

B-40 木質混合土壌中の硫酸塩還元微生物の探索

○中木原 江利¹・熊代 和也²・池本 良子^{1*}・高野 典礼³・山下 恭広⁴

¹金沢大学理工学域環境デザイン学類 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

²中央復建コンサルタンツ (〒533-0033 大阪市東淀川区東中島4丁目11番10号)

³石川工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒929-0392 石川県河北郡津幡町北中条タ1)

⁴(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 (〒305-0901 茨城県つくば市池の台2)

* E-mail: rikemoto@t.kanazawa-u.ac.jp

1. はじめに

硫酸塩は、硫黄化合物の中で最も安定な形態として存在しているが、自然界の硫黄循環においてこの硫酸塩を転換させる役割を担っているのが、硫酸塩還元微生物である。硫酸塩還元微生物の異化型硫酸塩還元反応は、液中の溶存酸素や硝酸塩の不足によって硫酸塩が酸素源もしくは電子受容体としての役割を果たし、硫化物(H_2S)に転換される反応である。硫酸塩還元反応に用いられる電子供与体もしくは炭素源としては、低分子重量の乳酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、ピルビン酸塩、酪酸塩、エタノールやその他のアルコールなどが一般的であり、それらの化合物のほとんどすべてが炭水化物、タンパク質などの嫌気的微生物分解による発酵産物である。一方、硫酸塩還元微生物は、セルロース分解能のある硫酸塩還元微生物が報告されている¹⁾。

本研究室では、間伐材チップを電子供与体として混合した脱窒土壌カラムにおいて、あらかじめ間伐材を脱窒条件および硫酸塩還元条件下で処理をした後に土壌に混合することにより、脱窒効果が高まることを報告している²⁾。しかし、これまで木質混合土壌中の微生物の群集構造については、ほとんど報告がない。そこで、本研究では、16S rDNA遺伝子(16S rDNA)および異化型亜硫酸還元酵素B(dissimilatory (bi) sulfite reductase B; dsrB)を標的としたNested PCR-DGGE法を用いることによって、木質混合土壌中の硫酸塩還元微生物の群集構造を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

(1) 実験に用いた木質混合土壌

実験には、約940日間、人工の農業排水路水の処理を行った4種類の土壌層を使用した。土壌層は、赤玉土400 gと腐葉土80 g、および木炭15 gを混合したものに、土壌2はあらかじめ純水で洗浄した広葉樹の間伐材を、土壌3は下水汚泥を種汚泥としてあらかじめ間伐材に脱窒細菌を増殖させたものを、土壌4はあらかじめ硫酸塩還元条件で間伐材内に微生物を増殖させたものをあわせて、カラムに充填し、20℃の恒温室内で、カラム上部から人工水路水(組成: KNO_3 : 5, $NaNO_3$: 20, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$: 200, $CaCl_2$: 150, K_2SO_4 : 30, Na_2SO_4 : 150, $MgSO_4$: 50, Na_2HPO_4 : 1.5 (単位: ppm))を空塔滞留時間24-72時間で通水を行った後、カラムを解体し、赤玉土、木炭、腐葉土由来の腐朽木および間伐材に分けて取り出した。

(2) 微生物群集解析

a) DNAの抽出法

土壌から取り出した赤玉土、木炭、腐葉土由来の腐朽木、間伐材をそれぞれ0.2 gについて、Ultra Clean Soil DNA kit (Mo Bio Laboratories, Inc., USA)を用いてDNA抽出を行なった。手順は同キットのプロトコルに従い、DNAの抽出、精製を行なった。

b) 16S rDNAを標的としたNested-PCR - DGGE法

土壌層内の微生物群集を把握するため、16S rDNAを標的としたNested PCR-DGGEも行なった。1回目のPCRでは、微生物の持つ16S rDNAのほぼ全長配列を標的とし、表1に示す616V及び630Rを用いて、抽出DNAを鋳型としたPCRを行なった。温度条件は94℃1分、(94℃40秒、52℃40秒、72℃90秒)×30サイクル、72℃10分とした。得られたPCR産物を用いてさらに、16S rDNAのV3領域を標的とし、表1に示すPrimer2及びPrimer 3 (GCクランプ付)を用いて2

FASTA 検索を行った結果、土壌 3 では、*Desulfobulbus rhabdiformis* (相同性 81.4%) などの不完全酸化型および *Desulfatibacillum alkenivorans* (相同性 78.1%) 等の完全酸化型の硫酸塩還元菌が検出された。土壌 4 よりも土壌 3 の方が硫酸塩還元細菌の多様性が高かった。

4. まとめ

脱窒条件および硫酸塩還元条件であらかじめ培養した間伐材を混合した土壌の 16S rDNA と *dsrB* に基づいた微生物群集解析を行った結果、以下のことが分かった。

(1) 木質内から抽出した微生物由来の DNA に、16S rDNA を標的とした Nested PCR-DGGE を適用することにより、微生物群集構造の違いによるバンドパターンを感度良く検出することができた。間伐材および腐朽木中に多様な微生物が存在していると推定された。

(2) 木質内から抽出した微生物由来の DNA に、*dsrB* を標的とした Nested PCR-DGGE を適用することにより、硫酸塩還元微生物を感度良く検出することができた。脱窒条件で前処理を行った間伐材を混合した土壌 3 では、不完全酸化型および完全酸化型の硫酸塩還元菌の近縁種が見られたのに対し、硫酸塩還元条件下で前処理した間伐材を混合した土壌 4 では、検出された硫酸塩還元菌のほとんどが、不完全酸化型であった。

<参考文献>

- 1) 金錫九・松井三郎・Sandeep Pareek・清水芳久：廃棄物埋立地における硫酸塩還元およびメタン生成経路によるセルロースの分解特性：回分実験，廃棄物学会論文誌，Vol. 9, No. 7, pp. 310-317, 1998
- 2) 天倉和也・高井淑恵・高野典礼・池本良子：微生物培養間伐材を混合した土壌層による窒素除去，第 44 回環境工学研究フォーラム講演集，pp. 113-115, 2007
- 3) Miletto M., Bodelier P. L. E. and Laanbroek H. J.: Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soil and sediments, *J. Microbiol. Methods* Vol. 70, pp. 103-111, 2007.
- 4) Wagner M., Roger A. J., Flax J. L., Brusseau G. A. and Stahl D. A.: Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration, *J. Bacteriol.* Vol. 180, pp. 2975-2982, 1998.
- 5) Loy A., Kusel K., Lehner A., Drake H. L. and Wagner M.: Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 70, pp. 6998-7009, 2004.
- 6) Geets J., Boremans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., van der Lelie D. and Vanbroekhoven K.: *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria, *J. Microbiol. Methods* Vol. 66, pp. 194-205, 2006.
- 7) Juretschko S., Timmermann G., Schmidt M., Schleifer K. H., Pommerening-Roos A., Kops H.-P. and Wagner M.: Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterial diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira-like* bacteria as dominant populations, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64, pp. 3042-3051, 1998.
- 8) Meyer G., Dewald E. C. and Ustachkin A. G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 59, pp. 695-700, 1993.

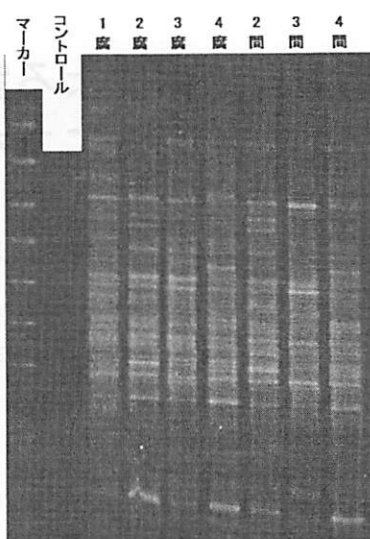


図 1 16S rDNA を標的とした Nested PCR-DGGE の電気泳動写真 腐；腐朽木，間；間伐材，上部の数字は，土壌カラムの番号を示す。

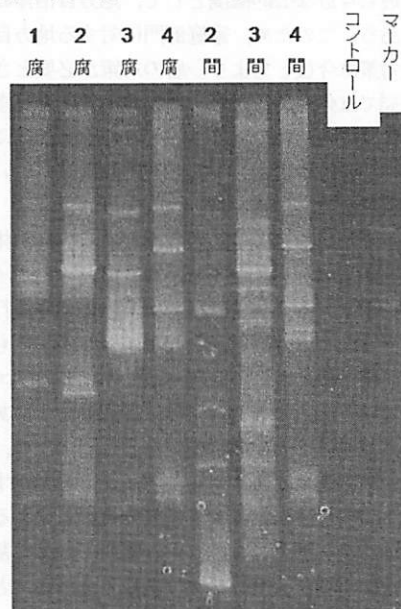


図 2 *dsrB* を標的とした Nested PCR-DGGE の電気泳動写真 腐；腐朽木，間；間伐材，上部の数字は，土壌カラムの番号を示す。