

MAR-FISH 法を用いた活性汚泥中の PAHs 分解細菌の検出

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 金田一 智規

広島大学大学院 正会員 尾崎 則篤

1. 背景

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、活性汚泥中の微生物により分解されていると考えられる。しかし、活性汚泥中のどのような細菌が分解に関与しているかは、あまり把握されていない。

従来、細菌の特性把握には、培養により単離した細菌が用いられてきた。しかし、現在培養可能な細菌は、数%と少ないことに加えて、実環境中では、複数の細菌が群集を形成して機能・存在している。このため、従来の単一種での特性把握には限界がある。培養を介さず、群集内での、ある細菌の基質利用特性を把握する手法として MAR-FISH 法 (Microautoradiography - Fluorescence *In Situ* Hybridization) が用いられるようになった。この手法は、放射性同位元素で標識した物質をトレーサーとして用いた Microautoradiography により、基質の取り込みを把握することに加えて、FISH 法により基質を利用した細菌の同定を行う。

本研究では、初めに、活性汚泥を用いて PAHs が微生物分解されることを確認する。次に MAR-FISH 法を用いて、活性汚泥中の PAHs 分解細菌の同定を行う。

2. 実験内容

(1) 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⁻¹ の活性汚泥に、最終濃度 1,000 µg L⁻¹ の PAHs を加え、液量を 100 mL とし、25°C、100 rpm 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同条件で培養し、

対照系とした。PAHs の測定は HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 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を基に系統樹を作成した。

(3) MAR-FISH 法

対象とした PAHs の ¹⁴C 標識化合物([¹⁴C]PAHs)を用い、液量を 2 mL とし、25°C、100 rpm で3日間振とう培養を行った。 [¹⁴C]PAHs の最終濃度は、Phe が 8,136 µg L⁻¹、Flu が 11,278 µg L⁻¹、Pyr が 9,364 µg L⁻¹、B(a)p が 10,583 µg L⁻¹ とした。培養後、バイオマスへの ¹⁴C 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。同時に標識されていない 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) 分解実験

図1に PAHs の除去率を示す。分解実験の結果、活性系の除去率の上昇は、4物質とも3日間で見られ、それ以降はほぼ一定となった。活性系において7日間で、Phe で100%、Flu で81%、Pyr で75%、B(a)p で87%の除去率が得られ、対照系においてそれぞれ、20%、4%、1%、55%の除去率が得られた。4物質とも、対照系に比べて高い除去率が得られたことより、活性汚泥により PAHs が吸着、または微生物分解されていると考えられる。

(2) 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

系統解析の結果、培養前後で活性汚泥中の細菌相に大きな変化は見られなかった。活性汚泥中には様々な細菌が存在することに加えて、PAHs は、難分解性であるため、2週間の培養期間では、PAHs 分

解能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 法では、培養前後で検出された細菌の中で、*Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria* を対象とした。

(3) MAR-FISH 法

図 2 に除去率を示す。4 物質とも対照系と比較して高い除去率が得られたことより、微生物分解が行なわれたと考えられる。図 3 に ^{14}C 取り込み率を示す。Phe で ^{14}C 取り込み率は数%であったが、顕微鏡で取り込みを観察することができた。図 4 に顕微鏡画像を示す。図 4(a)の $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ 銀粒子と同じ位置に、図 4(b)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。これらのことより、*Betaproteobacteria* が Phe の分解に関与している可能性が示された。川中ら¹⁾は、土壌中の *Betaproteobacteria* に属する *Burkholderia* が Phe の分解に関与していることを報告している。他の PAHs では、 ^{14}C 取り込み率に、あまり差が見られず、Flu、B(a)p では、 ^{14}C 取り込みは観察されなかった。しかし、Pyr では、細菌により取り込まれている画像が観察された。これは、Pyr の ^{14}C 標識部位が、他の $[^{14}\text{C}]\text{PAHs}$ が 1、2 箇所であるのに対して、4 箇所と多く、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。逆に、B(a)p では、除去率が高くても標識部位が 2 箇所であるため、取り込まれる可能性が低かったと考えられる。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、使用するトレーサーの ^{14}C 標識部位も重要になると考えられる。

4. 結論

PAHs は、活性汚泥により吸着除去、または微生物分解される可能性が示された。活性汚泥において Phe の微生物分解には *Betaproteobacteria* が関与している可能性が示された。

今後は、分解産物の測定を行い PAHs が微生物分解されているかの判断を行うと共に、活性汚泥による PAHs 分解経路を明らかにする。また、取り込みが観察された *Betaproteobacteria* に関しては、さらに細かいレベルでの細菌の同定を試みる。

参考文献

- 1) 川中ら：多環芳香族分解細菌の単離とその分解特性の比較，水環境学会誌，429 - 436(1998)

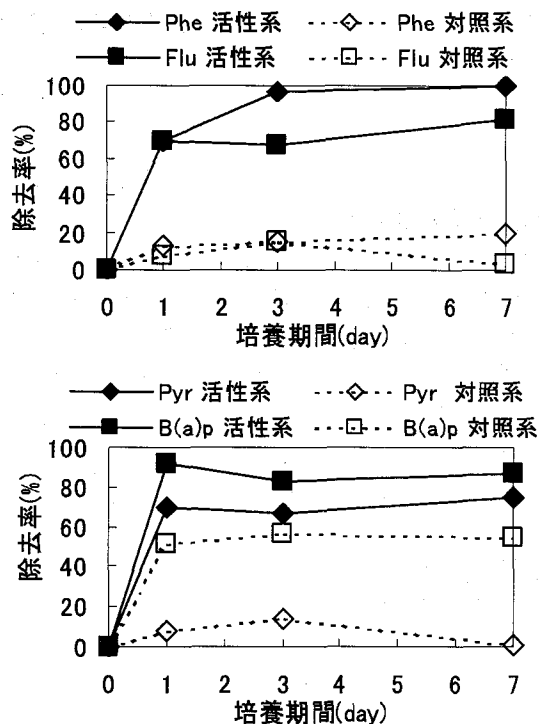


図 1 PAHs 除去率 (n=2)

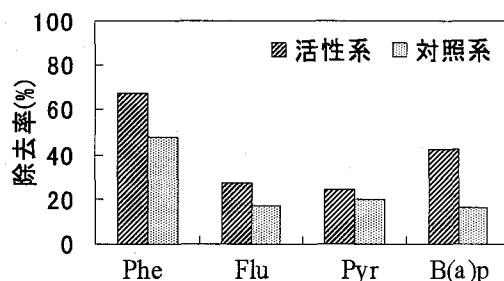


図 2 PAHs 除去率 (n=2) (MAR-FISH 法)

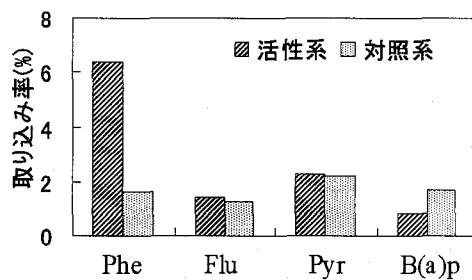


図 3 ^{14}C 取り込み率 (n=2)

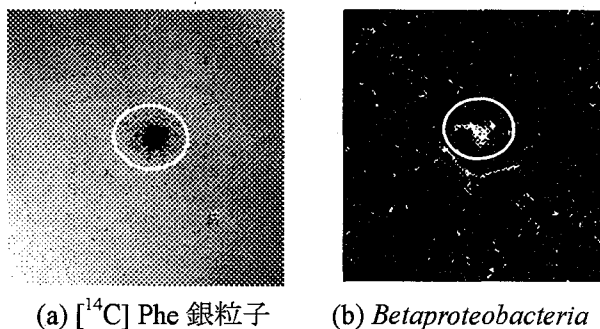


図 4 顕微鏡画像