

Stable-isotope probing法を用いた脱窒細菌の特異的検出 ～機能遺伝子と16S rRNA遺伝子による評価～

おおさかとしふみ よしえさちこ つねだとし ひらたあきら いなもりゆうへい

○大坂利文¹, 吉江幸子¹, 常田聡¹, 平田彰¹, 稲森悠平²

¹早大・理工, ²国環研・循環セ

【目的】炭素源の乏しい廃水に対する効率的な脱窒プロセスの維持管理手法として、外部からの有機物添加がしばしば行われている。脱窒炭素源の選択は、主に経済性や扱いやすさという観点から行われており、必ずしも脱窒細菌の活性を考慮しているとは言えない。そこで、添加した脱窒炭素源を実際に利用しているアクティブな脱窒細菌を特定する必要がある。本研究では上記の点を鑑み、SIP(Stable-isotope-probing)法¹⁾を導入し、硝酸呼吸条件下でメタノールあるいは酢酸を利用する微生物群のDNAを獲得し、亜硝酸還元酵素遺伝子および16S rRNA遺伝子に基づいた系統解析を行うことで、活性汚泥内に存在するメタノール資化性脱窒細菌および酢酸資化性脱窒細菌の特定を試みた。

【方法】¹³C-メタノールまたは¹³C-酢酸ナトリウムを含む生活模擬排水に下水処理場の活性汚泥を添加し、十分懸濁させた後窒素ガスで曝気することで培地の溶存酸素を排除し、25℃で攪拌しながら脱窒回分培養を行った。経時的に微生物群をサンプリングし、微生物群から抽出したDNAを用いて、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法により、浮遊密度の高い¹³C-labelled DNAを分離した。透析により精製した¹³C-labelled DNA溶液を鋳型とし、亜硝酸還元酵素遺伝子*nirS*および*nirK*に特異的なプライマー²⁾と全真正細菌の16S rRNA遺伝子の特定領域をターゲットとするプライマーセットEub341f-Univ907r³⁾を用いてPCRを行い、つづいてPCR産物のサブクローニングを行った。得られたクローンの塩基配列をDNAシーケンサーにより決定し、NJ法により系統解析を行った。

【結果および考察】

亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirS*, *nirK*)に基づいた系統解析を行った結果、メタノール資化性脱窒細菌と酢酸資化性脱窒細菌の群集構造は大きく異なることが示された。また、16S rRNA遺伝子に基づいた系統解析を行ったところ、メタノール添加系ではMethylophilaceae科、Hyphomicrobiaceae科に近縁なクローンが多く検出され、酢酸添加系ではComamonadaceae科、Rhodocyclaceae科、Rhodobacteraceae科に近縁なクローンが多く検出された。検出された微生物の多くが脱窒能を有することが知られているが、それぞれの亜硝酸還元酵素遺伝子配列が獲得されていないのが現状であり、今後はこれら*nir*配列の獲得が課題である。

【引用文献】

- 1) S. Radajewski et al. (2000). Nature 403:646-649
- 2) G. Braker et al. (1998). Appl. Environ. Microbiol. 64:3769-3775
- 3) G. Muyzer et al. (1998). Molecular microbial ecology manual. 3.4.4:1-27

e-mail : stsuneda@waseda.jp (常田 聡)