

B-25 共生培養法による 新たな硫黄脱窒素細菌の探索

○小林 寛樹^{1*}・上村 基成¹・荒木 信夫¹・山口 隆司²・山崎 慎一³

¹長岡工業高等専門学校環境年工学専攻 (〒940-8532新潟県長岡市西片貝町888番地)

²長岡技術科学大学大学院環境システム工学専攻 (〒940-2188新潟県長岡市上富岡町1603-1番地)

³高知工業高等専門学校建設システム工学科 (〒783-8508高知県南国市物部乙200-1番地)

* E-mail:ac20830z@st.nagaoka-ct.ac.jp

1. はじめに

排水中の窒素化合物の除去には生物学的硝化脱窒素法が広く適用されているが、脱窒素反応の際に電子供与体としてメタノールなどの有機物の添加を必要とし、コストなどの点で問題がある。この問題を解決するために、硫黄の酸化還元サイクルによる脱窒素法を用いた新規排水処理システムの開発が進められている¹⁾²⁾。この排水処理システムは有機物の分解と脱窒素反応を担う2つのUASB槽と、硝化反応を担う接触酸化槽を組み合わせたものである。このシステムは硫黄の酸化還元サイクルを活性化させて、独立栄養性の硫黄脱窒素細菌が脱窒素反応を行う。そのため、外部からの炭素源を必要としない。これまでに、システム内に存在する硫黄脱窒素細菌は *Thiobacillus denitrificans* と *Thiomicrospira denitrificans* の2種類が確認されている。加えて、これらの硫黄脱窒素細菌は硫酸塩還元細菌と共生していることも明らかとなっている。しかし、これまでに硫黄脱窒素細菌は世界的にも7種しか確認されていないが、微生物の多様性の点から考えても硫黄脱窒素細菌が数種しか存在しないとは考えられない。また、今までに確認された硫黄脱窒素細菌は硝酸塩および還元型硫黄が高濃度の条件の下で単離されたものである。しかし、自然界ではこのような環境はほとんど存在せず、多くの硫黄脱窒素細菌は低濃度で還元型硫黄を供給する他の微生物と共生関係にあると考えられる。そこで本研究は硫黄脱窒素細菌と硫酸還元細菌が共生する自然界に近い状態で培養を行い、未知の硫黄脱窒素細菌を探索することを目的とした。

2. 研究方法

(1) 集積培養

表1に共生系培地の組成を示す。自然界に近い状態で

培養を行うために、硫酸還元細菌を共生させて低濃度の還元型硫黄を緩やかに硫黄脱窒素細菌に供給できる嫌気性培地を作成した。また、硫黄脱窒素細菌と硫酸還元細菌を共生培養させるために、硫酸塩と硝酸塩の濃度を調整した4種の培地を作成し、それぞれ集積培養を行った。共生培養法と従来の培養法を比較するために、共生培養法の培地に還元型硫黄 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を入れた従来の培地も作成した。また、培地内の酸化還元電位状態が視覚的にわかるようにレザズリンナトリウムを培地に添加した。

サンプルは、2基のUASB槽と接触酸化槽を組み合わせた本システムの中で、硫黄の酸化還元サイクルを用いて脱窒素を行なっている後段UASB槽から採取した。サンプルの植継ぎは、DAPIによる核酸の全菌染色を行い、適度に細菌が増えていることを確認した後、バイアル瓶から菌体を採取して新しい培地へ接種した。また、集積培養後のサンプルは菌体回収を行い、FISH法のための固定とPCR-DGGE法のためのDNA抽出を行った。

表 1. 共生系培地の組成

薬品名	培地番号			
	1	2	3	4
Solution A				
KH_2PO_4	2.0g	2.0g	2.0g	2.0g
KNO_3	2.0g	1.0g	0.5g	0.2g
NH_4Cl	1.0g	1.0g	1.0g	1.0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8g	0.4g	0.16g	0.08g
Trace element solution SL-4	2.0ml	2.0ml	2.0ml	2.0ml
Distilled water	980.0ml	980.0ml	980.0ml	980.0ml
Solution B				
NaHCO_3	1.0g	1.0g	1.0g	1.0g
Distilled water	20.0ml	20.0ml	20.0ml	20.0ml
Solution C				
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0mg	1.0mg	0.5mg	0.2mg
$\text{H}_2\text{SO}_4 (0.1\text{N})$	1.0ml	0.5ml	0.2ml	0.1ml

(2) FISH法

硫酸還元細菌の確認のためにFISHを行った。FISHは Amann³⁾の方法に準拠した。Oligonucleotide プローブには蛍光標識を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。ハイブリダイゼーションのプロブは硫酸還元細菌の検出に実績のある既存のSRB385を用いた。

(3) PCR-DGGE法

a) PCR条件

サンプル中の全細菌の16S rRNA遺伝子をターゲットとして、PCRによって遺伝子の増幅を行なった。プライマーセットはGCクランプ付きEUB-341FとUNIV-907Rを採用した。

b) DGGE条件

PCRによって得られたPCR産物を用いてDGGEを行なった。6%ポリアクリルアミドゲルの変性剤濃度勾配を30%～60%に設定し、60℃、200V、210minの条件下で電気泳動を行なった。電気泳動終了後、エチジウムブロマイドによるDNA染色、紫外線による可視化を行い、滅菌したメスによりバンドを切り出しサンプルの回収を行なった。

c) シーケンシング

回収したバンドはオートシーケンサーCEQ8000 (BECKMAN COULTER) を用いて、16S rRNA遺伝子の塩基配列の解読を行なった。また、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のBLASTを使い、解読した塩基配列と既知種の細菌との相同性を比較した。

3. 実験結果および考察

(1) 集積培養

集積培養の状況を表2に示す。共生培養の植継ぎは第6回まで進行している。従来の培養法と同量の汚泥を植継ぎしたのに対し、第1回植継ぎ前には、共生培養法ではサンプル投入時に入れた汚泥が培養の日が進むごとに薄く膨化し、綿菓子のような物質に包まれたブロックを形成した。このブロック状の物質は、作成した共生系培地に適した細菌群が形成したものと思われる。また、培養が進むにつれて、培地内のレザズリンナトリウムが還元雰囲気から酸化雰囲気に変化した。培養が進行した全ての培地で同様の変化が見られたことから、培地作成時に酸素が混入して酸化雰囲気に変化したとは考えにくい。従って、硫黄脱窒素細菌と硫酸還元細菌が共

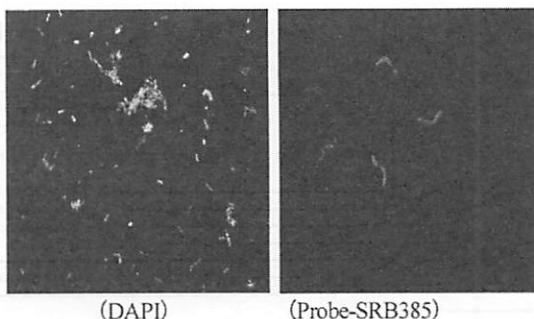


図 1. FISH 法による硫酸還元細菌の検出

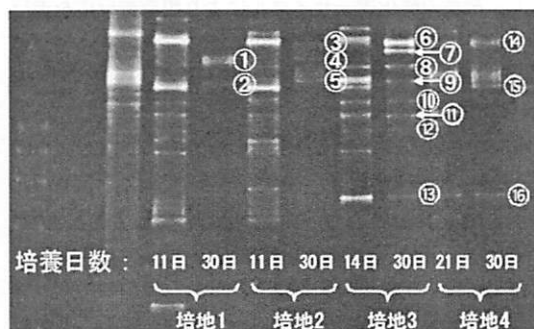


図 2. PCR-DGGEにより切り出したバンド
(記載されている番号は表3, 図3のBand番号に対応)

表 3. DGGE バンドの相同性の検索結果

	近縁種	相同性
Band01	<i>Staphylococcus sp.</i>	99%
Band02	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	100%
Band03	<i>Porphyromonas sp.</i>	100%
Band04	—	—
Band05	<i>Neisseria sp.</i>	97%
Band06	<i>Porphyromonadaceae bacterium</i>	100%
Band07	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	100%
Band08	<i>Ochrobactrum sp.</i>	99%
Band09	<i>Thiobacillus sp.</i>	48%
Band10	<i>Rhodocyclus sp.</i>	95%
Band11	—	—
Band12	<i>Sinorhizobium sp.</i>	99%
Band13	<i>Desulfovibrio sp.</i>	100%
Band14	—	—
Band15	—	—
Band16	<i>Desulfovibrio sp.</i>	100%

表 2. 共生系培地の培養状況

培地番号	汚泥投入	第1回植継ぎ	第2回植継ぎ	第3回植継ぎ	第4回植継ぎ	第5回植継ぎ	第6回植継ぎ
1	10月5日	10月16日	11月4日	12月5日	1月12日	—	—
2	10月5日	10月16日	11月4日	12月5日	1月12日	—	—
3	10月5日	10月19日	11月4日	12月5日	12月10日	1月12日	3月6日
4	10月5日	10月26日	11月4日	12月5日	12月10日	1月12日	3月6日

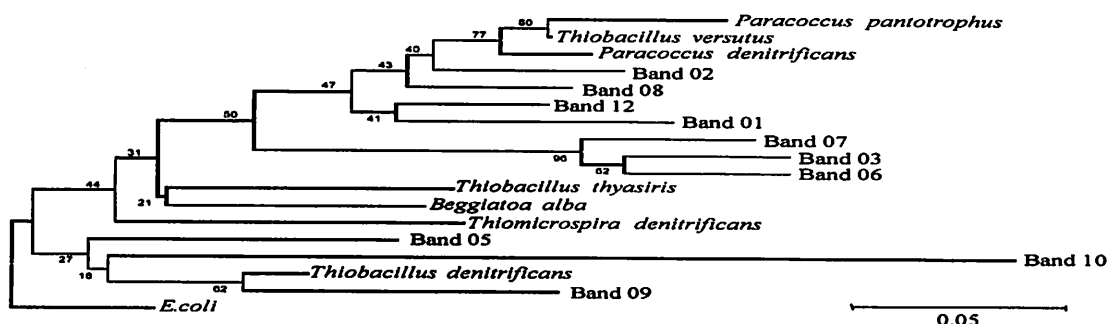


図3. サンプルと既存の硫黄脱窒素細菌から作成した系統樹

生し、硫黄の酸化還元サイクルにより脱窒素反応を進行している可能性が大きい。

果と合わせると、未知種の細菌である可能性がある。

(2) FISH法

図1にFISH法による硫酸還元細菌の検出した写真を示す。培地4の集積培養21日目のサンプルに対し、硫酸還元細菌を特異的に検出するプローブSRB385を用いて FISHを行った。図1では、DAPI染色によって各種さまざまな細菌が存在し、集積がかかっていることがわかる。しかし、硫酸還元細菌も少数ではあるが存在することがわかった。また、菌体のブーメラン型の特徴的な形状から *Desulfovibrio sp.* と推定した。

(3) PCR-DGGE法

図2にPCR-DGGEにより切り出したバンドを示す。培養日数が経過するにつれて菌種を表すバンド数が減少しており、集積がかかっていることを確認した。集積培養30日のサンプルから、16本のバンドを回収した。

(4) シーケンシング

表3にDGGEバンドの相同性の検索結果を示す。回収したバンドに含まれるDNAをPCRにより再び増幅させ、塩基配列を解読した。その結果と既知の細菌の16S rRNA遺伝子の相同性を比較した。表3は、各バンドから得られた塩基配列が、どのような既知の細菌と近縁種にあり、どのくらいの相同性があるかわかる。Band09からは、塩基配列が *Thiobacillus sp.* と48%しか相同性がなく、95%以上の相同性を得られるものはなかった。他のバンドからは、相同性が一致するものが検出できたが、いずれも、硫黄脱窒素細菌として単離された細菌ではない。

図3にサンプルと既知の硫黄脱窒素細菌から作成した系統樹を示す。相同性の結果の比較のために、サンプルと既知の硫黄脱窒素細菌の16S rRNA 遺伝子に基づいた系統樹を作成した。系統樹は図中の位置関係から近縁種かどうかのわかる。Band09と硫黄脱窒素細菌の *Thiobacillus denitrificans* は、他のバンドと比べ系統的に近いように見えるが9%程度離れている。相同性を調べた結

4. まとめ

硫黄の酸化還元サイクルを用いて脱窒素反応が行われている後段UASB槽の汚泥をサンプルとして採取し、共生培養法により集積をかけた結果、以下のような結果が得られた。

- ①集積培養中に、従来の培養法では見られない挙動を示した。
- ②FISH法とPCR-DGGE法により、硫黄脱窒素細菌の共生培養に必要不可欠な硫酸還元細菌の存在を確認することができた。
- ③PCR-DGGE法により、培養日数が経過するにつれて菌種を表すバンド数が減少しており、集積がかかっていることが確認できた。
- ④PCR-DGGE法により回収したバンドから、塩基配列を解読した。その結果と既知の細菌の16S rRNA遺伝子の相同性を比較した中に、48%しか相同性が得られないものがあつた。

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, pp.135-142,2003
- 2) 山崎慎一, 山口隆司, 荒木信夫, 角野晴彦, 原田秀樹, UASB-接触酸化下水処理システムにおける有機物と窒素の除去特性, 土木学会論文集, No.811/VII-38, pp.87-94,2006
- 3) R.I.Amann, In situ identification of micro organisms by whole cell hybridization with rRNA targeted nucleic acid probes.Molecular Microbial Ecology Manual, 3.3.6: 1-15,1995