

16S rRNA アプロ - チによる硝化菌生物膜の生態学的構造解析

北海道大学大学院 正○岡部 聡 渡辺 義公
横浜市役所 内藤 初夏

1. はじめに

廃水処理において生物学的窒素除去プロセスの第一段階は硝化であるが、硝化を担う硝化細菌の増殖速度は遅く、水質・pH・水温等の変動に敏感であることから、実際の処理施設において安定した硝化反応を維持することは困難な場合が多い。硝化効率を強化・安定化するためには、反応を担う微生物の同定および生態に関する情報が必要不可欠となる。近年 16SrRNA を標的とする蛍光遺伝子プローブを用いた FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) 法により、活性汚泥フロックや生物膜内の *in situ* における硝化細菌の特異的検出が可能となってきたが¹⁾、実際に硝化反応を担っている硝化細菌群集の多様性は？、また廃水の組成や処理方式の違いによりこれらの優占種は異なるのか？などの廃水処理プロセスにおける硝化細菌相に関する情報は十分でない。そこで本研究では、硝化細菌生物膜を対象とし、16S rRNA 遺伝子のクロ - ニング解析の結果を基に、硝化細菌相の解析を行った。更に、アンモニア酸化細菌に特異的な 16S rRNA を標的とする蛍光遺伝子プローブを用いた FISH 法により、生物膜形成過程におけるアンモニア酸化細菌相の変遷を明らかにした。

2. 実験方法

実験に用いた生物膜はベンチスケールの半水没型回転円板装置(反応容積 2.4L)を用い、都市下水試料は札幌市 S 下水処理場最初沈殿池流出水で、人工基質試料は 3 日間最初沈殿池流出水で初期馴養を行った後、C/N 比 0, 1(NH₄-N=50 mg/l)の人工基質に切り替え馴養を行った。硝化反応が定常に達した後の生物膜試料及び最初沈殿池流出水を採取し、DNA を抽出し、真正細菌を増幅する GM3F と GM4R²⁾もしくはβサブクラスのアンモニア酸化細菌に特異的な CTO プライマーセット³⁾を用い 16S rRNA 遺伝子を増幅した。増幅された PCR 産物をクローン化し、ランダムに選択したクローンに対し制限酵素 *cfo* I を用いた RFLP によりスクリーニングを行い、同一の切断パターンを持つクローンを OTU とし、その OTU の塩基配列を決定し分子系統解析を行った。以後、便宜上最初沈殿池流出水、人工基質生物膜(C/N=0)及び人工基質生物膜(C/N=1)からの OTU を、それぞれ InCTO、ECTO、および FCTO と呼ぶ。GC9 及び GCTO は、それぞれアンモニア性窒素濃度の異なる基質(C/N=0)で培養された生物膜試料である。さらに、同一の生物膜鉛直切片に対して FISH 法を行い、16SrRNA クロ - ニング解析により検出された硝化細菌の生物膜内における変遷および空間分布を解析した。

3. 実験結果と考察

3.1 硝化細菌相の多様性評価 アンモニア酸化細菌のみを特異的に増幅し、生物膜試料(C/N=0, 1)、生物膜の初期馴養基質である最初沈殿池流出水について 16S rRNA 遺伝子のクロ - ニング解析を行った(Fig. 1)。
(a) **最初沈殿池下水 ; InCTO** 12 クローンから得られた 7 種類の OTU について分子系統解析を行った。これらのクローンのうち最も高頻度で検出された OTU(12 クローン中 7 クローン; InCTO-01(6/12)と InCTO-20(1/12))は *Nitrosomonas ureae* と近縁であり(相同性約 96%)、その他には *Nitrosococcus mobilis* と *N. europaea* の中間に位置するクローン(InCTO-10)、*N. europaea* に近縁なクローン(InCTO-25 と InCTO-18)、および *N. eutropha* に近縁なクローン(InCTO-06)がそれぞれ 1 つずつ検出された。この結果より、最初沈殿池流出水中では *N. ureae* に近縁な種が高度に優占していると推察された。

(b) **人工基質生物膜 (C/N=0) ; ECTO**

培養 38 日目の生物膜試料よりアンモニア酸化細菌の 16S rDNA を特異的に増幅し、24 クローンから 7 種類の OTU について分子系統解析を行った結果、最も検出率が高かった OUT は ECTO-01(12/24)であり、*N. eutropha* に近縁であった(約相同性 96%)。ECTO-09(1/24)は *N. eutropha* と約 99%の相同性を、ECTO-11(3/24)

Keywords: 硝化細菌生物膜、FISH、16S rDNA クロ - ニング解析

北海道大学大学院工学研究科都市環境工学専攻水質変換工学講座

〒060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目 TEL&FAX: 011-706-6267

約 95%の相同性を示した。その他には、*N. mobilis* に近縁なクローン(2/24; ECTO-21)(相同性 96%)、*N. europaea* と *N. eutropha* の中間に位置するクローン(4/24; ECTO-08)、*N. europaea* に近縁なクローン(2/24; ECTO-06)、*N. marina* に近縁なクローン(1/24; ECTO-07)が検出された。最初沈殿池流出水から最も高頻度に検出された *N. ureae* に近縁なクローンは全く検出されず、解析したクローンの殆どは *N. eutropha* と *N. europaea* のクラスターに属した。人工基質によって培養されたことにより、優占種が変化したと推察される。

(c) 人工基質生物膜 (C/N=1) ; FCTO

C/N=0 系と同様に、水質が定常期に達した 41 日目の生物膜試料より、アンモニア酸化細菌の 16S rDNA を特異的に増幅し、その後得られた 23 クローンより 8 種類の OTU を得た。最も検出率が高かったクローン(FCTO-04(7/23)と FCTO-12(6/23))は、それぞれ *N. eutropha* に近縁であった。また、*N. europaea* に近縁な 8 クローン (FCTO-02、FCTO-06、FCTO-09 と FCTO-20) が検出された。その他に、*N. marina* に近縁なクローン (FCTO-18) および *N. ureae* と *N. communis* の中間に位置するクローン (FCTO-22)がそれぞれ 1 つずつ検出された。

3.2 FISH によるアンモニア酸化細菌相の変遷

16S rRNA 遺伝子のクローニング解析に用いた人工基質生物膜(C/N=0)の鉛直切片に対し、Nso190、Nsm156、NEU の 3 種類のプローブを

組み合わせて用いることにより、生物膜形成過程におけるアンモニア酸化細菌の優占種の遷移について検討した。人工基質による運転開始時には Nso190 と Nsm156 の両プローブではハイブリするが NEU ではハイブリしないアンモニア酸化細菌のみが検出された。この結果は、先の 16S rRNA 遺伝子のクローニング解析より、*N. ureae* に近縁な種が高頻度で検出された結果と一致する。時間の経過に伴いこの種のアンモニア酸化細菌が徐々に成長し、直径 10~15 μm のクラスターを形成した。約 10 日目には、3 種類のプローブ全てでハイブリするアンモニア酸化細菌のクラスターが増加し始め、培養 39 日目ではこの種が優占種となった。これらの優占種はクローニング解析より *Nitrosomonas eutropha* であると推察された。

4. まとめ

16S rRNA 遺伝子のクローニング解析と FISH 法により生物膜内の硝化細菌相の多様性評価を行った。遺伝子解析により都市下水中では *Nitrosomonas ureae* が、人工基質により培養された生物膜内では増殖速度の大きい *Nitrosomonas eutropha* に近縁な硝化細菌が高頻度で検出され、アンモニア酸化細菌の優占種と推定された。これらの結果を基に FISH 法により、生物膜内で *N. ureae* に近縁な種から *N. eutropha* 及び *N. europaea* への細菌相の変化を視覚的に明らかにすることができた。一方、亜硝酸酸化細菌に関しては生物膜内における存在比率が非常に小さく、本研究で用いた真正細菌に特異的なプライマセットではその存在が確認できなかった。

【参考文献】(1) Okabe, *et al.* (1999). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2156-2162. (2) Brosius *et al.* (1981). *J. Mol. Biol.* **148**: 107-127. (3) Kowalchuk *et al.* (1997). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1489-1497.

