

下水の嫌気性処理装置内における優占硫酸還元菌群の特定とその定量

長岡工業高等専門学校 学生会員 今井 崇博
長岡工業高等専門学校 非会員 阿部 憲一
長岡工業高等専門学校 正会員 荒木 信夫
広島県産業科学技術研究所 正会員 角野 晴彦

1. はじめに

近年、UASB という嫌気性排水処理が再注目されている。この処理システムはエアレーションが不要で、余剰汚泥が少ないという利点がある。しかし、低濃度廃水では十分な処理能力が得られないという問題点がある。この問題点を改善するために硫黄酸化還元サイクルを活用した UASB が開発された。このシステムは前段の嫌気層で、硫酸還元菌が硫酸を還元すると共に有機物を分解し、後段の好気性処理層で硫黄酸化細菌が硫黄を酸化してその処理水の一部を前段の嫌気槽に返送することにより、BOD のドライビングフォースとして処理するものである。しかし、この硫黄酸化還元システムの処理層内の有機物を処理する微生物の菌種、菌数、能力はまだ解明されていない。そこで本研究ではまずこの硫黄酸化還元システム活用した新規リアクターの中の硫酸還元菌の群集構造解析を PCR-DGGE、シーケンシング法を用いて特定した。さらに、この優占種の定量手法を Real-Time PCR 法を用いて開発し、この嫌気性槽内での動態を明らかにした。

2. 実験方法

2.1 サンプルング

本研究に用いたサンプルは、東広島浄化センターで運転している硫黄酸化還元サイクルを用いたパイロットプラント UASB 槽から採取した。また、硫酸塩濃度約 20 mM の培地による集積培養を行った。培養開始から 1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後にそれぞれサンプルを採取した。DNA 抽出にはビーズビーダー法を適用し、フェノール、クロロホルム、エタノール沈殿した後、Rnase 処理を行った。

2.2 PCR-DGGE による菌種の特定

硫酸還元菌の 16S rDNA と硫酸還元菌を網羅する真正細菌の 16S rDNA をターゲットとして、Touch down PCR によりサンプル DNA を増幅させた。プライマーは、R-Primer に UNIV907.deg を使用し、F-Primer には GC クランプ付の EUB341 と SRB385 を使用した。プライマーの塩基配列を表-1 に示す。

増幅した PCR 産物を変性 剤濃度勾配 30～60%, 130V, 5 時間で電気泳動を行った。 その後、集積培養により蛍 光強度が強くなったバンド	表-1 プライマーの塩基配列	
	Primer	Sequence(5'-3') Specificity
	UNIV907R.deg	CCG TCA ATT CCT TTR ^(a) AGT TT All organisms
	EUB341F ^(b)	CCT ACG GGA GGC AGC AG Eubacteria
	SRB385F.deg ^(b)	CCT GAC GCA GCR ACGCCG SRB belong to δ -Proteobacteria, other δ -Proteobacteria, and some gram-positive bacteria(e.g Clostridium)
	(a) TR...A or G (b) DGGEにはGC-clamp ^(c) を付けたものを用いる	
	(c) GC-clamp: CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G	

を切り出し、再度 PCR により増幅させ、Gene Clean Kit(Q-BIO gene)により精製を行い、マルチキャピラリー DNA 解析システム CEQ2000(BECKMAN COULTER)を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列は BLAST search により菌種の特定を行った。

2.3 Real Time PCR 法によるサンプル内の動態の把握

Real Time PCR 法によりサンプル内の全真正細菌数、全硫酸還元菌数を定量し、サンプル内の動態を明らかにする。Real Time PCR 法の蛍光取得方法は SYBR Green I を用いたインターカーレーター法を用いた。

3. 結果

3.1 PCR-DGGE による菌種の特異

図-1 に EUB341F と UNIV907. degR を用いた PCR-DGGE の電気泳動の結果を示す。切り出したバンドをそれぞれ A, B, C, D とし、表-2 に切り出したバンドの BLAST search の相同性が最も高かった菌種を示す。BLAST search の結果から、Desulfobulbus 属、Syntrophobacter 属に極めて近い菌種が検出された。バンドの蛍光強度が強くなっていることから、これらの菌が優先していることが分かる。

図-2、表-3 に SRB385. degF と UNIV907. degR を用いた PCR-DGGE、BLAST search の結果を示す。バンド B, D は BLAST search の相同性が低い Desulfobulbus 属と特定されたので、少なくとも硫酸還元菌の一種であると言える。どちらの結果にも Uncultured bacterium があるが、蛍光強度が強くなっていることから、硫酸還元菌の一種であると予想される。

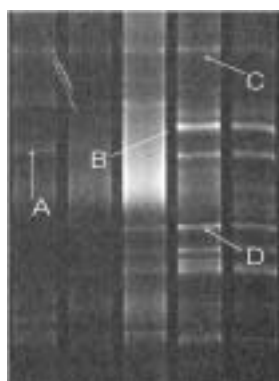
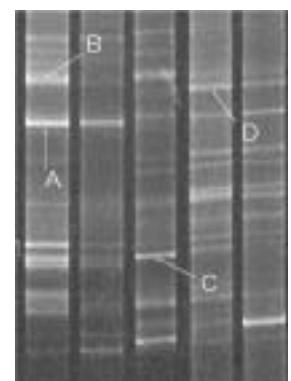


表-2 EUB341F-UNIV907. degR

BAND	菌の名前	相同性
A	<i>Desulfobulbus elongatus</i>	340/347(97%)
B	<i>Uncultured bacterium clone R1p32</i>	508/517(98%)
C	<i>Uncultured bacterium clone SHA-237</i>	430/455(94%)
D	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	504/508(99%)

表-3 SRB385. degF-UNIV907. degR

BAND	菌の名前	相同性
A	<i>Uncultured bacterium DGGE band 3</i>	430/463(93%)
B	<i>Desulfobulbus rhabdoformis</i>	464/489(94%)
C	<i>Uncultured bacterium clone SR_FER_E70</i>	485/485(100%)
D	<i>Desulfobulbus elongatus</i>	379/395(95%)



(図-1)

(図-2)

3.2 Real Time PCR 法によるサンプル内の動態の把握

現時点ではまだ定量法の開発は途中段階である。本研究で用いるプライマーセットは、全真正細菌数の定量

には EUB341F-UNIV907. degR のプライマーセットを使用し、全硫酸還元菌数の定量には DELTA495aF-UNIV907. degR のプライマーセットを用いて定量法を開発する。表-4

表-4 プライマーの塩基配列

Primer	Sequence(5'-3')	Specificity
UNIV907R. deg	CCG TCA ATT CCT TTR ^(a) AGT TT	All organisms
EUB341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Eubacteria
DELTA495aF	AGG AAG CAC CGG CTA ATC	most δ -proteobacteria

(a) R: A or G

4. 結論

PCR-DGGE 法によりサンプル内の硫酸還元菌の特定ができた。今後の課題としてこれらの硫酸還元菌を先のプライマーセットを用いて定量法を開発し、東広島浄化センターの嫌気層内に存在する硫酸還元菌の動態を明らかにする。