

< 研究発表 >

活性汚泥における微生物モニタリングとその応用

大泉由紀、江崎聡、倉根隆一郎

株式会社クボタ 技術開発部(〒661-8567 兵庫県尼崎市浜1-1-1 E-mail:rkurane@kubota.co.jp)

概要

近年の遺伝子工学の発達により、従来ブラックボックスとされてきた活性汚泥中において、分解に関与する微生物の特定や動態の調査が行なえるようになってきた。本研究では、我々が新たに単離した複数の高効率分解菌に関して、活性汚泥中における挙動のモニタリングを DNA 修復遺伝子の一種 *gyrB* (DNA gyrase subunit B) 遺伝子を用いて行なっているその結果を報告する。菌のモニタリング結果を受けた廃水処理の運転制御に関しても検討中である。

また、環境サンプルの遺伝子モニタリングの簡便化・省力化・高精度化を目指して、DNA チップによる菌の検出・解析法(実験操作の自動化)を開発中なので併せて報告する。

キーワード: 活性汚泥、モニタリング、DNA gyrase、DNA チップ

1. はじめに

工場廃水や家庭下水といった排水の処理は、その大部分が何らかの微生物を用いて行われている。特に、活性汚泥法は古くから使用されている方法であるが、そのコントロール等については主に環境工学的アプローチからなされてきた。その結果、活性汚泥そのものをブラックボックスとして扱い、負荷・槽のサイズ・HRT・DO・pH 等の物理化学的条件を変数として最適運転条件を求め、という制御が用いられてきている。

前述のように、活性汚泥法において物質分解を行なっているのは微生物である。そのため、より高度な制御を目的として微生物の立場からのアプローチ法が最近活発になってきている。すなわち、経時的に微生物の動態をモニタリングしていくことで負荷・温度・DO 等の運転条件との相関関係を求めていく手法である。このように、微生物(単体又は“群”)の挙動と槽全体の動態との関係を調査し、現在の槽の運転状態の適否を知ること、そしてそれを運転条件にフィードバックすることで、最適の運転状態を維持することが出来ると期待されている。

2. 活性汚泥中の微生物を「知る」方法

活性汚泥のような「微生物群」において(特定又は群全体の)微生物の動態を調べる方法としては①固形培地上にまいて培養し、コロニーとして検出してその数を調べる②特定の菌が生産する物質を ELISA や液体クロマトグラフィーその他を用いて検出する③微生物の持つ DNA の共通配列、または変異部分を用いて検出する などの方法がある。

今回我々が用いたのは③の方法である。DNA は全ての(微)生物に含まれており、なおかつ全ての種間に特有の違いがあることから、網羅的検出と特異的検出のどちらにも使用できると考えたからである。なお、今回のモニタリングでの

検出対象微生物は①～③の方法を並列して用いて分解活性の高い細菌を単離、特定したものである。

3. 分解菌の特異的検出方法

3-1 分解菌特異的モニタリング用領域の選択

細菌の DNA を調べる際、良く用いられるのが 16SrRNA(リボソーム RNA)遺伝子¹⁾である。この配列は全てのバクテリアが持っていること、広範囲のバクテリアに存在する「保存領域(conservative region、C 領域)」と種によって異なる「変異領域(Variable region、V 領域)」とがあるため網羅的解析と特異的解析の両方が行なえる、古くから利用されてきた領域であるためデータベースが充実しており、PCR(Polymerase Chain Reaction)プライマーやハイブリダイゼーション検出用プローブの知見が豊富なこと、といった特徴がある。我々も単離菌の種の特定などにはこの領域を用いている。しかしながら比較的進化速度が遅く、種内の変異が少ないことからより近縁の菌と区別する、特異的な検出にはやや使い難いところがあった。

今回我々がモニタリングに用いたのは DNA gyrase(ジャイレース)遺伝子の B サブユニットである。DNA gyrase とは II 型 DNA topoisomerase に属する酵素で、DNA 複製時に二重らせんに切れ目を入れ、らせんのまき戻しを行なうという役目を持っている。このように重要な役割を持つ酵素なので全ての細菌が持っており、ある程度の共通領域も見られる²⁾。一方で 16SrDNA 遺伝子より進化速度が速いことが早く、近縁の菌間の変異が蓄積しているという特徴がある³⁾。遺伝的にはごく近縁の菌でも、その特性、特に物質分解プロファイルに差があることは良く知られており、今回我々が単離した菌を正確にモニタリングするためにはできるだけ特異的な DNA 領域を使用する必要があったので本遺伝子を選択した。

3-2 gyrB 遺伝子の DNA プライマーの設計

活性汚泥中に存在する様々な菌の中から特定のモニタリング対象菌を検出するために、対象菌特異的なプライマーを用いた PCR を行なった。このプライマーの設計には、「その菌にしかない DNA の配列」を知ることが必要となる。そのために、まず保存配列を用いた PCR を行い、ある程度の長さの gyrB 遺伝子領域を増幅して配列を決定した。その上でその配列をデータベースと照合して「その菌特異的」な DNA 領域を突き止め、この部分を対象菌特異的プライマーとして用いることとした。なお、保存配列として用いたのは以下の配列である(参考文献³⁾のプライマーを改変)。

gyrB-F 5'-CAYGCNCGNGGNAARTTYGA-3'

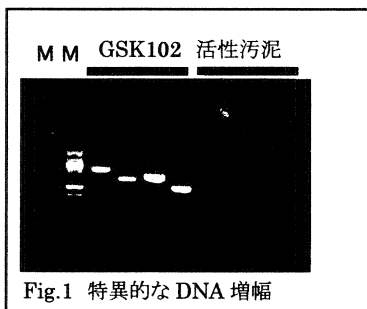
gyrB-R 5'-CCRTCACRTCNGCRTCNGTCAT-3'

前述の一晚培養液を、95℃5分熱処理したものを PCR のテンプレートとし、上記プライマーにて PCR を行なった。菌によって PCR 条件は異なっていたものの、上記プライマーにて 6 菌株全てで 1kb 強の増幅産物を得ることができた。この増幅産物の全長シーケンスを求め、それぞれの菌に特異的な PCR プライマーを設計した。

3-3 特異的プライマーを用いた分解菌の検出

3-2 のようにして設計した菌特異的 PCR プライマーは対象菌培養液と人工下水馴養活性汚泥(し尿処理汚泥由来)それぞれより抽出した DNA をテンプレートにして PCR を行なった。

その結果、対象菌が存在する時のみ DNA の増幅が見られることを確認した(Fig.1)。現在、それぞれのプライマーに関して、汚泥中に含まれる検出対象菌の検出感度を調査中である。



を用いた検出を行えるようになるため、処理現場での DNA 分析の活用も現実的になると考えている。

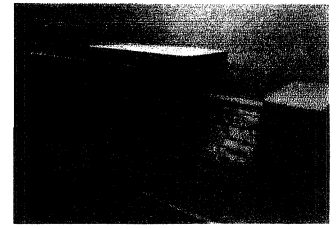


Fig.2-1 全自動遺伝子検出機器外観

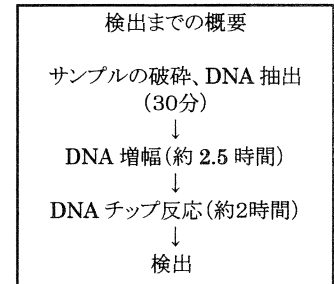


Fig.2-2 全自動遺伝子検出機器による DNA 検出の概要

[参考文献]

- 1) Picard, C. et al. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2717-2722 (1992).
- 2) Huang, WM. Annu Rev Genet. 30:79-107(1997)
- 3) Yamamoto, S and Harayama, S. Appl. Environ. Microbiol. 61:1104-1109 (1995)

4. DNA モニタリングの迅速化、簡便化を目指した取り組み

今回開発した活性汚泥槽の分解菌モニタリングは、微生物相と分解活性とを関連付けて、運転状態の把握・良好な分解活性の維持に用いることを最終目的にしている。そのためには迅速かつ現場でも可能なモニタリング方法が必要になると考えている。しかし DNA モニタリングはある程度細かい実験操作が必要であり、しかも結果が出るまで(培養法よりは短いものの)一日程度かかる。これらが環境領域で普及しない原因ともなっている。

そこで、我々は DNA モニタリングに自社開発の全自動遺伝子検査機器を用いることを検討している(Fig.2)。

本機器を用いることで、サンプルから全自動で DNA チップ