

# N<sub>2</sub>O 抑止を目的として硝化脱窒反応槽内に添加する脱窒細菌のモニタリング技術の開発

東北学院大学 工学部 学生会員 ○横山紗織

東北学院大学 工学部 山田剛史

東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介

東北学院大学 工学部 フェロー 遠藤銀朗

1. はじめに 二酸化炭素の 310 倍の温室効果を示す亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) は、ゴミの燃焼処理のような化学的な発生経路の他に、硝化・脱窒反応のような生物学的な過程を介しても発生する事が知られている。特に、産業廃水や家庭廃水などの窒素成分を処理する硝化・脱窒処理反応槽では、液滞留時間の影響、不適切な C/N 比を示す廃水の適用や溶存酸素濃度の影響などにより不十分な硝化・脱窒反応が引き起こされ、N<sub>2</sub>O が反応槽外へ放出される現象が顕著に報告されている<sup>1)</sup>。一般に、脱窒細菌の持つ亜酸化窒素還元酵素は、酸素によって不活化したり発現が制御されるため<sup>2)</sup>、間欠曝気硝化・脱窒反応槽のように酸素-無酸素環境が交互に形成される環境では、溶存酸素の影響によって亜酸化窒素還元酵素の失活や本酵素の生産が抑制され、N<sub>2</sub>O の生成を促進することが予想されている<sup>3)</sup>。良好な硝化・脱窒廃水処理の達成および脱窒反応起源の N<sub>2</sub>O の発生を抑止するためには、好気環境下でも脱窒能力を有する特殊微生物 TR2 株を反応槽内へ適切な条件時に投入 (バイオオーギュメンテーション) する微生物工学的な新規技術の開発が必要に思われる。

しかしながら、本技術を確立するためには、まず、(1) バイオオーギュメンテーションする TR2 株が反応槽内汚泥に定着することを評価可能な技術と、(2) 導入された特殊微生物 (TR2 株) の機能発現が行われていることを評価可能な技術の開発が必要である。そのため本研究では、本細菌の 16S rRNA 遺伝子、16S rRNA および *nosZ*-mRNA (亜酸化窒素還元酵素遺伝子から転写される mRNA) を標的としたリアルタイム PCR 法による定量的モニタリング技術の開発とその適用性について評価する事を目的とした。

そこで、まず本報では、(1) TR2 株の 16S rRNA 遺伝子に特異的な DNA プライマーを設計し、そのプライマーセットの特異性の評価とリアルタイム PCR 法の最適条件の検討を行った。その後、(2) 添加した特殊微生物の割合の変動 (16S rRNA 遺伝子コピーレベルにおいて) をモニタリングすることを目的として、16S rRNA 遺伝子を基に TR2 株をリアルタイム PCR 法で検出するための測定範囲の検討を行った。次に、(3) TR2 株の *nosZ* 遺伝子に特異的なプライマーセットを設計し、設計したプライマーの PCR における増幅の特異性および最適リアルタイム PCR 条件の検討を行った。その後、(4) *in vitro* で作成した TR2 株由来の 16S rRNA および *nosZ*-mRNA から cDNA を作成した後、RNA を基にした TR2 株の「定着」と「機能」を

評価する技術の可能性を検討したので報告する。

2. 実験方法 TR2 株の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを設計するため、本細菌の 16S rRNA 遺伝子 (16S rRNA 遺伝子の一部 (910 bp) は NCBI に登録されておりアクセッション番号は AB096261 である。) の全塩基配列の決定を行った。その後、ARB プログラム<sup>4)</sup> を用いて、得られた塩基配列に特異的なプライマーセットの設計を行った (表 1)。本細菌に対して分子系統学的に近縁な細菌を含む数種の微生物から DNA を抽出し、各微生物の全 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。増幅した TR2 株由来の PCR 産物は、希釈系列 (10<sup>6</sup>-10<sup>2</sup> コピー数) を作成した後、各微生物由来の PCR 産物 (10<sup>4</sup> コピー数) とともに設計したプライマーセットの特異性と最適リアルタイム PCR 反応条件の検討に用いた。

TR2 株の 16S rRNA 遺伝子を基にしたリアルタイム PCR 法の測定範囲は、TR2 株が存在しない汚泥から抽出した DNA に対して、純粋な TR2 株から抽出した DNA を 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 および 0.2 % の割合でそれぞれ DNA を混合し、その DNA を用いたリアルタイム PCR 法で評価した。上述した各微生物由来の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅産物は、T7 プロモーターを持つプラスミドに組み込み、大腸菌に形質転換してクローン化した。その後、各 16S rRNA 遺伝子を組み込んだプラスミドを利用して、各微生物由来の 16S rRNA を *in vitro* で合成した。合成した各 16S rRNA は、1492r プライマー (表 1) を用いた逆転写反応により cDNA にして後の解析に使用した。作製した TR2 株由来の cDNA は、希釈系列 (10<sup>6</sup>-10<sup>2</sup> コピー数) を作製した後、各微生物由来の cDNA (10<sup>4</sup> コピー数) とともに設計したプライマーセットの特異性と最適リアルタイム PCR 反応条件の検討に用いた。

TR2 株の *nosZ* 遺伝子 (非公開データ) に特異的なプライマーセットの作製は、公的なデータベース上に登録されている *nosZ* 遺伝子を取得し、TR2 株の *nosZ* 遺伝子の特異的に検出可能な領域を探索することで行った (表 1)。設計したプライマーセットの特異性およびその最適リアルタイム PCR 条件の検討は、数種の脱窒細菌由来の DNA を用いて行った。TR2 株由来の *nosZ*-mRNA を標的としたリアルタイム PCR 法の条件の検討をするために、まず上記で使用した脱窒細菌 TR2 株由来の DNA を利用し、上述した方法で RNA 合成を行った。その後、*nosZ*1MR プライマー (表 1) を用いて cDNA を作成した。最適リアルタイム PCR 反応条件の検討は、作製した TR2 株由来の

表 1 本研究で使した 16S rRNA 遺伝子および *nosZ* 遺伝子に特異的な DNA プライマー

| Primer name  | Target gene | Target group                              | Primer Sequence (5' to 3') | Primer length (mer) | Target site ( <i>E.coli</i> position) | Reference  |
|--------------|-------------|-------------------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------|
| 8f           | 16S rRNA    | Domain <i>Bacteria</i>                    | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG       | 20                  | 8-28                                  | 5          |
| 1492r        | 16S rRNA    | Domain <i>Bacteria</i> and <i>Archaea</i> | GGHTACCTTGTACGACTT         | 19                  | 1492-1503                             | 5          |
| EUB338f      | 16S rRNA    | Domain <i>Bacteria</i>                    | GCTGCCTCCGTTAGGAGT         | 18                  | 338-355                               | 6          |
| EUB338-If    | 16S rRNA    | Domain <i>Bacteria</i>                    | GCAGCCTCCCGTAGGAGT         | 18                  | 338-355                               | 7          |
| EUB338-IIIf  | 16S rRNA    | Domain <i>Bacteria</i>                    | GCAGCCACCCGTAGGTGT         | 18                  | 338-355                               | 7          |
| EUB338-IIIIf | 16S rRNA    | Domain <i>Bacteria</i>                    | GCTGCCACCCGTAGGTGT         | 18                  | 338-355                               | 7          |
| 907r         | 16S rRNA    | Domain <i>Bacteria</i>                    | CCGTC AATTCMTTTRAGTT       | 19                  | 907-926                               | 8          |
| pseu136f     | 16S rRNA    | strain TR2                                | TGATAGTGGGGACAACG          | 18                  | 136-154                               | this study |
| pseu598r     | 16S rRNA    | strain TR2                                | GGGGCTTTCACATTCAAC         | 18                  | 598-616                               | this study |
| TR2nosZF     | <i>nosZ</i> | strain TR2                                | AAGGTACCGGTGGTCGAT         | 18                  | 1172-1190                             | this study |
| TR2nosZR     | <i>nosZ</i> | strain TR2                                | TGCAGCGGGCCGGTAG           | 16                  | 1662-1678                             | this study |
| nosZ1F       | <i>nosZ</i> | almost all denitrifying bacteria          | WCSYTGTCMTGACAGCCA         | 20                  | 1184-1203                             | 9          |
| nosZ1MR      | <i>nosZ</i> | almost all denitrifying bacteria          | ATRTCGATCARCTGVKCRITTYTC   | 23                  | 1421-1443                             | this study |

cDNA の希釈系列 ( $10^6$ - $10^2$  コピー数) と各微生物由来の cDNA ( $10^4$  コピー数) を用いて行った。

**3. 実験結果と考察** ARB プログラムを用いて TR2 株の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットの設計を行った結果、TR2 株の 16S rRNA 遺伝子の一部の領域を PCR 増幅可能なプライマーセット (pseu136f および pseu598r, 表1) を設計する事が可能であった。分子系統学的に TR2 株に近縁な株を含む数種の株 (脱窒細菌を含む) を用いて、設計したプライマーセットの特異性の検討をリアルタイム PCR 法により行った。その結果、各プライマーセットは、TR2 株の 16S rRNA 遺伝子を実験的に検出することが可能であった。

硝化・脱窒反応槽内における添加した TR2 株の割合を定量的に評価するために、リアルタイム PCR 法の測定範囲の検討を行った。その結果、設計したプライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法は、硝化・脱窒反応槽内において 0.2-50 % の範囲で存在する TR2 株の定量的なモニタリングが可能であることを示した (図1)。

次に、ARB プログラムを用いて TR2 株の *nosZ* 遺伝子に特異的なプライマーセットの設計とリアルタイム PCR 法による特異性の検討を行ったところ、TR2 株の *nosZ* 遺伝子 (TR2nosZF および TR2nosZR: 約 500 bp) の一部の領域を実験的に増幅可能なプライマーセットの設計が可能であり、その最適リアル

タイム PCR 条件も決定することができた。さらに本研究では、硝化・脱窒反応槽内における TR2 株由来の 16S rRNA および *nosZ*-mRNA を標的としてリアルタイム PCR 法を適用することを想定して、まず合成した TR2 株由来の RNA (16S rRNA および *nosZ*-mRNA) から作製した cDNA を用いて、リアルタイム PCR 法の最適条件の検討を行った。その結果、以下の条件下において TR2 株の 16S rRNA (変性 95 °C, 5 秒, アニーリング 65 °C, 20 秒, 伸長 72 °C, 15 秒: 45 cycle) および *nosZ*-mRNA (変性: 95 °C, 5 秒, アニーリング: 68 °C, 20 秒, 伸長: 72 °C, 15 秒: 37 cycle) において、それぞれの RNA を標的とした定量的リアルタイム PCR 法は、 $10^2$  コピーまでの cDNA 数を有意に測定する事が可能であった。

これらの結果は、 $N_2O$  の発生抑止を目的として添加する TR2 株の反応槽内汚泥における「定着」と「機能」を本技術により定量的に評価することが可能であることを示唆していた。今後、本研究で開発した定量的モニタリング技術により、 $N_2O$  の発生抑止を目的として反応槽内に添加された TR2 株の「定着」と「機能」を実際に評価できるかを調査していく予定である。

**4. 謝辞** 本研究は、生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業 (異分野融合研究開発型) の助成を受けて行われた事を記し感謝の意を表します。

## 5. 参考文献

- 1) Zheng et al. (1994) *Wat. Sci. Tech.* **30**, p133-141
- 2) Ferguson (1994) *Antonie Leeuwenhoek* **66**, p89-110
- 3) Takaya et al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, p3125-3157
- 4) Ludwig et al. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, p1363-1371
- 5) Weisburg et al., (1991) *J. Bacteriol.* **173**, p697-703
- 6) Amann et. al. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, p1919-1925
- 7) Daims et. al. (1999) *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, p434-444
- 8) Stubner (2002) *FEMS Microbial. Ecol.* **50**, p155-164
- 9) Henry et al. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, p5181-5189

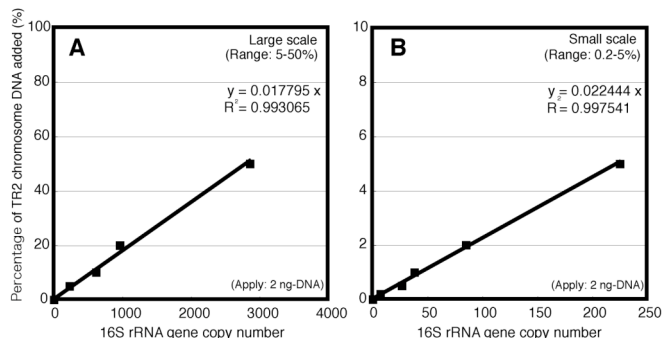


図 1 16S rRNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法による硝化・脱窒反応槽内に添加された TR2 株の測定範囲 (A: 5-50 %, B: 0.2-5 %) の検討。