

B-7 新規下水処理リアクター内における優占硫黄脱窒素細菌の特定

長岡工業高等専門学校 ○五十嵐利弘 荒木信夫
高知工業高等専門学校 山崎慎一
呉工業高等専門学校 山口隆司

1. はじめに

従来の脱窒素法では、メタノールなどの炭素源の添加が必要となる場合がある。我々は、この課題を解決するために硫黄の酸化還元サイクルを利用した新規下水処理システム¹⁾を開発中である。この下水処理システムは有機物分解と脱窒をそれぞれ担う2槽のUASBと好気性接触酸化槽を組み合わせたものである。最前段の有機物分解UASB反応槽から流出する硫化物を含む処理水と、好気槽から循環する硝酸を含んだ接触酸化槽処理水を第2槽UASBに流入させることにより硫黄脱窒が発生する仕組みである。この硫黄脱窒は従来の脱窒法とは異なり、独立栄養細菌である硫黄脱窒菌を用いるためメタノールなどの添加は不要となる。しかし、この新規下水処理システムに出現する硫黄脱窒素細菌について菌種や菌数の特定がされておらず、安定した処理性能は得られていない。そこで、本研究では、硫黄脱窒UASB内の汚泥をサンプルとし、系内の硫黄脱窒素細菌種を特定し、その定量法の開発を行った。

2. 実験方法

2.1 集積培養

集積培地には、硝酸カリウム (40mM)、チオ硫酸ナトリウム (30mM) を 122mL のバイアル瓶に投入し、第2槽UASBから採取した汚泥を接種した。培養は、嫌気状態で培養温度 28℃、暗所により行った。また、集積培養は定期的に植え継ぎを行った。培養後のサンプルは、FISH 法、PCR-DGGE 法に供した。

2.2 PCR-DGGE 法

PCR-DGGE 法では、集積培養後のサンプルから DNA を抽出し、プライマー EUB-341F-GC、UNIV-907Rpair による PCR 増幅を行った。その後、変性剤濃度勾配ゲルによる電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し回収した後、オートシーケンサーを用いて塩基配列の決定を行った。解読した塩基配列から既知種中の相溶性の高い配列を検索し、系統解析を行った。プライマーSequencesはTable 1に示す。

2.4 FISH 法

FISH 法は Amann²⁾方法に準拠した。DNA oligonucleotide Probe にはテトラメチルローダミン標識を5'末端に付加したものを使用した。サンプルの固定には4%パラホルムアルデヒドで4℃、12時間以上固定を行った。Hybridizationは、Hybridization buffer (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl [pH 7.2], 0.01% SDS) と 50 μg/ml に希釈した Probe をサンプルに滴下し、46℃、2時間以上で行った。その後、Probe の洗浄のために、48℃で20分間 Hybridization buffer に浸した。本研究では硫黄脱窒菌に関する知見から主要菌種をリストアップし、*Thiobacillus denitrificans* を検出した実績のある既存の Probe Td626³⁾を用いた。Probe SequencesはTable 1に示す。

2.3 PCR 法

採取したサンプルは、中村ら⁴⁾の方法に準拠し、DNA の抽出を行った。抽出した DNA に対し細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 増幅を行った。プライマーセットは UNIV-907R と既存の Probe Td626 をプライマーに置き換えて用いた。プライマーSequencesはTable 1に示す。Td626 の特異性を調べるために *Thiobacillus denitrificans* (DSM12475) と *Thiobacillus thioautotrophicus* (DSM505) を用いて、*T. denitrificans* のみを検

出できる最適条件を検討した。

2.5 CARD-FISH 法

CARD-FISH 法では、Td626-HRP Probe を用いた。サンプルの固定は、FISH 法と同様に行った。Hybridization に関しても FISH 法同様に行い、formamide 濃度を調節することによって probe の非特異的結合が起こらない Hybridization 温度を検討した。

2.6 nirS 遺伝子に基づいたクローン解析

採取した汚泥から PCR 法と同様に DNA 抽出を行い、nirS4 F-6 R のプライマーセットを用いて nirS 遺伝子増幅を行った。nirS 遺伝子の増幅産物は TA Cloning kit (Novagen) によりクローン化させ、得られた単一の nirS 遺伝子の塩基配列を決定した。得られた塩基配列のデータは、既知種中からの相同性の高い配列を検索し、系統解析を行った。

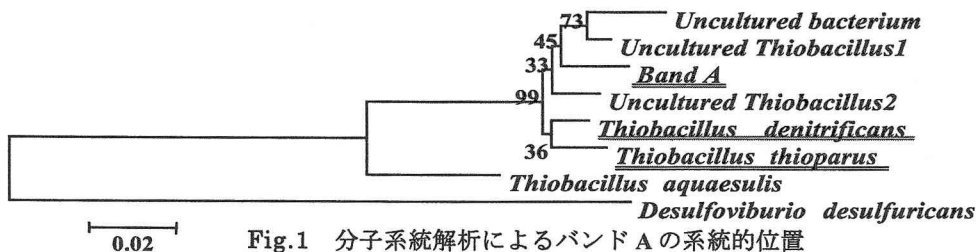
Table-1 本研究で用いた Oligonucleotide Sequence

Method	Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Specificity
FISH	Td626	GTTCAAAACGCCATTCCC	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
PCR	Td626-F	GGAATGGCGTTTGAAC	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
	UNIV907-R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Universal
PCR-DGGE	EUB341-F (GC-clamp)	CCTACGGGAGGCAGCAG	Bacteria
	GC-clamp	CCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGACGGGGG	
	UNIV907-R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Universal
Cloning	nirS4-F	TTCTCAAGACSCA	Denitrifying bacteria
	nirS6-R	CGTTGAACCTRCCGGT	Denitrifying bacteria

3. 実験結果

3.1 PCR-DGGE 法の結果

集積培養と PCR-DGGE 法を組み合わせた解析からいくつかのバンドがえられた。その中でも培養 11 目のサンプルからは A のバンドが得られ、そのバンドから硫黄脱窒細菌の一種である *T. denitrificans* の 16S rRNA 遺伝子との相同性が 97% の近縁な菌が検出された。そのことから、系内にはこの細菌が硫黄脱窒細菌として優占しているものと判断した。また、塩基情報からこの細菌が *T. denitrificans* を特異的に検出するプローブ Td626 で検出可能な細菌であることがわかった。



3.2 FISH 法の結果

FISH 法では、汚泥サンプルと集積培養後の汚泥サンプルに probe Td626 を適用した。その結果、第 2 槽 UASB 汚泥サンプルからは有意なシグナルは得られなかった。一方、硝酸-チオ硫酸

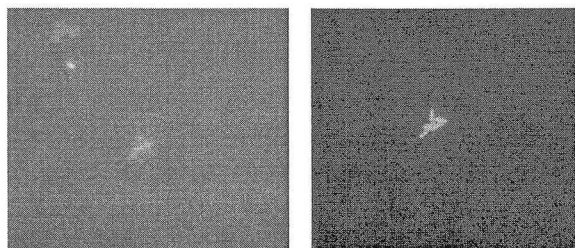


Fig. 2 Td626 を用いた FISH 法の結果

による集積培養汚泥からは鮮明なシグナルが得られ *T. denitrificans* を特異的に検出することができた。

3.3 PCR 法の結果

汚泥サンプルから回収した DNA に対し、probe Td626 の配列をプライマーとして置き換え、PCR 増幅を行った。その際、*T. denitrificans* のみを検出できる最適条件を得るためにアニーリング温度を検討した。その結果、アニーリング温度 62℃では所定の塩基長の DNA 断片を増幅でき、*T. denitrificans* のみを特異的に検出することができた。

3.4 CARD-FISH 法の結果

CARD-FISH 法では、Td626-HRP probe を第 2 槽 UASB から採取したサンプルに適応した。その結果、通常の FISH 法では検出できなかった *T. denitrificans* を特異的に検出することが出来た。

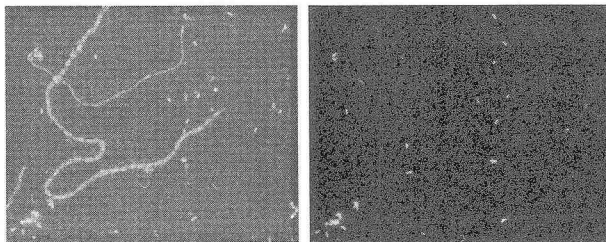


Fig.3 Td626-HRP を用いた CARD-FISH 法の結果

3.5 nirS 遺伝子に基づいたクローン解析の結果

今回行ったクローン解析の結果、他の実験結果からこの系で優占していると思われる硫黄脱窒素細菌 *T. denitrificans* を検出することは出来なかった。その理由としては、純粋菌株から抽出した DNA に今回用いたプライマーセットで *nirS* 遺伝子を増幅できたことから、この系での *T. denitrificans* のポピュレーションが低いためであると考えられる。

4. 考察

本研究から、PCR-DGGE 法によって検出された *T. denitrificans* に近縁な菌が新規リアクター内の硫黄脱窒反応に関わっていることが示唆された。FISH 法の結果では、この細菌は集積培養と併せて行った FISH 法でのみ検出できた。また、この細菌が PCR 法によっても検出できたことから、系内に *T. denitrificans* に近縁な細菌は存在するものの、菌の活性が低く、rRNA の存在量が少ない状態であると考えられる。細菌の低活性が示唆されたため、あくまで細菌の検出のために集積培養と組み合わせた FISH 法を行ったが、この方法には集積培養によるバイアスがかかり菌相を反映しないという欠点がある。この問題を解決するために、より高感度な CARD-FISH 法により、PCR-DGGE 法で検出された細菌の検出を CARD-FISH 法によっても行った。

これらのことから、この系内に優占している硫黄脱窒素細菌は、PCR-DGGE 法によって検出された *T. denitrificans* に近縁な細菌であることが示唆された。しかし、*nirS* 遺伝子によるクローン解析からは、この細菌のポピュレーションの小ささが示唆された。また、現段階でこの細菌がこの系での硫黄脱窒に関わっていると断定することはできない。よって、今後も機能遺伝子 NIR に着目した解析を行っていく必要がある。

5. 参考文献

- 1) 山崎慎一、山口隆司、荒木信夫、原田秀樹、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 No.734/VII-27、135-142、2003.5
- 2) 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
- 3) 長谷川聖、栗栖太、花木啓祐、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 回環境研究フォーラム講演集 2000、95-97
- 4) 中村明靖、荒木信夫、山口隆司、山崎慎一、大橋晶良、原田秀樹、Real-Time PCR 法と Competitive PCR 法を用いた *Nitrosomonas* 属の 16S rDNA 遺伝子及び *amoA* 遺伝子の定量、環境工学研究論文集・第 3 9 回・2002、39、365-373