

B-23 土壌中における硫黄脱窒細菌 *Thiobacillus denitrificans* のFISH法による検出

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 ○長谷川 聖

東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター 栗栖 太

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 花木 啓祐

1. はじめに

農地水系においては、肥料や畜産飼料として投入される窒素負荷が大きいため、地下水の硝酸態窒素汚染は重大な問題といえる。また、土壌のもつ脱窒能により、硝酸態窒素が還元される過程で、温室効果ガスの一つである亜酸化窒素 (N_2O) が発生することも懸念される。本研究では、脱窒の電子供与体として、無機硫黄を土壌に投与し、オンサイトで効率的に硝酸態窒素を除去しつつも、比較的緩速な反応を進めることにより N_2O 発生割合を減らし得る可能性を評価してきた。実験結果より¹⁾²⁾、土壌中に元素硫黄を埋め込むのみで十分な硝酸態窒素除去が可能であり、有機物を唯一の電子供与体とする場合より、発生する N_2O 量が低く抑えられ、 N_2O 抑制の見地からも、硫黄脱窒が有効な手段となりうる事が示された。硫黄脱窒細菌としては、*Thiobacillus denitrificans* が主要細菌として、多くの研究が成されてきている。そこで、より微視的に、土壌中での硫黄脱窒の経時変化・空間分布を把握するため、FISH (fluorescent in situ hybridization) 法による土壌中での *T. denitrificans* の検出を試みた。FISH法は、サンプルに対し、蛍光標識したoligonucleotide probe をin situでhybridize させ、蛍光検出することにより、標的微生物を検出できる。よって、対象細菌が限定されている場合に特に有効な手法といえる。本研究においては、まず *T. denitrificans* に対するprobe designを行なった後、土壌の前処理法を検討した。

2. 使用probeの設計と選択

まず塩基配列データベースツールARB(<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>) のProbe_Design機能と、*T. denitrificans* (ATCC 23644) の16S-rRNAシーケンスデータ(Genbank)を用い、*T. denitrificans*を対象としたprobeデザインを行なった。RDP (<http://www.cme.msu.edu/RDP/>) のCheck_Probeを用いてミスマッチ状況、positive control (+ve), negative control (-ve)となる純菌株を確認し、入手かつ培養可能で病原性でないものをcontrolとするprobeを候補とした。候補probeはTakaraカスタムDNAサービス(宝酒造)に外注し、蛍光標識は全てXRITCとした。probeは滅菌水を用いて100pmol/μLに調整し、-20℃条件下にて保存し、最初の使用時に滅菌水を用い25ng/μLに調整した。調整済みprobeは-20℃で保存し、使用時に室温にて溶解させ用いた。各probe候補のうち、対象細菌が確実に光り、それ以外の微生物を検出しない有効probeを選択するため、以下の手順により検討した。まず、+veとして *T. denitrificans* (ATCC 23644)、-veとして、*Thiobacillus thioautotrophicus* (ATCC8158) もしくは *Comamonas testosteroni* str. RH1104 (ATCC11996) の各純菌を培養し、全細菌検出probeであるEUB338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT, 5'-3')³⁾により、各control細菌が充分検出可能であることを確認する。各probeの+ve、-veでの光り具合を確認し、有効probeを選択した。この際の、hybridization過程における、formamide濃度としては、probeがhybridizeしやすい10%条件を設定した。以上の検討により、*T. denitrificans* の検出に有効なprobeとして、

Td626(GTTCAAAACGCCATTCCC, 5'-3')を選択した。この有効probeに対して、10-50%までhybridizationにおけるformamide濃度を変化させ、最も検出光の大きかった20%を最適formamide濃度とした。FISH法の各手順はAmann⁴⁾に依った。観察には共焦点レーザースキャン顕微鏡 (CLSM, Leica) を用いた。

3. 実験方法

3.1 自然沈降による自家蛍光除去の評価

硫黄添加土壌を対象として扱うことから、土壌の前処理法を検討した。肥田野ら⁵⁾は土壌試料の蛍光観察に際し、自然沈降を前処理法としている。そこで、超音波分散処理後、自然沈降時間に伴う自家蛍光状態をDAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole) により観察した。DAPIはDNAのA:T塩基対に特異的に結合する蛍光色素であり、生物の蛍光観察に適している。DAPIによる観察手順はBloem⁶⁾を参考とした。対象サンプルには水田土壌に粉末元素硫黄を混合したもの15gに、100mgN/LのKNO₃溶液10mLを添加し、6日間無酸素状態に保ったものを用いた。サンプルに超純水25mLを加え、スターラーにて攪拌しながら、40Wにて20分間、超音波分散する。この間、サンプルが熱せられるのを防ぐため、周囲を氷冷しつつ行なった。超音波分散の後、サンプルを自然沈降させ、上澄み液をDAPI観察した。

3.2 FISHにおける前処理法の検討

FISHにおいて十分な観察が可能かどうか、滅菌土壌及び*T. denitrificans* の純菌を対象としてFISHによる検出を行なった。土壌には水田土壌を使用し、121℃にて30分間加圧滅菌する。この滅菌土壌15gに超純水35mLを添加し、上記と同様超音波分散にかけた後、5時間自然沈降させる。その上澄み液を15倍濃縮したものと、*T. denitrificans* (ATCC 23644) の培養液を15倍濃縮したものを、それぞれ試料とした。

さらに、probeの土壌粒子等への結合を防ぐため、ブロッキング剤の効果を検討した。ブロッキング剤としてはBlock-Ace (雪印乳業) を20%になるようhybridization bufferに混入し用いた。また、DNA断片として、NON-probe (ACTCTACGGGAGGCAGC, 5'-3') を、Td626 probeをhybridize させる前に、5もしくは30分prehybridizeさせる方法を検討した。試料としては、上記同様滅菌土壌と純菌を設けた。

4. 実験結果

4.1 自然沈降による自家蛍光除去の評価

図1に超音波分散直後、及び自然沈降5時間後のDAPI観察の結果を示した。超音波分散直後のサンプルでは、土壌粒子・硫黄粒子が多量に存在することから、微生物以外の自家蛍光部分が多く、微生物の蛍光観察が十分に行なえない。自然沈降させると、1時間の状態では、自然沈降させないサン

プルと大差なく、自家蛍光が大きかったのに対し、3時間自然沈降させた場合には、自家蛍光の減少が見られた。しかし、残存する自家蛍光により、微生物自体の蛍光が十分観察できない結果となっていた。これに対し、5時間の自然沈降では、自家蛍光要因がほぼ除去され、微生物が十分観察できることがわかる (図1-右)。本研究では比較的増殖速度の遅い、独立栄養細菌の*T. denitrificans* を対象とすることから、10数日スパン実験での、5時間の自然沈降が微生物群の状態変化に与える影響は小さいと考え、5時間の自然沈降を前処理法とした。

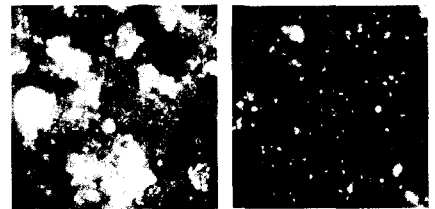


図1. DAPI観察による自然沈降の結果
左：超音波分散直後 右：自然沈降5時間後

4.2 FISHへの適用

Td626 probeを用い5時間自然沈降させたサンプルに対するFISHの結果では、いずれのサンプルにおいても、B励起、Y励起の蛍光は観察されず、5時間の自然沈降ではほぼ土壌粒子等による自家蛍光は除去できていたと考えられる。しかし、残存している微量な土壌粒子にprobeが非特異結合し、滅菌土壌でもG励起蛍光が観察される結果となった(図2(1))。BlockAceを用いた場合には、図2(3)のように滅菌土壌への非特異結合が減少した。しかし、純菌単独へ適用した場合に、十分明瞭な検出が出来なかったことから(図2(4))、BlockAceの濃度・適用法の検討が必要である。NON probeをブロッキング剤として使用した場合には、5分のprehybridizationでは十分な効果が得られず(図2(5))、30分prehybridizeした場合には、5分の場合よりブロッキング効果が示されてはいるものの、BlockAceよりその効果は小さかった(図2(6))。

5 まとめ

probe design 及びcontrol 純菌による検討により、*T. denitrificans* 検出用probe、Td626を得た。実土壌環境中での検出には、土壌粒子の持つ自家蛍光の除去、

及びprobeの土壌粒子への非特異結合の防止が重要となる。自家蛍光は、自然沈降により大部分が除去可能となった。非特異結合は、ブロッキング剤のBlockAceによる除去可能性が示されたが、純菌の検出が不十分となったことから、今後、濃度・適用方法の検討が必要といえる。また、NON probeのブロッキング効果は小さく、適用を試みるには更なるprehybridize時間及びNON probe濃度の検討が必要である。

引用文献

- 1) 長谷川聖・花木啓祐・松尾友矩, 1999. 土壌中の硫黄脱窒過程における硝酸態窒素除去及び亜酸化窒素生成の評価. 環境工学研究論文集, 36, 465-476.
- 2) Hasegawa, K., K. Hanaki, T. Matsuo, and S. Hidaka, 2000. Nitrous Oxide from the Agricultural Water System Contaminated with High Nitrogen. *Chemosphere*, in press
- 3) Amann, R. I., W. Ludwig and K.-H. Schleifer, 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143-169.
- 4) Amann, R. I., 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6 : 1-15.
- 5) 肥田野哲樹, 原田秀樹, 大橋晶良, 珠坪一晃, 1998. FISHによる土壌内微生物の同定および定量. 土木学会第53回年次学術講演会, 60-61.
- 6) Bloem, J., 1995. Fluorescent staining of microbes for total direct counts. *Mole. Microbial Ecology Manual*, **4.1.8**, 1-12.

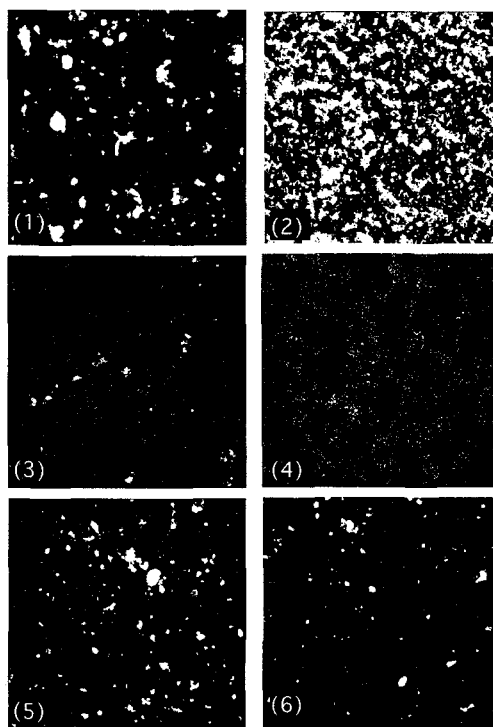


図2. B/Y/G励起の重ね合わせ画像

(1)滅菌土壌 (2)純菌 (3)BlockAce+滅菌土壌
(4)BlockAce+純菌 (5)NON5分後Td626
(6)NON30分後Td626