

2004 年度 修 士 論 文

亜硝酸蓄積型硝化脱窒処理プロセスにおける
硝化細菌の挙動解析

Characterization of Nitrifying Bacterial Population in a
Nitrification-Denitrification Process with Nitrite Build-Up

高崎 由紀
Takasaki, Yuki

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学専攻 社会文化環境コース

目次

第1章 序論	1
1.1 はじめに	1
1.2 本研究の目的	2
1.3 本研究の構成	2
第2章 既存の研究	3
2.1 製鐵所排水	3
2.2 窒素循環	3
2.3 硝化細菌	4
2.3.1 アンモニア酸化細菌	4
2.3.1.1 生理学的・生化学的性質	4
2.3.1.2 培養条件	5
2.3.1.3 AOBの種類と系統樹	5
2.3.1.4 AOBの分子生物学的研究の知見	7
2.3.2 亜硝酸酸化細菌	8
2.3.2.1 亜硝酸酸化反応	8
2.3.2.2 NOBの種類と生理学的・生化学的性質	8
2.3.2.3 培養条件	10
2.3.2.4 NOBの分子生物学的知見	10
2.3.2.5 NOBと環境	12
2.4 硝化脱窒処理プロセス	13
2.4.1 従来の硝化脱窒処理プロセス	13
2.4.2 亜硝酸蓄積型硝化脱窒処理プロセスと新しい窒素除去プロセス	15
2.5 分子生物学的手法	19
2.5.1 PCR法	20
2.5.2 Cloning法	21
2.5.3 DGGE法	23
2.5.4 Sequencing法	24
2.5.5 リアルタイムPCR定量法	25
2.5.6 FISH法	28
2.5.7 分子生物学的手法以外の定量法	29
第3章 研究手法、及びその検討	30
3.1 ミニプラント	30
3.1.1 ミニプラントの詳細・概要	30
3.1.2 ミニプラントの運転状況	32
3.1.3 ミニプラントの処理状況	32
3.2 分子生物学的手法	34
3.2.1 サンプルング	34
3.2.2 DNA抽出	35
3.2.3 PCR法	36
3.2.4 Cloning法	39
3.2.5 DGGE法	40
3.2.6 Sequencing法	41
3.2.7 リアルタイムPCR定量	42
3.2.8 FISH法	44

第4章 人工安水硝化脱窒処理プロセスミニプラントの主要 NOB の把握とその挙動解	47
4.1 優占 NOB グループの絞込み	47
4.1.1 <i>Nitrobacter</i> 属及び <i>Nitrospira</i> 属を標的とする PCR 法の適用	47
4.1.2 FGPS プライマーセットによる増幅産物のバンド強度の挙動	48
4.1.3 まとめ	48
4.2 PCR-Cloning-Sequencing 法による解析	49
4.2.1 <i>Nitrobacter</i> 属のみを対象としたクローニングによる解析	49
4.2.2 全細菌を対象とする 16SrRNA 全長 (27F-1492R) プライマーセットによる解析	49
4.3 QP-PCR 法による <i>Nitrobacter</i> 属の定量法の開発	50
4.3.1 QP-PCR 条件の最適化	50
4.4 QP-PCR 法を用いたミニプラント内の <i>Nitrobacter</i> 属の定量解析	52
4.5 FISH 法を用いた NOB グループの検出	55
4.6 アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の空間分布	56
4.7 考察	58
4.7.1 FGPS プライマーの信頼性	58
4.7.2 <i>norB</i> による PCR の結果について	58
4.7.3 <i>Nitrobacter</i> 属の亜硝酸酸化速度について	59
4.7.3.1 本実験結果による単位あたりの <i>Nitrobacter</i> 属あたりの亜硝酸酸化速度の計算	60
4.7.3.2 文献から得られる亜硝酸酸化細菌の比亚硝酸消費速度 (mgN/mgNOB/day) の計算	61
4.7.3.3 ミニプラント内での亜硝酸酸化への <i>Nitrobacter</i> 属の寄与の評価	63
4.8 まとめ	64
第5章 人工安水硝化脱窒処理プロセスミニプラントの AOB 群集構造解析	65
5.1 PCR-DGGE 法による AOB 微生物群集モニタリング	65
5.2 塩基配列解読による DGGE バンドの近縁種決定	67
5.2.1 塩基配列解読結果	67
5.2.2 系統樹作成	67
5.3 全細菌を対象とする 16SrRNA 全長 (27F-1492R) プライマーセットを用いたクローニングによる解析	71
5.4 AOB プローブの検討	72
5.4.1 データベースを用いた AOB プローブの検討	72
5.4.2 Nso1225 プローブと NEU プローブを用いた FISH 法による検出の確認	72
5.4.2.1 Nso1225 プローブと NEU プローブの蛍光シグナル検出の確認	72
5.4.2.2 Nso1225 プローブと NEU プローブの性質の確認	72
5.5 まとめ	73
第6章 総括	74
6.1 研究の結果	74
6.2 今後の展望	75
謝辞	76
参考文献	77

第1章 序論

1.1 はじめに

近年、生活排水等に大量に含まれたリン、窒素等の栄養塩類による閉鎖性水域の富栄養化が社会問題になっている。排水から窒素を除去する主要な対策として、下水処理場などで微生物を用いた活性汚泥法に硝化脱窒法を加えた硝化脱窒処理プロセスが普及している。

このプロセス内では大きく分けて硝化細菌群と脱窒細菌群の二つの微生物群が窒素除去に関与している。前者の硝化細菌群はさらにアンモニア酸化細菌（以下 AOB）と亜硝酸酸化細菌（以下 NOB）の二種類に分けられ、AOB はアンモニアを酸化し亜硝酸に転換し、NOB がその亜硝酸を酸化し硝酸へと転換している（硝化反応）。脱窒細菌群がこの硝酸を窒素へと転換させ、大気に放出することで窒素は除去される（脱窒反応）(図 1.1)。

このような微生物の働きを利用した窒素除去処理法(生物学的窒素除去プロセス)は従来使われてきた物理化学的手法に比べてエネルギー、コスト負担が少ないというメリットがある。

一方、普通の活性汚泥法と比べて、消化液の循環や酸素供給のためにエネルギーが余計にかかる。この改善策として、酸素供給量を抑制するために、硝化反応において亜硝酸の硝酸への酸化を抑制し、そこから脱窒反応を行う「亜硝酸蓄積型」硝化脱窒プロセスが有効であることが指摘されている。(ただし、「亜硝酸蓄積型」硝化を安定的におこす制御方法(メカニズム)等は解明されていない)。

一方、味埜・佐藤・小貫研究室と新日鐵(株)との共同研究の研究の過程で、高濃度のアンモニア等の窒素分やフェノール類、チオシアン(HCN)、チオ硫酸(S₂O₃)、タール油状分などで構成される「安水」を大量に含んだ製鉄所排水を硝化脱窒処理プロセスで処理した結果、「亜硝酸蓄積型」硝化が安定して起こることがわかった。そこで、新日鐵(株)において、この製鉄所排水を模倣した人工安水を硝化脱窒法により処理する実験プラント(ミニプラント)が立ち上げられ運転された。安水中の成分(フェノール、チオ硫酸、チオシアン)が「亜硝酸蓄積型」硝化に与える影響を調べるため、人工安水(基質)から各成分を順に抜いて運転した。その結果、安水中のチオ硫酸が「亜硝酸蓄積型」硝化に関与していることを示唆する知見が得られた(新田見 2003)。

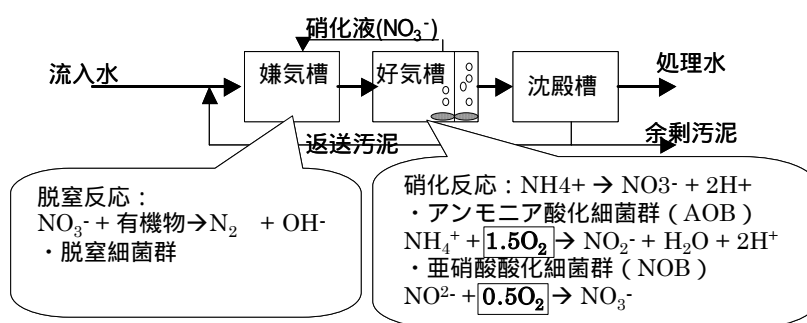


図 1.1 硝化脱窒処理プロセスと微生物の化学反応

1.2 本研究の目的

本研究は、先に述べた製鉄所排水処理において硝化を担うアンモニア細菌、亜硝酸酸化細菌について、種を特定し、また、硝化を担う細菌の挙動を明らかにすることを目的とした。すなわち、本研究の目的は以下の通りである。

1. 安水処理プロセスにおいて硝化を担った硝化細菌群（アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌）を明らかにする。
2. 硝化細菌群のうち、特に亜硝酸酸化細菌の挙動に着目し、ミニプラントにおける亜硝酸蓄積型硝化の原因についての知見を得る。

1.3 本論文の構成

第1章 序論

ここでは、本研究の背景、目的、及び構成について述べた

第2章 既往の研究

ここでは、本研究を進めるにあたり必要となった既存の研究について述べた。

第3章 研究手法（及びその検討）

ここでは、本研究で使用した実験手法、その原理、及び、確立までの経過等について述べた。

第4章 人工安水硝化脱窒処理プロセスミニプラントの亜硝酸酸化細菌の解析

本研究の目的である、安水処理プロセスにおける硝化を担う亜硝酸酸化細菌についての明らかにすることと、ミニプラントにおける亜硝酸蓄積型硝化の原因についての知見を得るために行った、ミニプラント内での優占種 NOB グループの絞込み、挙動解析、等の結果を述べた。

第5章 人工安水硝化脱窒処理プロセスミニプラントのアンモニア酸化細菌群集構造解析

本研究の目的である、安水処理プロセスにおける硝化を亜硝酸酸化細菌と共に担うアンモニア酸化細菌についての明らかにするために行った MP 内の経時変化及び群集構造の解析結果を述べた。

第6章 総括

本研究のまとめを述べた。

第2章 既知の研究

2.1 製鉄所排水

製鉄所排水とは、製鉄所で鉄の製造過程で出てくる排水で、高濃度のCOD成分、高濃度のアンモニアの他、フェノール類、シアン、硫化水素イオン油分等を含む「安水」を主成分とした排水である。現在の安水処理は一般的に物理化学的処理法と生物学的処理法（標準活性汚泥法）との組み合わせて処理されている。

本研究室と新日鐵（株）の共同研究で、この製鉄所排水を硝化液循環型硝化脱窒処理プロセスを用いて処理した結果、安定的に亜硝酸蓄積型硝化が行われていることが報告されている（新田見 2003）

2.2 窒素循環

窒素は生体内では、核酸やアミノ酸の構成元素として含まれる生体にとって最も重要な元素の一つである。また、この窒素は自然界においてさまざまな形で存在しており、循環している（図 2.1）。この窒素の循環にはさまざまな微生物が関わっている。本研究で扱う微生物を用いた窒素除去（硝化脱窒処理プロセス）にもこの循環の一部である硝化・脱窒反応が深く関わっている。

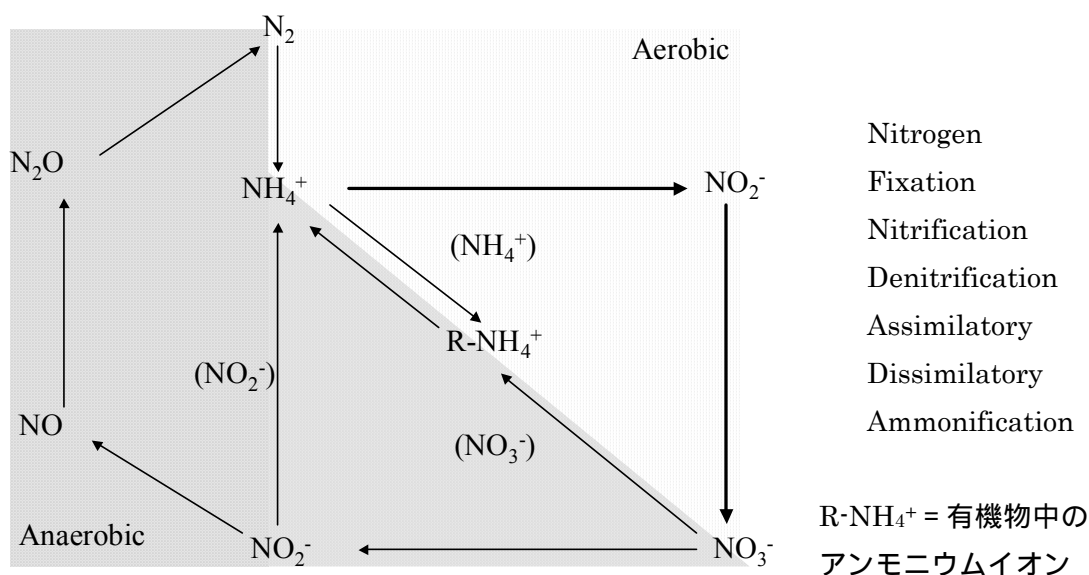


図 2.1 自然界における窒素循環

2.3 硝化細菌

硝化細菌は、自然界の窒素循環（図 2.1）の中で大きな役割を果たしており、アンモニアを亜硝酸へと酸化するアンモニア酸化細菌（Ammonia Oxidizing bacteria, 以下 AOB）と亜硝酸から硝酸へと酸化する亜硝酸酸化細菌（Nitrite Oxidizing bacteria, 以下 NOB）の 2 種類に分類できる。従来の硝化脱窒処理プロセスには硝化細菌、中でも Lithoautotrophic(化学無機独立栄養細菌)の硝化細菌が深く関与している。ここでは、この二種類の硝化細菌について述べる。

2.3.1 アンモニア酸化細菌

2.3.1.1 生理学的・生化学的性質

アンモニア酸化細菌は通常絶対好気性細菌であり、二つの酵素を用いて 2 段階の化学反応（式 2.1, 2.2, 2.3）を経てアンモニア態窒素を亜硝酸態窒素へと酸化する。アンモニア酸化細菌は独立栄養型（化学無機独立栄養細菌）であり、アンモニアを電子供与体、酸素を電子受容体として利用し、酸化した際に生成されるエネルギーを利用し、炭酸ガスを固定して増殖を行う（式 2.4）。

表 2.1 アンモニア酸化反応

段階	反応式	関与酵素	G (Kcal/mol)	式
1	$\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	AMO	3.85	2.1
2	$\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	HAO	- 68.89	2.2
合計	$\text{NH}_4^+ + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$		- 65.04	2.3

AMO: ammonia monooxygenase

HMO: Hydroxylamine oxidoreductase

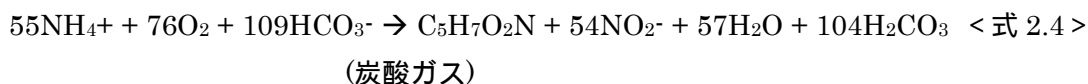
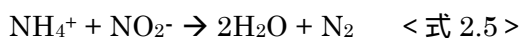


表 2.1 からわかるように、AOB によるアンモニア酸化には酸素が必要となる。また、最近になってアンモニア酸化細菌の一部(嫌気性アンモニア酸化細菌)には、酸素濃度の制限下で亜硝酸によりアンモニアを酸化する嫌気的なアンモニアの酸化を行うことが出来る細菌がいることがわかってきた（Bock *et al.*, 1995）(式 2.5）。



2.3.1.2 培養条件

AOB の培養にはアンモニア濃度と塩濃度が大きな影響力をもつ。(AOB に属する菌がこれらの因子によって培養可能・不可能となる)。増殖速度はきわめて遅く、プレート培養からコロニーを採取するのに最低 6 ~ 8 週間かかる。最適培養温度は 30 °C、最適 pH は 8。液体窒素 (-80 °C) での保存が可能。

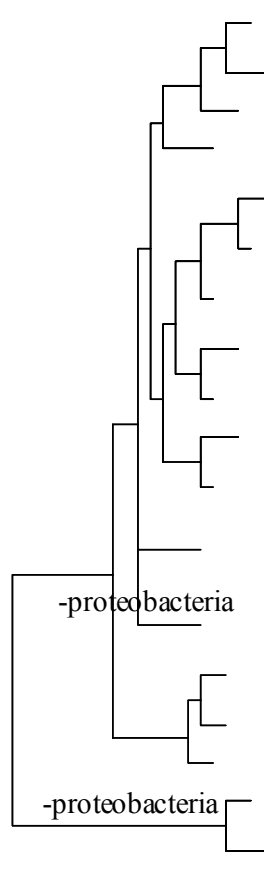
2.3.1.3 AOB の種類と系統樹

1892 年に Winogradsky が AOB を単離して以降、今までに数多くの AOB が単離された。好気性 AOB は属名の頭文字(Prefix)が "Nitroso-" がつけられており(Seviour and Blackall, 1999) 代表的なものに *Nitrosomonas* 属に属する *Nitrosomonas europaea* 等が存在する。

また単離された AOB は 16S rRNA 塩基配列が読まれてきた(Head *et al.*, 1993; Teske *et al.*, 1994; Pommerening-Röser *et al.*, 1996)。その結果、AOB は大きく分けて二つのグループ、すなわち α -proteobacteria か β -proteobacteria のどちらかに属することがわかっている (Head *et al.*, 1993; Teske, *et al.*, 1994)。単離され、且つ 16SrRNA の塩基配列が 1000bp 以上決定されている AOB のデータから作成された系統樹は図 2.2 の通りである。図 2.2 からわかるように、 β -proteobacteria に属する AOB が大きく分けて 7 つの lineage に分けることができ、また、lineage 内の単離株の生化学的特徴 (Phenotypical properties: アンモニアへの親和性、塩要求性、Urease の活性、等) が似ていることがわかっている(Koop *et al.*, 2001)。

また、AOB の機能遺伝子である *amoA* を系統樹解析に用いた研究がされている(Mc Tavis *et al.*, 1993; Klotz and Norton, 1995; Suwa *et al.*, 1997; Purkhold *et al.*, 2000; Aakra *et al.*, 2001)。AmoA を用いた系統樹解析は基本的に 16SrRNA のデータベースを元に作成した系統樹解析の結果と一致していた。ただし、今までのところ増幅させた *amoA* 領域が短いことと、その配列部位が高い保存性(98%の β -proteobacteria AOB において、*amoA* のアミノ酸配列 (151 ポジション) の内の 93 ポジションが全く同じアミノ酸で構成されている。)を示していたことから 16SrRNA 由来の系統樹に比べて分離能が低かった(Koops *et al.*, 2003)。

さらに、 α -proteobacteria に属する AOB (以下、 α -AOB) が 2 種類しか単離されていないのに対し、 β -proteobacteria に属する AOB (以下、 β -AOB) は数多く単離されており知見が多くあることから、分子生物学的手法を用いた AOB の多様性の研究は主に β -AOB に焦点をあてて行われている。



Species	Ecophysiological parameters			Preferred habitat
	Salt requirement	Urease activity	NH ₃ affinity (K _a) (μM)	
<i>Nitrosomonas europaea</i> <i>Nitrosomonas eutropha</i> <i>Nitrosomonas halophila</i> <i>Nitrococcus mobilis</i>	Halotolerant Or moderately halophilic	-	30 – 61	Sewage disposal plants Eutrophic fresh water and brackish water
<i>Nitrosomonas communis</i> <i>Nitrosomonas sp1 &2</i>	No salt requirement	-	14 – 43	Soil (not acid)
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>		+	19 – 46	Eutrophic freshwater
<i>Nitrosomonas urea</i> <i>Nitrosomonas pligotropha</i>	No salt requirement	+	1.9 – 4.2	Oligotrophic freshwater natural solis
<i>Nitrosomonas marina</i> <i>Nitrosomonas aestuarii</i>	Obligately halophilic	+	50 – 52	Marine environment
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	Obligately halophilic	+	42 – 59	
<i>Nitrosomonas sp. Nm143</i>				Marine & estuary systems
<i>Nitrosolbus multiformis</i> <i>Nitrosovibrio tenuis</i> <i>Nitrospira</i>	No salt requirement	+ / -		Soils(not acid)
				Soils, rocks
				Freshwater
<i>Nitrosococcus oceani</i> <i>Nitrosococcus halophilus</i>	Obligately halophilic	+ -		Marine environment

図 2.2 AOB の 7 つの系統的グループとその生理学的性質、及び、生息環境

2.3.1.4 AOB の分子生物学的研究の知見

AOB の 16SrRNA 系統樹解析の研究がはじめられて以来、次々に PCR プライマーや、dot-blot hybridization 及び FISH 用の プローブが開発されてきた (Koops *et al.*, 2003)。

特に、AOB の多様性を調べるために環境サンプル由来の配列を増幅させ、AOB のクローンとの相同性を調べる研究が多くなされている。このとき、Primer や Probe の”sensitivity (targeting all known or least most beta-AOB)”と”Specificity (not perfectly excluding other bacteria)”が重要となってくる。特に、多様性の研究においては、顕著なバイアスを避けるために高い”sensitivity”とほどよく低い”specificity”が推奨されている (Koops *et al.*, 2003)。また、16SrRNA の増幅領域が 1000bp 以上のものが推奨されている。現在これらの条件をもっとも満たしているものとして AOMf と AOB_r のプライマーセット (McCaig *et al.*, 1994) がある (Koops *et al.*, 2003)。

AOB に対して様々な分子生物学的手法を用いた研究が行われてきた。その一つが DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) である。この手法は Soil (Kowalchuk *et al.*, 1997, 1998, 1999, 2000), groundwater (Ivanova *et al.*, 2000), wastewater (Luxmy *et al.*, 2000), marine (Bano and Hollibaugh, 2000) 等様々な環境中の AOB の多様性研究に使われている (Nicolaisen and Ramsing, 2002)。

DGGE に用いるプライマーは増幅領域が約 500bp までという制限があるため開発されたすべてのプライマーセットが利用できるわけではない。この条件を満たし、かつ幅広く AOB を捉えることが出来るプライマーセットとして CTO189f – CTO654r (465bp) がある。これは、Soil (Kowalchuk *et al.*, 1997) や wastewater (Boon *et al.*, 2002) 等、幅広い環境サンプルの解析に利用されている。

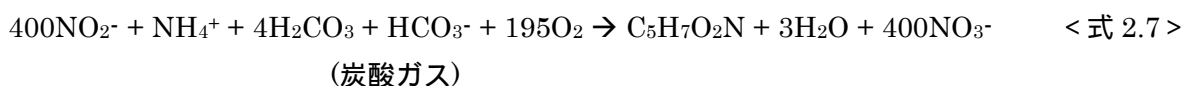
また、PCR バイアスのかからず、定量解析にも使用可能な FISH 法で検出することも、盛んに行われている。硝化細菌に対して FISH 法を用いたアプローチを最初に開始したのは Wagner らである (Wagner *et al.*, 1995)。彼らはアンモニア参加細菌である *Nitrosomas europaea*, *Nitrosomonas eutropha* をターゲットとして NEU プローブを開発し、これを活性汚泥法排水処理プロセスから得られたサンプルに適用し、NEU プローブがアンモニア酸化細菌の計数に十分使用可能であること、そして検出されたアンモニア酸化細菌グループは、アンモニア酸化細菌はクラスター構造をとっていることを明らかにした (Wagner *et al.*, 1995)。さらに、Wagner らのグループは、アンモニア酸化細菌のほとんどをターゲットとする Nso1225 と Nso190 プローブ、*Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosococcus mobilis* をターゲットとする Nsm156 プローブ等を開発した (Mobarry *et al.*, 1996)。

また、AOB の定量解析に cPCR (competitive PCR: 競合的 PCR) とリアルタイム PCR という二つの手法が近年用いられている。前者は wastewater (Dionisi, H.M. *et al.*, 2002) 等に用いられている。また全 - AOB の定量に、16S r RNA をターゲットとする CTO189f を用いた TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 定量法が開発されている (hermansson and Lindgren, 2001)。AOB に対するリアルタイム PCR の適用はこのほかには現時点での文献調査の限りでは Harms (Harms *et al.*, 2003) と Okano (Okano *et al.*, 2004) による amoA をターゲットにしたものだけである。

2.3.2 亜硝酸酸化細菌

2.3.2.1 亜硝酸酸化反応

亜硝酸酸化細菌は通常好気性細菌であり、亜硝酸を硝酸へと酸化する(式 2.6)。また、独立栄養型(化学無機独立栄養細菌)であり、亜硝酸を電子供与体、酸素を電子受容体として利用して亜硝酸酸化を行う。この反応には”nitrite oxidoreductase(亜硝酸酸化還元酵素(NOR))”という酵素が関わっている。この反応で生成されるエネルギーを利用し、炭酸ガスを固定して増殖を行う(式 2.7)。



これらの式からもわかるように、NOBによる亜硝酸酸化には酸素が必要となる。

2.3.2.2 NOBの種類と生理学的・生化学的性質

AOBと比較して単離された数が少なく、4つのグループ(*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*)に分類される(図 2.3)。また、 α -proteobacteria (*nitrobacter* 属)、 β -proteobacteria (*Nitrococcus* 属)、 δ -proteobacteria (*nitrospina* 属) 及び proteobacteria とは異なる phylum(門) (*Nitrospira*) というように系統樹上に幅広く存在している。

Nitrobacter 属

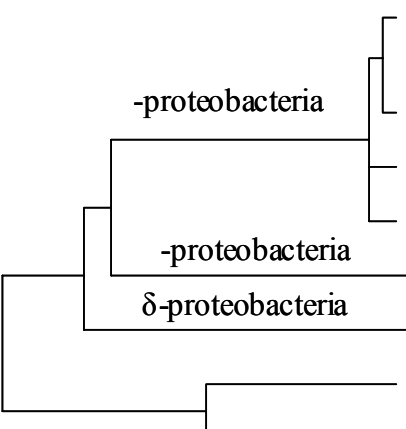
N. winogradskyi, *N. hamburgensis*, *N. vulgaris* は river, lake, swage disposal plants, soil, marine 等、幅広い環境から検出されている。これに対して *N. alkalicus* は soda lake からしか単離されておらず、また、pH 10 の培養条件下でも増殖することがわかっている (Sorokin *et al.*, 1998)。他の NOB が絶対独立栄養細菌であるのに対し、*Nitrobacter* 属は嫌気下では炭素源を用いて従属栄養的に増殖することが可能である。(Bock *et al.*, 1992)。顕微鏡下では Free-living cell (フロックを形成していない) のかたちで存在していることが確認されている (Koops and Pommerening-Roser 2001)。また、*Nitrobacter* 属は基本的に塩要求性 (no salt requirement) を示さない。

Nitrospira 門

生息環境は freshwater, marine, sediment, activated sludge 等、多様である。ただし、塩要求性(halophilic)を示す。顕微鏡下ではフロックを形成、又はバイオフィーム上に存在していることが確認されている (Koops and Pommerening-Roser 2001)。

Nitrospina 属・*Nitrococcus* 属

これらに属する種は 1 種類ずつしか単離されていない。いずれも marine からのみ検出されており、高い塩濃度条件で培養しても増殖は見られなかった (Watson and Waterbury, 1971)。



species	Group	Ecophysiological parameters		Preferred habitat
		Salt requirement	Preferable nitrite conc.	
<i>Nitrobacter alkalicus</i>	Nitrobacter	Alkali & halotolerant	high	Soda lakes
<i>Nitrobacter wingradskyi</i>		No salt requirement	high	Freshwater, soils and rocks
<i>Nitrobacter vulgaris</i>				
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>				
<i>Nitrococcus mobilis</i>	Nitrococcus	Obligately halophilic	Low (<1mM)	Marine environment
<i>Nitrospina gracilis</i>	Nitrospina			
<i>Nitrospira marina</i>	Nitrospira			
<i>Nitrospira moscoviensis</i>				

図 2.3 NOB の 4 つの系統的グループとその生理学的性質、及び、生息環境

2.3.2.3 培養条件

NOB を培養には世代時間（全集団の細胞が 2 倍になるのに要する一定の時間）が最低 8 時間以上であるため、増殖速度はきわめて遅く、純菌を得るのに数ヶ月かかる。最適培養温度は 25-30 。

2.3.2.4 NOB の分子生物学的知見

NOB は自然界の窒素循環の一部を担ってきたが、AOB に比べて注目度は低く、よって長い間研究があまり進められてこなかった。理由の一つは NOB の持つ生理学的性質、すなわち、増殖速度が遅く、バイオマスが低い、等が研究を困難にさせていたからである（Bock *et al.*, 1989; Schmidt 1978）。もう一つの理由は、酸素が十分に供給されている通常の自然界では亜硝酸酸化反応の速度がアンモニア酸化反応の速度を上回り、アンモニア酸化反応が消化反応の律速因子となるため、AOB の研究が重視されてきた点があげられる（Bock *et al.*, 1991）。

系統樹解析

< *Nitrobacter* 属 >

1994 年に Teske らにより（Teske *et al.*, 1994）AOB と *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* の主要な株の 16SrRNA 塩基配列解析が行われ、それぞれが異なる proteobacteria 門（ α 、 β 、 δ ）に属することが解明された。また、 α -proteobacteria の系統樹上で各 *Nitrobacter* が極めて近接してクラスターを形成しており、さらに自然界における働きの異なる *Rhodobacter palustris* (Water and free living photoheterotroph)、*Bradyrhizobium japonicum* (Soil and intracellular symbiont of legumes)、*Blastobacter denitrificans*、*Afipia felis* (Opportunistic for cats and humans)、*Afipia clevelandensis*、らとも近接していることがわかった（96.8 から 100% の相同性を示した）（Teske *et al.*, 1994）。また、Orso らにより *Nitrobacter* 属の 16SrRNA の全塩基配列を用いた系統樹解析が行われた（Orso *et al.*, 1994）。各 *Nitrobacter* 種の平均的な相同性は 99.2% と高かった。また、*Nitrobacter* 属の近縁種である *Bradyrhizobium* 属と *Rhodopseudomonas* 属との平均的な相同性も 98.1% と高かった（Orso *et al.*, 1994）。

< *Nitrospira* 属 >

単離された二つの *Nitrospira* 種やクローニングによって得られた *Nitrospira*-like NOB 等の塩基配列情報が蓄積され、このグループは新しい系統樹 (Linage) として『*Nitrospira* Phylum』 (Ehrich *et al.*, 1995) と名づけられた。この Phylum は 4 つのクラスターに分かれ、うち 2 つのクラスターは完全に環境サンプルのみで成り立っている（Daim *et al.*, 2001）。

検出方法

< *Nitrobacter* 属 >

16SrRNA 上をターゲットにした FGPS872f(non-specific)-FGPS1269r(specific)プライマーセット(397bp)(Degrange and Bardin 1995)、及び、16S と 23S r DNA の間(the intergenic spacer (IGS) region) の配列が極めて保存性が高いという視点から作られた FGPI149-457 と FGPL420'-458 プライマーセット (Gradmann *et al.*, 2000) の二つが *Nitrobacter* 属のプライマーセットとして開発されている。後者のプライマーは *Nitrobacter* 属内での多様性の研究に利用された (Graudmann and Normand 2000)。

Wagnerらにより *Nitrobacter* 属をターゲットとするプローブ NIT3 が開発されている(Wagner *et al.*, 1996)。これは様々な研究者に利用されている。

< *Nitrospira* 属 >

NSR1113f-NSR1264r という *Nitrospira* グループの 16S r RNA をターゲットにしたプライマーセットが開発されている(Dionisi *et al.*, 2002)。さらにこのプライマーセットを用いた TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 定量法が開発されており、下水処理場のサンプルの *Nitrospira* グループの定量解析に用いられた (Harms *et al.*, 2003)。

Ntspa712, Ntspa662(Daims *et al.*, 2001), NSR1156, NSR826(Schramm *et al.*, 1998)等、*Nitrospira* を門レベルで捕らえられるものから、属レベルで捕らえるものなど複数のプローブが作成されている。

< *Nitrococcus* 属&*Nitrospina* 属 >

Nitrococcus と *Nitrospina* についてはあまり研究がなされていない。唯一、Ntspn693,Ntcoc84 というプローブが作成されている (Juretschko S. (2000))。

< 機能遺伝子 : Nor >

Nitrobacter hamburgensis の亜硝酸酸化還元酵素 (NOR) 遺伝子のクローニングの成功例がある (Kirstein and Bock. 1993)。この塩基配列情報を元に norB269f-443r というプライマーセットが開発され、PCR の成功例がある (赤司 2004)。ただし、環境サンプル等への応用は報告されていない。

定量

< *Nitrobacter* 属 >

Nitrobacter 属の定量はあまり研究されていない。文献調査の結果、培養を必要とする MPN-Griess 法、Immunofluorescence 法 (fluorescent antibody staining technique) ,そして培養を必要としない MPN-PCR 法 (Degrange and Bardin 1995) と cPCR 法が開発されている (Berthe *et al.*, 1999)。培養を必要とする手法は”recovery yield”が良いが手間がかかるという欠点があり、MPN-PCR 法は”recovery yield”が低いといわれている (Feray *et al.*, 1999)。Immunofluorescence 法では *Nitrobacter* 属すべてを捕らえる抗体(antibody)が無いという問題点がある (Josserand and Cleyet-Marel 1979)。

< *Nitrospira* 属 >

近年、様々な環境で *Nitrospira* 属が優占していることが確認されて折り、それに伴い cPCR(Dionishi, *et al.*, 2002)やリアルタイム PCR 法等の分子生物学的手法を用いた *Nitrospira* 属の定量方法の開発が進められてきた。

2.3.2.5 NOB と環境

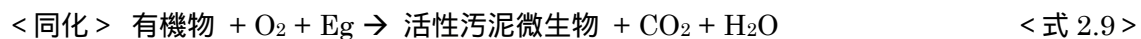
培養法及び顕微鏡下の morphology (形状) 観察による NOB の検出が行われていた当時、土壌 (soil)、海洋 (marine)、下水処理場 (wastewater treatment plant) 等、幅広い環境から *Nitrobacter* 属が中心的に検出され、優占種だとされていた (Watson *et al.*, 1981)。

NOB の検出に PCR や FISH 法が利用されて以降、多くの環境サンプル中で *Nitrospira* 属が優占的に存在し、事前に培養しなければめったに *Nitrobacter* 属が検出されないことが確認された (Burrell *et al.*, 1998; Burrell *et al.*, 1999; Schramm *et al.*, 1998; Juretschko *et al.*, 1998; Okabe *et al.*, 1999 ; Egli *et al.*, 2003)。

2.4 硝化脱窒処理プロセス

2.4.1 従来の硝化脱窒処理プロセス

活性汚泥法とは、微生物により排水中の有機性汚泥物質を除去する方法であり、日本における都市下水処理場の90%以上で利用されている(大森 2000)(図 2.4)。この方法は物理学的処理法に比べてもコストを抑えられるという利点がある。原理としては、まず、空気供給が行われている処理槽(曝気槽・好気槽)で、微生物が排水中の有機物を利用して繁殖し、凝集性のあるゼラチン状のフロック(活性汚泥)ができる。具体的には、流入水中の有機物は活性汚泥微生物の体内に取り込まれ、酸化されて生態維持のためのエネルギー材料となるか、又は同化により活性汚泥微生物が増殖するための材料となる。



活性汚泥は沈殿槽においてエネルギーを必要せずに重力により沈殿し、上澄みが処理水として放出される。汚泥を引き抜かれ、汚泥処理プロセスで処理されることにより有機物の除去が可能となる。なお、有機物は活性汚泥と接触すると短時間のうちに活性汚泥の表面に吸着されることから、一部の汚泥は活性汚泥の種となるため曝気槽へ返送される。

この微生物の能力を用いた有機物除去に、窒素除去作用を加えたものが硝化脱窒処理プロセスである。

< 硝化脱窒処理プロセス >

硝化脱窒処理プロセスは、自然界の窒素循環の一部である『硝化反応』と『脱窒反応』を利用した活性汚泥法の一つである。原理としては、流入水は好気性の硝化槽に入り、ここで BOD 成分を酸化分解するとともにアンモニアを亜硝酸または硝酸にまで酸化する。その後、無酸素状態の脱窒槽にて、硝酸を還元するための電子供与態を添加し硝酸を窒素ガスに還元させる。ただし、ここではアンモニアを硝酸に変換されるために酸素の供給が必要であり、また、窒素の酸化過程ではプロトンが生成することから pH の低下が起こり、アルカリ(中和剤)を添加する必要がある。また、脱窒槽では脱窒素のため電子供与体が必要であることからメタノールや酢酸等の有機物の添加が必要とされる。

これらの問題を踏まえ、改善案として『硝化液循環型硝化脱窒素処理プロセス』が開発された(図 2.5)。このプロセスでは、流入水がまず脱窒槽へ導かれ、ここで返送汚泥、及び硝化槽から循環されてくる硝酸を含んだ循環水と混合される。ここでは、流入水中の BOD 成分を利用した脱窒素が起こり、硝酸が除去されるとともに大部分の BOD も除去される。次に、汚泥混合液は硝化槽へ送られ、ここでは、残存する BOD 成分が除去されるとともに、アンモニア態の窒素が硝酸へと酸化される。このプロセスでは、流入水中の有機物を電子供与体として利用でき、また、硝化液を循環させることにより pH の変動を低く抑えることができるという利点がある。また、このプロセスは物理化学的方法を用いた窒素除去プロセスに比べてランニングコストが低いという利点がある(中村 1998)。ただし、硝化反応には酸素供給が必須であり、そのエネルギー、コストの削減が課題となっている。

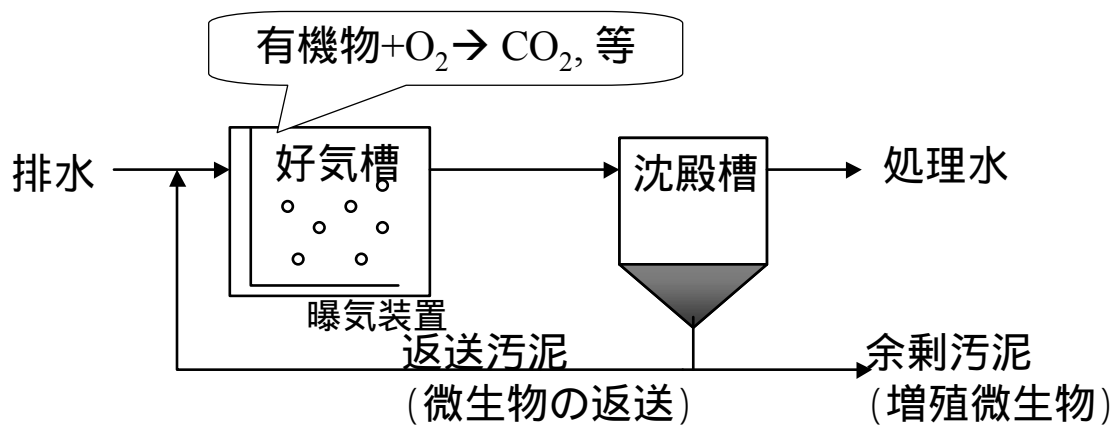


図 2.4 活性汚泥法の原理

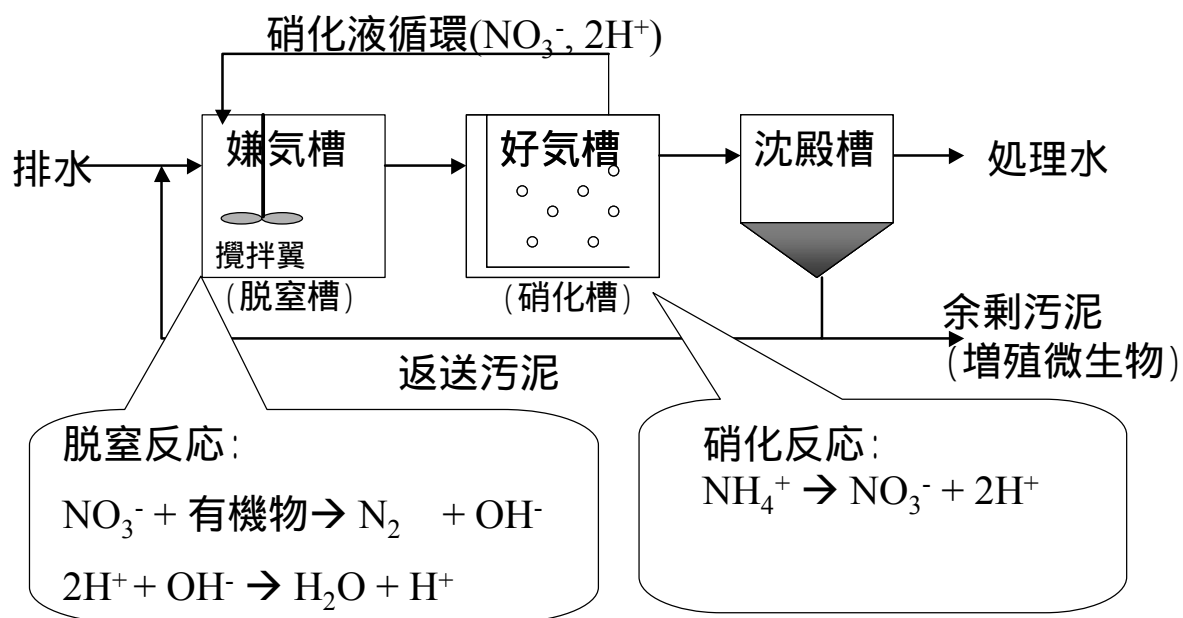


図 2.5 消化液循環型硝化脱窒処理プロセス

2.4.2 亜硝酸蓄積型硝化脱窒処理プロセスと新しい窒素除去プロセス

従来の硝化脱窒処理プロセスの問題を克服する為、新たな生物学的窒素除去プロセスが近年開発されてきている。

< Partial Nitrification : 亜硝酸蓄積型硝化 >

硝化反応において、アンモニアの酸化を亜硝酸で止め、硝酸への酸化を防ぎ、脱窒反応を亜硝酸から窒素へ変換させようとするプロセスのことをいう。このプロセスでは、亜硝酸酸化に必要な供給酸素量を省くことができ、また、硝酸の還元を必要しないことから COD(有機物の供給量)を削減することができる。このように、酸素・COD の供給量を削減できることからエネルギー & コスト削減が可能となる。ただし、硝化反応を亜硝酸で止めるための要因は十分に解明されておらず、現時点では制御が難しいという問題点を抱えている。(Schmidt *et al.*, 2003)

現在、知られている亜硝酸酸化を制御する方法としては、アンモニア酸化と亜硝酸酸化の活性エネルギー量(それぞれ、68KJ/mol, 44KJ/mol)の差を利用する、低酸素濃度、且つ、過剰なアンモニア濃度環境において亜硝酸酸化細菌が増殖不可能になるという性質を利用するといったものがある。

< SARON(Single reactor system for high rate ammonia removal over nitrite) >

これは、アンモニア酸化細菌(AOB)と亜硝酸酸化細菌(NO₂-B)の成長条件や速度の違いを利用することにより上記の Partial nitrification(亜硝酸蓄積型硝化プロセス)の制御を可能にした数少ないプロセスの一つである。普段、AOBはNO₂-Bに比べて成長速度が低いのに対し、溶存酸素(DO)を0.4mg/L以下に抑え、高濃度アンモニアの存在下で(Schmidt *et al.*, 2003)温度が26℃以上、pH7~8状態ではAOBの成長速度が高くなるという性質を利用している(Hellinga *et al.*, 1998)。この環境は、HRT(タンクでの滞留時間)をAOBが十分に成長する時間を確保しつつ、NO₂-Bが十分に成長する前に流れ出ていくように設定することで制御が可能となる(Schmidt *et al.*, 2003)。ここでも、酸素・CODの供給量を削減できることからエネルギー & コスト削減が可能となる。ただし、流入水が高温かつ高濃度のアンモニアを含む必要があるため、すべての下水処理場に適用させることは難しいという問題点がある(Schmidt *et al.*, (2003))。

SHARONは次項で述べる Anammox と併用し、実下水処理に利用されている(Mulder *et al.*, 2001)。

< ANAMMOX(anaerobic ammonium oxidation) >

ANAMMOX とは、嫌気性アンモニア酸化細菌が亜硝酸を最終電子受容体として利用し、アンモニアを酸化して窒素ガスに変換するプロセスのことである (Van de Graff *et al.*, 1996)。反応式は以下に示す通りである。



(このとき、 NH_4^+ = electron donor (亜硝酸還元)

NO_2^- = electron acceptor)

このプロセスでは流入水中の亜硝酸とアンモニアの濃度が 50% ずつになっていることが必要であり、そのため、事前に亜硝酸蓄積型硝化を必要とする。この条件は SHARON プロセスに改良を加えることにより満たされた (van Dongen *et al.*, 2001)。SHARON では、アンモニアが 50% 酸化されると pH が下がり、残りのアンモニアの酸化を抑止することから Anammox にとっての理想の流入水を提供できる。実際に、オランダのロッテルダムにおいて SHARON-Anammox の組み合わせの Full-scale Reactor が運転されている。

SHARON-ANAMMOX プロセスでは、従来の脱窒法で添加するメタノール等の電子供与体が不要にあることから、この施設では 7 年以内に Anammox の設備投資額が回収できるといわれている (Schmidt *et al.*, 2003)。Anammox プロセスの問題点は、高濃度 (180mgN/L 以上) の NO_2^- 含有排水の処理に不向きな点、そして Anammox を担う微生物群が装置内に馴養されるまでに 100 - 150 日という長期間が必要となる点である (Schmidt *et al.*, 2003)。

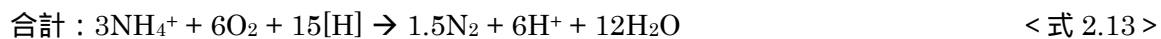
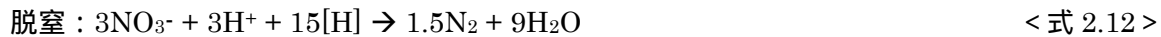
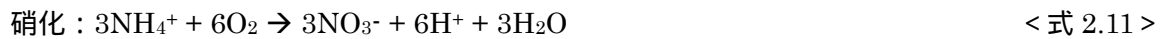
< Canon (Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) >

このプロセスは、アンモニア酸化反応 (Partial Nitrification) と Anammox の原理である嫌気下でアンモニアを窒素ガスへと酸化する反応を一つのリアクターで行うというものである (Schmidt *et al.*, 2003)。好気下でアンモニア酸化反応が起こる際に酸素が消費されることにより嫌気環境が作られることを利用している (Gallert and Winter. <http://media.wiley.com/product-data/excerpt/58/35273058/3527305858.pdf>)。利点として、リアクター一つで納まり経済的である。ただし、今までのところ実用化されておらず、また、欠点として anammox に比べ、低負荷 (1.5kgNm⁻³day⁻¹) の排水にしか適用できない点がある。

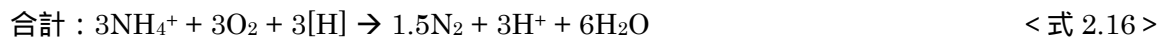
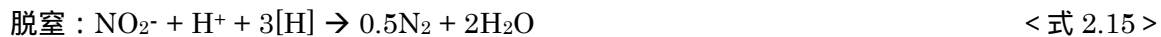
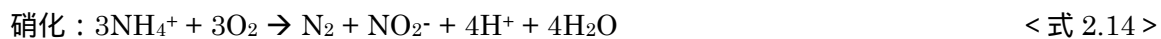
< NO_x Process >

“Nitrogen oxides(窒素酸化物 (NO_x))の曝気を処理槽で行うことにより、1 槽内で *Nitrosomonas*-like microorganism が硝化・脱窒両反応 (好気性環境であっても) を同時に行い窒素ガスを発生させ、除去するというプロセスである (Schmidt *et al.*, 2003, Bock *et al.*, 1996)。利点としては以下の式で表されるように従来の硝化脱窒法と比べ、必要酸素量が半分となる。

- 従来 -



- NO_x process -



このプロセスはパイロットプラントレベルでの適用と研究が行われている (Schmidt *et al.*, 2002)。留意点としては、このプロセスではアンモニアの 60% は窒素ガスとなり除去されるが、残りの 40% は NO₂⁻ に変換されるため、この未処理窒素態を除去するために NO_x process の後を受ける従来の脱窒処理が必要となる。また、この処理は排水の組成に依存すると考えられる。

< OLAND (oxygen-limited nitrification and denitirification) >

電子供与体である有機物の供給を必要とせずに 1 槽で硝化脱窒処理を行うというものである (Kuai and Verstraete, 1998)。利点としては、canon (Anammox) のように馴養期間を必要とせず、また NO_x プロセスのように、窒素酸化物の封入を必要としない。処理槽内の DO を低くコントロールするだけである。欠点としては、canon と比較しても低負荷のアンモニア含有排水しか処理できない点がある。また、まだ実験室レベルでの研究で、実用化にはいたっていない (Schmidt *et al.*, 2003)。

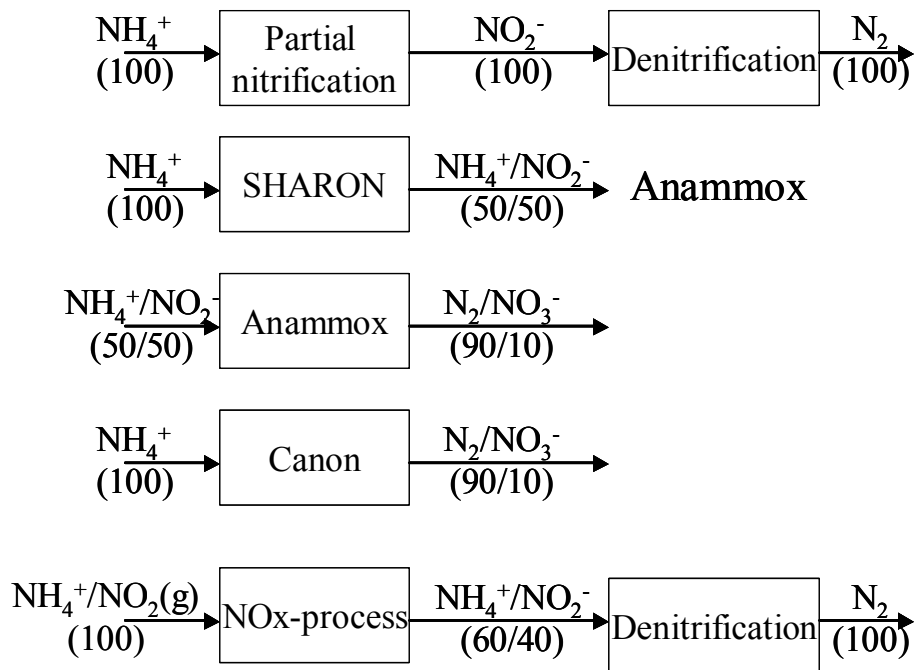


図 2.6 新しい窒素除去プロセスの概念図

(各数値は、流入水または放流水中における全窒素に対し、該当する形態の窒素の割合(%)を示す。また $\text{NO}_2(\text{g})$ は機体状の亜硝酸をあらわす。なお、プロセスからの処理水(法流水)に対し、脱窒処理が必要なものについては、脱窒槽を付加した。

2.5 分子生物学的手法

一昔前まで、環境中の微生物の検出、定量、変動を把握するために用いられてきた方法は顕微鏡観察による直接計数法と、コロニー計数法や MPN 法のような間接計数法であった（中村 1998）。しかし、前者では微生物種類や生理的特性の解析は難しく、また、後者は培養に用いる培地で増殖できなければ検出できないという欠点があった。これらの手法の欠点の多くを克服し、且つ、短時間で簡易に行える方法として近年利用されているのが分子生物学的手法である。

分子生物学的手法とは、微生物の持つ遺伝情報を微生物の検出、定量、群集解析などに用いる手法である。この手法の基本原則として微生物の細胞内にあるリボソーム（タンパク質の合成を担う小器官）を構成する rRNA (Ribosomal RNA) の遺伝情報の保存性の高さがある。原核生物のリボソームは二つのサブユニットからなり、大きい方を 50S サブユニット、小さい方を 30S サブユニットと呼ぶ（S は超遠心における沈降定数）。前者には 23S と 5S rRNA が含まれ、後者には 16S rRNA が含まれている。この 16SrRNA は 1500 塩基前後の長さがあり、部分的にすべての原核生物が共通してもつ配列領域（保存領域）と種や属のレベルにより多様性に富む領域により構成されている。この多様性と保存性が微生物間の系統発生的な関係を推定するのに適切だと考えられ（Woese 1987; Olsen *et al.*, 1994）、この領域を用いた系統分類解析などが 1980 年代になって活発になってきた。現在、原核生物の属（genus）のアウトラインは、16SrRNA の塩基配列と化学分類の情報に基づいて決められ、16SrRNA の相同性が 97% 以下であれば、別種であることは明確とされる（Stackebrandt and Gebel 1994）。また、既知種の細菌や単離株について 16SrRNA 塩基配列が調べられており、データベース化されている。この情報は DDBJ、等で検索することが出来る。16SrRNA のデータベースにより、純粋培養微生物と自然界における培養困難な微生物の系統関係を論じることが可能になった（平石 1996）。

2.5.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)法

1980年代半ばまで、クローニングや培養等の過程を経なければならず手間がかかっていたDNAの一部の塩基配列の増幅を劇的に改善したのが1985年にMullisらにより開発されたこのPCR法である。この手法は酵素を用いて試験管内 (*in vitro*) でDNAの(目的)特定部位を短時間で簡便に数十万倍以上に増幅させることが出来る(ワトソン 2003)。

<原理>

DNAは、温度を上げると変性し塩基対が解け、温度を下げると二重らせんに戻る性質を持っている。塩基対が解けた一本鎖のDNAに、相補的な塩基からなる二種類のヌクレオチド(forward, reverse プライマー: 20塩基ほどの一本鎖DNA)を添加し少し温度を下げるとプライマーが結合したDNAが出来る。このようなDNAに4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)とDNAポリメラーゼを添加すると、プライマー結合部位から元のDNA鎖を鋳型としたDNAの進行反応が起こり両プライマー間のDNAが2倍に増幅される。

この、

1. 温度を上げる: 二本鎖DNAの熱変性 一本鎖への解離
2. 温度を下げる: 2つのプライマーのアニーリング(付加)
3. 温度を上げる: DNAポリメラーゼによるDNA二本鎖の伸長

の3つの段階を繰り返すと1回の伸長反応ごとに目的とするDNAが2倍ずつ増加する。よって、 n サイクル後には $2^n \cdot n - 1$ 組に増幅されることになる。通常の細菌から単離されたDNAポリメラーゼは熱変性温度で失活してしまうため、各サイクルごとに添加する必要があったが、高熱菌 *Thermus aquaticus* から単離されたTaqDNAポリメラーゼによりこの問題が解決され、さらに、温度サイクラー装置の出現でPCRは自動化された。

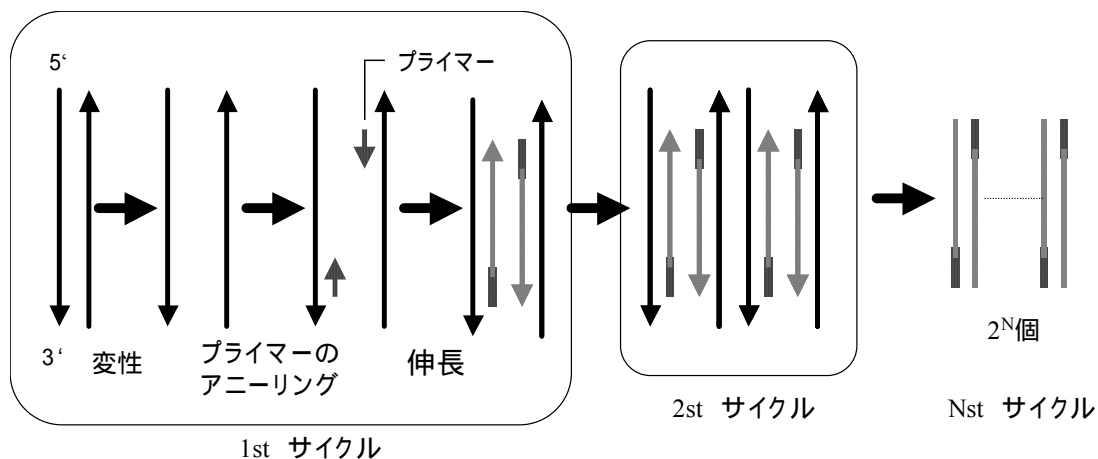


図 2.7 PCR の原理

2.5.2 Cloning 法

Cloning(クローニング)とは DNA 断片の単離・増幅方法であり、複合微生物系の中にいた微生物を別々のものとして扱うことが出来るため、微生物の研究によく用いられている手法の一つである。環境微生物分野への応用の一例として、複合微生物系内の存在微生物像の把握があげられる。これは、系内に存在する様々な微生物がクローニングによりある確率で単離した状態で得られ、クローンライブラリーを作成することが可能だからである。

<原理>

クローニングは「Ligation」と「Transformation(形質転換)」という二つの工程からなる(図 2.8)。

Ligation (ライゲーション)

プラスミドベクターに目的 DNA (特異的に増幅された PCR 産物など)を挿入(インサート)する操作である。通常、プラスミドベクターは目的 DNA を挿入するために制限酵素で切断される「クローニングサイト」、宿主大腸菌に認識される複製開始点(ori) さらに、プラスミドを持つ大腸菌を選択的に増殖させるための選択因子(薬剤耐性遺伝子)を持っている必要がある。

クローニング効率に影響を与える因子の一つに目的 DNA の末端の修飾法がある。本研究ではクローニング効率が高いと言われている TA クローニング法の変法である UA クローニング法を採用した。また、ベクター/目的 DNA 比もライゲーション効率と深く関わっており、通常 1/1 ~ 1/10 程度にする必要がある。

なお、このようなベクターは市販されている。本研究で用いたベクターには、薬剤耐性遺伝子としてアンピシリン、及びカナマイシン耐性遺伝子が含まれている。

Transformation (トランスフォーメーション)

ライゲーションを行ったプラスミドを DNA の取り込む能力のある大腸菌のコンピテント細胞に感染させる操作である。

直接選別法

トランスフォーメーションした大腸菌を薬剤含有プレートにまき、コロニーを形成することにより、薬剤耐性を含むプラスミドが大腸菌に感染したことがわかる。さらに、プラスミドへの目的 DNA の挿入を確認する方法として形成されたコロニーを色で識別する方法がある。原理としては、ガラクトシダーゼが X-gal を分解することで青色コロニーを生じる性質を利用している。プラスミドベクター上のガラクトシダーゼの合成に関与する lacZ 遺伝子の途中に目的 DNA 断片の挿入部位があり、挿入されない場合はガラクトシダーゼの合成され X-gal 添加培地上でブルーコロニーが検出される。挿入された場合はガラクトシダーゼが合成されず、白いコロニーを生じる。このように選別できる。

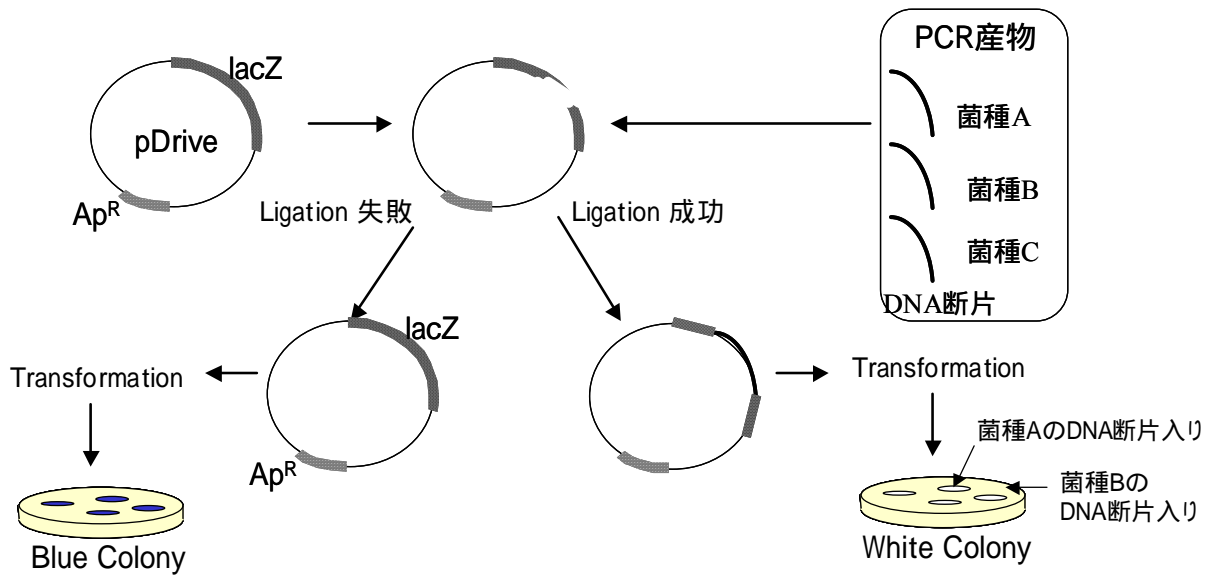


図 2.8 クローニングの原理

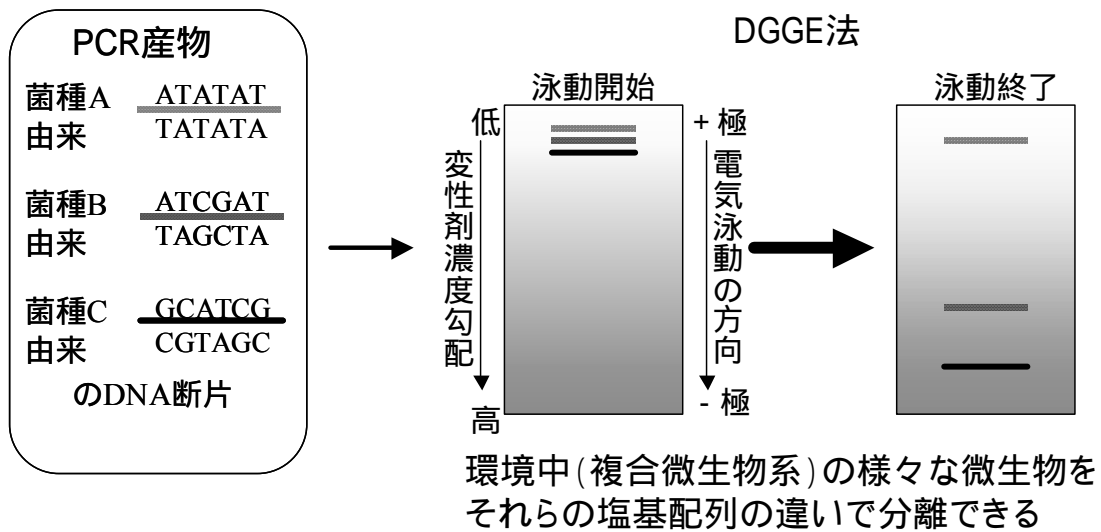


図 2.9 PCR-DGGE 法の原理

2.5.3 DGGE 法(denaturing gradient gel electrophoresis, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)

この手法は 1970 年代に開発され、染色体 DNA の点変異検出に用いられていた。この手法が微生物分野へ応用が可能であると 1993 年に Muzer らに紹介されて以来 (Muyzer *et al.*, 1993) 急速に普及し、現在では環境中からの微生物の検出、単離の確認、集積培養のモニター等様々な研究に利用されている。

<原理>

DNA 変性剤 (尿素とホルムアミド) の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で DNA 電気泳動をおこなうことにより、同じ長さの複数種の 2 本鎖 DNA (例、PCR 産物) でさえも塩基配列の違いにより分離できる方法である。GC クランプ (GC に富む配列) 付きプライマーセットを用いた PCR により増幅された 2 本鎖 DNA を上方 (- 極) から下方 (+ 極) へ向かって DNA 変性剤濃度が高くなるように形成されたポリアクリルアミドゲルで泳動すると、DNA 変性剤の濃度上昇とともに 2 本鎖 DNA 間の水素結合が切断され二重らせん構造から 1 本鎖 DNA に変性する。しかし、GC クランプ部分は結合力が強いため二重鎖を維持し、その DNA は 3 方に伸びた形になる。そのような形に変性した DNA はゲルの網目を移動する速度が著しく小さくなるため、その地点に集まり、バンドを形成する。各配列は A-T,G-C 間の水素結合の数、および配列の違いにより異なる DNA 変性剤濃度で解離するため、異なる位置にバンドを形成する (分離されることになる) (図 2.9) (石井ら 1999)。

PCR-DGGE 法

通常、DGGE 法は PCR 法と組み合わせることにより環境中の微生物群集解析に応用することが可能となった。環境中の微生物由来の核酸を抽出し、それを template にして PCR 法で目的配列を増幅させ、DGGE 法で分離することで、微量のサンプルであっても培養せずに微生物を検出することが可能となった (石井ら 1999)。環境中からの微生物の検出、単離の確認、集積培養のモニター等様々な研究に利用されている。

<利点>

これにより、rRNA 遺伝子のクローニングを行わなくとも塩基配列の違いを比較することが出来、複合系に生息する生物構成を簡便に推定することが出来る。

検出結果を可視化できる 環境中にどれくらいの種類の微生物が存在するかを容易に判断できる。

環境中に微量にしか存在しない、まった、培養できない微生物の遺伝子も検出できる。

<欠点・問題点>

PCR 産物の長さが 500bp 以下でしか適用できない

異なる配列を持つ DNA 断片であっても、含まれる G + C 量などが等しかったりすると同じ位置にバンドを生じる可能性がある。

PCR バイアス、及び微生物から核酸の抽出効率の違いが DGGE の結果に影響を与える可能性がある。

2.5.4 Sequencing 法

Sequencing 法とは、塩基配列を決定する手法である。塩基配列決定法は同時期にギルバートとサンガーの二人が別々の手法を開発した。ただし、ギルバートの方法 (Maxam-Gilbert 法) は必要となる DNA を切断するための化合物の取り扱いが難しいという欠点があり、現在主流となっているのはサンガーが開発した方法 (Sanger 法、ジデオキシ法) である (ワトソン 2003)。ここでは、Sanger 法について述べる。

< Sanger 法の原理 >

この方法に必要なものは解読したい鋳型となる一本鎖 DNA (template)、その鋳型と特異的に結合するプライマー、DNA 合成のための基質である「デオキシ」塩基(dNTP: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)及びデオキシ塩基と分子構造がわずかに異なる「ジデオキシ」塩基 (ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸) (ddNTP: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP)、そして DNA ポリメラーゼ (細胞内で DNA が自然に増えるときに使われる酵素) である。これらを混合させ、合成のための環境を整えると、通常、一本鎖 DNA にプライマーが結合し、そこから DNA ポリメラーゼによって dNTP が付加され伸長していく。しかし、dNTP の代わりに ddNTP が結合すると、DNA 合成が阻害され、それ以上の伸長は起こらなくなる。この ddNTP の性質を用いたのがこの手法である。すなわち、ddNTP を蛍光色素で標識し、鋳型 DNA、プライマー、DNA ポリメラーゼ、4 種類の dNTP に一種類の蛍光標識つき ddNTP 添加して DNA 合成反応を行うと、ddNTP が結合することにより反応が止まるため、様々な長さの配列が出来ることになる。この反応をそれぞれの ddNTP で行い、4 種類の反応液をそれぞれ、1 塩基の長さでも分離することが可能なアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、蛍光色素を計測することで塩基配列を決定出来る。

現在、この原理を用いた自動シーケンサーが開発されている。また、forward と reverse の両プライマーを別々に添加し塩基配列決定を行い、それぞれで読めた配列を比べ、配列の一致具合を確認することで、読めた配列の正確さが確認できる。

2.5.5 リアルタイム PCR 定量法

リアルタイム PCR 定量とは、サーマルサイクラー (Thermocycler) と分光蛍光光度計を一体化した機器を用い、PCR での増幅産物の精製の過程をリアルタイムで検出し、解析する方法である。電気泳動が不必要な為時間を短縮でき、また、増幅産物の生成の過程を連続して試みる事が出来るため、より正確な定量が出来る。また、解離曲線分析を行う事により、目的産物のみが増幅されたことが確認できる。

<リアルタイム PCR 定量法の原理>

定量したい核酸について希釈系列を作り、それぞれについて PCR を行い、そのタイムコースをリアルタイムで取る。増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold cycle:Ct 値) を縦軸、核酸量を横軸にプロットし、検量線を作成する。目的の試料についても同じ条件で PCR を行い、Ct 値を求める事により、検量線から試料中の目的産物の量を測定することができる。

核酸の検出には様々な方法があるが、主流となっているのは蛍光を用いたものである。蛍光は SYBER Green や FRET (fluorescence resonance energy transfer) を用いたハイブリダイゼーションプローブ等がある。現在のリアルタイムの主流となっているのは FRET を利用した TaqMan プローブ (PE Biosystems 社) である。この TaqMan プローブ法は、目的の増幅産物のみ測定できるため正確な定量が可能であるという利点がある。一方、目的産物に応じたプローブをデザインし、合成する必要がある点や、増幅サイズが 80 ~ 150bp、長くても 300bp のものしか利用できないという欠点がある。それに対して、Kurata らにより開発された QP - PCR 法は増幅サイズの制限が低くなり (900bp ぐらいまで可能) また、新たにプローブを作成せずとも、既存のプライマーに蛍光色素をつけるだけで利用できるというメリットがある。本研究では、この QP-PCR 法を用いた。

<解離曲線分析>

温度を低温から徐々に上昇させ、蛍光強度の変化を調べる分析法。温度をゆっくりと上げて DNA 二重鎖の融点に至るまでのカーブから特異性を決定する。つまり、ある高温に達するとまず Tm の低い方の 2 二重鎖が解離し、消光していた蛍光が発するようになる。仮に非特異的な産物 (ダイマーなど) が生産されていた場合、それ由来の Tm 値において蛍光を発しピークとして検出される為、目的産物の Tm 値で出てくるピークと含めて 2 種類以上のピークが検出される事になる。

< QP-PCR 法の原理 >

QP-PCR (Quenching Primer-PCR)法は蛍光消光プライマーを用いる。この手法は、DNA の構成塩基である C(シトシン)にある蛍光色素を付加させておくと、C の相補的な塩基である G(グアニン)が結合したときに G と蛍光色素の相互作用によりその蛍光が消光するという現象を PCR での定量に応用したものである (Kurata *et al.*, 2001)。PCR を行う際に用いるプライマーの末端に蛍光標識した C 塩基を付加しておき (これを Qprimer と呼ぶ) PCR の伸長反応によって G が Qprimer 末端の C 塩基に結合したときの蛍光消光率をサイクルごとにプロットすることで増幅をリアルタイムに観察することが出来る。

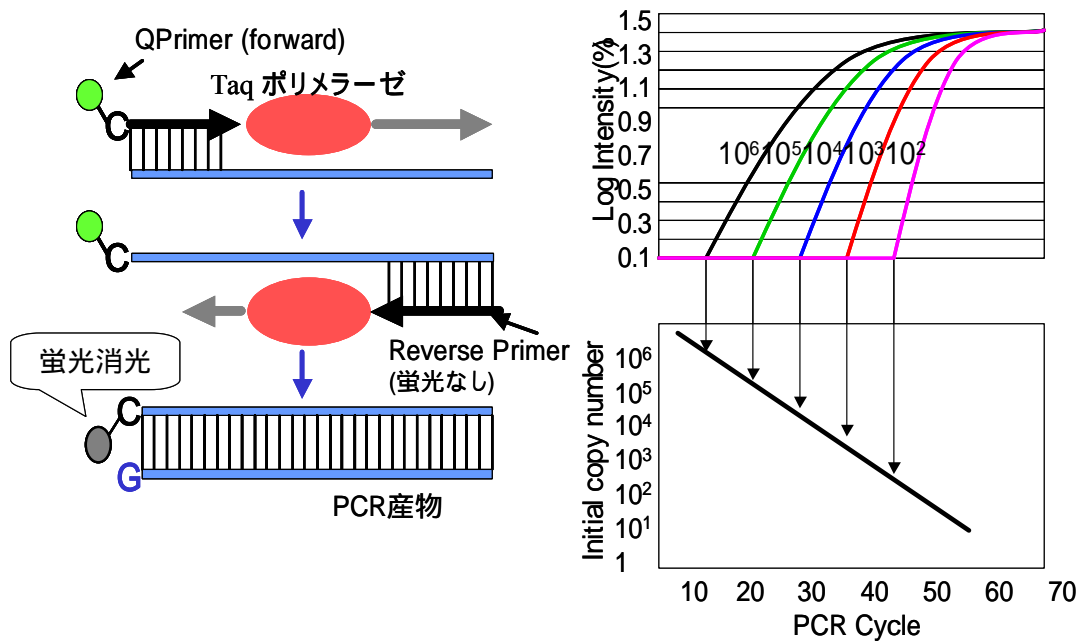


図 2.10 QP-PCR 法の原理

*リアルタイム PCR 定量法の利点

<長所>

微量遺伝子でも強力な検出力を持つ。
一度に大量のサンプルを処理できる
短時間（2～4時間）で反応が行える
準備が簡便であり、ルーチンなモニタリングには最適
測定後のアガロースゲルチェックが不要

<短所>

非特異的産物の増幅

最初はわずかなコンタミネーションであっても、PCR の過程で大量に増幅されて致命的失敗を招いてしまう。

プライマーのデザイン、温度条件などの最適化に時間がかかる

今までに PCR を行ったことのない領域の遺伝子を増幅しようとする場合には、プライマーデザインからはじめる必要がある。非特異的産物の生成およびプライマーダイマー（プライマー同士が結合すること。これができるとう目的産物を上回って増幅されてしまう）のできない箇所を捜し当てるのが非常に困難である。また、温度条件やプライマー濃度等を最適化するのにも多くの時間が費やされる。

また、普通の PCR 法に比べて感度が高く、普通の PCR 法に用いる場合には問題なく増幅されるにも関わらず、リアルタイム PCR ではダイマーが確認され適用できない場合がある。

<リアルタイム検出機器を使った場合> 検出機器、ランニングコストが高い

2.5.6 FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

1980年代末より開発された手法であり、Amannらにより、この手法が環境微生物分野でも十分適用可能であることが示され、その具体的な実験手法が紹介された (Amann, 1995)。

<原理>

標的塩基配列に相補的な塩基配列 (オリゴヌクレオチドプローブ) を蛍光物質で標識し、細菌内の標的塩基配列と結合 (Hybridize) させ、それを蛍光顕微鏡で観察することにより、目的の細菌を検出、定量する。FISH法を微生物の検出に用いる場合、リボソームにある rRNA を標的とする。リボソームは1つの細菌に 10^3 - 10^5 存在しており、プローブもそれだけの量菌体に入ることになるため、菌体一つあたりの蛍光が大きくなり、顕微鏡下で蛍光が観察可能になるということである。

<適用例>

環境微生物分野における FISH 法の適用目的は、サンプル中に標的微生物が存在しているかの確認 (検出)、環境中の空間分布を調べる、そして、検出された蛍光の面積、または菌対数を計測することによりサンプル中の標的種の割合を調べること、等である。

<長所>

サンプル中の細菌の三次元的な配置や構造を、顕微鏡的に (in situ に) 直接確認が可能。

培養、及び、PCR 特有の増幅バイアスがかからない。よって定量性が向上

実験の手法が簡単

<短所>

ターゲット由来の蛍光が暗い

標的最近ないの rRNA 分子数 (リボソーム数) が少ないから。(細胞内のリボソーム数は細菌の増殖速度と相関すると考えられ、増殖速度の比較的遅い細胞は FISH 法では蛍光が暗く見えることになる。よって、活性の低いターゲットには向いていない。) また、細胞膜が分厚すぎると、プローブ rRNA が標的部位まで到達できない可能性あり

サンプルの持つ自家蛍光にプローブ由来の蛍光が紛れてしまう

プローブと夾雑物が非特異的な結合を起こしてしまう

推定 10^5 個 / ml 前後の濃度で定量が難しくなると報告している (Amann *et al.*, 1995)

定量化にあたって、分散条件の最適化が困難

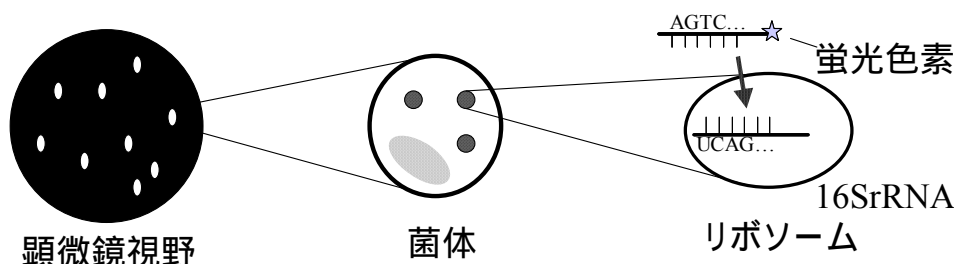


図 2.11 FISH の原理

2.5.7 分子生物学的手法以外の定量法

MPN 法 (Most Probable Number 法)

<長所>

培養条件があえばどのような菌であっても単離が可能。

生きた菌体のみ検出が可能。

定量下限が低く、菌体濃度が薄くても検出可能。

<短所>

培養時間が長すぎる。

サンプル数が増えると作業量が飛躍的に増大する

培養条件の合わない菌体は検出できない、等培養に伴うバイアスによる過小評価が起こる。

Immunofluorescence 法 (蛍光抗体法)

<原理>

蛍光がついた抗体を用いて菌体の抗原と結合させ、その後蛍光顕微鏡で定量を行う方法。

<長所>

抗体の生産と取得を除けば、実験操作は比較的単純

抗体の生産と取得を除けば、基本的に短時間で測定可能 (FISH 法に比べても)

抗体の菌体レベルの高い特異性を利用した、特定菌体の検出が可能

FISH 法で問題となる『蛍光が暗い』という事態に直面しにくい (と思われる)

<短所>

抗体生産が煩雑で困難である。

抗体の特異性が不十分で、ターゲット以外も検出される可能性がある。

抗体の特異性が高すぎて、特定のグループを幅広く検出することが難しい

死菌を検出する可能性あり

定量下限は FISH 法と同程度 濃度が薄すぎると検出しにくい

抗体の非特異的な結合が起こる可能性がある

*野田らは、排水処理リアクター内の生体膜サンプルを蛍光抗体法で染色し、生体膜の中での *Nitrosomonas europaea* と *Nitrobacter winogradskyi* の群集構造を明らかにした (野田ら 1999)。

第3章 研究手法、及びその検討

3.1 ミニプラント

共同研究を行っている新日鐵（株）にて、製鉄所コークス炉排水（安水）を硝化脱窒法（硝化脱窒処理プロセス）により処理したところ、硝化反応が亜硝酸までしか進まず、亜硝酸から脱窒反応が起こること（以下、『亜硝酸蓄積型硝化脱窒』）が確認された。本研究では、この反応と安水主成分との関係に注目し、それを解明するためのプラント（ミニプラント）を立ち上げた。ミニプラントの詳細は次の項目で述べる。

なお、プラントの維持、管理、水質モニタリング、及び活性汚泥サンプルの採取は新日鐵（株）の協力にた。以下、新日鐵（株）より提供いただいた資料をもとに、ミニプラントについて記述する。

3.1.1 ミニプラントの詳細・概要

ミニプラントは、実際の安水の組成を模倣した人工の安水（人工安水）を流入水として硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法により処理するプラント(図 3.1)である。新日鐵君津製鉄所において2002年10月から2003年9月まで運転された。図 3.1 で示すように、希釈混合槽において海水で希釈（人工安水：海水 = 1：1.5）された人工安水は脱窒槽（45L）、硝化槽（45L 槽が計3槽）、沈殿槽を経て処理された。流入推量は 60L/Day とした。脱窒槽の流入量に対して、硝化液循環率は 200%、汚泥返送率は 100%であった。沈殿槽において定期的に余剰汚泥の引き抜きを行い、処理水への SS 流出と併せて SRT を 50 日程度（2003年4月からは 30 日程度）に管理し、プラント内の MLSS を一定に保っていた。表 3.1 で示すように HRT は脱窒槽で 18 時間、硝化槽で 54 時間、pH は脱窒槽が 8.0-8.5、硝化槽で 7.0-7.5、水温は各槽で 25-30 に制御されて運転された。

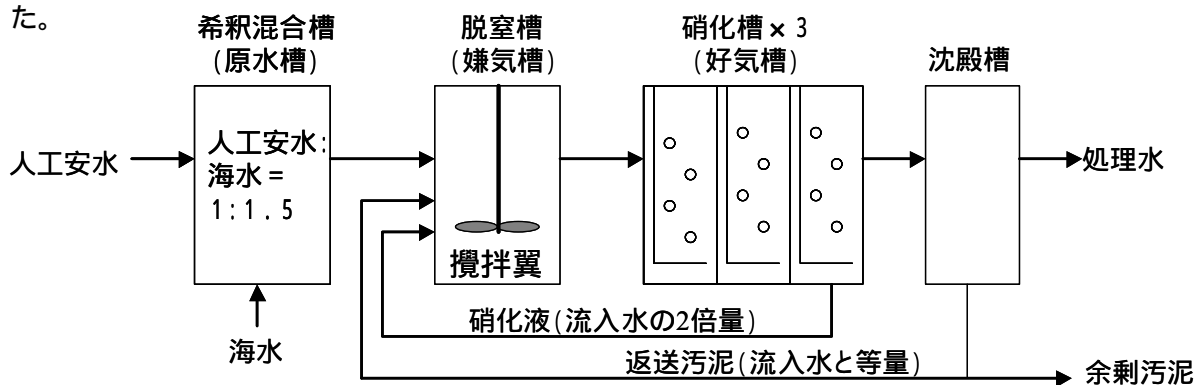


図 3.1 ミニプラントの模式図・構成

表 3.1 ミニプラントの構成

	容量 (L)	HRT (時間)	pH	水温 ()
脱窒槽	45L	18 時間	8.0 – 8.5	25 – 30
硝化槽	45L × 3 = 135L	54 時間	7.0 – 7.5	

なお、流入水である人工安水は高濃度のアンモニウムイオン、及び、安水の主成分であるフェノール、チオ硫酸、チオシアンを主体として組成した。また実際の安水も若干添加することで、安水中の不明因子の影響についても考慮した。詳しい組成は表 3.2 に示した。これは人工安水の組成を単純に 2.5 倍（海水による希釈倍率）した計算値である。

表 3.2 人工安水の組成(mg/L)

pH	安水 ^a	NH ⁴⁺ -N	Phenol	チオシアン SCN ⁻	チオ硫酸 S ₂ O ₃ ⁻	NaHCO ₃ ^b	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O
8.3	5%	500	600	100	300	1800-5000	51

a:非人工安水を容積で 5 %のみ添加した。

b:途中アルカリ度を上げるため、添加量を何回か変更した。

各水質項目の測定は、流入水、脱窒槽出口、処理水の 3 ヶ所及び硝化槽各槽、脱窒槽各槽で行った。測定項目は表 3.3 の通りである。また、微生物群集構造解析用の活性汚泥サンプル採取は脱窒槽と硝化槽の 2 ヶ所より行った。

表 3.3 水質測定項目

	流入水	脱窒槽出口	処理水		脱窒槽各槽	硝化槽各槽
pH	+	+	+	MLSS	+	+
SS	+	+	+	MLVSS	+	+
T-N	+	+	+	DO		+
D-T-N	+	+	+	ORP	+	
D-NH ₄ -N	+	+	+	水温	+	+
D-NO ₂ -N	+	+	+			
D-NO ₃ -N	+	+	+			
COD	+	+	+			
D-COD	+	+	+			
D-TOD	+	+	+			
D-phenol	+	+	+			
D-SCN	+	+	+			
D-S ₂ O ₃	+	+	+			
D-SO ₄	+	+	+			
Alkalinity	+	+	+			

3.1.2 ミニプラントの運転状況

安水の各主成分がプラント内の硝化細菌群集に与える影響を調べるため、まず表で示した流水水から、フェノール、実安水、チオシアン、チオ硫酸を、一次的に単一、又は複数同時に添加をやめ、その後、再度添加した。変化の詳細は表 3.4 の通りである。

表 3.4 ミニプラント流入水の組成変化

RUN	RUN1	RUN2	RUN3	RUN4	RUN5	RUN6	RUN7
DATE	2002 10/18-11/12	11/12-12/9	2003 12/9-1/17	1/17-3/13	3/13-4/17	4/17-7/4	7/4-9/26
実安水	←→		→				
Phenol	←→		←				→
SCN-	←			→			
S ₂ O ₃ ⁻	←			→		←→	

←→ : 人工安水に含まれている時期を指す。

3.1.3 ミニプラントの処理状況

ここでは、表で示したモニタリング項目のうち、処理水中の D-NO₂-N、D-NO₃-N の結果を示す(図 3.2)。なお、残りのモニタリング項目の結果は付録に示した。

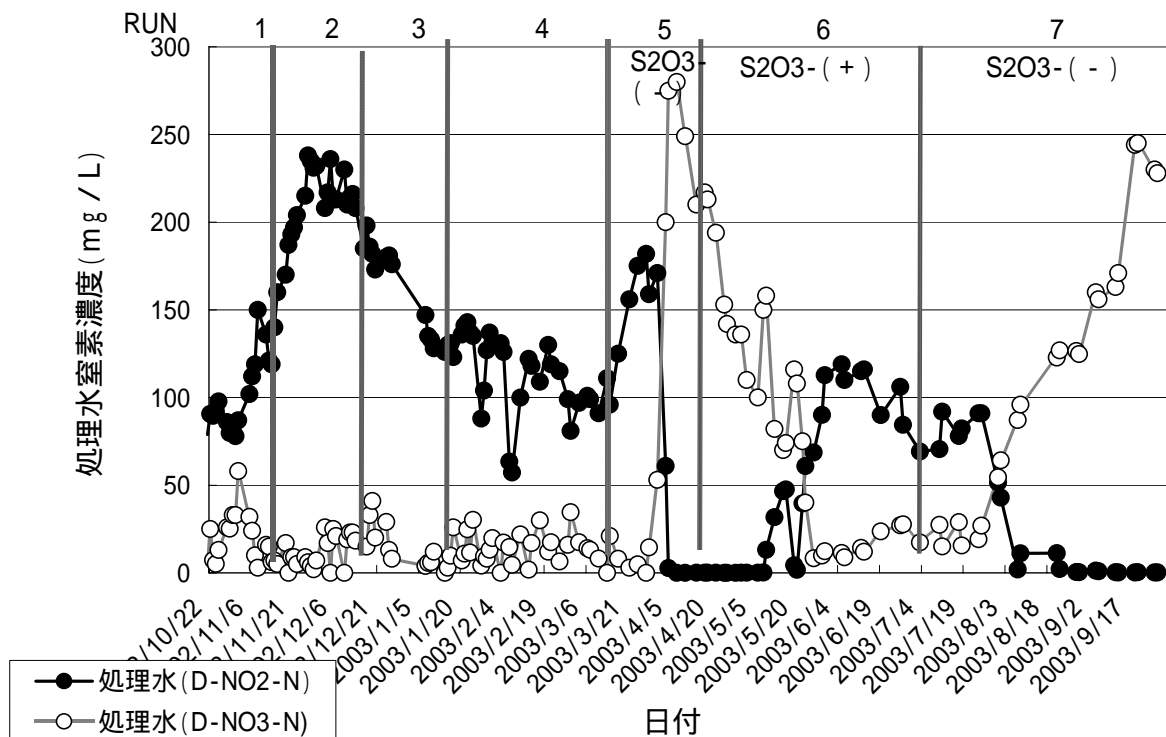


図 3.2 ミニプラントの亜硝酸 / 硝酸濃度変化

図 3.2 で示すように、RUN1 のすべての主成分が流入水に含まれている状態では亜硝酸濃度(D-NO₂-N)が硝酸濃度(D-NO₃-N)に比べて高く、亜硝酸が蓄積されている。このような亜硝酸蓄積の現象は、実際の安水を処理したパイロットプラントで起こった現象と同じであった。RUN2 でフェノールを除いた際、多少亜硝酸濃度(D-NO₂-N)が高くなるが、亜硝酸濃度が高いことには変わらない。再び RUN3 でフェノールを再添加した結果、亜硝酸・硝酸濃度は RUN1 と同程度を示した。RUN4 で実安水を流入水から取り除いたが急激な変化は起こらなかった。RUN5 でチオ硫酸とチオシアンを流入水から除いた結果、亜硝酸濃度が急激に低下し、(今まで低濃度(50mg/L 以下)だった)硝酸濃度が急激に高くなった(300mg/L)(硝酸蓄積)。RUN6 でチオ硫酸のみ再添加した結果、再び亜硝酸の濃度が RUN1 と同程度になり、硝酸が低濃度になり亜硝酸蓄積を示した。RUN7 で再度チオ硫酸を流入水から除いた結果、RUN5 と同様亜硝酸濃度が低下し硝酸濃度が高くなった。

RUN4 まではフェノール、実安水を流入水から除いても亜硝酸蓄積を示した。また、チオシアンが除かれチオ硫酸が存在する状態(RUN6)では亜硝酸蓄積を示した。しかし、チオシアンとチオ硫酸がともに除かれた場合(RUN5,7)では硝酸蓄積を示した。このことから、チオ硫酸が亜硝酸蓄積に関与していることが推察された。そこで、本研究ではミニプラントの RUN 4 以降の活性汚泥サンプルを研究対象とした。

3.2 分子生物学的手法

3.2.1 サンプルング

ミニプラントの硝化槽から定期的に（主に、水質分析日にあわせて）採取した。この採取した汚泥は、汚泥 9 容に対してエタノール 1 容を混ぜてしばらく 4℃ で保存し、その後、DNA 抽出用と FISH 用に分けて保存した。

< DNA 抽出用サンプルの保存方法 >

- 1 .2mL エッペンチューブによく混ぜた汚泥を 1mL 取り、遠心分離にかけて上澄みを取り除く。
- 2 .ペレットを TE (pH8.0) バッファーに券抱くし、遠心分離で上澄みを取り除く。
- 3 . - 20℃ で保存する。

< FISH 用サンプルの保存方法 >

- 1 .汚泥を 2ml を - 80℃ で保存可能なクライオチューブに入れ、- 80℃ の冷蔵庫、又は、液体窒素中に保存した。

3.2.2 DNA 抽出

DNA 抽出用に -20℃ で保存した汚泥サンプルを室温で解凍し、Fast DNA SPIN Kit for Soil(Qbiogene)を使用して、Kit のプロトコルに従い DNA 抽出を行った。なお、抽出操作に使用する試薬類は、TE バッファーを除き、Kit 付属のものである。

この Kit のメリット

- 1) 500mg までの土壌や他の環境サンプルから 30 分以内で効率的に DNA 抽出できる。
- 2) 抽出時間が短い
- 3) フェノール、クロロホルム等の有機溶媒が不要
- 4) 比較的抽出しにくいとされてきたグラム陽性細菌なども抽出可能

<操作>

細胞の破碎・DNA の可溶化・タンパク質の可溶化

サンプルを、ホモジナイズとタンパク質の可溶化が可能なバッファーに溶解させ、それをセラミックとシリカからなるビーズと混ぜる事により、細胞を破碎し DNA を可溶化する。この段階で、ほとんど RNA の混入のない DNA を得ることが出来る。

DNA の精製と濃縮

可溶化した DNA のみをシリカ製の BindingMatrix に吸着させることで、混在する阻害物質を除去する。その後、Binding Matrix に吸着した DNA を溶出させて、精製 DNA を得ることが出来る。

<手法>

操作は、Kit に付属のプロトコルに従った。ここでは、操作について簡単に述べる。

1. サンプルングして保存しておいたペレットに、サンプルをホモジナイズしタンパク質を可溶化することの出来る Sodium Phosphate Buffer と MT Buffer を加え、プレットを懸濁する。
2. ビーズの入った Lysing Matrix E tube に 1 を移す。
3. 2 を Fast Prep に設置し、Speed5.0,30sec で 2 回処理を行い、細胞を破碎し溶解させる。
4. 上澄みを新しいチューブに移し、PPS を加え、手で攪拌する。
5. 遠心分離にかけタンパク質を沈殿させ、上澄みを新しいチューブに移すことでタンパク質を除去する。
6. 5 で移した上澄みと等量の Binding Matrix を加え、手で反転浸透した後数分静置して BindingMatrix に DNA を吸着沈殿させる。
7. 上澄みを除去した後、残った液で Binding Matrix - DNA を懸濁し、それを Spin Filter に移す。
8. 7 を遠心分離にかけ、その後、SEWS-M を加えて Filter 上の Binding Matrix-DNA を洗浄濃縮する。(エタノール沈殿に相当する操作)
9. Filter 上の Binding Matrix-DNA に DES を加えて、遠心分離により DNA を溶出させ、PCR グレードの DNA を回収する。DNA は -20℃ で保存可能である。

3.2.3 PCR 法 (Polymerase chain reaction)

環境サンプルから抽出された DNA や、DGGE バンドからの DNA、クローニングの結果得られたコロニー中の DNA の目的部位を増幅させるために用いた。

<手法>

1. 鋳型 (テンプレート) DNA を用意する。環境サンプルから抽出された DNA を用いる場合、吸光度計を用いて 50ng/μl に調整しておく。
2. 鋳型 DNA、プライマー (reverse と forward) 及び、用いる市販の DNA ポリメラーゼ付属している PCR Buffer、dNTP、MilliQ を混合する。各プライマー配列とそのターゲットとなる細菌群を表 3.5, 3.6 に表した。各試薬の混合液組成は表 3.7 に表した。
3. 混合したものをサーマルサイクラー T3 Thermocycler (Biometra 社) で目的に応じたプログラム条件で PCR を行う。プログラム条件は表 3.8 に表す。
4. PCR 産物の増幅の有無を確認するためアガロースゲルチェックを行う。アガロースゲルチェックの手法は次項に記載したとおりである。

<注意点>

PCR を行う際には、そのプライマーセットと PCR 条件で必ず増えるポジティブコントロールサンプルと絶対に増えない滅菌済みの MilliQ をネガティブコントロールとして増幅させたいサンプルとあわせて PCR を行う事により、確かに目的物が増幅しており、又、コンタミしていないことを確認する必要がある。

表 3.5 特定の菌に特異的なプライマーセット

Name	Sequence(5'-3') ¹⁾	target organism	Product Length	Reference
FGPS872f	²⁾ *CTAAAACTCAAAGGAATTGA	<i>Nitrobacter</i> nonspecific	397bp	Degrange and Bardin 1995
FGPS1269r	TTTTTTGAGATTTGCTAG	<i>Nitrobacter</i> specific		Degrange and Bardin 1995
NSR1113f	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	<i>Nitrospira</i>	151bp	Dionishi <i>et al.</i> 2002
NSR1264r	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	<i>Nitrospira</i>		Dionishi <i>et al.</i> 2002
norB269f	ACTGGAACAACGTGGAGACC			赤司 2004
norB443r	GTCGGCAGATAGGGGTTGTA			赤司 2004
CTO189fAB	³⁾ *GGAGRAAAGCAGGGGATCG	proteobacteria AOB	465bp	Kowalchuk <i>et al.</i> , 1997
CTO189fC	³⁾ *GGAGGAAAGTAGGGGATCG			
CTO654r	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC			

1) R=A+G, Y=C+T, K=G+T, S=G+C

2)*QP-PCR 法に用いるさい、この部位を (BODIPY) で修飾した。

3)*GC-clamp: CCGCCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCACGGGG

表 3.6 ユニバーサル、及び、プラスミドベクターに対応するプライマーセット、

Name	target site	Sequence(5'-3')	target organism	Reference
SP6	SP6 region	CATTTAGGTGACACTATAG	Vector*	
T7	T7 region	GTAATACGACTCACTATAG	Vector*	
27f	8-22	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Eubacteria	Lane 1991
1492r	1492-1510	GGTTACCTTGTTACGACTT	Eubacteria	Lane 1991
357f	341-357	CCTACGGGAGGCAGCAG	Eubacteria	Lane 1991
517f	517-533	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Eubacteria	Lane 1991
1099f	1099-1114	GAAACGAGCGCAACCC	Eubacteria	Lane 1991
518r	518-534	ATTACCGCGGGCTGCTGGC	Eubacteria	Lane 1991
907r	907-926	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	Eubacteria	Lane 1991
1114r	1099-1114	GGGTTGCGCTCGTTRC	Eubacteria	Lane 1991

*Kit に付属する pDrive Cloning Vector 中の配列。同 Vector 内に M13 というプライマー配列があるが、それに比べて増幅される PCR 産物の長さが短い。(挿入部位に近い配列)

表 3.7 PCR 混合液組成

	FGPS	NSR	norB	CTO	27f-1492r	SP6-T7
Buffer	1 ×	1 ×	1 ×	1 ×	1 ×	1 ×
dNTP(mM)	0.2	0.2	0.2mM	0.125	0.2	0.2mM
F primer(μ M)	0.5	0.2	0.3	1	0.2 μ M	0.2 μ M
R primer(μ M)	0.5	0.2	0.3	1	0.2 μ M	0.2 μ M
Taq polymerase (Unit)	2.5	2.5	*1U	5	1.25U	1.25U
Template DNA	約 50ng	約 50ng	約 50ng	約 50ng	約 50ng	**

*:KOD-PLUS- (TOYOBO)

**Colony 産物の PCR

表 3.8 PCR のサイクル条件

プライマー	Step1	Step2	Step3
FGPS	95℃ , 10min	(94℃ ,45sec - 50℃ ,45sec - 72℃ ,90sec) × 35cycles	72℃ , 10min
NER	95℃ , 10min	(94℃ ,45sec - 50℃ ,45sec - 72℃ ,90sec) × cycles	72℃ , 10min
NorB	94℃ , 2min	(94℃ ,30sec - (50-62)℃ , 30sec - 68℃ ,(25-60)sec) × 30cycles	68℃ , 5min
CTO	95℃ , 10min	92℃ ,1min - (92℃ ,30sec - 57℃ , 30sec - 72℃ ,45sec) × 20-35cycles	72℃ , 5min
27f-1492r	95℃ , 10min	(94℃ ,30sec - 50℃ , 30sec - 72℃ ,2min) × 30cycles	72℃ , 10min
SP6-T7	95℃ , 10min	(94℃ ,30sec - 53℃ , 30sec - 72℃ ,2min) × 30cycles	72℃ , 10min

アガロースゲルチェック (アガロースゲル電気泳動)

PCR がうまくいき、目的とする標的配列が増幅されたかどうかはアガロースゲル電気泳動を行う事により確認した。アガロース電気泳動は、DNA の長さ (大きさ) によって分離することが出来る。従って、あらかじめ長さのわかっている DNA を一緒に流すことで、そのバンドの位置から、サンプルがどれくらいの長さの DNA が把握することが出来る。PCR 産物は基本的に標的配列のみ増幅される。よって、PCR 産物が標的配列と同じ大きさを持つ DNA と同じ位置にバンドが出ていれば、その産物は目的産物ということが出来る。

<手法>

- 1 . 2%アガロースゲル{Agarose HS(日本ジーン)、50×TAE buffer(Tris-Acetic acid-EDTA)(BIO RAD)、milliQ 水}を作成する。
- 2 . PCR 産物を 6 × loading dye と混合し、2%アガロースゲルにローディング (添加) し、100V で 20 ~ 25 分 (PCR 産物の長さに応じて変更する) 電気泳動する。このとき、遺伝子の長さの基準となるマーカーとして 100bp DNA Ladder (TAKARA)を用いた。
- 3 . 電気泳動を終えたアガロースゲルは、5 万倍希釈したエチジウムブロマイド溶液 (BIO RAD) で染色し、UV トランスイルミネーター{FAS システム (東洋紡 TOYOBO)}により撮像し、取り込んだ。

以上の操作により、溶液中に目的の長さの DNA が検出されることを確認した。

以下、アガロースゲル電気泳動と記す際には、断りのない限り同様の操作を行うものとする。

3.2.4 Cloning 法

本研究では QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN)を用いてクローニングを行った。

< LB plate >

1 . 表の組成をもとに、トランスフォーメーションされた大腸菌を培養する選択 LB 培地を作成した。

表 3.9 LB 培地の組成 (1 L)

試薬	LB Broth ^a	Bacto agar ^a	Xga I ^b	IPTG ^b	アンピシリン ^b
量	20g	15g	80mg	50 μ M	100mg

a : DIFCO 社製 b : TAKARA (株) 製

< PCR 産物の精製 >

1 . 目的の PCR 断片 (FGPS プライマーセット, 27F-1492r) を含む PCR 産物を Microcon(Millipore)を用いて過剰なプライマーや dNTP を除去し、精製した。

2 . 精製した DNA 濃度は DU®530, Life Science UV/Vis Spectrophotometer (分光光度計) (Beckman Instruments, Inc., US)により、260nm, 280nm, 320nm(背景)での吸収を測定し、DU-500 に内蔵された Warburg-Christian 法により算出した。

3 . 必要に応じて”Microcon centrifuge filter device”で PCR 産物の濃縮をおこなった。

< クローニング >

QIAGEN PCR® Cloning Kit(QIAGEN)のプロトコルに従った。

1 . Kit に付属のベクターを含む Ligation mixture と精製された目的 DNA 断片を混合させた。このとき、ベクター / 目的 DNA 断片比は 1 / 5 とした。

2 . 1 の混合液を T3 Thermocycler(Biometra)で 16 、 30 分インキュベート (培養) し、ライゲーション反応を起こした。

3 . プロトコルに従い、トランスフォーメーション操作を行った。この作業は迅速かつ慎重に行い、時間を守ることと、ライゲーション混合液とコンピタント細胞を混合する際に、数度チューブをはじく程度に静かに混合することを気をつけた。

4 . トランスフォーメーション液を寒天プレートにまき、37 で 16 時間程度インキュベートした。

3.2.5 DGGE 法

<方法>

DGGE 法は ポリアクリルアミドゲルの作成、電気泳動、画像取得と解析、という3つのステップからなる。各ステップの詳細は以下に示す。 、 は Dcode™ Universal Mutation Detection System, BIO-RAD, US (以下 Dcode) を用いて行った。

ポリアクリルアミドゲルの作成

1) 高変性剤濃度溶液 (65%)、低変性剤濃度溶液 (35%)、変性剤濃度 0% 溶液をそれぞれ調整し、0.2 μm フィルターを用いて吸引ろ過し、脱気した。この時、ポリアクリルアミド濃度は 8% とした (Muyzer *et al.* (1993))。表 3.10 はポリアクリルアミドゲルの組成を示す。

表 3.10 ポリアクリルアミドゲルの組成

	(100ml)	0%	35%	65%
8%Acrylamide/Bis(37:5:1) (ml)	40%Acrylamide/Bis(37:5:1) (ml)	20	20	20
1 × TAE buffer (ml)	50 × TAE buffer (ml)	2	2	2
x%(V/V) Formamide (ml)	Formamide (ml)	0	14	26
yM Urea (g)	Urea (g)	0	14.7	27.30

(変性剤濃度 (%)) は x、y に比例し、変性剤濃度 100% は 40% (v/v) Formamide、7M urea に相当)

2) 1) で調整した変性剤を用いてゲルキャストを行った。方法は Dcode™ Universal Mutation Detection System, BIO-RAD, US のプロトコルに従った。具体的には、高変性剤濃度溶液に Dye を加え、各変性剤に架橋剤である 10% ammonium persulfate (APS) と TEMED を加え、それらを BIO-RAD の変性剤の濃度勾配をつけられる装置に流し込み、約 1 晩放置させ、ゲルキャストを行った。

電気泳動

1) PCR 産物 (CTO189 - CTO654r) と 6 × Lording Dye (Takara?) を 5:1 で混合し、調整した。
2) Dcode のチャンバーに装着されたポリアクリルアミドゲルの各ウェルに 1) を挿入し、60 に加温された 1 × TAE buffer チャンバー内で 75V、16 時間電気泳動を行った。

画像取得と解析

1) 電気泳動終了後のゲルを 1 万倍希釈した Vistra Green で 15 分間染色した。
2) 蛍光イメージアナライザー (画像解析) FluoroImager595 (Molecular Dynamics) の Scanner Control と画像解析ソフト Image QuanNT を用いて画像を取得した。
3) 塩基配列決定用サンプル取得、DGGE ゲル上のバンドの精製の為、バンドを切り出した。
4) バンド強度解析等は、画像解析ソフト FragmeNT を利用して付属のマニュアルに従い解析を行った。

3.2.6 Sequencing(塩基配列決定法)法

DGGE で得られたバンド、および、クローニングで得られたコロニーをテンプレートにした PCR 産物を精製し、オートシーケンサーABI310 または ABI3100 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列解読を行った。操作は Applied Biosystem 社のプロトコルに従った。

ABI310&ABI3100(Applied Biosystems)

<手法>

精製

1 .PCR 産物を MontagePCR96(Millipore)にて過剰プライマーや dNTP を取り除き、精製した。なお、精製する PCR 産物数が少ないときは (大体 10 個以下)、コスト削減のため Microcon YM-100(Millipore)を用いて精製した。精製の具体的な作業は各プロトコルに従った。

Sequence Reaction

Bigdye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて、そのプロトコルに従い Sequence Reaction を行った。プライマーは forward、reverse を別々に用いた。また、プライマーの選択については、16S r DNA の全長配列を読む際には表に記載されている 27f、357f、517f、1099f、518r、907r、1114r、1492r の 8 種類のプライマーを利用した。また、DGGE バンド由来の PCR 産物の配列を読む際には CTO189f と CTO564r、FGPS 領域をクローニングしたサンプル由来の PCR 産物の配列を読む際には FGPS872f と 1269r を用いた。

- 1 . Kit に付属された試薬とプライマーを混合した。
- 2 . 混合液を T3 Thermocycler(Biometra)で { 96 ,30s-(96 ,10sec-50 ,5sec-60 ,4min) × 35cycles - 4 } で反応させた。
- 3 . Montage SEQ₉₆(Millipore)により、過剰な Dye Terminator を除去し Sequence Reaction 産物を精製した。

塩基配列解読

- 1 . オートシーケンサーABI310 または ABI3100 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列解読を行った。操作は Applied Biosystem 社のプロトコルに従った。
- 2 . AutoAssembler2.1 を用いて forward 鎖と reverse 鎖の assemble を行い、必要に応じて修正し塩基配列を決定した。

3.2.7 リアルタイム PCR 定量法

ミニプラント中の *Nitrobacter* 属の定量に用いた。

本研究において、*Nitrobacter* 属をターゲットとするプライマー FGPS872r-1269r を用いた QP-PCR 法 (Qprimer : Quenching Primer を用いたリアルタイム PCR 定量法 (Kurata *et al.* 2001)) を用いたリアルタイム PCR 定量法を開発した。

3.2.7.1 手法の検討

リアルタイム PCR とは、Thermocycler と分光蛍光光度計を一体化した機器を用い、PCR での増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出し、解析する方法の総称である。現在、リアルタイム PCR の主流は PCR プライマーセットと目的の塩基配列と結合できる蛍光色素つきプローブ (TaqMan Probe) を用いた TaqMan プローブ法である。ただし、この手法は増幅サイズが 80 ~ 150bp (300bp 程度までは増幅可能) であることと (タカラバイオ (株) リアルタイム PCR 実験のためのガイドライン) プライマーとは別に標的配列に特異的なプローブを作成する必要があるという制限がある。これに対して、Kurata らが開発した QP-PCR 法は、増幅サイズ (増幅領域の長さ) の制限がゆるく (900bp 程度までは可能) また、既存のプライマーの 5 末端に C (シトシン) と蛍光色素をつけるだけでよいので、新たにプローブを作成する必要が無いという利点がある。今回、用いたい FGPS プライマーは 300bp 以上の長さなので、QP-PCR 法を用いることにした。

<手法>

- 1 . 5'末端に Qprimer 用色素 (BODIPY) を修飾した FGPS872f プライマーを作成した。
5' - (BODIPY)-CTAAAACTCAAAGGAATTGA - 3'
- 2 . 検量線に用いる標準遺伝子 (検量線用サンプル) を作成した。(3.2.7.2 参照)
- 3 . 標準遺伝子を用いてリアルタイム定量の条件の最適化を行った。DNA ポリメラーゼの種類とプライマー濃度について検討した。この詳しい過程は 4.3.1 で示す。
- 4 . 検量線用サンプルと定量対象サンプルを表に示す組成でリアルタイム PCR 用混合液と混合させた。
- 5 . ABI7000(Applied Biosystems) を用いて {95 °C, 10min - (94 °C, 45sec - 50 °C, 45sec - 72 °C, 90sec) × 60cycles - 72 °C, 10min} という条件で PCR を行った。
- 6 . 5 の終了後、つづけて、ABI7000(Applied Biosystems) を用いて解離曲線解析 (60 °C から 90 °C) を行った。

表 3.11 リアルタイム定量 PCR の混合液組成（最適化後の組成）

Component	Volume(μl)	Final Conc.
Template DNA	10 ¹⁾	-
DdH ₂ O	8.75	-
10 × Takara Taq PCR Buffer	2.5	1 ×
2.5mM dNTP mix	2.5	200nM
10 μ M forward primer	0.5	200nM
10 μ M reverse primer	0.5	200nM
5U/μl Takara Taq polymerase	0.25	
Total	25	

1) 検量線用サンプルは 10 μl 入れると目的の濃度になるようあらかじめ希釈しておいた。

3.2.7.2 検量線に用いる標準遺伝子（検量線用サンプル）の作成

<手法・手順>

1. FGPS プライマーセットを用いた cloning-sequencing の結果目的 DNA 断片が含まれていると確認されたコロニーを確認し、そのコロニーを新しい LB 培地（組成は表 3.9 を参考）に植え継ぎ（inoculate）、37 ℃、16 時間静置培養した。
2. 10mL の LB 培地が入った乾熱滅菌（160 ℃、90 分）済み試験管にコロニーを植え継ぎ、37 ℃、120rpm で 8 時間振とう培養を行った。
3. 500mL 容量の三角フラスコに LB 培地 100mL を準備し、上記の培養液が 1 / 1000 に希釈されるように植え継ぎし、37 ℃、120rpm、で 16 時間振とう培養を行った。
4. 培養後、遠心分離（6000 × g, 15min, 4 ℃）を行い培養液計 4 ml 分のペレットを得た。
5. このペレットを QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN）のプロトコルに従いプラスミド抽出を行った。
6. 抽出されたプラスミドの濃度を分光光度計で調べた。
7. 下記の計算式により FGPS のコピー数を計算した。

$$\text{DNA copy number(number/μl)} = \frac{\text{DNA conc. (ng/μl)} \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{Number of oligonucleotides} * \times 660}$$

*ここでは、プラスミドベクター + FGPS 領域 = 4248

8. 上記の抽出液を元に定量 PCR の希釈系列（最適化の際には 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ copies, 実際の定量の際には 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² copies）を作成した。

3.2.8 FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization)法

ミニプラント中の NOB の 4 つのグループの検出、-AOB と NOB の空間分布の把握にこの手法を用いた。Amman, Wagner, Mobarry らのプロトコルに従って行った。具体的な手順は以下に示す。

< 手法 >

1) サンプルの固定

固定液として 3%パラホルムアルデヒド溶液{ (pH7.2) }を調整し、サンプル 1 容に固定液 3 容の割合で混合し、4 で 1~3 時間静置状態で固定した。固定後、遠心機 (MX-150,160 TOMY 社) を用いて遠心分離 (15000g, 5min) を行った。得られたペレットを 1 × PBS (Phosphate Buffer Saline) で洗浄し、遠心分離 (15000g, 5min) を行った。その後、1 × PBS とエタノールを 1 : 1 で混合した溶液に MLSS 量が約 500 ~ 750 になるように懸濁させ、超音波分散を 30 秒 ~ 2 分行った。超音波分散は汚泥の状態、及び、定量解析用サンプルは通常 2 分、空間分布解析用は 30 秒から 2 分というように目的によって時間を変化させた。これを -20 で保存した。

2) 試料の定着

ゼラチンコーティング済みのスライドガラスを準備し、各ウェルに 2 µl ずつ滴下し、空気乾燥させた。その後、適量のエタノール系列 (50%、80%、98%) に順次 3 分ずつ浸し、脱水を行った。この状態で半永久的に保存できるとされている。

3) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバッファー { x %ホルムアルデヒド、0.9M NaCl, 20mM Tris/HCl, 0.01%SDS、pH7.2 } とプローブセットをそれぞれ表 A の割合で混合し、スライド上の各ウェルに 9 µl ずつ滴下した。直後にあらかじめ気液平衡状態にしておいた (細長く切ったる紙にハイブリダイゼーションバッファーを満遍なくしみ込ませ、ハイブリダイゼーション温度でしばらく放置) 50ml 容遠心管チューブに移し、46 で 2 時間静置状態でハイブリダイゼーションを行った。

4) 未結合プローブの洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、48 に加温された洗浄バッファー (組成は表 3.12 参照) 数 ml でプローブを洗い流し、その後スライドガラスを洗浄バッファーに 48 で 20 分間浸して洗浄した。洗浄後、スライドガラスを超純水 (MilliQ) で素早くすすぎ、即座に水分を切って空気乾燥させた。

表 3.12 洗浄バッファーの組成

0.01% SDS
y M NaCl (y はホルムアルデヒド濃度 x % により異なる)
20mM Tris-HCl (pH7.2)

5) 退色防止剤の滴下、封入

スライド上に退色防止剤 SlowFade Light(Molecular Probes 社)をウェル全体に滴下し、ウェル内に気泡が入らないようにカバーガラスをかぶせ、ふちをマニキュアでコートして乾燥を防ぐように封入した。

6) 顕微鏡観察 (画像取得)

各プローブの蛍光色素に見合ったフィルターを使用し、Olympus BX51 蛍光顕微鏡で観察した。
定量解析用画像

同一視野について取り組んだ EUB プローブ画像と標的プローブ画像、及び、位相差画像を 1 セットとして、評価対象のサンプルにつき 20 セット以上取得した。また、定量性を高めるため、画像はランダムに選んだ。

7) 定量解析

画像解析システム Qwin600HR(Leica Microsystems)で蛍光面積定量を行った。

表 3.13 用いた FISH プローブ

Probe name	Sequence (5' - 3')	Target Organisms	Fc[%] (%)	dye	Reference
EUB338-	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	20-35	FITC	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Eubacteria	35	FITC	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Eubacteria	35	FITC	Amann <i>et al.</i> , 1990
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter</i>	40	Cy3	Wagner <i>et al.</i> , 1996
Ntspa662	GGAATTCCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira</i> genus	35	Cy3	Daims <i>et al.</i> , 2000
Ntspn693	TTCCCAATATCAACGCATTT	Nitrospina	20	Cy3	Juretschko S. 2000
Ntspn994	CAAGGCGGTCCCAAGCAA	Nitrospina	20	FITC	Juretschko S. 2000
Ntcoc84	TCGCCAGCCACCTTTCCG	Nitrococcus	10	Cy3	Juretschko S. 2000
Ntcoc206	CGGTGCGAGCTTGCAAGC	Nitrococcus	10	FITC	Juretschko S. 2000
Nso1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	Almost all AOB	35	FITC Cy3	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
NEU	CCCCTCTGCTGCACTCTA	Halophilic and halotolerant members of the genus <i>Nitrosomonas</i>	40	FITC Cy3	Wagner <i>et al.</i> , 1995
CNIT3	CCTGTGCTCCAGGCTCCG	Competitor of NIT3			Wagner <i>et al.</i> , 1996
CTE	TTCCATCCCCCTCTGCCG	Competitor of NEU			Wagner <i>et al.</i> , 1995
CNtspa662	GGAATTCCGCTCCTCTCT	Competitor of Ntspa662			Daims <i>et al.</i> , 2000

Fc: Formamide conc.

Dye: Fluorescent dye

< EUB プローブと対比染色 >

EUB プローブは、全細菌を染色する為、EUB338- 、EUB338- 、EUB338- プローブを混合して用いる。EUB プローブは本研究の項目 4.5、及び 5.4.2 において対比染色の為に用いる。対比染色とは、AOB,NOB を検出する際、ターゲットに特異的なプローブに Cy3 蛍光標識をついたものを用い、FITC 蛍光標識をつけた EUB プローブと同時にサンプルを染色させることである。両方のプローブで染色されることにより、ターゲットに特異的なプローブが細菌を染色していることが確かめられる。

第4章 人工安水硝化脱窒処理プロセスミニプラントの主要 NOB の把握とその挙動解析

4.1 優占 NOB グループの絞り込み

4.1.1 *Nitrobacter* 属及び *Nitrospira* 属を標的とする PCR 法の適用

NOB は4つのグループに分かれている。rDNA を標的とするプライマーとしては、*Nitrobacter* 属を特異的に増幅する FGPS872f-FGPS1269r (以下、FGPS プライマーセット) と、*Nitrospira* 属について特異的な NSR1113f-1264r (以下、NSR プライマーセット) が開発されている。また、*Nitrobacter* 属に関しては、*Nitrobacter hamburgensis* から得られた亜硝酸酸化還元酵素(NOR) 遺伝子のクローニングより設計されたプライマー(norB269f-443r、以下、norB プライマーセット) が開発されている。そこで、ここではこれら3種のプライマーを用い、ミニプラント内に存在している NOB 族を特定しようとした。なお、ポジティブコントロールとして NOB が多く含まれていると考えられているリアクターサンプルを用いた (Lmpliyakorn 2003)。ただし、norB については、ポジティブコントロールは用いなかった。

各 PCR 産物をアガロースゲルチェックした結果を図 4.1 に示す。その結果、*Nitrospira* 属と機能遺伝子をターゲットにしたプライマーセットを用いた場合はバンドが検出されなかった。*Nitrospira* 属についてはポジティブコントロールではバンドが検出されたことからプライマーセットや PCR の条件に問題点があったのではなく、*Nitrospira* 属がこの系に存在しない、もしくは検出できないほど少量しかいなかったことが確認できた。

Nitrobacter を標的とする FGPS プライマーセットはすべての RUN のサンプルでバンドが検出された。この結果、ミニプラント内では *Nitrobacter* が優占しているのではないかと推測された。その一方、*Nitrobacter* 属の亜硝酸酸化還元酵素を標的とした norB プライマーセットについては、赤司 (2004) はアニーリング温度として 62 を報告しているが、その温度を 50 まで下げてプライマーとテンプレートが結合しやすくしても PCR 増幅産物が検出されなかった。norB または norB と類似の配列は試料中には存在しないという結果であった。

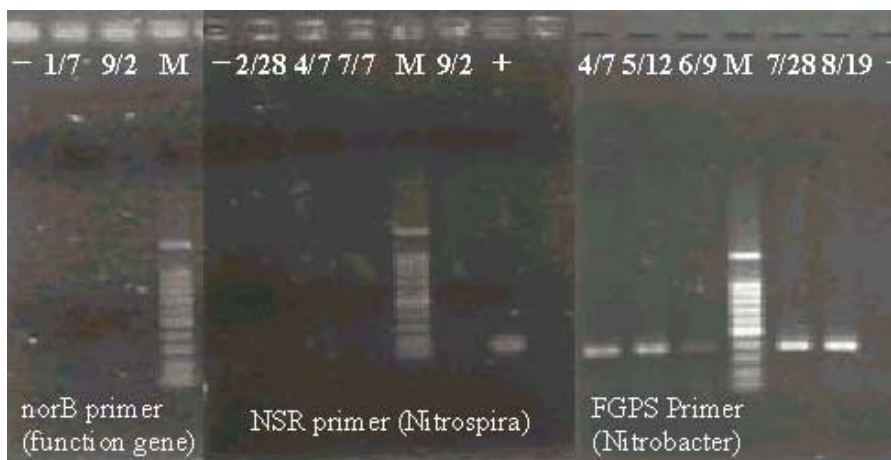


図 4.1 各種プライマーセットを用いたミニプラント中の NOB グループの検出 (- : negative control、+ : positive control、M : 100bp Ladder Maker(Takara))

4.1.2 FGPS プライマーセットによる増幅産物のバンド強度の挙動

FGPS プライマーセットを用いて PCR 法でミニプラント内の NOB の挙動解析を行った(図 4.2)。硝酸が蓄積する RUN 5 , 7 でバンドが濃くなり、亜硝酸が蓄積する RUN 6 でバンドの濃さは減少した。この画像のバンド強度を画像解析ソフト FragneNT により解析した(図 4.3)。この時、一番バンド強度の高い値を「1」として相対的なバンド強度を示した。このように、バンドの濃さの変動と亜硝酸、硝酸の変動が一致した。ミニプラント内の亜硝酸の蓄積は *Nitrobacter* 属の菌体量と関係していることが示唆された。

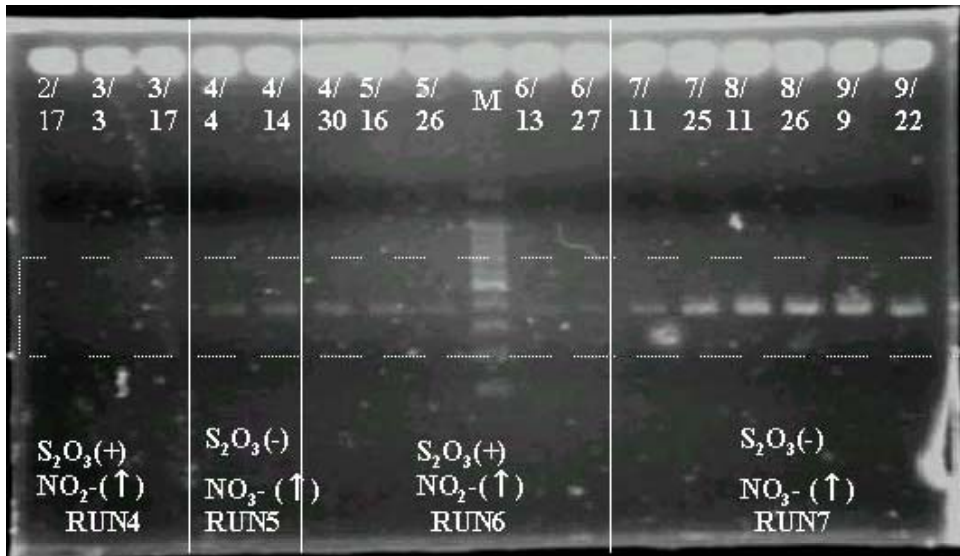


図 4.2 PCR 法によるミニプラント内の NOB の菌体量の挙動解析
(+) : 流入水に含まれる、(-) : 流入水に含まれない、() : 蓄積

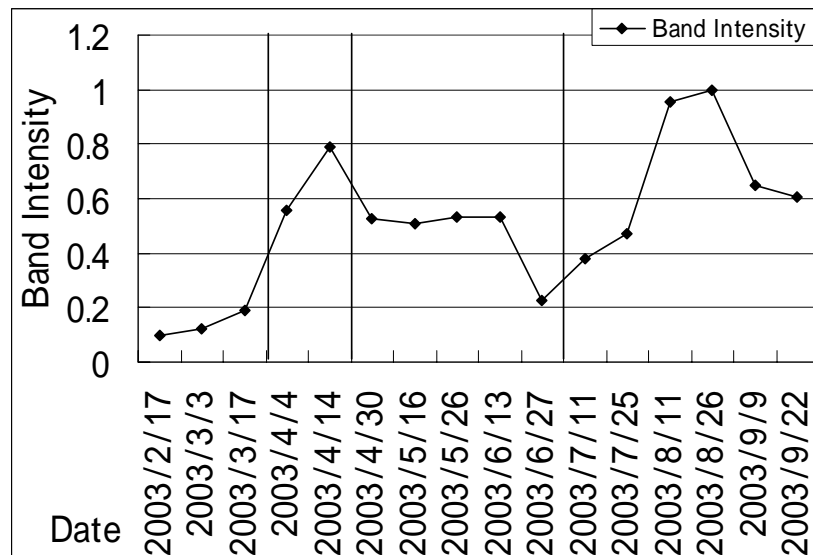


図 4.3 図 4.2 で示したバンドの経時的なバンド強度の変化

(バンド強度は、最も強度が大きいバンドの値を 1 とした相対値で示した。)

4.1.3 まとめ

以上の結果は、*Nitrobacter* 属が本プロセスにおいて亜硝酸硝化を担っている硝化細菌である可能性を示している。

4.2 PCR-Cloning-Sequencing 法による解析

4.2.1 *Nitrobacter* 属のみを対象としたクローニングによる解析

ミニプラントの 2003 年 9 月 22 日の活性汚泥サンプルから、Fast DNA SPIN Kit for soil により核酸を抽出した。得られた DNA を鋳型として FGPS872f-FGPS1269r プライマーセットを用いて得た PCR 産物に対してクローニングを行った。Cloning kit には QIAGEN PCR® Cloning Kit(QIAGEN)を使用した。次に、クローンを導入された大腸菌のコロニー個に対して FGPS プライマーセットを用いて再び PCR を行い、99 個クローンを鋳型とした PCR 産物を得た。アガロースゲル電気泳動でバンドの検出位置から目的の配列が含まれているものを確認した。その結果得られたクローン 79 個について DNA 塩基配列を決定した (Sequencing)。得られたクローンは全て全く等しい塩基配列であった。相同性検索プログラム BLAST(WU-BLAST2, DNA Data Bank of Japan[DDBJ] <http://www.blast.genome.ad.jp>)を使用して最も近縁な配列を検索したところ、この配列と 100%の相同性を示す配列が 4 種類データベースに登録されていた。それらは、*Nitrobacter sp.* (strain R6)(L35511)、*Nitrobacter sp.* TH21(AF080257)、*Nitrobacter alkalicus* strain AN 1 (AF069958)、*Nitrobacter alkalicus* strain AN4(AF069956)であった(カッコの中は Accession number)。

得られたクローンすべてが同じ塩基配列を有していたことから、このミニプラント内の *Nitrobacter* 属の群集構造は極めて単純であることが示唆された。

4.2.2 全細菌を対象とする 16SrRNA 全長 (27F-1492R) プライマーセットによる解析

16SrRNA のほぼ全長(27F-1492R)を対象として PCR を行い、その産物に対してクローニングを行った。109 個のコロニー(clone)を得、その内 72 個のコロニー(clone)内に全長配列が組み込まれていることを確認した。その中から *Nitrobacter* 属の存在を確認するため、FGPS プライマーセットを用いた colony PCR を行い、その PCR 産物のアガロースゲルチェックを行った。その結果、92 個の内 1 個のコロニーに対してバンドが検出された。そこで、そのクローンのシーケンシングをおこなった。解読した 16SrRNA 全長領域の遺伝子配列は、相同性検索プログラム BLAST(WU-BLAST2, DNA Data Bank of Japan[DDBJ] <http://www.blast.genome.ad.jp>)を使用して、最も近縁な配列を検索した。その結果、L35506.1 *Nitrobacter winogradskyi* (ATCC 25381) 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene. (Score = 2714 bits (1369), Identities = 1420/1432 (99%), Gaps = 6/1432 (0%)) と一番高い相同性を示した。ただし、得られた塩基配列の FGPS プライマーセットに挟まれる領域を BLAST を使用して相同性検索を行った結果、4.2.1 の FGPS プライマーセットを用いた時と同じ結果が得られた。

4.3 QP-PCR 法による *Nitrobacter* 属の定量法の開発

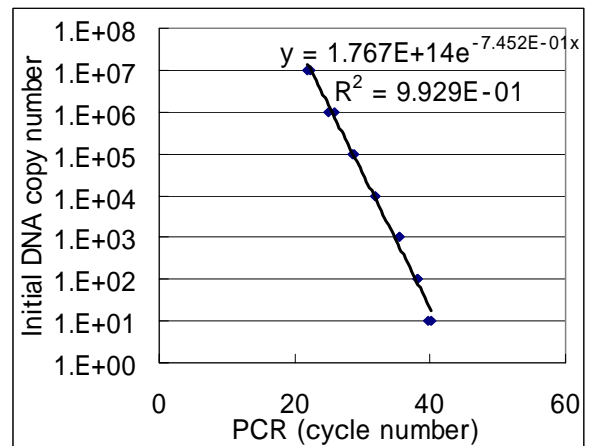
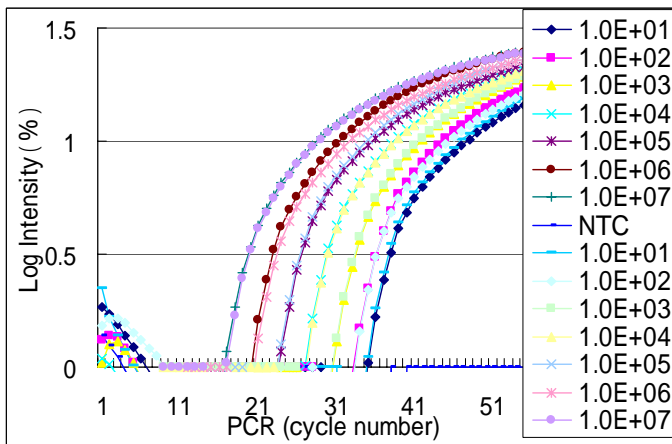
図 4.2 で示した PCR 法による挙動解析によって、*Nitrobacter* 属の菌体量とミニプラント内の亜硝酸の蓄積との関係が示唆されたが、PCR 法を用いた DNA の定量では、増幅効率のチューブ間の差やプラト - 効果などの問題点（真木 1999）があり、定量性が低いという欠点を持つ。そこで、NOB の菌体量の挙動解析の信頼性を高めるため、定量性の高い手法であるリアルタイム PCR 法の中の一つである QP-PCR 法を用いた解析を検討した。

4.3.1 QP-PCR 条件の最適化

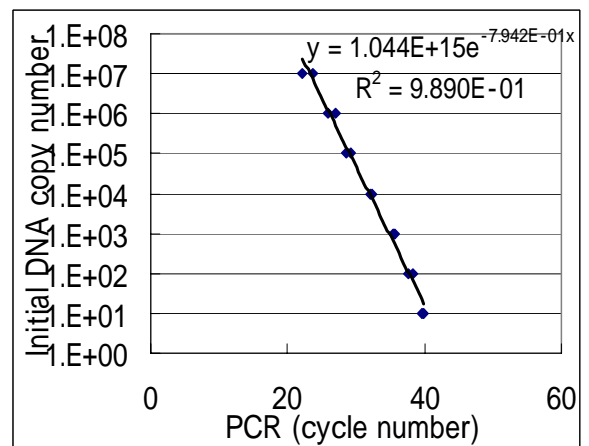
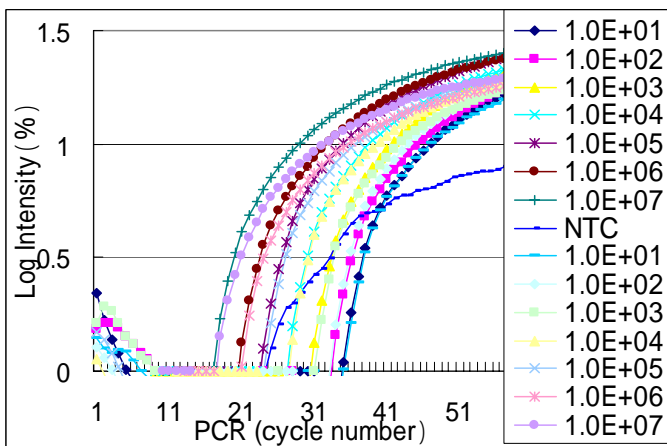
QP-PCR の条件として、Taq ポリメラーゼの種類とプライマーの濃度についての検討を行った。まず、ポリメラーゼは、PCR で用いている AmpliTaqGold ポリメラーゼと TakaraTaq ポリメラーゼの 2 種類について検討を行った。また、通常リアルタイム定量に用いられるプライマー濃度は $0.1 \sim 0.5 \mu\text{M}$ だといわれている（タカラバイオ（株） 2003）。これは、濃度が高すぎるとダイマーなどが形成されやすいので、プライマー濃度は最小限に抑える必要があるからである。そこで、ここでは、 $0.2 \mu\text{M}$ と $0.4 \mu\text{M}$ について検討を行った。その結果は図 4.4 のとおりである。なお、TakaraTaq ポリメラーゼを用いた $0.4 \mu\text{M}$ で二度定量を行ったが定量可能な結果が得られなかった（データ示さず）。

図 4.4 からわかるように、AmpliTaQGold ポリメラーゼを用いても TakaraTaq ポリメラーゼを用いても、 R^2 が 0.99 以上であり、高い相関を示す検量線を得ることが出来た。また、プライマー濃度が $0.2 \mu\text{M}$ でも $0.4 \mu\text{M}$ でも R^2 が 0.989 以上であり、高い相関を示す検量線を得ることが出来た。この結果、プライマー濃度を最小限に抑えるという観点から $0.2 \mu\text{M}$ という条件を採用する事にした。また、TakaraTaq ポリメラーゼでも AmpliTaqGold ポリメラーゼでも同精度の結果が得られたことから、よりコストの低い TakaraTaq ポリメラーゼを利用することにした。なお、アニーリング温度についての検討は行わなかったが、PCR と同じ 50°C とした。また、FGPS プライマーと 1,2 ミスマッチで人食的に増える可能性のある菌についての検討は行はなかった。

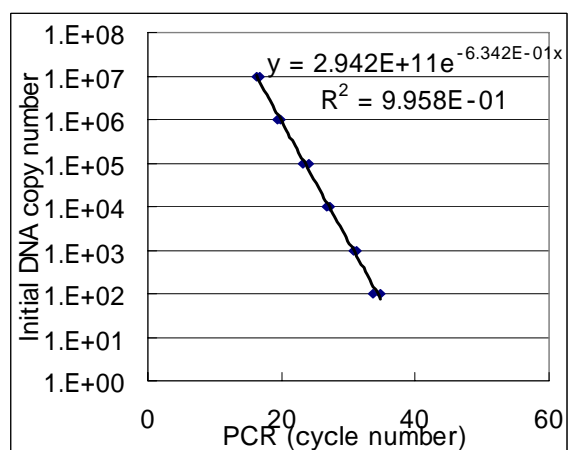
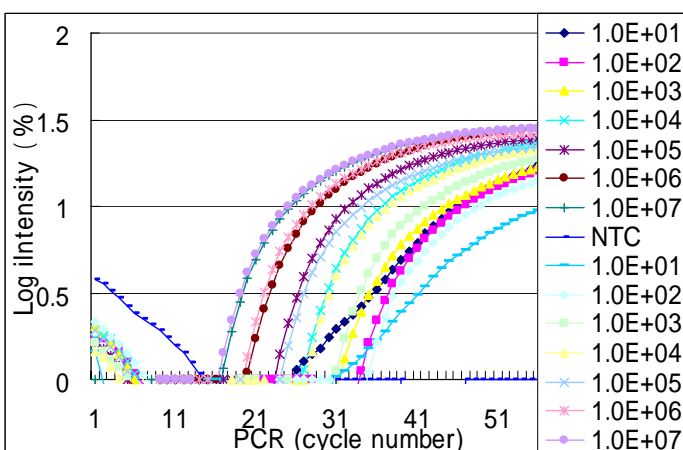
最適化の結果として QP-PCR 条件は TakaraTaq ポリメラーゼを用い、 $0.2 \mu\text{M}$ プライマー濃度とすることにした。



A) AmpliTaq GOLD ポリメラーゼと 0.2 μM プライマー濃度



B) AmpliTaq GOLD ポリメラーゼと 0.4 μM プライマー濃度



C) Takara Taq ポリメラーゼと 0.2 μM プライマー濃度

図 4.4 FGPS プライマーセットを用いた QP-PCR 法の DNA ポリメラーゼとプライマー濃度の最適化

4.4 QP-PCR 法を用いたミニプラント内の *Nitrobacter* 属の定量解析

項目 4.4 で設定した条件を用いてミニプラントの *Nitrobacter* 属の定量解析を行った。

図 4.5 に log 消光%と PCR cycle 数の関係を表すグラフを、図 4.6 に得られた検量線を示した。また、図 4.7 に解離曲線を示した。検量線は R^2 の値が 0.9985 であり、高い相関を示した。解離曲線分析により特異性の確認を行ったところ、ダイマーや別の産物等、非特異的な増幅が発生した可能性を示すピークは認められなかった(図 4.7)。また、増幅されたサンプルについてアガロースゲル電気泳動を行い、目的の長さの PCR 産物が確認された(FGPS プライマーセットに挟まれる領域は 397bp)(データ示さず)。

ミニプラント中の *Nitrobacter* 属の菌体量の経時変化を QP-PCR 法で追ったところ、図 4.8 のような挙動を示した。亜硝酸蓄積型を示した RUN 4 において、*Nitrobacter* 属の DNA コピー数の濃度は 4.0×10^4 DNA copy #/ml Reactor 前後で安定であった。RUN 4 では人工安水から実安水が除かれたが、*Nitrobacter* 属の DNA コピー数の挙動に大きな変化が表れなかったことから、実安水は特に *Nitrobacter* 属の挙動に影響を与えないことがわかった。次に、硝酸蓄積型を示した RUN 5 において、 5.6×10^5 DNA copy #/ml Reactor まで濃度の上昇が見られた。この間、人工安水からチオシアンとチオ硫酸が除かれていた。チオ硫酸が再添加された RUN 6 は再び硝酸蓄積型を示し、*Nitrobacter* 属のコピー数濃度は 1.1×10^5 DNA copy # / ml Reactor まで濃度が低下した。チオ硫酸が再び除かれた RUN 7 は硝酸蓄積型を示し、*Nitrobacter* 属のコピー数濃度は最高 1.9×10^8 DNA copy # / ml Reactor まで上昇した。

RUN5,6,7 はチオシアン、実安水が除かれているという条件は同じであるにもかかわらず、チオ硫酸が除かれた RUN5,7 で *Nitrobacter* 属が増加し、RUN6 では減少したことから、チオ硫酸が *Nitrobacter* 属の阻害因子となっていることが示唆された。

その一方、RUN5 の DNA コピー数は RUN7 の約 100 分の 1 であり、RUN5 も RUN7 も亜硝酸酸化の活性はほぼ同程度であったと考えると、RUN 5 における亜硝酸酸化を *Nitrobacter* 属によるものと説明することには無理があることが示唆される。

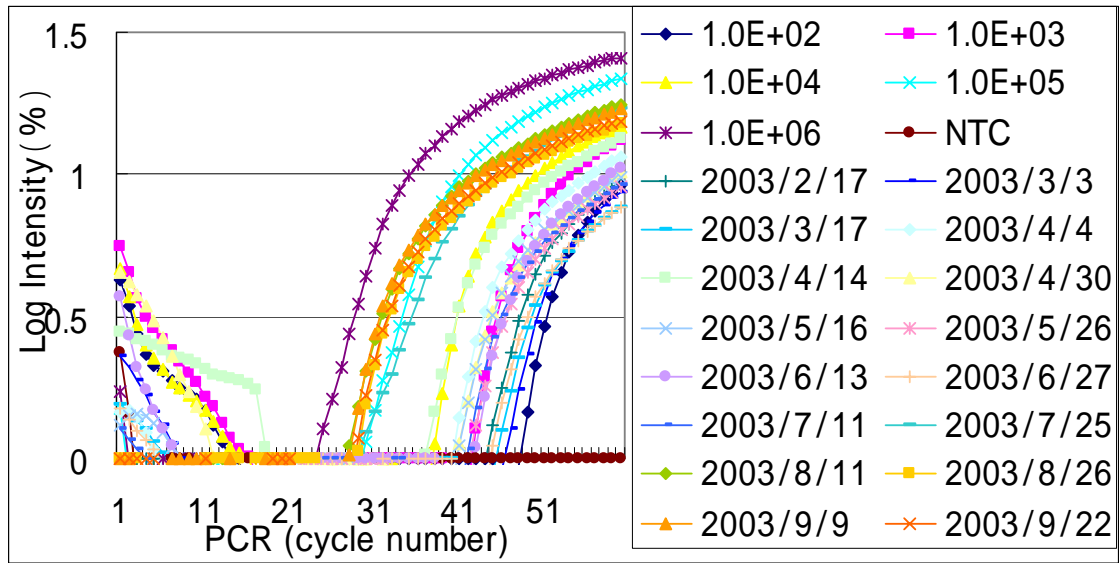


図 4.5 ミニプラント中 *Nitrobacter* 属をターゲットとした QP-PCR 定量結果

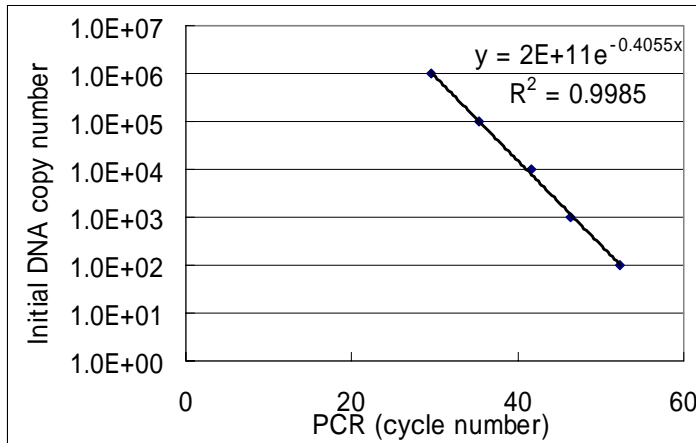


図 4.6 ミニプラント中の *Nitrobacter* 属をターゲットとした QP-PCR 定量法の際に得た検量線

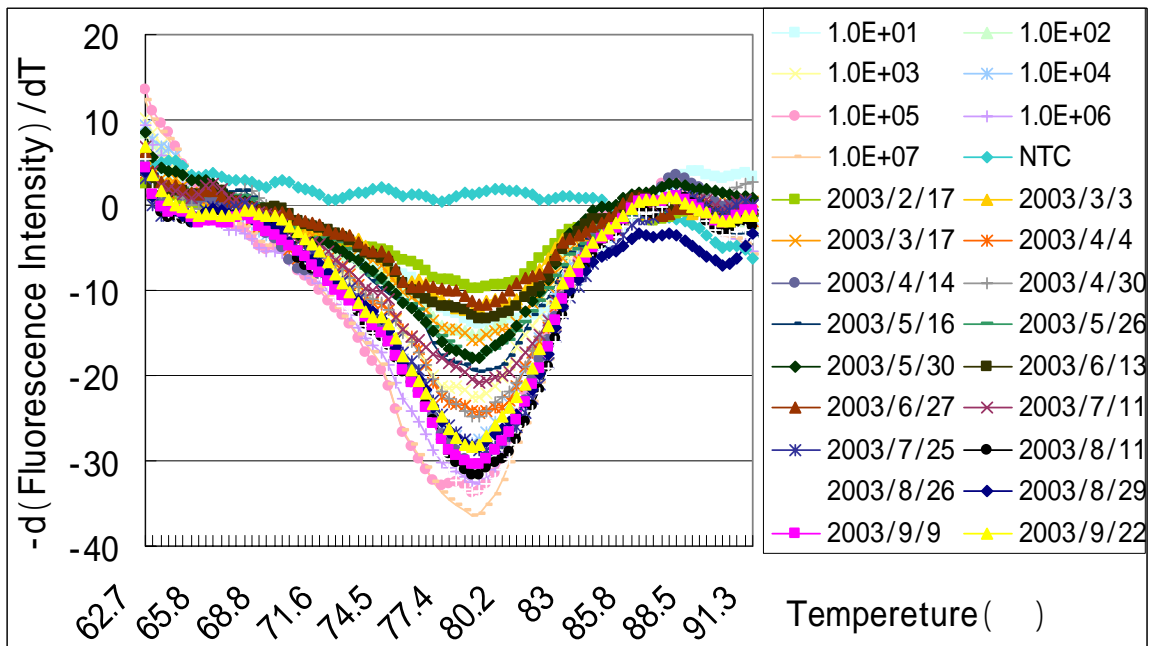


図 4.7 解離曲線

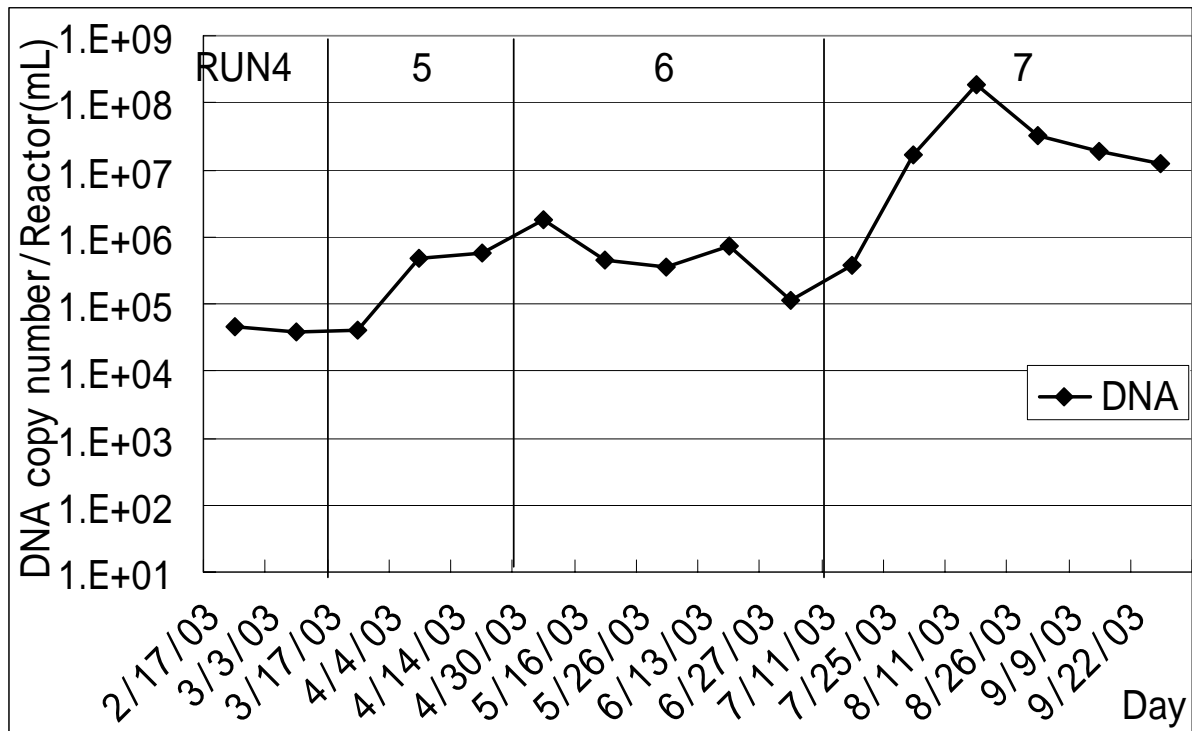


図 4.8 ミニプラント中の *Nitrobacter* 属由来の DNA コピー数の挙動

4.5 FISH 法を用いた NOB グループの検出

4.1 では優先 NOB グループの絞込みに比較的好く知られている *Nitrobacter* 属と *Nitrospira* 属を標的にしたプライマーを用いて検出を試みた。しかし、*Nitrococcus* と *Nitrospina* に対しては既存のプライマーが存在しなかったため PCR 法による検出の試みを断念した。これに対して、FISH 法で用いるプローブは 4 つの NOB グループに特異的なものがそれぞれ開発されている。*Nitrobacter* 属、*Nitrococcus*、*Nitrospina* については、それぞれ NIT3、Ntcoc84 と Ntcoc206 のセット、Ntspn693 と Ntspn994 のセットの 1 種類ずつのみしか開発されていなかったため、これらを用いた。また、対比染色の為に全細菌を標的とする EUB を用いた。*Nitrospira* 属については幾つかプローブが開発されており、より幅広く *Nitrospira* 属を検出することを考え genus *Nitrospira* 属をターゲットとする Ntspa662 を選択した。そこで、ここではこれら 4 種類のプローブを用い、各 NOB 属がミニプラント内に存在しているかを FISH 法により確認した。なお、これらのプローブが細菌以外のものを捕らえていないことを確かにする為、標的 NOB グループを捉えるプローブの蛍光色素 (Cy3) とは異なる蛍光色素 (FITC) をつけた全細菌をとらえる EUB プローブを同時に用いた。Cy3 と FITC の蛍光シグナルが同時に検出されること (図 4.9 の右下の写真の中で黄色く見える部分) によりプローブがターゲットへ上手くハイブリダイズされたことが確認できる。

硝酸蓄積を示す RUN7 の 2003/9/9 のサンプルを用いて検出を試みた結果、NIT3 プローブの蛍光シグナルは検出できたが (図 4.9) それ以外は検出されなかった。この時、EUB プローブの蛍光シグナルはどの場合でも検出できた (このことから、サンプルや FISH の固定に問題があったわけではないことが確認できた)。また、Ntcoc84 と Ntspn693 については、FISH のホルムアミド濃度を文献値以外の濃度でも試してみたが (Ntcoc84 は文献値の 10% の他、20% で、Ntspn693% は文献値の 20% の他、10% で) 検出されなかった。

このことから、*Nitrobacter* 属が主要な亜硝酸酸化細菌であることが確認できた。ただし、FISH 法による検討を行ったのは 2003/9/9 の試料だけなので、それ以外の時期、特に RUN5 の時期に優占していた亜硝酸酸化細菌についてはここでの知見は有効ではない。

4.6 アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の空間分布

硝化反応を共に担う AOB と NOB はバイオフィルム上等では近接して存在していることが確認されている。ここでは、硝化細菌がミニプラント内で空間的にどのように存在しているかを FISH 法を用いて確認した。なお、AOB の検出に用いたプローブ (NEU プローブ (FITC 標識)) は第 5 章の項目 5.4 で検討したものをを用いた。これは、 γ -AOB の一部である、halophilic, halotolerant な *Nitrosomonas* 属に属するものを捉えるプローブである。NOB のプローブは唯一検出できた *Nitrobacter* 属をターゲットとする NIT3 プローブ (Cy3) をを用いた。また、サンプルはリアルタイム PCR での定量の結果 *Nitrobacter* 属の存在量が高かった RUN7 の 2003/9/9 のサンプルを用いた。

ミニプラントサンプルのフロックを観察した結果、 γ -AOB はクラスターを形成していることが分かった (図 4.10 の矢印)。また、*Nitrobacter* 属は Free Living のように遊離している、すなわちクラスターを形成していないことが分かった (図 4.10 の矢印)。この結果は *Nitrobacter* 属は Free Living の形で存在しているという Koops らの報告と一致している (Koops and Pommerening-Roser 2001)。さらに、二つの画像を重ね合わせ、AOB と NOB のフロック中の空間分布を調べたところ、ミニプラント中のフロック内では特に近接して存在しているわけではないことが確認された (図 4.10)。

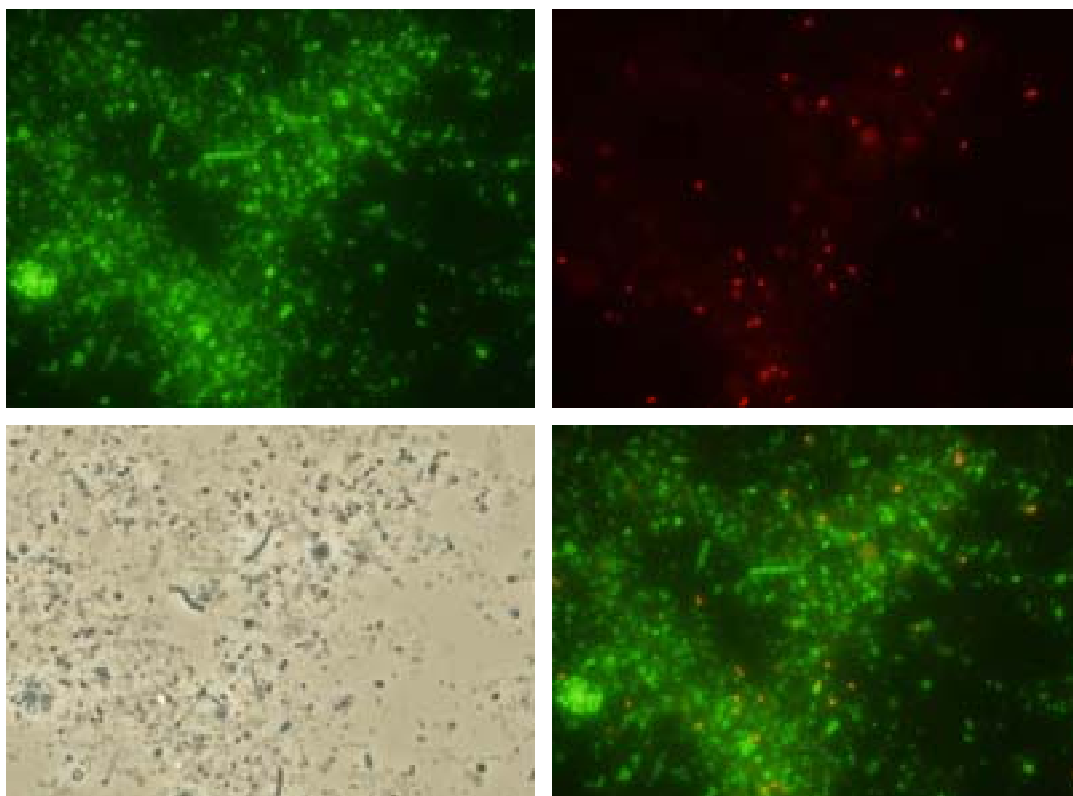


図 4.9 FISH 法によるミニプラント内での *Nitrobacter* 属の検出

(左上：EUB(FITC)、右上：NIT3(Cy3)、左下：位相差、右下：左上と右上の画像を重ねた結果。)

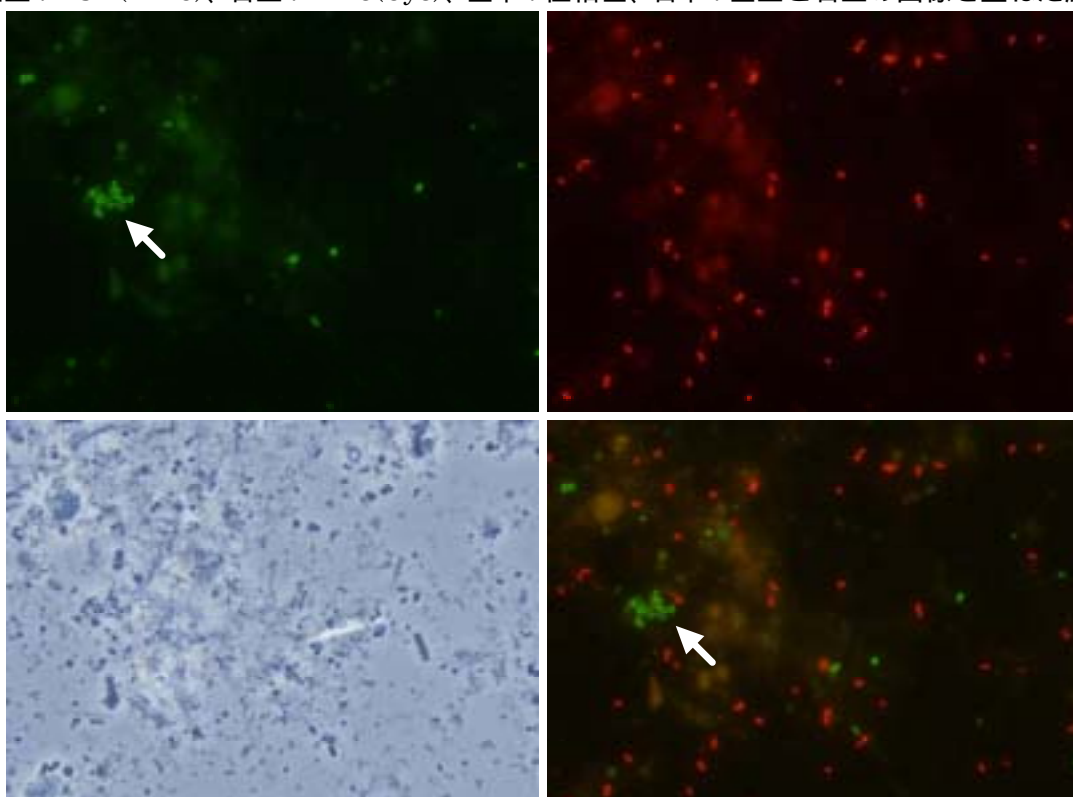


図 4.10 FISH 法による γ -AOB と NOB (*Nitrobacter* 属) のミニプラントサンプルブロック中の空間分布状況 (白い矢印：クラスターを形成した γ -AOB)

(左上：NEU(FITC)、右上：NIT3(Cy3)、左下：位相差、右下：左上と右上の画像を重ねた結果。)

4.7 考察

この項では、章全体の振り返りをおこなった。

本研究では、*Nitrobacter* 属をターゲットとする FGPS プライマーセットを用いて研究を進めてきた。その結果、*Nitrobacter* 属が本プロセスにおいて亜硝酸酸化を担っている主要な細菌である可能性が示され、さらに、リアルタイム定量により、ミニプラント内の亜硝酸の蓄積は *Nitrobacter* 属の菌体量と強く関係していることが示唆された。

4.7.1 FGPS プライマーの信頼性

本研究でえられた *Nitrobacter* 属に関する結果の多くは FGPS プライマーを用いたものだった。プライマーは特定の細菌を厳密に捉える目的のため、特異性を高めて設計されるものもあれば、より幅広く特定の菌群を捉えるために特異性を低めた設計も可能である。このようなプライマーの特性を確認することは、本研究で得られた結果を考察するために必要である。そこで、ここでは、FGPS プライマーセットの特異性についてあらためて確認した。

確認の方法としては、まず、現時点（2005年1月）で、NCBI Taxonomy Database (Wheeler et al 2000, Benson et al. 2000) に登録されている *Nitrobacter* 属の 16SrDNA 全長配列(合計 20) について、FGPS プライマーセットの Reverse と Forward のそれぞれの配列を含んでいるかを確認した。その結果登録されていた 20 の塩基配列のうち、18 の塩基配列内に完全な形（0 ミスマッチ）で検出された。よって、少なくとも現在データベースに登録されているほとんどの *Nitrobacter* を検出することが出来ることが分かった。

なお、*Nitrobacter* 属の近縁種であるとして次のものがあげられ、そのうち下線を引いたものとは 1 ないし 2 のミスマッチがあることが BLAST により確認された。*Bradyrhizobium japonicum*(土壌に生息する根粒菌), *Blastobacter denitrificans*, *Caulobacter crescentus*(水環境中に生息する遊離性プロステーカ細菌), *Afipia felis*(猫と人への日和見感染性細菌), *Afipia clevelandensis*, *Rhodobacter palustris*(水環境中に生息する遊離性光合成細菌), *Rhodobacter capsulatus*(水環境中に生息する遊離性光合成細菌)。1,2 ミスマッチのレベルではプライマーは判別しにくく、増幅させてしまう可能性がある。だが、今回、4.2 において、PCR-Cloning-Sequencing 法を行った際、79 個のクローンすべてがデータベース上の *Nitrobacter* 由来の塩基配列と相同性を示し、類似の塩基配列を持つものは見つからなかった。このことから、FGPS プライマーセットがミニプラント環境中で *Nitrobacter* 属以外の近縁種を検出する確率は極めて低いことが確認された。よって、このプライマーを用いて研究することの妥当性が確認できた。

4.7.2 norB による PCR の結果について

本研究では、項目 4.1 で *Nitrobacter* 属をターゲットにした 2 つのプライマーセットを用いて *Nitrobacter* 属の検出確認を行った。しかし、16SrDNA をターゲットにした FGPS プライマーセットでは PCR 産物が検出されたにも関わらず、亜硝酸酸化還元酵素機能遺伝子をターゲットにした norB プライマーセットでは検出されなかった。そこで、ここではこの矛盾について考察した。

機能遺伝子をターゲットにしたプライマーでは PCR 産物が検出できなかった理由を以下の二

つの知見から考察した。まず、一つ目に 16SrDNA に比べて機能遺伝子の多様性が高いことがあげられる。16SrDNA では全長(1500bp 程度)の類似度が 97%未満であると別種だとされるのに対し、AOB の機能遺伝子である amoA では 500bp 程度の長さにおいて、80%未満の類似度の場合には別種であるとされる (Purkhold *et al.*, 2000)。同種でも類似性が 80%以上という広さを考えると、必ずしもすべての *Nitrobacter* がこの領域を保存しているとは言い切れないと考えられる。

また、プライマー部分のアミノ酸配列の保存性が低い、もしくは、アミノ酸配列から考えられるすべての塩基配列を抑えていない、すなわち、複数あるうちの一つのコードのみを選んでいる可能性がある。そのため、このプライマーの設計の際に選ばれたコードと異なるコードを持った *Nitrobacter* 属は検出できないということになる。

多様性の高い、低いのは機能遺伝子の種類による。norB プライマーを開発した赤司の文献によると、NOR 遺伝子のクローニング例は極めて少なく *Nitrobacter hamburgensis* の 1 例だけで、著者はこの菌のデータベースのみを用いてプライマーを作成された (赤司 2004)。さらに、この PCR プライマーセットを用いた PCR 産物の生産の有無を確認する際にも、用いられた菌株は、*Nitrobacter hamburgensis* のみであった。2005 年 1 月現在の DDBJ のデータベースには上記も含めて 8 株の norB 遺伝子配列が登録されており、それらとこのプライマーが 100%相同であることが確認できた。

こうした状況で、なぜ norB 遺伝子が検出されなかったか疑問が残る。しかし、norB 遺伝子は現在知られている以上に多様である可能性はある。16SrDNA を標的とした FGPS プライマーセットで *Nitrobacter* 属の存在が確認されても、今回用いた norB プライマーセットでは *Nitrobacter* 属の norB 遺伝子を検出することが出来なかったのは、決して不思議ではない。

4.7.3 *Nitrobacter* 属の亜硝酸酸化速度について

本研究により *Nitrobacter* 属の挙動が亜硝酸・硝酸蓄積と関係があることが示唆されたが、その一方、RUN5 の標的 DNA 量は RUN7 の約 100 分の 1 であり、RUN5 も RUN7 も亜硝酸酸化の活性はほぼ同程度であったと考えれば、RUN5 における亜硝酸酸化を *Nitrobacter* 属によるものと説明することには無理があることが示唆される。そこで、ここでは、QP-PCR 法を用いた定量結果と水質測定データを利用して *Nitrobacter* 属単位質量あたりの亜硝酸酸化速度 (比亜硝酸参加速度) を求め、これと、文献から得られる亜硝酸酸化細菌の比亜硝酸消費速度と比較することで、反応槽内に検出された *Nitrobacter* 属により、反応槽内で実際に起きていた亜硝酸酸化反応をどの程度説明することが出来るか、比較を行った。

4.7.3.1 本実験結果による単位あたりの *Nitrobacter* 属あたりの亜硝酸酸化速度の計算
 実験結果による単位あたりの *Nitrobacter* 属あたりの亜硝酸酸化速度は以下の式で求められる。

$$[\text{単位あたりの } Nitrobacter \text{ 属あたりの亜硝酸酸化速度(mg/day)}] = \frac{[\text{硝化槽内の } Nitrobacter \text{ 属の濃度(mg/L)}] \times 145\text{L}}{[1 \text{ 日の硝化槽内(145L)の亜硝酸消費量(mg/day)}]}$$

式 4.1

硝化槽内の *Nitrobacter* 属の濃度(mg/L)の算出

硝化槽内の *Nitrobacter* 属の濃度 (mg/L) は以下の式より得られる。

$$[\text{硝化槽内の } Nitrobacter \text{ 属の濃度 (mg/L)}] = \frac{[\text{硝化槽内の } Nitrobacter \text{ 属の濃度 (個/L)}] \times [\text{Nitrobacter 1 個あたりの乾燥重量 (mg/個)}]}{[\text{Nitrobacter 1 個あたりの乾燥重量 (mg/個)}]}$$

式 4.2

ここで、*Nitrobacter* 属の濃度 (個/L) は以下の式より得られる。

$$[\text{Nitrobacter 属の濃度 (個/L)}] = \frac{[\text{検出された DNA コピーの濃度 (個/L)}] \times [\text{Nitrobacter 1 個あたりのコピー数 (} X_1 \text{) (個/個)}]}{[\text{Nitrobacter 1 個あたりのコピー数 (} X_1 \text{) (個/個)}]}$$

式 4.3

また、*Nitrobacter* 1 個あたりの乾燥重量 (mg/個) は以下の式より得られる。

$$[\text{Nitrobacter 1 個あたりの乾燥重量 (mg/個)}] = \frac{[\text{Nitrobacter 1 個あたりの湿重量 (} X_2 \text{) (mg/個)}] \times (1 - \text{含水率 (} X_3 \text{)})}{[\text{Nitrobacter 1 個あたりの湿重量 (} X_2 \text{) (mg/個)}]}$$

$$= 6.62 \times 10^{-10} \text{mg/個} \times (1 - 0.7)$$

$$= \underline{1.99 \times 10^{-10} \text{mg/個}}$$

式 4.4

なお、未知数 X_1 、 X_2 、 X_3 の推定は以下のように行った。

< *Nitrobacter* 1 個あたりのコピー数 (X_1) >

Navarro らによる「*Nitrobacter* は 1 つの細胞あたり 1 つの 16SrRNA オペロンを持っている (Navarro *et al.*, 1992)」という報告があったので、1とした。この数は種により様々だが、*Nitrobacter* 属のような成長速度の遅い種はこの数が少ないと考えられている。このことから、上記のデータは信頼できると考える。よって、リアルタイム PCR 定量の結果得られる DNA 産物量はそのまま *Nitrobacter* 属の菌体数 (個数) を表していると考えることが出来る。

< *Nitrobacter* 1 個あたりの湿重量 (X_2) >

Nitrobacter の大きさは平均で直径が 0.6 ~ 0.9 μm 、長さが 1.2 ~ 1.8 μm だといわれている (Sorokin, *et al.*, 1998)。そこで、それぞれの平均値を用いて、直系 0.75 μm 、長さ 1.5 μm と仮定した。よって、*Nitrobacter* の 1 個あたりの体積は

$$(0.75 \mu\text{m} / 2)^2 \times 1.5 \mu\text{m} = 6.62 \times 10^{-13} \text{cm}^3/\text{個}$$

式 4.5

なった。次に、細胞 $1\text{cm}^3=1\text{g}=1000\text{mg}$ と仮定した。

よって、 X_2 は、

$$X_2 = 6.62 \times 10^{-13} \text{cm}^3 \times 1(\text{g/cm}^3) = \underline{6.62 \times 10^{-10} \text{mg/個}} \quad \text{式 4.6}$$

< 含水率 (X_3) >

含水率は脱水ケーキの典型的な含水率である 70% を仮定した (藤田 1988)。

水質測定データからの硝化槽内の亜硝酸消費速度 (mg/day)

流入水を Q と置くと、1 日で硝化槽 (145L) 内で硝酸になった亜硝酸の量 (mg/145LL/day) は以下の式から得られる。また、この時、 Q は 60L/day である。

$$[1 \text{ 日で硝化槽 (145L) 内で硝酸になった亜硝酸の量 (mg/145LL/day)}] = 4Q(\text{L/day}) \times (\text{処理水の D-NO}_3\text{-N} - \text{脱窒槽出口 D-NO}_3\text{-N}) \quad \text{式 4.7}$$

4.7.3.2 文献から得られる亜硝酸酸化細菌の比亜硝酸消費速度 (mgN/mgNOB/day) の計算

亜硝酸酸化細菌の比亜硝酸酸化速度を文献から見つけることが出来なかった。ここでは活性汚泥モデル (Henze *et al.*, 2000) にあるアンモニアから硝酸への酸化に関する動力学定数をもとに、亜硝酸酸化細菌の比亜硝酸酸化速度を推定した。

Henze らによるとアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌をあわせたアンモニアの硝酸への硝化速度 (mgN/mgNOB/day) は、以下のように与えられる (Henze *et al.*, 2000)。

< 用いる式 >

$$\text{比増殖速度 (1/day)} \quad \mu (\text{硝化細菌}) = 1/X \cdot (dx/dt) \quad \text{式 4.8}$$

$$\text{菌体収支} \quad Y(\text{硝化細菌}) = - (dX)/d\text{NH}_4 \quad \text{式 4.9}$$

$$(T) = \ln(\mu_{\text{Max}}(t_1) / \mu_{\text{Max}}(t_2)) / (t_1 - t_2) \quad \text{式 4.10}$$

$$\text{ここで } t_1=10, \quad t_2=20, \quad \mu_{\text{Max}}(10) = 0.35[\text{d}^{-1}], \quad \mu_{\text{Max}}(20) = 1[\text{d}^{-1}]$$

$$\mu(T) = 1 \times \exp(- (T) \times (T-20)) \quad \text{式 4.11}$$

なお、式 4.8 は本来酸素、アンモニア、アルカリ度等に関してもモノー型である。酸素、アンモニア、アルカリ度が十分にあるとして式を近時簡略化している。また、菌体量 X は単位は mg/COD である。NH₄ 1g の消費あたり 0.24g (未知数 X_4) の硝化細菌が生産される (Henze *et al.*, 2000)。

すなわち、

$$Y(\text{硝化細菌}) = 0.24\text{g}/1 = 0.24\text{g COD/gN} \quad \text{式 4.12}$$

次に、30 における硝化細菌の最大比増殖速度（未知数 X_5 ）を式 4.10、式 4.11 より得た。この計算の結果、30 における硝化細菌の最大比増殖速度は 2.86(1/d)であることがわかった。ここで、式 4.8、式 4.9 より NH_4 の消費速度は

$$d\text{NH}_4/\text{dt} = -\mu(\text{硝化細菌}) \cdot (X/Y(\text{硝化細菌})) \quad \text{式 4.13}$$

よって、上記のによりわかった Y ($Y(\text{硝化細菌})$) の値と硝化細菌の最大比増殖速度を式 F に代入すると、

$$d\text{NH}_4/\text{dt} = 2.86 \times 1/0.24 = 11.91 \quad \text{式 4.14}$$

よって、単位菌体量あたりの NH_4 消費速度は $12\text{gN}/(\text{gCOD})/\text{day}$

ここで、 $1\text{gCOD} = \sim 1\text{gSS}$ (硝化細菌の乾燥重量)とすると

単位菌体量あたりの NH_4 消費速度は $12\text{gN} \cdot (\text{gSS})/\text{day}$

さらに、1g の SS は、AOB と NOB からなる。そこで、1 g の SS 中の NOB の菌体量を求めなければならない。ここで、一般に菌体の増殖量は増殖の際に得ることの出来るギブスエネルギー変化量に比例するといわれる。1 モルのアンモニアが亜硝酸に酸化される時、及び、1 モルの亜硝酸が硝酸に酸化される時の比率は以下のとおりである。

$$\text{AOB} : \text{NOB} = -65.04\text{Kcal/mol} : -17.5\text{Kcal/mol} = 4:1 \quad \text{式 4.15}$$

これに基づくと、1 モルのアンモニアが酸化されて生じた硝化最近は、約 8 割がアンモニア酸化細菌で、2 割が亜硝酸細菌という事になる。

よって、単位量の亜硝酸酸化細菌の亜硝酸酸化速度は $12/5=60\text{gN}/\text{gNOB}/\text{day} = 60\text{mgN}/\text{mgNOB}/\text{day}$ である考えられる。

4.7.3.3 ミニプラント内での亜硝酸酸化への *Nitrobacter* 属の寄与の評価

4.7.3.1 で得られた本実験の結果による単位量の *Nitrobacter* 属あたりの比亜硝酸酸化速度（図の曲線、以下実験値と呼ぶ）と 4.7.3.2 で得られた文献から算出された単位量亜硝酸酸化細菌あたりの亜硝酸酸化速度の結果（60mgN/mgNOB/day、以下文献値と呼ぶ）を比較した（図 4.11）。

この結果、硝酸蓄積を示す RUN 5 では、実験値が文献値(60mgN/mgNOB/day)の 10～100 倍高かった。このことから、RUN 5 における亜硝酸活性は *Nitrobacter* 属だけでは説明が不可能であり、他の NOB が主としてこの RUN の亜硝酸酸化に関わっていることが示唆される。亜硝酸蓄積を示す RUN 6 において、実験値の亜硝酸酸化活性が低下を示したことから、*Nitrobacter* 属の減少量以上に亜硝酸酸化活性が減ったことが示唆される。硝酸蓄積を示す RUN 7 では、文献値が 60mgN/mgNOB/day と推定されたのに対して、今回検出された *Nitrobacter* 属の濃度から算出された実験値はと 60mgN/mgNOB/day とほぼ同程度か、10 分の 1 ほど下回ることがわかった。よって、この期間の亜硝酸酸化は *Nitrobacter* 属によるものとしてほぼ説明できることがわかった。なお、実験値が文献値を下回った理由としては、各値を計算するために大雑把な仮定を行っているためその誤差によるものだと考えられる。

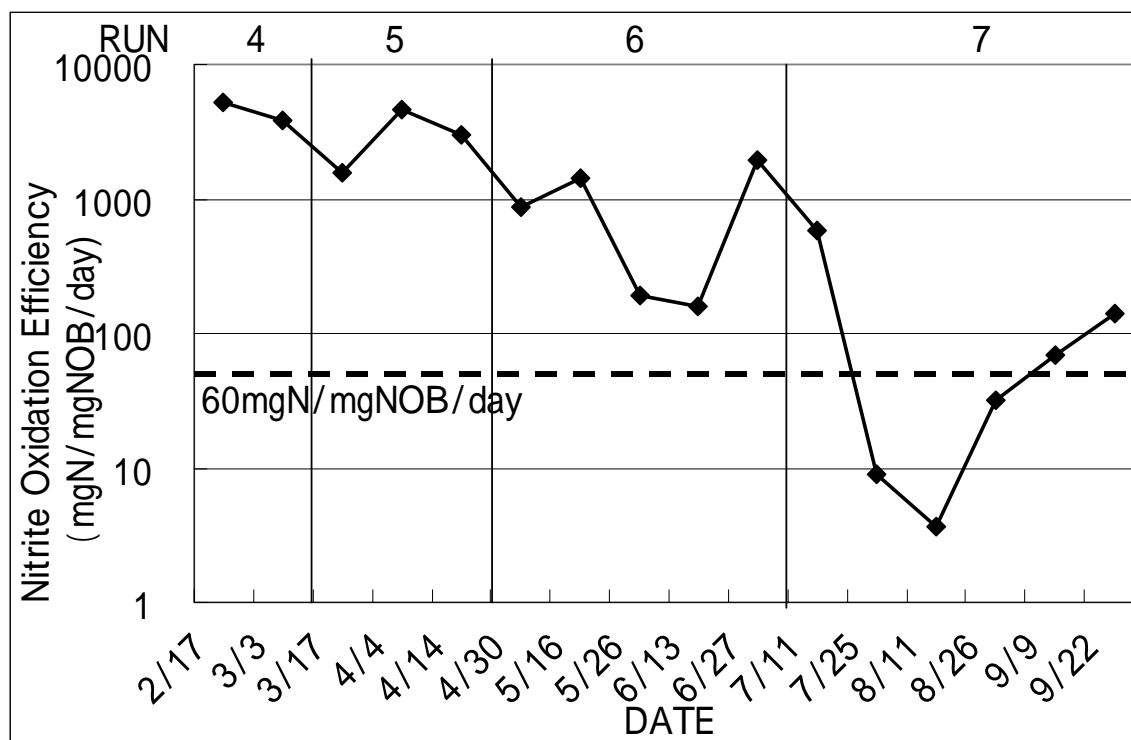


図 4.11 本実験の結果による単位量の *Nitrobacter* 属あたりの亜硝酸酸化速度と文献からの単位量の亜硝酸酸化細菌の亜硝酸酸化速度（60mgN/mgNOB/day）の比較
（縦軸：単位質量の亜硝酸酸化細菌・*Nitrobacter* 属の亜硝酸酸化速度）

4.8 まとめ

本章では、人工安水処理するミニプラント内で亜硝酸酸化を担っている主要な亜硝酸酸化細菌群を明らかにすること、及び、亜硝酸酸化細菌の挙動に着目し、ミニプラントにおける亜硝酸蓄積型硝化の原因についての知見を得ることを目的として実験を行った。以下に、本章で得られた結果についてまとめる。

4.1、4.2、4.5 から、PCR 法、クローニング法、FISH 法を使った結果、*Nitrobacter* 属が主要な亜硝酸酸化細菌の候補としてあげられた。

4.3 において *Nitrobacter* 属を標的とした QP-PCR 法を開発し、それを 4.4 においてミニプラント内の *Nitrobacter* 属の挙動を解析することが出来た。

4.4 においてミニプラント内の *Nitrobacter* 属の挙動を QP-PCR 法により定量した結果、チオ硫酸のなかった Run 5 および Run 7 において *Nitrobacter* の増加が確認された。このことから、チオ硫酸が *Nitrobacter* 属の増殖に阻害的な作用を持っていることが示唆された。

4.4 の QP-PCR 法を用いた挙動解析により、Run 5 の *Nitrobacter* 属の量は Run 7 の時の約 100 分の一程度であり、Run 5 における亜硝酸酸化は *Nitrobacter* 属外の細菌が主として担っている可能性が示唆された。

4.7 で、4.4 で検出された *Nitrobacter* 属の DNA コピー数から反応槽内の *Nitrobacter* 属の質量を推定した。また、ミニプラントの物質収支から、反応槽内での亜硝酸酸化速度を計算した。これらに基づき、ミニプラントにおける単位質量の亜硝酸酸化細菌の亜硝酸酸化速度を計算した。一方、文献に報告されている硝化細菌の硝化速度から、単位質量の亜硝酸酸化細菌の亜硝酸酸化速度を推定した。これらを比較した結果、Run 7 における亜硝酸酸化は *Nitrobacter* 属によるものとしてほぼ説明できることがわかった。

4.6 で FISH 法を用いて $-AOB$ と *Nitrobacter* 属の空間分布の解析を行った結果、 $-AOB$ 、*Nitrobacter* 属は共に既知の研究で報告された存在状態と一致していることが確認できた。ただし、知見とは違い、近接して存在しているわけではないことが確認された。

第5章 人工安水硝化脱窒処理プロセスミニプラントの AOB 群集構造解析

5.1 PCR-DGGE 法による AOB 微生物群集モニタリング

2003年2月17日から2003年9月22日において採取した活性汚泥サンプルから約2週間間隔で16サンプルを選択し、FastDNA SPIN Kit for soilにより核酸を抽出した。得られたDNAを鋳型としてPCR-DGGE法を行い、 α -Proteobacteriaに属するAOB(以下 α -AOB)の群集構造の解析を行った。このとき、プライマーセットには、CTO189f-CTO654r(以下、CTOプライマーセット)を用いた。このプライマーセットはDGGE法に適用できる増幅領域が500bp以下という条件を満たし、かつ、幅広く α -AOBをとらえることができることから本研究で用いる事に決定した。この結果を図5.1に示した。なお、AOBは α -AOBの他に、 β -Proteobacteriaに属する β -AOBが存在するが2種類しか単離されておらず、研究があまりなされていない。本研究は、数多くの株が単離されており、研究がされている α -AOBに焦点をあてて研究を行った。

その結果、合計7つのバンドが得られた。通常の下水处理の活性汚泥中の硝化細菌群集等(Boon *et al.*, 2002)と比較して種数が少なく、 α -AOBの群集構造が単純であることが示唆された。

バンドB1はミニプラントの流入水からチオシアンが除かれて以降(RUN5以降)バンドの濃さが減少した。このことから、バンドB1に相当する細菌とチオシアンとの関係が示唆された。

バンドB4はチオ硫酸が流入水に再添加され亜硝酸蓄積を示すRUN6でバンドの濃さが増加し、再びチオ硫酸が取り除かれたRUN7で濃さが減少した。このことから、バンドB4由来の細菌はチオ硫酸添加による亜硝酸蓄積と関係があると考えられる。しかし、RUN6と同じくチオ硫酸が含まれており、かつ実安水が添加されているRUN4でもバンドが検出されないということから、実際の安水处理では存在しにくい細菌由来のバンドであると考えられる。なお、このような挙動を示すバンドは脱窒細菌の機能遺伝子NIRSを標的としたnirS2F#2-nirS3R#5プライマーセットを用いてPCR-DGGE法を用いた脱窒細菌の群集構造解析(図5.2)を行った結果でも現れていた(図5.2のバンドM2-CG26,27,28)(新田見 2003)。

今回、ミニプラント流入水中のチオシアンの有無と関係していると思われるバンドとしてB1、チオ硫酸との関係があると示唆されるB4が見つかったが、しかし、ミニプラント内の亜硝酸、硝酸蓄積と挙動が完全に一致するようなバンドは観察されなかった。このことから、 α -AOB群の構造変化がミニプラントの亜硝酸・硝酸の蓄積に関与している可能性は低いと示唆された。

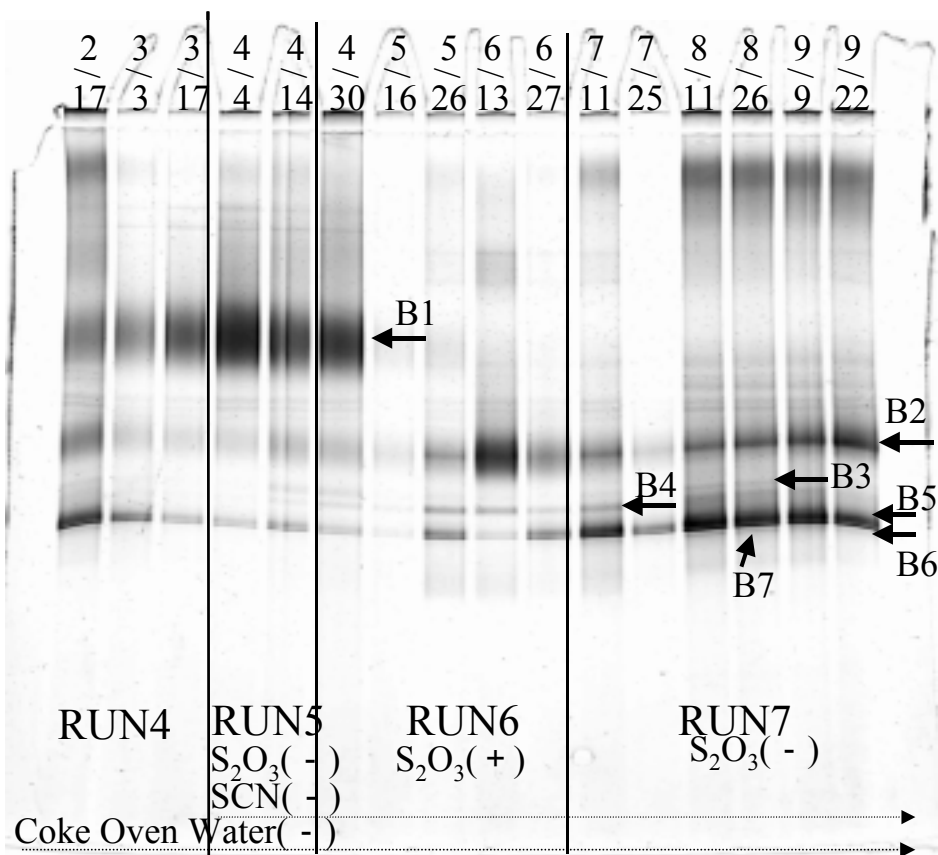


図 5.1 CTO プライマーセットを用いたミニプラント (RUN4-7) の解析

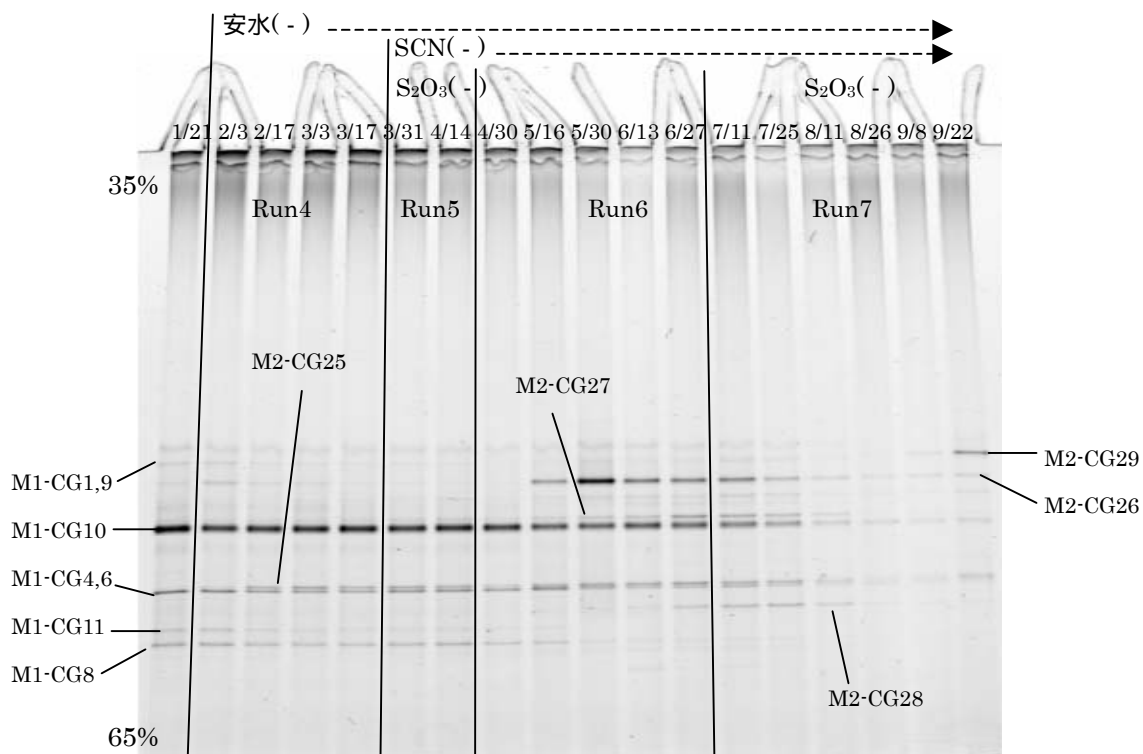


図 5.2 NirS2F#2-NirS3R#5 プライマーセットによるミニプラント (RUN4-7) の解析
(新田見 2003 引用)

5.2 塩基配列解読による DGGE バンドの近縁種決定

5.2.1 塩基配列解読結果

検出された7つのバンドを切り出し、数度 DGGE を繰り返すことでバンドの精製を行い、シーケンシング解析を行った。解読した CTO 領域の遺伝子配列は、相同性検索プログラム BLAST(WU-BLAST2, DNA Data Bank of Japan[DDBJ] <http://www.blast.genome.ad.jp>)を使用して、最も近縁な配列を検索した。結果を表 5.1 にまとめた。Band name は図 5.1 で用いたものである。

近縁種を決定したところ、すべてのバンドにおいて *Nitrococcus*、及び *Nitrosomonas* 等、 γ -AOB に属するものが近縁種の候補となった。また、B5, B6, B7 の最近縁種である Marine bacterium C-17、及び、*Nitrosomonas* sp. Nm143 はともに海洋由来の細菌であった(Koop *et al.*, 2001)。

このことから、ミニプラント内で硝化反応を担っている γ -AOB 群は、ミニプラントの人工安水の希釈にもちいられる海水由来のものであると推測できる。

5.2.2 系統樹作成

DDBJ の ClustalW(<http://hypernig.nig.ac.jp/homology/clustalw.shtml>)でアライメント解析を行い、系統樹を作成した(図 5.3)。系統樹作成の際、既知種の塩基配列は DDBJ のデータベースに登録されてある γ -NOB、 γ -NOB の主な単離株、及び比較のためにアンモニア酸化細菌ではないグループの細菌として *E.coli* (J01859) を利用し取得した。

系統樹を作成した結果、7つのバンドはそれぞれバンド B1, B2, B3, B4 由来の菌は *Nitrosomonas europaea* - *Nitrosococcus mobilis* クラスタに、バンド B5, B6, B7 由来の菌は *Nitrosomonas* sp Nm 143 のクラスタに含まれていた。これらのクラスタから単離された γ -AOB は高塩濃度環境を好む、もしくは、高塩濃度環境に耐性のある性質を持っている (Koop *et al.*, 2001)。ミニプラントが海水により希釈されていることからミニプラント内でアンモニア酸化に関わる AOB は海水由来であると推測される。

なお、前項目でミニプラントの人工流入水の基質の変化と対応していたバンド B1 由来の菌は *Nitrosomonas* sp. clone (AB000702) の近縁種、バンド B4 由来の菌は *Nitrosomonas europaea* ATCC19718 (BX321856) の近縁種だった。

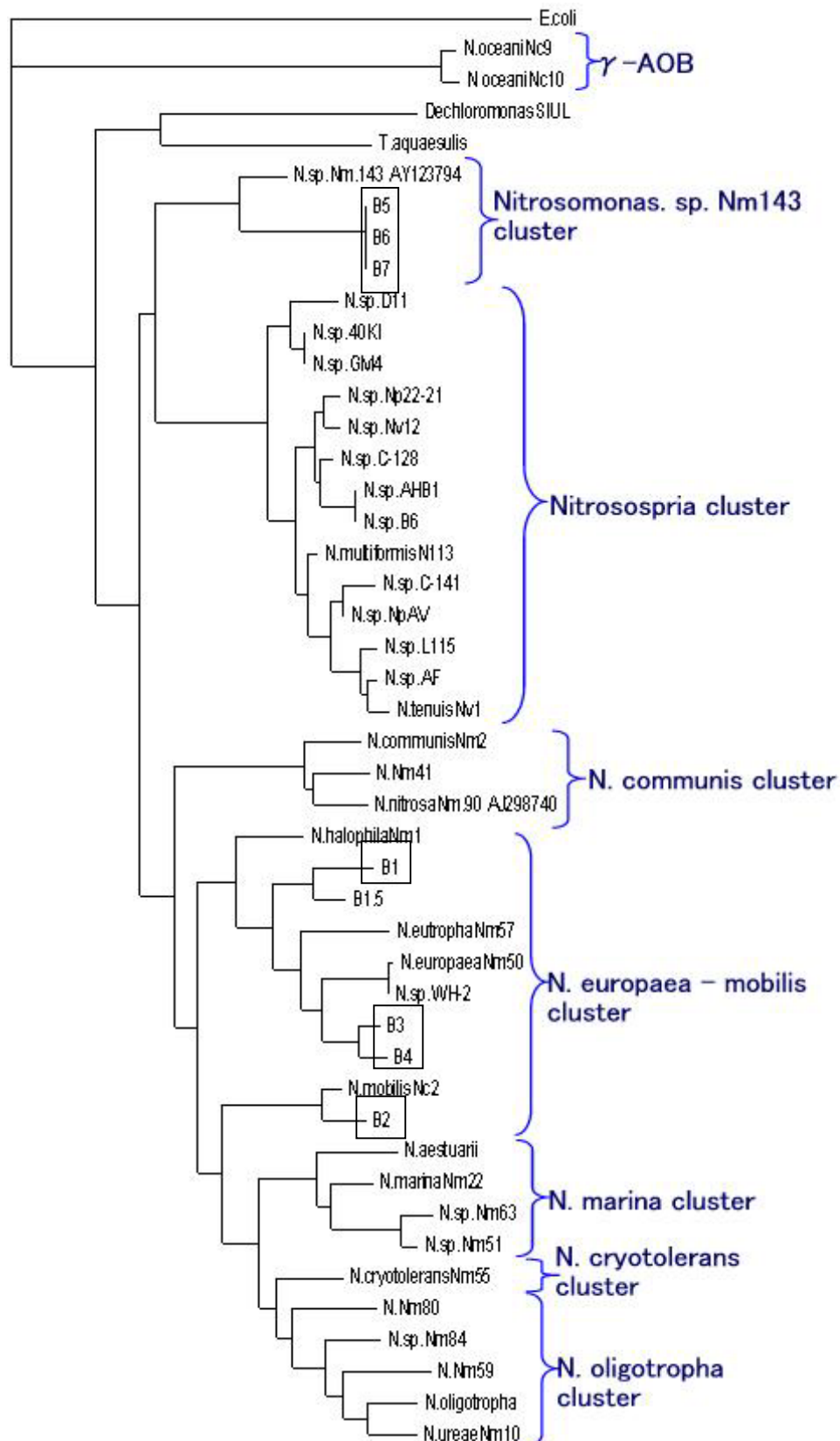
表 5.1 CTO プライマーセットを用いたミニプラント (RUN4-7) の DGGE ゲルから切り出したバンドの最近縁種

Band name	Accession#	Closest sequence	Score	Identities	Reference
B1	AB000702	<i>Nitrosomonas</i> sp. gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate:HPC101.	793 bits (400)	431/440 (97%)	Suwa, <i>et al.</i> , 1997
B2	AJ621029	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is425 16S rRNA gene, isolate Is425. Length = 1457	797 bits (402)	430/436 (98%)	Nielsen <i>et al.</i> , (unpublished)
	AJ298728	<i>Nitrosococcus mobilis</i> partial 16S rRNA gene, isolate Nc2. Length = 1209	797 bits (402)	430/436 (98%)	Aakra <i>et al.</i> , 2001
B3	BX321856	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718, complete genome; segment 1/10.Length = 302050	783 bits (395)	427/438 (97%)	Chain <i>et al.</i> , 2003
	AJ224941	<i>Nitrosomonas</i> sp. 16S rRNA gene, mixed culture isolate Koll-21. Length = 1461	783 bits (395)	427/438 (97%)	Van <i>et al.</i> , (Unpublished)
	AF338211	<i>Nitrosomonas</i> sp. WH-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length = 1100	783 bits (395)	427/438 (97%)	Voytek,M.A. 1996
B4	AF525955	Uncultured bacterium clone AOB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length = 465	694 bits (350)	411/428 (96%)	Pynaert <i>et al.</i> , 2003
	BX321856	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718, complete genome; segment 1/10.Length = 302050	692 bits (349)	410/427 (96%)	Chain <i>et al.</i> , 2003
B5	AJ316215	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, DGGE Band 423.Length = 427	799 bits (403)	421/427 (98%)	Bollmann and Laanbroek. 2002
	AF338202	Marine bacterium C-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length = 1098	791 bits (399)	428/438 (97%)	Voytek, M. A 1996
	AY123794	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	773 bits (390)	426/438 (97%)	Purkhold <i>et al.</i> , 2003

B6	AJ316215	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, DGGE Band 423.Length = 427	783 bits (395)	420/427 (98%)	Bollmann and Laanbroek. 2002
	AF338202	Marine bacterium C-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length = 1098	777 bits (392)	428/439 (97%)	Voytek, M. A. 1996
	AY123794	<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	759 bits (383)	426/439 (97%)	Purkhold et al. 2003
B7	AJ316215	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, DGGE Band 423.Length = 427	783 bits (395)	420/427 (98%)	Bollmann and Laanbroek. 2002
	AF338202	Marine bacterium C-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length = 1098	771 bits (389)	425/436 (97%)	Voytek, M. A. 1996
	AY123794	<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	753 bits (380)	423/436 (97%)	Purkhold <i>et al.</i> , 2003

注：最近縁の配列が単離株でない場合(Uncultured の場合)には、最近縁の単離株の配列情報をあわせて記した。

本表に記した文献は、巻末の参考文献一覧には記載していない。



001 図 5.3 γ -AOB をターゲットとする CTO プライマーセットを用いた PCR-DGGE 法の結果切り出されたバンドの系統樹 (*E. coli* をアウトグループにした)
 本研究で得られたバンド由来の配列は で囲った。また、 γ -AOB と表示された以外の cluster は γ -AOB に属するものである。

5.3 全細菌を対象とする 16SrRNA 全長 (27F-1492R) プライマーセットを用いたクローニングによる解析

16SrRNA のほぼ全長(27F-1492R)を対象として PCR を行い、その産物に対してクローニングを行った。109 個のコロニー(clone)を得、その内 92 個のコロニー(clone)内に全長配列が組み込まれていることを確認した。その中から -AOB の存在を確認するため、CTO プライマーセットを用いた colony PCR を行い、その PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行った。その結果、92 個の内 2 個のクローン (c-76、c-101) に対してバンドが検出された。そこで、そのクローンの CTO 領域 (CTO プライマーセットで挟まれた領域) のシーケンシングを行った。解読した塩基配列は相同性検索プログラム BLAST(WU-BLAST2, DNA Data Bank of Japan[DDBJ] <http://www.blast.genome.ad.jp>)を使用して、最も近縁な配列を検索した。その結果は表 5.2 に示した。

表 5.2 より、クローン c-76 と c-101 の最近縁種(単離されたものに限る)は共に *Nitrosomonas sp.* Nm143 (AY123794) であった。この株は前項の PCR-DGGE 法を用いた解析の結果得られたバンド B5,B6,B7 の最近縁種候補と同じであった。クローン c-76,c-101 の CTO 領域の配列はこのバンド B5,B6,B7 と 100%の相同性を示した。

全細菌を対象としたクローニングの結果得られた 72 個のクローンのうち 2 つのクローンが -AOB で、しかも CTO 領域では同じ配列を持つことから、ミニプラント内では塩基配列を持つ -AOB (*Nitrosomonas sp.* Nm143 (AY123794) 近縁種) が優占している可能性があることが示唆された。

表 5.2 クローニング法により得られた -AOB の可能性が高いクローンの最近縁種

Clone name	Accession#	Name(closest sequence)	Score	Identities	Reference
c-76	AF527025	Uncultured <i>Nitrosomonas sp.</i> 55Fb 16S ribosomalRNA gene, partial sequence.	829 bits (418)	445/454 (98%)	Rowan <i>et al.</i> , 2002
	AY123794	<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm143 16S ribosomal RNA gene,partial sequence.	805 bits (406)	442/454 (97%)	Purkhold <i>et al.</i> , 2003
	AF338202	Marine bacterium C-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	823 bits (415)	444/454 (97%)	Voytek <i>et al.</i> , 1996
c-101	AY123794	<i>Nitrosomonas sp.</i> Nm143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	797 bits (402)	441/454 (97%)	Purkhold <i>et al.</i> , 2003

注：最近縁の配列が単離株でない場合(Uncultured の場合)には、最近縁の単離株の配列情報をあわせて記した。また、本表に記した文献は、巻末の参考文献一覧には記載していない。

5.4 AOB プローブの検討

ミニプラント中の AOB に関するさらなる知見をえるため、FISH 法を用いた NOB と AOB の空間分布解析を行った。結果は項目 4.7 で示した。

ここでは、FISH 法を用いるために行ったプローブの検討について述べる。

5.4.1 データベースを用いた AOB プローブの検討

FISH 法を用いた AOB の研究は活発に行われているため(Wagner *et al.*, 1995, Mobarry *et al.*, 1996, Schramm *et al.*, 1998)、様々なプローブが開発されている。本研究では、より幅広く -AOB を検出するために、ほとんどの -AOB を捕らえるといわれている Nso1225 と、本研究の DGGE 法(項目 5.1, 5.2)を用いた解析の結果、ミニプラントの活性汚泥サンプルから得られた塩基配列の近縁種は海洋細菌であり、halophilic、halotolerant な *Nitrosomonas* 属に属しているものだったので、halophilic と halotolerant *Nitrosomonas spp.*を検出する NEU プローブを利用することにした。また、クローニング法(項目 5.3)により得られたクローンの塩基配列と NEU プローブの配列を比較したところ、NEU の塩基配列 18 塩基に対して 1 ミスマッチで相同性を示した。

5.4.2 Nso1225 プローブと NEU プローブを用いた FISH 法による検出の確認

5.4.2.1 Nso1225 プローブと NEU プローブの蛍光シグナル検出の確認

まず、二つのプローブについて、それぞれ蛍光シグナルが検出できるかを、RUN7 の 2003/9/9 のサンプルを用いて FISH を行い確認した。この時、-AOB プローブ(蛍光色素: Cy3) プローブの対比染色として EUB プローブ(蛍光色素: FITC) と同時染色を行い、細菌以外を染色しないことも確認した。この結果、NEU プローブでは強い蛍光シグナルが検出されたが、Nso1225 プローブの蛍光シグナルは弱く、検出されているかを判断するのが難しかった。

5.4.2.2 Nso1225 プローブと NEU プローブの性質の確認

Nso1225 プローブは幅広く -AOB を捕らえ、NEU プローブは Nso1225 プローブで検出できる範囲の中の一部を特異的にとらえるとされている。そこで、ここでは、この二つのプローブを同時に用いて FISH を行い、上記の性質を示すかを確認した。確認を行うにあたり、それぞれ別の蛍光標識(Cy3, FITC)を用いて、Nso1225 と NEU の両ハイブリダイズ条件(ホルムアルデヒド 35% と 40%)で同時にハイブリダズさせた。蛍光標識は NEU プローブが Cy3 の時は Nso1225 は FITC を用い、また逆の蛍光標識の組み合わせについても検討を行った。

この結果、どちらの組み合わせを用いても、NEU プローブの方が強い蛍光シグナルを示した。さらに一部の *Nitrosomonas* を捉える NEU プローブで蛍光シグナルが検出できるサンプルはほとんどの -AOB を捕らえる Nso1225 プローブでも検出されるべきであるにもかかわらず、蛍光が検出されないという問題が起こった。このような問題は小沼(小沼 1998)も報告している。小沼は、ほとんどの -AOB を検出できるはずの Nso190 プローブが蛍光シグナルを発しないという問題を解決する為、FISH 法で十分な蛍光をもつ集積培養系から得られたサンプルと、アン

モニア酸化細菌以外の細菌で、プローブと2ミスマッチで結合する可能性のある非ターゲット細菌に対してホルムアミド濃度を変化させて FISH 法で検出実験を行い、再最適化を行った(小沼 1998)。この結果、再最適化に成功した。なお、本研究では、二つのプローブを比較した結果より多くの菌を捉えることが出来たことから、項目 4.6 での検討は AOB の標識のために NEU プローブを用いた。

5.5 まとめ

本章では、安水処理プロセスにおいて硝化を担ったアンモニア酸化細菌の知見を得ることを目的として研究を行った。以下に、本章で得られた結果についてまとめる。

5.1 の PCR-DGGE 法により、ミニプラント内の γ -AOB の群集構造は極めて単純であることが示唆された。

5.1 の PCR-DGGE 法により、ミニプラント流入水中のチオシアンの有無と関係していると思われるバンドとして B1 が、亜硝酸酸化とかかわりが示唆される B4 が見つかったが、ミニプラント内の亜硝酸、硝酸蓄積と挙動が完全に一致するようなバンドは観察されなかった。このことから AOB はミニプラントの亜硝酸・硝酸の蓄積に大きな影響を与えているわけではないことが示唆された。

5.2 においてミニプラントから検出された γ -AOB 群は、海洋細菌由来の株が近縁種であることがわかった。

5.3 のクローニング法により、ミニプラント内の γ -AOB は、*Nitrosomonas sp.* Nm143 (AY123794) 近縁種が優占している可能性があることが示唆された。

5.4 において、ミニプラント内の AOB の解析には NEU プローブをもちいることが最適であることが確認できた。

第 6 章 総括

6.1 研究の結論

本研究では人工安水処理するミニプラントの硝化を担う硝化細菌を明らかにすることと、亜硝酸酸化細菌の挙動に着目し、亜硝酸蓄積型硝化の原因について知見を得ることを目的として研究を行った。

人工安水処理するミニプラント中の主要な亜硝酸酸化細菌として *Nitrobacter* 属が候補に上がった。定量を行うために *Nitrobacter* 属標的とした QP-PCR 法を開発し、*Nitrobacter* 属の挙動解析に適用することが出来た。この挙動解析の結果、チオ硫酸が *Nitrobacter* 属の増殖に阻害的な作用を持っていることが示唆された。また、RUN7 は *Nitrobacter* 属が亜硝酸酸化が主として担っている可能性があるが、RUN5 では *Nitrobacter* 属以外の NOB が亜硝酸酸化を主として担っていることが示唆された。実験の結果を用いて *Nitrobacter* 属の比亜硝酸酸化速度を計算し、文献を用いて算出した亜硝酸酸化細菌の比亜硝酸酸化速度の推定値と比較した結果、RUN7 における亜硝酸酸化は *Nitrobacter* 属でほぼ説明ができることがわかった。一方、RUN5 における亜硝酸酸化は *Nitrobacter* 属では説明できず、他の NOB が関与していることが示唆された。

また、フロック中の *Nitrobacter* 属はクラスターを形成せず互いに離れて存在している傾向があるのに対し、 γ -AOB はクラスターを形成しており、既知の研究で報告されているとおりだった。しかし、知見とは異なり、両グループが近接して存在してはいることが確認された。

また、人工安水処理するミニプラント内の γ -AOB の群集構造は極めて単純であることが示唆された。さらにこの系から DGGE 法やクローニング法により検出された γ -AOB 群は、海洋細菌由来の株が近縁種であることがわかった。特に、*Nitrosomonas sp.* Nm143 (AY123794) 近縁種が優占している可能性があることが示唆された。また、ミニプラント流入水中のチオシアンの有無と関係しているような挙動がみられるバンドは見つかったが、ミニプラント内の亜硝酸、硝酸蓄積と挙動が完全に一致するようなバンドは観察されなかった。よって、AOB はミニプラントの亜硝酸・硝酸蓄積に大きな影響を与えているわけではないと考えられる。また、ミニプラント内の AOB の解析には NEU プローブをもちいることが最適であることが確認できた。

6.2 今後の展望

本研究では、人工安水処理するミニプラント内で海洋細菌由来の近縁種がアンモニア酸化を担っており、また、*Nitrobacter* 属が優占的に存在していることが示唆された。また、ミニプラントの運転状況と一致するような挙動を示すアンモニア酸化細菌は検出されなかった。*Nitrobacter* 属は亜硝酸が蓄積している際には減少し、硝酸が蓄積している期間に増加するという挙動を示すことが明らかになった。特に、RUN7 における亜硝酸酸化はほぼ *Nitrobacter* 属によるものだと説明できることがわかった。

一方 RUN5 における亜硝酸酸化は *Nitrobacter* 属では説明することが出来ず、他の NOB が関与していることが示唆されたが、その NOB の特定までには至らなかった。亜硝酸蓄積型硝化が観察された RUN5 に置ける亜硝酸酸化を担う NOB の解明は、亜硝酸蓄積型硝化脱窒プロセスを制御するための知見として重要なものである。RUN5 における亜硝酸硝化をになう NOB のさらなる研究が必要だと考えられる。

また、チオ硫酸が *Nitrobacter* 属の増殖に阻害的な作用を持っていることが示唆された。しかし、チオ硫酸が *Nitrobacter* 属の増殖を阻害するのかを培養実験などで確認するまでには至らなかった。チオ硫酸が流入水から除かれた際に亜硝酸の蓄積を示すことから、チオ硫酸は、亜硝酸蓄積型硝化脱窒プロセスに制御の面で大きな役割を担っていると考えられ、この物質の NOB への影響の究明は重要であると考えられる。

謝辞

修士課程の2年間の結果を本修士論文にまとめるにあたり、様々な方々からご指導、助言を頂くことが出来たことに対してこの場を借りて御礼申し上げたいと思います。

指導教官である味埜俊先生には、以前から興味があった微生物と環境という二つのキーワードを併せ持つ研究をさせて頂ける機会を下さいました。また、ご多忙にも関わらず、どのような時でも個人ミーティングをして下さり、ご指導、助言をして下さったことを大変感謝しております。

佐藤弘泰先生には、本修士論文をまとめるにあたり、お忙しい中、毎日のようにミーティングを開いて下さり、一つ一つの問題を一緒に解決して頂きました。本修士論文の完成度を高められたのは、先生の助言、指摘、鋭いコメントのおかげです。本当に有難うございました。小貫元治先生には、研究会や個人ミーティング等、様々な場所、機会に助言を頂き感謝しております。片山浩之先生には研究会、グループミーティング等でお世話になりました。有難うございました。また、鯉淵幸生先生には、本修士論文の副査を引き受けて下さったことを感謝します。また、新日本製鐵所の三木理さん、伊藤公夫さんには、共同研究において、サンプル、プラント情報を提供していただき、また、興味深い研究を行う機会を与えてくださったことに大変感謝しております。

また、本研究の結果の大部分は工学部9号館の実験室にて得られたものです。このような結果を得るまでに、9号館のメンバーの皆様には大変お世話になりました。博士3年の春日郁郎さん、真砂佳史さん、道中敦子さんには、研究の技術的な指導、助言、実験を行うたびに出てくる様々な疑問点、問題点に対して、時間を割いて相談にのっていただき、また、親切かつ丁寧に教えていただきました。皆さんのおかげで、様々な技術的問題を解決することが出来、本研究を進めることが出来ました。また、皆さんの研究に対する真面目な姿勢は、自分も頑張らなければと再確認させてくれるとても良い刺激になりました。本当に有難うございました。また、Tawan Limpiyakorn さんには、同じ硝化細菌をターゲットにしていたこともあり、様々な情報の提供、更にはサンプルの提供までして下さったことを感謝いたします。9号館の皆様と一緒に研究生活を送ることが出来て大変うれしく思います。有難うございました。

新田見匡さん(現横浜国立大学助手)には、新日鐵との共同研究のメンバーとして、在学中も卒業後も、新日鐵のサンプルやデータ、その他様々な疑問点や問題が起こったときに相談にのって下さり、助言、指導をして頂きました。研究を進める上でとても心強く感じておりました。有難うございました。また、Bijan Gurung さんには、共同研究のメンバーとして相談にのって下さり感謝しております。

原本英司さんにはABI7000の使い方の指導をして下さったことを感謝いたします。

また、本研究室M2の荒生遵君、大江華さん、上條絵美子さん、木塚健太君には研究を超えて公私にわたり相談に乗って頂き、大変感謝しております。アットホームな雰囲気のある味埜研究室、都市工の皆様と一緒に研究が出来たことを感謝いたします。

最後に、どのようなときでも温かく見守り支えてくれた両親、相談にのってくれた弟に心から感謝の意を表します。

2005年1月31日 高崎 由紀

参考文献

(English Paper)

Aakra, A., J. B. Utaaker, and Nes, I. F. 2001. Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria FEMS Microbiol. Lett. 205:237–242.

Amann, R.I., David, L.K., and Stahl, A. 1990. Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. J. bacterial. 171:762-770.

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbial Reviews. 59:143-169.

Bano, N. and Hollibaugh, J.T. 2000. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in the arctic ocean. Appl. Environ. Microbiol. 66:1960–1969.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., Wheeler, D.L. 2000. GenBank. Nucleic Acids Res. 28:15-18.

Berthe, T., J. Garnier, and Petit, F. 1999. Quantification of nitrifying bacteria of the genus *Nitrobacter* in an aquatic system (Seine estuary, France) Science. 322:517–526.

Bock, E., Koops, H.P. and Harms, H. 1989. Nitrifying bacteria, p. 80-96. In H.G. Schlegel and B. Bowien (ed.), Autotrophic bacteria. Science Tech Publishers, Madison, Wis.

Bock, E., Koops, H. P., Harms, H. and Ahlers, B. 1991. The biochemistry of nitrifying organisms. In: Variations of Autotrophic Life (Shivelym J. M., Ed.), pp. 171-200. Academic Press, London.

Bock, E., and Koops, H.P. 1992. The genus *nitrobacter* and related genera In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (Eds.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag New York, NY vol. 3, pp. 2302–2309

Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R. and D, Zart. 1996. Verfahren zur biologischen Umsetzung von in Wasser gelostem Ammonium unter Verwendung ammoniak-oxidierender Bakterien.

Az.: De 196 17 331.0-41.

Boon, N., Top, E.M., Verstraete, W., and Siciliano, S.D. 2002. Bioaugmentation as a Tool to Protect the Structure and Function of an Activated-Sludge Microbial Community against a 3-Chloroaniline Shock Load. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1511-1520.

Burrell, P. C., J. Keller, and L. L. Blackall; 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1878–1883

Burrell, P., J. Keller, and Blackall, L. L. 1999. Characterisation of the bacterial consortium involved in nitrite oxidation in activated sludge *Water Sci. Technol.* 39:45–52

Daims, Holger., Nielsen, J. L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.K., and Wagner, M. 2001. *In Situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5273-5284.

Degrange, V., and Bardin, R. 1995. Detection and Counting of *Nitrobacter* Populations in Soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2093-2098

Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G., and Sayler, G. S. 2002. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira spp.* from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR *Appl. Environ. Microbiol.* 68:245–253

Dionisi, H.M., Harms, G., Layton, A.C., Gregory, I.R., Parker, J., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., and Sayler, G.S. 2003 Power Analysis for Real-Time PCR Quantification of Genes in Activated Sludge and Analysis of the Variability Introduced by DNA Extraction. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6597-6604.

van Dongen, U., Jetten, M. S. M. and van Loosdrecht, M. C. M. 2001. The SHARON((R)) - Anammox((R)) process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci. Technol.* 44:153-160.

Egli, K., Langer, C., Siegrist, H.R., Zehnder, A.J.B., Wagner, M., and Jan Roelof van der Meer. 2003. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3213-3222.

Ehrlich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig, and E. Bock; 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship Arch. Microbiol. 164:16–23

Feray, C., B. Volat, V. Degrange, A. Clays-Josserand, and B. Montuelle; 1999. Assessment of three methods for detection and quantification of nitrite-oxidizing bacteria and nitrobacter in freshwater sediments Microb. Ecol. 37:208–217

Gallert, C., and Winter, J. Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems.
<http://media.wiley.com/product-data/excerpt/58/35273058/3527305858.pdf>

Van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M. and Kuenen, J. G. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. Microbiology UK 142:2187-2196.

Grundmann, G. L., M. Neyra, and P. Normand. 2000. High-resolution phylogenetic analysis of NO₂⁻-oxidizing *Nitrobacter* species using the *rrs-rrl* IGS sequence and *rrl* genes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1893-1898

Grundmann, G. L., and Normand, P. 2000. Microscale Diversity of the Genus *Nitrobacter* in Soil on the Basis of Analysis of Genes Encoding rRNA
Appl. Envir. Microbiol. 66: 4543-4546.

Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Greogry, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., and Sayler, G.S. 2003. Environ. Sci. Technol. 37: 343-351

Head, I. M., W. D. Hiorns, T. M. Embley, A. J. McCarthy, and J. R. Saunders. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences J. Gen. Microbiol. 139:1147–1153

Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. 1998. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. Water Sci. Technol. 37:135-142.

Henze, M., Gujer, M., Mino, T., and Loosdrecht, M.V. 2000 Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2D, and ASM3. IWA Publishing. England:London.

Hermansson, A., and P. E. Lindgren. 2001 . Quantification of ammonia-oxidizing bacteria

- in arable soil by real-time PCR *Appl. Environ. Microbiol.* 67:972–976
- Ivanova, I. A., J. R. Stephen, Y. J. Chang, J. Bruggemann, P. E. Long, J. P. McKinley, G. A. Kowalchuk, D. C. White, and S. J. Macnaughton. 2000 . A survey of 16S rRNA and amoA genes related to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria of the beta-subdivision of the class Proteobacteria in contaminated groundwater *Can. J. Microbiol.* 46:1012–1020
- Josserand, A., and Cleyet-Marel, J.C. 1979 Isolation from soil of *Nitrobacter* and evidence for novel serotype using immunofluorescence. *Microb. Ecol.* 5:197-205
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H. P. Koops, and M. Wagner. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira-like* bacteria as dominant populations *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3042–3051
- Juretschko S. 2000. Mikrobielle Populationsstruktur und -dynamik in einer nitrifizierenden/denitrifizierenden Belebtschlammanlage. Doctoral thesis (Technische Universität München)
- Kirstein, K., and E. Bock. 1993. Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases *Arch. Microbiol.* 160:447–453
- Klotz, M. G., and J. M. Norton. 1995 Sequence of an ammonia monooxygenase subunit A-encoding gene from *Nitrospira sp. NpAV* *Gene* , vol. 163:159–160
- Koops, H.-P., and A. Pommerening-Röser. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species *FEMS Microbiol. Ecol.* 37:1–9
- Koops, H.P. Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Timmermann, G., and Wagner, M. 2003. “The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria” *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- Kowalchuk, G. A., J. R. Stephen, W. De Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley, and J. W. Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1489–1497

Kowalchuk, G. A., Z. S. Naoumenko, P. J. L. Derikx, A. Felske, J. R. Stephen, and H. J. Laanbroek. 1998. Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27:339–350

Kowalchuk, G. A., A. W. Stienstra, G. H. Heilig, J. R. Stephen, and J. W. Woldendorp. 2000a. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ. Microbiol.* 2:99–110

Kowalchuk, G. A., A. W. Stienstra, G. H. Heilig, J. R. Stephen, and J. W. Woldendorp. 2000b. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:207–215

Kowalchuk, G. A., and J. R. Stephen ; 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55:485–529

Kuai, L. and Verstraete, W. 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4500-4506.

Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaru, T., Kamagata, Y., and Kurane, R. 2001. Fluorescent Quenching-based Quantitative Detection of Specific DNA/RNA BODIPY® FL-labeled Probe or Primer, *Nucleic Acids Research*, 29: e34.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S/ rRNA sequencing, p.115-147. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Academic Press, Chichester, England.

Limpiyakorn, Tawan. 2004. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria Populations in Activated Sludge Processes of Sewage Treatment Plants and Assessment of Process Variables Affecting Their Performance. Doctor Thesis, the University of Tokyo, Department of Urban Engineering.

Luxmy et al., 2000. B.S. Luxmy, F. Nakajima and K. Yamamoto, Analysis of bacterial community in membrane-separation bioreactors by fluorescent in situ hybridization (FISH) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) techniques. *Water Sci. Technol.* 41 10–11 (2000), pp. 259–268

McTavish, H., J. A. Fuchs, and A. B. Hooper. 1993. Sequence of the gene coding for

ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* J. Bacteriol. , 175 :2436–2444

Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria [published erratum appears in Appl. Environ. Microbiol.(1997), 63(2), p. 815] Appl. Environ. Microbiol. 62:2156–2162

Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., Hellinga, C. and van Kempen, R. 2001. Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. Water Sci. Tech. 43:127-134.

Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59:695-700.

Navarro, E., M. P. Fernandez, P. Normand, and R. Bardin. 1992. Genomic heterogeneity of the genus *Nitrobacter*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:554-560

Nicolaisen, M. H., and N. B. Ramsing. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria J. Microbiol. Meth. 50:189–203

Okabe, S., H. Satoh, and Y. Watanabe. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes Appl. Environ. Microbiol. 65:3182–3191

Okano, Y., Hristova, K.R. Leutenegger, C.M., Jackson, L.E., Denison, R.F. Gebreyesus, B., Lebauer, D., and Scow, K.M. 2004 Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil Appl. Envir. Microbiol. 2004 70: 1008-1016.

Olsen, G.J., Woese, C.R. & Overbeek, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. 1994. J. Bacteriol. 176:1-6.

Orso, S., M. Gouy, E. Navarro, and P. Normand; 1994. Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:83–86

Pommerening-Röser, A., G. Rath, and H.-P. Koops. 1996. Phylogenetic diversity within the

genus Nitrosomonas. Syst. Appl. Microbiol. 19:344–351

Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H.-P. Koops, and M. Wagner ; 2000 . Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys Appl. Environ. Microbiol. 66:5368–5382

Schmidt, E.L. 1978 Nitrifying microorganisms and their methodology, p. 288-291. In D. Schlessinger (ed.), Microbiology –1978. American Society for Microbiology, Washington, D.C

Schmidt, I., Hermelink, C., van de Pas-Schoonen, K., Strous, M., op den Camp, H. J., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M. 2002. Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NO_x) by two different lithotrophs. Appl. Environ. Microbiol. 68:5351-5357.

Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. and Strous, M. 2003. New concept of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. FEMS Microbiol. Rev. 27:481-492.

Schramm A., De Beer D., Wagner M. and Amann R. 1998. Identification and activities in situ of Nitrospira and Nitrospira spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3480-3485

Seviour, R.J. and Blackall, L.L. 1999 The Microbiology of Activated Sludge. Kluwer Academic Publishers.

Sorokin, D. Y., G. Muyzer, T. Brinkhoff, J. G. Kuenen, and M. S. Jetten; 1998. Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic Nitrobacter species, *N. alkalicus* sp. nov. Arch. Microbiol., 170:345–352

Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849.

Suwa, Y., T. Sumino, and K. Noto. 1997. Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate J. Gen. Appl. Microbiol. 43:373–379

Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, T. S., B. E. Rittmann, and D. A. Stahl. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria J. Bacteriol. 176:

Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H.-P. Koops, and K.-H. Schleifer. 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:251–264

Wagner M., Rath G., Koops H.P., Flood J. and Amann R. 1996. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat Sci Tech.* 34: 237-244

Watson, S. W., and J. B. Waterbury. 1971. Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. *Arch. Mikrobiol.* 77:203–230

Watson, S. W., F. W. Valois, and J. B. Waterbury. 1981. *The family Nitrobacteraceae*. In: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel (Eds.) *The Prokaryotes*. Springer-Verlag New York, NY vol. 1, pp. 1005–1022

Wheeler, D.L., Chappey, C., Lash, A.E., Leipe, D.D., Madden, T.L., Schuler, G.D., Tatusova, T.A., Rapp, B.A. 2000. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 28:10-4

Woese, C.R. 1987 Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271 .

(日本語文献)

赤司昭 (2004) 亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 (norB) の PCR による検出、第 38 回日本水環境学会年会講演集、381 .

石井浩介、中川達功、福井学 (2000) 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

大森俊雄、野尻秀昭、堀之内正枝、春日和 (2000) 環境微生物学 - 環境バイオテクノロジー - 、昭晃堂、東京.

小沼晋 (1998) 分子生物学的手法を中心としたアンモニア酸化細菌定量手法の実用性評価、東京大学大学院工学系研究科博士論文

タカラバイオ株式会社 2003 SYBR® Green I を用いたリアルタイム PCR の条件検討、 BIO VIEW #44 http://www.takara-bio.co.jp/goods/bioview/pdfs/44/44_52-55.pdf

タカラバイオ株式会社 リアルタイム PCR 実験のためのガイドライン-プライマー設計について-
<http://www.takara-bio.co.jp/prt/h1-3b.htm>

中村和憲 (1998) 環境と微生物 - 環境浄化と微生物生存のメカニズム - 、産業図書株式会社

新田見匡 (2003) 亜硝酸還元酵素遺伝子に着目した脱窒細菌解析手法の確率及びその活性汚泥微生物群集解析への適用、東京大学大学院新領域創成科学研究科博士論文

野田尚宏、平田 彰、常田 聡、稲森悠平、生田 創 (1999) 蛍光抗体法による生体膜内硝化細菌の検出・定量化手法の開発、第 33 回日本水環境学会年会講演集、326

平石明 (1996) 微生物の多様性と系統分類、水環境学会誌、19、250-256.

藤田賢二 (1988) 下水道工学演習 - 最新土木工学演習集成 - 、学献社

真木寿治 (1999) 改訂 PCR Tips - 可能性を広げるコツとヒント - 、秀潤社

J.D. ワトソン (2003) DNA、講談社