

15:00~15:25

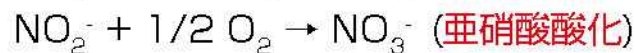
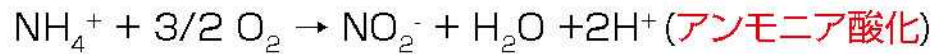
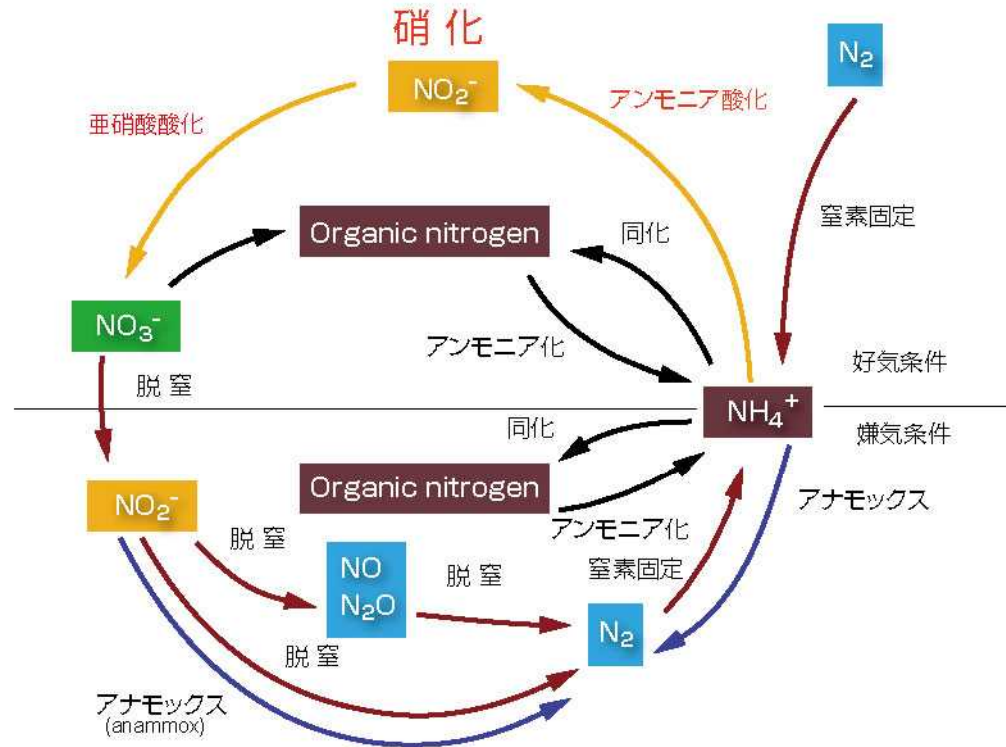
## 廃水処理における有用微生物の簡易計測

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科

応用化学・生命工学専攻

講師 山田 剛史

## 硝化菌が活躍する環境



硝化菌（アンモニア酸化菌や亜硝酸酸化菌）は、廃水処理などの人工的な環境や、河川、湖沼などの自然環境中において、アンモニアから硝酸への酸化に寄与する重要な細菌群である。



## ■ 新技術の概要

硝化反応を構成するアンモニア酸化反応および亜硝酸酸化反応の内、亜硝酸酸化細菌 (NOB) は、後者の微生物反応を担っており、硝化反応には欠かせないため、指標微生物として利用できる。NOB の細胞表層に特異的に結合する核酸分子を利用することによって、廃水処理、湖沼や河川に生息する亜硝酸酸化細菌のオンサイト計測について世界に先駆けて紹介する。なお、アンモニア酸化細菌の計測に関しては、昨年度の新技術説明会にて公表した。

## ■ 新技術の特徴

- ・ 複数種の亜硝酸酸化細菌の識別
- ・ 迅速・簡便な亜硝酸酸化細菌の検出
- ・ オンサイトでの亜硝酸酸化細菌の検出



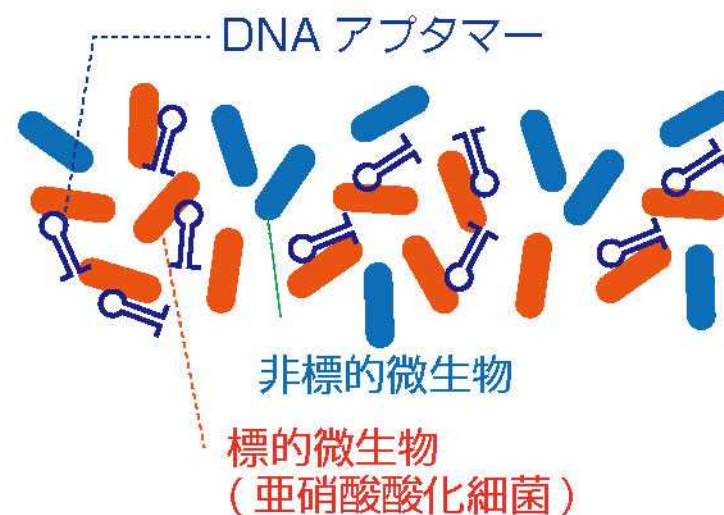
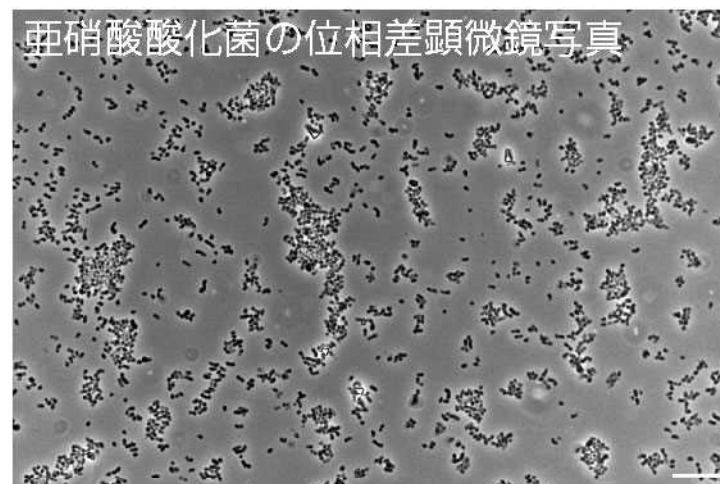
## 生物学的廃水処理、河川や湖沼の浄化能の簡易評価

本技術は、生物学的廃水処理プロセスや各種浄化槽における亜硝酸酸化細菌の計測に利用できるため、それぞれのプロセスの硝化能力（とくに亜硝酸酸化）を簡易的に評価できる。

さらに、河川や湖沼に存在する亜硝酸酸化細菌の計測にも応用できるため、それらの環境の窒素成分に対する浄化能の簡易評価にも繋がる。

## 亜硝酸酸化細菌の検出・計測の迅速化

本技術は、亜硝酸酸化細菌の細胞表層タンパクなどに結合する核酸分子を用いているため、それを利用した計測機器の自動化、迅速化にも応用できる。



## 亜硝酸酸化細菌を計測する既存技術と本測定技術の目標

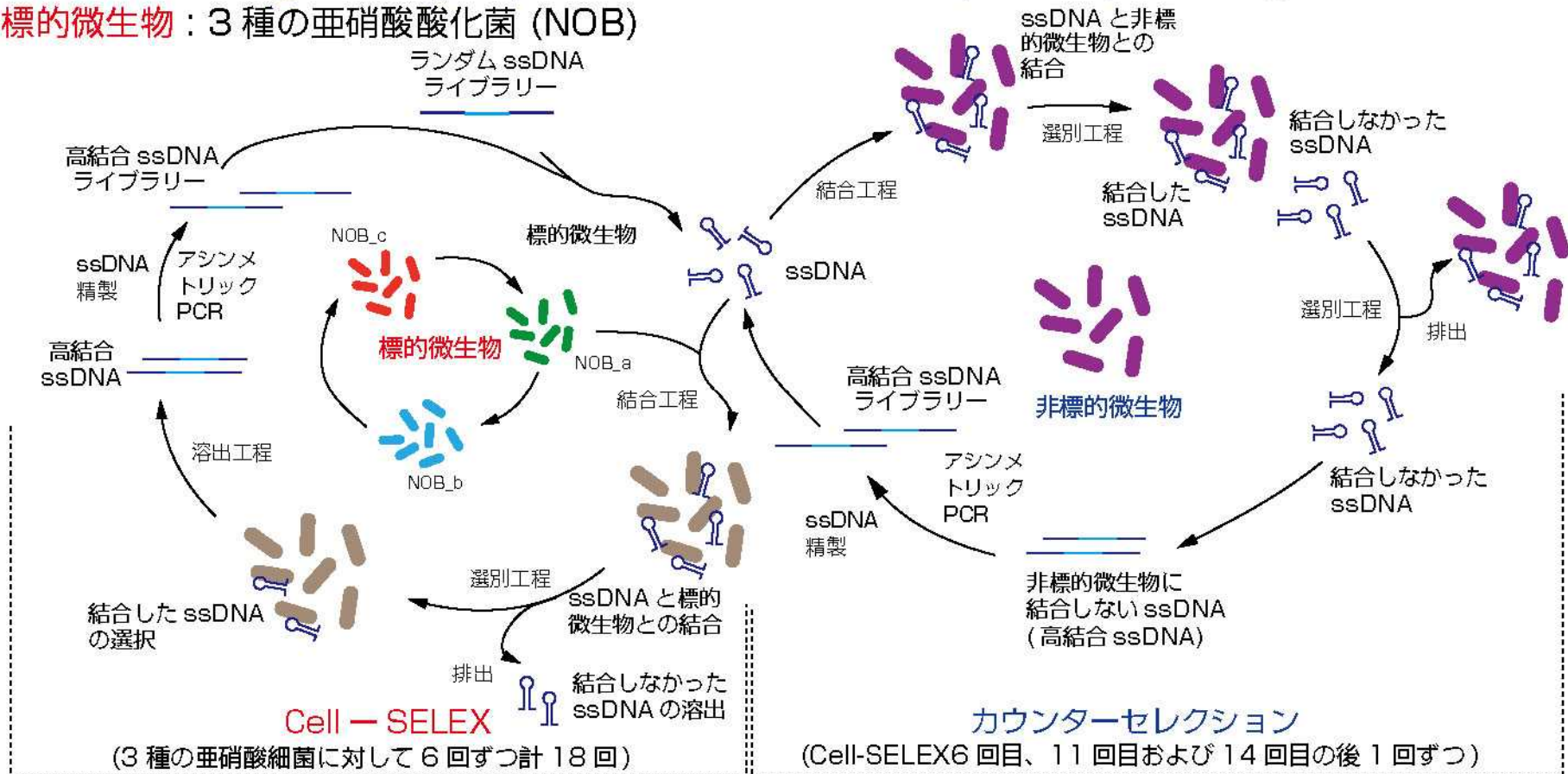
技術項目	Fluorescence in situ hybridization (FISH 法)	リアルタイム定量 PCR 法	測定技術の目標
操作性	煩雑	煩雑	簡便
専門スタッフ	有	有	無
測定環境	クリーン度の高い実験室	クリーン度の高い実験室	オンサイト
測定時間	2日	2~3日	4~6時間

亜硝酸酸化細菌の検出や計測には、リアルタイム定量 PCR 法や DNA プローブを用いた蛍光染色法が用いられるが、測定操作も煩雑であり長い測定時間を必要とする。細胞表層タンパクなどに特異的に結合する核酸分子 (DNA アプタマー) を用いた方法では、**短時間かつ簡便な操作**によって、**亜硝酸酸化菌の検出や計測をオンサイトで達成**できる。また、自動計測や迅速計測機器の検出ツールとしても応用できる可能性がある。



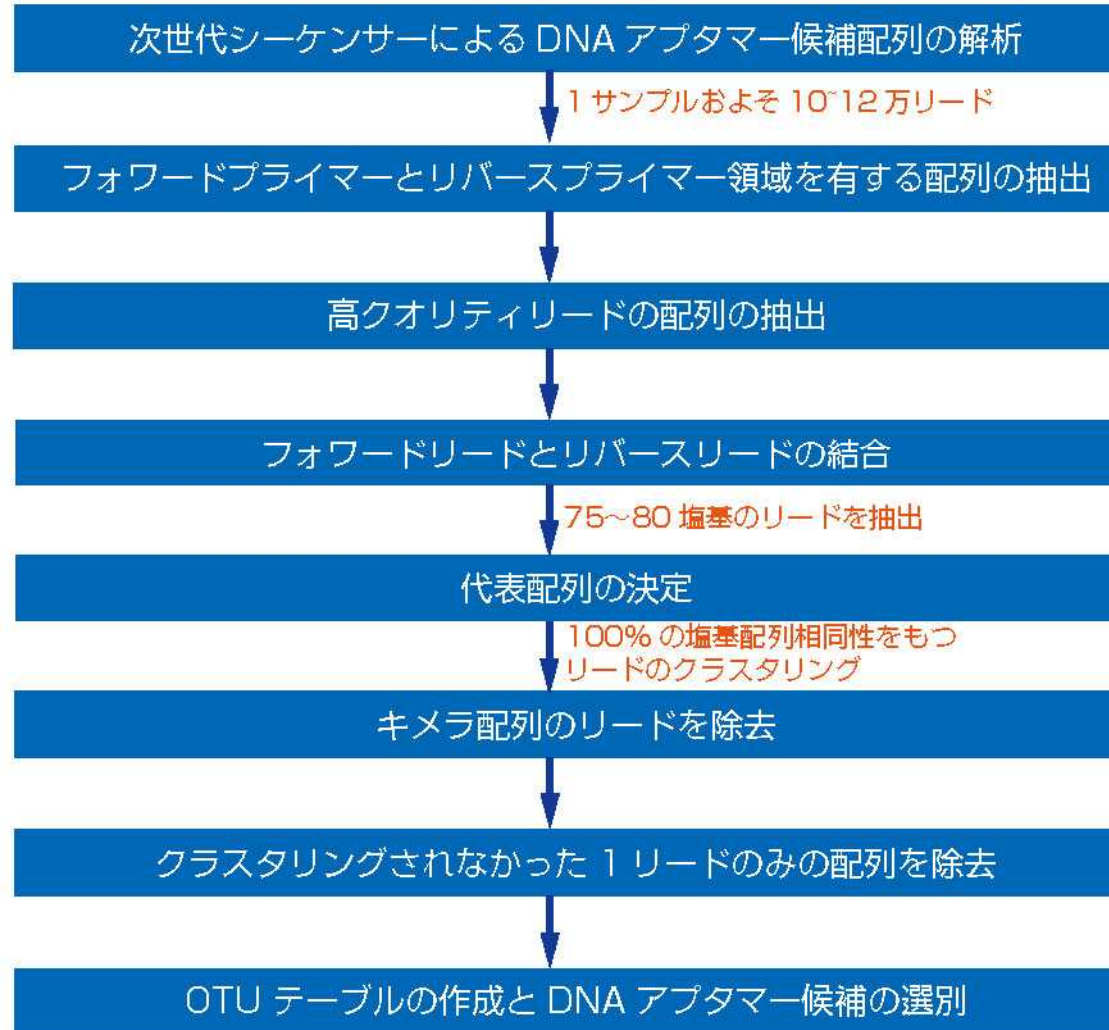
## 亜硝酸酸化菌を網羅的に識別できる DNA アプタマーを獲得する Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) 法の概略

標的微生物：3種の亜硝酸酸化菌 (NOB)

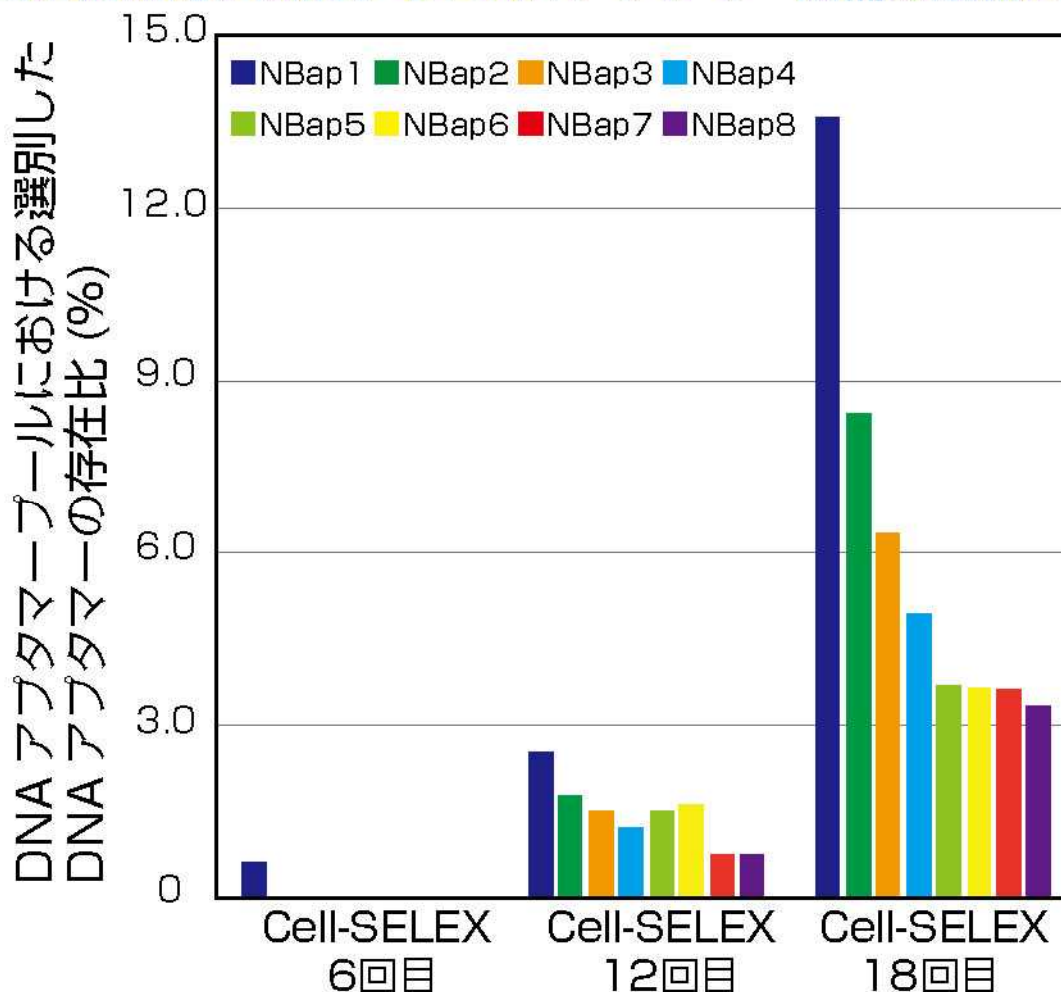


- ・ 亜硝酸酸化菌に特異的な DNA アプタマーの獲得のため、本サイクルを **6 ラウンド (18 回)** 繰り返した。
- ・ DNA アプタマーの特異性を高めるため、非標的微生物 (*Escherichia coli* (6 回目), *Blastomonas natatoria* (11 回目) および *Nitrosomonas europaea* (14 回目)) による **3 回のカウンターセクション** を実施した。

## 次世代シーケンサーによる DNA アプタマー候補配列の解析と DNA アプタマー候補の選別までのフロー



## 亜硝酸酸化細菌を網羅的に識別する DNA アプタマー候補の濃縮過程



数種の亜硝酸酸化菌を標的とした Cell-SELEX 法では、18 回目の Cell-SELEX において 3.3%以上のリード占有率を示す 8 種 (NBap1 – NBap8) を選別した。



- ・ 本技術は、生物学的廃水処理などの人工的な環境や河川、湖沼などの自然環境における硝化菌（とくに亜硝酸酸化細菌）による硝化能力を簡易的に評価できる簡易測定キットに有効である。
- ・ 本技術は、硝化菌（とくに亜硝酸酸化細菌）の自動計測および迅速計測機器の検出ツールとしても有効である。
- ・ 水処理企業や、硝化菌の簡易測定キットおよび測定機器の開発に興味のある企業との共同研究を希望する。
- ・ また、硝化菌以外にも、他の微生物の簡易計測キット開発に興味のある企業との共同研究を希望する。

- ・ 硝化菌の内、亜硝酸酸化細菌（とくに Nitrobacter 属細菌）を網羅的に識別可能な DNA アプタマーについて明らかにした。今後、これらの DNA アプタマーの内、もっとも有効に機能し得る DNA アプタマーの調査が必要がある。
- ・ これらの DNA アプタマーをツールとした亜硝酸酸化細菌の簡易計測技術の最適化を行う必要がある。

発明の名称：亜硝酸酸化細菌に結合する核酸分子、その核酸分子を用いる亜硝酸酸化細菌の検出及び検出キット

出願番号：特願 2018-234961

出願人：国立大学法人 豊橋技術科学大学

発明者：山田剛史、萩原達也、ハーポウンサチャン、大門裕之

お問合せ先：国立大学法人 豊橋技術科学大学  
研究推進アドミニストレーションセンター (RAC)

Phone：0532 - 44 - 6975

FAX：0532 - 44 - 6980

E.mail：tut-sangaku@rac.tut.ac.jp

担当：白川正知