

(62) Multiplex real-time PCR 法を用いた硫黄酸化細菌と硫酸塩還元細菌の同時定量

Simultaneous Quantification of Sulfur-Oxidizing Bacteria and Sulfate-Reducing Bacteria
by Multiplex Real-time PCR

川上周司*, 荒木信夫**, 山口隆司***, 角野晴彦†, 高橋優信††, 山崎慎一†††
井町寛之*, 大橋晶良*, 原田秀樹*

Shuji KAWAKAMI*, Nobuo ARAKI**, Takashi YAMAGUCHI***, Haruhiko SUMINO†,
Masanobu TAKAHASHI††, Shinichi YAMAZAKI†††, Hiroyuki IMACHI*, Akiyoshi OHASHI*
and Hideki HARADA*

Abstract ; Multiplex real-time PCR was applied to simultaneous quantification of sulfur-oxidizing bacteria and sulfate-reducing bacteria in a novel wastewater treatment system enhancing sulfur-redox cycle by a microbial community. Three approaches in real-time PCR, such as SYBR Green I intercalating dye, TaqMan probe and multiplex TaqMan probe (multiplex real-time PCR) were evaluated by PCR amplification efficiency with a serial dilution of 16S rRNA genes amplified from DNA extracted from *Thiobacillus thioparus* and *Desulfobulbus elongatus*. The PCR amplification efficiency of multiplex real-time PCR was found to be low in comparison to those of SYBR Green I and TaqMan probe in case of both bacteria. For application on sludge sample taken from an aerobic biofilter, cDNA, obtained by reverse transcription from total RNA, was used as real-time PCR templates. Changes in 16S rRNA level of *Thiobacillus* gen. and *Desulfobulbus* spp. groups determined by the three real-time PCR assays showed the same tendency during experimental period, but the values obtained from multiplex real-time PCR was less than 10% of those obtained from other assays. Numbers of 16S rRNA of both bacterial groups virtually remained the same level in the aerobic biofilter throughout the experimental period.

Keyword ; sulfur-oxidizing bacteria, sulfate-reducing bacteria, real-time PCR, multiplex real-time PCR

1 はじめに

UASB をはじめとする嫌気性処理法は、省エネルギーかつ余剰汚泥の発生が少ないといった利点を有している。これまでに筆者らは、硫黄の酸化還元サイクルを活性化した新規下水処理システム^{1, 2, 3)}を開発し、低温・低濃度排水である都市下水を対象としてフィージビリティテストを実施している。このシステムは、前段にUASB槽、後段に好気性ろ床の二槽を設け、まず前段のUASB槽で硫酸塩還元細菌が硫酸塩還元に伴ってBOD成分を分解し、次に後段の好気性ろ床で硫黄酸化細菌が硫酸塩を再生し、再度処理水の一部を硫酸塩還元のドライビングフォースとしてUASBに返送するものである。このシステムの特長は、通常の嫌気性処理の最終段階を担うメ

* 長岡技術科学大学大学院 環境システム工学系 (Dept. of Environmental System Engineering, Nagasaki University of Technology)

** 長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (Dept. of Civil Engineering, Nagasaki National College of Technology)

*** 呉工業高等専門学校 環境都市工学科 (Dept. of Civil Engineering, Kure National College of Technology)

† 岐阜工業高等専門学校 環境都市工学科 (Dept. of Civil Engineering, Gifu National College of Technology)

†† 広島県産業科学技術研究所 (Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology)

††† 高知工業高等専門学校 建設システム工学科 (Dept. of Civil Engineering, Kochi National College of Technology)

タン生成古細菌が低温条件で急激に活性が低下するのに対し、硫酸塩還元細菌は比較的低温条件下でもその活性を保持するため、低水温期においても一定の処理能力を維持する点にある。

筆者らは、前報⁴⁾にて硫黄の酸化還元サイクルを活用した新規下水処理リアクターの後段好気槽において、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析を行い、その微生物群集構造を明らかにした。その結果、後段好気槽汚泥中には優占硫黄酸化細菌として *Thiobacillus* 属が存在することが明らかになり、*Thiobacillus* 属を特異的に検出し定量する手法を確立した。しかし、後段好気槽汚泥には *Desulfohalobium* 種をはじめとする δ -*proteobacteria* に属する硫酸塩還元細菌も存在し、汚泥生物膜の表層に生息する硫黄酸化細菌によって酸化された硫酸塩を還元し、再度 *Thiobacillus* 属に供給していることが示唆された。したがって、リアクターのより正確な硫黄酸化ポテンシャルを評価するには、両者の挙動を把握することが極めて重要である。

近年、微生物の菌数を迅速にモニターする手法として Real-time PCR が注目されている。16S rRNA 遺伝子を用いた微生物の菌数挙動の把握^{4,5)}、機能遺伝子を用いた特定機能をもつ微生物群挙動の網羅的把握^{6,7,8)}など、その適用範囲は急速に拡大している。また、TaqMan probe 法を応用し、一つの反応チューブ内で複数の遺伝子断片を同時に検出し定量する手法として Multiplex real-time PCR 法が注目されている。Multiplex real-time PCR 法は、同時に複数の遺伝子を定量できることから、複数遺伝子の発現を指標とした遺伝子診断⁹⁾や、ウイルスの同定¹⁰⁾、また原核生物においても複数の遺伝子による動態解析¹¹⁾など、広い分野で用いられている。また、Jinneman ら¹²⁾は、Multiplex real-time PCR 法に Tm enhancer 物質である Minor-groove binder (MGB) を組み合わせた probe¹³⁾を用いて病原性大腸菌の一塩基多型 (Single-nucleotide polymorphism : SNP) 解析を可能にし、三種類の遺伝子を同時にモニターする技術を開発している。

本研究の目的は、Multiplex real-time PCR 法を用い、硫黄酸化細菌と硫酸塩還元細菌の両者を同時にモニターする手法を開発し、後段好気槽の生物膜内における両者の挙動を追跡することである。Multiplex real-time PCR 法は、数種の微生物群を測定する際に省力化が可能であるが、その複雑な原理から、プライマーやプローブの特異性や定量値の妥当性などを検証する必要がある。そこで本研究では、まず硫黄酸化細菌 *Thiobacillus* 属と硫酸塩還元細菌 *Desulfohalobium* 種の純粋菌株由来の 16S rRNA 遺伝子断片を用いて、SYBR Green I インターカレーターを用いた手法 (以下 SYBR Green I 法と略す)、TaqMan probe 法と Multiplex real-time PCR 法による PCR 増幅効率の違いを検討した。さらに、後段好気槽から採取した汚泥サンプルから全 RNA を抽出し、逆転写して得られた cDNA に対しても同様の比較を行い、Multiplex real-time PCR 法による *Thiobacillus* 属と *Desulfohalobium* 種の同時定量法の開発を行った。次に、開発した手法を用いて後段好気槽の汚泥サンプル中の *Thiobacillus* 属と *Desulfohalobium* 種由来の 16S rRNA 量の定量を行い、その経時変化を追跡した。

2 実験方法

2.1 実験装置及びサンプリング

広島県東広島浄化センター内に建設したパイロットプラントに、スクリーン通過後の都市下水を連続通水し、フィジビリティテストを実施した²⁾。システムは、まず、脱窒槽 (1.4m³) と UASB (8.4m³) からなる嫌気槽で前段処理され、次に好気性ろ床 (4.32m³) と沈殿槽 (2.88m³) を経て放流される。沈殿槽下部から最前段の脱窒槽には循環ラインを設けた。また、脱窒槽と好気性ろ床には、生物膜付着担体としてアクリル板の両面に板状スポンジを貼り付けたものを充填し、運転開始 116 日目には好気性ろ床の担体を取り替えた。運転条件は、システム全体の滞留時間を 24hr に設定し、循環比 2 で運転した RUN1 (運転開始から 184 日目まで) と、循環比 0.3 で運転した RUN2 (184 日目以降) とした。実験期間を通じて温度制御は行わなかった。Real-time PCR による遺伝子定量に供した汚泥は、担体変更後の運転 120 日目から 372 日目までの間、スポンジ担体から汚泥を約二週間間隔で採取したものをサンプルとした。

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence(5'-3')	Specificity	Tm(°C)	Reference
BONE663cF	AGGGGGGT(A/G)GAATTCCA	Most <i>Beta-proteobacteria</i>	55	14
Thio840R	TCGTTACTAAGGGATTTCAC	<i>Thiobacillus</i> gen.	52	4
Td626cF	GGGAATGGCRTTTTGAAC	<i>Thiobacillus</i> gen.	54	15
Delta495acF	GAAGCACCGCTAACT	Most <i>Delta-proteobacteria</i>	53	16
DSB660F	CAGAGGGGAAAAGTGGAATTC	<i>Desulfobulbus</i> spp.	56	16
UNIV907cR	CCGTCAATTCCTTTTTRAGTTTC	All Organisms	54	17
Thio840 MGB probe	FAM-TGAAATCCCTTAGTAACGA-NFQ-MGB	<i>Thiobacillus</i> gen.	50+ α	This study
DSB660 probe	ROX-AATTCCTTTCCCTCTGGTA-BHQ	<i>Desulfobulbus</i> spp.	58	16

Table 2 Primer and Probe sets for three types of real-time PCR such as SYBR Green1, TaqMan probe and Multiplex real-time PCR to detect 16S rRNA gene of *Thiobacillus* gen. and *Desulfobulbus* spp.

Method	Target	Oligonucleotide	MgCl2 concn (mM)	Primer, Probe concn (uM)	Expected product size (bp)
SYBR Green I	<i>Thiobacillus</i> gen.	BONE663cF Thio840R	3	0.3 0.3	177
	<i>Desulfobulbus</i> spp.	DSB660 UNIV907cR	3	0.3 0.3	247
TaqMan probe	<i>Thiobacillus</i> gen.	Td626cF UNIV907cR Thio840 MGB probe	7	0.1 0.1 0.8	281
	<i>Desulfobulbus</i> spp.	Delta495acF UNIV907cR DSB660 probe	7	0.1 0.1 0.8	412
	<i>Thiobacillus</i> gen.	Td626cF		0.1	281
	<i>Desulfobulbus</i> spp.	Delta495acF UNIV907cR Thio840 MGB probe DSB660 probe	10	0.1 0.1 0.8 0.8	and 412

Table 3 Amplification conditions applied for each real-time PCR method

BONE662cF-Thio840R pair			DSB660f-UNIV907R pair			TaqMan probe and Multiplex method		
PCR reaction step	Temp. (°C)	Time (sec)	PCR reaction step	Temp. (°C)	Time (sec)	PCR reaction step	Temp. (°C)	Time (sec)
Denature	95	60	Denature	95	60	Denature	95	60
Denature	95	15	Denature	95	15	Denature	95	15
Anneal	60	20	Anneal	68	20	Anneal	58	20
Extension	72	15	Extension	72	15	Extension	62	14
Fluorescence measurement	88	6	Fluorescence measurement	85	6	Fluorescence measurement	62	6

2.2 三種の Real-time PCR による *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の遺伝子定量

本研究では、前報での微生物群集構造解析の結果をもとに硫酸酸化細菌として *Thiobacillus* 属を、硫酸塩還元細菌として *Desulfobulbus* 種を優占種と判断し、それぞれを定量の対象種とした。Real-time PCR は、その計測法の違いから SYBR Green I 法、TaqMan probe 法と Multiplex real time PCR 法の三種を適用し、*Thiobacillus* 属および *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 遺伝子数を Smart Cycler (Cepheid, TaKaRa biomedical) を用いて測定した。酵素は R-PCR Version Takara Ex Taq™ を使い、それぞれ Real-time PCR 反応液の組成は付属のマニュアルを参考にし、最適条件の検討を行った。本研究で用いたプライマーとプローブの塩基配列を Table 1 に、三種の Real-time PCR 法の反応液組成を Table 2 に示す。

SYBR Green I 法では, *Thiobacillus* 属の 16S rRNA 遺伝子を BONE663cF-Thio840R pair で増幅し, *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 遺伝子を DSB660F-UNIV907R pair で増幅した。各プライマーセットの PCR 反応条件を Table 3 に示す。二重蛍光標識プローブを用いた TaqMan probe 法では, *Thiobacillus* 属の 16S rRNA 遺伝子を Td626cF-UNIV907R pair で増幅し, Thio840 MGB probe により特異的に検出した。また, *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 遺伝子を Delta495acF-UNIV907R pair で増幅し DSB660 probe により特異的に検出した。Multiplex real-time PCR 法では, TaqMan probe 法で用いたプライマーとプローブセットを一つの反応チューブ内で混合させ, 同時に PCR 反応を進行させ, *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 遺伝子を同時に増幅し, 定量した。

三種の Real-time PCR の増幅効率, スタンダードサンプルから作成した検量線の傾きを比較した。スタンダードは, *Thiobacillus thioarans* (DSM505) のゲノム DNA を Td626cF-UNIV907R pair で PCR 増幅し, 増幅産物を精製, $10^5 \sim 10^2$ copies になるように希釈したものと, *Desulfobulbus elongatus* (DSM644) のゲノム DNA から Delta495acF-UNIV907R pair で増幅した増幅産物に同様の処理を行ったものを用いた。

2.3 好気槽汚泥サンプルの PCR 増幅効率の検討

後段好気槽内の汚泥サンプルに関しては, 汚泥から回収した全 RNA から逆転写反応により cDNA を作成し, *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 遺伝子数を測定した。逆転写反応にはランダムプライマーを用い, その手法は押木ら¹⁸⁾の方法に準じた。汚泥サンプル中の 16S rRNA 量の定量に関する三種の Real-time PCR の増幅効率の検討は, RNA 1ng を逆転写して得られた cDNA の 5 倍希釈列を用いた。また, 定量値の標準偏差は, 各々三回の測定から算出した。

2.4 後段好気槽内の *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 定量

後段好気槽から汚泥サンプルを経時的に採取し, サンプル中の *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 数から両者の挙動を追跡した。テンプレートには, 汚泥サンプルから抽出した全 RNA 1ng をランダムプライマーにて逆転写したものを用い, 三種の Real-time PCR を用いて測定した。16S rRNA 数は, 汚泥から抽出し, 精製した RNA 1ng 中の Copy 数 (copies/1ng-total RNA)¹⁸⁾ として示した。スタンダードは 2.2 と同様に純粋菌株の増幅産物を精製し, 希釈したものを用いた。三種の real-time PCR における定量値の標準偏差は, 三回の測定から算出した。

3 結果と考察

3.1 純粋菌株由来の 16S rRNA 遺伝子断片を用いた三種の Real-time PCR における増幅効率について

Fig.1 に, 三種の Real-time PCR より *T. thioarans* 由来の 16S rRNA 遺伝子断片の段階希釈サンプルから得られた検量線を示す。いずれの条件の Real-time PCR においても相関係数 R^2 値は 0.99 以上となり, 良好な近似直線が得られた。この検量線の傾きから PCR 増幅効率 (E) ¹⁹⁾ を算出した。この PCR 増幅率は, 10 倍希釈列の検量線の傾きを S とすると $E=10^{-1/S}$ で定義され, 10 倍希釈列が指数的に PCR 増幅したとすると $E=2.0$ となる。三種の Real-time PCR

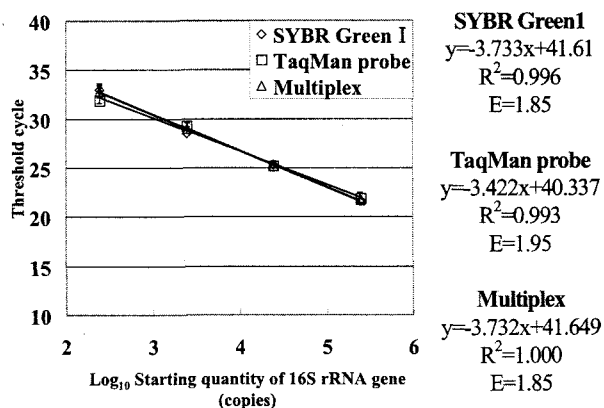


Fig.1 Standard curves for three types of real-time PCR method with the serial dilution of PCR products that obtained with Td626cF-UNIV907R from *Thiobacillus thioarans*.

の増幅効率については、SYBR Green I 法に比べ、Real-time PCR の中でも高効率、高検出感度とされる TaqMan probe 法が 1.95 と高い値を示した。しかしながら、TaqMan probe 法で用いたプライマーとプローブセットを Multiplex real-time PCR 法に適用した際には、1.85 と低下した。

Fig.2 に、*T. thioparus* の場合と同様に *D. elongatus* 由来の 16S rRNA 遺伝子断片の段階希釈サンプルから得られた検量線を示す。*D. elongatus* においても TaqMan probe 法での PCR 増幅効率は 1.98 と良好であったが、*T. thioparus* の場合と同様に、Multiplex real-time PCR 法では 1.82 に低下した。

この原因は、Multiplex real-time PCR 法において複数の遺伝子断片を増幅することによる PCR 増幅効率の低下が関与していると予想される。Weller ら²⁰⁾は、Multiplex での TaqMan probe 法において目的遺伝子断片を高効率かつ特異的に増幅し定量するためには、増幅塩基長を 60~70bp に設定するのが好ましく、長くても 200bp にとどめるべきだと報告している。本研究における Multiplex real-time PCR 法では、Delta495acF- UNIV907R pair, DSB660 probe set で 412bp と大きく、一種の増幅断片を得る TaqMan probe 法の場合では十分であった増幅効率も、二種の増幅断片を得る Multiplex real-time PCR 法では十分な増幅効率が得られなかったものと判断される。

3.2 好気槽生物膜サンプルにおける三種の Real-time PCR の PCR 増幅効率について

汚泥サンプルから回収した DNA を Multiplex real-time PCR 法のテンプレートとした場合は増幅効率が極めて低下した(データ非表示)。Multiplex real-time PCR 法のような複数の遺伝子断片を増幅する PCR 反応では、標的サイト以外に大量に混在する遺伝子によって PCR 増幅が阻害され、増幅効率が低下したものと考えられる。したがって、Multiplex real-time PCR 法においては、ゲノム DNA を標的にするよりも全 RNA 中の 80% 近くの割合を占める 16S rRNA をターゲットにした方が有利であると判断した。これは、死滅細胞でも計測してしまう DNA をベースにした遺伝子定量法に比較して、*Thiobacillus* 属や *Desulfobulbus* 種の総合的な活性度を評価する 16S rRNA 量の定量の方が硫酸酸化ポテンシャルを適切に評価できるものと考えられる。

16S rRNA の逆転写産物を Multiplex

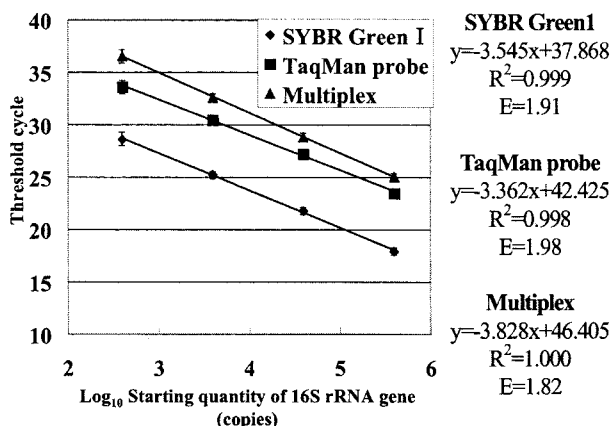


Fig.2 Standard curves for three types of real-time PCR method with the serial dilution of PCR products that obtained with Delta495acF-UNIV907R from DNA of *Desulfobulbus elongatus*.

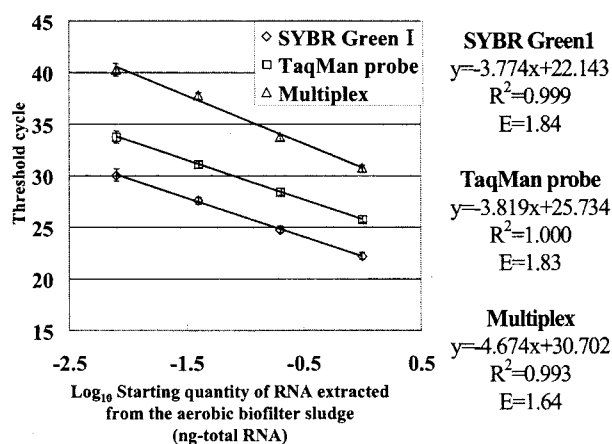


Fig.3 PCR efficiencies of three types of real-time PCR method on amplification of 16S rRNA gene of *Thiobacillus thioparus*. Serial dilution of cDNA obtained by reverse transcription of the RNA extracted from the aerobic biofilter sludge was used as PCR templates.

real-time PCR 法で定量する場合、外部標準となる検量線スタンダードサンプルと汚泥サンプルから得た cDNA の PCR 増幅効率と同じであることが望ましい。そこで、汚泥サンプル由来の cDNA の PCR 増幅効率を三種の Real-time PCR から算出し、3.1 の実験結果と比較した。

Fig.3 に、*Thiobacillus* 属検出系の三種の Real-time PCR を適用して、汚泥サンプル由来の cDNA の段階希釈列から得られた検量線を示す。いずれの手法においても相関係数 R^2 値は 0.99 を超え、良好な近似直線が得られた。しかしながら、PCR 増幅効率については、TaqMan probe 法、Multiplex real-time PCR 法ともに *T. thioparus* 由来の検量線スタンダードサンプルから得られたもの (Fig.1) と比較すると小さく、Multiplex real-time PCR 法においては 1.64 とその低下は極

めて顕著であった。Fig.4 に、*Desulfobulbus* 種検出系の三種の Real-time PCR を適用して得られた検量線を示す。*Desulfobulbus* 種検出系でも *Thiobacillus* 属検出系の場合と同様に、PCR 増幅効率は Multiplex real-time PCR 法において 1.60 まで低下した。

これは、検量線スタンダードサンプルと汚泥サンプルとの間に増幅効率の違いがあることを示している。この一因は、スタンダードで用いた純粋菌株の増幅産物と汚泥サンプルから得た逆転写産物の質的相違と考えられる。さらに、本研究では Multiplex real-time PCR 法において *Thiobacillus* 属を定量する際に用いた Td626cF-UNIV907R pair, Thio840 MGB probe set が *Thiobacillus* 属に極めて特異的な設計になっているのに対し、*Desulfobulbus* 種を定量する Delta495acF- UNIV907R pair, DSB660 probe set は、 δ -proteobacteria に属する細菌の遺伝子断片を増幅し、その際に *Desulfobulbus* 種由来の遺伝子断片を DSB660 probe にて検出する設計になっている。したがって、これらを汚泥サンプルに適用した場合、*Desulfobulbus* 種由来の遺伝子断片が *Desulfobulbus* 種以外の δ -proteobacteria に属する細菌由来の遺伝子断片とプライマーを競合している可能性が考えられる。しかし、スタンダードサンプルに適用した場合にはこの競合関係は成り立たず、プライマーセットは *Desulfobulbus* 種由来の遺伝子断片のみに結合することになる。こうした要因がこの両者の増幅効率の違いに寄与していることも予想される。

3.3 三種の Real-time PCR による汚泥サンプル内の *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の遺伝子定量

Fig.5 に、三種の Real-time PCR による *Thiobacillus* 属の 16S rRNA 数の経日変化を示す。三種の Real-time PCR から得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、いずれの Real-time PCR においても理論的な断片長の増幅断片だけが得られ、非特異的増幅は確認されなかった。したがって、複数の Oligonucleotides が混在する Multiplex real-time PCR 法においても、各プライマーとプローブセットの特異性は十分に発揮されたことは明らかである。SYBR Green I 法と TaqMan probe 法による定量結果は、 $10^2 \sim 10^3$ copies/ng-total RNA の間で推移し、全運転期間においてほぼ同様の変遷を示した。しかしながら、Multiplex real-time PCR 法による定量結果においては、 $10^1 \sim 10^3$ copies/ng-total RNA の間で推移し、前者と比較すると約 1 オーダー低い値を示した。Fig.6 に三種の Real-time PCR による *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 数の経日変化を示す。*Thiobacillus* 属と同様に、SYBR Green I 法と TaqMan probe 法による定量結果は $10^2 \sim 10^3$ copies/ng-total RNA の間で推移し、Multiplex real-time PCR 法においては約 1 オーダー低い値を示した。しかし、Multiplex real-time PCR 法における定量結果は、SYBR Green I 法お

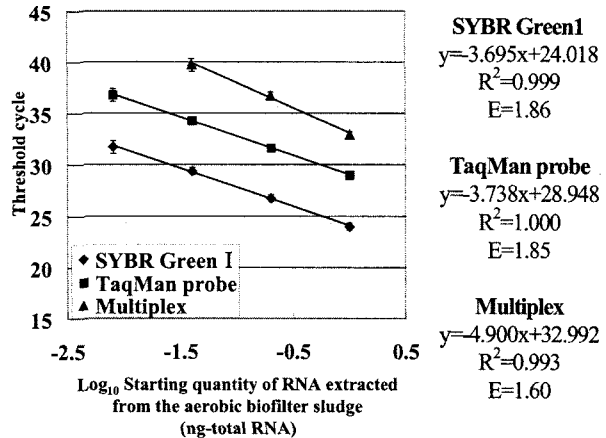


Fig.4 PCR efficiencies of three types of real-time PCR method on amplification of 16S rRNA gene of *Desulfobulbus elongatus*. Serial dilution of cDNA obtained by reverse transcription of RNA from the aerobic biofilter sludge was used as PCR templates.

よび TaqMan probe 法による定量結果と同様の変動を示した。

3.4 後段好気槽内の *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の挙動について

本研究では、Multiplex real-time PCR 法を用いて、本システムの後段好気槽汚泥中の *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 量の挙動を追跡した。システムの循環比を 2 で運転した RUN1 を循環比 0.3(RUN2)に変更すると、汚泥中の *Thiobacillus* 属の 16S rRNA 量は急激に増加した。これは、前段 UASB での滞留時間が増加し、後段好気槽に流入する硫化物濃度が 10mg-S/L から 30mg-S/L 程度に上昇した⁴⁾ためと考えられる。運転 332 日目に *Thiobacillus* 属の 16S rRNA 量の急激な減少がみられたが、これは前段 UASB から後段好気槽への汚泥の流入により、システム全体の処理性能が低下したことが原因である（データ非表示）。一方、*Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 量は、RUN2 で増加し、プロセスの不安定化後に減少するといった *Thiobacillus* 属の 16S rRNA 量とはほぼ同様の变化を示した。これは好気性プロセス内といえども汚泥が生物膜を形成した場合、硫酸酸化細菌は無酸素環境の提供と還元硫酸黄（基質）の取得といった硫酸塩還元細菌との間に密接な共生関係を構築して存在していることを示唆している。さらに、両者の全 RNA 中の 16S rRNA 量は同レベルであることが判明した。

Multiplex real-time PCR 法は処理プロセスの鍵を握る数種の微生物群を同時に定量できるという特長を有している。しかし、排水処理プロセスのような複合微生物系に本手法を適用する場合は、標的遺伝子に共存する雑多な大量の遺伝子によって PCR 増幅効率が低下する現象が明らかになった。本研究ではこの欠点を克服するために汚泥から全 RNA を抽出し、その逆転写産物から標的微生物群由来の 16S rRNA のコピー数を定量する手法を採用した。この手法でも Multiplex real-time PCR 法は他の Real-time PCR に比較して約 1 オーダー小さい定量値を示したが、プライマーの非特異的な増幅は発生せず、汚泥サンプル中での経時変化も SYBR Green I 法および TaqMan probe 法と全く同じ傾向を示した。したがって、本研究で開発した Multiplex real-time PCR 法は、サンプル間の硫酸酸化ポテンシャルや硫酸還元ポテンシャルの相対的な変化を追跡するには十分であると判断できる。今後は、増幅塩基長を小さくするなどプライマーとプローブセットの組み合わせを再検討することによって増幅効率の向上を図り、2 種の菌群の同時定量手法を確立する。

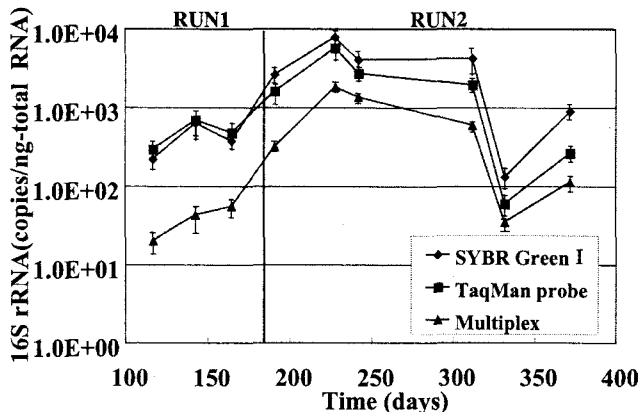


Fig.5 Changes in 16S rRNA number of *Thiobacillus* cells in the aerobic biofilter sludge determined by three types of real-time PCR.

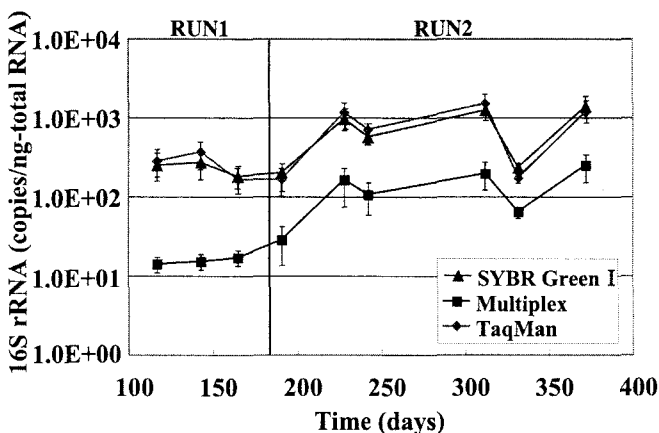


Fig.6 Changes in 16S rRNA number of *Desulfobulbus* cells in the aerobic biofilter sludge determined by three types of real-time PCR.

4 結論

硫黄の酸化還元サイクルを活用した新規下水処理システムの連続運転を行い、後段好気槽内の汚泥中における *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 量を SYBR Green I 法、TaqMan probe 法と Multiplex real-time PCR 法の三種の Real-time PCR 法を用いて計測した結果、以下の知見が得られた。

- 1) *Thiobacillus* 属、*Desulfobulbus* 種の各純粋菌株から回収した DNA の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅産物の希釈列を用いた場合、三種の Real-time PCR 法の増幅効率、両者ともに Multiplex real-time PCR 法において増幅効率が低下した。
- 2) Multiplex real-time PCR 法を汚泥サンプルに適用する場合、ゲノム DNA よりも RNA の逆転写産物をテンプレートする方法が有効である。
- 3) 三種の Real-time PCR 法において、汚泥から回収した RNA の逆転写産物の増幅効率は、純粋菌株から回収した DNA の PCR 増幅産物から作成した検量線スタンダードサンプルの増幅効率に比べ低下した。
- 4) Multiplex real-time PCR 法による 16S rRNA 量は、SYBR Green I 法と TaqMan probe 法に比較して約 1 オーダー小さい値であった。しかし、後段好気槽内の *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 量の変化は、いずれの Real-time PCR 法ともほぼ同じ傾向を示した。
- 5) 運転期間を通して後段好気槽内の *Thiobacillus* 属と *Desulfobulbus* 種の 16S rRNA 量の変化は同じ傾向を示し、全 RNA 中のコピー数もほぼ同じレベルにあった。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費（基盤研究（C）、課題番号 16560489）、NEDO 産業技術研究事業費助成金（課題番号 01B63001d）及び広島県地域新生コンソーシアム研究開発事業（広島県産業科学技術研究所、西尾プロジェクト）の助成を受けて遂行したものである。ここに記して、感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 角野明彦, 山口隆司, 谷川大輔, 岡崎優子, 荒村言夫, 川上周司, 山崎真一, 原田秀樹 2003. 前段UASB 後段好気槽を組み合わせたシステムの硫黄酸化還元サイクルを利用した下水処理 環境工学研究論文集 40:431-440.
- 2) 角野明彦, 高橋樹言, 山口隆司, 阿部憲一, 荒村言夫, 山崎真一, 霜崎敏, 長野晃弘, 西尾尚道 2004. 無効温パイロットスケールUASB と固定床型好気槽による都市下水連続処理 環境工学研究論文集 41:69-77.
- 3) 山崎真一, 山口隆司, 荒村言夫, 原田秀樹. 2003. UASB-接触酸化下水処理システムによる有機物と窒素の同時除去特性. 土木学会論文集. 734:135-143.
- 4) 川上周司, 荒村言夫, 山口隆司, 角野明彦, 山崎真一, 西尾尚道 2004. 硫黄の酸化還元サイクルを活用した新規下水処理リアクターにおける硫黄酸化細菌の検出とその挙動 環境工学研究論文集 41:205-212.
- 5) 金田一智規, 河野快子, 伊藤司, 岡部聡 2004. Real-time PCR を用いた生物膜内部における硝化細菌のポピュレーションダイナミクス 環境工学研究論文集 41:321-330.
- 6) 中村明彦, 荒村言夫, 山口隆司, 山崎真一, 大橋晶良, 原田秀樹 2002. Real-time PCR 法と Competitive PCR 法を用いた *Nitrosomonas* 属の 16S rDNA 及び *amoA* 遺伝子の定量 環境工学研究論文集 37:365-375
- 7) 塚本雄介, 荒村言夫, 長野晃弘, 山口隆司, 原田秀樹 2004. 都市下水処理種床型脱窒素リアクターにおける優占脱窒素細菌の特定と機能遺伝子の定量 水環境学会誌 27:791-796.
- 8) Gruntzig, V., S. C. Nold, J. Zhou and J. M. Tiedje 2001. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene Abundance in environmental samples measured by real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:760-768.
- 9) Loredana, E., M. Marco, M. Luisa, M. Giovanna, B. Sonia, K. Mouro, R. G. De, F. Robin, and C. Giuseppe. 2003. A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric

genes. *Haematologica*. 88:275-279.

- 10) Fan, Jiang, Kelly J. H., and Laura L. S.. 1998. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, reaction-enzyme hybridizaion assay (hexaplex). *Clin. Infect. Dis.* 26:1397-1402.
- 11) Ibekwe, A. M., P. M. Watt., C. M. Grieve, V. K. Sharma, and S. R. Lyons. 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4853-4862.
- 12) Jinneman K. C., Ken J. Yoshitomi, and S. D. Weagant. 2003. Multiplex real-time PCR method to identify Shiga Toxin Genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157:H7/H⁻ serotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6327-6333.
- 13) Kutuyavin I. V., I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S/ G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer and J. Hedgpeth. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*. 28:655-661
- 14) Amann, R., J. Snaird, M. Wagner, W. Ludwig and K. H. Schleifer. 1996. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriology*. 178: 3496-3500.
- 15) 長谷川聖, 栗栖太, 花木啓祐. 2000. 土壌中における硫黄脱窒細菌 *Thiobacillus denitrificans* の FISH 法による検出. 第 37 回環境工学研究フォーラム講演集. 37: 95-97.
- 16) Loy, A., A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K. H. Schleifer, and M. Wagner. 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5064-5081.
- 17) Amann R.L., J.Stromley, R. Devereux, R. Key and D.A.Stahl. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilm, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:614-623.
- 18) 押木守, 荒木信夫, 山口隆司, 山崎真一, 原田秀樹. 2003. amoA mRNA の転写量に基づいた *in-situ* におけるアンモニア酸化活性の評価, 環境工学研究論文集, 40, pp.63-70.
- 19) Pfaffl, M. W., G. W. horgan and Leo Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30:36-46.
- 20) Weller S. A., J. G. Elphinstone, N. C. Smith, N. Boonham, and D. E. Stead. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* starins with a quantitative, Multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2853-2858.