

PCR-DGGE 法を用いた微生物分解型の生ゴミ処理機中に形成される菌叢解析

高知工科大学工学部物質・環境システム工学科 堀沢 栄

1. はじめに

近年、微生物叢のプロファイリングには DNA をマーカーとする方法が多用されており、バクテリアでは主に 16s rDNA の配列が利用される。DGGE (Denature gradient gel electrophoresis) 法は、泳動する DNA の塩基配列の差が泳動距離に表れる電気泳動である。PCR-DGGE は、PCR で増幅させた DNA 断片を DGGE で配列の違いによって分ける方法である。DNA 変性剤の濃度に勾配をつけたゲルに塩基配列の異なる DNA 断片を泳動すると、変性する濃度が配列で異なるため、泳動度に差が生じるのである (Fig. 1)。一度に大量の生物を暑かったり、微生物の群集構造の変化を捉える方法としては、迅速、簡便さから有力なツールとされている⁽¹⁾。また、培養が困難な生物にも対応可能である。

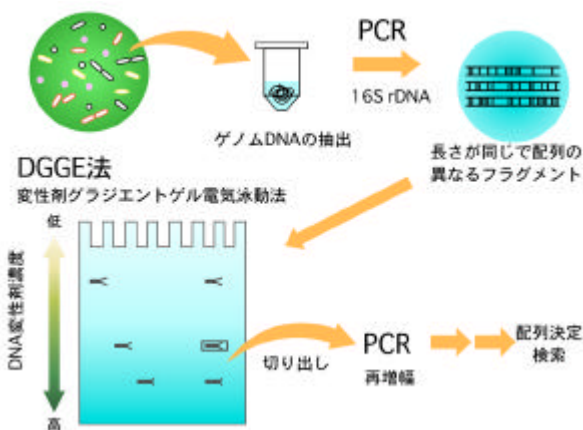


Fig.1 PCR-DGGE 法の手順 .

微生物分解型の生ゴミ処理機⁽²⁾は、新しい家電として定着した。特に食品廃棄物処理法が施行されたあとは、家庭用だけでなく大型スーパーなどにも業務用が導入されている。生ゴミ処理機の分解速度を上げること、装置のパフォーマンスを維持することは重要な問題であり、そのためには安定した微生物叢を維持しなければならないと考えられている。微生物叢を調べる方法としては、従来は培養を介する方法によって行われてきた。微生物担体より主要種と思われる細菌を分離し、形態、グラム染色性、運動性、資化性等の表現型から同定を行った⁽³⁾。しかし、培養手法を介すると培養条件によるバイアスが大きく、真の微生物相を捉えていないおそれがある。また、時間的なコストおよび手間がかかる。筆者らは、異なる含水率条件および温度条

件下において無菌状態のリアクターに環境より侵入する微生物によって形成された菌叢を、PCR-DGGE 法および培養を介する手法を用いて比較し、各菌叢の主要種を明らかにした。

2. 生ゴミ処理実験

実験室スケールの装置およびモデルゴミを用いて、微生物分解による生ゴミ処理を行った^(4,5)。担体含水率を 20-80% (湿潤重量基準) に変化させ、滅菌したモデルゴミを投入し、含水率ごとのモデルゴミの重量減少率を測定した (Fig. 2)。担体含水率 20% では、バクテリアの要求する水分活性に達しないため微生物叢の酵母占有率が大きく (培養法で検出) ゴミ減少率が小さかった。また、水分過多の 70% 以上ではゴミ減少率がやや減少した。しかし、30-60% ではほぼ同等の減少率であった。

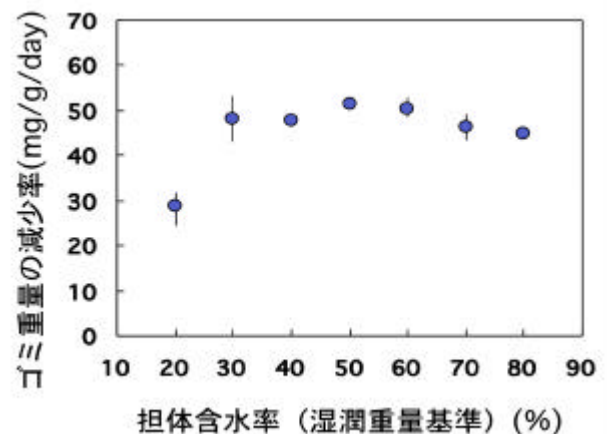


Fig.2 担体重量あたり時間あたりのモデルゴミの重量減少率 (30 , バーは最大及び最小) .

3. PCR-DGGE による菌叢解析

生ゴミ処理装置のモデル装置を用いて行った分解試験より、30日目の担体?分解産物混合物を採取した。担体-分解産物混合物から微生物群のゲノム DNA を抽出し⁽⁶⁾、カラム精製した。精製 DNA をテンプレートとし、E.coli の 341-907 (バクテリア、放線菌用) を使用した。プライマーの配列は、Table 1 に示したとおりであり、F (フォワード) プライマーに約 40b の CG クランブを付加した⁽⁷⁻⁹⁾。Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Molecular System, California, USA) を用いて DGGE 用のフラグメントを増幅させた。

DNA 変成剤の濃度を 20-70% (7M 尿素液を 100 変性剤とする) アクリルアミド濃度 6% のランニングゲルを用いて DGGE を行った⁽⁷⁾。0.5× TAE (Tris-酢酸-EDTA) を泳動バッファーに用い、恒温循環水槽を用いて 60 に保温した。泳動電圧は 170V、泳動時間は 4-4.5 h とした。泳動後、臭化エチジウムでバンドを可視化し、UV で検出した (Fig. 3)。

滅菌したゴミを投入したので、生ゴミ処理機の中に形成された微生物叢は通気などにより反応槽に侵入した大気由来の微生物が、反応槽の環境条件 (温度、水分、栄養物など) に適応して形成された微生物叢であると考えられる。酵母の占有率が高かった含水率 20% では、バクテリア、放線菌のバンドが少なかった。また、ゴミ重量減少率が同等の条件では、共通のバンドがいくつかみられ (Fig. 2, V?Z)、類似した微生物叢が形成されていることが示された。

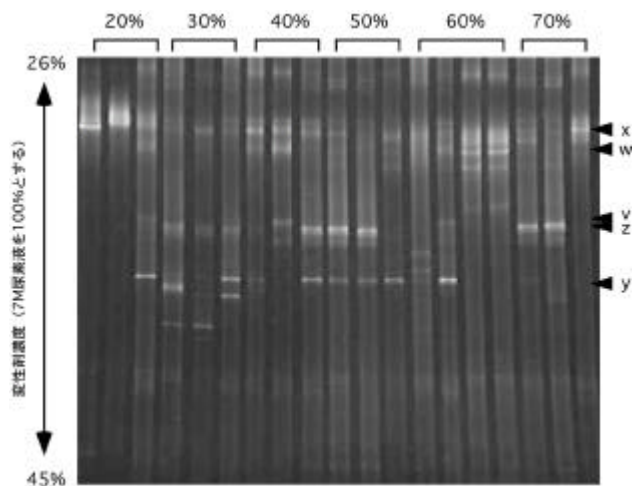


Fig.4 生ゴミ処理機に形成された微生物叢の PCR-DGGE. 各含水率において 3 回ずつ繰り返し実験を行った。

Table 1 主要種の推定

バンド	近縁種
v	Uncultured rape rhizosphere bacterium
w	<i>Alcaligenes</i> sp.
x	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
y	<i>Microbacterium aerolatum</i>
z	<i>Cellulomonas cellulans</i>

共通に見られる微生物を推定するために、バンドを切り出し、塩基配列を決定した。データベースでホモロジー検索を行い、最も近い種を Table 1 に示した。この結果は、培養手法をによって菌叢を解析した結果と一致した。以上の結果から、生ゴミ処理機に形成される微生物叢は、反応槽内の環境条件によって形成されると示唆された。

引用文献

- (1) Muyzer G (1999) Current Opinion in Microbiology 2: 317-322.
- (2) Terazawa M, Horisawa S, Tamai Y, Yamashita K (1999) J Wood Sci. 45(4): 354-358.
- (3) Horisawa S, Sakuma Y, Tamai Y, Doi S, Terazawa M (2001) Eurasian Journal of Forest Research 3: 11-22.
- (4) Horisawa S, Tamai Y, Sakuma Y, Doi S, Terazawa M (2000) J Wood Sci. 46(4): 317-321.
- (5) Horisawa S, Sakuma Y, Tamai Y, Doi S, Terazawa M (2001) J Wood Sci. 47(2): 154-158.
- (6) Heng Zhu, Febg Qu, Li-Huang Zhu (1993) Nucleic Acids Research 21(22): 5579-5580.
- (7) Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG (1993) Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.
- (8) Emilio O Casamayor, Hendrik Schäfer, Lluís Bañeras, Carlos Pedrós-Alió, Gerard Muyzer (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 499-508.
- (9) Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, Jannasch HW (1995) Arch Microbiol. 164(3): 165-172.