

活性汚泥における微生物相互作用物質検出方法の開発と それを用いた物質探索の試み

Development of a Method to Detect Microbial Interactions in Activated Sludge and an Attempt to Search Causative Chemicals

学籍番号 096756

氏名 高梨 正訓(Takanashi, Masanori)

指導教員 佐藤 弘泰 准教授

1. 研究背景と研究目的

下水処理場で一般的に用いられている手法である生物学的リン除去(EBPR:Enhanced Biological Phosphorus Removal)プロセスは、富栄養化の原因物質である排水中のリン除去に重要な役割を果たしている。しかし、実処理場や実験室規模でのEBPRプロセスであってもリン除去がうまくいかなくなることが度々報告されている。そして排水中のリン除去を適切に行うためには、活性汚泥中の微生物を適切に制御することが肝要と考えられている。微生物を制御するために、温度やpH等の外的要因を制御することによってリン除去が改善するという報告はそう少なくはない。しかし、微生物相は外的要因だけではなく、内的要因の影響も受けると考えられる。すなわち、外的要因と内的要因が単発的・複合的に作用し、微生物の群集構造を決定していると考えられることもできる。

活性汚泥における内的要因による微生物群集構造に及ぼす影響を調べた研究はあまりなく、内的要因による影響の知見を蓄積していくことが今後重要になってきている。

既往の研究によって、活性汚泥から固液抽出法によって化学物質を抽出し、その

化学物質を添加することによって微生物群集構造が変化することがわかった。しかし、固液抽出法による化学物質の抽出では、抽出液の中に多くの化学物質が含まれており、どの化学物質が微生物群集構造に大きな影響を及ぼしたか不明である。化学物質を分画し、各画分の影響を丹念に調べることで、目的成分を分離し、その影響を正確に記述することが可能となるが、そのためには多くの画分に分離された成分のそれぞれの微生物群集構造への影響を簡便に調べる技術が必須である。

そこで、本研究では分画した成分を迅速かつ簡便に微生物群集構造の変化を検出する方法の開発を試みた。

2. MALDI-TOFMS

本研究では、MALDI-TOFMS(以下、MALDIと記す)という装置を用いて微生物群集構造の変動を検出することを試みた。MALDIは主に生化学の分野で用いられる装置である。この装置の原理はマトリックスと言われるサンプルをイオン化させやすくする試料とサンプル混合させて、レーザーを照射しサンプルをイオン化させ、イオン化させたサンプルに電荷をかけ、検出機

までの到達時間の差を用いてサンプル中の化学物質を検出するものである。この装置のメリットとしては、(1) 微量サンプルでの分析が可能、(2) 試料が粗精製の状態でも分析可能、(3) 短時間での分析が可能という 3 点である。

3. 実験方法

本手法の有用性を検討するために以下の 3 つの実験を行った。(1) 微生物群集構造の相違の検出の可否、(2) 抽出物添加有無の相違による微生物群集構造変化の検出の可否、(3) 分画抽出物による微生物群集構造の変化の検出の可否の 3 点である。

(1) 微生物群集構造の相違を検出の可否の実験では、サンプルは実験室リアクターからリン除去能が良いもの(S1)、悪いもの(S2)、少しある(WL)、3 つの異なる汚泥を使用した。サンプル調製は各リアクターから汚泥を採取し、遠心分離に供し上澄み液を捨てた後にエタノールを添加し懸濁させた。その後遠心分離に再び供し上澄み液をサンプル原液としマトリックス溶液と混合させ分析を行った。MALDI の結果を主成分分析による解析を行った。

(2) 抽出物添加有無の相違による微生物群集構造変化の検出の可否は、培養用の汚泥とは異なる時期の汚泥を用いて、固液抽出法によって汚泥から化学物質を抽出し、その化学物質を添加し、培養後の微生物群集構造の変化を見ることによって、化学物質による影響を調べた。その後、MALDI と T-RFLP 法の結果を比較することによって本手法による微生物群集構造変化の検出の評価を行った。

(3) 分画抽出物による微生物群集構造の変

化の検出では、(2) で使用した抽出液を疎水性成分用固相抽出キット(Water 社, SepPak C18)を用いて、抽出液を分画した。抽出液を 6 つの組成(0,20,40,60,80,100%)の水・エタノール混合溶液で溶出させた。それぞれの溶出液を培養用の汚泥に添加し、培養後の微生物群集構造の変化を MALDI の主成分分析による解析を行った。

5. 結果

(1) の MALDI の結果を図 1 に、主成分分析の結果を図 2 に示した。図 1 では、S1 と WL のスペクトルが非常に類似していることが分かる。図 2 では、わずかではあるが S1 と WL との相違を検出することができ、微生物群集構造の相違を検出することができた。

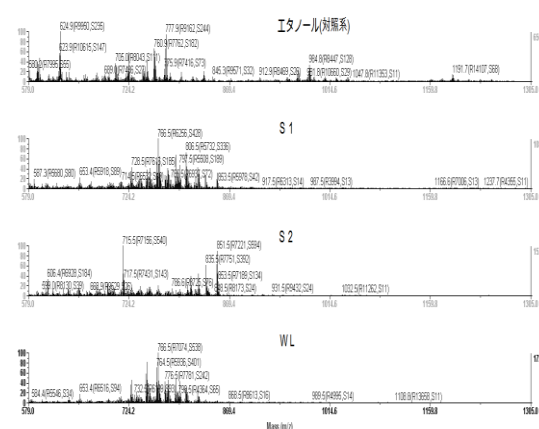


図 1 各汚泥の微生物群集構造スペクトル

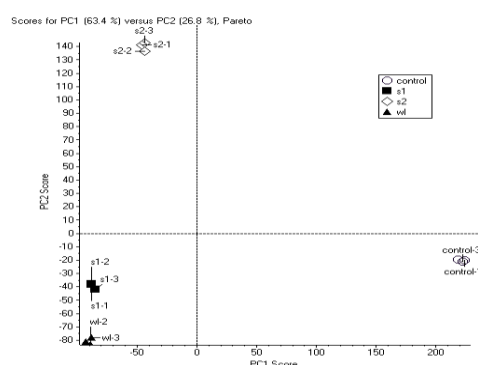


図 2 微生物群集構造の MALDI の結果

(2)の実験は表 1 のように実験を行い、WL 汚泥に抽出物を添加した結果を図 3,4 に、S1 汚泥に抽出物を添加した結果を図 5,6 に示した。図 3 より無添加系と比較すると、WL 汚泥にエタノール・各抽出物を添加することによって、各抽出物の影響によって微生物群集構造が変化していることが分かる。図 4 より、T-RFLP 法による分析を行っても、エタノール添加系は無添加系と類似しており、各抽出物添加系では無添加系と比較すると大きく微生物群集構造が変化していることが分かる。

一方、図 5 より、S1 汚泥に各抽出物を添加した実験では、エタノール添加系と S1 と S2 抽出物を添加した系と類似の結果が得られた。また、図 6 においては図 4 と比較すると、S1 汚泥に抽出物を添加した実験では、WL 汚泥よりも化学物質による影響を受けておらず、その結果エタノール添加系と S1 と S2 抽出物添加系と近い結果になってしまったと考えることもできる。

表 1 実験(2)の実験条件

表示	培養用汚泥	添加物
No	WL または S1	添加物なし
Control		エタノール
S1		S1 抽出物
S2		S2 抽出物
WL		WL 抽出物

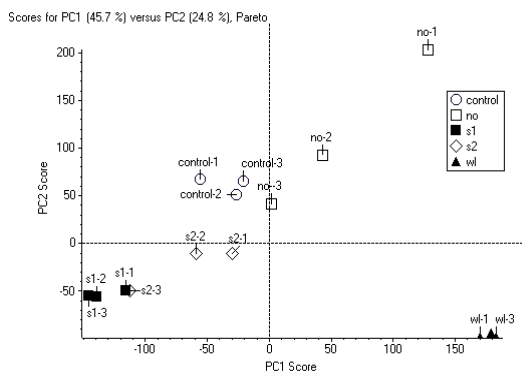


図 3 抽出物添加の MALDI の結果(WL)

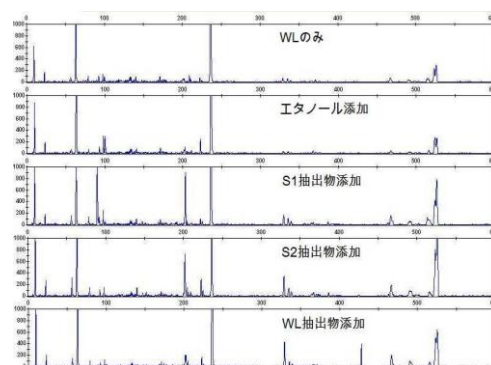


図 4 抽出物添加の T-RFLP(WL)

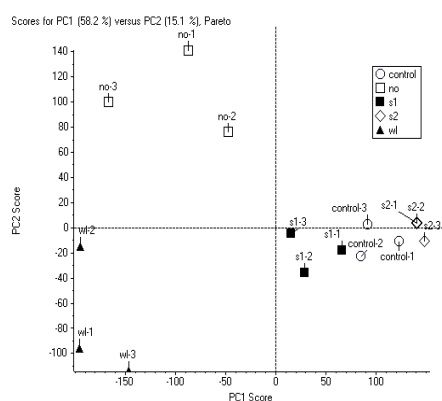


図 5 抽出物添加の MALDI の結果(S1)

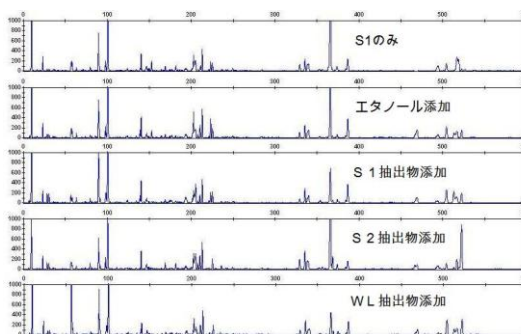


図 6 抽出物添加の T-RFLP(S1)

(3)の実験では、以下の表 2 のように実験を行った。WL 汚泥に S1 抽出物を分画したものを添加し培養したものの結果を以下の図 7 に、S2 抽出物を添加したものの結果を図 8 にまとめた。

表 2 実験 3 の実験条件

表示	培養用汚泥	添加物
No	WL	添加物なし
Control		エタノール
S1-all		無分画 S1 抽出物
S2-all		無分画 S2 抽出物
0		0%エタノール
20		20%エタノール
40		40%エタノール
60		60%エタノール
80		80%エタノール
100		100%エタノール

もスポットの位置がそれぞれ点在しており、微生物群集構造が各分画抽出液によって異なる影響を受けていることがわかる。また、図 8 では、無分画 S2 抽出物の影響が一番大きかった。これらの結果をふまえると各分画成分に相乗作用や阻害作用が働いて微生物群集構造に影響を及ぼしていると考えられることもできる。

6. まとめ

MALDI を用いた微生物相互作用物質による微生物群集構造の変化を T-RFLP と同様に検出することができた。本手法は、T-RFLP 法と比較すると、概ね 10 分の 1 の時間で分析することができるため有用性は非常に高いと考えられる。

本手法を用いて、大きな影響を及ぼす化学物質の特定を目指したが、微生物の再現性やその他の影響によって、特定物質にまでは至らなかった。

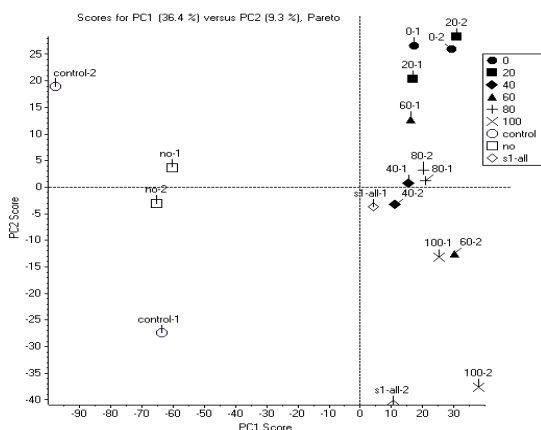


図 7 S1 分画液を添加した WL の結果

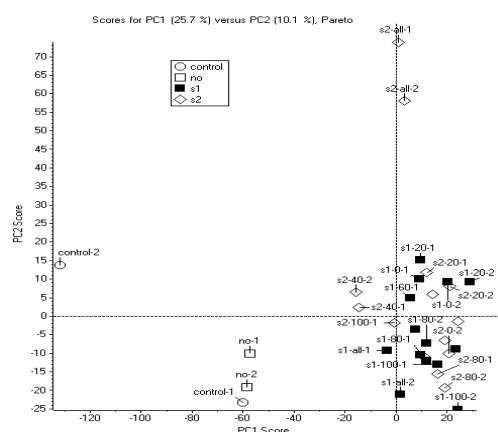


図 8 S2 分画液を添加した WL の結果

図 7 より、無添加系とエタノール添加系のスポットが近い位置にあり、S1 抽出液添加系や分画液添加系とは大きく異なっていることが分かる。また、各分画液において

7. 今後の展望

今後も同様の実験を繰り返し、さらに EBPR プロセスに関連する代謝速度等も合わせて見ていくことによって、これらの実験で得られた知見を実処理場での微生物群集構造の制御、そして、安定した処理水を得るために役立つことが必要になってくると考える。

参考文献

小川且 マイクロプレートを用いた活性汚泥の化学的微生物相互作用の検出 2008 年度 修士論文 大学院新領域創成科学研究科