

N-acyl-homoserine lactone (AHL)による活性汚泥内群集構造への影響評価

Evaluation of the effect of N-acyl-homoserine lactone (AHL) on bacterial community in activated sludge

学籍番号 56835
氏名 中野 拓磨 (Nsknsno, takuma)
指導教員 味埜 俊 教授

1. 背景と目的

廃水や下水中の汚濁・汚染物質を除去する処理法として、微生物群集の浄化能力を利用した活性汚泥法が古くから用いられており、現在でも、生活排水や工場廃水の処理に一般的に用いられている。しかし、その歴史の長さや生物処理という活性汚泥法の特徴にもかかわらず、生物学的な知見が未だ不足しているのが現状である。

活性汚泥をうまく制御するために、プロセスの運転条件などの外的な因子についてさまざまな研究がなされてきたが、そもそもこれらの外的因子を受けて汚泥中の微生物群集構造がどのようにして形成され、維持・変化していくかといったことについては外的因子の研究のみでは知ることができず、汚泥中の微生物間の相互作用といった内的な因子に着目することが必要となる。

微生物間相互作用には先に述べた基質競合以外にもさまざまな現象が知られているが、本研究では、微生物が産生する化学物質による微生物間相互作用(アレロパシー作用)が、微生物群集構造の形成・変化に重要な役割を担っているのではないかという仮説を建てた。微生物が産生する非常に多

岐にわたる化学物質の中で、近年そのメカニズムが解明され、さまざまな分野で研究が行われている **Quorum sensing** という微生物間の情報伝達・応答現象に関与するとされる **N-acyl-homoserine lactones (AHLs)**に着目し、この物質が微生物群集構造に及ぼす影響について研究を進めた。

2. 実験方法

K 市し尿処理場から入手した汚泥を元に実験室規模(容量 10L)の連続回分式リアクターを運転した。このリアクターの汚泥を対象に **AHL(C6-HSL)**を添加したバッチ実験を、異なるリアクター運転条件の下で 2 度行った。リアクターは、2 種類の運転サイクル①6 時間サイクル (5 時間好気、1 時間沈殿・放流・流入) および②24 時間サイクル (23 時間好気、1 時間沈殿・放流・流入) で、それぞれ酢酸を主たる炭素源とする人工下水で運転した。**HRT** は①10 時間、②40 時間、**SRT** は①約 8 日、②5 日とした。

バッチ実験は、リアクター汚泥を各 30mL ずつ 200mL 三角フラスコ 12 本に分取し、恒温室にて行った。バッチ実験では、リアクターに供給しているものと同一組成の基質 30mL とともに、**C6-HSL stock solution** を

バッチ汚泥混合液中の C6-HSL 濃度が 0 (control), 2, 5, または 10 μ M となるように与え、培養した。以下、各濃度それぞれ 3 つずつのバッチ汚泥をそれぞれ Control (C6-HSL 添加なし、対照系)、2 μ M (C6-HSL 2 μ M 添加)、5 μ M (C6-HSL 5 μ M 添加)、10 μ M (C6-HSL 10 μ M 添加) と呼ぶ。

バッチ実験では一日一回遠心分離により上澄みを除去し、新たに基質および C6-HSL を加えた。この基質交換直後に、分子生物学的群集構造解析に用いるために汚泥混合液を 1.5mL チューブに各 1[mL]、2 本ずつ採取した。また、培養中、フラスコの口をシリコ栓で封し、ロータリーシェイカーで攪拌することで通気を行った。

汚泥混合液のサンプリングと同時に、余剰汚泥の引き抜きを行った。

採取した汚泥サンプルからキットを用いて核酸を抽出し、1 回目のバッチでは 16SrDNA を対象に PCR-DGGE 法を、2 回目のバッチでは 16SrDNA および 16SrRNA を対象に (RT-)PCR-DGGE 法を、それぞれ適用した。使用したプライマーは、1 回目のバッチでは 357fGC-518r を、2 回目のバッチでは 357fGC-907r をそれぞれ用いた。DGGE は、1 回目、2 回目とも 30% - 60% の変性剤濃度勾配ゲルで行った。泳動条件は、1 回目のバッチでは 130V, 5 h、2 回目のバッチでは 130V, 8 h の条件とした。電気泳動後のゲルは、SYBR Green I で染色し、蛍光イメージアナライザーで撮像した。

4 実験結果と考察

C6-HSL を添加したバッチ実験において、triplicate として行ったバッチ実験の全てのサンプルで、非常に高い再現性が示された。したがって、本研究で得られた DGGE バンドパターンの信頼性は高いと考えられる。

16SrDNA を対象とした PCR-DGGE 法と 16SrRNA を対象とした RT-PCR-DGGE 法の結果を比較すると、RT-PCR-DGGE 法の方がバンド数の多い結果が得られた。よって、16SrRNA を対象とした方がより多くの微生物種の挙動を反映していることが示された。

第 1 次バッチ実験と第 2 次バッチ実験の結果を比較すると、リアクターの運転条件がバッチ実験条件により近い第 2 次バッチ実験の方が、バッチ実験を通してバンドパターンの違いが小さく、バッチ実験中の群集構造が比較的安定していた。

C6-HSL を添加したことによる微生物群集への影響は、微生物群集の経時的な挙動と比較すると軽微であるという結果であった。

しかし、一部の細菌で C6-HSL の添加によって強い影響を受けているものの存在も示され、添加した C6-HSL が汚泥内の細菌に対してオートインデューサーとして作用して、何らかの機能の発現を誘引していたことがバッチ実験によって示された。C6-HSL の添加によって特徴的な変化を示したバンドは、16SrRNA を対象とした方がより多く認められた。このことから、RNA を対象とした方がより敏感に AHLs の影響を捉えていることが示された。

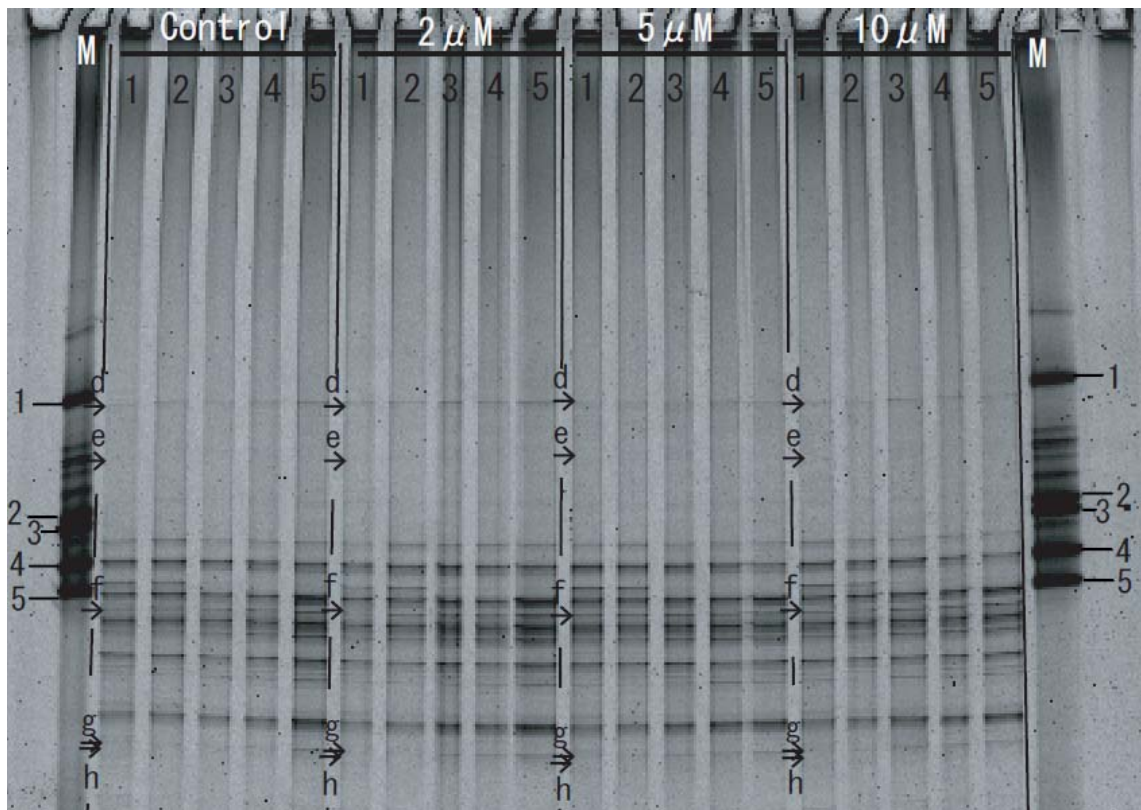
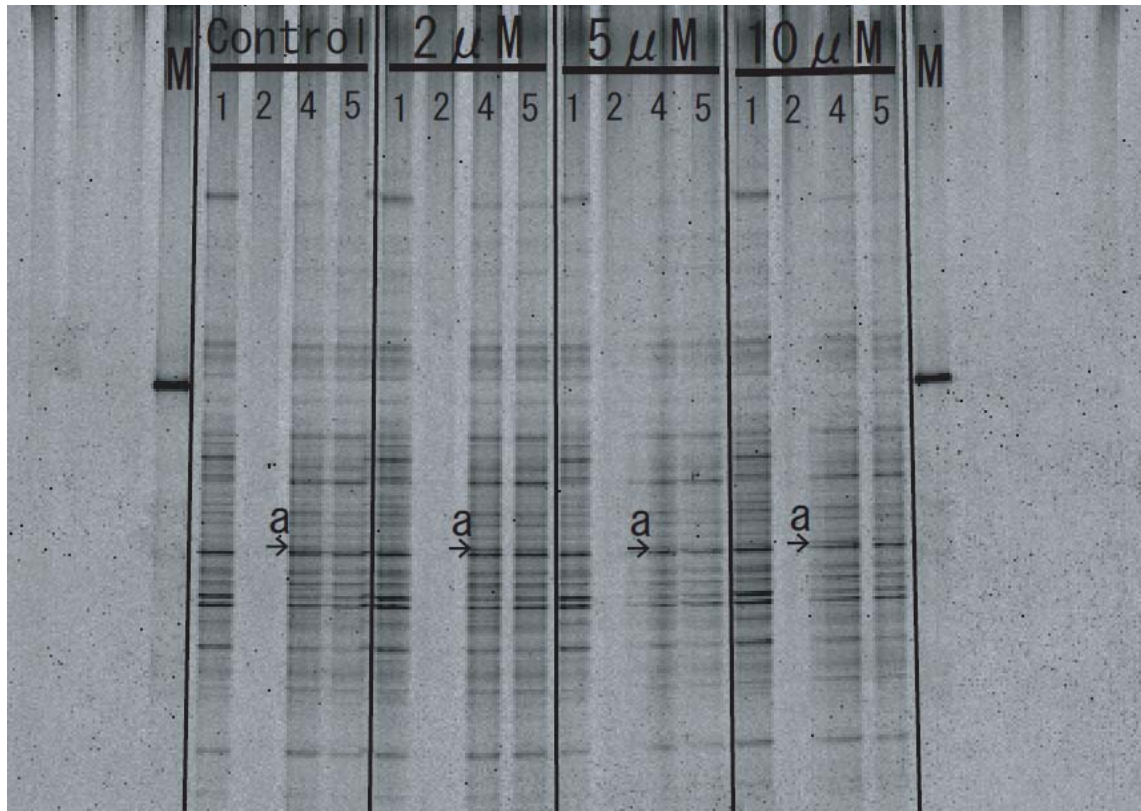


図1 第1次バッチ実験および第2次バッチ実験結果(上：第1次、下：第2次)

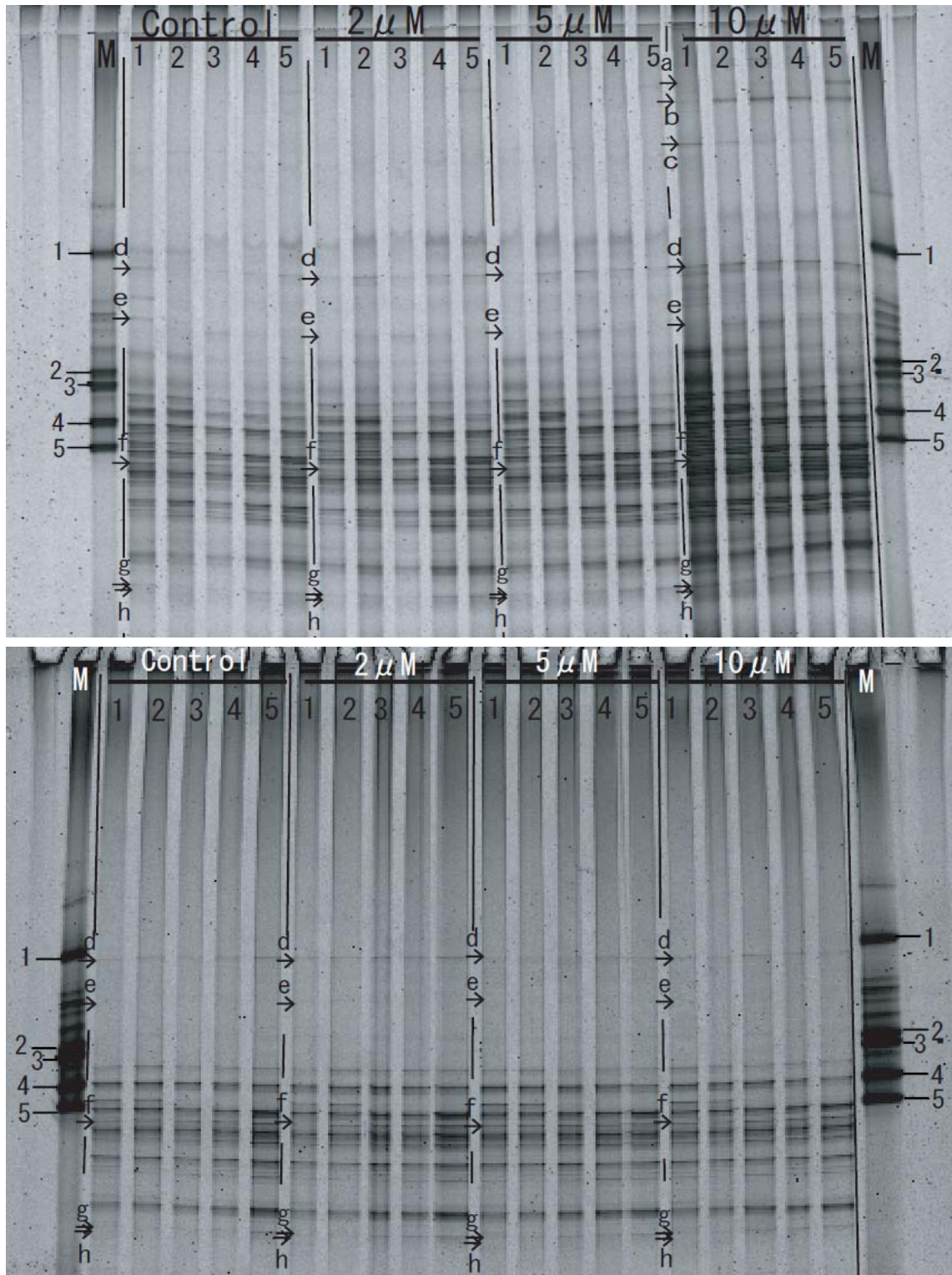


図2 第2次バッチ実験結果(上：16SrRNA、下：16SrDNA)