

FISH 法を用いた活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌の検出

信州大学工学部工学系研究科 山浦修一
信州大学工学部 正 松本明人

1. はじめに

Bacillus 属細菌はたんぱく質分解能力に優れており、生育環境や栄養状態によって様々な形態を呈することが知られている。伊那中央衛生センターでは好気性消化処理方式でし尿と各種浄化槽汚泥の処理が無臭かつ効率的に行なわれおり、この消化槽汚泥の細菌類の大部分が *Bacillus* 属細菌であったと報告されている。また当研究室ではここ数年、*Bacillus* 属細菌を大量に含むとされるコンポストを種汚泥に用い、浄化槽や下水処理場の余剰汚泥の好気性消化実験をおこなった結果、きわめて高い汚泥分解率を得ている。

排水処理をより効率よく行なっていくためには、処理に重要な役割を担っている微生物の動態を把握していくことが重要である。本研究では分子生物学的手法である FISH (Fluorescent in situ hybridization) 法を用いて処理水中の *Bacillus* 属細菌の検出を目的とした。また *Bacillus* 属細菌を培養した際の形態の変化についても観察した。

2. 実験方法

2-1 培養中の形態の変化

微生物製剤用の枯草菌粉末 (7500mg/L) にスクロースとポリペプトンを主成分とした合成基質を加えた。滅菌は 121℃で 20 分行い、容積 120mL のバイアル瓶に枯草菌粉末溶液 40mL および基質 5mL をそれぞれ注入した。恒温振とう培養槽で温度を 35℃で 120 回・min⁻¹ となるよう運転した。試料を基質洗浄の後、スライドに滴下し全細菌を染色する DAPI で染色をおこない蛍光顕微鏡で形態を観察した。

2-2 FISH 法による *Bacillus* 属細菌の検出

使用した試料は採取後すぐに 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した。基質洗浄の後、フィルター (Millipore, 0.2 μm, 47mm φ) に集菌し、エタノールで脱水した。1 μL のプローブに 8 μL の Hybridization buffer (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.2, 1% SDS, ホルムアミド (Probe-A=50%, Probe-B=35%, Probe-C=0%), ブロッキング阻害剤 (Block Ace: 雪印乳業) 10% を溶解して、46℃で 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後 48℃の Washing Solution で 20 分間非結合プローブの洗浄を行った。5 分間の DAPI 染色の後、落射蛍光顕微鏡で観察した。

実験には表-1 に示す *Bacillus* 属細菌をそれぞれ異なるレベルで検出する 3 種類のプローブを用いた。まず培養した *Bacillus* 属細菌と嫌気性サンプルを混合させたものに 3 種類のプローブを適用し、特異性の確認をおこなった。その後、下水処理場から採取した曝気槽内溶液に適用し *Bacillus* 属細菌の存在状況を観察した。

表-1 使用したプローブ

Probe	Target group	Probe sequence(5'-3')	Reference
Probe-A	<i>Bacillus subtilis</i>	GTACCGCCCTATTCTGAACG	Kazue TAKAOKA et al. ¹⁾
Probe-B	Low G+C	CGGAAGATTCCTACTGA	HARALD M et al.(1999) ²⁾
Probe-C	<i>Genus Bacillus</i>	GTTCCCCAGTTTCCAATGACCC	JOAO CALOS T.D et.al.(2002) ³⁾

3. 実験結果および考察

3-1 培養中の形態の変化

写真-1、写真-2に DAPI 染色による培養 12 時間後、6 日後の観察結果を示す。培養開始時は $1\mu\text{m}$ 程度の桿菌であったが、4 時間後には $5\mu\text{m}$ 程の桿菌が連なったものが多数を占めるようになった。12 時間後から個々に独立したものに分離しはじめ、48 時間後には完全に分散した状態になった。また 24 時間後から小さな桿菌も観察されるようになった。6 日後以降は写真-2 のような $1\mu\text{m}$ 程度の桿菌が分散して存在する状態が続いた。

Bacillus 属細菌は培養開始後短時間の間に大きく形態を変化させるが、一定の時期に達するとほとんど形態を変化させないことが分かった。これは基質消費後、*Bacillus* 属細菌の活性が低下し形態を安定させていることが考えられる。

3-2 FISH 法による *Bacillus* 属細菌の検出

培養した *Bacillus* 属細菌と嫌気性サンプルを混合させたものに 3 種類のプローブを適用したところ、Probe-C は Probe-A、Probe-B よりも強い特異的な蛍光を発していた。

下水処理場の曝気槽内溶液の DAPI 染色による全菌を検出した結果を写真-3 に、Probe-C を用いて *Bacillus* 属細菌を検出した結果を写真-4 に示す。Probe-C を用いた結果、夾雑物による非特異的な蛍光も見られたが、フロック内部を貫通するように存在する糸状の細菌から特異的な蛍光が観察された。このことから、*Bacillus* 属細菌は曝気槽内ではかなりの部分で糸状性の細菌として存在し、場合によってはバルキングを引き起こす可能性がある⁴⁾ことも考えられる。

今後は他のサンプルにも適用し、活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌の存在状況を把握していく予定である。

【謝辞】

微生物製剤用の枯草菌粉末を提供して下さった NPO 法人資源循環システム開発センターの岩崎和之氏、曝気槽サンプルを提供して下さった（財）長野県下水道公社千曲川下流管理事務所の皆様に感謝いたします。

【参考文献】

- 1) 高岡一栄ら,(2000).第 34 回日本水環境学会年会講演集,33.
- 2) HARALD,M. et al, (1999).System.Appl.Microbiol.22,186-196.
- 3) JOAO CARLOS T.D et al, (2002).J.Basic Microbiol.43.3,202-209
- 4) 村上弘毅ら,(1995).水環境学会誌.第 18 巻.第 2 号,97-108.

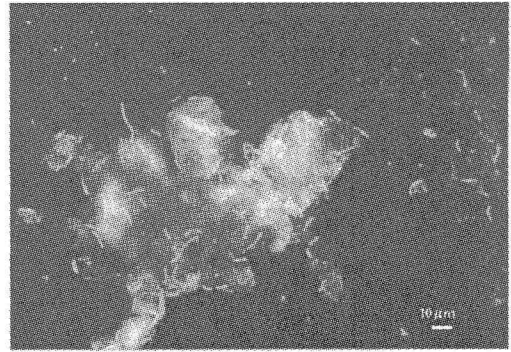


写真-1 DAPI 染色による培養 12 時間後の様子

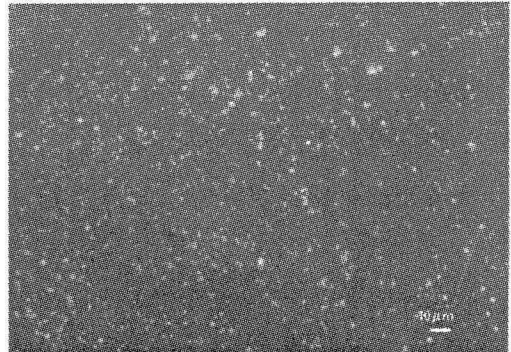


写真-2 DAPI 染色による培養 6 日後の様子

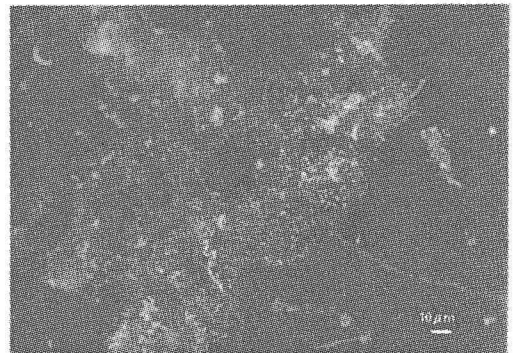


写真-3 DAPI 染色による曝気槽内溶液の様子

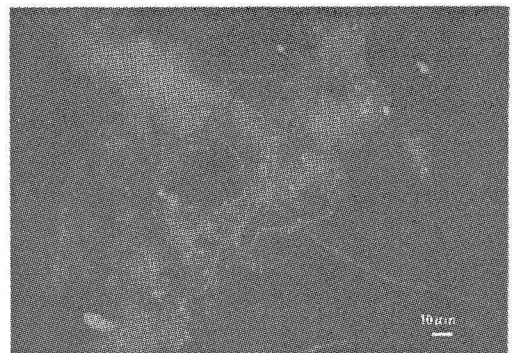


写真-4 Probe-C による曝気槽内溶液の *Bacillus* 属細菌の検出結果 (写真-3 と同視野)