

硫黄脱窒細菌の微生物群集構造解析と処理特性の評価

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

学生会員 ○清水 桂*

正会員 長谷川 聖* 花木 啓祐*

秩父農林振興センター農業振興部

非会員 根岸 勉**

1. 目的

畑地での過剰施肥による窒素肥料の流出によって、水道水源である地下水汚染が引き起こされる。そのため発生現場やその付近で未然に流出を防ぐ必要がある。有機物濃度の低い発生源において、硝酸態窒素除去処理として硫黄脱窒が注目されており、現場で試行されるようになってきた。しかしながら実際どのような微生物によって硝酸態窒素除去が行われているかは明らかにされていない。本研究では、試行現場において微生物群集構造を把握すると同時に、現場における微生物がどのような役割をしているのかを把握することを目的として検討を行った。

2. 実験方法

2.1 対象現場

埼玉県深谷市で、2001年11月から2月にかけて調査を実施した。現場では、バラ栽培所排水を12mの水路(鋼製、内幅33.5cm、高さ25cm)に、150~350ml/minで導水している。水路には、0~10mでは硫黄-CaCO₃顆粒(SC11、ニッチツ)を、10~12mにはゼオライトを充填している。水路上部には、空気孔のあいた蓋がされ、雨水の影響を避けるために透明のビニルシートかぶされている。

2.2 サンプル採取方法及び測定方法

水質項目の分析は、サンプルを現場においてDISMIC(0.45μm、Advantec)で濾過し、NO₃⁻、NO₂⁻、SO₄²⁻の測定は、キャピラリー電気泳動(CIA クウォンタ 4000、Waters)で、TOCの測定は全有機炭素計(TOC-500、Shimadzu)にて測定した。

2.3 微生物相解析手法

対象現場の硫黄-CaCO₃顆粒数粒を採取して用いた。また2月の硫黄-CaCO₃顆粒については、特異的な条件培地(Table.1)を1L試薬瓶にいれ、硫黄顆粒を28℃で培養し、1週間毎に採取した。培養中、条件Aについては、NO₃⁻濃度がなくならないように2、4、12日目に濃度0.2g/mlのKNO₃溶液を50ml添加した。また、9日目には電子供与体である有機物を投入するために、濃度0.2g/mlのPeptone溶液を50ml添加した。条件Bについては、13、18日目に濃度0.2g/mlのKNO₃溶液を50ml添加した。条件は、Aでは従属栄養的脱窒細菌が、Bでは独立栄養的脱窒細菌が、Cでは硫黄酸化細菌が特化しやすいように設定した。

DNA抽出は採取顆粒を細かく砕いた後、Fast DNA Kit for soil(フナコシ)で行った。これは、ビーズによる物理破碎抽出法であり、蛋白除去工程を含む。

抽出したDNAを3領域を、全細菌をターゲットとするプライマー(F357GC、R518)で増殖し、このPCR産物を変性剤濃度勾配40~55%のゲルを用いてDGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)を行った(5h, 130V)。

DGGEバンドにおいて、特徴的なものに関しては、精製後塩基配列を解読し、既知種の中から最も相同性の高い塩基配列を検索し(BLAST, GenBank)、最近縁配列を求めた。

Table 1 特異的な培養条件について

	A	B	C
標的微生物	従属栄養性脱窒細菌	硫黄脱窒細菌	硫黄酸化細菌
酸素条件	無酸素	無酸素	好気
電子供与体	有機物 (Peptone) 元素硫黄*	チオ硫酸塩 元素硫黄*	チオ硫酸塩 元素硫黄*
電子受容体	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	O ₂
その他培養液組成	なし	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O, FeCl ₃ ·6H ₂ O, MnSO ₄ ·6H ₂ O, CaCl ₂ ·2H ₂ O	
追加試料	2,4,12日:KNO ₃ **2 9日:Peptone**3	13,18日 :KNO ₃ **2	なし

*1: 現場で使用している硫黄 CaCO₃顆粒をそのまま用いている

**2: 0.2g/ml, **3: 0.2g/ml

3. 結果および考察

3.1 現場水質調査

11月における水質調査結果をFig.1に示した。流入時の高濃度硝酸態窒素が、流下にともない除去され、11月(18.0℃)では0mgN/Lまで完全に除去された。4回の調査において温度が下がるにつれて除去量も減った。これより、硫黄脱窒能は温度による影響を受けることがわかった。11月のDOの変化は、流入では4.3mgO/Lあったが、5m付近より1.0mgO/L以下となった。pHは、どの場所でも6前後に保たれていた。TOCの値は、11月では2m、4m、5mで局所的に約20mgC/Lと高い値になっていたが、他の場所では8mgC/L前後の値であった。DO、pH、TOCは他の調査日でも同じような動向を示した。

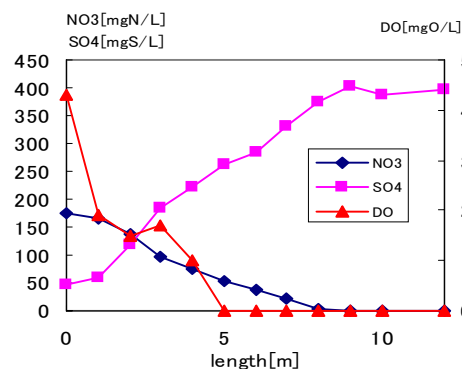


Fig.1 11月における長さ方向への水質変化

3.2 微生物相の変化

12m水路における長さ方向の微生物変化をFig.2に示した。特徴的なDGGEバンドを1~7とした。5m付近まではバンド1,2がともに観察されるが、6m以降はバンド2が薄くなっていった。バンド3、4は4m付近までは観察されていたが、

地下水汚染、硫黄脱窒、微生物群集構造解析、PCR-DGGE法、シーケンシング

*東京大学大学院工学系研究科 〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

**秩父農林振興センター農業振興部 〒368-0034 埼玉県秩父市日野田町 1-1-44

5m 以降は薄くなっていった。バンド 5、6 は、どの位置でもはっきりと表れているが、5m 付近まではバンド 6 が、5m 以降ではバンド 5 がより濃くなっていることが分かった。8m 以降ではそれまで表れていなかったバンド 7 が濃くなっていった。これは、水路設置の構造上、8m 以降では硫黄顆粒の湛水状態が不十分となっていることによる、酸素状態が変化したからと考えられる。このことより、それぞれの場所で存在種は大きく変化しないが、長さ方向での水質の変化により各種の存在度合いが変化することが分かった。

塩基配列の検索結果を Table 2 に示した。シーケンシングの結果、最も相同性の高かった配列は、バンド 1、2 は、緑色硫黄細菌の配列であった。緑色硫黄細菌は、嫌気的な状況で、硫黄を光エネルギーで酸化することで生育する独立栄養的光合成細菌である。バンド 4 は硫黄脱窒細菌の配列に近縁配列となった。バンド 3、5、6 は水田より単離された硫黄酸化細菌に、バンド 7 は炭素源に有機物も使える硫黄酸化細菌に近縁配列であった。しかし、これらの硫黄酸化細菌が硫黄脱窒を行えるかどうかは、分かっていない。

3.3 特異的条件培養による微生物相の変化

特異的な条件下で培養した際の、それぞれの条件における微生物相の変化を Fig.3 に示す。バンド 1、2 は条件 A、C ではうすくなるが条件 B では濃くなっていった。このことよりシーケンシング結果である緑色硫黄細菌が、裏付けられた。バンド 3、4、5 は、条件 A では 7 日目で薄くなり、条件 B、C では濃くなっていったので、独立栄養的硫黄酸化細菌であると考えられる。しかし、脱窒性の有無に関しては、今の段階では断定できない。バンド 6 は、条件 B で培養していくに従い、特に濃くなっていったことより、脱窒性を持つ独立栄養性硫黄脱窒細菌である可能性が高い。しかし条件 A においても濃くなっているため、有機物を炭素源として使える可能性も考えられる。硫黄顆粒の湛水状態が不十分となっている 8m 以降で観察されたバンド 7 が好気的条件下 C においても現れてくることより、脱窒性を持たない硫黄酸化細菌であるといえる。ことがわかった。

しかしながら、培養液中の増殖に必要な成分の減少により、増殖できずバンドが薄くなっている可能性も考えられるため、今後さらに検討する必要がある。

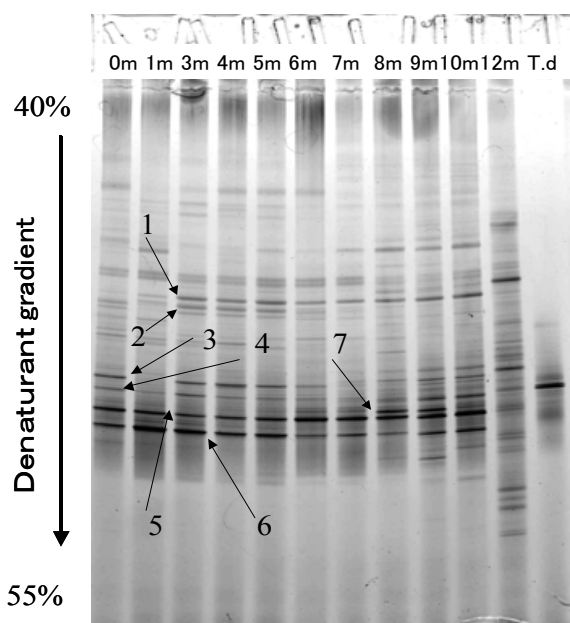


Fig.2 11 月におけるそれぞれの場所の微生物群集構造
T.d : *Thiobacillus denitrificans* の純菌株(ATCC23644)より同様の手法で DNA を抽出したサンプル

Table 2 シーケンシング解読によるバンドの最近縁種

Band	最近縁種	分類	相同性
1	Uncultured <i>bacterium</i>	Green sulfur bacteria	169/179 (94%)
2	Uncultured <i>bacterium</i>	Green sulfur bacteria	182/189 (96%)
3	Beta proteobacterium	Sulfur-oxidizing bacteria	191/194 (98%)
4	<i>Thiobacillus</i> <i>denitrificans</i>	Sulfur-denitrifier bacteria	187/195 (95%)
5	Beta proteobacterium	Sulfur-oxidizing bacteria	190/194 (97%)
6	Beta proteobacterium	Sulfur-oxidizing bacteria	190/194 (97%)
7	<i>Thiomonas</i> sp.	Sulfur-oxidizing bacteria	165/167 (98%)

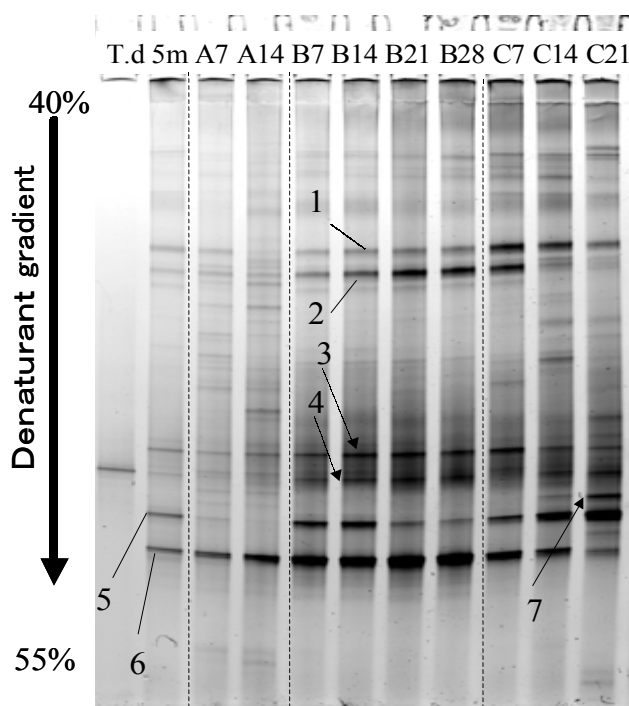


Fig.3 A,B,C 条件下での培養による微生物相の経時変化
5m : 2 月の硫黄顆粒より抽出した培養前のサンプル

4. まとめ

- 緑色硫黄細菌に最近縁配列であったバンド 1、2 と、硫黄酸化細菌に最近縁配列であったバンド 3~6 は、ともに硫黄を電子供与体とするため、硫黄に関して競合関係であることが分かった。
- 硫黄脱窒細菌である *Thiobacillus denitrificans* に最近縁配列であるバンド 4 は、硫黄脱窒細菌に最適な条件 B で培養しても増殖せず、他のバンド 6 が増殖したことより、バンド 6 はこの系で優先する硫黄脱窒細菌の可能性はある。
- バンド 7 は、水路においても湛水が不十分な状況となる 8m 以降と、好気的条件下 C で培養することによってバンドを観察することができることより、脱窒性を持たないと考えられる。