

VII-11 DGGE 法による嫌気性グラニューール汚泥の微生物群集構造の比較の試み

長岡技術科学大学 学生会員 増田功一、正会員 原田秀樹、大橋晶良、珠坪一晃、学生会員 関口勇地

はじめに

好気性活性汚泥法と比較して、メンテナンスが容易で、設置面積が小さく、ランニングコストを低く抑えることが可能な UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) リアクター内では、廃水処理を支配する多様な微生物が集合して高密度で優れた沈降性を有するグラニューール状汚泥が形成されている。このグラニューール形成は UASB 法の特徴である高速廃水処理には欠かせず、そのグラニューールは、表面付近の層状構造やマイクロコロニーの形成など微生物生態学的にも特徴のある構造をしている。しかもリアクターの運転温度や処理の対象となる廃水の性状によって構造が異なることが知られている。しかし、リアクターの運転条件と形成されるグラニューールの構造や構成微生物群との関係はほとんど知られていないのが現状である。

本研究では、PCR により増幅したグラニューール内の多様な微生物の 16S rDNA を、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) により分離、検出することによって、運転条件の異なるリアクター内で形成されたグラニューールの微生物群集構造の比較を試みた。

実験方法

本研究では、運転温度や廃水の組成が異なるリアクター内で形成された 5 種類のグラニューール (Table 1) を試料として用いた。各グラニューールは、数年間に渡り運転され、処理が安定した状態のリアクターからサンプリングを行った。

グラニューールを構成する微生物群全体から DNA を抽出し、真正細菌と古細菌の 16S rDNA に特異的なプライマー (Table 2) を使用して PCR を行い、真正細菌と古細菌の 16S rDNA の任意の領域を別々に増幅した。複数のプライマーセットを使用して PCR を行い、それぞれについて非特異的な領域が増幅されていないことをアガロースゲル電気泳動で確認した。

次に PCR で増幅された DNA 断片に対して DGGE を行い、各プライマーセットを使用した場合の泳動を

調べた。No. 1~5 のグラニューールについて DGGE で検出されたシグナルの数と位置の違いからグラニューールを構成する微生物群の比較を試みた。

また、5 種類の純菌 *Desulfobulbus propionicus*, *Methanobrevibacter arboriphilicus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanoplanus limicola*, *Methanobrevibacter ruminantium* に対しても同様の実験を行い、単一のパンドを得ることができたか確認した。

Table 1 Running conditions of UASB reactors from which granular sludges were taken.

	Granular sludges	Temp. (°C)	Substrate	Load (kg CODcr/m ³ /d)
No.1	中温人工廃水	35	Sucrose, Acetate, Propionate, Peptone	7.8
No.2	中温牛乳	35	Diluted Milk	4.8
No.3	中温ジュース	35	Diluted Juice	4.8
No.4	高温人工廃水	55	Sucrose, Acetate, Propionate, Peptone	23
No.5	高温アルコール蒸留廃水	55	Alcohol Distillery Wastewater	20

Table 2 Primers used in this study.

Primer ^a Sequence	Positions ^b
Univ 530F(GC-clamp) 5' (GC-clamp) GTGCCAGC(C/T)GCCG CGG	530-545
Eub 341F(GC-clamp) 5' (GC-clamp) CCTACGGGAGGCAGCAG	341-357
Eub 907R 5' CCCCCTCAATTCCTTTGAGTTT	907-928
Arc 344F(GC-clamp) 5' (GC-clamp) ACGGGGIGCAGCCGCGA	344-363
Arc 915R 5' GTGCTCCCCCGCAATTCCT	915-934
Arc 957R 5' TCTCGCTCGTTGCCTGACT	957-975
GC-clamp 5' CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGGCGGG -GGCACGGGGGG	

^a F, forward primer; R, reverse primer.

^b The numbering of positions is based on *E. coli* 16S rRNA.

結果と考察

PCR による 16S rDNA の増幅産物をアガロースゲルで電気泳動を行ったところ、真正細菌・古細菌共にどのプライマーセットを使用した場合も予想された長さの増幅産物が得られ、非特異的な領域が優位に増幅さ

れていないことが確認された（Fig. 1）。

DGGEの泳動結果は、真正細菌についてはグラニユー・純菌どちらも Eub341f(GC-clamp)と Eub907r のプライマーセットを使用した場合に比較的良好な結果を得ることができた（Fig. 2(A)）。その結果より、基質組成が同じ人工廃水を処理している中温（35℃）と高温（55℃）のグラニユーを比較すると泳動パターンは全く異なることが確認された。また、温度が同じであっても組成の異なる廃水で培養されたグラニユーでは異なった泳動結果が得られた。これらの結果は、グラニユー内に優占的に存在する真正細菌群の構成が各リアクターの運転条件により異なることを示唆しており、グラニユーを構成する微生物群集構造の違いは、リアクターの運転条件によって有機物の分解経路に関係する真正細菌が異なるために生じるのではないかと推察される。一方、同じ温度条件下で組成の異なる廃水の処理を行っていたグラニユーからは、ほぼ等しい位置に検出されたバンドがいくつかあり、処理する廃水の組成に関わらず同じ温度条件下で形成されたグラニユーに共通する真正細菌の存在も予想される。

古細菌についてはグラニユー・純菌どちらもスミアなバンドしか得られず、良好な結果が得られなかった（Fig. 2(B)）。しかも、どのプライマーセットを使用した場合も同様の結果であった。PCRでの増幅産物を市販の kit（QIAquick Spin PCR Purification Kit, QIAGEN）やアガロースゲルを用いて精製して未反応のプライマーや dNTP 等を除いた後に DGGE を行うなど、この問題を解決するために検討を行ってみたが、泳動結果に変化は見られず、古細菌と真正細菌とでこのように DGGE の結果が異なるのはなぜなのか、その原因は不明である。

今後の課題

古細菌と真正細菌とで DGGE の適応の良否が異なる理由は現在のところ不明であることから、真正細菌群と同様に古細菌群も良好に検出するための更なる実験的な検討が必要である。その後、古細菌群も含めたグラニユー全体の微生物群集構造を明らかにし、それとリアクター条件との関係についてさらに調査を行う予定である。

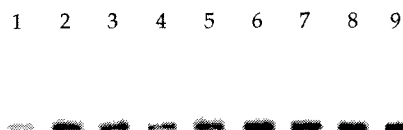


Fig.1 Negative image of an ethidium bromide-stained agarose gel analysis of 16S rDNA fragments obtained by PCR, primer set : Univ 530F(GC-clamp) and Arc 957R. Lane : 1, granular sludge No.1; 2, granular sludge No.2; 3, granular sludge No.3; 4, granular sludge No.4; 5, granular sludge No.5; 6, *Mbb. arboriphilicus*; 7, *Mb. thermoautotrophicum*; 8, *Mpl. limicola*; 9, *Mbb. ruminantium*. Granular sludges No.1-5 were shown in Table 1.

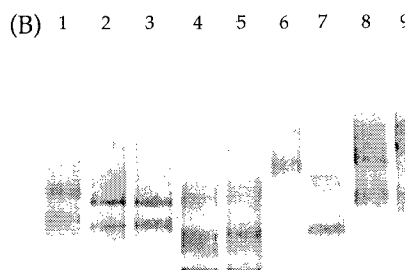
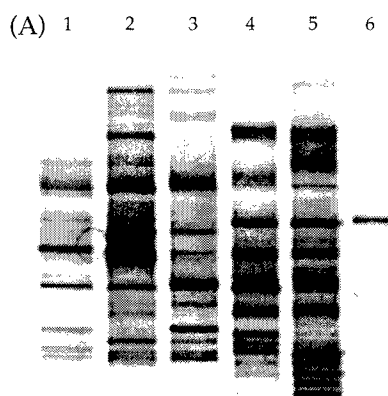


Fig.2 Negative images of a GelStar-stained DGGE analyses of 16S rDNA fragments obtained by PCR. (A) Bacteria : primer set, Bac 341F(GC-clamp) and Bac 907R. Lane : 1, granular sludge No.1; 2, granular sludge No.2; 3, granular sludge No.3; 4, granular sludge No.4; 5, granular sludge No.5; 6, *Dbb. propionicus*. (B) Archaea : primer set, Univ 530F(GC-clamp) and Arc 957R. Lane : 1, granular sludge No.1; 2, granular sludge No.2; 3, granular sludge No.3; 4, granular sludge No.4; 5, granular sludge No.5; 6, *Mbb. arboriphilicus*; 7, *Mb. thermoautotrophicum*; 8, *Mpl. limicola*; 9, *Mbb. ruminantium*.