

## リアルタイム PCR を用いた脱窒関連酵素遺伝子のモニタリング

## A real-time PCR method for monitoring denitrification gene

○安元純・高田遼吾・廣瀬美奈・細野高啓

YASUMOTO Jun\*, TAKADA Ryogo\*\*, HIROSE Mina\*\*\*, HOSONO Takahiro\*\*\*\*

## 1. はじめに

近年、人間活動に伴う硝酸性窒素 (NO<sub>3</sub>-N) 等による地下水汚染が世界的に問題になっており、沖縄県内においても顕在化している。ここ数年、分子生物学的手法を用いた遺伝子解析技術が、環境中に存在する微生物相解析に応用されているが、硝酸性窒素汚染を対象にしたものは非常に少ない。これまで、指標とされてきた無機窒素 (IN)、全有機炭素 (TOC)、無機炭素 (IC)、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP) 及び硝酸中の窒素・酸素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ・ $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) に加え、遺伝子解析等により脱窒に関わる微生物量を直接確かめることが出来れば、脱窒による窒素除去量を定量的に把握するための有益な情報となる。

本研究では、硝酸性窒素の脱窒現象に着目し、リアルタイム PCR を用い、脱窒に係る微生物相解析と脱窒関連遺伝子である亜硝酸還元酵素遺伝子 (nirS) の定量分析を実施し、脱窒過程における地下水中の nirS/nirK の DNA コピー数の変動特性を把握することを目的とした。さらに、硝酸性窒素 (NO<sub>3</sub>-N) や硝酸イオン中の窒素・酸素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ・ $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) の分析結果と比較することで、両手法の脱窒の評価に係る相違点について検討した。

## 2. 実験方法

図 1 にカラム実験装置を示す。土壌及び琉球石灰岩を層状に充填したカラムに、沖縄本島南部地域で採取した湧水を下方から通水し、上方からの排出水をフラクシオンコレクターで一定時間毎に採水し、分画時間毎の排出量から流量を測定した。実験に使用したカラムは、高さ 70cm、内径 7cm のアクリル製で、0.26cm ふるいを通過した琉球石灰岩をカラムの底から高さ約 31cm まで充填し、石灰岩の上に沖縄本島南部の圃場で採取した土壌を、高さ約 33cm 充填した。石灰岩および土壌の間隙率はそれぞれ 0.54, 0.53 で充填した。水質の分析項目は、nirS の DNA コピー数、無機態窒素を含む主要陽・陰イオン、TOC、IC、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  を選出した。また、カラムには水温および酸化還元電位 (ORP) を測定するための電極を計 9 地点に設置した。ORP 計は、石灰岩充填部分に下方から①～④の順に 4 点設置し、土壌充填部に下方から⑤～⑨の順に 5 点設置した。フラクシオンコレクターで採水した水は、滅菌した 0.2 $\mu\text{m}$  のフィルターで一定量吸引ろ過し、ろ過フィルターを 2mL の TE 緩衝液に浸し冷凍保存し、DNA 抽出用のサンプルとした。なお、DNA 抽出は PCR-DEEG による土壌細菌・糸状菌相解析法 (農業環境技術研究所, 2010) に記された Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いた抽出法で行った。

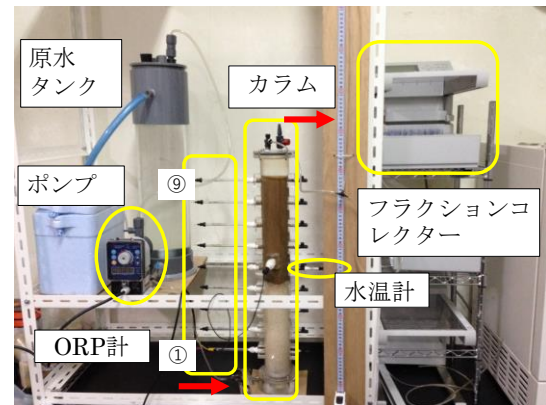


図 1 地下水試料採水地点

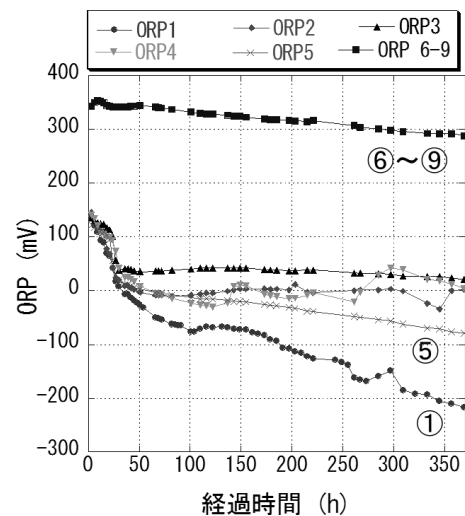


図 2 各 ORP 計の経時変化

\*琉球大学農学部地域農業工学科 Faculty of Agriculture University of The Ryukyus, \*\*信州大学大学院, \*\*\*一社トロピカルテクノプラス, \*\*\*\*熊本大学大学院先端機構, キーワード: リアルタイム PCR, 脱窒, 亜硝酸還元酵素遺伝子

### 3. 結果及び考察

図2に各ORP計の経時変化を示す。⑥～⑨石灰岩充填部の平均値は若干の減少はみられるものの、300mV前後と高い値を示し、実験期間中は還元的環境には至らなかった。それに対し、土壌充填部では実験開始直後に急激な減少がみられ、カラム内の測定場所によって酸化還元環境に差異はみられるものの、最も低いところでは-222mVまで減少し、還元的な環境の形成が確認された。

図3にNO<sub>3</sub>-N濃度、TOC、IC、流量の経時変化を示す。実験開始後、NO<sub>3</sub>-N濃度は減少し、経過時間が221時間を超過したあたりから検出限界以下になった。脱窒の電子供与体となるTOCは、カラム通過前後で3~5倍程度増加しており、流速の減少に伴い増加する傾向がみられた。一方、脱窒の副産物であるICは、NO<sub>3</sub>-N濃度の減少やTOCの増加に伴い増加する傾向がみられた。以上より、カラムの土壌充填部分で脱窒が生じたと推測される。また、石灰岩帯水における脱窒の反応条件として、有機物の供給の重要性が明らかになった。

図4にnirSのDNAコピー数及び水温の経時変化を示す。nirSのDNAコピー数はNO<sub>3</sub>-Nの減少に伴い上昇がみられ、最大値は、NO<sub>3</sub>-N濃度が検出されなくなった345時間後に2.89×10<sup>6</sup> (copies/1mL of sample)となった。また、気温の変化によりカラム内の水温が急激に低下した際にはNO<sub>3</sub>-N濃度の減少はみられなくなり、nirSのDNAコピー数は検出限界付近まで低下した。その後、NO<sub>3</sub>-N濃度の減少と共にnirSのDNAコピー数の上昇が確認された。

図5 nirSのDNAコピー数と<sup>15</sup>N<sub>NO3</sub>-・<sup>18</sup>O<sub>NO3</sub>-の経時変化を示す。<sup>δ15</sup>N<sub>NO3</sub>-・<sup>δ18</sup>O<sub>NO3</sub>-の値は、NO<sub>3</sub>-Nの減少に伴い上昇がみられ、脱窒に伴う同位体分別効果が確認された。<sup>δ15</sup>N<sub>NO3</sub>-・<sup>δ18</sup>O<sub>NO3</sub>-の値はNO<sub>3</sub>-Nの減少と共に上昇し、nirSのDNAコピー数が検出限界になった水温低下時にも高い値を維持し、NO<sub>3</sub>-Nが完全に無くなると測定不能になった。

### 4. まとめ

脱窒過程における亜硝酸還元酵素遺伝子nirSの変動特性の把握ができた。また、nirSと<sup>δ15</sup>N<sub>NO3</sub>-・<sup>δ18</sup>O<sub>NO3</sub>-との脱窒の指標としての違いが明らかとなった。

### 5. 参考文献

農業環境技術研究所 (2010) : PCR-DGGE法による土壌細菌・糸状菌相解析 Ver. 3.3 2010年6月10日改。

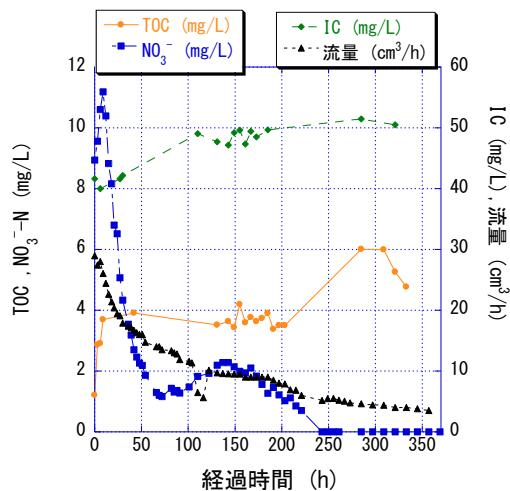


図3 NO<sub>3</sub>-N濃度, TOC, IC, 流量の経時変化

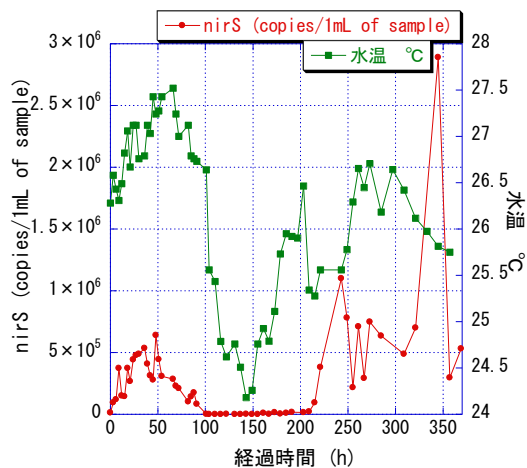


図4 nirS及び水温の経時変化

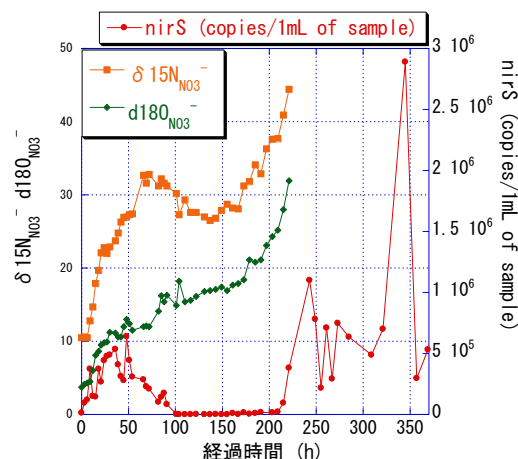


図5 nirSと<sup>15</sup>N<sub>NO3</sub>-・<sup>18</sup>O<sub>NO3</sub>-の経時変化