

「PCR-DGGE 法を用いた活性汚泥の形成過程の解析」

東京大学大学院工学系研究科 学生会員 田中美奈子
 東京大学大学院工学系研究科 正会員 栗栖太
 東洋大学工学部 正会員 松尾友矩

1. はじめに

近年、分子生物学的分析手法を用いた研究の進展によって、活性汚泥中の微生物群集の構成並びに動態が少しずつ解明されてきている。しかし、活性汚泥の微生物群集が構成される際の支配因子に関してはよく分かっていない、というのが現状である。

活性汚泥への連続的な微生物供給源としては、曝気槽に送られる空気と流入下水の2つがある。本研究では、分子生物学的手法の一つである PCR-DGGE 法を用いて、この二つの微生物供給源が及ぼす影響について調べると同時に、微生物構成の形成過程を解析した。

2. 実験方法

微生物培養には、図1に示すような、沈殿工程付き回分式リアクターを使用した。まず除菌空気と滅菌基質を用いた系を運転し、無菌運転が可能であることを確認した。その後、表1に示す4つの条件で、表2に示す運転条件のもとでリアクターを18日間運転し、定期的にサンプリングを行った。また、モニタリング項目として pH、CODCr、MLSS を測定した。

このようにして得られた試料は、TE バッファーで濯ぎ、 -20°C で保存した。その後、ベンジルクロライド法によって核酸を抽出し、PCR-DGGE 法を用いて 16SrDNA の V3 領域を含む領域をターゲットとした分析を行い、各 run の DNA バンドパターンの比較、また一部の試料については DNA バンドの経時変化の追跡を行った。

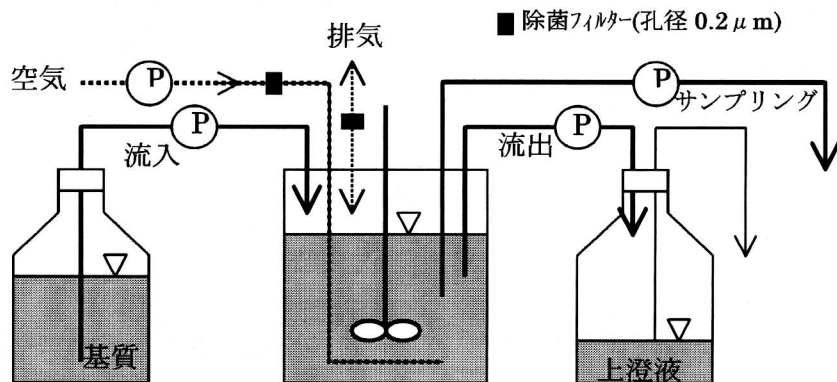


図1：リアクター概略図

表1：各 run の条件

run	流入水	曝気空気
①	人工基質	通常大気※1
②	オートクレーフ処理下水	通常大気※1
③	生下水※2	通常大気※1
④	生下水※2	除菌空気※3

※1：実験室外の大気

※2：東京都S処理場初沈越流水

※3：0.2 μm フィルターで除菌

表2：リアクター運転条件

サイクル数	3 回/日
反応槽容積	1.5 L
HRT	1 日
SRT	7 日
曝気量	2 L/min

3. 結果・考察

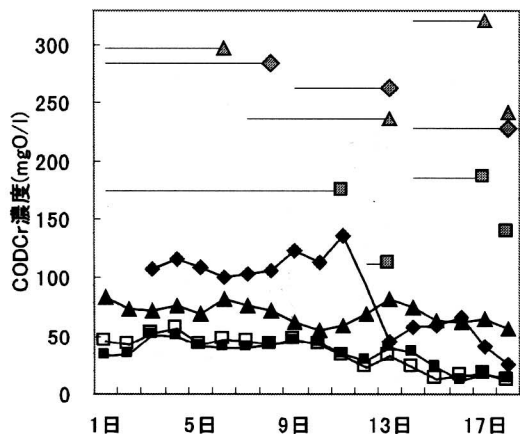


図2：各 run における CODCr の変化

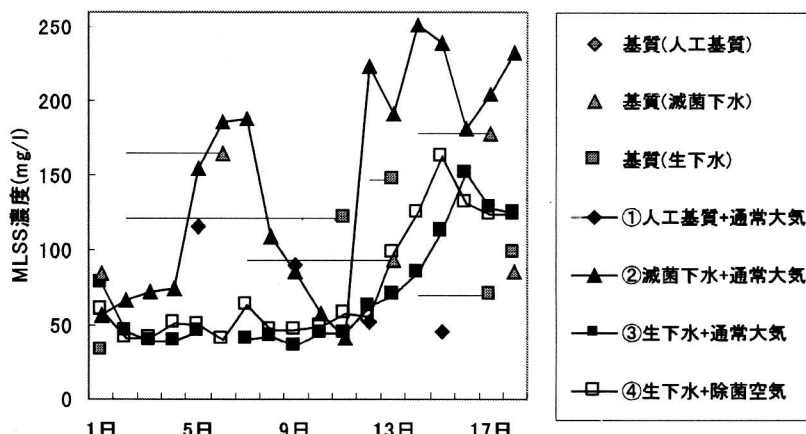


図3：各 run における MLSS の変化

キーワード：PCR 法、DGGE 法、微生物群集解析、活性汚泥、下水、大気

連絡先：〒113-8656 文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 03(5841)6238

リアクター並びに系内の生物を観察した結果、①②の系は、運転後まもなく白濁が見られたが、沈降性のあるフロック状粒子は形成されなかった。その一方で、③④の系には運転開始一日目から褐色のフロックが形成され、ツリガネムシ等多種類の原生生物が観察された。

CODCr 測定結果を図 2 に、MLSS 測定結果を図 3 に示す。CODCr については、基質の COD は懸濁液の測定値、試料の COD は上澄液の測定値を用いた。

図 2 の結果からは、全ての系で微生物による有機物消費が行われていることが推測される。ただし、図 3 を見ると、反応槽内の MLSS はいずれの系でも低く、一般的な活性汚泥濃度(1000~2000mg/l 程度)には達していないことが分かる。

PCR-DGGE 分析結果を下図 4~6 に示す。各バンドに記されている文字は、run の番号(または試料名)と運転開始からの時間である。

図 4、5 を見ると、微生物供給源が大気のみの場合、系内に定着する微生物は単純な構成となり、また、10 日程度で増殖・定着することが分かる。また、図 6 では①と②のバンドパターンが大きく異なっていることから、定着する微生物種が基質の種類によって異なることが分かる。

図 5 の左端に、滅菌下水の DGGE 分析結果を示したが、数本のバンドが検出された。つまり、オートクレーブ処理を行った下水にも、DNA が残るということになる。これは分子生物学的分析手法に特有の問題であろう。ただし、これが微生物の生存を示すのか、あるいは DNA 断片の残存を示すのか、確認する必要があると思われる。

図 6 を見ると、run③④はバンド数が非常に多く、しかもこの 2 つの間には差が見られない。また、①②のバンドと同じものが③④には無い。このことから、微生物供給源に生下水が含まれる場合、系内には非常に複雑な微生物構成が形成され、それらは大気からの微生物供給の有無には影響されない、ということが分かる。

生下水と S 処理場活性汚泥の DGGE 分析結果を、図 6 右端部に記載した。生下水のバンドパターンは③④とほぼ同じである。また、活性汚泥のバンドと生下水のバンドには相違点が多いが、一部では同じと思われるバンドも検出された。このことから、生下水中には多種多様な微生物が存在しており、また、活性汚泥と生下水の微生物構成は異なる部分が多いが共通点も見受けられる、と考察できる。

4. まとめ・今後の課題

今回の研究結果から、「活性汚泥の微生物群集構成の形成・維持には生下水からの微生物供給が重要である」という推論が導き出せた。しかし活性汚泥と生下水の微生物構成は異なる部分が多く、「活性汚泥の微生物は生下水に由来する」とは断言できない。実処理を想定し、より長いタームで運転を行う必要があると思われる。

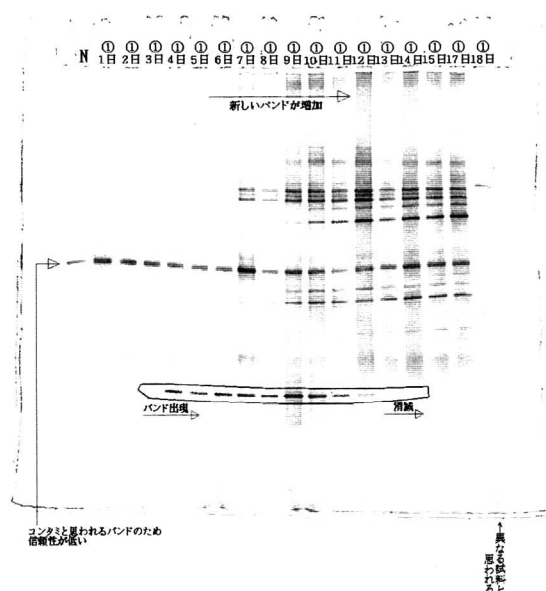


図 4 ; run①のバンドの経時変化

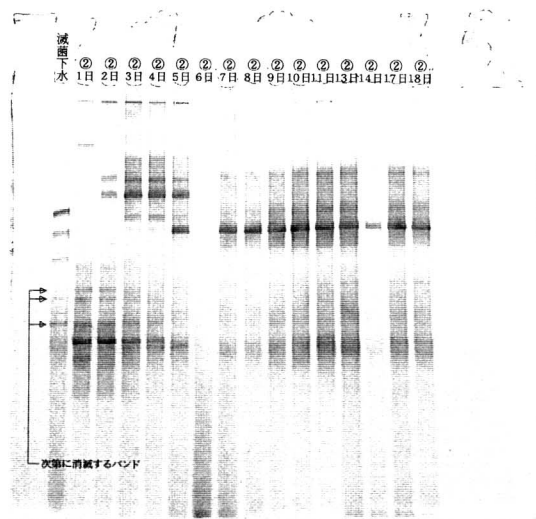


図 5 ; run②のバンドの経時変化

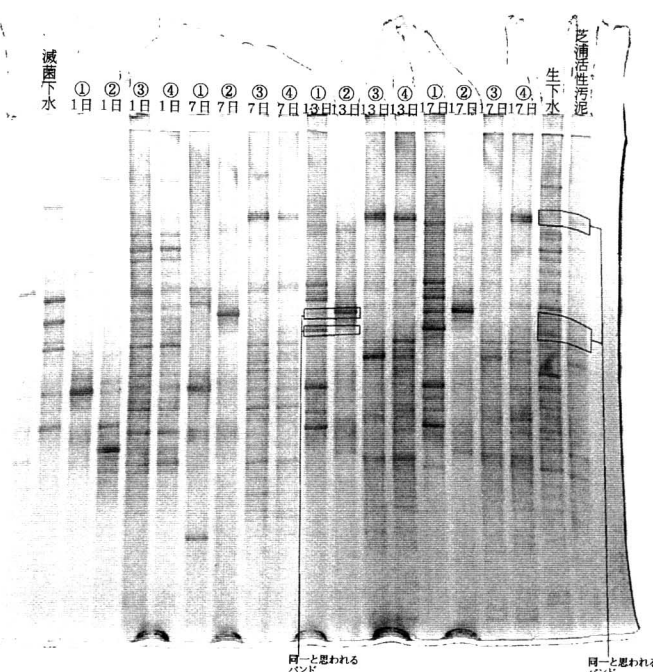


図 6 ; run①②③④のバンドの比較