

VII-41

T-RFLP 法および 16S rDNA クローン解析法による
活性汚泥微生物群集の生態系解析に関する研究

東北学院大学工学部 学生員 ○齋藤史典
東北学院大学大学院 学生員 菅原宏幸
東北学院大学工学部 フェロー 遠藤銀朗

1. はじめに

活性汚泥法は下水などの廃水処理する方法として最も広く用いられており、好気性微生物の分解代謝活性を利用して下水中の有機物を分解する方法である。しかし、活性汚泥法には解決すべき様々な課題が残されている。その例として、糸状性細菌の発生により活性汚泥が沈降しなくなるバルキング現象や、放線菌の発生による発泡がある。このような課題のほとんどは微生物群集の生態系が変化すること起因する。そこで、微生物の量や種などの変化を把握することは重要である。新しい分子生物学的方法を駆使して、遺伝情報から活性汚泥微生物を網羅的に知る方法の開発が必要である。

T-RFLP 法は活性汚泥微生物の全体像を把握することができるため、微生物群集の解析に有用な方法である。また、遺伝子レベルの解析で最も利用されている 16S rDNA クローン解析法を T-RFLP 法と組み合わせることによって、さらに詳細に微生物群集を解明できると考えられる。

本研究では、T-RFLP 法および 16S rDNA クローン解析法を活性汚泥微生物生態系の解析に適用するために必要な方法的条件を明らかにするとともに、実際の微生物生態系の変動を把握できるかどうかについて調べた。

2. 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

宮城県内の S 下水処理場の活性汚泥を用いた。

2-2 現場下水処理場活性汚泥微生物群集の生態系解析

現場下水処理場の活性汚泥を T-RFLP 法および 16S rDNA クローン解析法による解析を行った。

PCR は、活性汚泥微生物の 16S rDNA をターゲットとして増幅を試みた。T-RFLP は中村らによって確立された方法に従った。また、約 1500 base からなる 16S rDNA の前半の約 600 base の塩基配列を決定し、データベースに登録されている配列との相同性を調べた。T-RFLP およびシーケンスは Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) で解析を行った。

2-3 汚染物質をモデルとした単一基質での人工培養による生態系の変化

下水処理場活性汚泥をグルコース基質、また酢酸基質で 12 日間人工培養した際の微生物生態系の変化を調べた。T-RFLP およびシーケンスの実験手順は 2-2 と同様である。

3. 実験結果および考察

Fig. 1 に下水処理場の活性汚泥の T-RFLP 解析を行ったエレクトロフォレグラムを結果として示す。Fig. 2 にグルコース基質で人工培養した際の T-RFLP 解析を行ったエレクトロフォレグラムを結果として示す。Fig. 3 に酢酸基質で人工培養した際の T-RFLP 解析を行ったエレクトロフォレグラムを結果として示す。また、Table 1 に 16S rDNA クローン解析の結果を示す。

解析結果から、単一基質を汚染物質のモデルとして、活性汚泥を単一基質で培養すると、基質を分解可能な微生物種が増殖していくことが T-RFLP の微生物の蛍光シグナルが単純化および 16S rDNA クローン解析の結果から明らかとなった。

4. おわりに

本研究の結果から、下水中の基質が変わると、微生物群集も変化していくことが把握できた。また、T-RFLP 法および 16S rDNA クローン解析を用いることによって微生物相の変化を追跡できることを確認できた。

参考文献

- 1) 中村寛治：バイオレメディエーション実用化の手引き。
- 2) 中村寛治、鈴木義彦、石田浩昭：フェノールによるトリコロロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の解析、環境工学研究論文集、Vol.36, pp.1-10, (1999)
- 3) 中村寛治、石田浩昭、飯泉太郎：バイオスティミュレーションのプロセス管理を目的とした 16S rDNA 遺伝子による微生物群集構造の解析、環境工学研究論文集、Vol.38, pp.1-10, (2001)

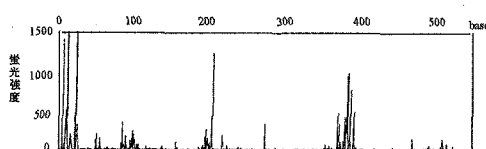


Fig. 1 現場処理場活性汚泥の T-RFLP 解析結果

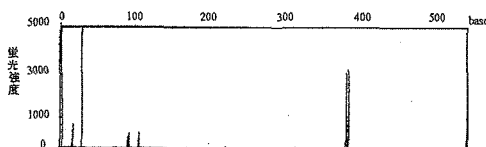


Fig. 2 グルコース基質による人工培養した際の微生物群集の変化

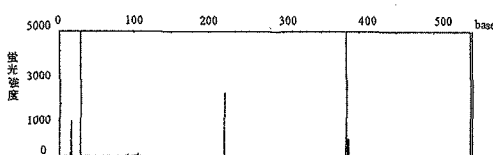


Fig. 3 酢酸基質による人工培養した際の微生物群集の変化

Table 1 活性汚泥のクローン解析結果

現場活性汚泥のクローン解析結果		
最近縁種		
30クローン	Uncultured bacterium	25クローン
	<i>Sphingomonas</i> sp.	2クローン
	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	2クローン
	<i>C. cellulovorans</i>	1クローン
グルコース基質で12日間培養した際のクローン解析結果		
最近縁種		
30クローン	<i>Klebsiella</i> sp.	15クローン
	Uncultured bacterium	9クローン
	<i>Sphingomonas</i> sp.	2クローン
	<i>Raoultella terrigena</i>	2クローン
	<i>Lactococcus lactis</i> strain	1クローン
	<i>Citrobacter freundii</i> strain	1クローン
酢酸基質で12日間培養した際のクローン解析結果		
最近縁種		
30クローン	Uncultured bacterium	19クローン
	<i>Nitrosomonas</i> sp.	3クローン
	<i>Flexibacter</i> sp.	2クローン
	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2クローン
	<i>Klebsiella</i> sp.	1クローン
	Estrogen-degrading bacterium	1クローン
	<i>Lactococcus lactis</i> strain	1クローン