

高感度 FISH 法を用いた水処理装置内の未培養微生物の視覚的検出

松江工業高等専門学校 ○(学) 岡崎祐輝, (正) 山口剛士
住友重機械エンバイロメント株式会社 中野淳
豊橋技術科学大学 山田剛史

1. はじめに

微生物を利用した水処理は、下水や工業廃水の処理システムに用いられるなど様々な場所で用いられている。微生物を用いた水処理の代表的な問題として、バルキングが報告されている。バルキングは、装置内の汚泥が通常の汚泥よりも沈降性が悪くなる状態であり、その結果、処理効率の低下や水処理プロセスの破綻を引き起こすことが報告されている¹⁾。従って、バルキング発生のメカニズムの解明やバルキングの制御技術を確認することは、処理プロセスを安定的かつ高効率で運転するうえで極めて重要な課題である。バルキングの発生は、主に糸状性細菌が関与していると考えられている。しかし、水処理装置内の環境や季節変化、廃水の種類などによってバルキングに関与する微生物種が異なるという報告もあり、未だバルキングに関与する微生物の把握ができていないのが現状である¹⁾。そこで本研究では、まず、水処理装置内で発生したバルキング前後における細菌と古細菌の相互関係を把握することを目的として、細菌と古細菌を fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法及び高感度 FISH 法である quick *in situ* DNA hybridization chain reaction (HCR) -FISH 法を用いて視覚的検出を試みた。また、バルキング発生前後の細菌の検出率を求め、細菌の存在割合を把握した。さらに、16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物群集構造解析を行い、バルキングに関与する可能性のある微生物を同定し、高感度 FISH 法による視覚的検出を試みた。

2. 実験方法

2.1 サンプルの選定

本研究では、嫌気性のグラニュール汚泥を用いた水処理システムである Expanded Granular Sludge Bed

(EGSB) リアクター内のバルキング発生前後のグラニュール汚泥を用いた。装置から採取したサンプルはホルムアルデヒド溶液で固定し、超音波処理を行い物理的に分散させた。

2.2 プローブの選定

本研究で用いたプローブを Table1 に示す。FISH 法には、古細菌を標的として AlexaFluor555 を標識させた ARC915 プローブを用いた。quickHCR-FISH 法には、細菌を標的として EUB338 領域に交雑する配列及び HCR 法の伸長起点を有したイニシエーター配列を加えた EUB338 initiatorH プローブを用いた。また、バルキング発生後で増加率が高かった未培養微生物群である operational taxonomic unit (OTU1) の検出には、それら微生物を検出可能な BCR467 initiatorH 及び BCR851 initiatorH プローブを設計し適用した。蛍光増幅には、AlexaFluor488 を標識させた蛍光増幅プローブ (H1 及び H2) を用いた。

2.3 FISH 法及び quickHCR-FISH 法

FISH 法は、Sekiguchi らの方法に準拠し行った³⁾。quickHCR-FISH 法は、Yamaguchi らの方法に準拠し行った⁴⁾。

2.4 細菌及び古細菌の多重染色

本研究では、FISH 法及び quickHCR-FISH 法を用いて多重染色を行った。以下の手順で多重染色を試みた。まず、FISH 法及び quickHCR-FISH 法に用いるプローブ (ARC915 プローブ及び EUB338 initiatorH プローブ) を 1:1 の割合で混合し、ホルムアミド濃度 40% で各標的部位に交雑させた。その後洗浄を行い、ホルムアミドを有していない蛍光増幅バッファーを用いて H1 及び H2 による蛍光増幅を行った。

Table 1 Probe used in this study

Probe name	Probe sequence (5'-3')	%FA	Reference
FISH			
ARC915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	40	2)
quickHCR-FISH			
<i>Initiator probe</i>			
EUB338 initiatorH	CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGAAAAAAGCTGCCTCCCGTAGGAGT	20, 40	4)
BCR467 initiatorH	CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGAAAAAATACCATCW(A)GCACCGATAC	5	This study
BCR851 initiatorH	CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGAAAAAAGTTTCCCTAAGACGCTG	5,15	This study
<i>Amplifier probe</i>			
H1	TCTAGTCGTTgatgctttgtattcggCGACAGATAAccgaatacaaaagcatc	0	4)
H2	cgaatacaaaagcatcAACGACTAGAgatgctttgtattcggTTATCTGTCTCG	0	4)

※ Lowercase letters represent the stem structure of the amplifier probe.

2.5 バルキング前後の微生物群集構造解析

16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物群集構造解析は、Illumina MiSeq による 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域のアンプリコン解析によって調査した。塩基配列情報を基にした分子系統群への帰属は、Quantitative Insights Into Microbial Ecology パイプラインを用いて行った。

2.6 細菌群の検出率の算出

高感度 FISH 法による細菌の検出率は、Yamaguchi らの方法に準拠して行った⁴⁾。

2.7 水処理装置内の未培養微生物の視覚的検出

本研究では、高感度 FISH 法である quickHCR-FISH 法を用いて未培養微生物の視覚的検出を行った。まず、未培養微生物群である OTU1 に分類された微生物に対して BCR467 initiatorH プローブ及び BCR851 initiatorH プローブを 1:1 で混合し、ホルムアミド濃度 5% で交雑させた。その後、余分なプローブを洗浄し、蛍光増幅プローブである H1 及び H2 を用いて HCR 法による蛍光増幅を行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 細菌及び古細菌の多重染色

バルキング発生時のグラニュール汚泥の細菌及び古細菌の相互関係を明らかにするために、バルキング発生後のサンプルに対して、細菌及び古細菌の多重染色を行った。本研究で用いたサンプルでは FISH 法による蛍光が微弱であり細菌の検出が困難であった。そこで、高感度 FISH 法である quickHCR-FISH 法を用いて細胞壁処理を必要としない多重染色を行った。その結果、細菌及び古細菌を視覚的に検出することに成功した (Fig. 1)。また、検出された細菌には、球菌や桿菌とともに糸状性細菌も存在していることが明らかとなった。また、古細菌の形態学的特徴としても細菌と同様の特徴が見られ、多様な微生物が存在していることが明らかとなった。

3.2 バルキングに関与する微生物の選定

バルキング発生前後の微生物叢の変遷を明らかにするために、バルキング発生前後のサンプルを用いて 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析を行った。その結果、複数種の微生物群がバルキング発生後に増加していることが明らかとなった (データ非表示)。また、最も増加率が大きかった OTU 1 に分類された微生物は、*Bacteroidetes* 門に属する未培養微生物群であった。従って、OTU1 に分類された *Bacteroidetes* 門に属する未培養微生物群がバルキングに関与している可能性が高いと考えた。

3.3 バルキング発生前後の細菌群の検出率

バルキング発生前後の細菌の存在率を把握するため

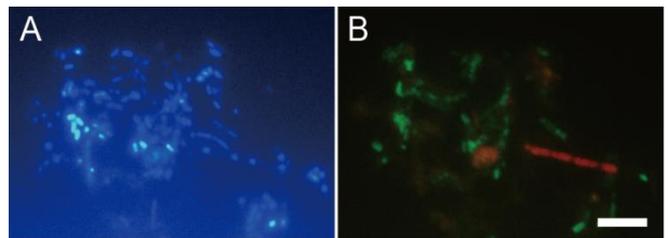


Fig. 1 Detection of bacterial and archaeal microbes in an anaerobic sludge sample by using FISH and quickHCR-FISH. (A) DAPI stained cells. (B) Probe signal (Archaea : red, Bacteria : green). Both panels shows same field. The exposure times were adjusted with each fluorescent signal. The scale bar is shown in 10 μ m.

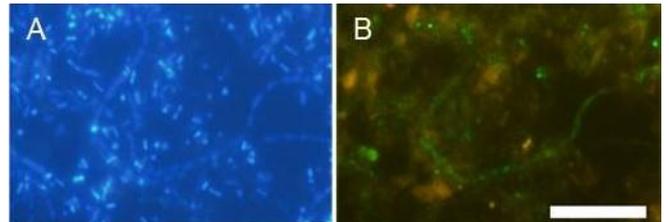


Fig. 2 Detection of uncultivated microbes, named OTU1 in anaerobic sludge sample, by quickHCR-FISH. (A) DAPI stained cells. (B) Probe signal. Both panels shows same field. The exposure times were adjusted with each fluorescent signal. The scale bar is shown in 20 μ m.

に quickHCR-FISH 法を用いてバルキング発生前後の細菌群の検出率を算出した。その結果、バルキング発生後の細菌群の検出率 ($56.1 \pm 1.4\%$) は、バルキング発生前の細菌群の検出率 ($35.7 \pm 1.8\%$) と比較して高かった。視覚的検出による細菌の検出率が 50% 程度であった要因としては、本研究で用いたプローブでは交雑しない細菌やプローブの細胞浸透性が低い細菌の存在、古細菌の存在が影響を及ぼしていると考えられる。

3.4 未培養微生物の視覚的検出

16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物群集構造解析の結果より、バルキング発生後に増加した未培養微生物 (OTU1) に対してプローブを設計し、視覚的検出を行った。mathFISH 法⁵⁾を用いて最適ホルムアミド濃度を検討した。その結果、いくつかの微生物から蛍光が得られ、その中で糸状性細菌も検出されたため、*Bacteroidetes* 門に属する微生物群がバルキングに直接的に関与していることが示唆された (Fig. 2)。

4. まとめと今後の展望

本研究では、quickHCR-FISH 法により、バルキングに関与する可能性のある未培養微生物の形態学的特徴を明らかにすることができた。しかし、蛍光が微弱であるため quickHCR-FISH 法の実験条件の最適化を行う必要が考えられる。

参考文献 1) Yamada *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005. 2) Stahl *et al.*, Wiley, NYSE:JW. A., 1991. 3) Sekiguchi *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999. 4) Yamaguchi *et al.*, *Syst. Appl. Microbiol.*, 2015. 5) Yilmaz *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012.