

下水処理プロセスにおける生理的活性のある細菌群の挙動解析

八戸工業高等専門学校 正会員 ○矢口淳一

非会員 成田健志 Nur Dianna binti Ibrahim

1 はじめに

近年 DNA 染色試薬 PMA(Propidium monoazide)を用いて生理的活性のある細菌のみを定量する手法が開発され、われわれは PMA 試薬と PCR を組み合わせた PMA-PCR 法で活性のある大腸菌のみを計数する方法を研究開発してきた。また次世代シーケンサーなどの分子生物学的手法の発展によって、病原性細菌を含む全ての細菌群の検出が実現可能になりつつある。本研究では、PMA-PCR 法や RNA を利用した RT-PCR 法などの活性のある細菌を検出する手法と次世代シーケンサーを組み合わせることで生理的活性のある全ての細菌、特に病原性細菌を 2 つの下水処理プロセスから網羅的に検出し、その挙動を明らかにすることを目的としている。

2 実験材料及び方法

2.1 実験材料

水環境試料として馬淵川浄化センター（2019 年 3 月 27 日採取）と東部下水処理場（2019 年 7 月 22 日採取）から採取した流入水や最終沈殿池流出水に加え、塩素消毒後の処理水を使用した。処理水はハイポ入り滅菌採水ビン（栄研化学（株））を使用して採取した。生理的活性のある細菌と死滅した細菌を区別する試薬として Biotium 社の PMAxx (propidium monoazide)を使用した。

2.2 実験方法

本研究の実験概要を図 1 に示した。NGS を用いた生理的活性のある細菌の検出方法について検討するため、PCR 法と PMA-PCR 法、RT-PCR 法を適用したサンプルを用いて細菌叢解析を行った。また DNA と RNA の抽出、逆転写反応及びリアルタイム PCR の方法については昨年度の中間発表会と同様なため割愛した。

2.2.1 PMAxx 処理

流入水については 10 倍希釈した後、0.5mL の透明なマイクロチューブに採水し、PMAxx 濃度が 50 μ M となるように添加して暗室で 5 分間 PMAxx 処理を行った。ハイポ入り滅菌採水ビンで採水した塩素殺菌後の処理水と最終沈殿池流出水については 200mL、300mL

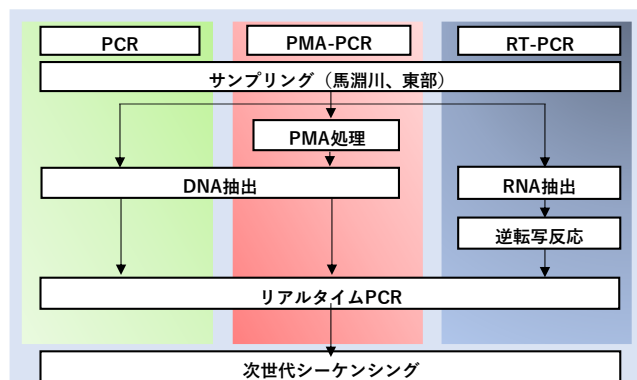


図1 本研究の実験概要

のサンプルをそれぞれのポリカーボネートフィルター（Advantec, 孔径 0.2 μ m、直径 47mm）でろ過後、50 μ M の PMAxx 溶液をフィルターが完全に浸るように 2mL 添加し、暗室で 5 分間放置した。その後、PMAxx をろ過排出し、PBS で洗浄後フィルターをシャーレに移し、LED 投光器(Global Japan, GJ-LP-30RGB)の青色光（波長 460~470nm）を 40 分間照射した。

2.2.2 次世代シーケンサーによる解析

サンプルの DNA 増幅は、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象に行い、得られた塩基配列データは usearch 及び Qiime で解析した。PCR 産物を精製後、細菌叢を株式会社生物技研所有の次世代シーケンサー Miseq(Illumina 社)で解析した。

3 実験結果及び考察

3.1 大腸菌群数および大腸菌数

2 つの下水処理場における流入水、最終沈殿池流出水及び処理水の大腸菌群数と大腸菌数を図 2 に示した。指標細菌はメンブレンフィルター法で計数した。両方の処理場において処理工程で大腸菌、大腸菌群ともに 5~6 オーダー処理されていることが知られる。馬淵川浄化センターの処理水では大腸菌が検出されなかったことから、十分な塩素消毒が行われていることが分かった。大腸菌群の処理水基準は 3000 (個/mL)で、各処理場の処理水はその基準を十分に満たしていた。

3.2 大腸菌の DNA と RNA 濃度

リアルタイム PCR を用いて大腸菌の 23S rRNA 遺伝

キーワード：病原性細菌, PMA, 大腸菌, RNA, 次世代シーケンサー

連絡先：〒039-1192 青森県八戸市田面木字上野平 16-1, 0178-27-7305 yaguchi-z@hachinohe-ct.ac.jp

子(EC 23S857)と rRNA 濃度を PCR, PMA-PCR 及び RT-PCR 法で測定すると、PCR 法は全工程で 2 オーダー未満しか減少しないのに対し、PMA-PCR と RT-PCR 法では 2~3 オーダー減少した。しかし処理水中には生理的活性のある大腸菌が 2 つの処理場とも残存しており、PMA-PCR 法では 10^2 copy 数/100mL 以上、RT-PCR 法では 10^3 copy 数/100mL 以上残存していた。2~3 オーダーしか処理されていないことが分かった。

3.3 細菌叢解析結果

2 つの下水処理場の処理工程 3 地点に、PCR 法と PMA-PCR 法及び RT-PCR 法を適用し、NGS を使用して細菌叢解析を行った。馬淵川浄化センターから得られた網レベルの解析結果を図 4 に示した。流入水では、RT-PCR 法の細菌叢のみ他の 2 方法と異なっていたのに対し、最終沈殿池流出水と処理水では 3 つの方法とも解析された細菌叢は大きく異なり、PMA-PCR 法と RT-PCR 法でもかなり違いが見られた。東部下水処理場の解析結果では、最終沈殿池流出水と処理水で RT-PCR 法で得られた細菌叢のみ他の 2 方法と異なっていた。

馬淵川浄化センターの病原性細菌の組成割合について属レベルで解析した結果を図 5 に示した。流入水中では活性をもった *Acinetobacter* 属と *Arcobacter* 属が多く存在しているが、処理過程で除去され処理水中に残存していても活性は低いと考えられる。東部下水処理場では、流入水中のほとんどの病原菌は最終沈殿池流出水までに除去されていた。また 2 つの処理場とも *Mycobacterium* 属の細菌が最終沈殿池流出水と処理水の PMA-PCR 法と RT-PCR 法で得られた細菌叢で組成割合が高く、塩素消毒後も活性を維持して残存していることが分かる。

4 まとめ

2 つの下水処理場とも培養によるメンブレンフィルター法では大腸菌、大腸菌群とも 5~6 オーダー処理されていたが、PMA-PCR 法や RT-PCR 法では処理水中に生理的活性のある大腸菌が残存していた。NGS を用いた細菌叢解析の結果、生理的活性のある細菌を検出する手法と組み合わせることによって塩素消毒に強く、処理後も残存している細菌を検出できた。

（謝辞）本研究は科学研究補助金基盤研究 C（課題番号 16K06559）の支援を得て行われました。ここに記して深く感謝の意を表します。

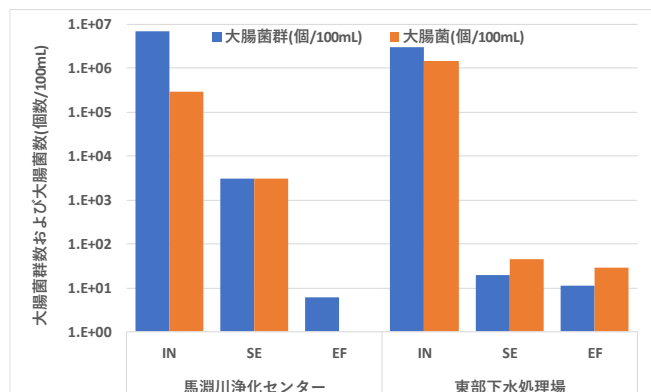


図 2 大腸菌群数および大腸菌数

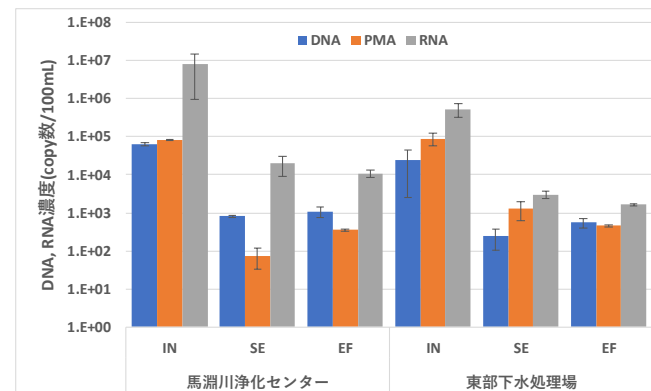


図 3 大腸菌の DNA, RNA 濃度

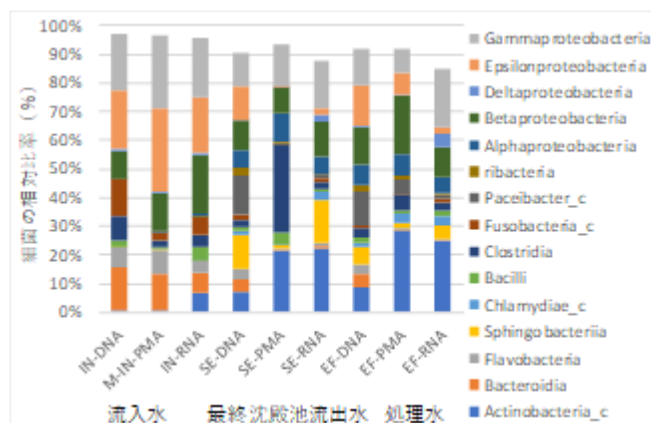


図 4 馬淵川浄化センターの細菌叢解析結果

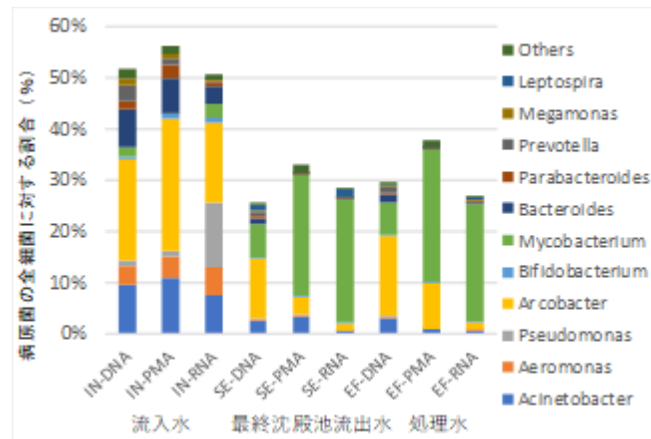


図 5 馬淵川浄化センターの病原性細菌の割合