

メタン生成菌を対象とした 16S rDNA の微生物指標への適用に関する検討

京都大学工学研究科 学生員 ○岩倉一生 正員 越川博元
 洪鋒 正員 津野洋

1. 背景と研究目的

生物処理において、微生物量を把握することは重要である。微生物量を表す指標として、従来から浮遊性固形物(SS)、ATPなどが主に用いられてきた。SS濃度の測定は容易ではあるが、微生物以外の浮遊性固形物も対象となるため、微生物以外のSS成分が多い場合には適用が困難である。またATPは細胞内のエネルギー伝達物質であることから生細胞のみを対象とできるが、特定の微生物や種類別にATP濃度を測定することは困難である。一方、16S rDNAは微生物の種類ごとに特有の塩基配列を有することから、微生物の分類などにも適用されている。本研究では、混合培養系のなかからターゲットとする微生物のみを検出し、さらにその定量をおこなうことを目的として、ターゲットとする微生物が有する16S rDNAについて検出および定量をおこない、新たな微生物指標としての16S rDNAの適用性について検討することとした。

2. 実験方法

本研究では混合培養系でかつSSに微生物以外の浮遊物質が含まれるメタン発酵リアクターを対象として選択した。リアクターから回収されるメタンガスはメタン生成菌の活動の結果であると考えることができる。そこでメタン生成菌を対象としてその16S rDNA量を定量し、メタンガス発生速度(1日あたりの発生量)との対応についてSSおよびATPとの比較をおこなった。メタン生成菌は酢酸資化性のグループと水素資化性のグループとに大別されるが、本研究では酢酸資化性のものとして *Methanosarcinales* 目の菌を、水素資化性のものとして *Methanobacteriaceae* 科の菌をそれぞれターゲットとした。

2.1 メタン発酵リアクター

本研究で取り扱ったメタン発酵リアクターの装置図を図1に示す。リアクターの有効容積は20Lで、ウォータージャケットにより内部の温度は常時55℃に調節されている。基質には粉碎生ごみを使用している。1年以上にわたりリアクターを連続運転しており、本研究でサンプリングを行った期間における運転条件は以下に示すとおりである。すなわち、基質は約24時間ごとに投入し、一回あたりの投入量はCOD_C換算で5.26[kgCOD_C/m³]とした。また水理学的滞留時間は43.9日で、汚泥の返送は行わなかった。

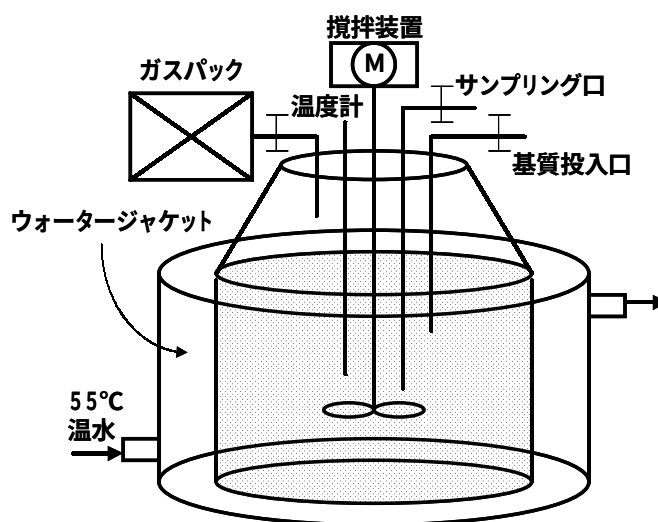


図1 メタン発酵リアクター

2.2 SS

下水試験方法に示されているガラス繊維ろ紙法により、消化汚泥についてSSの濃度を測定した¹⁾。

2.3 ATP

消化汚泥からのATPの抽出とその濃度の測定にはATP抽出キットおよびATP発光キット（いずれも東洋インキ製造株式会社製）を使用した。試料と同様の手順に従いATP濃度既知の標準

表1 プライマーセット

	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>Methanosarcinales</i>	MSMX860f(Raskin et al. ²⁾)	1406r(Lane ³⁾)
<i>Methanobacteriaceae</i>	MB1174f(Raskin et al. ²⁾)	1406r(Lane ³⁾)

表2 PCR温度条件

	変性	アニーリング	伸長
<i>Methanosarcinales</i>	95℃ (10sec)	64℃ (10sec)	72℃ (30sec)
<i>Methanobacteriaceae</i>	95℃ (10sec)	62℃ (10sec)	72℃ (30sec)

キーワード：メタン生成菌、指標、16S rDNA、Real Time PCR

〒520-0811 滋賀県大津市由美浜1-2 環境質制御研究センター

Tel：077-527-6220 Fax：077-524-9869

溶液の希釈列について測定を行い、検量線を作成し、これをもとに試料の ATP 濃度を求めた。

2.4 16S rDNA

消化汚泥から DNeasy Tissue Kit(QIAGEN 社製)により高分子 DNA を抽出し、これを鋳型 DNA として LightCycler(ロシュ社製)を用いて Real Time PCR を行った。使用したプライマーセットを表 1 に、設定した温度条件を表 2 に示す。外部標準 DNA には以下に示す手順で調製した DNA 断片を使用した。すなわち、表 1 に示したプライマーセットを使用して表 2 の条件で PCR を行い、増幅された DNA 断片を精製して外部標準 DNA とした。外部標準 DNA 溶液の濃度は波長 260 nm における吸光度を測定することにより求めた。

3. 結果と考察

図 2 に SS、ATP、16S rDNA それぞれの濃度の測定結果(白点)と 1 日あたりのメタンガス発生量(黒点)とを対応させて示す。16S rDNA 濃度にはターゲットとした 2 種類のメタン生成菌についての和を示している。メタンガス発生速度がほぼ一定であるのに対し SS および ATP 濃度は約 2 倍に増加しており、一方で 16S rDNA 濃度は減少傾向にあるものの、本研究で取り扱った期間においては、SS、ATP と比較すると 16S rDNA 濃度はメタンガスの発生速度に比較的良好に対応しているといえる。

図 3 にはターゲットとした菌についての 16S rDNA 濃度の和を白点で、それぞれの 16S rDNA 濃度を黒点で示している。先に示したように、本研究で取り扱ったメタン生成菌群は全体として減少する傾向にあるものの、個々については一方の菌の 16S rDNA 量が増加している期間においては他方が減少している様子が伺える。これは系内における微生物群集の動的な変化を追跡できる可能性をも示している。

4. 結論

メタン生成菌についての 16S rDNA 濃度を測定した結果、SS および ATP に比較してメタンガス発生速度とよく対応した値が得られた。このことから、メタン生成菌についての 16S rDNA 量を混合培養系におけるメタン生成菌量の指標として適用することは有効であるといえる。

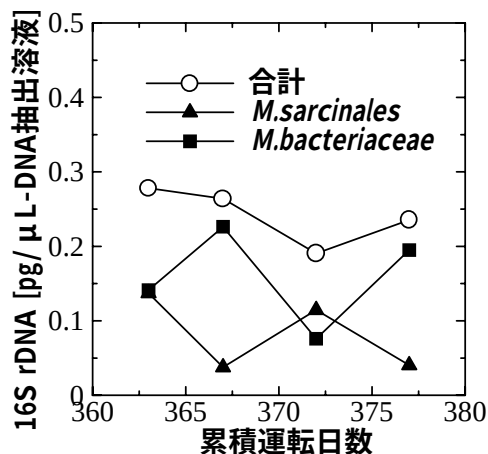


図 3 16S rDNA 濃度の推移

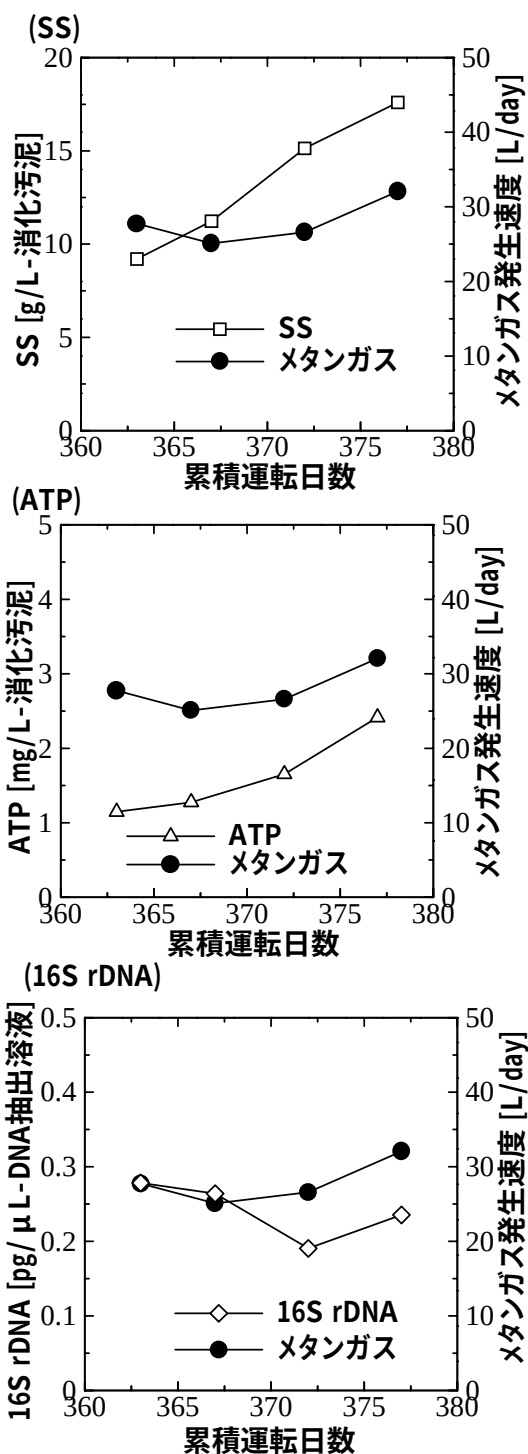


図 2 SS、ATP および 16S rDNA とメタンガス発生速度との対応

5. 参考文献

- 1) 下水試験方法 上巻 -1997 年版-, 社団法人 日本下水道協会
- 2) Raskin, L. et al.: Group-Specific 16S rRNA Hybridization Probes To Describe Natural Communities of Methanogens, Appl. Environ. Microbiol., **60**, 1232-1240, 1994
- 3) Lane, D. J.: 16S/23S rRNA Sequencing, 148-163, In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, New York, 1991