

B-28 共生培養法による 硫黄脱窒素細菌の分離培養

○佐藤祐一朗^{1*} 小林寛樹² 荒木信夫¹ 山崎慎一³ 山口隆司⁴

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

²エヌシーイー株式会社 (〒950-0964新潟県新潟市中央区網川原1丁目4番11号)

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)

⁴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)

*E-mail: araki@nagaoka-ct.ac.jp

1. はじめに

排水中には様々な形態の窒素化合物が存在しており、富栄養化現象の原因となっている。排水中の窒素除去には生物学的硝化脱窒素法が適用されているが、大量の下水処理には多くのエネルギーが消費されるため、低コスト、高効率化がもてめられている。そこで、脱窒素反応に有機物の添加を必要としない新規な処理システムとして、硫黄の酸化還元サイクルを用いた脱窒素法が提案されている。これは有機物除去と脱窒素反応を行う2槽のUp-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)槽と、硝化反応を行う接触酸化槽を組み合わせたシステムである。後段UASB槽内で独立栄養性の硫黄脱窒素細菌が脱窒素反応を行い、硫黄の酸化還元サイクルを達成している。

排水の脱窒素処理システムの高効率化を目指すためには、より多くの脱窒素細菌種の生態を把握し、処理に関わる有用な微生物を生息させる運転条件を確立する必要がある。硫黄脱窒素細菌は脱窒素反応において有機物を必要としないことから、排水処理に関わる微生物としてコストの面で有用である。さらに、これまでに報告された硫黄脱窒素細菌は約10種程度であるが、微生物の多様性から考えると、特定されていない硫黄脱窒素細菌が処理槽内で窒素除去に関わっていることが考えられる。

既知の硫黄脱窒素細菌は硝酸塩および還元型硫黄が比較的高い濃度での培地条件で単離されている。しかし、自然界では硫黄脱窒素細菌は還元型硫黄の濃度が低い条件下で、他の微生物と共生し生息していると考えられる。そこで本研究で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ない、未知の硫黄脱窒素細菌を単離、培養することを目的とした。

2. 実験方法

(1) 集積培養

サンプルは2基のUASB槽と接触酸化槽を組み合わせたシステム内で硫黄の酸化還元サイクルを用いて脱窒素を行っているUASB槽から採取した。培養方法は硫酸還元細菌を共生させて低濃度の還元型硫黄を硫黄脱窒素細菌に供給できる培地を用いた。使用した共生培地の組成は表1のSolution 1, 2, 3をそれぞれ作成し、混合して培地とした。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A-Dの4種の培地を作成し、それぞれ集積培養を行った。DAPIによる核酸の全菌染色を行い、細菌が増殖しているかを確認し、新しい培地に接種した。

表1 培地作成に用いた薬品溶液の組成表

培地記号		A	B	C	D
硝酸塩・硫酸塩濃度		1	1/2	1/5	1/10
Solution 1	KH ₂ PO ₄	2.0g	2.0g	2.0g	2.0g
	KNO ₃	2.0g	1.0g	0.4g	0.2g
	NH ₄ Cl	1.0g	1.0g	1.0g	1.0g
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.8g	0.4g	0.16g	0.08g
	Trace element	2.0ml	2.0ml	2.0ml	2.0ml
	Distilled water	980ml	980ml	980ml	980ml
Solution 2	NaHCO ₃	1.0g	1.0g	1.0g	1.0g
	Distilled water	20ml	20ml	20ml	20ml
Solution 3	FeSO ₄ ・7H ₂ O	2.0mg	1.0mg	0.4mg	0.2mg
	H ₂ SO ₄ (0.1N)	1.0ml	0.5ml	0.2ml	0.1ml
Solution 4	Na ₂ S ₂ O ₃ ・5H ₂ O			1.0g	0.5g
	Distilled water			8.0ml	4.0ml

(2) FISH 法による硫酸還元細菌の検出

共生培地内に硫酸還元細菌が存在しているか FISH を用いて確認した。FISH 法は Amann^③の方法に準拠した。Oligonucleotide プローブには Cy3 の蛍光標識を 5' 末端に標識したものを使用した。集積汚泥の固定には 4%パラホルムアルデヒドで 4℃、12 時間以上固定を行い、ハイブリダイゼーションは温度 40℃、Formamide(FA)濃度 40%で行い、プローブは硫酸還元細菌を特異的に検出できる既存の SRB385 を用いた。

(3) PCR-DGGE および Cloning による細菌種の特定

共生培地の集積汚泥からビードビーダー法により DNA 抽出を行った。抽出した DNA はキット(Q・BIOgene)を用いて精製した後、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的として、EUB341F-GC と UNIV907R のプライマーペアを用いて PCR 増幅した。PCR 増幅産物を用いて PCR-DGGE を行った。変性剤濃度勾配を 30-60%に設定した 6%ポリアクリルアミドゲルにて、130V、300min で電気泳動を行い、バンドを回収した。回収した DNA はマルチキャピラリー DNA 解析システム CEQ8000 (BECKMAN COULTER)を用いて 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読した。その後、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の BLAST を用いて解読した塩基配列と既知種との相同性を調べ、系統樹を作製した。

共生培地の集積汚泥から凍結融解法と Proteinase K を用いて DNA の抽出を行った。抽出した DNA は EUB341F と UNIV907R のプライマーペアを用いて PCR 増幅した。PCR 増幅した 16S rRNA 遺伝子をインビトロジェン TOPO TA Cloning Kit を用いて、プラスミドにインサートさせ、大腸菌に組込んだ。この大腸菌と S.O.C を LB 寒天培地に散布し、37℃で 24 時間培養を行った。その後、コロニーを採取し、LB 液体培地内にて 37℃で 24 時間培養し、16S rRNA 遺伝子が増幅されたクローンの遺伝子の塩基配列を解析した。その後は PCR-DGGE 法と同様に既知種との相同性を調べ、系統樹を作製した。

(4) 単離培養

硫黄脱窒素細菌の単離培地の組成は表 1 の Solution 1, 2, 3, 4 を混合し、培地とした。培地はロールチューブ法を用いてバイアル瓶壁に寒天培地を作成し、30℃で培養した。寒天培地で形成されたコロニーを回収し、液体単離培地に植え継いで二次培養を行った。DAPI 観察により細菌の増殖を確認した培地から、DNA の抽出とともに新しい培地に接種した。DNA の抽出には凍結融解法と Proteinase K を用いた。抽出した DNA は、EUB341F と UNIV907R を用いて PCR 増幅し、塩基配列の解析を行う。

3. 実験結果および考察

(1) 集積培養と硫酸還元細菌の確認

集積培養の状況を表 2 に示す。共生培地では培養の進行にしたがって培地内の汚泥が薄く膨化し、綿埃のような形状のフロックが確認できた。また、全ての共生培地においてレザズリンナトリウムが酸化雰囲気中のピンクに変色したことから、還元型硫黄が硫黄脱窒素反応によって硫酸塩に変化したことを示している。

FISH 法を用いて硫酸還元細菌が共生培地内に存在しているかを確認した。図 1 に示すように FISH 法で SRB385 プローブを用いて特異的に検出することができた。したがって、共生培地内では硫黄脱窒素細菌と硫酸還元細菌が共生し、硫黄の酸化還元サイクルにより脱窒素反応が進行していると判断した。

表 2 共生培地の培養状況

	植種	植継ぎ①	②	③	④	⑤
A	13day	32day	—	—	—	—
B	13day	32day	—	—	—	—
C	16day	32day	62day	67day	98day	153day
D	23day	32day	62day	67day	98day	153day

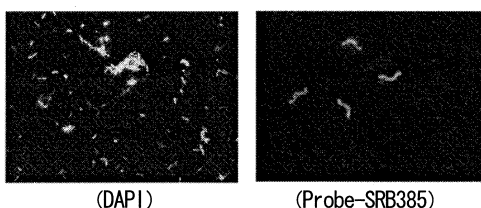


図 1 FISH 法による硫酸還元細菌の検出

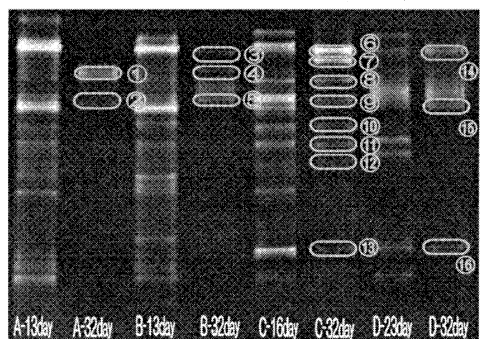


図2 PCR-DGGEにより切り出したバンド

(2) PCR-DGGE および Cloning による細菌種の特定

共生培地の集積汚泥に対して PCR-DGGE 解析を行った結果を図 2 に示す。培養日数の経過に伴い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。DGGE バンドの 16S rRNA 遺伝子と既知の硫黄脱窒素細菌の配列から作成した系統樹を図 3 に示す。Band08 と硫黄脱窒素細菌の *Paracoccus denitrificans* は 6%

程度しか離れておらず系統的に近縁である。また、硫酸還元細菌の *Desulfovibrio* sp. も検出されたことから、共生培地内で硫黄の酸化還元サイクルが達成されていると考えられる。

共生培地 C, D の集積汚泥に対して Cloning 解析を行い、既知の硫黄脱窒素細菌を加えて作成した系統樹を図 6 に示す。その結果、硫黄脱窒素細菌の *Thiobacillus delicatus* と系統的に近縁なクローン C-13, C-14, C-15 が検出された。また、*Paracoccus* sp. に近縁なクローンが培地 C から C-10, 培地 D から D-1 と両方の培地から検出された。

(3) 単離培養

硫黄脱窒素細菌の存在が確認できた培地 C, D に対して嫌気性の寒天培地で単離培養を行った。その後、寒天培地からコロニーを回収し、液体培地で二次培養を行った。複数の培地で菌体と思われる霞のような物質が形成していたことを視認した。さらに、DAPI 観察で数本の培地から菌体が確認できた。細菌が適度に増殖した培地から DNA を回収し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析を行う。

4. まとめ

- (1) FISH 法および PCR-DGGE 法により、硫酸還元細菌の存在を硝酸塩および硫酸塩の濃度の低い培地 C, D の両方から確認できたことから、集積培地内では硫黄の酸化還元サイクルが達成していたと考えられる。
- (2) Cloning 解析の結果、硫黄脱窒素細菌の *Thiobacillus delicatus* と系統的に近縁なクローンが培地 C から検出され、*Paracoccus* sp. と系統的に近縁なクローンが培地 C, D の両方から共通して検出された。
- (3) ロールチューブ法で作成した寒天培地を用いた単離培養から、液体培地による二次培養を行った結果、複数の培地で菌体と思われる霞のような物体が視認でき、DAPI による観察でも数本の培地で菌体が確認できた。

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

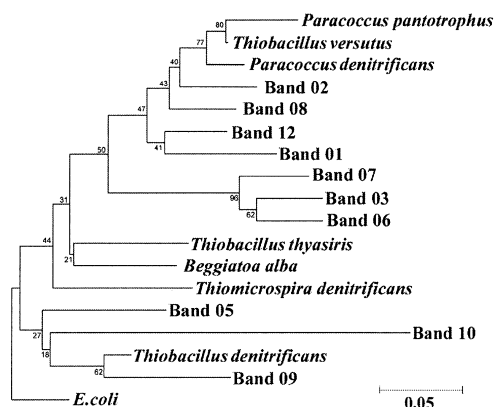


図3 PCR-DGGE 解析により集積汚泥と既知の硫黄脱窒素細菌から作成した系統樹

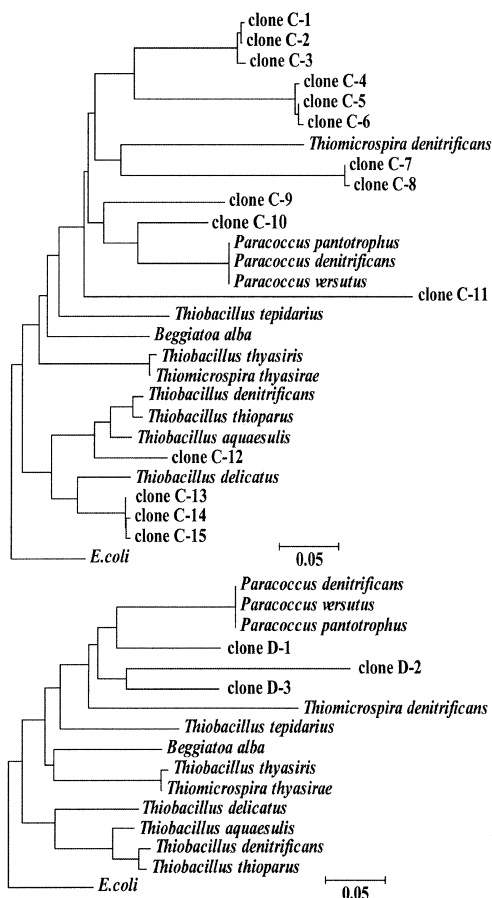


図4 Cloning 解析により培地 C (上) D (下) の集積汚泥と既知の硫黄脱窒素細菌から作成した系統樹