

B-8

16S rRNA 遺伝子から見た ANAMMOX グラニュール汚泥の微生物多様性

長岡技術科学大学 ○蛭子井 康、井町 寛之、大橋 晶良、原田 秀樹
栗田工業株式会社 徳富 孝明

1. はじめに

新規な生物学的窒素除去反応として、嫌気性アンモニア酸化反応 (Anaerobic Ammonium Oxidation [ANAMMOX]) が注目され始めている。ANAMMOX 反応とは嫌気的条件下で、アンモニアを電子供与体、亜硝酸を電子受容体として窒素ガスへ変換する反応である。この ANAMMOX 反応には有機物を全く必要としない独立栄養反応であるため、従来の好気処理で行われてきた硝化・脱窒法と比較して省エネルギーかつ低コストで窒素を除去することが可能である。しかしながら、ANAMMOX 反応を担う微生物の増殖は極めて遅いことから (倍加時間は約 11 日)、いかに ANAMMOX 反応を担う微生物を反応槽内に高濃度に保持できるかがプロセス成功の鍵を握っている。そこで、いくつかの検討をおこなった結果、メタン発酵処理で用いられている嫌気グラニュール汚泥を核として使用することで ANAMMOX 微生物を高濃度に保持することに成功し、窒素除去にも優れた上向流リアクターを開発することに成功した (1)。

そこで本研究では、良好な処理能を有する ANAMMOX グラニュール汚泥の基礎的な情報を得るため、16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析による微生物構造解析と FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法を用いた ANAMMOX 細菌のグラニュール汚泥内の空間的な位置の解明を行った。

2. 実験方法

2.1 サンプルを採取したリアクター

ANAMMOX グラニュール汚泥は、30℃ 付近で運転されているパイロットスケールの上向流リアクター (容積 200L) 反応槽内から採取した。反応槽には、下水処理場の嫌気消化プロセスから排出される脱離液を前段の曝気槽において脱離液中のアンモニアの一部を亜硝酸化させ、おおよそアンモニアと亜硝酸の濃度が 1:1.2 ($\text{NH}_4^+=250\text{mg/L}$; $\text{NO}_2^-=300\text{mg/L}$) となるように調整した廃水を 1 年以上通水している。反応槽内には 1-5 mm 程度の ANAMMOX グラニュールが安定的に保持されており、窒素除去能力として $4\text{kg-TN/m}^3/\text{day}$ 以上、窒素除去率約 80% で処理を行っていた。

2.2 ANAMMOX グラニュール汚泥内微生物の 16S rDNA クローン解析

グラニュールからの DNA 抽出はビーズビーダー法で行った。16S rRNA 遺伝子 (rDNA) の PCR 増幅には、細菌 (*Bacteria*) の 16S rDNA に特異的な EUB338f (5'-ACWCCTACGGGWWGGCWGC-3') と細菌と古細菌の 16S rDNA に特異的な 1490R (5'-GRHTACCTTGTTACGACTT-3') のプライマーセット、*Planctomycetales* の 16S rDNA に特異的な Pla46f (5'-GGATTAGGCATGCAAGTC-3') と細菌と古細菌の 16S rDNA に特異的な 1490R のプライマーセットの 2 種類のプライマーセットを用いた。2 つのプライマーセットにより得られた PCR 産物は大腸菌を介してクローン化し、塩基配列の決定を行った。

2.3 FISH 法

FISH 法は Amann の方法 (2) に準拠して行った。16S rRNA 標的オリゴヌクレオチドプローブ (DNA プローブ) には細菌 (*Bacteria*) に特異的な EUB338 (5'-GCWGCCWCCCG-TAGGWTG-3')、古細菌 (*Archaea*) に特異的な ARC915 (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3')、*Planctomycetales* 門に特異的な Pla46 (5'-GACTTGCAATGCTTAATCC-3')、*Nitrosomonas* に特異的な NSO190 (5'-CGATCC-CCTGCTTTTCTCC-3') とメ

タン酸化細菌に特異的な GM705 (5'-CTGGTGTTCCTTCAGATC-3') を用いた。グラニューール切片に対する 2 重染色は FITC あるいは Cy-5 を付加した異なる 2 種類の DNA プローブを同一切片に対して用いた。

3. 実験結果と考察

3.1 ANAMMOX グラニューール汚泥の 16S rDNA クローン解析

Table 1 Sequence results of the ANAMMOX granular sludge clones.

Primer set	Clone name	Number of clones/total clones	Sequence length (bp)	Closest relatives (% sequence similarity)
EUB338f & 1490R	clone Bac-1	8/33	1180	<i>Sterolibacterium denitrificans</i> (93%)
	clone Bac-2	7/33	1140	<i>Chloroflexi</i> subphylum 1 clone SHA-31 (93%)
	clone Bac-3	6/33	1175	<i>Acidobacteria</i> clone DA008 (94%)
	clone Bac-4	4/33	1172	Green sulfur bacterium clone 19 (99%)
	clone Bac-5	3/33	1167	<i>Limnobacter thiooxidans</i> (94%)
	clone Bac-6	1/33	1185	<i>Planctomycetales</i> ANAMMOX clone KSU-1 (95%)
	clone Bac-7	1/33	1186	<i>Planctomycetales</i> ANAMMOX clone KOLL2a (99%)
	clone Bac-8	1/33	1156	candidate phylum WS6 clone WCHB1-06 (84%)
	clone Bac-9	1/33	1150	<i>Acidobacteria</i> clone Cart-N4 (98%)
	clone Bac-10	1/33	1126	candidate phylum TM7 clone SBR1071 (94%)
Pla46f & 1490R	clone Pla-1	19/29	1512	<i>Planctomycetales</i> ANAMMOX clone KOLL2a (99%)
	clone Pla-2	7/29	1508	<i>Planctomycetales</i> ANAMMOX clone KSU-1 (95%)
	clone Pla-3	3/29	1512	<i>Planctomycetales</i> ANAMMOX clone KOLL2a (99%)

The sequence of clone Bac-7 was the completely match with a part of clone Pla-1 sequence.

ANAMMOX グラニューール汚泥内の微生物の多様性を調査するため、16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。今までの研究において ANAMMOX 反応を行う微生物は 16S rRNA 遺伝子に基づいた分子生物学的手法の解析から *Planctomycetales* 門に属する 1 部の細菌群が ANAMMOX 反応を行うことが推定されている (3)。そこで、本研究では細菌 (*Bacteria*) の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーに加え、*Planctomycetales* の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いて、2 つのクローンライブラリを作成した (Table 1)。得られたクローン配列の 16S rDNA 配列の相同性を調べた結果、Pla46f & 1490R のプライマーセットで得られた 3 クローンはすべて ANAMMOX 細菌と推定されているクローン配列と非常に近縁であった。EUB338f & 1490R のプライマーセットにおいても、ANAMMOX 細菌由来と推定されているクローンと非常に近縁な配列も得られた。しかしながら、硝酸還元細菌として知られている *S. denitrificans* や *Chloroflexi* subphylum1, *Acidobacteria*, candidate phylum WS6 や candidate phylum TM7 など、分離例が少ない、あるいは全く分離株がなくクローン配列でのみ構成されている門に属するクローンと近縁な配列も得られた。これらのクローンは未分離の細菌グループに属しているため、これらの配列を持つ細菌が ANAMMOX 反応を担っているかは今のところ不明である。

これらクローン解析の結果を基にして、クローンの解析に伴う異なる塩基配列の蓄積数をプロットする方法で両グラニューールの微生物

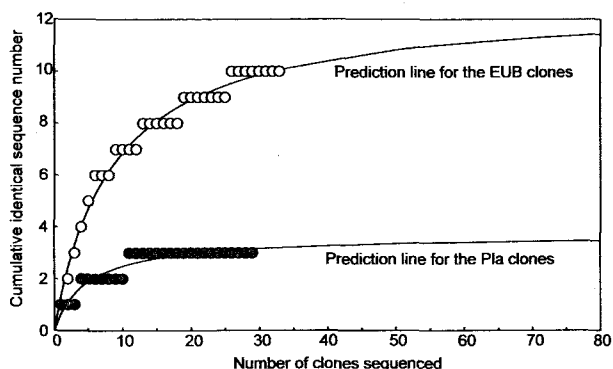


Fig. 1 Estimation microbial diversities in the ANAMMOX granular sludges.

物多様性を推定した (Fig 1)。このグラフのプロットを、 $y=x/(ax+b)$ (x : 解析クローン数、 y : 異なる塩基配列の累積数、 a , b : 定数) で近似を行い、 x を無限大、すなわちクローンの解析を無限大まで行った場合、 y すなわち異なる塩基配列が何種類検出されるかを検定した。この式の場合 x を無限大、すなわちクローンの解析を無限大まで行った場合とすると $y=1/a$ となることから、EUB クローンライブラリ内には約 13 種類、Pla クローンライブラリ内には約 4 種類の 16S rDNA が含まれることが推定された。

3.3 FISH 法によるグラニューール汚泥内の ANAMMOX 細菌の空間分布の解明

FISH 法と共焦点レーザー走査顕微鏡を組み合わせた手法を用いることにより、グラニューール汚泥内での ANAMMOX 細菌の空間分布の解明を試みた。先のクローン解析により ANAMMOX 反応を担う微生物と推定されている *Planctomycetales* 門に属するクローンが得られたことから、まず *Planctomycetales* 門に特異的な Pla46 プローブを用いた。その結果、グラニューール汚泥を覆い被さるように存在し集塊体を形成している球菌はすべて Pla46 プローブと反応した (Fig. 2)。こ

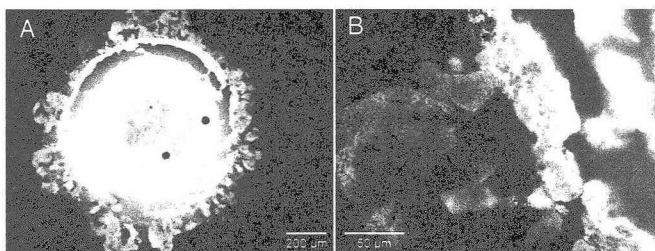


Fig. 2 *In situ* hybridization of sections from ANAMMOX granules viewed by confocal laser scanning microscopy. (A) a section hybridized FITC-labeled *Planctomycetales*-specific probe Pla46 (green) and Cy-5-labeled bacterial domain probe EUB338 (red). (B) higher magnification of ANAMMOX granular sludge section panel A, showing ANAMMOX bacteria-like cells.

の Pla46 で検出された細菌は Strous が報告している *Planctomycetales* 門に属する ANAMMOX 細菌の形態と非常に似ていた (3)。この結果は、本グラニューール汚泥においても *Planctomycetales* 門に属する細菌が主に ANAMMOX 反応を担っていることを強く示唆するものであった。一方、グラニューール内部からも強い蛍光が得られたが、プローブの非特異的な吸着が疑われた。そこで、ANAMMOX グラニューールには存在しないと思われる好気性のメタン酸化細菌に特異的な GM705 プローブを用いて FISH を行ったところ、グラニューール内部から強い蛍光が得られた。このことから、グラニューール内部の蛍光はプローブの非特異的な吸着であることが明らかとなった。また、好気性のアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas* に特異的な NSO190 プローブおよび古細菌に特異的な ARC915 プローブからは全く蛍光が得られなかった。

4. まとめ

本研究では、良好な処理能を有する ANAMMOX グラニューール汚泥の基礎的な情報を得るため、16S rRNA 遺伝子を標的とした分子生物学的手法を用いて解析を行った。16S rDNA クローン解析の結果、既報の ANAMMOX 細菌と極めて近縁なクローン配列が得られた一方で、機能も全く不明な未分離の細菌グループに属しているクローン配列も多く検出された。また FISH 法を用いることで *Planctomycetales* 門に属する細菌がグラニューール表面を覆うように存在していることが明らかとなり、本グラニューール汚泥においても *Planctomycetales* 門に属する細菌が主に ANAMMOX 反応を担っていることが強く示唆された。

参考文献

- (1) 今城ら (2003) ANAMMOX 微生物のグラニューール化の検討、第 37 回水環境学会講演集, p.404.
- (2) Amann, R. (1995) *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molec. Microbiol. Ecol. Manual*, 3.3.6: 1-15.
- (3) Strous, M. (2000) *Microbiology of anaerobic ammonium oxidation*. PhD Thesis, Delft University of Technology, The Netherlands.