

遺伝子プローブを用いた活性汚泥中の微生物相の解析

東京大学大学院工学系研究科	学生会員	小貫 元治
東京大学大学院工学系研究科	正会員	佐藤 弘泰
東京大学大学院工学系研究科	正会員	味埜 俊
東京大学大学院工学系研究科	正会員	松尾 友矩

1. はじめに

近年、培養法の上に成り立っていた伝統的微生物分類学や微生物生態学の限界が指摘され、遺伝子プローブ法などの新しい微生物同定検出手法が開発されてきている。高度な生物学的廃水処理系を開発し、安定に運転していくためには、分子遺伝学をふまえたこれらの新手法を用いて、活性汚泥中のありのままの微生物相やその変化を把握することが重要である。本研究ではまず、すでに開発されている group-specific プローブを用い、日本において稼働中の水処理施設から採取した活性汚泥の微生物相を調べた。

2. 試料、プローブ、実験方法

2.1. プローブ

実験では、真正細菌と古細菌をドメインレベルで、また真正細菌のいくつかのグループをグループレベルで検出する rRNA 標的合成オリゴヌクレオチドプローブを用いた。使用したプローブの名称、標的生物、塩基配列、hybridization 条件は表1に示した。

表 1 使用したプローブ

Name	Specificity	Sequence(5'-3')	%
Arch915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	20
EUB338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20
ALF1b	α subclass of Proteobacteria	CGTTCGYTCTGAGCCAG	20
BET42a	β subclass of Proteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT	35
GAM42a	γ subclass of Proteobacteria	GCCTTCCACATCGTTT	35
HGC69a	Gram-positive with high-GC DNA content	TATAGTTACCACCGCCGT	25

hybridization 条件：hybridization 温度を一律 46℃にしたときの formamide 濃度(%)

2.2. 試料

今回の実験で調査した試料を表 2 に示した。

処理水量は中水道施設 D,E が約 600～1000m³/d であるのに対し、各下水処理場は、数十万 m³/d である。

各試料は、その 3 倍容積の固定液(4% paraformaldehyde、1×PBS、pH7.2) で固定(4℃、1～3 時間)し、70℃のゼラチン溶液(0.01%クロムミョウバン、0.1%ゼラチン)でコーティングしたスライドグラスにスポット、エタノール脱水して用いた。

2.3. 実験方法

各スポットにプローブ 1 μ l とそれぞれ

のプローブに応じた formamide を含む hybridization buffer (0.9M NaCl, 20mM Tris/HCl pH7.2, 1%SDS, X% formamide) 8 μ l を滴下し、hybridization をおこなった。hybridization 時間は 2 時間とし、hybridization 温度はすべて 46℃とした。洗浄は、スライドグラスを washing buffer (プローブを含まない hybridization buffer) に 46℃で 20 分間浸けておこなった。

全菌数測定のため、hybridization に続けて DAPI による染色をおこなった。各スポットに DAPI staining solution (1.25 μ g/ml DAPI, 0.9M NaCl, 0.5M Tris/HCl) を 10 μ l ずつ滴下し、室温で 5 分間染色後、純水で洗い流した。

表 2 調査した資料

#77° #名	処理施設名	処理法
As	都市下水処理場 A 系列 1 生物反応槽	スチープ・エアレーション
Aa	都市下水処理場 A 系列 2 生物反応槽	嫌気好気法
B	都市下水処理場 B 生物反応槽	スチープ・エアレーション
C	都市下水処理場 C 生物反応槽	嫌気無酸素好気法
D	中水道施設 D 生物反応槽	標準活性汚泥法
E	中水道施設 E 生物反応槽	標準活性汚泥法
Ps	都市下水処理場 A 系列 1 最初沈殿池越流水	

group-specific プローブ、活性汚泥、微生物相、Proteobacteria β subclass

〒113 東京都文京区本郷 7-3-1 TEL 03-3812-2111 内 6250

プローブおよび DAPI で染色した試料は、蛍光顕微鏡で観察した。同一視野を、プローブと DAPI それぞれの励起波長で励起して写真撮影し、蛍光を発している菌数をカウントした。以下の式から各プローブの目的細菌の、全菌に対する存在率を算出し、3 視野以上について求めた存在率を平均して最終的な存在率とした。

$$\text{存在率(\%)} = \frac{\text{プローブによる蛍光を発している細胞数}}{\text{DAPIによる蛍光を発している細胞数}} \times 100$$

3. 結果と考察

各サンプルにおける、各プローブの目標微生物の存在率を図1、2に示した。Ps に関しては、BET、GAM プローブのみを用いた。

3.1. 都市下水処理場

As から C までの4つの都市下水処理場は、その処理方式の違いにかかわらず、グループレベルの微生物相では目立

った特徴はみられない。どれも Proteobacteria β subclass が主成分をなしている。（図1）

3.2. 規模について

中水道処理施設のDサンプルは、 β subclass が多い点や γ subclass の存在率など、下水処理場サンプルと似ている（図1）。中水道施設の処理水量は、下水処理場の処理水量の約 100 分の 1 のオーダーだが、規模による微生物相の違いはあまり大きくないといえる。E サンプルは、DAPI による全菌数に対する EUB の割合が極端に小さく、その他の EUB が大きくマイナスになっている。同じスライドガラス上の試料の中で後のほうに観察したため、プローブの蛍光の退色がすすみ、定量化がうまくいかなかったと考えられる。

3.3. 処理場内での変化について

処理場 A に関しては、処理場内での微生物相の変化を追うため、最初沈殿池越流水も調査した（図2 Ps）。このサンプルからは Proteobacteria β subclass がそれほど優勢ではないのに対し、 γ subclass がほかより多めである、古細菌がほとんどいない、といった結果が得られた。最初沈殿池越流水は沈殿処理だけの生下水であり、越流水中の微生物も生下水中に生存しているものである。一方、生物反応槽中の微生物は有機物を分解し沈殿しやすい微生物が選択的に蓄積されたものであり、最初沈殿池越流水と活性汚泥とは微生物相が大きく異なることは当然である。 γ subclass が多めなもの、越流水がまだ生下水に近いためである可能性がある。尿尿に含まれる腸内細菌はそのほとんどが Proteobacteria γ subclass に属しており、それらが生下水中で生き残っている可能性が考えられるからである。

4. 結論

Amann らにより、ドイツの下水処理場の活性汚泥では Proteobacteria β subclass が主成分であることが報告されているが、本研究により東京の下水処理場の活性汚泥においても Proteobacteria β subclass が優勢であることが確かめられた。

またグループレベルで見ると、活性汚泥中の微生物相は、その運転方法や規模にかかわらず、大きなばらつきは見られなかった。

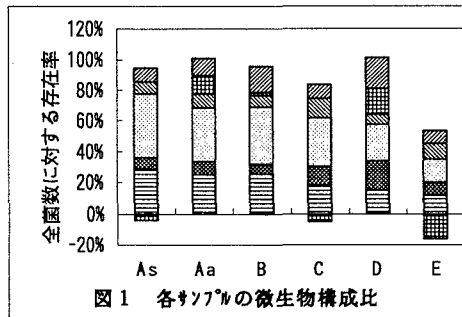


図1 各サンプルの微生物構成比

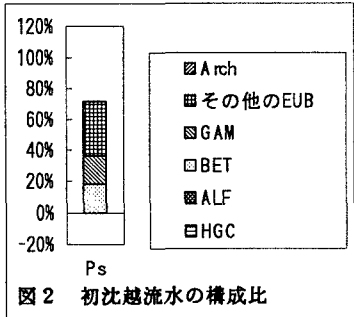


図2 初沈越流水の構成比

※その他の EUB = (EUB で検出された細菌の存在率) - (下位グループの HGC, ALF, BET, GAM で検出された細菌の存在率の合計)

参考文献 1) Amann, R. I. et al. (1995) *Microbiol. Rev.* 59(1):143-169

2) Amann, R. I. (1995) *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6:1-15, Kluwer Academic Publishers.

3) Manz, W. et al. (1994) *Wat. Res.* 28(8):1715-1723