

MAR-FISH 法を用いた多環芳香族炭化水素類（PAHs）分解細菌の特異的検出

広島大学大学院 正会員 ○金田一 智規
 広島大学大学院 学生会員 田辺 泰人
 広島大学大学院 学生会員 梶原 寛司
 広島大学大学院 正会員 尾崎 則篤

1. はじめに

環境中に存在する様々な有害化学物質群の 1 つに多環芳香族炭化水素類(PAHs)がある。PAHs は下水処理場内にも存在し、その一部は、活性汚泥中の細菌により分解されていると考えられる。しかし、実際に活性汚泥中のどの細菌が分解に関与しているかはほとんど把握されていない。従来、細菌の特性の把握には純粋培養系を用いられてきたが、現在培養可能な細菌は、全体の数%にしかすぎないといわれている。さらに、実環境中での細菌は複合微生物系を形成して存在し、その機能を発揮していると考えられる。このため、複合微生物群集内で実際に分解を担っている細菌種を特定することが重要となる。培養を介さず、複合微生物系内の目的とする細菌種の系統学的同定と基質利用特性の把握が可能な分子生物学的手法のひとつに MAR-FISH 法がある。この手法は放射性同位元素で標識された物質をトレーサーとして用いた Microautoradiography と FISH 法を組み合わせることによって、基質を取り込んだ細菌種を FISH 法で同定し、顕微鏡上で特定する手法である。

本研究では、MAR-FISH 法を用いて PAHs 分解細菌を検出する方法を確立し、活性汚泥内の分解を担う細菌種を特定することを目的とする。

2. 実験方法

(1) 活性汚泥による PAHs の分解実験

分解実験に用いる活性汚泥は、標準活性汚泥法で処理を行っている下水処理場の好気槽から採取した。PAHs は、下水処理場内で比較的高濃度で検出される Phenanthrene (Phe)、Fluoranthene (Flu)、Pyrene (Pyr)、Benzo(a)pyrene (B(a)p)の 4 物質を対象とした。

MLSS 約 1,000 mg/L の活性汚泥に、最終濃度 1,000 µg/L の PAHs を加え、培養液量を 100 mL とし、25°C、100 rpm の条件で 7 日間、振とう培養を行った。70°C

で 15 分間、低温殺菌を行った系を対照系とし、同条件で培養した。PAHs の測定は HPLC による蛍光検出法で行った。

(2) 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

PAHs を用いて活性汚泥を (1) の分解実験と同条件で 2 週間振とう培養した。培養前後の活性汚泥から DNA を抽出し、全細菌を対象とした Bact11f-Univ1492r のプライマーセットを用いて PCR 増幅し、クローニングを行った。得られたクローンの塩基配列から N-J 法により系統樹を作成した。

(3) MAR-FISH 法

対象とした PAHs の ^{14}C で標識された化合物 ($[^{14}\text{C}]\text{PAHs}$)を用い、培養液量を 2 mL とし、25°C、100 rpm で 3 日間振とう培養を行った。 $[^{14}\text{C}]\text{PAHs}$ の最終濃度は、Phe が 8,136 µg/L、Flu が 11,278 µg/L、Pyr が 9,364 µg/L、B(a)p が 10,583 µg/L とした。培養後、バイオマスへの ^{14}C 取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。 ^{14}C で標識されていない PAHs を用いて同条件で培養し、HPLC で PAHs の測定を行った。MAR-FISH 法では、系統解析で検出された細菌を対象とした。

3. 結果と考察

(1) 活性汚泥による PAHs の分解実験

本実験系では対照系での PAHs の減少は活性汚泥への吸着または揮発が考えられ、活性系ではこれらに加え、生物分解が考えられる。データには示していないが、活性系において 4 物質とも 1 日目から 70% の除去率を示し、7 日目には、Phe で 100%、Flu で 81%、Pyr で 75%、B(a)p で 87% の除去率であった。対照系においてはそれぞれ 20%、4%、1%、55% の除去率であった。4 物質とも、活性系と対照系の除去率には有意な差があったことから、活性汚泥により PAHs が分解されていると考えられる。

キーワード 多環芳香族炭化水素類(PAHs), MAR-FISH 法, 微生物分解, 活性汚泥

連絡先 〒739-8527 広島県東広島市鏡山 1-4-1 広島大学大学院工学研究科 TEL 082-424-5718

(2) 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

系統解析の結果、2 週間の培養前後で検出されたクローンに特徴的な変化は見られなかった。活性汚泥中には多種多様な細菌が存在することと、PAHs は微生物難分解性であるため、今回の実験では、PAHs 分解能力を有する細菌の集積が見られなかったと考えられる。MAR-FISH 法で対象とする細菌種は、培養前後で検出されたクローンのうち、活性汚泥から比較的高頻度に検出される *Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria* 門を対象として、それぞれに特異的なプローブ (ALF1b、BET42a、GAM42a) を用いた。

(3) MAR-FISH 法

図1にMAR-FISHの実験系と同条件で3日間培養した活性汚泥の除去率を示す。4物質とも対照系と比べて活性系において高い除去率が得られた。活性系と対照系の除去率の差が、(1)の分解実験と比べて少ないのは、培養時間の差であると考えられる。この時の $[^{14}\text{C}]$ PAHsのバイオマスへの取り込み率を図2に示す。Pheにおいて ^{14}C の高い取り込み率が得られたが、他は対照系と有意な差はなかった。図3にMAR-FISH画像を示す。図3Aの $[^{14}\text{C}]$ Phe銀粒子と同じ位置に、図3Bで*Betaproteobacteria*が観察されたことより、*Betaproteobacteria*によるPheの取り込みが確認された。 $[^{14}\text{C}]$ Pyrの系においては今回用いた3つのプローブでは検出されない細菌種による $[^{14}\text{C}]$ Pyrの取り込みが確認された(図3C、3D)。これらの結果より、MAR-FISH法を用いて活性汚泥の中からPAHs分解細菌を検出する方法を確立することができた。対照系ではFISH法で検出される細菌と異なる位置に銀粒子がみられたことから、図2における対照系での ^{14}C の取り込みは活性汚泥への吸着によるものと考えられる。 $[^{14}\text{C}]$ Pyrの活性系における取り込み率は、 $[^{14}\text{C}]$ Pheに比べて少なかったが、取り込み画像を得ることができた(図3C、3D)。これは他のPAHsの ^{14}C 標識部位が1、2箇所であるのに対して、Pyrでは4箇所と多く(図3中のPAH上の赤色の部分は ^{14}C で標識された位置を示している)、除去率が低くても ^{14}C が取り込まれる可能性が高かったためであると考えられる。これらのことから、PAHsのような分解経路が複雑な物質では、使用するトレーサの ^{14}C 標識部位も重要になると考えられる。

4. まとめ

PAHs は、活性汚泥により吸着除去、または微生物分解され、MAR-FISH 法を用いて、PAHs 分解細菌を可視化することができた。今後は、分解・代謝産物の測定を行い、PAHs 分解経路の推定を行うとともに、各段階で反応に関与する細菌種を MAR-FISH 法により可視化することを試みる。また、今回 Phe の分解が示唆された *Betaproteobacteria* については属・種レベルで特定する。

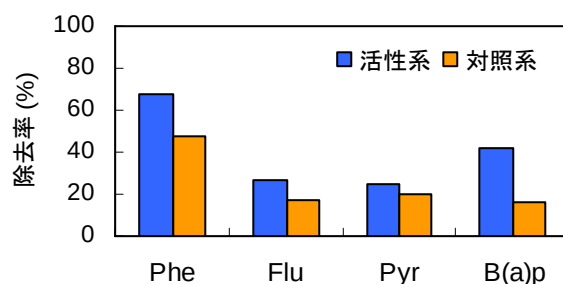


図1 PAHsの除去率

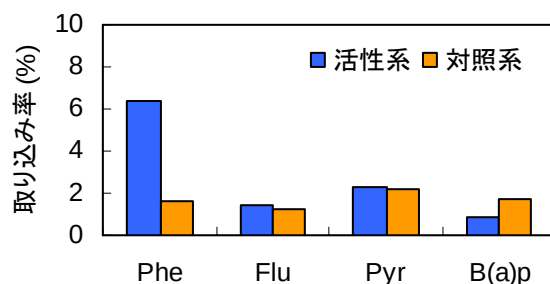


図2 $[^{14}\text{C}]$ PAHsのバイオマスへの取り込み率

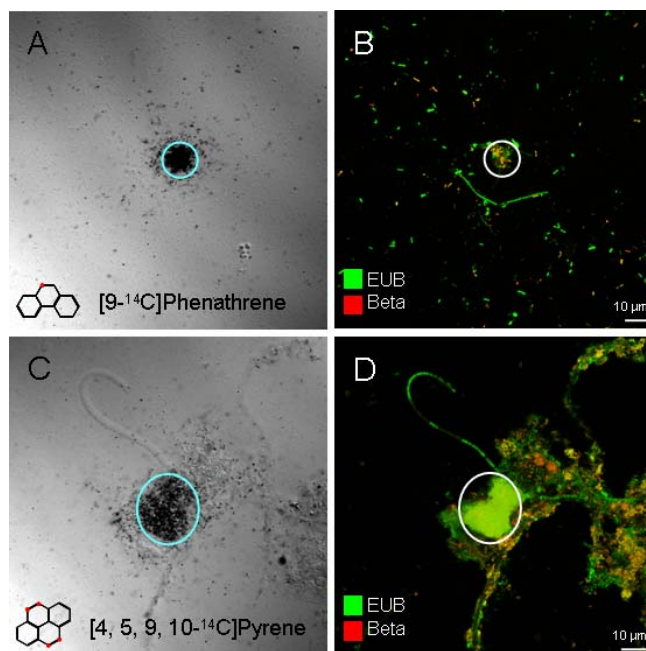


図3 MAR-FISH 画像