

(77) 生物学的リン除去プロセスにおける PAOs の可視化による検出

今村 裕一^{1*}・山崎 廉予¹・出口 浩¹・渡辺 義公²

¹東京理科大学大学院理工学研究科土木工学専攻 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641)

²北海道大学環境ナノ・バイオ工学研究センター (〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目)

* E-mail: j7609602@ed.noda.tus.ac.jp

本研究は、分子生物学的手法を用いた PAOs の可視化を試み、その存在を示唆する視覚情報を得た。各細菌を特異的に蛍光させる FISH 法と、細胞内に取り込まれたポリリン酸顆粒を蛍光させる DAPI 染色とを併用することで、標的とする細菌がポリリン酸を蓄積しているか否かを確認した。この結果、*Azohydromonas* 属、*Aeromonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Flavobacterium* 属の細菌が、好気工程終了時にポリリン酸を蓄積していることが視覚的に見出された。細菌量解析の結果、これらの細菌の占有率は全細菌に対して合計で 8 % 程度であった。また、細胞内にポリリン酸顆粒を保有するものは全体の約 30 % であると示唆された。上記 4 種の細菌を PAOs と考えると、PAOs の 1/4 を占めることとなる。以上を踏まえ、PAOs は複数種の細菌によって構成されていることが示唆された。

Key Words: Polyphosphate Accumulating Organisms, Fluorescence in situ Hybridization, DAPI

1. はじめに

リン鉱石はあと数十年で枯渇する希少資源であると叫ばれている。リン資源を持たず 100 % を輸入に頼る我が国では、リン資源の有効活用や、効率的な循環活用システムの構築が早急な課題となり注目度が高まってきた¹⁾。日本が輸入するリンは、年間約 70 万 t であるとされ、このうち約 5 万 t が余剰汚泥等の廃棄物として処分されている²⁾。そこで注目されるのが生物学的リン除去プロセスである。

生物学的リン除去プロセスは、下水中のリンを微生物が高濃度に蓄積することでリンを除去する。汚泥からリンを回収する試みも多く取り組まれている。これらは、微生物 (PAOs) の代謝を活用したもので、凝集剤を用いる処理方法に比べ安価に運用することが可能である。しかし、水温、pH、DO などの変動によってリン除去が不安定になることから実下水処理場への適用例は少ない。また、PAOs (Polyphosphate Accumulating Organisms: ポリリン

酸蓄積細菌) に関する情報も多くはない。

近年発展著しい、分子生物学的手法を用いることで、活性汚泥中の細菌叢、PAOs を視覚化する試みが報告されている。*Actinobacteria* 門に属する一部の細菌や、*Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* が PAO であると明らかにされている³⁾⁴⁾。また、Seviour⁵⁾、黒澤⁶⁾ は良好な生物学的リン除去が行われている活性汚泥の細菌叢パターンを報告している。

本研究は、スキムミルクを栄養源とし嫌気好気活性汚泥 (以下、AO 汚泥) 馴養した。これに対し、FISH 法と DAPI 染色を用いて、生物学的リン除去を担う PAOs の細菌叢を明らかにすることを目的とした。各細菌を特異的に蛍光させる FISH 法と、細胞内に蓄積されたポリリン酸顆粒を蛍光させる DAPI 染色を併用する二重染色を施すことで、PAOs の視覚化を試みた。また、FISH 法を用いた細菌量解析により、良好にリン除去を行う細菌叢のパターンを調査した。若干の結果が得られたので、以下にこれを報告する。

2. 実験方法

(1) 連続回分式反応槽の運転

本研究は、生物学的リン除去プロセスを採用し、有効容積 4.5 L のラボスケール連続回分式反応槽を用いて AO 汚泥を馴養した。基質は、C/N 比が下水の組成に近いスキムミルクを用い、TOC 濃度 120 mg/L、T-P 濃度 8 mg/L、T-N 濃度 8 mg/L となるように調製した。培養基質の組成を表-1 に示す。なお、基質貯蔵タンクは腐敗を防ぐ目的で冷蔵庫に保存し、2 日毎に基質を作成した。

反応槽の運転サイクルは、基質流入および嫌気工程に 120 分、好気工程に 180 分、沈降工程・排水工程に 60 分とした。1 サイクルは 6 時間であり、HRT は 27 時間とした。また、反応槽の水温は 20～25 °C で維持した。

(2) DAPI 染色

DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) は、染色に用いられる蛍光色素の一種であり、DNA に対して強力に結合する物質である。また、細胞膜透過性の色素であり、生きた細胞・固定された細胞の両方に使用することができるという特徴を持つ。DAPI (50～100 µg/mL) は、細胞内の核を青色に蛍光し、また、ポリリン酸を黄色く蛍光させることができる。この青色と黄色の蛍光の違いを利用し、大腸菌のポリリン酸蓄積変異株の分離が試みられている⁷⁾。これを参考にし、本研究では PAOs が細胞内にポリリン酸を蓄積しているか否かを確認するために DAPI 染色を行った。

(3) FISH 法

FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法とは、蛍光物質を標識したオリゴヌクレオチドプローブを目的の遺伝子とハイブリダイゼーションさせることで、蛍光顕微鏡で目的遺伝子を検出する手法である。本研究でターゲットとするのは、細胞の 16S rRNA である。この配列をコードする 16S rRNA 遺伝子は、非常に安定な遺伝子であり、微生物のクロモソーム DNA に複数存在する。16S rRNA に蛍光標識をつけることで、目的とする細菌が顕微鏡下で観察可能となる。

表 - 1 培養基質の組成

スキムミルク	6.34 g
KH ₂ PO ₄	0.454 g
NH ₄ CL	0.425 g
水道水	20 L

本研究では、好気工程終了時に AO 汚泥を採取し、概ね Amann⁹⁾の方法に準じて FISH 法を施した。また、汚泥を分散させるため、0.5 N の塩酸存在下によるダイヤモンドベッセルを用いた分散処理を行った⁹⁾。

FISH 法に用いた蛍光プローブを表-2 に示す。ポジティブコントロールとして、全ての細菌グループが検出できる EUB338 と、ネガティブコントロールとして、いかなる細菌も検出しない NON-EUB の 2 種類の蛍光プローブを使用した。また、網 (class) レベルで細菌を検出するプローブ ALF968, BET42a, GAM42a, CF319a を使用した。さらに、属 (genus) レベルで細菌を検出するプローブ AHM, AER, CHR, FLV を使用した。

FISH 法に用いた蛍光プローブを表-2 に示す。ポジティブコントロールとして、全ての細菌グループが検出できる EUB338 と、ネガティブコントロールとして、いかなる細菌も検出しない NON-EUB の 2 種類の蛍光プローブを使用した。また、網 (class) レベルで細菌を検出するプローブ ALF968, BET42a, GAM42a, CF319a を使用した。さらに、属 (genus) レベルで細菌を検出するプローブ AHM, AER, CHR, FLV を使用した。

(4) DAPI 染色と FISH 法を併用した二重染色

本研究での二重染色とは、FISH 法を施したサンプルに対し、DAPI 染色 (50 µg/mL, 10 min) を行い、同視野より 2 種類の蛍光を観察する手法である。FISH 視野において標的とする細菌の位置情報を得、DAPI 視野においてポリリン酸の蓄積の有無を確認した。

(5) 細菌量解析方法

FISH 後の試料を検鏡し、顕微鏡据え付けカメラ

表 - 2 FISH 法で使用した蛍光プローブ

Abbreviation	Target		Probe sequences 5' → 3'	Reference
	class	genus		
ALF968	<i>α-Proteobacteria</i>	-	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	Neef A. <i>et al.</i> (1997)
BET42a	<i>β-Proteobacteria</i>	-	GCCTTCCCACCTTCGTTT	Manz W. <i>et al.</i> (1992)
AHM		<i>Azohydromonas</i>	CCGCACTCCAGCCGTGCAG	Kurosawa (2008)
GAM42a	<i>γ-Proteobacteria</i>	-	GCCTTCCCACATCGTTT	Manz W. <i>et al.</i> (1992)
AER		<i>Aeromonas</i>	GCTTTCACATCTAACTTATC	Kurosawa (2008)
CF319a	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	-	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	Manz W. <i>et al.</i> (1996)
CHR		<i>Chryseobacterium</i>	CACCACTGACTTATCAGTCCG	Kurosawa (2008)
FLV		<i>Flavobacterium</i>	GCTTTCACCACTGACTTACCA	Kurosawa (2008)
EUB338	Most bacteria		GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann R.I. <i>et al.</i> (1990)
NON-EUB	No bacteria		ACTCCTACGGGAGGCAGC	Wallner G. <i>et al.</i> (1993)

COOLPIX950 (NIKON 社) を用いて撮影をした。対物レンズ 40 倍を用い、1 プローブにつき顕微鏡写真を 25 枚程度 (スライドガラス上に塗布したサンプルを直径線上に一列) 撮影した。標準偏差はおおよそ 0.45 % である。得られた画像を Photoshop 6.0 (Adobe 社) により二値化処理し、細菌の蛍光部分を白色で抽出した。この面積を数値化し合計することで、細菌量を相対的に算出した。プローブ毎にこの処理を行い、EUB338 プローブに対する割合を算出し、各種細菌の占有率を求めた。

3. 実験結果とその考察

(1) 連続回分式反応槽の運転状況

実験期間中の MLSS は 2,200~3,200 mg/L であった。また、リン除去率は 97 % 以上で推移し、リン含有率は 5.8 % 程度であった。これを、良好にリン除去を行う AO 汚泥とし、DAPI 染色、FISH 法に用いた。

(2) PAOs の占有率

好気工程終了時に採取した AO 汚泥に対し、高濃度 DAPI 染色を行った。この結果を図-1 に示す。

図-1 のように、全ての細菌の持つ核が青色の蛍光を発することから、細菌の所在を視覚的に確認することができる。さらに、黄色の蛍光の位置からポリリン酸顆粒を持つ PAOs の所在を視覚的に確認することができる。本研究の撮影精度 (対物 40 倍) では、ポリリン酸顆粒の蛍光強度が強いため、写真にはポリリン酸顆粒の原型のみでなく、細胞全体が蛍光しているように見える。図-1 の画像から多数の黄色の蛍光が観測されることから、ポリリン酸顆粒を細胞内に持つ細菌が多数存在していることがわかる。これらが PAOs を構成する細菌群と考える。

ここで、図-1 に対し画像処理ソフトを用い、青色及び黄色の蛍光を検出する閾値、黄色の蛍光を検出する閾値を設定した。それぞれ、全細菌、PAOs の可視化に対応している。この 2 つの閾値を用いて二値化処理を行った。

全細菌の蛍光面積を白色に置き換えた画像を図-2 に示す。

次に、リンを蓄積した PAOs と考えられる黄色の蛍光面積を白色に置き換えた画像を図-3 に示す。

二値化処理後、白色に置き換わったピクセル数を求めることで、図-2、図-3 それぞれの蛍光面積を算出した。リンを蓄積した PAOs の蛍光面積 (図-3、白い部分) は、全細菌の蛍光面積 (図-2、白い部分) の 29.7 % となった。この際、顕微鏡写真 15 枚を用いており、標準偏差は 8 % である。

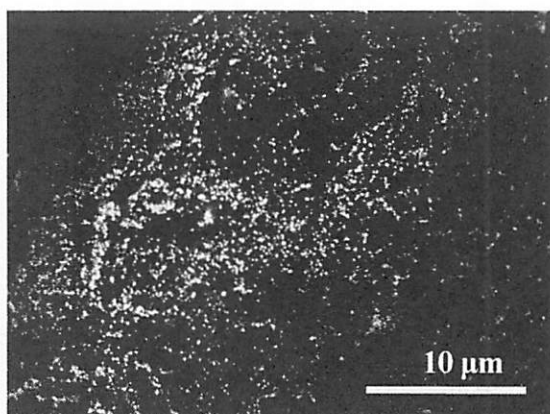


図-1 AO 汚泥に対する DAPI 染色

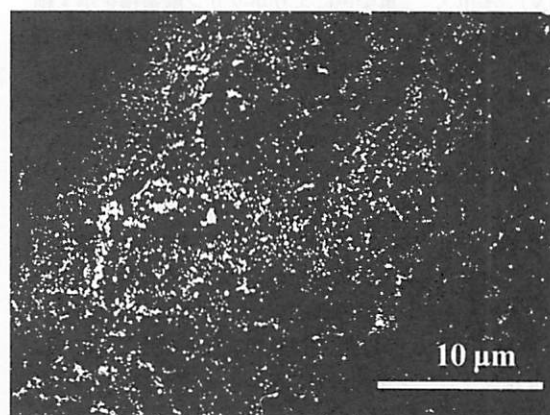


図-2 全細菌の二値化

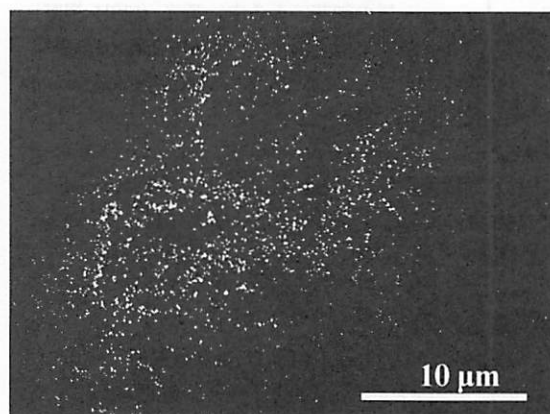
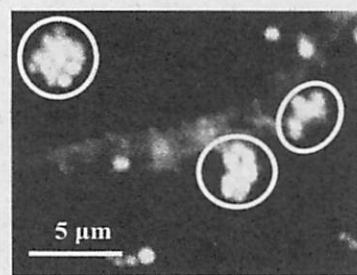
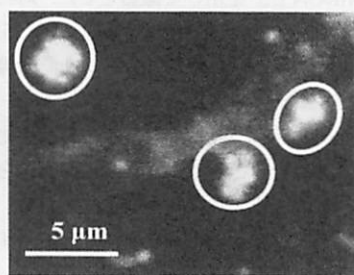


図-3 PAOs の二値化

よって、本研究で得た AO 汚泥において、PAOs がおよそ 30 % 程度存在することが解析結果から示唆された。



DAPI視野



FISH視野

図-4 CHRプローブを用いた二重染色

(3) 二重染色を用いたPAOsの視覚化

好気工程終了時に採取したAO汚泥に対して、FISH法に属レベルのプローブ（表-2中、AHM, AER, CHR, FLV）を用い、二重染色によりポリリン酸蓄積を示す細菌の視覚化を行った。この4種のプローブが標的とする細菌は、本研究におけるAO汚泥に存在し、PAOsの可能性が示唆されたものである⁶⁾。なお、PAOsの有力候補である *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* は、PCR-DGGE法及びシーケンスを用いた解析では、本研究のAO汚泥からは検出するに至らなかった。

なお、本研究におけるポリリン酸蓄積の判断基準は、画像処理ソフト上で同視野におけるFISH画像とDAPI画像を重ねた際、FISH画像上の検出された細菌とDAPI画像上のポリリン酸顆粒の位置が重なる場合とした。以上4種のプローブを用いて二重染色を行った結果の一例（CHRプローブを用いた二重染色）を、図-4に示す。

図-4のように白く円で囲った箇所において、*Chryseobacterium* 属の細菌による赤い蛍光（FISH視野）と、ポリリン酸顆粒の黄色い蛍光（DAPI視野）が重なることが確認された。このことから、*Chryseobacterium* 属の細菌がポリリン酸を蓄積していたと考えられる。*Azohydromonas* 属、*Aeromonas* 属、*Flavobacterium* 属の細菌でも、同様な結果が得られた。よって、*Azohydromonas* 属、*Aeromonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Flavobacterium* 属の細菌が、PAOsの一種であることが示唆された。

(4) 細菌叢解析

a) 網レベルのプローブを用いた細菌叢解析

良好なリン除去を行う細菌叢パターンを明らかにするため、AO汚泥に対し網レベルの蛍光プローブ（表-2中ALF968, BET42a, GAM42a, CF319a）を用いてFISH法を行った。この結果を図-5に示す。図-5において、縦軸は標的とする各細菌グループ、横軸は全細菌に対する各細菌の占有率を示している。

図-5のように、4つの網レベルのグループの中では *Cytophaga-Flavobacterium* グループが一番多く、15%程度

存在していた。以下、*β-Proteobacteria* 網が9%程度、*α-Proteobacteria* 網が5%程度、*γ-Proteobacteria* 網が0.1%程度であった。

Seviourら⁵⁾、黒澤⁶⁾の報告によると、生物学的リン除去が良好に行われている活性汚泥中には *β-Proteobacteria* 網、*Cytophaga-Flavobacterium* グループの割合が大きくなる。一方で、生物学的リン除去が悪化した際は、*β-Proteobacteria* 網、*Cytophaga-Flavobacterium* グループの割合が著しく減少し、*α-Proteobacteria* 網の割合が優先的になると報告している。本実験で採取したAO汚泥は良好なリン除去を示しており、細菌叢は図-5のようにリン除去が良好に行われる細菌叢のパターンに合致した。これらを総括すると、*β-Proteobacteria* 網、*Cytophaga-Flavobacterium* グループの細菌の割合が大きく、かつ、*α-Proteobacteria* 網の割合が小さいことが、リン除去を良好に行うAO汚泥の細菌叢パターンであることが考えられる。

b) 属レベルのプローブを用いた細菌叢解析

本研究で、ポリリン酸の蓄積を確認した *Azohydromonas* 属、*Aeromonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Flavobacterium* 属の細菌がAO汚泥中にどの程度存在するのか、FISH法により解析を行った。この結果を図-6に示す。図-6において、縦軸は標的とする各細菌種、横軸は全細菌に対する各細菌の占有率を示している。

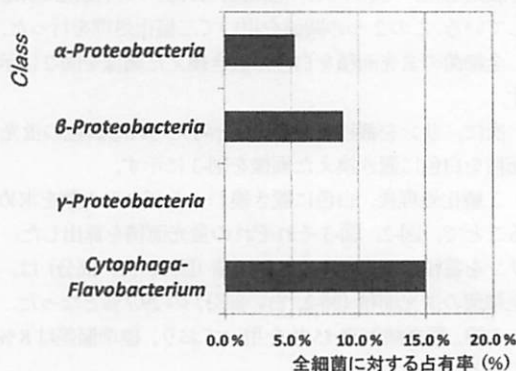


図-5 網レベルのプローブを用いた細菌叢解析

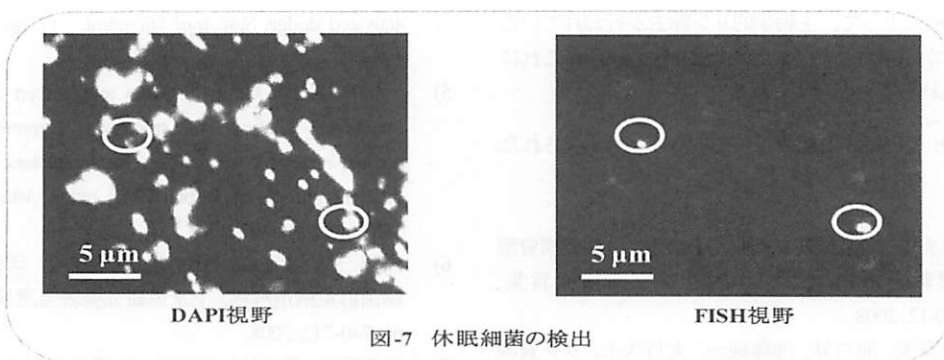


図-7 休眠細菌の検出

図-6より、ポリリン酸の蓄積を確認した4種類の細菌の内、AO汚泥中にもっとも多く存在していたのは *Flavobacterium* 属で 3.9 % 程度となった。次いで、*Azohydromonas* 属は 2.2 %、*Aeromonas* 属は 1.6 %、*Chryseobacterium* 属は 0.4 % 程度であった。ここで、 γ -*Proteobacteria* 綱に属する *Aeromonas* 属の占有率が、上の網レベルのプロープを用いた細菌叢解析における γ -*Proteobacteria* 綱の占有率を上回る結果となった。この事象に関して、現在調査中である。

上記4種類の細菌の総和を算出したところ、本研究で得たAO汚泥内には、およそ 8.0 % 程度存在していた。また、PAOs は約 30 % 存在すると示唆されることから、*Azohydromonas* 属、*Aeromonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Flavobacterium* 属の4種は、このうちの 1/4 を占めていることとなる。他の PAOs が、これら4種と同様の占有率で存在すると仮定すると、PAOs を構成する細菌は 10 種以上存在すると考えられる。

既存の研究では、*Actinobacteria* 門に属する一部の細菌や、*Rhodocyclus* 属に近縁な *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* が PAO であるとされている³⁾⁴⁾。これらの PAO や、本研究で得られた PAOs の情報を総合すると、PAOs は多種類の細菌によって構成されていると考えられる。今後の課題として、4種類以外の PAOs を同定し、FISH 法により細菌量を解析しなければならないと考える。

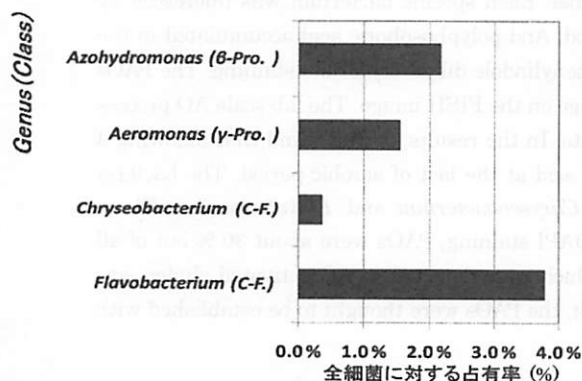


図-6 属レベルのプロープを用いた細菌叢解析

(5) 休眠細菌の検出

FISH 法と DAPI 染色との二重染色を行ったところ、同じ種の細菌でもポリリン酸を蓄積しているものと、していないものが見出された。図-7にこれを示す。

図-7より、FISH 視野の右に位置し蛍光を発する細菌は、DAPI 視野においてリン蓄積がされていることが視覚的に分かる。しかし、FISH 視野の左に位置する細菌は、DAPI 視野においてリンの蓄積が見られなかった。ごく稀ではあるが、本研究において、この事象を見ることができた。よって、同じ種の細菌でも、休眠状態にあり、リンを蓄積していないものがあることが示唆された。この場合、PAOs の占有率 30 % という値は、PAOs の中でも、ある好気工程終了時においてポリリン酸を蓄積した細菌の割合となりうる。

4. 結論

本研究を総じて、次のようにまとめる。

- (1) β -*Proteobacteria* 綱、*Cytophaga-Flavobacterium* グループの細菌の割合が大きく、かつ、 α -*Proteobacteria* 綱の割合が小さいことが、リン除去を良好に行う AO 汚泥の細菌叢パターンであることが考えられる。
- (2) 本研究で得た AO 汚泥内には、PAOs がおよそ 30 % 程度存在することが示唆された。
- (3) 二重染色を施した結果、*Azohydromonas* 属、*Aeromonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Flavobacterium* 属の細菌が、好気工程終了時にポリリン酸を蓄積していることが視覚的に確認された。よってこれら4種の細菌が PAOs であることが示唆された。
- (4) 上記4種の細菌は、本研究で得た AO 汚泥内におよそ 8.0 % 存在し、PAOs の 1/4 を占めていた。
- (5) (1)~(4)より、複数種の細菌によって構成される

PAOs によって、生物学的リン除去が行われていることが示唆された。また、上記4種の細菌がこれに含まれることが考えられる。

- (6) PAOs の中に休眠細菌が存在することが示唆された。

参考文献

- 1) 橋本光史, なぜ今リン回収が必要なのか, 元素資源の濃縮と活用エンジニアリング講演要旨集, pp.10-12, 2008.
- 2) 黒田章夫, 滝口昇, 加藤純一, 大竹久夫, リン資源枯渇の危機予測とそれに対応したリン有効利用技術開発, 環境バイオテクノロジー学会誌, vol.4, No.2, pp.87-94, 2005.
- 3) Hesslmann, R.P., C.Werlen, D.Hahn, J. R. van der Meer, and A. J. Zehnder., Enrichment phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge, *Syst Appl Microbiol*, 22, pp. 454-465, 1999.
- 4) Wager M, Amann R, Kampfer P, Assume B, Hartmann A, Hutzler P, Springer N & Schleifer K-H, Identification and in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge, *Syst Appl Microbiol*, 17, pp. 405-417, 1994.
- 5) Yun H. Kong, Grain N. Rees and Rovert J. Seviar, Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios, *Microbiology*, 148, pp. 2299-2307, 2002.
- 6) 黒澤一央, 水上徹, 出口浩, 嫌気好気 - 活性汚泥の細菌群集構造解析, 下水道研究発表会講演集, 45, pp. 740-742, 2008.
- 7) 黒田章夫, 微生物によるリンの濃縮と資源化 - ポリリン酸の科学 -, 元素資源の濃縮と活用エンジニアリング講演要旨集, pp.13-16, 2008.
- 8) Amann, R. I., *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targets nucleic acid probes, *In Molecular Microbial Ecology Manual*, pp. 1-15, 1995
- 9) 流石達也, 大迫幸輔, 鈴木智順, 出口浩, 脱窒反応槽に投入した多孔質固定化担体の細菌群集構造解析, 下水道協会, vol.43, No.522, 2006.

(2009. 5.22 受付)

Visible detection of PAOs in enhanced biological phosphorus removal process

Yuichi IMAMURA¹, Yukiyo YAMASAKI¹, Hiroshi DEGUCHI¹, Yoshimasa WATANABE²

¹Dept. of Civil Engineering, Tokyo University of Science

²Center for Environmental Nano and Bio Engineering in Hokkaido University

This study attempted that the visualization of PAOs in the Anaerobic-aerobic (AO) activated sludge by using FISH and DAPI staining together. Each specific bacterium was fluoresced by FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) method. And polyphosphoric acid accumulated in the cell was fluoresced by DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) staining. The PAOs were thought to be identified by laying DAPI image on the FISH image. The lab-scale AO process was operated with skimmed milk based substrate. In the results, it was found that following 4 kinds of bacteria accumulated a polyphosphoric acid at the last of aerobic period. The bacteria were the genus *Azohydromonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium* and *Flavobacterium*. These bacteria were about 8 % out of all bacteria. In DAPI staining, PAOs were about 30 % out of all bacteria. Therefore, these 4 kinds of bacteria which were detected in AO activated sludge was approximately 25 % out of all PAOs. As the result, the PAOs were thought to be established with many kinds of bacteria.