

## 嫌気性アンモニア酸化 (ANAMMOX) 反応系における微生物群集構造の解析

指導教官 原田 秀樹、大橋 晶良、井町 寛之

## 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、そして培養による集積および分離を試みた。

## 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°C 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 抽出はビーズビーター法で行った。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'-ACWCCTACGGGWGGCWGC-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、そのうち約 30 クローンをランダムに採取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-TAGGWGT-3')、古細菌 (*Archaea*) に特異的な ARC915 (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3')、*Planctomycetales* 門に特異的な Pla46 (5'-GACTTGCATGCCTAATCC-3')、*Nitrosomonas* に特異的な NSO190 (5'-CGATCCCCTGCTTTTCTCC-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。

## 2.4 集積培養

培養は、ANMAMOX グラニュール汚泥をホモジナイザーでグラニュールを静かに砕いた後にバイアル瓶に植種した。ANAMMOX 細菌を集積・分離するために、Strous (3) が用いた培地を参考として、アンモニア源として硫酸アンモニウム、亜硝酸として亜硝酸ナトリウムを加えて pH を 7.5 とし、N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20.vol) で気相部を置換し密閉した。また、ANAMMOX 反応における中間生成物とされるヒドラジンとヒドロキシルアミンを加えると反応初期の活性が上昇するという結果が得られているため (4)、ヒドラジンとヒドロキシルアミンを加えて培養する。30℃の温度で、静置もしくは振盪を行いながら培養を行った (Table.1)。さらに、集積・単離を促進させるために、種々の基質を追加した培養も行った (Table.2)。

## 3. 実験結果と考察

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

ANAMMOX グラニュ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* 門に属する一部の細菌群が 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 (Table.3)。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

Table.1 The composition of the mineral medium

Substrate	Conc. [mg/L]
NaHCO <sub>3</sub>	1049
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56.7
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	300
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8.18
EDTA	25.0
ZnCl <sub>2</sub>	0.255
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.300
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.238
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.213
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.304
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.238
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.131
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.014
NaWO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.063
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	264.3
NaNO <sub>2</sub>	276.0
hydrazine	200
hydroxylamine	132

Table.2 Substrats tested for isolation

Substrate	Conc.
PenicillinG	500 μg/ml
Vancomycin	100 μg/ml
Yeast extract	0.01% wt%

Table.3 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 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.

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。

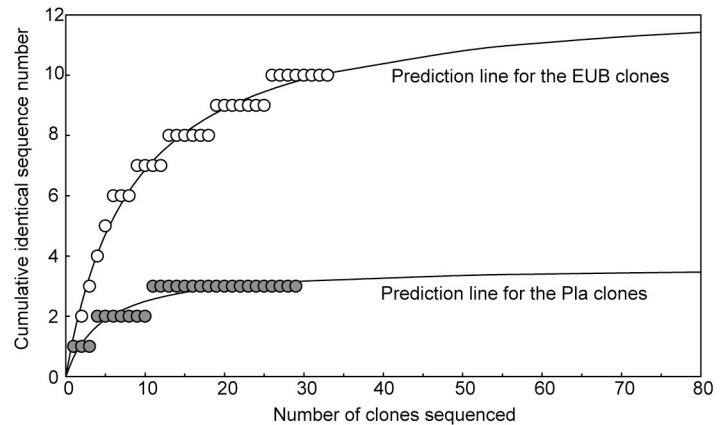


Fig. 1 Estimation microbial diversities in the ANAMMOX granular sludges.

### 3.2 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 プロブと反応した (Fig. 2)。この Pla46 で検出された細菌は Strous が報告している *Planctomucetales* 門に属する ANAMMOX 細菌の形態と非常に似ていた (4)。

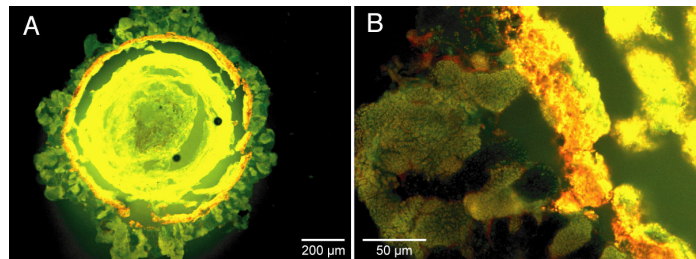


Fig. 2 *In situ* hybridization of sections from ANAMMOX granules viewed by confocal laser scanning microscopy. (A) a section hybridized FITC-labeled *Planctomycetales*-specific probe Pla46 (green) and Cy-5-labeled bacterial domain probe EUB338 (red). (B) higher magnification of ANAMMOX granular sludge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

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 プロブ および古細菌に特異的な ARC915 プロブからは全く蛍光が得られなかった。

### 3.3 集積培養の試み

培養して 40 日後、Yeast extract を追加した系以外の各系でアンモニアと亜硝酸の減少 (30~40ppm-N) が確認された。また、イオンクロマトグラフィを行うと同時に培地を引き抜いて位相差顕微鏡で観察した (Photo.3)。Yeast extract を入れた系以外はどれも ANAMMOX 細菌の形態的特徴を持つ集塊体と、ところどころに糸状細菌が見受けられ、基質による差はほとんど見られなかった。Yeast extract を追加した系は、集塊

体がほとんど見受けられず正常な ANAMMOX 反応が阻害されているようだった。それ以外の基質を追加した系では特に形態的に変化は無かった。

集積を進めるために、追加基質無しで 40 日間培養したものから、さらに振盪を含めた継代培養を 30 日行ったが、増殖速度が遅いため、アンモニアと亜硝酸の減少は確認できなかったが、顕微鏡で観察することで ANAMMOX 細菌の生存が確認された (Photo.4)。

#### 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。

さらに、ANAMMOX グラニュール汚泥からサンプルを採取し、培養を行ったところ、アンモニアと亜硝酸の減少が確認されたことから、ANAMMOX 反応が起きていることが確認された。修士の期間内には行えなかったが、さらに数世代の継代して培養をおこなうことで、ANAMMOX 細菌は集積し、ANAMMOX 以外の細菌については、FISH 法を行い、ANAMMOX グラニュール内の微生物群集構造を明らかにしていくことが可能であると考えられる。

#### 5.参考文献

- (1) 今城ら (2003) ANAMMOX 微生物のグラニュール化の検討、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.
- (4) Van de Graaf AA, de Bruijn P, Roberston LA, Jetten MSM, Kuenen JG (1997) Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of 15N studies in a fluidized bed reactor. Microbiology 143:2415-2421

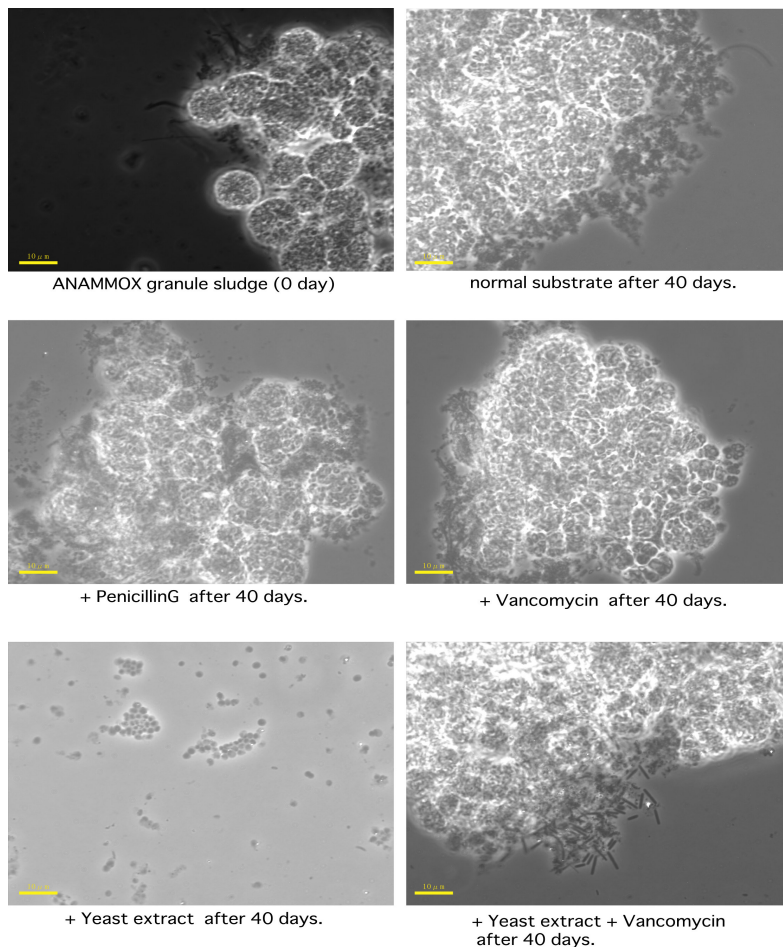


Photo.3 Phase-contrast micrograph. of ANAMMOX sludge.  
Bar is 10 μ m

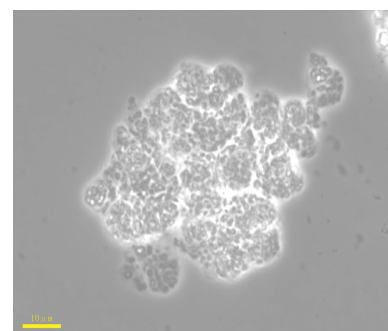


Photo.4 Phase-contrast micrograph of shaking culture.  
Bar is 10 μ m