RT-PCR法を用いた生活排水処理プロセスにおけるアンモニア酸化細菌の活性発現のモニタリング解析

Combination Analysis of Reverse Transcription (RT)-PCR and DGGE to Monitor Expression of Ammonia Monooxygenase Gene in Domestic Wastewater Treatment Process

蛭江美孝¹, 三浦英智², 野田尚宏³, 松村正利¹, 常田 聡², 平田 彰², 水落元之⁴, 稲森悠平⁴

¹筑波大学応用生物化学系／〒305-0006 つくば市天王台1-1-1

²早稲田大学理工学部応用化学科／〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

³独立行政法人 産業技術総合研究所／〒305-8566 つくば市東1-1-1 つくば中央第6

⁴独立行政法人 国立環境研究所／〒305-8506 つくば市小野川16-2

YOSHITAKA EBIE¹, HIDETOMO MIURA², NAOHIRO NODA³, MASATOSHI MATSUMURA¹, SATOSHI TSUNEDA², AKIRA HIRATA², MOTOYUKI MIZUOCHI⁴, and YUHEI INAMORI⁴

¹Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba

/1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-0006, Japan

²Department of Chemical Engineering, Waseda University

/3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

³National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

/Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

⁴National Institute for Environmental Studies/16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

Abstract

Expression of ammonia monooxygenase (*amoA*) gene in domestic wastewater treatment process was monitored by combination analysis of reverse transcription(RT)-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Sludge samples were collected from a bench-scale reactor treating synthetic domestic wastewater. After total RNA was extracted, RT-PCR was performed. DGGE analysis was used to separate the amplified products according to their sequence and thereby to visualize individual community members. Ammonia oxidizers that were demonstrated by the presence of *amoA* mRNA were regarded as metabolically active ones. The DGGE profiles of *amoA* mRNA RT-PCR products obtained at the initial stage of the operation showed decrease of the diversity of *amoA* mRNA. When influent load was changed with reduction of hydraulic retention time (HRT) or increase of concentration of wastewater, new DGGE bands newly appeared on only the short HRT condition. The *amoA* sequences of DGGE bands disappeared in the beginning of the operation affiliated to the *Nitrosomonas eutropha* lineage. On the other hand, all the *amoA* sequences of new DGGE bands affiliated to the genus *Nitrosomonas*, and formed phylogenetic lineage for which no cultured representative exists.

Key words: Ammonia-Oxidizing Activity, *amoA* mRNA, DGGE, Microbial Community, RT-PCR

1. はじめに

生活排水中の窒素・リン等の栄養塩類に起因する湖沼・内湾等の閉鎖性水域における富栄養化は未だ顕在化した問題である¹⁾。生物学的窒素除去プロセスの更なる高度効率化、安定化を図る上では、律速段階となる硝化反応を担う微生物の個体群動態と、それら微生物の活性を排水処理特性と結びつけ、工学的に評価・解析することが極めて重要である^{2, 3)}。硝化細菌は増殖速度が極めて遅く、従来の培養に基づいた手法では解析が困難であることから、注目する細菌を*in situ*で検出・定量化するFISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法⁴⁻⁶⁾や細菌の培養の可否に依存せずに、遺伝子レベルで群集構造を把握できるPCR (Polymerase Chain Reaction) -DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法をはじめとした分子生物学的手法による微生物群の動態解析が進められている⁷⁻⁹⁾。特に、PCR-DGGE法は群集構造をバンドパターンとして可視化でき、外的環境因子に対する時系列的な変化を理解しやすく、バンドのシーケンシングを行うことにより群集の構成種も推定できるため、複合微生物系におけるモニタリングにおいて極めて有用な手法である。生活排水を処理する浄化槽内の硝化細菌群に対しても分子生物学的手法を用いた動態解析がなされ、環境条件による硝化細菌群の個体数変動や群集構造の変遷、従属栄養硝化細菌による硝化反応への寄与などが推測されている¹⁰⁾。

さらに近年、従来の16S rDNAをターゲットにした系統分類学的な解析に加え、硝化細菌の特定の機能に着目した解析が行われつつあり、硝化反応の最初の段階であるアンモニアからヒドロキシルアミンへの酸化反応を担うAMO (アンモニアモノオキシゲナーゼ) という酵素に着目し、この酵素の活性中心を含むサブユニットをコードする構造遺伝子 (*amoA*遺伝子) をターゲットとしたアンモニア酸化細菌の検出や¹¹⁾、さらに、*amoA*遺伝子から転写された*amoA* mRNAをRT (Reverse Transcription) -PCR法により検出することで、微生物の有する機能のみならず実際の機能活性発現を評価しようという試みもなされている^{12, 13)}。本研究では、RT-PCR法による*amoA* mRNAの検出とDGGE法による群集構造解析を組み合わせることにより、転写されたmRNA、すなわち機能活性に基づいた微生物群集構造のモニタリングが可能であると考え、アンモニア酸化細菌の*amoA* mRNAの転写量を*amoA*遺伝子の発現量をモニタリングするための指標として着目し、RT-PCR-DGGE法を生活排水処理プロセス

におけるアンモニア酸化細菌のモニタリング技術として適用した。具体的には、高度処理型浄化槽をモデルとしたリアクターを用いて実生活排水から人工排水への排水性状の変化や、定常運転から排水量あるいは排水濃度を変化させることによる流入負荷変動に対し、処理活性を示すアンモニア酸化細菌群の応答性について評価・解析を行った。

2. 実験方法

2.1 実験装置と運転条件

実験で使用した高度処理型浄化槽のリアクターシステムの概要をFig. 1に示した。本リアクターシステムは容積が9.9lの嫌気第1槽および嫌気第2槽、7.4lの好気槽、3lの沈殿槽から成り、嫌気槽にはプラスチック製網状円筒型担体 (直径2.5cm, 高さ2.5cm) を、第1槽には槽容積の60%, 第2槽には90%となるよう充填した。また、好気槽には槽容積の20%のスポンジ担体 (1cm×1cm×1cm) を投入し、ばっ気により流動させた。リアクターは20℃に制御した恒温室内に設置し、流入排水は生活排水を模擬した人工排水とした。作成した人工排水の組成をTable 1に示す。種汚泥として下水処理場より採取した汚泥を使用し、浮遊物質濃度 (MLSS, Mixed Liquor Suspended Solids) 約2,000mg/lの汚泥を好気槽に6l投入し、水理学的滞留時間 (HRT, Hydraulic Retention Time) を2.5日、好気槽処理水の嫌気第1槽への循環比を4に設定して、運転を開始した。投入汚泥は速やかに好気槽のスポンジ担体に保持され、余剰の汚泥は循環水とともに沈殿槽より嫌気槽へ返送した。経目的に水質測定を行うとともに、スポンジ担体よりRT-PCRに供する汚泥を採取した。スポンジ担体からの汚泥の採取は搾汁により

Fig. 1 Schematics of experimental reactor system

Table 1 Composition of the synthetic wastewater

Component	Concentration [mg/l]			
	Period 1		Period 2	
	Run 1	Run 2	Run 1	Run 2
NaCl	6.6		11.6	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8.2		14.4	
KH ₂ PO ₄	18.6		32.6	
KCl	13.4		23.5	
NH ₄ Cl	114		201	
NaHCO ₃	191		335	
Dextrin	30.5		53.3	
Bactopeptone	65.4		114	
Yeast Extract	65.4		114	
Meat Extract	74.6		131	
BOD	200		350	
T-N	45		79	
T-P	5		9	

行い、同じ担体を採取しないよう担体に印を付けてからリアクターに戻した。また、運転開始から98日目までをPeriod 1、98日目以降をPeriod 2として、運転開始98日目に、Run 1では排水濃度を一定のままHRTを短縮し、Run 2ではHRTを一定のまま排水濃度を増加させ、両者の装置容積当たりの流入負荷量が等しくなるよう、運転条件を変化させた。なお、循環水量はPeriod 1、2を通して一定とした。Table 2にリアクター運転条件を示す。

2. 2 水質測定

流入水および処理水、好気槽流入水、好気槽流出水の溶存有機物 (DOC, Dissolved Organic Carbon), NH₄-N, NO₂-N, NO₂₊₃-N, 溶存態全窒素 (D-T-N, Dissolved Total Nitrogen) 濃度の測定は下水試験法に基づいて行った。すなわち、サンプルをガラス繊維ろ紙 (Whatman社, GF/C) でろ過後、NH₄-N, NO₂-N, NO₂₊₃-N, D-T-NについてはTRAACS2000 (Bran Luebbe) を用いて測定し、DOCはTOC-5000A (島津製作所製) を用いて不揮発性有機炭素量 (NPOC) として測定した。

2. 3 RT-PCR

好気槽のスポンジ担体から搾汁により回収した汚泥よりRNA抽出試薬 ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて全RNAを抽出し、*amoA* mRNAをターゲットにRT-PCRを行った。逆転写酵素はReverTra Ace (東洋紡社) を使用し、付属のRNase InhibitorおよびRT buffer,

Table 2 Reactor operational condition

Run	1		2	
Experimental Period	1	2	1	2
HRT [day]	2.5	1.4	2.5	
Conc.of Influent T-N [mg/l]	45		45	79
N-Load [kg/m ³ /day]	0.018	0.032	0.018	0.032

dNTPs mixtureを用い、RTプライマーにはランダムプライマー (東洋紡社) を用いた。同社の指示に従い、終濃度で 5 U/ μ l RTase, 0.5 U/ μ l RNase Inhibitor, 1 $\times$ buffer, 1 mM dNTPs, 1.25 μ M primerの組成のRT反応液を20 μ l調製し、(30 $^{\circ}$ C, 10min) + (42 $^{\circ}$ C, 50min) + (99 $^{\circ}$ C, 5min) + (4 $^{\circ}$ C, 5min)の条件でRT反応を行った。サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社) を用いた。続いてRT反応産物をテンプレートにPCRを行った。DNAポリメラーゼにはKOD plus (東洋紡社) を用い、付属のPCR bufferおよびMgSO₄, dNTPs mixtureおよび、 β -プロテオバクテリアに属する独立栄養アンモニア酸化細菌の*amoA*遺伝子を特異的に増幅する*amoA*-1 F, *amoA*-2 Rプライマーセット¹³⁾を用いてPCRを行った。同社の指示に従い、0.05 U/ μ l DNA polymerase, 1 $\times$ buffer, 1 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M primersの組成のPCR溶液を50 μ l調製し、(94 $^{\circ}$ C, 1min) + (94 $^{\circ}$ C, 20sec; 58 $^{\circ}$ C, 10sec; 72 $^{\circ}$ C, 20sec) $\times$ 35cycles + (72 $^{\circ}$ C, 1min)の条件で1st PCRを行った。RT-PCR増幅産物は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega社製) により精製し、これを鋳型として、*amoA*-1F-gc(5'-CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGGGGGTTTCTACTGGTGGT-3' [GC clamp underlined]), *amoA*-2 R4 (5'-CCCCTCGGCAAAGCCTTCTTC-3') プライマーセットによる2nd PCRを行い、40bpのGCクランプを付加した。PCRは1st PCRと同様の条件で行った。RT-PCR産物およびPCR産物は2%アガロースゲルの電気泳動(100V, 35min)で確認した。

2. 4 DGGE

DGGEにはDCode system (Bio Rad社) を用い、同社のプロトコールに準拠した。8% (wt/vol) ポリアクリルアミドゲル中の変性剤濃度勾配は30~45% (変性剤100%は、7M尿素, 40%ホルムアミドに相当) に設定し、130V, 4.5時間の条件で電気泳動を行った¹⁴⁾。電気泳動終了後、ゲルをSYBR Gold (Molecular Probes社) で30min染色し、UVトランスイルミネーター上で撮影した。

2. 5 シーケンシング

各DGGEバンドはゲルより切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemにより精製し、amoA-1F, amoA-2RプライマーセットによるPCRで増幅させた。PCR条件は(94℃, 1min) + (94℃, 20sec; 58℃, 10sec; 72℃, 20sec) × 30cycles + (72℃, 1min)とした。増幅したPCR産物はDYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (アマシャムファルマシア社)によるサイクルシーケンシング反応に供し、DNAシーケンサーABI377 (Applied Biosystems社)により塩基配列を決定した。さらに、データベース (DDBJ: DNA Data Bank of Japan) 上のamoA遺伝子配列に基づき、多重整列および系統樹作成プログラムCLUSTAL Wを用い、Neighbor-joining法により系統樹を作成した^[15,16]。

3. 結果および考察

3. 1 生活排水処理モデルリアクターにおける窒素の形態と除去

生活排水処理モデルリアクター運転期間中の硝化率およびD-T-N除去率、DOC除去率の経日変化をFig. 2 (a) ~ (c) に示した。リアクター運転開始当初から、硝化率は上昇し、運転開始30日目以降、95%以上の安定した処理能が確認できた。運転開始98日目に流入負荷を上昇させた後も、硝化率は両系とも95%以上を保ち安定した硝化能が維持された。また、DOC除去率に関しても運転開始直後より80%を越え、運転期間を通して安定して有機物が除去された。一方、D-T-N除去率に関しては、運転開始直後より除去率は上昇し、運転開始30日目以降、80%前後の安定した処理能が達成された。しかし、運転開始98日目に流入負荷を増加させた結果、HRTが一定のままのRun 2においては安定した除去率が維持されたものの、HRTを短くしたRun 1においては、処理水中へのNO₃-Nの残存に伴う除去率の低下が観察され、除去率は70%前後において安定傾向を示した。これは、沈殿槽から嫌気第1槽への循環水量が負荷変動前後において一定であったため、HRTを短くしたRun 1においては、流入水量に対する循環水量で表される循環比が小さくなり、結果として窒素除去率の低下が生じたものと考えられた。本実験で検討した処理プロセスは、装置容積あたりの流入負荷量が適正值から1.75倍に上昇しても、有機物およびNH₄-Nは安定して処理可能であることが明らかとなり、NO₃-Nの脱窒反応も含め全窒素を高効率に除去するため

には、計画水量負荷に対する実水量負荷および好気槽処理水の嫌気槽への循環水量を適正に管理することが重要であることが確認された。

3. 2 アンモニア酸化細菌群集構造の立ち上がりにおける遷移

生活排水処理モデルリアクター運転開始より流入負荷量を上昇させるまでのPeriod 1の期間について、Fig. 2 (a) 中に示した日(1-1~1-5)に汚泥をサンプリ

Fig. 2 Efficiencies of Nitrification, D-T-N removal and DOC removal. The days of sludge sampling were indicated at the top of the figure
Symbols: ●, Run 1; ○, Run 2

ングし、全RNAを抽出した。次に、抽出されたRNAに対し、*amoA* mRNAをターゲットにRT-PCR-DGGEを行い、槽内で*amoA* mRNAを転写し、アンモニア酸化活性を示すアンモニア酸化細菌群の評価を行った。Run 1のRT-PCR-DGGEバンドパターンをFig. 3に示した。検出されたDGGEバンドは、主に1. 運転開始初期のみに現れたバンド (Band-4, 5), 2. 運転開始初期から運転の定常期にかけて鮮明化したバンド (Band-3), 3. 運転開始初期, 定常期を通して検出されたバンド (Band-1, 2) の3種類に分けることができた。下水処理場の汚泥を種汚泥としてリアクター内に投入し、硝化反応が進行して窒素除去率が上昇する過程において、*amoA* mRNAを多量に転写するアンモニア酸化細菌群の多様性が減少し、スポンジ担体を流動させた本リアクター内において優占的に硝化反応を担うアンモニア酸化細菌が残存していく様子が観察された。これは、種汚泥として用いた下水処理汚泥は多種多様な基質を含む実生活排水を処理しているため、その中に存在する微生物群の多様性も複雑であるのに対し、本実験で使用した人工排水は実排水と比較して単純な組成であることから、処理活性を示すアンモニア酸化細菌群の多様性も減少したものと考えられた。

DGGEバンドの系統解析の結果、リアクター運転開始初期にのみ検出され、反応が定常に向かうにつれて消失していった2つのバンド (DGGE-band-4, 5) は、いずれも多くの排水処理プロセスで存在が確認され⁸⁾、一般に高窒素負荷条件下でアンモニア酸化を担うとされる *Nitrosomonas eutropha* の近縁種に由来するものと推定された。本処理プロセスは人工排水をHRT 2.5日で流入

させており、装置容積あたりの窒素負荷量 ($0.12 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$) としては比較的低い条件であるといえるが、装置の運転開始初期においては、投入した種汚泥中の硝化細菌数が少なく菌体あたりの窒素負荷量が高くなったために、これらのアンモニア酸化細菌が処理活性を示していたものと考えられた。細菌の増殖に伴い槽内に適正な菌体量が確保された後は、菌体あたりの窒素負荷量も低下し、これらのアンモニア酸化細菌の*amoA* mRNA転写量は減少してきたものと考えられた。以上より、装置の立ち上がりから硝化反応が定常に達する期間においては、実排水から人工排水への排水性状の変化や、装置内に存在する細菌数の変化に応じて、反応槽内で*amoA* mRNAを転写し、処理活性を示すアンモニア酸化細菌が変化すると考えられ、その変遷をRT-PCR-DGGE法により評価することが可能であった。

3. 3 流入負荷変動に対するアンモニア酸化細菌群集構造の遷移

排水処理性能の安定化を確認後、運転開始98日目にHRTを短縮 (Run 1) または排水濃度を増加 (Run 2) させることにより流入負荷を上昇させた。リアクター運転初期と同様にFig. 2 (a) 中に示した日 (2-1~2-7) にサンプリングした汚泥より抽出した全RNAに対し、*amoA* mRNAをターゲットにRT-PCR-DGGEを行った結果をFig. 4に示した。HRTを短くすることで流入負荷を上昇させたRun 1においては、112日目 (負荷変動後14日目) 以降DGGEバンドプロファイルに鮮明な2本のDGGEバンドが現れ、*amoA* mRNAの転写量が増加したアンモ

Fig. 3 DGGE band profiles of the *amoA* mRNA RT-PCR products obtained from Run 1 in period 1. DGGE bands pointed by arrows were used for phylogenetic analysis

Fig. 4 DGGE band profiles of the *amoA* mRNA RT-PCR products in period 2. DGGE bands pointed by arrows were used for phylogenetic analysis

ニア酸化細菌の存在が確認された。一方、HRTは一定のまま排水濃度を増加させることで流入負荷を上昇させたRun 2においても、Run 1で新たなDGGEバンドが現れた変性剤濃度付近にDGGEバンドが確認されたものの、Run 1に比べてバンドは不鮮明であり*amoA* mRNAの転写量は少なく、アンモニア酸化反応への寄与率としては大きな変動はなかったものと考えられた。これにより、Run 1およびRun 2において装置容積あたりの流入負荷量は同じであっても、槽内でアンモニア酸化反応を担うアンモニア酸化細菌群が異なることが明らかとなった。これは、菌種による基質消費速度等の流入基質に対する応答性の違いにより、負荷変動前に検出されていた活性の高い菌種とは別のアンモニア酸化細菌の活性が高まったものと考えられ、優占種の遷移によりHRTの短縮に対応できたものと考えられた。

3. 4 生活排水処理モデルリアクターの環境条件とアンモニア酸化細菌の*amoA*遺伝子配列に基づいた系統解析による評価

Fig. 3, 4に示したDGGEバンドを切り出し、データベース上の*amoA*遺伝子配列を基に系統解析を行った結果、Fig. 5に示す系統樹が得られた。リアクター運転開始初期でのみ検出されたバンド (DGGE-band-4, 5) は、多くの排水処理プロセスで存在が確認されており⁸⁾、一般に高窒素負荷条件下で働くとされる*Nitrosomonas eutropha*に近縁であった。一方、運転開始初期、定常期を通して検出されたバンド (DGGE-band-1, 2) および、運転開始初期から定常期にかけて鮮明化したバンド (DGGE-band-3), さらに、HRTを短くして流入負荷量を上昇させた後に出現したバンド (DGGE-band-6, 7)

Fig. 5 Neighbor-joining tree showing the relationships partial of nucleotide sequences from DGGE bands of *amoA* mRNA RT-PCR products with reference sequences in the database. Nucleotide sequence database accession numbers are shown in the parentheses. The bar indicates an estimated 10% sequence divergence

はいずれも*Nitrosomonas*属に属したものの、データベース上に登録された単離菌の*amoA*遺伝子配列とは独立したクラスターを形成し、互いに高い相同性を示した。RT-PCR-DGGEバンドプロファイルを見ると、運転開始初期から定常期にかけての変化よりもHRTを短くした後の方が顕著な変化を示したが、*amoA* mRNAを多く転写したアンモニア酸化細菌の系統樹上での位置は運転開始初期から定常期にかけて大きく変化したことが明らかとなった。

さらに、負荷上昇後に新たに現れたバンド (DGGE-band-6, 7) のシーケンス解析を行った結果、運転初期のみに現れ高窒素負荷条件で活性を示すと考えられたDGGE-band-4, 5あるいは高濃度アンモニア環境でしばしば検出される*Nitrosomonas europaea*等ではなく、運転初期、定常期を通して検出されたDGGE-band-2や運転初期から定常期にかけて鮮明化したDGGE-band-3に近縁なアンモニア酸化細菌であることが推定された。この結果は、長期間一定条件で運転された反応槽内では、微生物叢も安定化され、負荷変動後に新たに処理活性を示し始めた細菌は、変動前に優占化していた細菌と近種であったことを示している。DGGEバンドプロファイルにおいてはHRTの変動に対して顕著な応答を示したものの、アンモニア酸化細菌の細菌種レベルでの変遷を見ると、運転の立ち上がりにおいて観察された実排水から人工排水への変化に対する応答の方が大きく現れ、アンモニア酸化活性発現に対しては、排水濃度や排水量の変化よりも排水組成の変化の方が大きく影響を与えることが推察された。これらのアンモニア酸化細菌は本処理プロセス内で高いアンモニア酸化活性を示していると考えられるが、系統樹上ではこれまでに単離されたアンモニア酸化細菌とは独立したクラスターを形成した。Wagnerら¹⁷⁾も各種排水処理プロセスの活性汚泥あるいは生物膜から*amoA*遺伝子クローンを検出し、約18%のクローンが単離菌とは独立した4つのグループに分けられたと報告しており、未だ単離されていないアンモニア酸化細菌群が硝化反応に寄与していることが示唆された。

本研究では、*amoA*遺伝子から転写された*amoA* mRNAを検出することによって活性に基づいたアンモニア酸化細菌の群集構造をモニタリングすることに成功した。mRNAをターゲットにした群集構造解析例としてはWawerら¹⁸⁾が*Desulfovibrio* spp. の [NiFe] hydrogenase 遺伝子について、Nogalesら¹⁹⁾ が脱窒細菌の*nirS*遺伝子とそのmRNAをターゲットにした解析を行っており、環境条件によって遺伝子から検出した細菌とmRNAから検

出した細菌が一致しないことを報告している。本研究においても、これまでの*amoA*遺伝子をターゲットにしたアンモニア酸化細菌の群集構造解析結果^{11, 20-23)}や、従来の16S rDNAによる系統解析結果⁷⁻⁹⁾と比較すると、得られた*amoA* mRNAの多様性は比較的低い結果となった。このような現象は以下のような点から説明できる。*amoA* 遺伝子に対する*amoA* mRNAの転写量は環境条件に鋭敏に応答し^{24, 25)}、環境により適応した細菌のmRNAが遺伝子の数倍から十数倍のコピー数転写される^{12, 26)}。その結果、塩基配列の異なる*amoA*遺伝子の存在量の差が各アンモニア酸化細菌の個体数の差を直接的に反映するのに対し、*amoA*遺伝子から多量に転写される*amoA* mRNAの存在量の差は各*amoA*遺伝子の存在量の差が増幅されて表現されていると考えられる。すなわち、各サンプルにおいて全*amoA* mRNA転写量に占める割合の多い数種の*amoA* mRNAのみを検出することから、多様性の低い結果になったと考えられる。これを検証するためには、*amoA* mRNAと*amoA*遺伝子を並行して検出・解析する必要があると考えられた。

4. まとめ

本研究では、生活排水処理プロセスにおける新しい微生物生態モニタリング技術として高度処理浄化槽のモデルリアクターにおいてRT-PCR-DGGE法を適用し、環境条件の変化に対し処理活性を示すアンモニア酸化細菌の群集構造解析を行った。具体的には、硝化反応の最初の段階であるアンモニアからヒドロキシルアミンへの酸化反応を担うAMOという酵素に着目し、この酵素の活性中心を含むサブユニットをコードする*amoA* mRNAの転写量をアンモニア酸化活性の指標とした。以下に得られた結果を示す。

- 1) 生活排水処理プロセスに、RT-PCR-DGGE法を適用することにより、*amoA* mRNAの転写量をアンモニア酸化活性の指標としたアンモニア酸化細菌群集のモニタリングが可能であり、下水処理汚泥中のアンモニア酸化細菌が人工排水に馴養される過程において、*amoA* mRNAを多量に転写するアンモニア酸化細菌群の多様性が減少する様子を観察することができた。
- 2) 排水処理性能が定常に達した後に排水量あるいは排水濃度を変化させた結果、環境条件の違いに対するアンモニア酸化活性発現の応答性の違いを評価することが可能であったが、アンモニア酸化細菌の細菌種レベ

ルでの変遷を見ると、排水濃度や排水量の変化よりも排水組成の変化の方が大きく影響を与えることが推察された。

- 3) 本処理プロセスにおいてアンモニア酸化活性を発現しているアンモニア酸化細菌の*amoA* mRNAシーケンスはいずれも*Nitrosomonas*属に属したものの、大部分の*amoA*遺伝子はデータベース上の*amoA*遺伝子配列との相同性が低く、未だ単離されていないアンモニア酸化細菌が硝化反応に寄与していることが示唆された。

引用文献

- 1) 稲森悠平：窒素・リン除去システム技術開発・普及整備への変換の必要不可欠性，月刊地球環境，33，86-87 (2002)
- 2) 味埜俊：微生物群の動態解析と高度処理への応用，月刊下水道，21，25-29 (1998)
- 3) Inamori, Y., Ebie, Y., and Matsumura, M.: Application of molecular microbiological methods for advanced nitrogen removal countermeasure, "Res. Adv. in Water Research, vol. 3", R.M. Mohan ed., 65-76, Global Research Network, India (2002)
- 4) Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J., and Amann, R.: In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, Water Sci. Technol., 34(1-2), 237-244 (1996)
- 5) Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., and Schramm, A.: Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm, Appl. Environ. Microbiol., 67, 1351-1362 (2001)
- 6) Nogueira, R., Melo, L.F., Purkhold, U., Wuertz, S., and Wagner, M.: Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon, Water Res., 36, 469-481 (2002)
- 7) Kowalchuk, G.A., Naoumenko, Z.S., Derikx, P.J.L., Felske, A., Stephen J.R., and Arkhipchenko, I.A.: Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class Proteobacteria in compost and composting materials, Appl. Environ. Microbiol., 65, 396-405 (1999)
- 8) Purkhold, U., P.-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P., and Wagner, M.: Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizer based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys, Appl. Environ. Microbiol., 66, 5368-5382 (2000)
- 9) 河野快子，岡部聡，渡辺義公，高倉恭子：16S rDNA 解析によるアンモニア酸化細菌の多様性評価，第36回日本水環境学会年会講演集，374 (2002)
- 10) Ebie, Y., Matsumura, M., Noda, N., Hirata, A., Tsuneda, S., and Inamori, Y.: Community analysis of nitrifying bacteria in advanced and compact Gappei-Johkasou by FISH and PCR-DGGE, Water Sci. Technol., 46(11-12), 105-111 (2002)
- 11) Rothauwe J.H., Witzel, K.P., and Liesack, W.: The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, Appl. Environ. Microbiol., 63, 4704-4712 (1997)
- 12) 青井謙輝，正木洋介，柿本恵里奈，常田聡，平田彰，長棟輝行：定量PCRによる水環境プロセス中における核酸のモニタリング，第5回日本水環境学会シンポジウム講演集，97-98 (2002)
- 13) Ebie, Y., Miura, H., Noda, N., Matsumura, M., Hirata, A., Tsuneda, S., and Inamori, Y.: Detection and quantification of expression of *amoA* by competitive reverse transcription-PCR, Water Sci. Technol., 46(1-2), 281-288 (2002)
- 14) 石井浩介，中川達功，福井学：微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用，Microbes and Environments, 15, 59-73 (2000)
- 15) Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A., and Inamori, Y.: Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation methods, J. Biosci. Bioeng., 92, 346-353 (2001)
- 16) Saitou, N. and Nei, M.: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol., 4(4), 406-425 (1987)
- 17) Wagner, M. and Loy, A.: Bacterial community composition and function in sewage treatment systems, Curr. Opinion in Biotechnol., 13, 218-227 (2002)
- 18) Wawer, C., Jetten, M. S. M., and Muyzer, G.: Genetic diversity and expression of the [NiFe] hydrogenase large-subunit gene of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples, Appl. Environ. Microbiol., 63, 4360-4369 (1997)
- 19) Nogales, B., Timmis, K. N., Nedwell, D. B., and Osborn, A. M.: Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA, Appl. Environ. Microbiol., 68, 5017-5025 (2002)
- 20) Sinigalliano, C. D., Kuhn, D. N., and Jones, R. D.: Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2702-2706 (1995)
- 21) Hastings, R.C., Ceccherini, M.T., Miclaus, N., Saunders, J.R., Bazzicalupo, M., and McCathy, A.J.: Direct molecular biological analysis of ammonia oxidizing bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure, FEMS Microbiol. Ecol., 23, 55-63 (1997)
- 22) Sakano, Y. and Kerkhof, L.: Assessment of changes

- in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4877-4882 (1998)
- 23) Stephen, J.R., Chang, Y.-J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Leung, K.T., Flemming, C.A., and White, D.C.: Effect of toxic metals on indigenous soil β -subgroup Proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria, Appl. Environ. Microbiol., 65, 95-101 (1999)
- 24) 中村明靖, 荒木信夫, 井口晃徳, 山口隆司, 山崎慎一, 原田秀樹: 硝化汚泥中の*amoA*遺伝子の定量とその発現量の解析, 第18回日本微生物生態学会講演要旨集, 89 (2002)
- 25) 押木守, 竹林賢, 荒木信夫, 山口隆司, 山崎慎一: アンモニア酸化細菌の*amoA* mRNAダイナミクスに関する研究, 第37回日本水環境学会年会講演集, 430 (2003)
- 26) 正木洋介, 青井謙輝, 白政優子, 常田聡, 平田彰, 長棟輝行: 機能遺伝子のmRNA発現に基づいた機能及び活性の定量的解析, 第36回日本水環境学会年会講演集, 292 (2002)
- (受付 2003. 5. 6)
(受理 2003. 7. 22)