特集1・ニューバイオテクノロジーによる環境解析

分子生物学的手法の生物膜への適用

岡 部 聡*

1. はじめに

廃水処理システム内には多種多様の微生物が存在している。これら個々の微生物は独立に分散（浮遊）して存在することはきわめて稀であり、その90～99%は微生物自身が生成する細胞外ポリマーにより固体表面に付着して（生物膜を形成して）、または集塊（フロック）を形成して存在している¹⁾。このような複合微生物生態系に存在する細菌の多くは分離培養できない。廃水処理系のように比較的有機物濃度の高い環境においても、培養可能な細菌は存在する全細菌の10%以下であると言われている²⁾。もしたとえ純粋分離されたとしても、純粋培養系におけるその細菌の代謝活性・挙動は必ずしも自然環境下（すなわち、生物膜内）における挙動を反映するとは限らない。特に生物膜内では、高密度に存在する細菌の代謝活性と物質の輸送律速のため、僅か数mmの生物膜でも表層と底層では生育環境が大きく異なる。好気的環境下に存在する生物膜でも酸素の浸透深さは表層僅か数100 μ mであり、これ以深は無酸素状態となる^{3, 4)}。このように生物膜内の複雑な環境を、人工的に試験管内で再現することは極めて困難である。

したがって、このように複雑な複合系微生物群集から成る生物学的廃水処理プロセスの安定化・高効率化をはかるためには、従来のように経験に基づき、反応槽（生物膜）をブラックボックスとして取り扱い入出力操作のみに頼るのでは不十分である。処理に携わる多様な微生物群集の生態学的構造およびその代謝機能を十分に理解し、目的とする微生物活性を最適化するとともに、処理水から速やかに分離可能な微生物集塊を形成させる生育環境や運転条件等

を設定する必要がある。

このような背景のもとに、近年、著しい進展を見せている分子生物学的手法を導入し、これまでほとんどブラックボックスとして取り扱われてきた廃水処理プロセス内および生物膜内の微生物生態とその機能との関係が徐々に明らかにされつつある。

2. 硝化細菌生物膜

一般的にアンモニア性窒素は、生物学的硝化と脱窒反応の二段階により除去される。前段の硝化反応は好気的条件下において、アンモニア酸化細菌による NH_4^+ から NO_2^- への酸化、その後の亜硝酸酸化細菌による NO_2^- から NO_3^- への酸化の二段階反応によって達成される。硝化反応によって生じた NO_3^- は、後段の無酸素状態において脱窒細菌により窒素ガス（ N_2 ）に変換される。

アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌は系統学的に異なる独立栄養性細菌であり、増殖速度が極めて遅いうえ、菌体収率も低く、pH、水温、有機物負荷等の影響を受けやすい。またリアクターの立ち上げに長時間を要するうえ、安定した硝化反応を維持することは困難である。したがって、硝化細菌生物膜の活性を強化し安定した処理プロセスを確立するためには、生物膜内に存在する硝化細菌の多様性および優占種を同定するとともに、処理プロセス内での動態を細菌種レベルから明らかにすることが重要となる。また、硝化細菌の動態や活性に影響を及ぼす因子の決定・制御等が重要となる。更には生物膜内における硝化機構の詳細を解明すること、すなわち、硝化細菌分布と硝化活性分布との関係を明らかにすることが重要となる。

しかしながら、従来の培養に基づく最確数（MPN：Most Probable Number）法や平板計数法では、長期間の培養日数（4～8週間程度）を必

*北海道大学大学院工学研究科
Satoshi OKABE

図－1 微生物群集解析のための16S rRNAアプローチの流れ.

要とするうえ、培地の選択が難しく正確な菌数の測定すら困難である。またこれらの手法では、生物膜内部の原位置 (*in situ*) における硝化細菌の特異的検出及び優占種の同定や生態学的構造の観察は不可能である。したがって、硝化反応が生物膜内のどの部分で生じているのか、どんな種類の硝化細菌がどこに、どれだけ、どのように分布しているか、現在までのところ正確には把握できていない。故に、生物膜内における硝化反応機構を解明するためには、硝化細菌の空間的分布（鉛直方向分布）と硝化活性（機能）分布を *in situ* で直接測定し、両者を結び付けて議論することが必要不可欠となる。

3. 16S rRNA アプローチ

分離培養できない細菌で主に構成される複合系微生物群集の細菌相解析には、近年、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統分類解析が広く使われている^{5,6)}。図－1には、16S rRNA 遺伝子解析に基づく微生物群集解析の一連の流れを示している。このアプローチは、まず多種多様な細菌が含まれている試料から全DNAを抽出する。そして、全ての種類の細菌または特定の細菌に特異的で、比較的保

存性の高い部分配列をプライマーとし Polymerase chain reaction (PCR) により16S rRNA 遺伝子を増幅する。PCR 反応液には多くの細菌由来の16S rDNA 増幅断片が混在しているため、塩基配列を解読するためには、大腸菌を用いて直接クローニングする方法や変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE)⁷⁾ などにより、個々の16S rDNA 断片に分離されなければならない。その後、分離した16S rDNA 断片の塩基配列を決定し、16S rRNA 遺伝子ライブラリーを作成する。既存の蓄積された16S rDNA データベースとインターネットを介して、DNA の塩基配列の相同性を比較解析することにより、試料中に存在する細菌相の系統学的多様性が評価できる。また、この解析から標的とする細菌のグループ、属、および種等のレベルで共通な16S rRNA 塩基配列（約20塩基）を探し出し、この配列に相補的な配列を持つ DNA プローブを設計・作製する。この DNA プローブを蛍光色素で標識し、生物膜切片などに対し直接 whole cell *in situ* ハイブリダイゼーション (Fluorescence *in situ* hybridization : FISH)⁸⁾ を行うことにより、標的とする微生物の特異的検出お

よびその空間分布を定量的に解析することが可能となる。FISH法の解像度は非常に高く、複合系微生物集塊内で個々の細胞レベルで検出・同定が可能である。このように、この16S rRNAアプローチは、培養に依存しないため、未だ分離培養されたことのない未知（しかし、16S rDNAの塩基配列は明らか）の細菌や増殖速度のきわめて遅い細菌を複合系生物膜内*in situ*で迅速に検出・定量できる。しかしながら、この一連の分子生物学的手法も完全ではなく、ここではその1つ1つを取り上げて議論しないが、数々の問題が指摘されている。近年の分子生物学的技術の急速な進歩によって、生物膜、活性汚泥、嫌気性消化汚泥や嫌気性グラニュール汚泥などの廃水処理プロセスに関する微生物群集構造の解析が急テンポで行われ、驚くほどの微生物の多様性と多くの未だ分離培養されていない微生物の存在が報告されており、我々の理解は確実に深まってきている。

近年、様々な微生物生態系の生態学的構造と機能の解析を目的として、分子生物学的手法と各種微小電極を併用した解析アプローチが注目されている⁹⁾。これらの手法を用いた養鰻廃水処理する散水ろ床生物膜¹⁰⁾や都市下水生物膜内の硝化細菌の生態学的構造と反応機構の解析¹¹⁾、または都市下水生物膜内の硫酸塩還元反応機構の解析^{3, 4, 12)}が報告されている。このように、分子生物学的手法と微小電極を併用することにより、厚さ僅か数mmの複雑な生物膜内で生ずる、数々の重要な微生物反応の詳細なメカニズムが徐々に明らかにされつつある。

本章では、図-1に示す一連の16S rRNAアプローチを硝化細菌生物膜に適用した場合、どのような新規の情報が得られるか、著者らの研究成果の一部を示しながら簡単に説明したい。具体的には、16S rRNA遺伝子のクローニング解析による硝化細菌相の多様性解析の後、アンモニア酸化細菌に特異的な16S rRNAを標的とする蛍光DNA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追跡した結果を示す。

4. 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、都市下水生物膜は札幌市S下水処理場最初沈殿池流出水で、人工基質生物膜は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（NH₄-N=50mg/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を採取し、全DNAを抽出し、 β サブクラスのアンモニア酸化細菌に特異的なCTOプライマーセットを用い16S rRNA遺伝子を増幅した。増幅されたPCR産物を大腸菌を用いてクローン化し、ランダムに選択したクローンに対し制限酵素*cfo* Iを用い増幅断片を切断し、その切断パターンの違い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、便宜上都市下水生物膜および人工基質生物膜（C/N=0）のOTUを、それぞれDWWB、ANBと呼ぶ。

次に、16S rDNAクロー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より定量的に解析するために、生物膜馴養期間中、試料を経目的に採取し、生物膜を支持体に垂直方向に20 μ mの厚さに凍結切片化し、FISH法をAmannら¹³⁾の方法に準拠して行った。NH₄⁺酸化細菌に対するFISH法には、ローブNso190とNsm156、Nso190とNEU及びプローブNsm156とNEUの組み合わせでハイブリダイゼーションを行い、3つのグループに分類しそれぞれの変遷を追跡した。NO₂⁻酸化細菌に対しては*Nitrobacter*属に特異的なプローブ（NIT2、NIT3）と*Nitrospira*属に特異的な（Ntspa685、Ntspa454、Ntspa1026）を用いてFISHを行った。FISH画像を定量的に評価するために、プローブの組み合わせ毎に各切片試料から共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）を用いて投影画像を5-7枚作成し、CLSM510内蔵の画像解析ソフトを使用して、各プローブにより染色された細菌表面積を検出した。

5. 硝化細菌相の多様性評価

16S rRNA遺伝子のクローニング解析に基づき、都市下水生物膜および人工基質生物膜内に存在するアンモニア酸化細菌の系統学的多様性を評価した（図-2）。解析したクローンのうち、都市下水生物膜（DWWB）および人工基質生物膜（ANB）から、それぞれ10種類、7種類の異なる塩基配列をもつクローンを検出した。DWWBクローンライブラリにおいて、最も高頻度で検出されたクローン（全体のクローンの62%）は、*Nitrosomonas ureae*と近縁（相同性約97%）であった。その他のクローンは、

図-2 β -Proteobacteria 綱に属するアンモニア酸化細菌と得られたクローンの系統樹。プライマーペア CTO189f と CTO654r を用いて PCR 増幅した 16S rRNA 遺伝子の部分配列 (465bp) を近隣結合法により解析した。DWWB は都市下水生物膜のクローン、ANB は人工基質生物膜のクローン。分岐点に示した数字はブートストラップ値 (100 回抽出時の%)。スケールは 5% の塩基置換距離を表す。

Nitrosococcus mobilis, *N. europaea*, および *N. eutropha* に近縁なクローンがそれぞれ検出された。クローン DWWB-22 は、深い位置で分岐し *Nitrosococcus* と *Nitrososivibrio* のグループの間に位置した。この結果より、都市下水生物膜では *N. ureae* に近縁なアンモニア酸化細菌が優占的に存在していると推察できる。

一方、人工基質生物膜 (ANB) のクローンライブラリにおいては、7 種類の異なるクローンが検出

された。最も検出率が高かったクローン (全体のクローンの 50%) は、*N. eutropha* に近縁 (相同性約 96%) であった。なかでもクローン ANB-09 は *N. eutropha* と 99% の相同性を示した。*N. europaea* に近縁なクローンが全体のクローンの約 25% を占めた。その他には、*N. mobilis* および *N. marina* に近縁なクローン (ANB-21 および ANB-07) が検出された。都市下水生物膜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、

図-3 人工基質 (C/N = 0) を用いて培養した生物膜内におけるアンモニア酸化細菌の増殖パターン (0, 17, 30日目)

これらの写真は、FITCで修飾したNso190プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (CSLM) で観察したものである。写真の上部が生物膜の表面である。

図-4 アンモニア酸化細菌のポピュレーションダイナミクス。(A) C/N = 0の人工基質で培養した硝化細菌生物膜、(B) 都市下水で培養した生物膜

アンモニア酸化細菌はG-Iグループ (薄灰色)、G-IIグループ (灰色)、and G-IIIグループ (黒) に分類した。(●) 反応槽内 NO_2^- -N濃度の推移。

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。これらの結果より、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。

6. 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結果をより定量的に解析するために、都市下水生物膜および人工基質生物膜の鉛直切片に対し、アンモニア酸化細菌に特異的な16S rRNAを標的とする蛍光DNAプローブ (Nso190, Nsm156, NEU 3種類のプローブを組み合わせ) 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の優占種の遷移について検討した。

図-3は、*in situ* ハイブリダイゼーション結果の一例として、C/N = 0の人工基質で馴養し、経日的に採取した生物膜の鉛直切片に対して、FITCで標識したプローブNso190を用いてハイブリダイズした画像である。図-3から明らかなように、0日目の最初沈殿池流出水で馴養を終えたばかりの生物膜内では、殆どが単一細胞または小さなクラスターとして検出されるが、時間の経過と共に徐々に球状の大きなクラスターを形成し増殖していく様子が伺える。

次に、FISH画像より各プローブで検出された表面積を画像解析により求め、全バイオマス表面積当たりの比を求めた。これらの値を基に、[Nsm156による検出表面積比] - [NEUによる検出表面積比] = G1グループ (*Nitrosomonas marina* 種族、

Nitrosomonas ureae 種族, *N. communis* 種族, *N. cryotolerans*), [NEUによる検出表面積比] = G2グループ (*N. europaea* 種族, *N. eutropha*, *N. halophila*), [Nso190による検出表面積比] - [Nsm156による検出表面積比] = G3グループ (*Nitrospira* 種族) としてアンモニア酸化細菌相の遷移を定量化したのが図-4である。図-3に示したように、生物膜の成長に伴いNso190で検出される全アンモニア酸化細菌の検出表面積は徐々に増加し、23日目にバイオマス表面積の約34%に達し、その後やや減少した(図-4A)。アンモニア酸化細菌相の変化に注目すると、0日目の最初沈殿池流出水で馴養を終えたばかりの生物膜では、G1グループが優占種であった(図-4A)。G2グループは徐々に増加し、特にバルク水中に NO_2^- -Nが高濃度(最大45mg/L)に蓄積していた20日目前後の期

間では、G2グループの増加が顕著となった。この期間における、G2グループの全アンモニア酸化細菌に占める割合は、60~85%であった。 NO_2^- -N濃度の減少に伴いG1グループは再び増加し始め、硝化反応が定常に達した時期には、Nso190で検出される全アンモニア酸化細菌の26~40%を占めた。30日目以降、水質は定常に達したが生物膜内の硝化菌相はまだ徐々に推移していると思われる。G3グループは全ての資料においてほとんど検出されなかった。

一方、都市下水生物膜では馴養期間を通じ、プローブNso190とNsm156で検出されるがNEUとNmVでは検出されないG1グループのみが検出され、人工基質生物膜で優占種であったG2グループはほとんど検出されなかった(図-4B)。これらの結果は16S rDNA クローン解析結果と完全に一致

図-5 人工基質生物膜鉛直切片の *in situ* ハイブリダイゼーション。

(環境技術研究協会ホームページ <http://www.3osk3web.ne.jp/~riet/> にてカラー写真公開)

写真A: *Nitrosomonas europaea* 種族, *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas halophila* (ともにアンモニア酸化細菌) に特異的なDNAプローブ (NEU: TRITC 標識, 赤) と *Nitrospira* 属 (亜硝酸酸化細菌) に特異的なDNAプローブ (Ntsp454: FITC 標識, 緑) で2重染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Zeiss LSM-510) で観察した。写真の上部が生物膜の表面である。Substratumは生物膜が付着する担体を意味する。写真B: *Proteobacteria* 綱-β亜綱に属する全てのアンモニア酸化細菌に特異的なDNAプローブ (Nso190: TRITC 標識, 赤) で染色されたアンモニア酸化細菌のクラスターの拡大写真。写真CとD: DNAプローブNso190 (TRITC 標識, 赤) と *Nitrospira* 属 (亜硝酸酸化細菌) に特異的なDNAプローブ (Ntsp1026: FITC 標識, 緑) で2重染色した。

するものである。

7. 定常状態生物膜内の硝化細菌の空間的分布

アンモニア酸化細菌は、その大部分が直径5～20 μm の密な球状のクラスター（単一種で構成された集塊）を形成して、生物膜全体に非常に密に存在していた（図－5 A, 5 B）。一方、亜硝酸酸化細菌に関しては、16S rRNA 遺伝子のクローニング解析および*Nitrobacter*属に特異的なプローブNIT2及びNIT3を用いたFISHの結果、どの試料からも一般的によく知られている*Nitrobacter*属は全く検出されなかったが、プローブNtsp454で染色される*Nitrospira*属に属する亜硝酸酸化細菌のみが検出された。*Nitrospira*は、アンモニア酸化細菌のクラスターの周囲に小さなクラスターを形成して不規則に集合して存在するが（図－5 C, 5 D）、生物膜の表層では検出されず中・深層でのみ検出された（図－5 A）。両硝化細菌は単独のクラスターを形成するが、お互いに近接することにより効率的な NO_2^- の授受を行っている。しかし、亜硝酸酸化細菌は生物膜の表層には存在せず、中・底層に主に存在し、実際はアンモニア酸化反応と亜硝酸酸化反応が生物膜の深さ方向の異なる領域で生じていた。

8. お わ り に

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および動態解析を行った。その結果、都市下水生物膜では*Nitrosomonas ureae*に、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*に近縁なアンモニア酸化細菌が優占種であった。これらの結果を基にFISH法により、人工基質生物膜内で*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かつ定量的に明らかにすることができた。これらの結果は、従来の培養に基づく方法では解明できなかった貴重なデータである。

今後はこれら新しいツールにより得られた、または得られるであろうマイクロスケールの微生物群集情報を、廃水処理プロセスの制御・改善および健全

な水環境の管理・保全のためにいかに具体的に活用していくかが、我々環境工学技術者の課題となる。

参 考 文 献

- 1) Watnick, P., and Kolter, R.: Biofilm, City of Microbes, *J. Bacteriol.*, **182**, 2675-2679 (2000) .
- 2) Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H.: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169 (1995)
- 3) Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H., and Watanabe, Y.: Analyses of spatial distribution of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5107-5116 (1999)
- 4) Ito, T., Okabe, S., Satoh, H., and Watanabe, Y.: Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activity in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1392-1402 (2002)
- 5) Olsen, G. J., Lane D. J., Giovannovi, S. J., and Pace, N. R.: Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**, 337-365 (1986)
- 6) Pace, N. R.: A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**, 734-740 (1997)
- 7) Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700 (1993)
- 8) Amann, R. I., Krumholz, L., and Stahl, D. A.: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, **172**, 762-770 (1990)
- 9) Amann, R. I. and Kuhl, M.: *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 352-358 (1998)
- 10) Schramm, A. et al.: Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4641-4647 (1996)
- 11) Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y.: *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3182-3191 (1999)
- 12) Ramsing, N. B., Kuhl, M., and Jorgensen, B.B.: Distribution of sulfate-reducing bacteria, O_2 and H_2S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3840-3849 (1993)
- 13) Amann, R. I.: *In situ* identification of micro-organisms by whole-cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p.1-15. A. D. Akkermann, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (eds.). Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. (1995)