

生物学的窒素除去プロセスの高度化のための 硝化細菌の分子生物学的解析

えびえよしたか みうらひでとも のだなおひろ まつむらまさとし ひらたあきら つねださとし いなもりゆうへい
○蛭江美孝¹, 三浦英智², 野田尚宏², 松村正利¹, 平田彰², 常田聡², 稲森悠平³

1. 筑波大学, 2. 早稲田大学, 3. 国立環境研究所

【目的】 廃水からの窒素除去には主に生物学的プロセスが用いられるが、アンモニアから亜硝酸への酸化は一連の窒素除去プロセスにおいて律速段階となっているため、プロセスの高度・安定化のためにはアンモニア酸化を担う細菌群の生理活性を含めた微生物生態学的な解析が極めて重要であると考えられる。近年普及している16S rDNA, rRNA等に基づいた微生物解析手法は培養を必要としないため、独立栄養硝化細菌のような増殖速度の遅い細菌でも迅速に解析することが可能であるが、アンモニア酸化活性のような特定の生理活性を評価することは困難である。本研究では上記の点を鑑み、RT-PCR法を用いてアンモニア酸化細菌のammonia monooxygenase (AMO) のサブユニットをコードするmRNA (*amoA*) を検出・定量化するとともに、RT-PCR産物についてDGGE法を行うことにより、アンモニア酸化活性に基づいた群集構造解析を行った。

【方法】 *Nitrosomonas europaea* (IFO14298), 高濃度アンモニア含有無機性廃水 (500mg-NH₄-N・L⁻¹) を処理するベンチスケールリアクター内の汚泥, 高度合併処理浄化槽内の汚泥およびこの浄化槽汚泥をアンモニア含有無機性培地 (150mg-NH₄-N・L⁻¹) で短期間培養した汚泥からAGPC法によって全RNAを抽出した後, *amoA* 1F, 2R primer set (Rotthauwe, J.-H., et al, 1977) を用いてRT-PCRを行った。Competitive RT-PCRは, Competitive DNA Construction Kit (TaKaRa) および Competitor RNA Transcription Kit (TaKaRa) を用いて合成したRNA CompetitorをRT反応前に段階希釈して添加し, 電気泳動後, 分離したtargetとCompetitorのバンドの濃度を比較・解析した。さらにRT-PCR産物を鋳型として*amoA* 1F-gc, 2R primer setで再増幅し, 変性剤濃度勾配20-50%のゲル上で電気泳動を行った。

【結果と考察】 *N.europaea*の純粋培養液および無機性廃水処理槽内の汚泥についてCompetitive RT-PCRを行った結果, *amoA*の存在量は前者は 2.3×10^8 copies・mL⁻¹, 後者では 5.1×10^8 copies・mg-SS⁻¹であった。一方, 浄化槽汚泥からは*amoA*が検出できなかったが, この汚泥を短期間培養し, *amoA*の発現を促すことによって検出が可能となった。またDGGE法により*amoA*に基づく群集構造解析を行った結果, 浄化槽内の汚泥は無機性廃水処理槽内の汚泥よりもDGGEバンドパターンが多様であり, より複雑なアンモニア酸化細菌群が酸化活性を担っていることが示唆された。

【参考文献】 Rotthauwe, J.-H., et al, 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4704-4712