体からなる凝集体, フロックが分取されたが, SSC が小さいエリアではマイクロコロニーを分取することができた。特に FSC が大きいエリアでは, より高効率でマイクロコロニーを分取することができ, *Nitrospira* の占有率は 99% 以上を占めた。したがって, セルソーターを用いることで集積 (複合系) サンプルから *Nitrospira* マイクロコロニーのような同種の細胞の塊を選択的に分取できることが確認された。

5. 純粋培養と生理学的特性の解析

5.1 純菌株の同定

セルソーターから分取したマイクロコロニーを 96 ウェルプレートに一つずつ分注し, 純菌株の獲得を試みた。亜硝酸 ($2\text{--}10 \text{ mg-N L}^{-1}$) を含有した無機性培地で 1 ヶ月培養した。培養中は, 亜硝酸濃度の測定と顕微鏡観察を通じて, 増殖の有無を確認した。培養後, 獲得した純菌株について 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行い, シークエンスを同定した。

亜硝酸を含有した無機性培地で 1 ヶ月培養したところ, 一つのマイクロコロニー (10–100 細胞) から $10^6\text{--}10^7$ 細胞まで増殖していることが確認された。16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析から, 系統学的に異なる 2 種類の *Nitrospira* 純菌株を獲得することができた (図 4)。一つは *sublineage I* に属する純菌株 strain ND1 であり, *Candidatus Nitrospira defluvii* との相同性は 99% であった⁸⁾。もう一つは *sublineage II* に属する純菌株 strain NJ1 (*Nitrospira japonica*) であり, *Nitrospira moscoviensis* との相同性は 94% であった¹⁹⁾。この二つの株は, 活性汚泥から獲得された世界初の *Nitrospira* 純菌株である。さらに, 河川水サンプルを対象に本研究の分離培養手法を適用したところ, *sublineage II* に属する純菌株 strain NA1 (*Nitrospira aquarum*) の獲得にも成功した。した

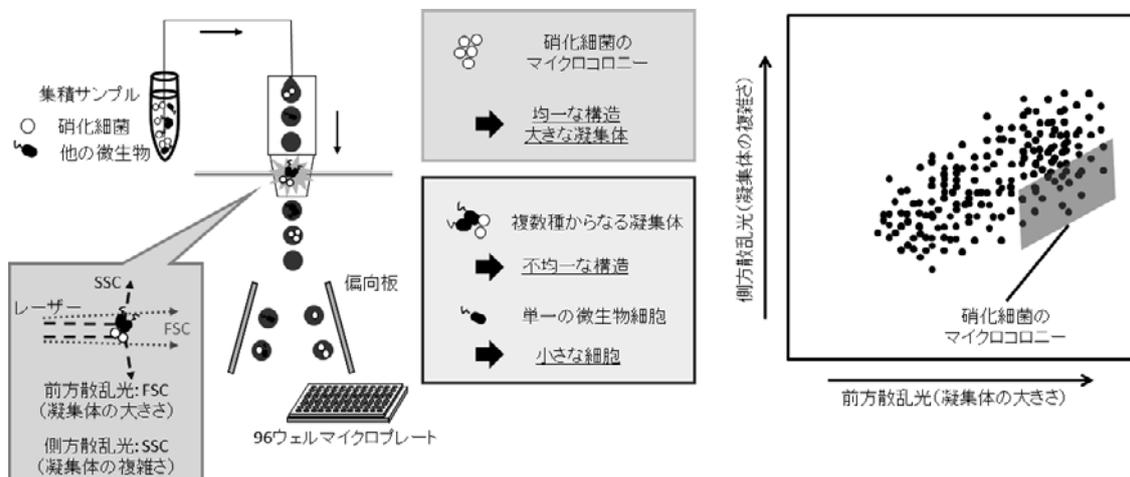


図 3. セルソーターによる分取原理とドットプロット

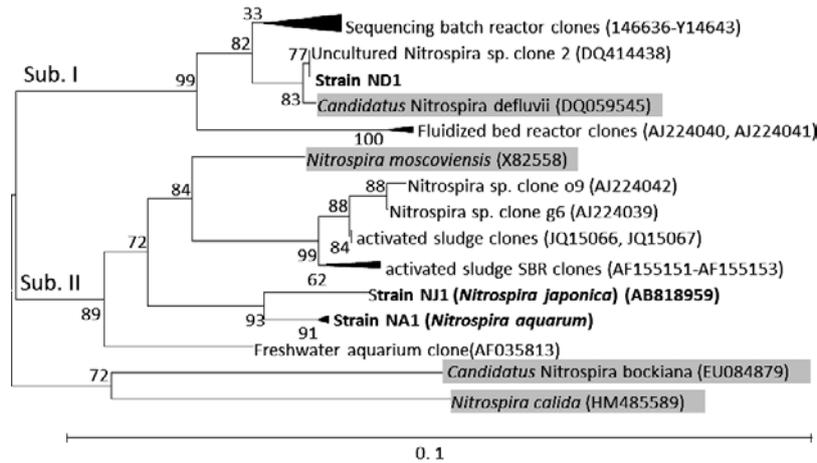


図 4. 16S rDNA 遺伝子に基づいた純菌株 *Nitrospira* の系統樹

がって、本手法は他の環境サンプルにも適用可能であることが示された。

5.2 生理学的特性の解析

獲得した *Nitrospira* 純菌株を用いて、生理学的な性質を調べた。温度依存性、アンモニア耐性については、培養 3 日間における亜硝酸消費量（硝酸生成量）を測定し、亜硝酸酸化速度として算出した。尿素分解能については、アンモニア生成量を測定し、アンモニア生成速度として算出した。また、純菌株の形態について、SEM（凍結乾燥法）および TEM（樹脂包埋切片法）を用いて観察した。

獲得した純菌株は、温度に応じて亜硝酸酸化速度が著しく変化し、strain ND1 は 28°C、strain NJ1 は 31°C、strain NA1 は 30°C で最も高い亜硝酸酸化速度を示した。また、strain NJ1 は、ある一定濃度のアンモニアに対して耐性があることが示唆された。さらに興味深いことに、すべての純菌株において尿素を分解しアンモニアを生成することが確認された。これらの知見は、アンモニア酸化細菌との新たな共生関係の可能性を示唆している。

また、顕微鏡の観察結果から、純菌株はいずれも粒径数 μm 程度のマイクロコロニーを形成し、EPS で囲まれていることが明らかになった（図 5）。これまで報告されてきた *Nitrospira* の形態と同様に、シングルセルの状態では、細長く細胞成長した形を有し、分裂状態に入ると EPS を分泌しながら球状に縮小し、数細胞のマイクロコロニーを形成すると考えられる^{12,18)}。

6. おわりに

筆者らは、連続流入式の混合型集積培養槽を用いることで、難培養性亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* を集積することに成功した。また、槽内の亜硝酸濃度を厳密に制御することで、系統的に異なる 2 種類の *Nitrospira* を選択的に濃縮した。つづいて、*Nitrospira* が形成するマイクロコロニーに着目し、セルソーターを用いて集積サンプルからマイクロコロニーのみを選択的に分取することに成功した。さらに、sublineage I に属する純菌株 strain ND1, sublineage II に属する純菌株 strain NJ1 (*Nitrospira*

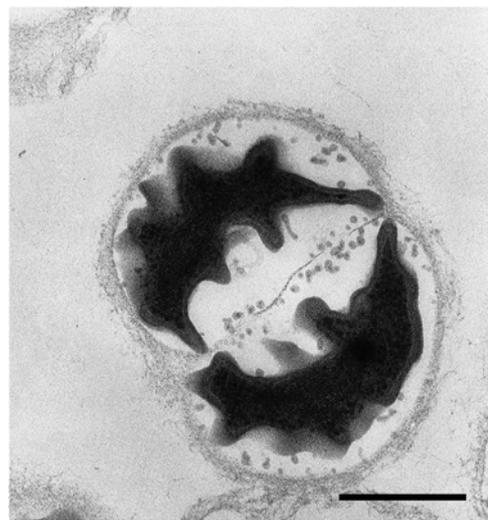


図 5. Strain ND1 の透過型電子顕微鏡画像、スケールバーは 0.5 μm を示す

japonica) を獲得した。この二つの株は、活性汚泥から獲得された世界初の *Nitrospira* 純菌株である。獲得した純菌株の生理学的特性を調べたところ、系統的にも生理学的にも異なる性質を示し、アンモニア酸化細菌との新たな共生関係の可能性が示唆された。本研究で開発した分離培養戦略の特徴の一つとして、マイクロコロニーの選択的な分取が挙げられる。難培養性微生物の中には、アンモニア酸化細菌、アナモックス細菌、ポリリン酸蓄積細菌などマイクロコロニーを形成するものが多い。そこで、本手法を様々な難培養性微生物に適用し、純菌株の獲得を試みている。また、本研究では活性汚泥から集積培養を介し、標的の微生物を濃縮させるステップを経たが、これには膨大な時間を必要とし、培地によるバイアスもかかってしまう。そこで、環境中ですでに形成しているマイクロコロニーを直接分取し、集積培養を介さない方法で純菌株を獲得することができるのではないかと考えている。このような新しい分離培養戦略で、99%以上の未培養微生物に少しでも多くアクセスできるよう、更なる工夫を重ねていきたい。

文 献

- 1) Bartosch, S., I. Wolgast, E. Spieck, and E. Bock. 1999. Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4126–4133.
- 2) Blackburne, R., V. Vadivelu, Z. Yuan, and J. Keller. 2007. Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Res.* 41: 3033–3042.
- 3) Burrell, P., J. Keller, and L. Blackall. 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1878–1883.
- 4) Daims, H., J. Nielsen, P. Nielsen, K. Schleifer, and M. Wagner. 2001. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5273–5284.
- 5) Daims, H., F. Maixner, S. Lucker, K. Stoecker, K. Hace, and M. Wagner. 2006. Ecophysiology and niche differentiation of *Nitrospira*-like bacteria, the key nitrite oxidizers in wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 54: 21–27.
- 6) Ehrlich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig, and E. Bock. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira-moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* 164: 16–23.
- 7) Fujitani, H., Y. Aoi, and S. Tsuneda. 2013. Selective Enrichment of Two Different Types of *Nitrospira*-like Nitrite-oxidizing Bacteria from a Wastewater Treatment Plant. *Microbes Environ.* 28: 236–243.
- 8) Fujitani, H., N. Ushiki, S. Tsuneda, and Y. Aoi. 2014. Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy. *Environ. Microbiol.* 16: 3030–3040.
- 9) Isaka, K., Y. Date, T. Sumino, S. Yoshie, and S. Tsuneda. 2006. Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 47–52.
- 10) Keuter, S., M. Kruse, A. Lipski, and E. Spieck. 2011. Relevance of *Nitrospira* for nitrite oxidation in a marine recirculation aquaculture system and physiological features of a *Nitrospira* marina-like isolate. *Environ. Microbiol.* 13: 2536–2547.
- 11) Lebedeva, E., M. Alawi, F. Maixner, P. Jozsa, H. Daims, and E. Spieck. 2008. Physiological and phylogenetic characterization of a novel lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium, '*Candidatus Nitrospira bockiana*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 242–250.
- 12) Lebedeva, E., S. Off, S. Zumbragel, M. Kruse, A. Shagzhina, S. Lucker, et al. 2011. Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 195–204.
- 13) Lucker, S., M. Wagner, F. Maixner, E. Pelletier, H. Koch, B. Vacherie, et al. 2010. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 13479–13484.
- 14) Maixner, F., D. Noguera, B. Anneser, K. Stoecker, G. Wegl, M. Wagner, and H. Daims. 2006. Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environ. Microbiol.* 8: 1487–1495.
- 15) Maixner, F., M. Wagner, S. Lucker, E. Pelletier, S. Schmitz-Esser, K. Hace, et al. 2008. Environmental genomics reveals a functional chlorite dismutase in the nitrite-oxidizing bacterium '*Candidatus Nitrospira defluvi*'. *Environ. Microbiol.* 10: 3043–3056.
- 16) Okabe, S., H. Satoh, and Y. Watanabe. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3182–3191.
- 17) Schramm, A., D. de Beer, J. van den Heuvel, S. Ottengraf, and R. Amann. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3690–3696.
- 18) Spieck, E., C. Hartwig, I. McCormack, F. Maixner, M. Wagner, A. Lipski, and H. Daims. 2006. Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environ. Microbiol.* 8: 405–415.
- 19) Ushiki, N., H. Fujitani, Y. Aoi, and S. Tsuneda. 2013. Isolation of *Nitrospira* belonging to Sublineage II from a Wastewater Treatment Plant. *Microb Environ.* 28: 346–353.
- 20) Wagner, M., G. Rath, H. Koops, J. Flood, and R. Amann. 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* 34: 237–244.
- 21) Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, and H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81: 665–680.
- 22) Watson, S., E. Bock, F. Valois, J. Waterbury, and U. Schlosser. 1986. *Nitrospira-marina* gen. nov. sp. nov. : a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.* 144: 1–7.