

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760429

研究課題名(和文) 簡便・迅速なオンサイト型脱窒細菌生菌数計測法の開発と廃水処理精密管理への応用

研究課題名(英文) Development of rapid and simple method for on-site total viable count of denitrifying bacteria and its application to accurate control for wastewater treatment

研究代表者

山田 剛史 (YAMADA, Takeshi)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90533422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：脱窒プロセスの精密管理には、脱窒プロセス内の生菌数の情報が重要である。これまでに様々な技法が考案されたが、脱窒細菌を迅速・簡便に測定する技法は皆無であった。本研究では、この目的のために5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride (CTC) 法を応用することを考案した。nirSおよびnirK型脱窒細菌と活性汚泥を用いて、CTC濃度、CTC反応時間および硝酸呼吸阻害剤濃度を最適化した。その結果、CTC法の最適条件は、0.2mM CTC、反応時間1時間および1mM硝酸呼吸阻害剤であり、本CTC法を用いることで80%以上の脱窒細菌生菌数の計測が可能であった。

研究成果の概要(英文)：To accurately control the denitrification processes, information on numbers of viable microbes in the denitrification processes is very important. Although some methods have been known for this purpose, a rapid and simple technique is absolutely nothing for counting viable denitrifying bacteria in the processes. In this study, we consider to apply 5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride (CTC) method. Several nirS and nirK-type denitrifying bacteria and activated sludge under denitrifying conditions are prepared, and CTC concentration, CTC reaction time and the concentration of nitrate respiration inhibitor are optimized. The results revealed that the optimum conditions were 0.2 mM CTC, 1 h of reaction time and 1 mM of nitrate respiration inhibitor. Under the optimum condition, the CTC method could detect more than 80% of viable denitrifying bacteria in pure cultures and activated sludge.

研究分野：土木工学

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：CTC 脱窒細菌 廃水処理プロセス 微生物計測技術 プロセス管理技術

1. 研究開始当初の背景

生物学的脱窒プロセスは、無酸素環境下において脱窒細菌の異化反応($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)を巧みに利用し、廃水中の硝酸を除去する技術である。現在、実処理脱窒プロセスでは、pH、温度、処理負荷や硝酸除去率などの水質指標に基づいてのみで制御・管理されている。しかし、水質指標に基づいた管理では、実際に硝酸除去処理を担う脱窒細菌は、半ばブラックボックス的に扱われているのが現状である。そのため、脱窒細菌の特性に合う精密な制御・管理を行うことができておらず、ひとたび処理水質の低下などプロセス運転が悪化した場合、現状回復に多大な労力が要求される。プロセス運転を精密管理するには、水質指標のみならず、プロセス内で硝酸除去を実際に担う脱窒細菌も指標化し、水質と微生物の両輪で行う相互補完的な管理体制が必要不可欠である。しかしながら、現在のところ、オンサイトで脱窒細菌の生菌数を迅速・簡便に計測する技術は皆無であり、当該技術の必要性が高まっている。

そこで本研究では、微生物に関する専門的知識を持たないユーザーが使用することを想定して、(1)「簡便な操作性」、(2)「迅速な検出」、および(3)「オンサイトで測定可能」という研究開発コンセプトを掲げて本計測技術の確立を目指すことにした。CTC法は、微生物が有機物から引き抜いた電子によって、CTCが還元されて不溶性蛍光物質(CTCフォルマザン)の細胞内蓄積を顕微鏡下で観察することで、微生物の呼吸活性(生菌数)を評価する手法である。これまで、CTC法は、好気性細の呼吸活性菌数の計測に広く使われてきた(Microbes & Environ. 19:61-70 [2004]) (Microbes & Environ. 21:272-277 [2006]) が、脱窒細菌の生菌数計測に応用された事例は見当たらない。申請者は、硝酸呼吸とCTCの酸化還元電位の関係から、脱窒条件下においてもCTC法による生菌数測定が可能であると予測した。そこで、CTC法で使われる酸素呼吸阻害剤を脱窒細菌の硝酸呼吸阻害剤に変えることで、脱窒細菌由来の硝酸呼吸に伴ったCTCフォルマザンの微量蛍光(反応時間:24時間)を蛍光顕微鏡下で観察することに成功した。

2. 研究の目的

本研究では、CTC法を計測原理とする上で、(1)CTC法の染色感度の向上、(2)測定時間の短縮化および(3)細胞から剥離した蛍光性CTCフォルマザンが擬陽性生菌数として計測される問題の克服である。申請者は、上述した(1)と(2)の問題を克服するために、効率的なCTC反応方法と様々な硝酸呼吸阻害剤を調査し、染色感度向上と測定時間の短縮に向けた研究を展開する。(3)の問題の克服には、脱窒細菌の細胞表層タンパクに特異的に結合する核酸アプタマーを採用する。蛍光物

質を付加した核酸アプタマー(J. Appl. Microbiol. 109:807-819 [2010])を用いることにより、脱窒細菌の2重染色が可能となり、擬陽性生菌数の計測を防げるのではないかと考えた。また、CTCやアプタマーによる微生物検出は細胞固定処理などの前処理を必要としないため、オンサイトでサンプルと試薬を混ぜるだけの簡便性を達成できる。本研究では、これらの問題点の克服を達成し、オンサイトで簡便・迅速に計測できる脱窒細菌生菌数の計測原理の構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脱窒細菌の純菌株を用いたCTC反応条件の最適化

硝酸呼吸に基づくCTC還元反応の最適条件の評価は、*nirS*型および*nirK*型の数種の脱窒細菌を用いて行った。CTC反応の最適条件を検討するために、CTC濃度、反応時間および呼吸阻害剤の種類や濃度をそれぞれ操作した。CTC反応に用いた脱窒細菌は、脱窒条件下において培養を行なった対数増殖期にあるものを使用した。硝酸呼吸下のCTC反応は、MOPS緩衝液(pH 6.5)で洗浄した菌体懸濁液をバイアル内に入れ、アルゴンガスを封入して密栓した後、25°Cでインキュベートしながら行った。CTC染色率は、蛍光顕微鏡下で計測したCTC陽性菌数をSYBR Green Iで染色した全菌染色数で除して算出した。CTC法とfluorescence *in situ* hybridization (FISH)法の同時検出は、数種の脱窒細菌を用いて検討した。FISH法で使用したDNAプローブは、細菌を標的とするEUB338プローブを用いた。

(2) 廃水処理プロセス内活性汚泥を用いた脱窒細菌の生菌数計測

廃水処理プロセス内における脱窒細菌の生菌数計測は、グルコースを単一の電子供与体として運転したラボスケール回分式脱窒プロセス内の活性汚泥(MLSS: 2,000 mg/l)を用いた。本プロセスは、約2ヶ月間に亘り、良好な硝酸除去速度と硝酸除去効率で運転されていた。CTC反応条件(CTC濃度、反応時間および呼吸阻害剤の種類や濃度)は、活性汚泥でも同様に評価した。

4. 研究成果

(1) 脱窒細菌の純菌株を用いたCTC反応条件の最適化

*nirS*型および*nirK*型の数種の脱窒細菌を用いてCTC法の最適化を行った。まず、CTC濃度1 mMおよび硝酸呼吸阻害剤なしの条件下においてCTC反応時間(1~72時間)の検討を行ったところ、いずれの反応時間においても90%以上のCTC染色率を示した。そのため本研究では、迅速な測定を測る上で、CTC反応時間を1時間とした。次に、CTC濃度の検討を行った。その結果、硝酸呼吸阻害剤を添加せずにCTC濃度を1 mM以上にするこ

によって、脱窒細菌の純粋株の 90%以上が、細胞内に蛍光性 CTC フォルマザンを蓄積していることが観察された。このことは、CTC 濃度を過剰に添加することによって、偽陽性細菌であっても CTC 陽性菌として検出されることを示していた。そこで、硝酸呼吸に由来する CTC 染色菌を明確に計測するためには、硝酸呼吸阻害剤を使用するとともに、CTC 濃度 0.1~0.2mM 程度とすることが重要であることが分かった。さらに本研究では、様々な硝酸呼吸阻害剤を用いて、硝酸呼吸に由来する CTC 染色菌率が増加するかを評価した。その結果、シアン化カリウムやアジ化ナトリウムを硝酸呼吸阻害剤として使用した場合、CTC 染色率を高める効果は無かったが、diethyldithio carbamate (DDC) を 0.5~1 mM 程度添加することにより、*nirS* 型および *nirKg* 型脱窒細菌いずれの場合でも、染色効率の差異は見られるものの、CTC 染色率を高める効果が確認できた。これらの結果は、本研究で開発を試みた新規 CTC 法は、DDC を硝酸呼吸阻害剤として使用することによって、脱窒細菌の生菌数を計測法として利用できることを示していた。

本研究では、アプタマーを用いた CTC 法との 2 重染色法の評価は達成することができなかった。しかしながら、硝酸呼吸に基づく CTC 陽性菌と検出される脱窒細菌に対して、従来の FISH 法による同時検出が可能かについて評価した。しかしながら、FISH 法による脱水過程において CTC フォルマザンが溶出するため、80%EtOH において数秒の脱水過程後、FISH 法を行うことが望ましいことが分かった。EUB338 プローブを用いた FISH 法による同時検出を行った結果、同一視野において、CTC フォルマザンとプローブ由来の蛍光を観察することに成功した。このことは、細胞レベルで脱窒細菌の呼吸活性と系統学的同定が同時に評価できることを示していた。この結果は、アプタマーを利用した CTC との 2 重染色を行う際にも応用可能であり、これらの 2 重染色の可能性を示唆する結果であった。

(2) 廃水処理プロセス内活性汚泥を用いた脱窒細菌の生菌数計測

脱窒プロセス内の脱窒細菌が、上記で決定した CTC 反応条件で検出可能かについて評価した。その結果、DDC (1 mM) を添加することにより、CTC 濃度 (0.2mM)、CTC 反応時間 (1 時間) で 80 %以上の脱窒細菌の生菌数を測定することができた。これは、通常の脱窒プロセス内の活性汚泥は、*nirS* 型脱窒細菌が優占しているケースが多いためであると考えられる。従って、本技法は、脱窒プロセス内の脱窒細菌の生菌数を測定する上で有効な方法であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kobayashi, K., T. Yamada, A. Hiraishi and S. Nakauchi. Real-time optical monitoring of microbial growth using optimal combination of light-emitting diodes. *Opt. Eng.*, vol. 51 (12): p123201 (1-8) (2012) 査読有

[学会発表](計 11 件)

山田剛史, 松本周平, 平岡知也, 平石明. 廃水処理プロセス内における脱窒細菌生菌数の迅速・簡便測定法の開発. 第 48 回日本水環境学会. 2014 年 3 月 17~19 日. 東北大学

柿内涼太, 川上周司, 山口剛士, 山田剛史, 山口隆司. アプタマーを用いた微生物の酵素の検出. 第 48 回日本水環境学会. 2014 年 3 月 17~19 日. 東北大学

岡拓磨, 川上周司, 山口剛士, 山田剛史, 山口隆司. In situ HCR 法を用いた活性汚泥中に生息する未培養微生物の検出. 第 48 回日本水環境学会. 2014 年 3 月 17~19 日. 東北大学

山田剛史, 松本周平, 平岡知也, 平石明. CTC 法と FISH 法によるシングルセルレベルでの高活性脱窒細菌の同時検出. 第 29 回日本微生物生態学会. 2013 年 11 月 23~25 日. 鹿児島大学

山田剛史, 平岡知也, 松本周平, 平石明. FISH 法と CTC 法を併用した脱窒細菌の細胞レベルでの同時検出. 環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会. 2013 年 5 月 30~6 月 1 日. 北九州国際会議場

平岡知也, 山田剛史, 平石明. 脱窒細菌生菌数の迅速・簡便測定法の開発. 第 47 回日本水環境学会. 2013 年 3 月 11~13 日. 大阪工業大学

松本周平, 山田剛史, 平石明. 生物学的脱窒反応槽内の脱窒細菌の細胞レベルでの蛍光検出法の開発. 2013 年 3 月 11~13 日. 大阪工業大学

Matsumoto, S., T. Yamada and Akira Hiraishi. Development of a nitrite reductase gene-targeted fluorescence detection method for denitrifying bacteria. The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology. 2012 年 9 月 19~22 日. 豊橋技術科学大学

Yamada, T., Z. Kawashima, T. Hiraoka and A. Hiraishi. Development of rapid and simple method for total viable count of denitrifying bacteria in wastewater treatment processes. The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology. 2012 年 9 月 19~22 日. 豊橋技術科学大学

山田剛史, 川島淳一, 松本周平, 平石明. 廃水処理プロセスにおける脱窒細菌の迅速・簡便な生菌数計測法の開発. 土木学会全国大会 第 67 回年次学術講演会(平成 24 年度). 2012 年 9 月 5~7 日. 名古屋大

学

松本周平, 山田剛史, 平石明. 亜硝酸還元酵素遺伝子を標的とした蛍光検出法による脱窒細菌の検出. 環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会. 2012 年 6 月 25 ~26 日. 京都大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://ens.tut.ac.jp/microbes/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 剛史 (YAMADA TAKESHI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90533422

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし