

2010 年度 修 士 論 文

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

高 梨 正 訓

Takanashi, Masanori

東京大学大学院新領域創成科学研究科

社会文化環境学専攻

目次

第1章 序論

1.1 研究の背景	1
1.2 研究の目的	2
1.3 論文の構成	2

第2章 既往の研究の整理

2.1 活性汚泥法について	3
2.1.1 下水処理の歴史	3
2.1.2 下水処理の基本フローと生物処理の分類	3
2.1.3 活性汚泥法	5
2.1.4 生物学的リン除去(EBPR)プロセス	6
2.1.5 EBPR プロセスの悪化	7
2.1.6 生物学的窒素除去プロセス	8
2.1.7 高度処理プロセス	9
2.2 アレロパシー	10
2.2.1 アレロパシー	10
2.2.2 アレロパシーの存在するタイミング	10
2.2.3 藻類のアレロパシー	11
2.2.4 硝化に関するアレロパシー	11
2.2.5 阻害的なアレロパシーとその機構	12
2.2.6 その他アレロパシーに関する知見	12
2.3 活性汚泥についてアレロパシーが疑われる事例	13
2.3.1 SMP(Soluble Microbial Products)の影響	13
2.3.2 リン除去能の低下	13
2.3.3 微生物群集構造への影響	14
2.4 クォーラムセンシング	15

第3章 実験方法の原理

3.1 MALDI-TOFMS	16
3.1.1 MALDI-TOFMS	16
3.1.2 マトリックス	18
3.1.2.1 CHCA	18
3.1.2.2 DHB	18
3.1.3 検出モード	19

3.2	MALDI-TOFMS を用いる際に注意しなければ行けない点	19
3.2.1	マトリックスとサンプルの混合比率	19
3.2.2	サンプル調製等に用いる容器	19
3.3	分子生物学的手法に関わる基礎的事項	20
3.3.1	細菌の系統樹	20
3.3.2	16s rRNA	21
3.3.3	DNA 抽出	21
3.3.4	PCR	22
3.3.5	制限酵素処理	23
3.3.6	T-RFLP	23
3.4	クロマトグラフィー	24
3.4.1	イオンクロマトグラフィー	24
3.4.2	HPLC	24
3.5	抽出方法	25
3.5.1	固相抽出	25
3.5.2	固液抽出	25
3.6	凍結乾燥	25
3.7	主成分分析	25

第4章 実験方法

4.1	リアクターの運転	26
4.1.1	リアクターの運転	26
4.1.2	サンプリング	28
4.1.3	モニタリング	28
4.1.3.1	MLSS と MLVSS	28
4.1.3.2	溶存態リン	28
4.1.3.3	溶存態炭素(DOC)	29
4.2	化学物質の抽出と分画	29
4.2.1	固液抽出	29
4.2.2	抽出物の分画	29
4.3	マイクロプレートによる微生物の培養	30
4.4	分子生物学的手法	30
4.4.1	DNA 抽出	30
4.4.2	PCR 法	31
4.4.3	PCR 産物の濃度測定	31
4.4.4	PCR 産物の精製	32

4.4.5	精製 PCR 産物の濃度測定	32
4.4.6	制限酵素処理	32
4.4.7	T-RFLP	33
4.5	MALDI-TOFMS	33
4.6	主成分分析	33
第 5 章 MALDI-TOFMS による実験条件の検討		
5.1	リアクターのモニタリング	34
5.2	質量電荷比の範囲	40
5.3	サンプルとマトリックスの混合比	42
5.4	微生物群集構造の比較	44
5.5	微生物群集の経時変化の比較	48
5.6	抽出物の比較	56
第 6 章 微生物相互作用物質による微生物群集構造の変化		
6.1	抽出物添加による微生物群集構造の変化	58
6.2	分画抽出物による微生物群集構造の変化	65
第 7 章 その他影響があると思われる実験条件の検討		
7.1	分画抽出物の総量	74
7.2	sep pak による影響	77
7.3	プレート的位置による影響	80
第 8 章 総括		
8.1	研究の成果	82
8.2	今後の展望	83
参考文献		84
謝辞		86
付録		87

第1章 序論

1.1 研究背景

活性汚泥法は、現在最も普及している下水処理技術である。1914年にイギリスに最初の処理場が出来て以来、嫌気好気法、膜分離活性汚泥法などの様々な手法が開発され、その欠点の克服や処理能力の向上がなされてきた。しかし、現在に至っても活性汚泥法が完成したものではない。活性汚泥の系内において想定外の微生物が繁殖・優占化した結果によると思われるプロセスの処理能の悪化現象が知られている。糸状の微生物が増殖することによって活性汚泥の沈降性が悪化し、活性汚泥と処理水がうまく分離できなくなるバルキング、嫌気好気式活性汚泥法におけるリン除去能の悪化等がその例として挙げられる。

このような処理水質の悪化を防ぐために活性汚泥をうまく制御し、想定した微生物を優占化させることが望まれる。また優占微生物の制御は、有機物や栄養塩除去の更なる高効率化に結び付くことが考えられる。

これまでに活性汚泥プロセスの運転状況が処理能力に与える影響について様々な研究がなされてきた。その結果、特定の微生物が増殖しやすいような運転条件を設定し、活性汚泥の処理能悪化を予防する策が発明されてきた。しかし、残念ながらバルキングやリン除去能の悪化等の悪化現象を確実に防ぐ方法は見つかっていない。この理由としては、活性汚泥内で優占する微生物を決定する未知の因子が存在していることが考えられる。

そこで、筆者は運転条件などの外的因子だけではなく、活性汚泥内の微生物相互作用のような内的要因も微生物の優占に影響を与えているに違いないと考えた。そしてとりわけ化学物質を介した相互作用に着目した。アレロパシーと呼ばれるこの現象は、植物もしくは微生物が化学物質を産出して環境中に放出し、他の植物または微生物に影響を与える現象と定義され、農学の分野で良く知られ研究されている。アレロパシーは植物などの生態系に広く知られている現象であり、活性汚泥内の微生物においても存在していたとしても何ら不思議ではない。

以上のことから、微生物群集構造の制御には活性汚泥内の微生物相互作用物質による影響の知見の蓄積が肝要になってくると考えられる。

既往の研究で、微生物由来の化学物質によって微生物群集構造の変化を検出した。しかし、どの化学物質が微生物群集構造に大きな影響を与えるかは判明していない。微生物群集構造に大きな影響を与える微生物相互作用物質の探索には、抽出した化学物質を分画し、どの分画に大きな影響を及ぼす物質が存在しているのか丹念に調べる必要がある不可欠になってくる。また、再現性の確認のため同様の実験を繰り返し行っていくことが研究の信頼性を高めるためにも必要である。しかし、既往の検出方法では微生物相互作用物質の検出に多大な時間と費用を費やしている。そういった背景から微生物相互作用の知見蓄積のために迅速かつ簡便な微生物相互作用の検出方法の開発が望まれている。

1.2 研究の目的

微生物相互作用物質の迅速かつ簡便な検出方法の開発とその検出方法を用いた微生物群集構造に大きな影響を与える微生物相互作用物質の探索の試みを目的としている。

本研究では MALDI-TOFMS という装置を用いて、微生物由来の化学物質による微生物群集構造の変化を検出することを目的としている。

1.3 論文の構成

本論文の概略を以下に示す。本章では、研究背景と目的を、第 2 章では、生物学的水処理分野および微生物相互についての既往の研究をまとめた。第 3 章では、本研究において使用する MALDI-TOFMS やその他実験装置や実験方法の原理をまとめた。第 4 章では、本研究において全体に関わる実験方法を、第 5 章では MALDI-TOFMS を使用する際の実験条件の検討をまとめた。第 6 章では微生物由来の化学物質による微生物群集構造に及ぼす影響を評価し、第 7 章では 5 章や 6 章の実験を行ったうえでさらに検討が必要である実験条件の検討を行った。第 8 章では総括として研究の成果と今後の展望をまとめた。

第2章 既往の研究の整理

2.1 活性汚泥法について

2.1.1 下水処理の歴史⁽¹⁾

19世紀初頭から中ごろにかけて、産業革命を先行させたロンドンではテムズ川の汚染が深刻化し、水源取水口の変更や下水道網の整備・延長、沈殿池およびろ床からなる下水処理場の建設を行い、河川汚濁の改善が図られた。1914年に発表された活性汚泥法の実用化によって水質改善が成功し、これをうけてシカゴなどの各都市で活性汚泥法が普及してきた。日本においても、1922年に東京都三河島処理場で散水ろ床法が24年に名古屋市堀留下水処理場で活性汚泥法がそれぞれ運転を開始した。このように、下水の生物処理は20世紀に大きく開花し、その後、標準活性汚泥法を改良した方法が考案・実用化されている。

しかし、第二次世界大戦後の化学工業の発展は、それ以前とは異なる水質汚染問題を顕在化させた。河川および下水処理場において、ハード型洗剤による発泡現象が確認され、各国における生分解性テストの導入と生分解を受けない洗剤の使用が禁止された。また、閉鎖性水域では富栄養化などの環境悪化が進行し、CODの総量規制などが導入されたが、汚濁物質の直接規制には限界があるとの指摘を受け、藻類増殖の栄養素であるリン・窒素の規制も加えられるようになった。このような規制は、活性汚泥法の発展の新たな推進力になっている。

2.1.2 下水処理の基本フローと生物処理の分類⁽¹⁾⁽²⁾

下水処理の基本フローは、一般的に以下の図2.1のように表わすことが出来る。まず、1次処理として簡単な物理的操作によって分離できる物質を除去した後、溶解している有機物質を2次処理によって除去する。2次処理後も河川などへの放流基準を満たさない場合には、3次処理と呼ばれる物理化学的处理が施される。各段階の処理を行った後、その水質が放流基準を満たしている場合には、それ以降の処理を省略して環境中に放流してしまう場合も多い。

ここで2次処理に相当する生物処理は、主として微生物の代謝機能を利用することで水中の有機物などを分解除去する方法である。微生物はその代謝様相によって好気性と嫌気性に分類されるため、生物処理も好気性と嫌気性に分類される。また、微生物が浮遊した状態で処理を行うのか、もしくは担体表面や内部に固着した状態で処理を行うかによっても、浮遊および非浮遊として区別される。

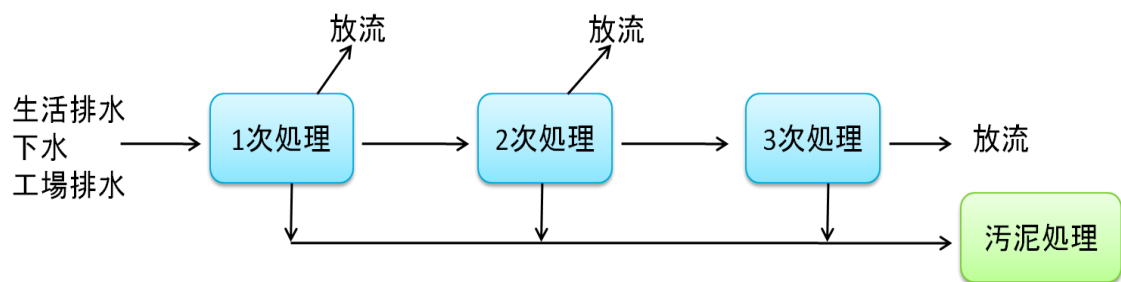


図 2.1 下水処理の基本フロー

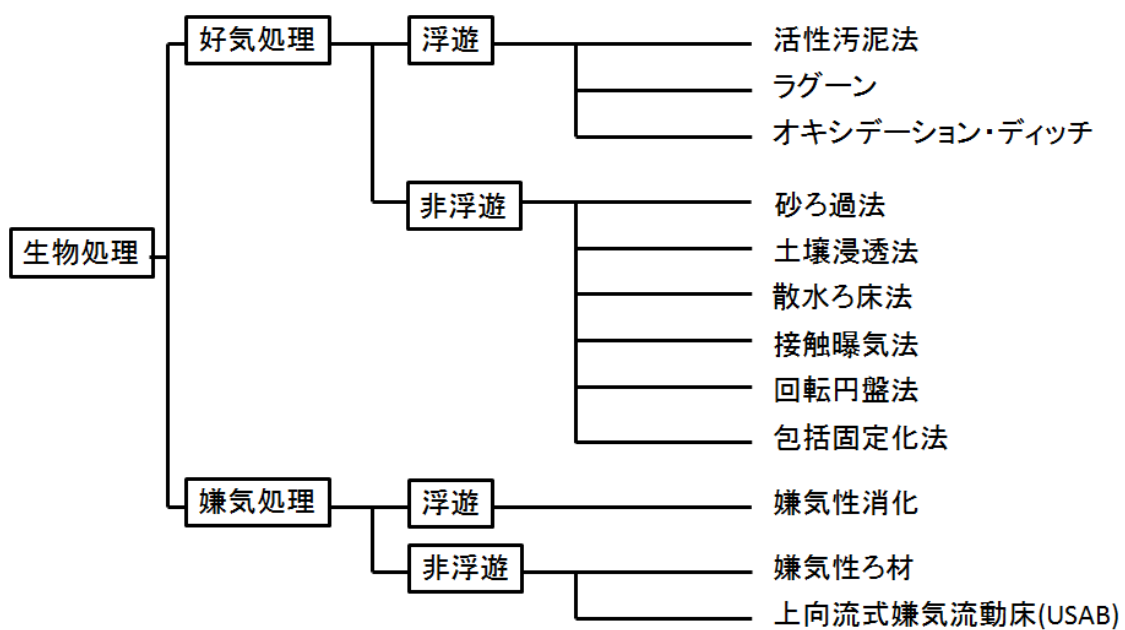


図 2.2 生物処理分類

2.1.3 活性汚泥法⁽¹⁾⁽²⁾

活性汚泥法は、日本における都市下水処理上の 90%以上で採用されている最も代表的な好気・浮遊性生物処理法である。そもそも活性汚泥とは、高濃度の細菌、原生動物、および小型の後生動物から構成される生物群集であり、フロックとして反応槽内に存在している。活性汚泥は吸着能と微生物による好気性代謝能を兼ね備えており、この機能によって下水中の汚染物質の除去を可能にしている。

下水中に存在する汚染物質のうち、低分子のものはフロックに吸着後、直ちに内部を拡散して微生物表面に到達、代謝されて無機化($\text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}$)される。一方、高分子のものはフロックに吸着後、微生物の分泌する体外酵素によって低分子化され、同様に代謝される。すなわち、活性汚泥は自己再生型吸着体とみなすことができ、下水中の低濃度汚染物質を効率的に除去するメカニズムを有している。これによって、難分解性物質や重金属をも除去することができる。

活性汚泥法の一般的な処理フローは図 2.3 のように表わされる。1 次処理を終えた流入水は、好気相において活性汚泥と混合される。好気槽ではポンプによって酸素(空気)が供給されているため、溶存酸素は高い状態に保たれており、流入水中の有機物などが酸化分解・除去される。一定の滞留時間を経過した後、好気槽内の混合水は最終沈殿池へと流入し、汚泥を沈殿分離させる。この上澄み液が処理水として放流され、必要ならば高度処理を施される。最終沈殿池で沈殿した汚泥の一部は返送汚泥として好気槽に返され、好気槽内の微生物濃度は一定に保たれる。一方増殖した微生物に相当する活性汚泥は余剰汚泥として廃棄される。

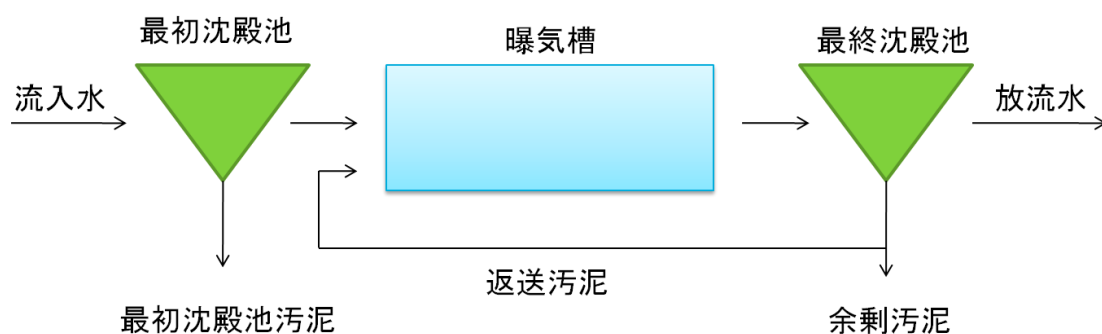


図 2.3 活性汚泥法の基本処理フロー

2.1.4 生物学的リン除去(EBPR)プロセス⁽²⁾

生物学的リン除去(Enhanced Biological Phosphorus Removal :EBPR)プロセスは、活性汚泥法の変法であり、その特徴は嫌気・好気条件のサイクルを備えていることである(図 2.4)。このような条件を繰り返すことによって、反応槽内でポリリン酸蓄積細菌(Polyphosphate Accumulating Organisms: PAOs)と総称される細菌群を優占化させることができる。PAOs は下水中の溶存態リン酸を細胞内にポリリン酸として蓄積する特性を有しており、この代謝機能を利用して下水中からリンを除去している。

1980 年代後半に提案された味埜モデルに基づけば、EBPR プロセスにおける PAOs の生態モデルは図 2.5 のように表すことができる。嫌気槽において、PAOs は細胞内に蓄積されているポリリン酸を加水分解することによってエネルギーを獲得し、下水中に存在する VFAs(Volatile Fatty Acids: 揮発性脂肪酸)を摂取する。この VFAs は主に酢酸およびプロピオン酸であるとされている。このようにして取り込まれた VFAs は細胞内に蓄積されているグリコーゲンを分解することで得られる還元力を用いて、PHA(Poly Hydroxy Alkanates: ポリヒドロキシ脂肪酸)へと合成・蓄積される。このため、嫌気槽では下水中にリン酸が放出されることになり、一時的にリン酸濃度は上昇する。続く好気槽では、上記のようにして蓄積してきた PHA を炭素源およびエネルギー源として、PAOs は菌体増殖と消費されたグリコーゲンの回復、および下水中のリン酸摂取・ポリリン酸合成を行う。このとき、嫌気槽でのリン放出量と比較して、好気槽でのリン摂取量のほうが多くなるため、このプロセスによって下水中の正味のリン濃度は低下することになる。

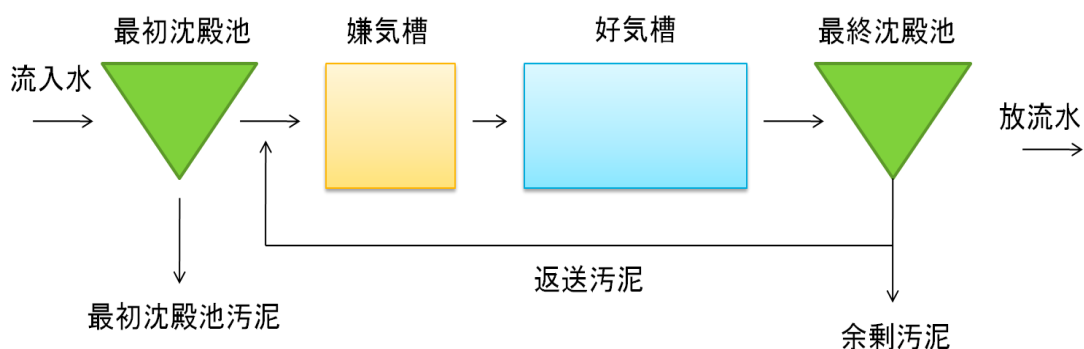


図 2.4 EBPR プロセス

PAOs: Polyphosphate Accumulating Organisms; ポリリン酸蓄積細菌

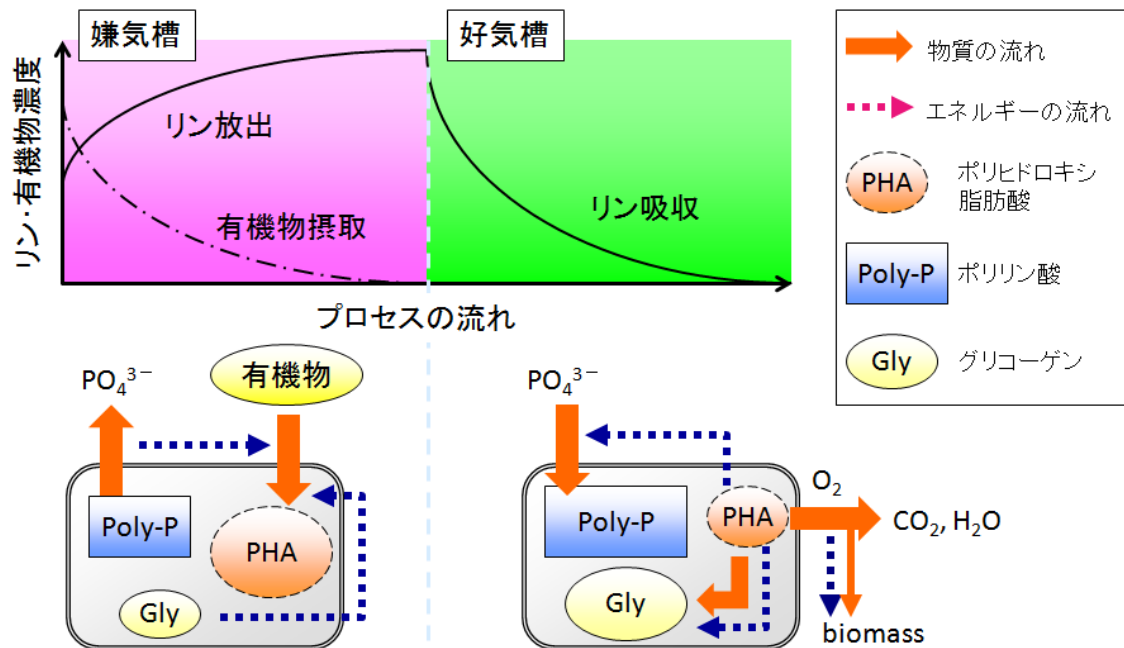


図 2.5 PAOs の生態モデル

2.1.5 EBPR プロセスの悪化⁽³⁾

前述のように EBPR プロセスは既に実用化されており、ランニングコストや効率の観点からも極めて有用性が高い処理技術であることは言うまでもない。しかし、EBPR プロセスはリン除去の低下や全くリンを除去されなくなるといった事例も確認されており、その安定性と信頼性に課題を残している。

EBPR プロセスの処理悪化は、過度の降雨、嫌気槽への大量の硝酸塩の流入、及びカリウム・マグネシウムの不足など、外部環境要因によって引き起こるとの報告がある。また、PAOs と類似した生態を有するグリコーゲン蓄積細菌 (Glycogen Accumulating Organisms: GAOs) の存在も確認されており、この両者の競合によってもリン除去能が低下することも懸念されている。GAOs は PAOs と同様に嫌気・好気のサイクルによって増殖するが、リン放出・吸収機能は備わっていない。GAOs の生態モデルは以下の 2.6 図のように考えられており、グリコーゲンのみをエネルギー源として嫌気槽における有機物摂取および PHA 合成を行い、続く好気槽で PHA を酸化させて、菌体増殖とグリコーゲンの回復を行うとされている。このように、GAOs は嫌気槽において PAOs と有機物摂取について競合することになる一方で、リン摂取を行わないため、EBPR プロセスにおいて好ましくない存在であると言える。

GAOs: Glycogen (non-polyphosphate) Accumulating Organisms; グリコーゲン蓄積細菌

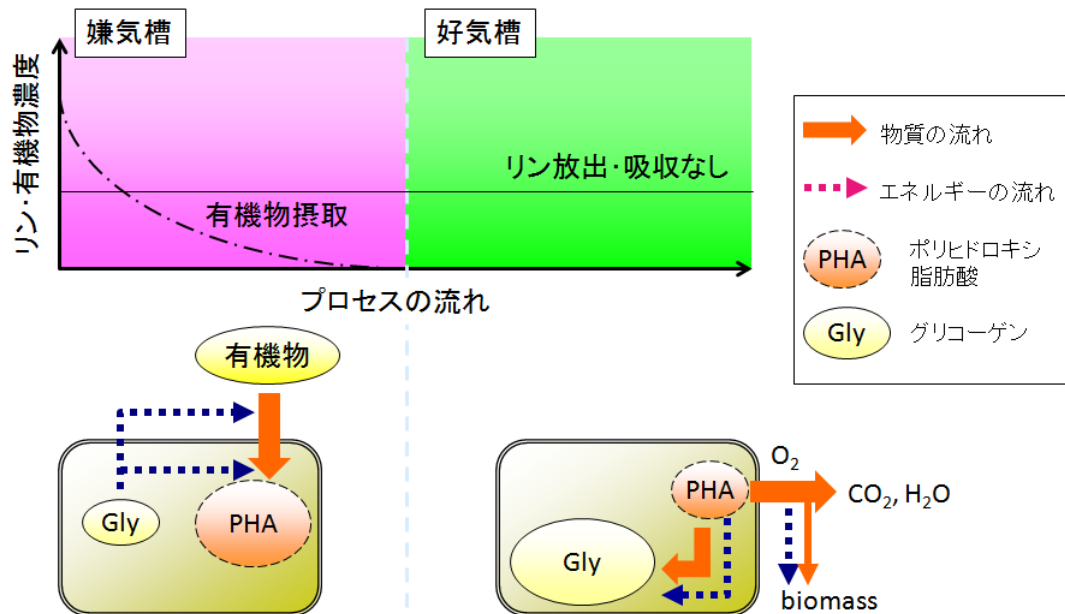


図 2.6 GAOs の生態モデル

2.1.6 生物学的窒素除去プロセス⁽²⁾

閉鎖性水域における富栄養化を抑制するためには、前述のリン除去に加え窒素除去を行うことが望ましい。このため、EBPR プロセスと同様に、生物学的窒素除去プロセスが実用化されている。以下の図 2.7 に本プロセスの基本フローを示した。本プロセスは、硝化 (NH_4^+ から NO_3^- への酸化) と脱窒 (NO_3^- から N_2 への還元) を組み合わせたもので、効率的な窒素除去を目的として構築されている。まず、流入水中の NH_4^+ は、無酸素 (NO_3^- が豊富な嫌気条件を意味する) 槽では、何ら変化を受けず好気槽へ流入する。好気槽では、曝気が行われているため、硝化細菌によって NH_4^+ から NO_2^- 、さらには NO_3^- へと酸化され、硝化循環液として大量 (流入水の 3-8 倍量) に無酸素槽へ返される。無酸素槽では、流入水中の BOD 成分を利用して脱窒細菌による脱窒反応が生じ、窒素除去が行われる。このプロセスでは、下水の流れを無酸素槽→好気槽とすることで、無酸素槽における BOD 成分の添加を不要化できる特長がある。

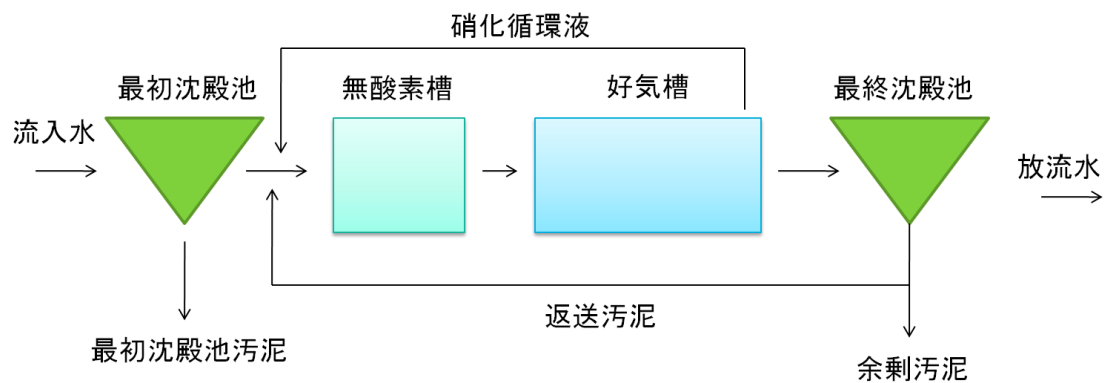


図 2.7 生物学的窒素除去プロセスの基本フロー

2.1.7 高度処理プロセス⁽²⁾

日本の下水処理場では、EBPR と窒素除去とを組み合わせた高度処理プロセスが普及しており、その主な方式には A2O や AAO などがある。以下の図 2.8 に A2O 方式を、図 2.9 に AAO 方式プロセスの基本フローを示した。これらのプロセスでは、第一の処理槽として嫌気槽が備えられているため、絶対好気性の糸状性細菌の発生による活性汚泥バルキングを軽減することが出来る。また、PAOs は嫌気槽中に NO_x が存在すると、リン放出が抑制される傾向があるが、脱窒細菌によって NO_x は速やかに水中から除去されるため、これも回避することができる。なお AAO 方式は硝化循環液の移送ポンプが必要ないため、ランニングコストの面で優れている。

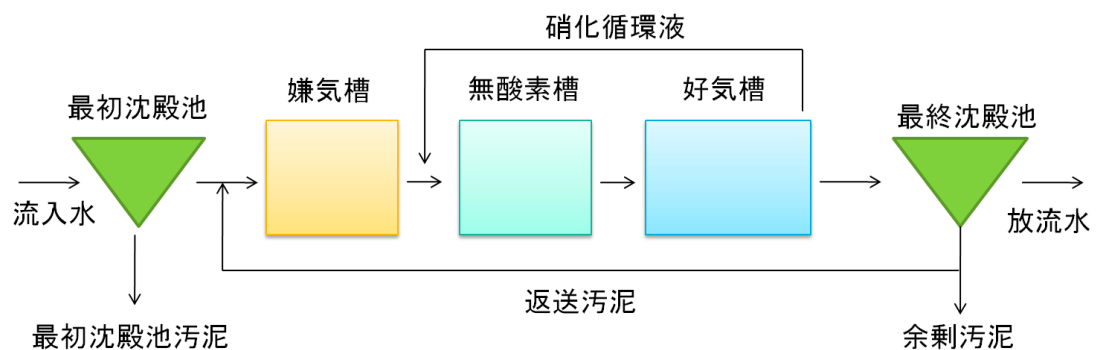


図 2.8 高度処理 A2O 方式プロセスの基本フロー

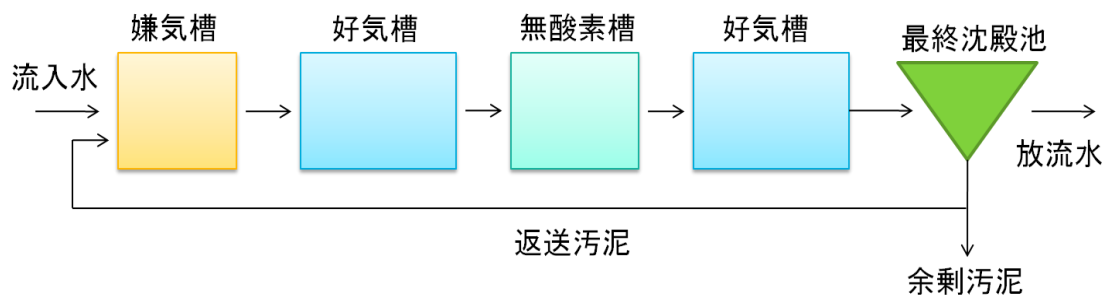


図 2.9 高度処理方式 AOA プロセスの基本フロー

2.2 アレロパシー⁽⁴⁾

2.2.1 アレロパシー

アレロパシーは植物または微生物が化学物質を放出し、それが他の植物や微生物に阻害的・促進的な何らかの影響を及ぼす現象のことである。定義は研究者によって異なるが、広義には昆虫等の動物に対する作用も含まれるとされている。植物が化学物質を放出して他の植物の成長を阻害する現象は紀元前から知られている。アレロパシーのうち微生物が生産し、微生物に影響を及ぼすものは抗生物質と呼ばれており、人間社会においても非常に重要な役割を果たしている。このようにアレロパシーは自然界でごく普通に観察される現象であり、活性汚泥中にこのアレロパシー現象が存在していてもなんら不思議ではない。

2.2.2 アレロパシーの存在するタイミング

生態系には何らかのアレロパシー作用が存在することが多いといっても、個々のアレロパシー作用は限定された条件でしか存在しない。一般にアレロパシー作用が顕在化するためには、1. 系内にある植物あるいは微生物が存在し、2. 植物や微生物がある特定の条件を満たして化学物質を放出し、3. その化学物質が他の植物あるいは微生物に影響を及ぼす、という 3 つのプロセスを経る。このようにある特定のアレロパシー作用はある特定の環境が整った場合にのみ作用するのであり、一度作用を確認したからといって常に作用しているわけではない。また、その逆も考えられる。従って、ある時に確認されたアレロパシー作用の再現性を得るためにはその時の環境を正確に再現することが肝要になってくる。

アレロパシーが生産されるための条件として考えられる条件は、1. 紫外線等の光の照射、2. カルシウム、マグネシウム等の無機栄養塩の欠乏、3. 水不足、4. 温度の変化、5. 他のアレロパシー物質の存在、6. 病原菌への感染、のようなものがある。

2.2.3 藻類のアレロパシー⁽⁵⁾⁽⁶⁾

植物や微生物が生育する環境は、一般に土壌圏と水圏に分けられる。水圏におけるアレロパシーの研究は陸域生態系よりもはるかに少ないものの、湖沼や海域における藻類に関する研究が比較的進んでいる。水生植物に抽出操作を施し、藻類に対し増殖抑制効果を示す生理活性物質を抽出してこれらを同定した報告は比較的多いが、アレロパシーを実証した例はそう多くはない。中井ら⁽⁵⁾⁽⁶⁾はホザキノフサモを濃度 100g-wet/L にて 3 日間培養し、この培養液を所定の栄養塩に入れ、*Microcystis.aeruginosa* を植種し、培養した。その結果、培養液を準連続的に添加することによって顕著な増殖抑制効果を確認し、アレロパシーを示した。

2.2.4 硝化に関するアレロパシー⁽⁷⁾

土壌中において硝化作用が阻害を受けるという報告は数多くされている。Neal ら⁽⁷⁾は草本植物の根の抽出物から *Nitrosomonas* や *Nitrobacter* に対する阻害物質が見つかったと報告している。

2.2.5 阻害的なアレロパシーとその機構

微生物の代謝や増殖に関するアレロパシーの阻害機構について、表 2.1 にまとめた。

表 2.1 アレロパシーの阻害機構⁽⁴⁾

阻害の種類	関与する物質及び阻害機構
細胞分裂の阻害	コルヒチンやクマリンなど。細胞分裂の際に有糸分裂を阻害する
ホルモンの作用を阻害	インドール酢酸の不活性化など
膜透過に対する影響	サリチル酸は酵母の K^+ イオン濃度を減少させる
たんぱく質合成の阻害	アミノ酸の摂取を阻害する結果、タンパク質の合成を阻害する。タンパク質組成を変化させる
電子伝達系の阻害	アンチマイシンなど
呼吸に対する阻害	酸素吸収阻害など
特定酵素の阻害と活性化	様々な酵素がアレロパシー物質により阻害・活性化
TCA 回路の阻害	フェルラ酸は酢酸が TCA 回路に流れる経路を阻害する。酢酸は脂質合成系へ振り分けられると考えられる
ミトコンドリアの阻害	ミトコンドリアの ATP アーゼ阻害など
細胞壁合成の阻害	ペニシリンなど。現在の主要な抗生物質
陽イオンの膜透過性の向上	Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , P , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{3+} などの吸収阻害。イオン輸送に関係している ATP アーゼに対する阻害
DNA	アクリジンオレンジやナリジキシム酸など。DNA の 2 本鎖に割り込む
グリコーゲン合成の阻害	無機リン酸がグリコーゲンの合成阻害
有機酸代謝の阻害	TCA 回路を阻害
リン酸吸収の阻害	大豆でフェノール性酸、特にフェルラ酸がリンの吸収阻害

2.2.6 その他アレロパシーに関する知見⁽⁸⁾

アレロパシー物質の相乗作用というものが知られている。単独では非常に濃い濃度でしか効果を表さないアレロパシー物質を複数組み合わせるとアレロパシー効果が強くなることがある。例えば、ハツカダイコンの種子に $2.5 \times 10^{-3} M$ のバニリン酸を与えた時の発芽阻害は 29%、 $2.5 \times 10^{-3} M$ の p-ヒドロキシ安息香酸を与えた時の発芽阻害は 5%であったが、それぞれを $2.5 \times 10^{-3} M$ の濃度で同時に与えた時の発芽阻害は 52%であった。このような現象を相乗作用と呼ぶ。また生理活性物質には、単独ではほとんど効果を発揮しないが、複数の化合物が混合されることによって初めて効果を表すことがあるので注意が必要である。

また、ある化学物質自体は阻害作用を持たないが、微生物によって分解されることによって結果、阻害作用を持つようになる化学物質の存在も知られている。例えば、リグニンの分解に際して、アレロパシー物質として知られるフェルラ酸が大量に生産される。

アレロパシー物質は低濃度では効果を発揮せず、アレロパシー物質が濃縮されやすい土壌では他の植物に阻害が起きているのに、一方で濃縮されにくい土壌ではむしろ活性化されているというケースも知られている。

アレロパシー物質は植物もしくは微生物が何らかのストレスに曝露された時に生産量が増えることが多い。光の照射、無機栄養素の欠如、浸透圧の変化、温度、他のアレロパシー物質の存在、病原菌への感染によってアレロパシー物質が増加した事例が報告されている。

2.3 活性汚泥についてアレロパシーが疑われる事例

2.3.1 SMP(Soluble Microbial Products)の影響

活性汚泥の微生物由来の化学物質は **SMP** と呼ばれている。Noguera ら⁽⁹⁾は **SMP** の期限を微生物代謝産物、微生物の死亡・分解により放出されたものに分けている。また、Ross ら⁽¹⁰⁾は生物膜により生産された **SMP** が毒性を有していたと報告している。後述するように、Chudoba ら⁽¹¹⁾は **SMP** による硝化阻害を報告している。

亀井ら⁽¹²⁾は活性汚泥に濃厚基質のみを与え、余剰汚泥のみを排出する(処理水の放出を行わない)ことにより、**HRT** を非常に長い系を運転したところ、サイクルが増すにつれてグルコースの摂取が低下したという報告をしている。そこで上澄みを水道水に入れ替えたところ、グルコース摂取が回復した。このことから、反応槽内の汚泥代謝産物が活性汚泥のグルコース摂取に何らかの影響を与えていたことがわかる。

2.3.2 リン除去能の低下

嫌気好気式活性汚泥法によるリン除去の悪化に関してはアレロパシーの関与が示唆される事例が数多く存在している。

前述したように、活性汚泥内の **PAO** に代わって **GAO** が優占化し、リン除去がうまくいなくなるケースが知られている。そして、**GAO** の優占を決定する詳しい要因は依然として正確にはわかっていない。嫌気好気式活性汚泥法において **GAO** が **PAO** に代わって優占した例として、以下のようなものがある。深瀬ら⁽¹³⁾は **SRT** と **HRT** が長かったため、Cech と Hartman⁽¹⁴⁾はグルコースの添加のため、Liu ら⁽¹⁵⁾はリンの量の制限のため、それぞれ **GAO** が優占したと報告している。

また、PAO も GAO も優占しなくなり、リン除去が行われなくなる事例も知られている⁽¹⁶⁾。このケースでは嫌気条件で有機物の摂取が行われない。PAO や GAO がなぜ有機物を摂取しないのか、もしくは増殖できないのかはわかっていない。

足立ら⁽¹⁷⁾は嫌気好気活性汚泥にポリリン酸蓄積細菌 No.38 株を添加したところ、リン除去能が一時的に良くなったものの、突然リン除去能が低下した。再度ポリリン酸蓄積細菌 No.38 株を添加したところ、リン放出はされるものの、好気条件でのリン摂取が大きく低下した。また、No.38 株の混合比率とリン除去能悪化汚泥の混合比率を変化させたところ、リン除去能悪化汚泥の割合が多くなるほど、No.38 株のリン放出は阻害された。このことから、嫌気好気活性汚泥を構成する他の細菌が No.38 株のリン酸摂取活性を阻害し、そこには何らかの微生物相互作用が関与していることが推測される。

太田ら⁽¹⁸⁾はリン除去活性の異なる 2 種類の汚泥混合液の上澄みを相互に入れ替えてリン除去に関連する代謝速度を測定した結果、はっきりとした微生物間相互作用を確認することはできなかった。しかし、リン代謝活性の異なる 2 種類の活性汚泥を混合してリン除去に関連する代謝速度を測定した結果、好気でのリン摂取が、混合比から推測される値より若干低くなることを確認した。

市橋ら⁽¹⁹⁾は太田らと同様の実験を行い、リン除去が良好と低下した 2 種類の活性汚泥の上澄み液を交換し、リン除去に関連する代謝速度を測定した結果、交換による有意な影響を観察できた。さらに、上澄み液に微生物由来の化学物質が含まれていると考えられ、その化学物質がリン除去に関連する代謝速度に影響を及ぼしている可能性が考えられる。上澄み液をオゾン処理することによって微生物由来の化学物質の影響を低減することが出来ると仮定し実験を行った結果、オゾン処理をした系としなかった系で有意な差がでた代謝速度があることを確認した。

2.3.3 微生物群集構造への影響

小川ら⁽²⁰⁾は活性汚泥内に微生物相互作用があるのかを調べる目的で、活性汚泥から固液抽出法を用いて微生物由来の化学物質を抽出した。その抽出物を新たな微生物に添加する系と添加しない系での微生物群集構造の変化を T-RFLP 法を用いて調べた。固液抽出に用いる有機溶剤を変えることにより活性汚泥から抽出される化学物質が異なり、エタノールを用いて抽出した化学物質を添加した系と添加していない系を比較すると、微生物群集構造に有意な差を検出することが出来た。

2.4 クォーラムセンシング⁽²¹⁾

長い間微生物はコミュニケーションなしに環境の変化に急速に適応していると考えられていた。微生物集団内の細胞間コミュニケーションの概念は、1967-1970 年代に提案された微生物自身が排出された外部因子の関与の発見から生み出された。1965 年に tomasz はホルモンのような細胞生成物が遺伝子発現において重要であると発表した。その化合物は Autoinducer: 自動誘導因子(以下 AI と省略)とよばれる修飾されたペプチドであった。この AI として良く用いられているものが acyl-homoserine lactone(AHL):(アシルホモセリンラクトン)である。これらの AI 濃度をモニタリングすることによって微生物自身の人口密度を観察するシステムである。細胞が高密度だとこれらの化合物はある遺伝子の活性が必要としているある濃度まで蓄積する。この現象をクォーラムセンシング(以下 QS と省略)といわれている。QS によってコントロールされたプロセスは一般的には個々の微生物によって行われるため非効率である。しかし、グループで行われることによって効率的になる。したがって、QS は多細胞微生物のようなふるまいをしていると考えることも出来る。生物発光や系統学的な分化に加えて、QS は病原性分泌液や生体膜形成や孢子形成をコントロールすることが出来る。

グラム陰性細菌は、AHL を使い、グラム陽性細菌は短いペプチドを用いてコミュニケーションをしている。共通の前駆体 (4,5-ジヒドロキシ-2,3-ペンタジオン) から由来する AHL は多くの微生物で発見されている。AI2 は種間のコミュニケーションに使われている。他にも 3 ヒドロキシパルミチン酸メチルエステルや、4 ヒドロキシ 2 アルキルキノロンや、3 ヒドロキシトリペンタデカン 4 オン、シス 11 メチル 2 ドデカン酸はバクテリアの細胞間のコミュニケーションには重要な役割を果たしている。

異なる生物分類の間でも化学物質を介したコミュニケーションが存在することは徐々に明らかになってきている。たとえば、根粒菌と植物、病原性微生物と動物などがある。

第3章 実験原理

3.1 MALDI-TOFMS

3.1.1 MALDI-TOFMS

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass spectrometry の略であり、マトリックス支援レーザーイオン脱離法飛行時間型質量分析計のことである。図 3.1 に簡単な概念図、図 3.2 に装置内部の図を示した。

一般的に質量分析計は、高電圧をかけた真空中で試料をイオン化すると、静電力によって試料は装置内を飛行する。飛行しているイオンを電氣的・時期的な作用等により質量電荷比に応じて分離し、その後それぞれを検出することで、質量電荷比を横軸に、検出強度を縦軸とするマススペクトルを得ることができる。

この MALDI-TOFMS という装置は、サンプルをイオン化するのにレーザーを用いている点が特徴である。レーザーを用いることにより、一般的にイオン化させにくいタンパク質等の生体高分子を変性されることなくサンプルをイオン化できる。また、サンプルをイオン化させやすくするためにマトリックスとよばれる化学物質とサンプルを混合させる。この混合サンプルにレーザーを照射し、熱エネルギーを利用してサンプルをイオン化させる。

サンプルスライドと接地グラウンド(Ground)の間には V_0 の電位差があるので、イオンは図の方向に引き出されます。引き出し後の各イオン速度 v は、エネルギー保存の法則より求められる。ここで電位差 V_0 は、どのイオンに対しても一定であるため、 m/z 値が小さい（軽い）イオンほど高速でドリフト空間(Drift Space)を飛行し、検出器(Detector)に到着する。このように、質量電荷比 m/z 値の違いでイオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う方法を「飛行時間型質量分析法」(TOFMS)と呼ぶ。

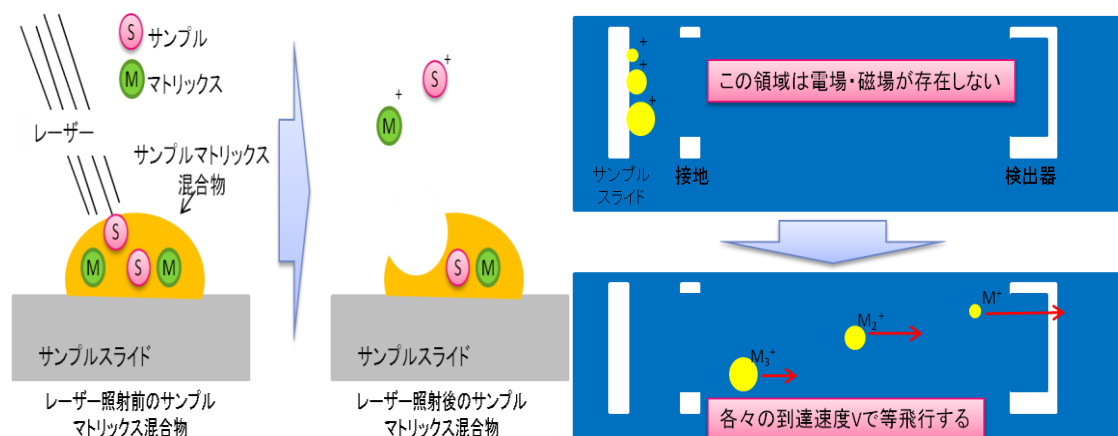


図 3.1 MALDI-TOFMS の概念図⁽²²⁾(島津製作所 HP を参考に作成)

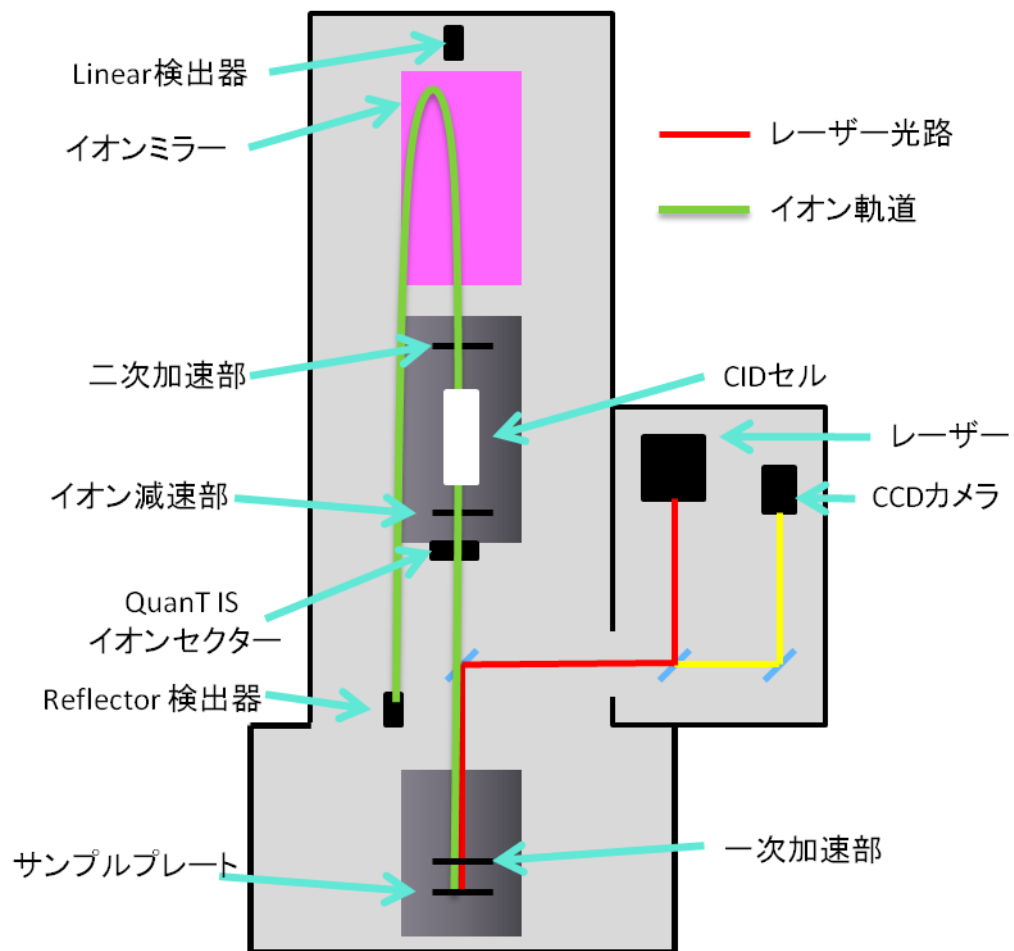


図 3.2 MALDI-TOFMS の内部構造⁽²³⁾

(4800 plus MALDI TOF/TOF Analyzer 簡易マニュアルを参考に作成)

3.1.2 マトリックス⁽²³⁾

MALDI-TOFMS を用いる際に考慮すべき点は何点かある。まず、マトリックスの種類である。マトリックスの選定条件としては、①サンプルと混合させても沈殿を生じない、②揮発性等がある。代表的なマトリックスとして α -CHCA と 2,5-DHB を以下に示した。

3.1.2.1 α -CHCA

α -cyano-4-hydroxycinnamic acid の略であり、 α -シアノー4-ヒドロキシケイ皮酸のことである。構造式は以下の図 3.3 に示した。ペプチドやたんぱく質を分析する際によく用いられる。

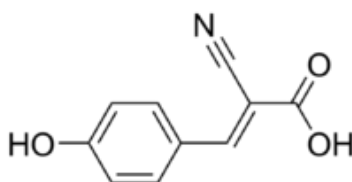


図 3.3 α -CHCA

3.1.2.2 2,5-DHB

2,5-Dihydroxybenzoic acid の略であり、2,5-ジヒドロキシ安息香酸のことである。構造式は以下の図 3.4 に示した。合成物、糖、ペプチドなどの分析に適している。

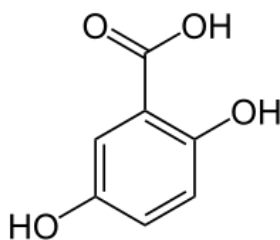


図 3.4 2,5-DHB

3.1.3 検出モード⁽²³⁾

図 3.2 により、MALDI-TOFMS の内部には二つの検出器があることがわかる。これは **Linear** モードと **Reflector** モードの二つの検出モードの違いで異なる検出器を使用している。**Linear** モードでは、レーザーがサンプルプレートに照射され、イオン化されたサンプルが装置上部の **Linear** 検出器で検出を行う。

一方 **Reflector** モードでは、最初は **Linear** モードと同じ軌道を進むが、装置上部のイオンミラーによってイオン化されたサンプルが逆方向に進行し、**Reflector** 検出器で検出を行う点異なる。

この両者のモードの違いは、**Linear** モードは高質量電荷比のものまで検出することができるが、感度はあまり高くない。一方、**Reflector** モードは高質量電荷比のものは検出することはできないが、低質量電荷比のものは感度良く検出することが出来る。

3.2. MALDI-TOFMS を用いる際に注意しなければならない点⁽²³⁾

3.2.1 マトリックス由来のバックグラウンド⁽²³⁾

マトリックスはサンプルをイオン化させやすくするものであるが、マトリックス自身のピークも強くでてしまうこともある。特にサンプル濃度が薄い場合には、マトリックス由来のピークを抑制するために薄めのマトリックスを使用したり、マトリックスの混合比率を低くしたり、マトリックス由来のピークが表れない範囲での分析をする必要などがある。

また、サンプル濃度が高すぎるとかえって感度が低下することもあるので、この装置を用いるうえでしっかりと条件検討を行う必要がある。

3.2.2 サンプル調製等に用いる容器による影響⁽²³⁾

3.2.1 で記述する以外にも、サンプルチューブ由来の溶出物などもバックグラウンドとして観測されてしまうことがある。サンプルなしの系でテスト測定を行い、観測されるバックグラウンドピークを確認するが必要になってくる。

3.3 分子生物学的手法に関わる基礎的事項

本研究では、MALDI-TOFMS による微生物群集構造の変化を検出するだけでなく、既往の方法の分子生物学的手法を用いて、微生物群集構造の比較検討も行った。この節では分子生物学的手法に関わる基本的な事項を以下にまとめた。

3.3.1 細菌の系統樹⁽²⁴⁾

古典的な細菌分類学の体系では、グラム染色性、細胞形態、酸素への対応、運動性などの性質を基に分類を行っていた。しかし、現在では分子生物学的手法の発達により、リボソーム RNA の一つである 16S rRNA(その遺伝子は 16S rDNA)の塩基配列を解析することによって、細菌の系統分類体系を構築する試みが広く行われている。

rRNA はあらゆる細胞にあるが、異なる生物のもののヌクレオチド配列を比較すると、生物の進化上の類縁関係を時代はずっとさかのぼって追跡する手掛かりとなる。図 3.5 に rRNA 配列に基づいて作製された系統樹を示した。

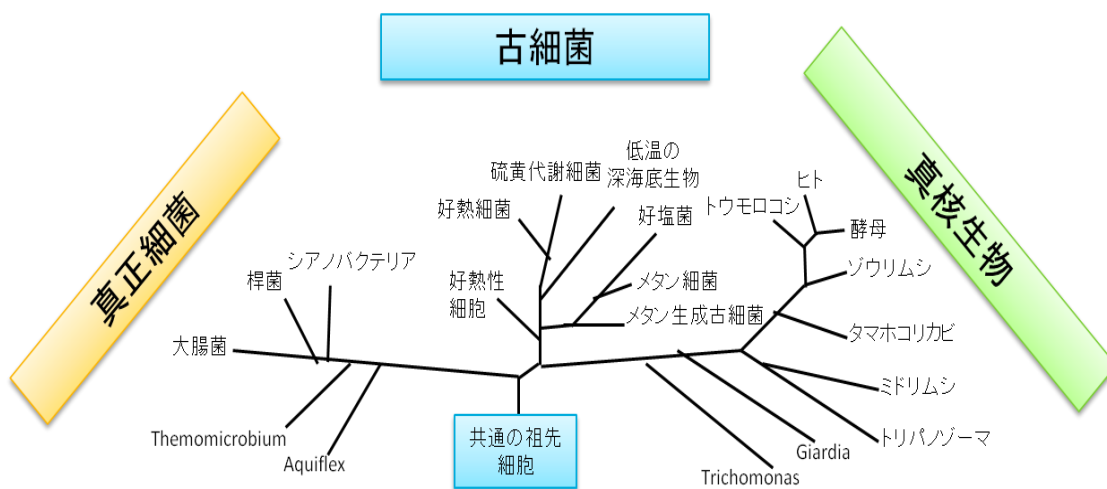


図 3.5 rRNA 配列に基づいて作製された系統樹⁽²⁴⁾(Essential 細胞生物学を参考に作成)

3.3.2 16S rRNA

近年、16S rRNA の塩基配列を用いた細菌の分類が行われている。16S rRNA はタンパク質合成の場であるリボソーム中に存在しており、その構造に厳密な制限がある。そのことから、16S rRNA をコードする遺伝子配列の変化速度は、ゲノム中の大部分の遺伝子よりもはるかに小さいため配列の保存性が高い。しかし、長い進化の歴史の中で少しずつ進化してきていることから塩基配列にも少しずつ違いがある。この塩基配列の違いが多ければ多いほど生物進化学的に遠い関係にあり、この違いを比較することにより、いろいろな生物種の進化系統を考察できるとともに種の同定に利用する事が出来る。

1. 進化の歴史の中で、塩基配列が変化している部分を変化領域、変化していない部分を保存領域という。16S rRNA の変化領域は 8 つ存在し、鎖長から、I =69-100、II =181-197、III =198-219、IV =451-480、V =837-849、VI =1004-1036、VII =1129-1144、VIII =1440-1461 となっている。こういったことから、16S rRNA の塩基配列の解明が進み、そのデータベース National Center for Biotechnology Information (NCBI)等 web 上で公開されている。

3.3.3 DNA 抽出

本研究では、DNA 抽出は物理破砕による超音波破砕・希釈法を用いた。一般的な DNA 抽出は物理的破砕や化学的処理によって行われる。または、市販のキットを用いて行われることも良くある。しかし、従来の方法は DNA 抽出に多くの時間と費用がかかってしまっていた。そこで佐藤ら⁽²⁵⁾は、超音波破砕・希釈法という PCR に供するまでの DNA サンプルを迅速かつ簡便に抽出する方法を開発した。筆者は、超音波破砕・希釈法の DNA 抽出バイアスを評価し、超音波破砕・希釈法が市販のキットと同等の結果が得られることを確認した⁽²⁶⁾。

超音波破砕・希釈法の原理は、超音波破砕による物理破砕によって、微生物の細胞を壊し、DNA 抽出する。超音波破砕後のサンプルを 1000 倍程度希釈するだけで、PCR の鋳型 DNA を調製する方法である。従来の方法では、物理破砕等によって DNA を抽出した後は、不純物を取り除く作業等が一般的であるが、超音波破砕・希釈法は水で希釈することによって、不純物の影響を軽減させている。

3.3.4 PCR⁽²⁷⁾

PCR(Polymerase Chain Reaction : ポリメラーゼ連鎖反応)法は微量の DNA 試料から特定領域の DNA だけを合成・増幅する方法である。(図 3.6)この方法ではまず、増幅させたい DNA 領域のそれぞれ 3'末端側の塩基配列に、相補的な 20 塩基程度のオリゴヌクレオチドであるプライマーを化学合成しておく。そして、目的 DNA 領域を含む DNA 試料を熱変性させて一本鎖化した後、プライマーをアニーリング(結合)させ、DNA 合成基質のデオキシヌクレオシド三リン酸と DNA ポリメラーゼを用いて相補鎖の合成を行う。つまり、「鋳型 DNA の熱変性→プライマーのアニーリング→相補鎖の合成」という一連の反応を繰り返す事により、目的 DNA 領域を増幅する。1 回の合成反応で生成した DNA は次の反応の鋳型となるため、連鎖反应的に DNA が合成され、n サイクルの反応の後には 2^n ほどの莫大な数の DNA 分子が理論上得られることになる。

初期の段階では、温度を上げたときに DNA ポリメラーゼが失活するために増幅操作ごとに新しく DNA ポリメラーゼを添加しなければならなかったが、高熱性細菌の DNA ポリメラーゼ(Taq DNA ポリメラーゼ)が利用されるようになってから、操作性が大幅に改善され、PCR の自動化が可能になった。

なお、本研究では各サンプルに後述の制限酵素処理を施すので、プライマーに蛍光色素を標識しておく必要がある。

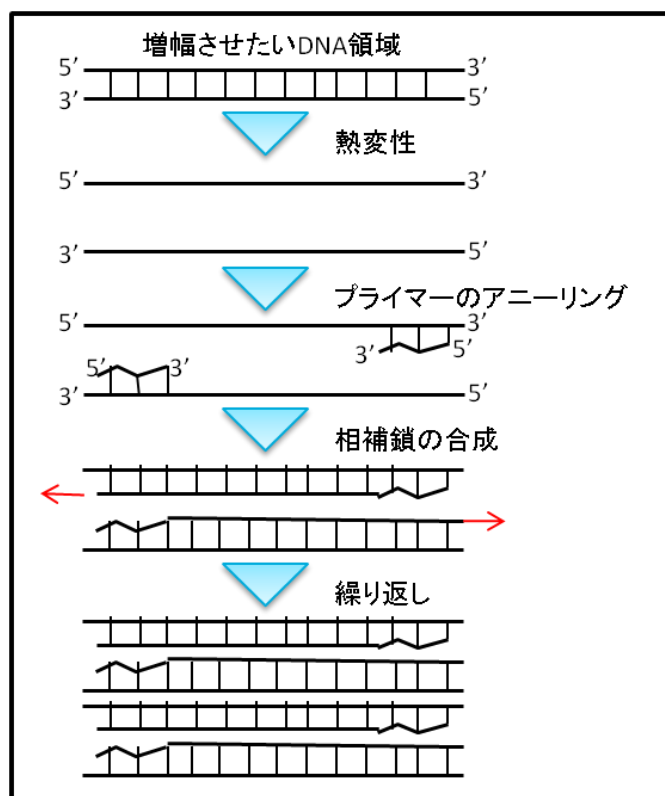


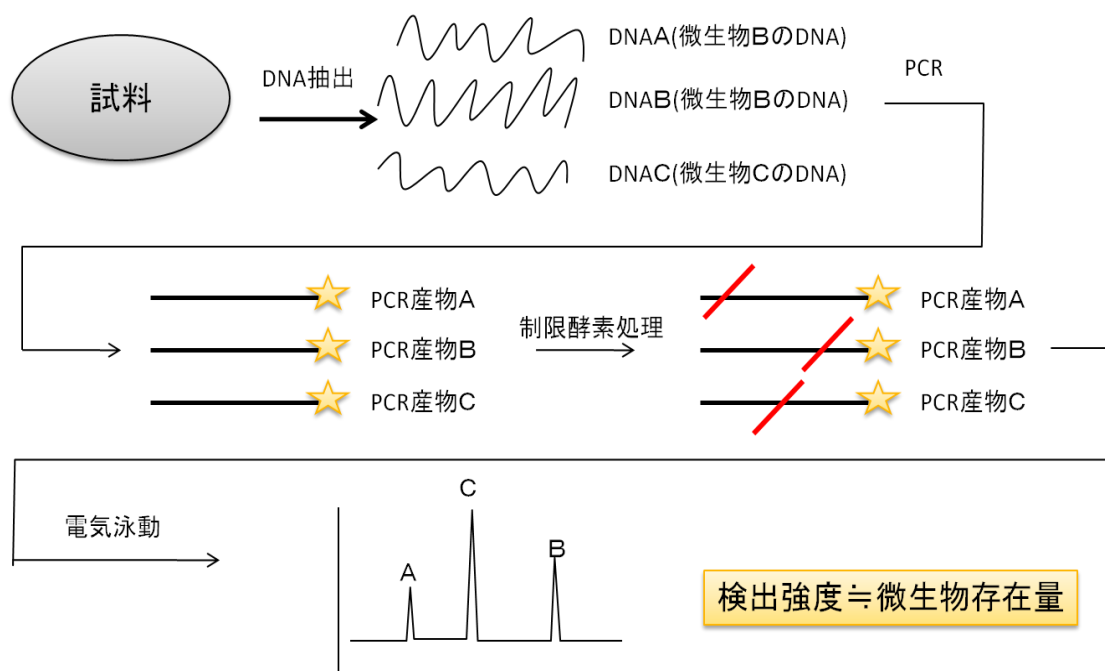
図 3.6 PCR の原理⁽²⁷⁾(生物工学基礎を参考に作成)

3.3.5 制限酵素処理

制限酵素とは、制限エンドヌクレアーゼとも言われるように、エンドヌクレアーゼの一種であり、DNA の特定の配列を認識してその部位を切断する。この原理を用いて、前述した PCR 産物を制限酵素処理に供することによって、異なる塩基配列を持つ微生物が異なる長さにそれぞれ切断されることになる。

3.3.6 T-RFLP

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism の略であり、環境微生物の群集構造を解析するために開発された技術である。T-RFLP 法の原理は、微生物種ごとに異なる塩基配列を持っているため、制限酵素処理を施すことによって微生物種ごとに異なる長さの DNA にすることが出来る。これらの長さの異なる DNA を電気泳動によって DNA 長さによって分けることが出来る。また、この際予め PCR におけるプライマーに蛍光色素を標識することによって検出することが出来る。図 3.7 に T-RFLP の概念図を示した。



★: 蛍光色素

図 3.7 T-RFLP の概念図

3.4 クロマトグラフィー⁽²⁸⁾

クロマトグラフィーは、試料を分離・精製することができ、さらに試料の定量・定性分析することもでき、環境分野だけではなく幅広い分野で利用されている技術である。試料の種類によって、分離方法が異なるため様々な種類のクロマトグラフィーがある。

この節では、本研究と関わりがあるイオンクロマトグラフィーと HPLC の原理について記述した。

3.4.1 イオン交換クロマトグラフィー:IC

イオン交換クロマトグラフィーは固定相に陽イオン交換体あるいは陰イオン交換体を用い、移動相には酸、塩基、緩衝液などの水溶液を用いてイオン性物質の分離を行う方法である。イオン交換体はイオン交換基とそれを固定化しているマトリックスから成り、マトリックスにはポリスチレン、ポリアクリルアミドなどの有機合成ポリマー、セルロースなどの多糖、およびシリカゲルなどの無機ポリマーが用いられる。同一のイオン交換基を持つ場合でもマトリックスが異なれば分離挙動が異なってくるので、マトリックスの構造を十分理解して上でイオン交換体を選択することが重要である。イオン交換体をマトリックスの構造によって大別するとゲル型樹脂、巨大網目状樹脂、架橋多糖型になる。ゲル型、巨大網目状型樹脂は低分子極性物質の分離には有効であるが、生体高分子などの高分子の分離に際しては交換容量が不足する場合が多い。さらに、マトリックスが疎水性であるために、非特異的な吸着とそれに伴う変性が起こるなどの不都合な点がある。一方架橋多糖型イオン交換体はマトリックスが親水性であるため非特異的な吸着や変性の心配が少なく、生体高分子が内部に潜り込める三次元的な網目構造と十分な数のイオン交換基を持つ。

3.4.2 高速液体クロマトグラフィー:HPLC

High performance Liquid chromatography の略であり、高速液体クロマトグラフィーのことである。原理としては、機械的に高い圧力をかけることによって移動相溶媒を高流速でカラムに通し、これにより分析物が固定相にとどまる時間を短くして分離能・検出感度を高くすることを特長としている。現在では分析物の注入から検出・定量まで自動的に行えるようになり、再現性の高い分析が比較的容易に行うことが出来るようになった。

HPLC 法では移動相の溶媒組成に勾配をつけて、目的成分の分離を行うことが出来るグラジエント分析を行うことができる。例として、溶媒に水とメタノールの混合溶液を使用するが、最初は水だけをカラムに通し、試料中の極性が高い物質が溶出し、徐々に溶媒中のメタノール濃度を高くすることによって極性の低い物質が順次溶出する。この原理を一般的に逆相クロマトグラフィーと呼ぶ。

3.5 抽出方法

3.5.1 固相抽出

固相抽出法とは、移動相に含まれる化学物質等を親和性の相違によって、固定相に吸着させて、化学物質等を分離・精製する方法である。原理は 3.4 で前述したクロマトグラフィーに類似している。

本研究では、活性汚泥から抽出した化学物質を分画する際に固相抽出を行った。本研究では、固相抽出を Sep pak®Plus C18 Cartridges(Waters 社)という固相抽出 Kit を用いた。

3.5.2 固液抽出

固液抽出法は、化学的な抽出方法のひとつであり、試料中の目的成分(固体)を目的成分がよく溶解する溶媒を用いて抽出する方法である。ただし、この手法は目的成分が溶媒に溶解しなければ抽出できないので注意が必要である。

3.6 凍結乾燥

凍結乾燥とは、真空状態にすることによって蒸発ではなく、昇華させて試料中の水分を取り除く方法である。この手法のメリットとしては、タンパク質の変性等をさせないで試料中の水分を取り除くことが出来ることである。

凍結乾燥の原理は、大気圧を限りなく 0(5Pa 等)に近くすることで、試料中の水分は、液体で存在することができない。あらかじめ凍結させておいた試料中の水分は、昇華する。この時熱エネルギーを失って、試料の温度が下がる。温度がさがったことによってさらに試料中の水分が昇華する。この繰り返し作業によって、タンパク質などを破壊しないで試料中の水分を除去することが出来る。

3.7 主成分分析:PCA

n 個のサンプルのそれぞれに対して p 個の変数の値が観測されたとすると、この(サンプル) \times (変数)の形式のデータを多変量データという。多変量解析法で扱う変数は、離散的な値を取るなら質的変数、連続的な値を取るなら量的変数と区別する。

主成分分析とは、多くの量的変数が存在する場合に、それらの間の相関構造を考慮して、低い次元の合成変数(主成分)に変換し、データが有している情報をより解釈しやすくするための方法である。

本研究では、MALDI-TOFMS によって得られたデータを主成分分析によって解析することによって、微生物群集構造の変化を見ることとした。

第4章 実験方法

本章では、本研究で全体に関わる実験方法について記述した。

4.1 リアクターの運転

研究室で実験室規模のリアクターを運転した。実験室規模のリアクターの実験装置概略図は以下の図 4.1 に示した。本研究では、S1,S2,WL の 3 つのリアクターを運転した。種汚泥は都市下水処理場に協力していただいた。リアクターの運転タイムテーブルは、1 時間嫌気、2 時間好気、1 時間沈降の 4 時間のサイクルで運転した。リアクターに与える基質の組成は以下の表 4.1 ように調製した。また、S1 と WL リアクターには、有機無機基質にミネラル基質をさらに添加した。そのミネラル基質の組成を以下の表 4.2 にまとめた。このミネラル基質を 1L あたり 15mL 添加した。また、有機無機系基質とリン系基質はそれぞれ各サイクルで約 50mL ずつ添加するように調整した。また、各リアクターの各 Run の運転期間を以下の図 4.2 に示した。

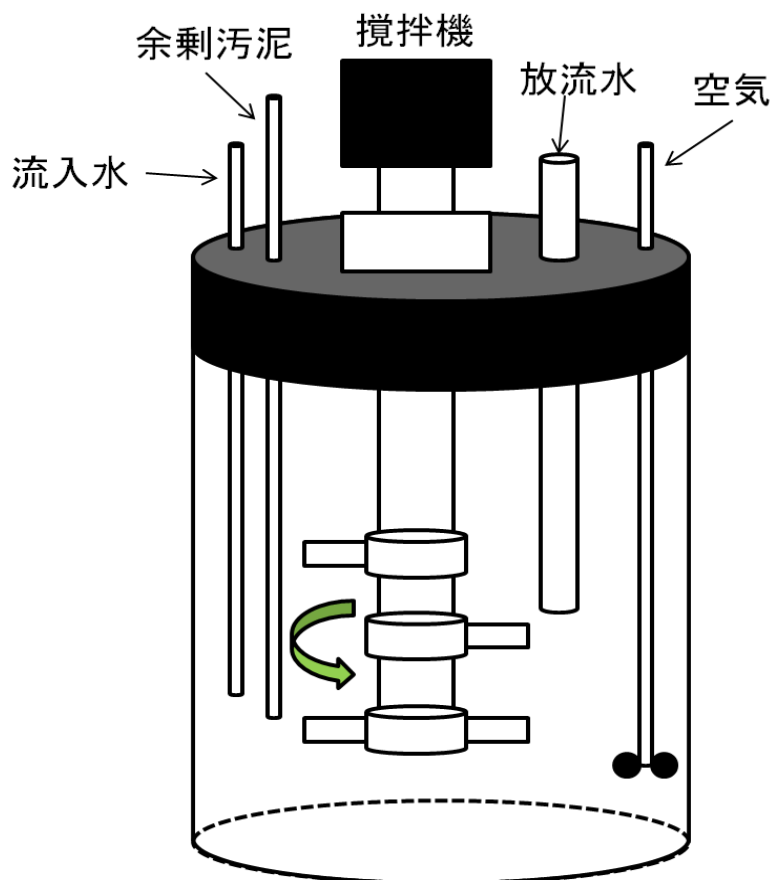


図 4.1 実験室規模リアクターの装置概略図

表 4.1 各リアクターの基質組成 (5L あたりの分量)

有機系基質		
	S1 と S2	WL
酢酸ナトリウム 3 水和物	56.5 g (26.5 g as COD)	110.5g (51.8 g as COD)
プロピオン酸ナトリウム	26.8 g (25.5 g as COD)	39g (37.1 g as COD)
ペプトン	50 g (62 g as COD)	4.15g (5.2 g as COD)
酵母エキス	10 g (9.8 g as COD)	5.115g (5.0 g as COD)
塩化カリウム	21 g	9g
塩化カルシウム 2 水和物	6.6 g	3.48g
硫酸マグネシウム 7 水和物	55 g	22.5g
塩化アンモニウム	なし	22.5g
アリルチオ尿素	なし	0.1345g
リン系基質		
リン酸水素 2 カリウム	18 g (6.41 g as P)	21.25g (7.57g as P)
炭酸水素ナトリウム	なし	37g

表 4.2 ミネラル基質の組成 (2L あたりの分量)

ミネラル基質	mg/L	ミネラル基質	mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1500	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60
H_3BO_3	150	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	120
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30	$\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	150
KI	180	EDTA	10000
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	120		

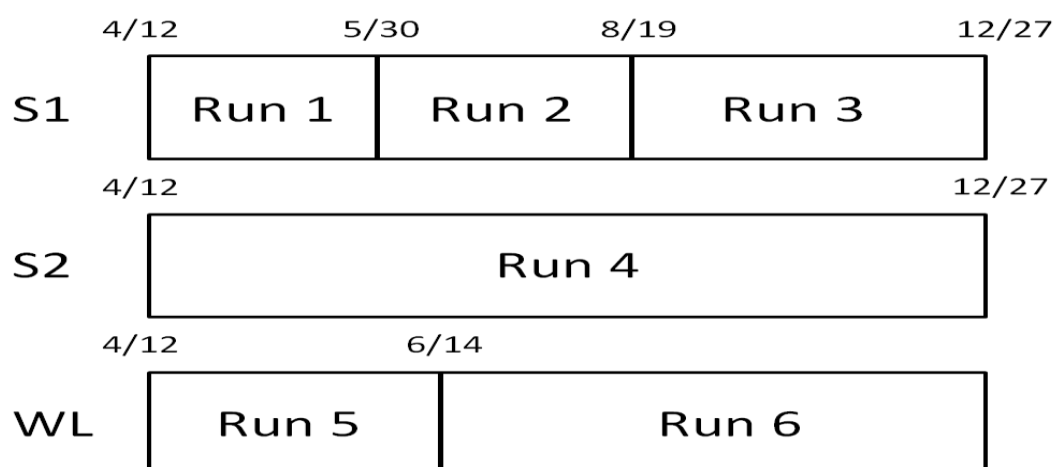


図 4.2 各リアクターの各 Run の運転期間

4.1.2 サンプルリング

実験室規模のリアクターを運転する際に週に 3 回のサンプルリングを行い、リアクター内のリンや窒素や溶存有機炭素濃度(以下 DOC と省略)を下水道試験法⁽²⁹⁾に従って測定した。

サンプルリング方法としては、嫌気条件の終わりの約 5 分前に約 100mL の汚泥を採取した。その後、25mL ホールピペットを用いて、50mL の遠沈管に 25mL を二つ分注した。遠沈管を 3500rpm で 5min 遠心させた。遠心させた試料二つの上澄み液を合わせて約 25mL の DOC 分析用の試料を得た。さらに、上澄み液を Cellulose Acetate 0.45μm Filter (Advantec 社)でろ過をした。そのろ液を約 1mL 採取し、IC 分析用の試料を得た。

好気条件の試料は、嫌気条件と同様の方法で DOC や IC 用の試料を採取した。そして、上澄み液を採取した後のそれぞれの汚泥試料に約 30mL になるように MiliQ 水でメスアップした。メスアップ後のサンプルを再び 3500rpm で 5min 遠心させた。遠心させたサンプルの上澄み液を捨てた。上澄み液を捨てたサンプルを MLSS や MLVSS の測定に用いた。

4.1.3 モニタリング

リアクターの水質モニタリング項目として、嫌気工程終了時の DOC、溶存態リン、好気工程終了時の DOC、溶存態リン、MLSS、MLVSS を測定した。これらの測定は、下水道試験法⁽²⁹⁾に従って測定した。測定の詳細を以下に示した。

4.1.3.1 MLSS と MLVSS

蒸発皿を 600℃のオーブンで 30 分強熱し、109℃の乾燥機で乾燥させ、デシケーターで 30 分以上冷まし、蒸発皿の風袋重量を測定した(i)。4.1.2 で前述した好気工程終了時のリアクターから 2 回目の上澄み液を捨てた沈降汚泥を蒸発皿に移した。汚泥を入れた蒸発皿を 109℃の乾燥機で 2 時間以上、デシケーターで 30 分以上乾燥・放冷させた後に、蒸発皿の重量を測定した(ii)。その後、蒸発皿を 600℃のオーブンで 30 分強熱し、109℃の乾燥機、デシケーターで乾燥・放冷し、蒸発皿の重量を測定した(iii)。MLSS 及び MLVSS は以下の式を用いて算出した。

$$MLSS[mg / L] = (ii - i) \times 1000 \times 1000 \div \text{使用汚泥量}(mL)$$

$$MLVSS[mg / L] = (ii - iii) \times 1000 \times 1000 \div \text{使用汚泥量}(mL)$$

4.1.3.2 溶存態リン

嫌気及び好気工程終了時にサンプルリングした IC 用の試料を ICS-3000(DIONEX 社)に供することによって、嫌気及び好気工程終了時における溶存態リンの濃度を求めた。また、モリブデン青(アスコルビン酸還元)吸光度法を用いて、濃度既知のリン標準液で検量線を作り、その検量線から溶存態リン濃度を求めた。

4.1.3.3 溶存有機炭素(DOC)

DOC 用の試料は TOC-VCSN(SHIMAZU 社)を用いて、DOC 濃度を測定した。DOC は活性汚泥内の有機物濃度とみなすことが出来、この値が高ければリアクター内の活性汚泥が有機物をあまり摂取していないことを示している。

4.2 化学物質の抽出と分画

4.2.1 化学物質の抽出

本研究では、活性汚泥から微生物相互作用物質と考えられる化学物質を固液抽出法を用いて抽出した。

抽出用の汚泥は、リアクター運転に伴う余剰汚泥を集めて収集した。S1 汚泥は 8/21-24、S2 汚泥は 9/3-9/6、WL 汚泥は 8/12-15 の余剰汚泥を採取した。収集した汚泥 10mL をねじ口試験管に移した。そのねじ口試験管を遠心分離に供し、上澄み液を捨てた。上澄み液を捨てた汚泥を-20℃で凍結保存した。

凍結保存した汚泥は凍結乾燥器：FLEEZE DRYER FDU-830(EYELA 社)を用いて、汚泥を凍結乾燥させた。先の凍結乾燥させた汚泥に 99.5%エタノールを 10mL 添加し、5 日間浸透させた。このとき、固まっている汚泥があった場合は、葉さじ等を用いて汚泥を細かく砕いた。5 日間の浸透が終わった汚泥を遠心分離に供して、上澄み溶液をすべて 15mL の遠沈管に移して冷蔵保存させた。

4.2.2 抽出物の分画

本研究では、固液抽出法で抽出した化学物質を分画することによって、どの分画に微生物に大きな影響を与える成分が含まれているのかを調べることを目的である。

本研究では、sep pak C18(Water 社)という固相抽出キットを用いて、化学物質の分画を行った。まず、sep pak のコンディショニングのために、3mL の 99.5%エタノールを sep pak にロードした。その後、MiliQ 水で sep pak を洗浄した。4.2.1 で前述した抽出液を 3mL 用いて、50mL にメスアップ(希釈)させた。この希釈溶液をガラス製のシリンジを用いてすべて sep pak にロードした。その後、エタノール濃度が 0,20,40,60,80,100%のエタノール溶液をそれぞれ約 2mL ずつエタノール濃度が薄い順に sep pak にロードし、sep pak に吸着した成分を親水性の差によって溶出・分画した。

それぞれの溶出液はエタノール濃度が異なるため、すべてエタノール濃度を統一させるためにすべての溶出液を蒸発させた。蒸発させたサンプルに 1mL の 99.5%エタノールを添加し、活性汚泥由来抽出物の分画を行った。

4.3 マイクロプレートによる微生物の培養

本研究の微生物の培養は、以下の図 4.3 の nunc96 マイクロウェルプレート(Thermo scientific 社)を用いた。一つのウェルの容量は約 300 μ L であり、一度に多くのサンプルを同様の条件で培養することができるため、微生物相互作用物質の影響を丹念に調べることが目的としている本研究ではマイクロプレートを用いた培養が適していると考えたからである。

抽出物や分画液を入れる場合は、培養用の汚泥を入れる前に各ウェルに添加し、自然乾燥させた。その後、嫌気工程終了後の活性汚泥をリアクターから採取し、150 μ L を各ウェルに分注させた。その後、汚泥の基質(餌)として、実験室規模のリアクターに与えている同じ有機無機系とリン系の基質をそれぞれ 10 μ L ずつ各ウェルに添加した。ウェル内の水分が蒸発させないように Gas Permeable Adhesive Seals(ABgene 社)をマイクロプレートに貼って蒸発を防ぐように試みた。この汚泥を 5 日間培養させた。また、5 日間の培養の間に各ウェルに有機無機系とリン系の基質を毎日 10 μ L ずつ添加した。

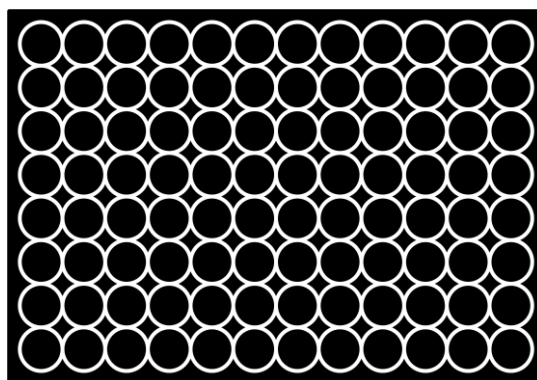


図 4.3 96 マイクロウェルプレート

4.4 分生物学的手法

4.4.1 DNA 抽出

DNA 抽出方法として、フェノールなどの化学的手法や物理破碎等の物理的手法がある。また、市販のキットを用いて DNA を抽出する方法もある。

本研究では、超音波ホモジナイザー : Digital sonifier(BRASON 社)を用いた超音波破碎希釈法による DNA 抽出法を用いた。一般的には、市販のキットを用いて DNA 抽出を行うが、筆者は超音波破碎希釈法を用いることによって、市販の DNA 抽出キットと同様の結果が得られることを確認したため、時間短縮・費用削減のため超音波破碎希釈法を用いた。

リアクター等から採取した活性汚泥サンプルを 2-10 倍に希釈し 1mL に調製した。そのサンプルを amplitude60%で 10 秒の超音波破碎を 2 回行った。超音波破碎後のサンプルを 100-500 倍に希釈し、原液サンプルを破碎前の 1000 倍になるように希釈した。

4.4.2 PCR 法

前述の超音波破碎希釈サンプルを以下表 4.3 ように調製した。本研究では、各汚泥の微生物群集構造の変化を見るために、f-プライマーと r-プライマーはどの汚泥に対しても 27f-FAM と 519r のプライマーを用いた。増幅条件は以下の表 4.4 にまとめた。

表 4.3 1 サンプルあたりの PCR 溶液の組成

10×Buffer	5 µL
dNTP	5 µL
f-プライマー(27f-FAM)	1 µL
r-プライマー(519r)	1 µL
滅菌水	32.75 µL
Taq Gold	0.25 µL
各超音波破碎希釈サンプル	5 µL
合計	50 µL

表 4.4 PCR の増幅条件

ステップ	温度[°C]	時間[秒]	サイクル[回]
Hot start	95	600	1
熱変性	94	30	30
アニーリング	55	30	
伸長	72	30	
最終伸長	72	600	1

4.4.3 PCR 産物の濃度測定

超音波破碎・希釈法によって得られた DNA が PCR 法でちゃんと増幅できたかを調べる目的で PicoGreen(invitrogen 社)を用いて DNA 濃度を測定した。

PicoGreen に付属している 20×TE バッファーと PicoGreen 原液を 400 倍に希釈して PicoGreen 試薬を得た。PicoGreen 試薬を 10µL と、PCR 後サンプルを適当倍率に希釈した 200µL を 96 マイクロウェルプレートに注入した。その後、マイクロプレートリーダー(CORONA 社)を用いて励起波長 490nm、蛍光波長 520nm で吸光度を測定した。また、標準液として、λ DNA 溶液を用いて検量線を作成した。その検量線から PCR 産物の DNA 濃度を産出した。

4.4.4 PCR産物の精製

得られたPCR産物を4.4.6で述べる制限酵素処理に先だってQIAquick PCR purification Kit(QIAGEN 社)を用いて精製した。なお、精製の目的は主として未反応のプライマーを除去すること、および、脱塩することである。また、脱塩は、後に述べる T-RF 長を測定するための電気泳動において、加電圧注入するために必要とされる。

4.4.5 精製 PCR 産物の濃度測定

精製後の PCR 産物を次項で記述する制限酵素に供するために精製後の PCR 産物濃度を知必要がある。制限酵素処理では、PCR 産物の量は 50-100ng が望ましい。PCR 産物を 1.5μL を NanoDrop ND-1000(Thermo scientific 社)に乗せ、PCR 産物の濃度を測定した。

4.4.6 制限酵素処理

精製した PCR 産物を次項で述べる T-RFLP に供するために、制限酵素処理する必要がある。制限酵素処理は以下のように行った。本研究では、微生物群集構造の変化を検出するために、用いる制限酵素はすべて *Hha I* (TOYOBO 社)に統一させた。

以下の表 4.5 のように反応溶液を調製した。ただし、制限酵素は失活を防ぐために最後に添加した後、すぐに-20℃の冷凍庫に戻した。制限酵素添加後の反応溶液はタッピングで混合させた。また、PCR 産物はすべて 50-100ng に統一させるために、前述の PCR 産物濃度をもとに希釈させた。

表 4.5 1 サンプルあたりの制限酵素処理の反応溶液組成

10×BSA	1 μL
10×TA	1 μL
滅菌水	2.84 μL
<i>Hha I</i> (20Units/μL)	0.16 μL

上記の反応溶液を、必要数用意した PCR チューブに 5μL ずつ分注した。反応溶液を分注したチューブに精製後の PCR 産物をそれぞれ 5μL 分注した。これらのチューブをサーマルサイクラー(Biometra 社)に入れ、37℃で 3.5 時間反応させた後に、酵素を失活させるために 65℃で 10 分処理を施した。

4.4.7 T-RFLP

T-RFLP 法による分析を行う際に制限酵素処理に供したサンプルを、一旦熱処理を施し、DNA 長さのサイジングを行う必要がある。

以下の表 4.6 のように反応溶液を調製した。必要数用意した PCR チューブに以下の反応溶液を 21.25 μ L ずつ分注した。そのチューブに制限酵素処理後の PCR 産物を 1.25 μ L ずつ分注した。これらのチューブをサーマルサイクラーで 95 $^{\circ}$ C、2 分熱処理した後に、5 分間氷冷させた。この熱処理後のサンプル全量をディスポーザルバイアルに入れ、サンプルトレーにバイアルをセットした。その後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)の Gene Scan モードによって DNA 断片の分離と検出を行った。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer の操作は付属のプロトコールに従い、解析はソフトウェア GeneMapper を用いて行った。

表 4.6 1 サンプルあたりの T-RFLP 法に必要な試薬

Hi-Di ホルムアミド	21 μ L
GeneScan TM -500 ROX TM Size Standard(Applied Biosystems 社)	0.25 μ L

4.5 MALDI-TOFMS

本研究では、MALDI-TOFMS として 4800 plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB SCIEX) を用いて実験を行った。次章で MALDI-TOFMS の実験条件等の検討についての記述をするが、本節では MALDI-TOFMS についてのプロセッシングメソッド等の条件についての記述をする。

実験に使用したプレートは Opti-TOFTM384 Well Insert(Applied Biosystems 社)を使用した。オペレーティングモードは MS Reflector Positive を用い、各スポットに 50 ショットを 25 か所にレーザーを照射した。つまり、各スポットに 1250 のレーザーを照射した。電圧は 1.708kV に設定し、S/N 閾値は 10 とした。照射するレーザー強度は非常に強い 5000-6000 の範囲で照射した。

4.6 主成分分析

本研究では、MALDI-TOFMS で得られたスペクトルデータを主成分分析によって各サンプル間の比較を行った。本研究では主成分分析を行う際に Marker ViewTM software version1.2 を使用した。MALDI-TOFMS で得られたデータを T2D 形式でエクスポートした後に Marker View でインポートをした。サンプル間でスペクトルの検出強度が異なっていたため主成分分析をする前に合計ピークエリアによる標準化を行った。その後、主成分分析のプレプロセッシングでは Weighting :None、Scaling :Pareto に設定して、主成分分析を行った。

第5章 MALDI-TOFMSの実験条件の検討

本研究では、微生物相互作用物質検出方法として、MALDI-TOFMS を用いた新規手法の開発を試みている。従って、MALDI-TOFMS が微生物相互作用を検出できるのかの検討をすることが重要になってくる。本章では、まず実験室規模リアクターの運転状況の結果を示し、次に 3.2 で前述した MALDI-TOFMS を用いる際に注意しなければならない点について検討を行った後に、以下の 3 点の検討を行った。1 つ目は異なるリアクターにおける微生物の相違を検出することが出来るのか。2 点目は、活性汚泥の経時変化を検出することが出来るのか。3 点目は、活性汚泥から抽出した化学物質の相違を検出することができるのか、である。

5.1 リアクターの運転

本研究は、実験室規模リアクターの活性汚泥をもとに実験を行った。そこで、各リアクターのモニタリング結果を以下にまとめた。運転開始時期はそれぞれ異なるが、本研究で関係のある時期のデータである 2010 年 8 月から 2010 年 12 月を示した。さらに、各リアクターの好気終了後のリン濃度をまとめた図を図 5.1.10 にまとめた。

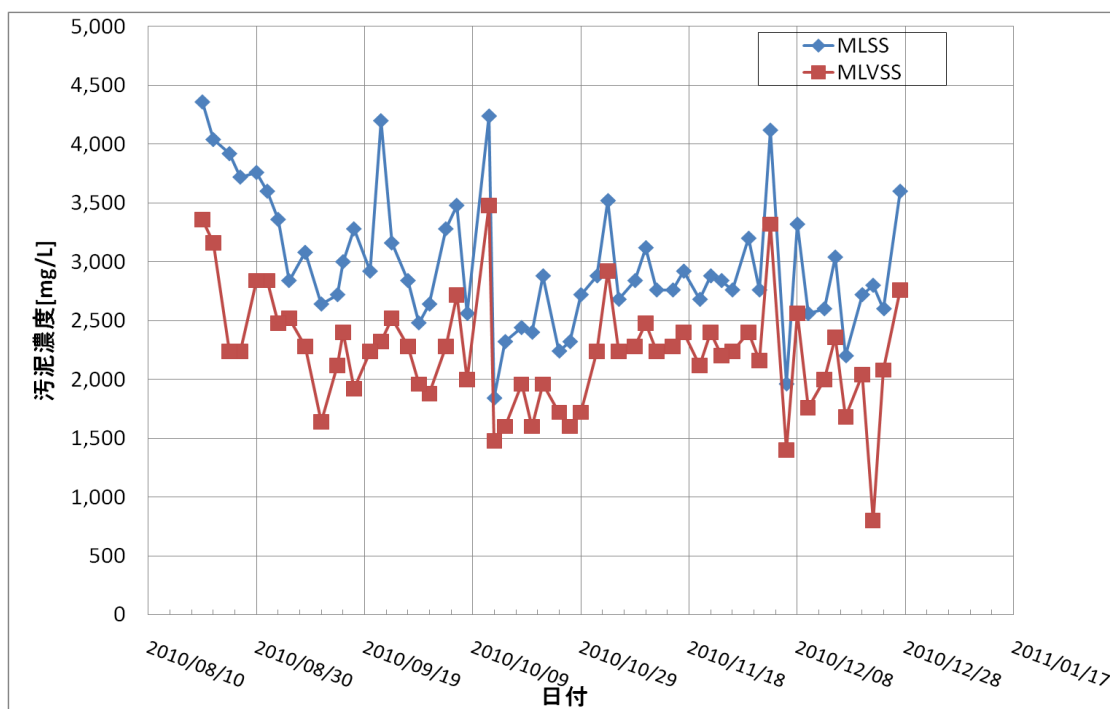


図 5.1.1 S1 リアクターの MLSS と MLVSS の結果

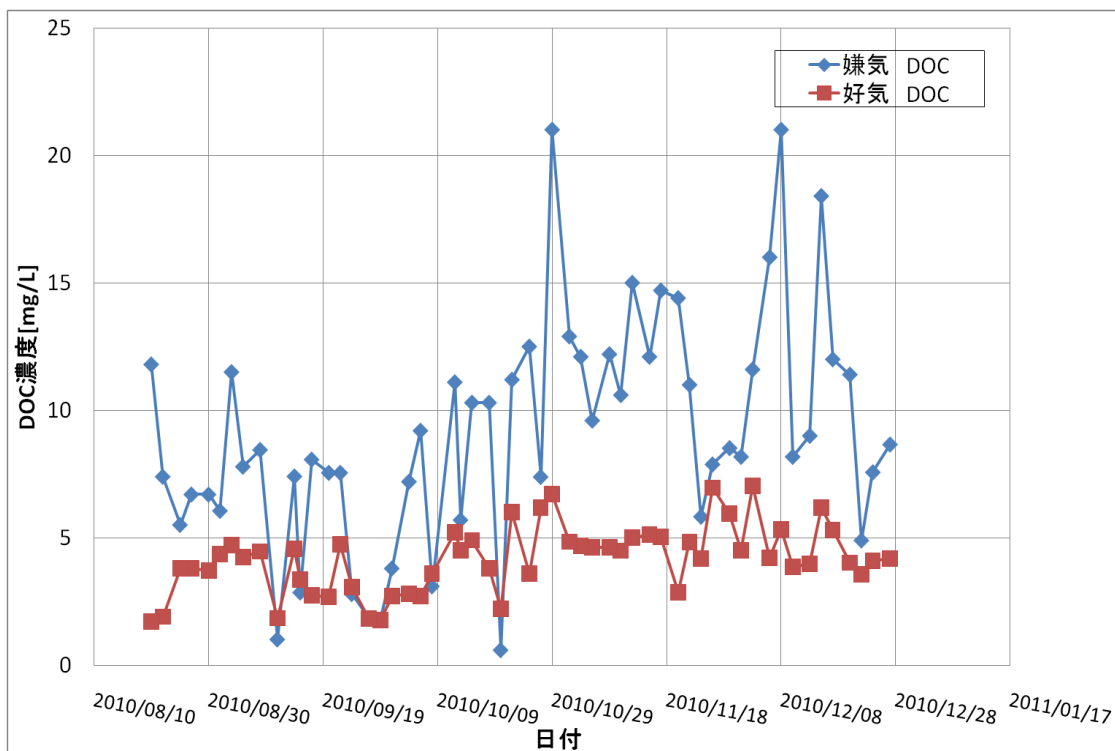


図 5.1.2 S1 リアクターの DOC の結果

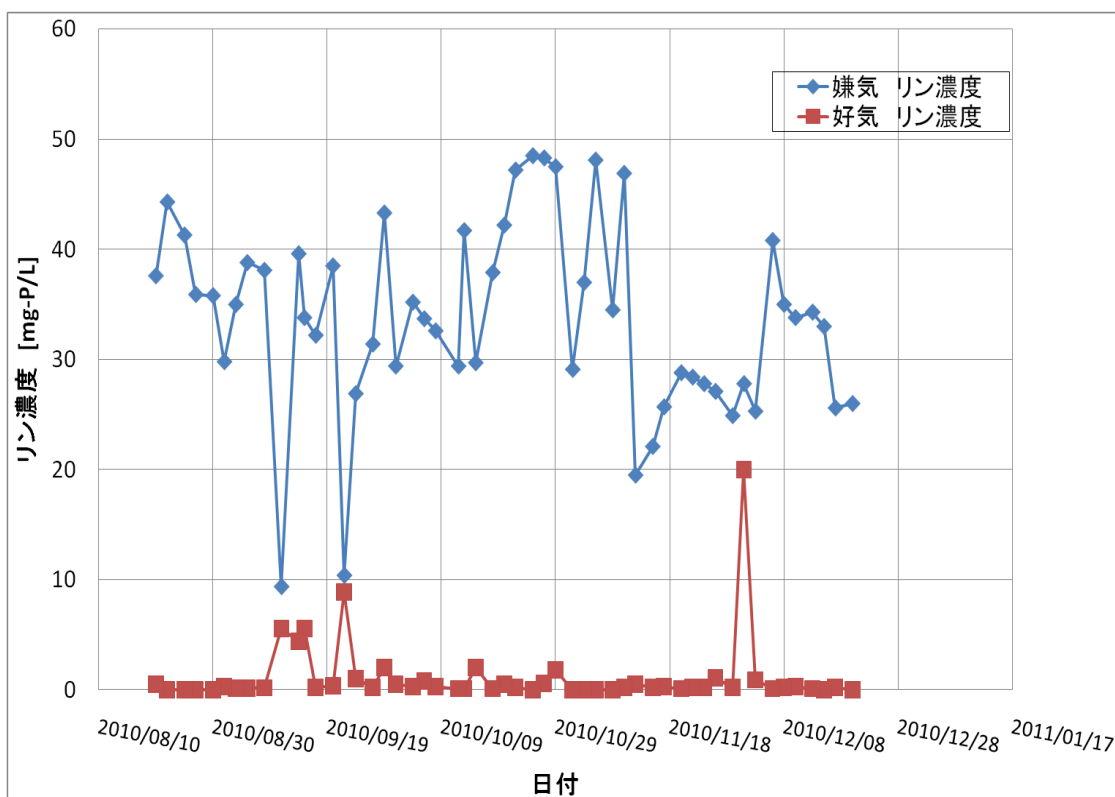


図 5.1.3 S1 リアクターの リン濃度の結果

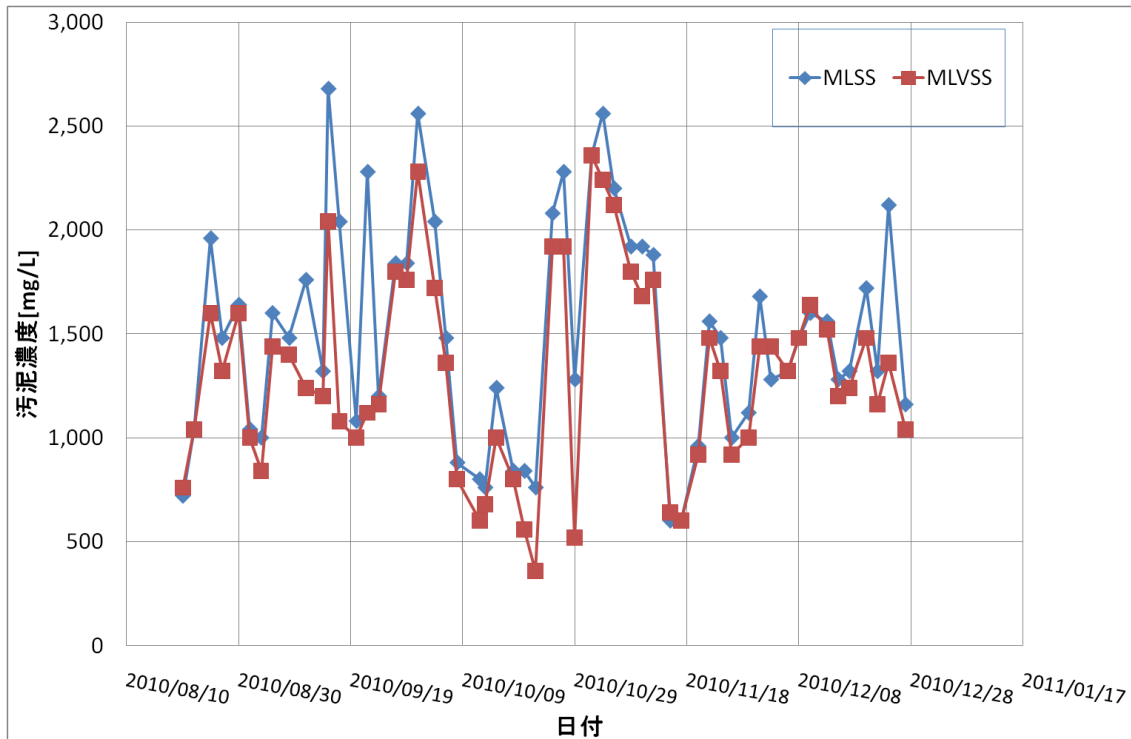


図 5.1.4 S2 リアクターの MLSS と MLVSS の結果

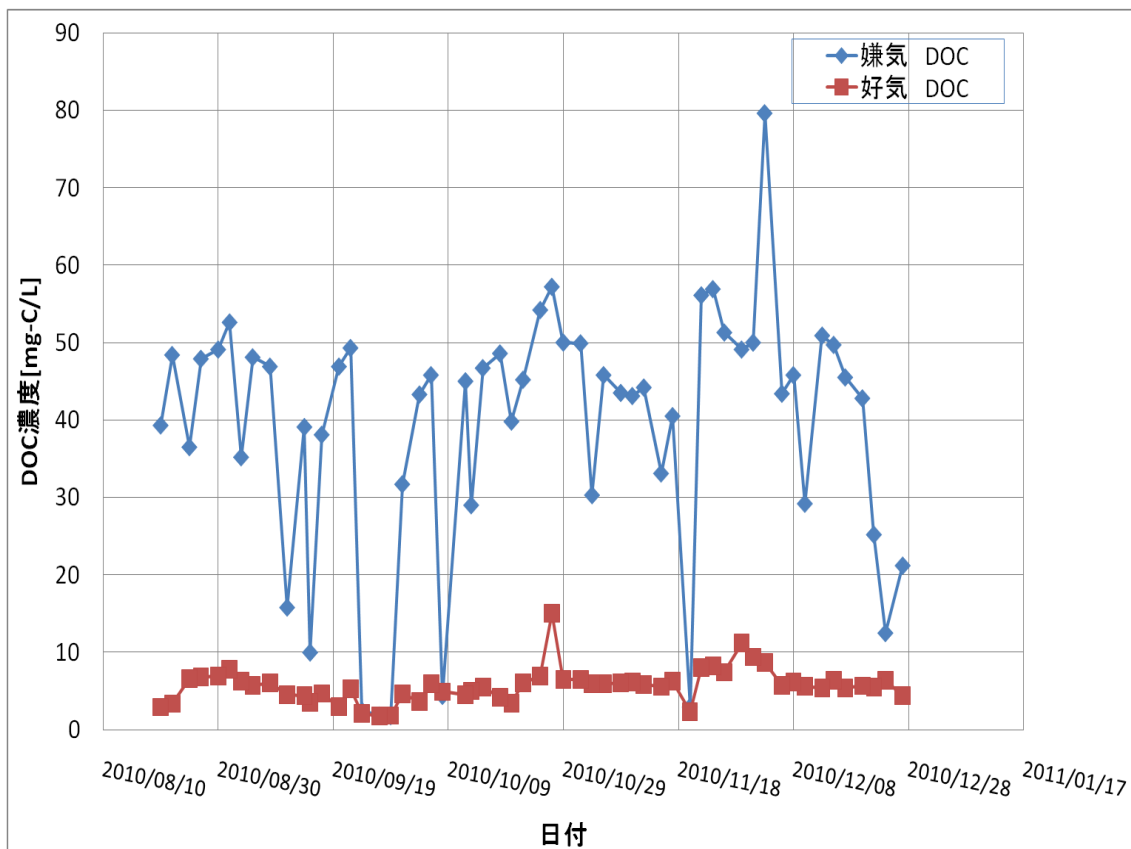


図 5.1.5 S2 リアクターの DOC の結果

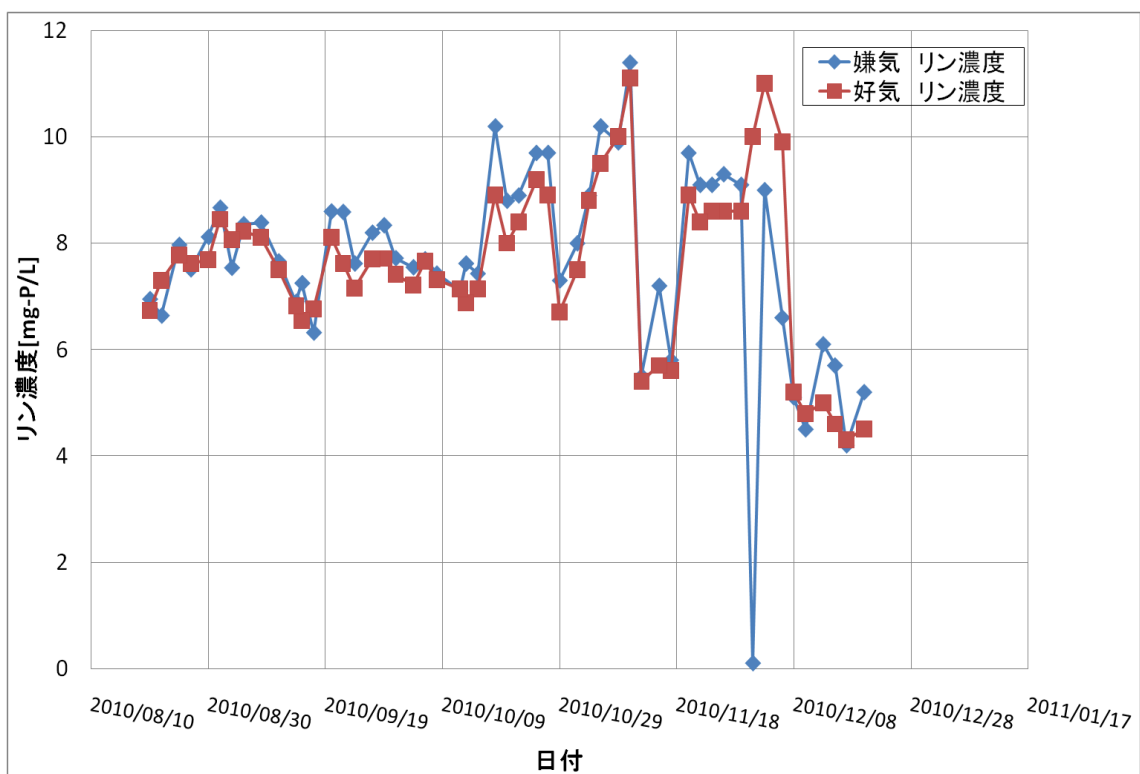


図 5.1.6 S2 リアクターのリン濃度の結果

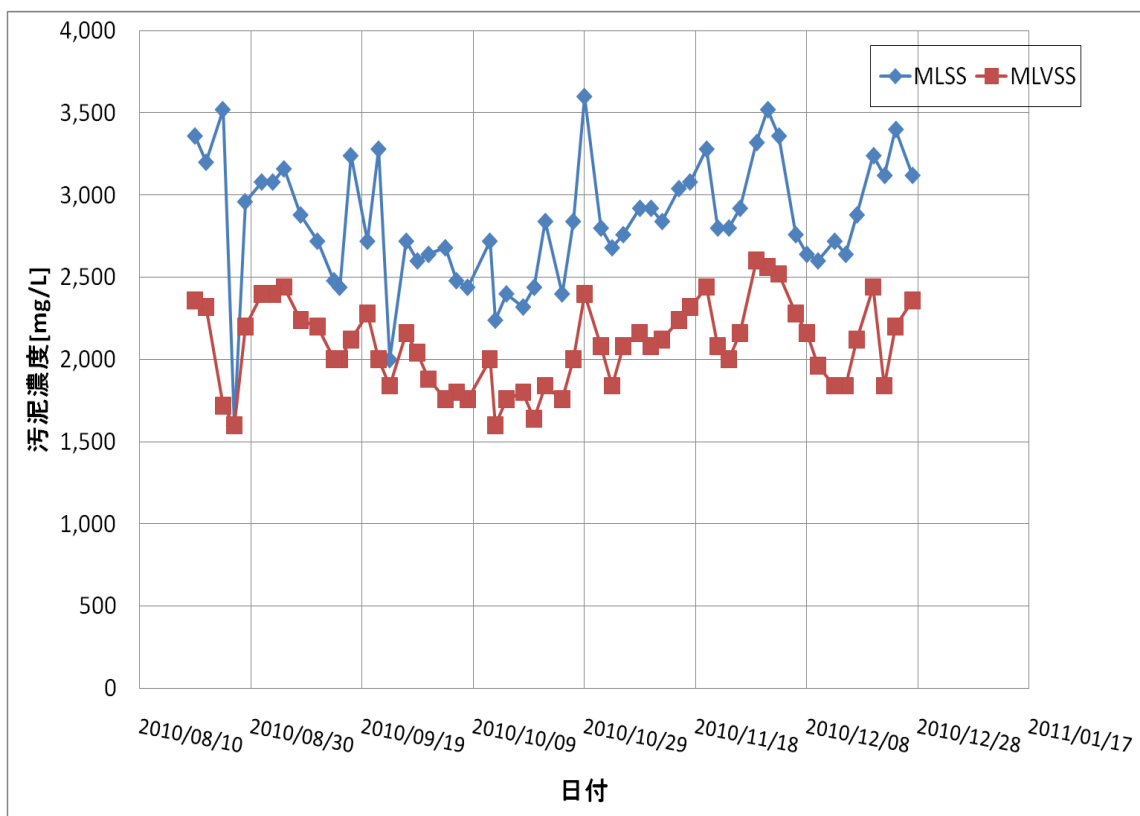


図 5.1.7 WL リアクターの MLSS と MLVSS の結果

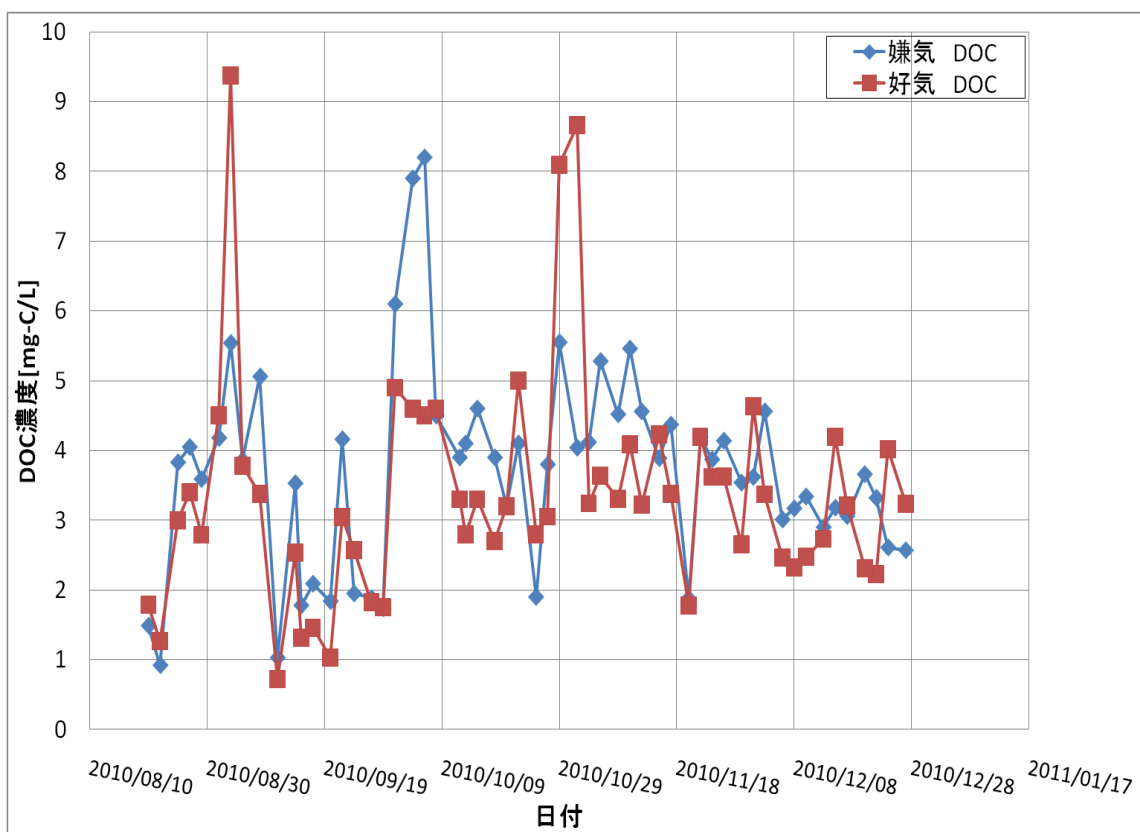


図 5.1.8 WL リアクターの DOC の結果

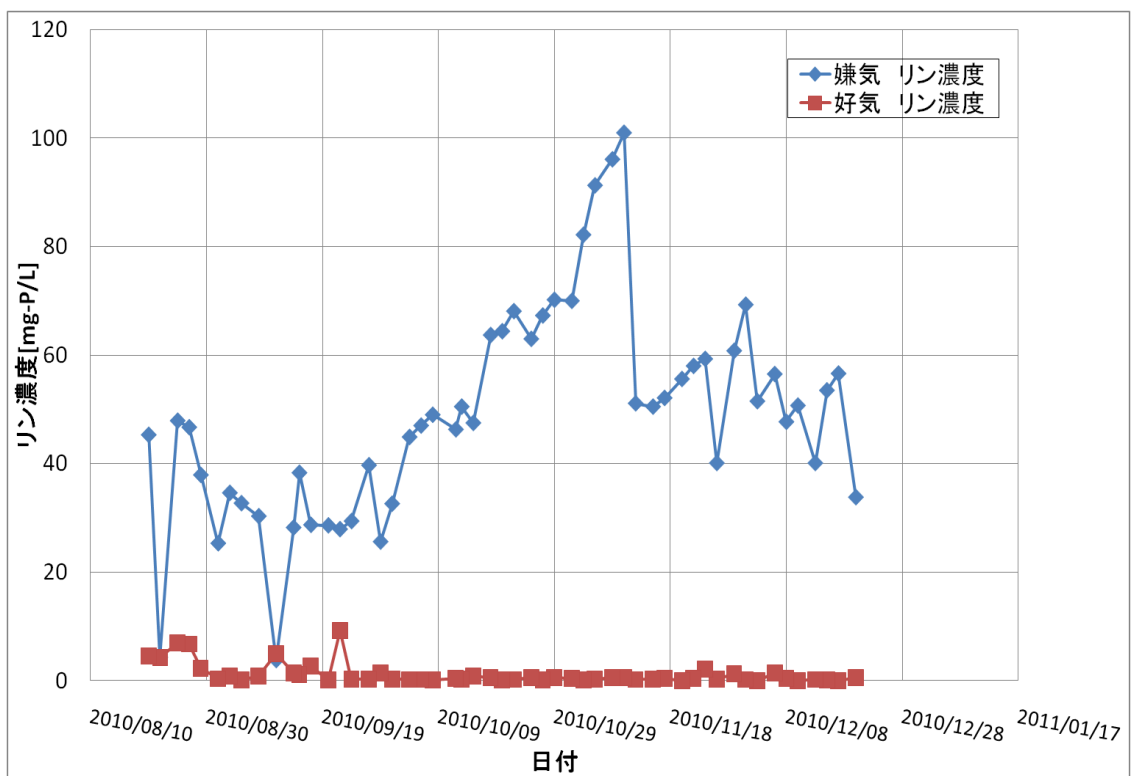


図 5.1.9 WL リアクターのリン濃度の結果

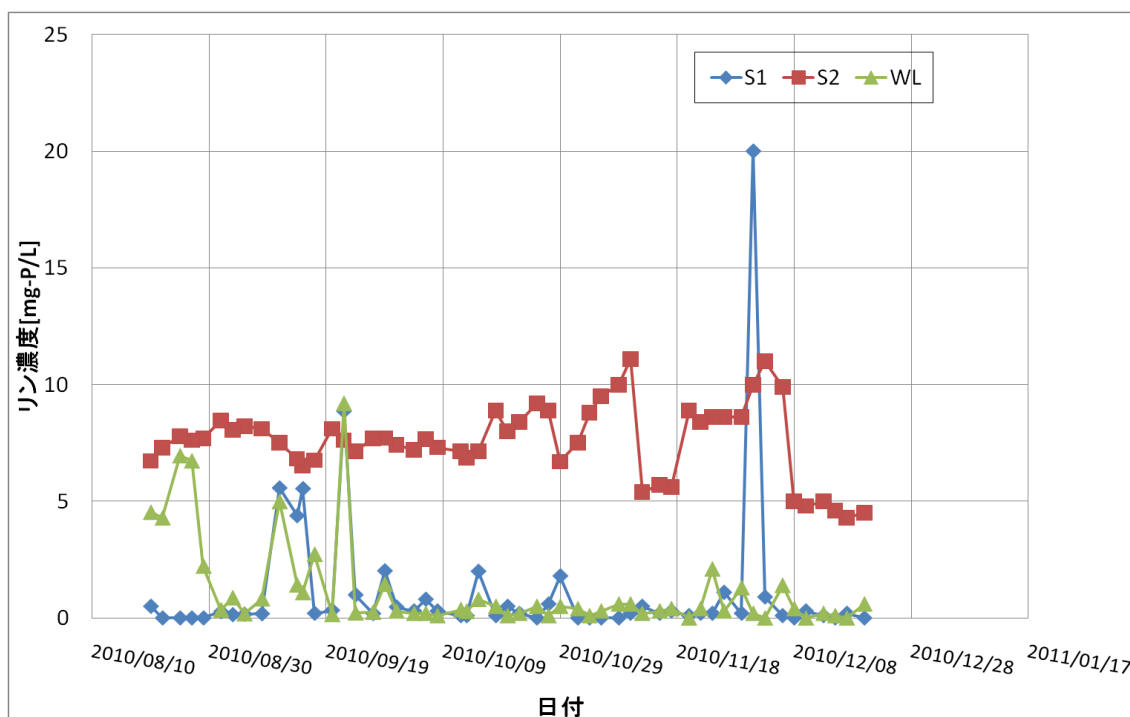


図 5.1.10 S1,S2,WL リアクターの好気工程終了時のリン濃度の結果

図 5.1.10 より、S1 は初期の EBPR は良好であるが、途中悪化したが後に良好な状態に戻ったと考えられる。また、S2 は運転期間中、安定して EBPR が良好ではなかった。WL は初期では EBPR が良好ではなかったが、9 月以降 EBPR が良好になっていった。

5.2 質量電荷比の範囲

3.2 で前述したマトリックス由来のピークが検出されてしまうので、質量電荷比の範囲を調節することによってマトリックス由来のピークを低減させることを試みた。

本研究は、マトリックスは合成物、糖、ペプチドなどの分析に適している DHB を用いることとした。DHB 由来のピークは、質量電荷比が 155,154,137,273 であるとされている。そこで、同じスポットに対して、スペクトルの質量電荷比(x 軸の範囲)だけを変化させてスペクトル図を取った。マトリックスを溶解させた溶液は 50%エタノールとし、マトリックス溶液は 10mg/L に調整した。本節では、サンプルは使用せず、マトリックスだけ 0.5 μ L をプレートにアプライさせた。実験・解析条件は 4.5 と 4.6 に前述したように行った。

結果は以下の図 5.2、および、その一部を拡大したものを図 5.3 にまとめた。X 軸の質量電荷比の範囲を上から順に、100-1400、300-1400、580-1400、620-1400 とした。図 5.2 より、低質領域からスペクトルをとった場合、マトリックス由来のピークが強く出過ぎてしまい、試料成分のスペクトルを検出しにくいと感じられた。そこで、本研究では質量数 580-1400 の範囲でスペクトルを採取することとした。

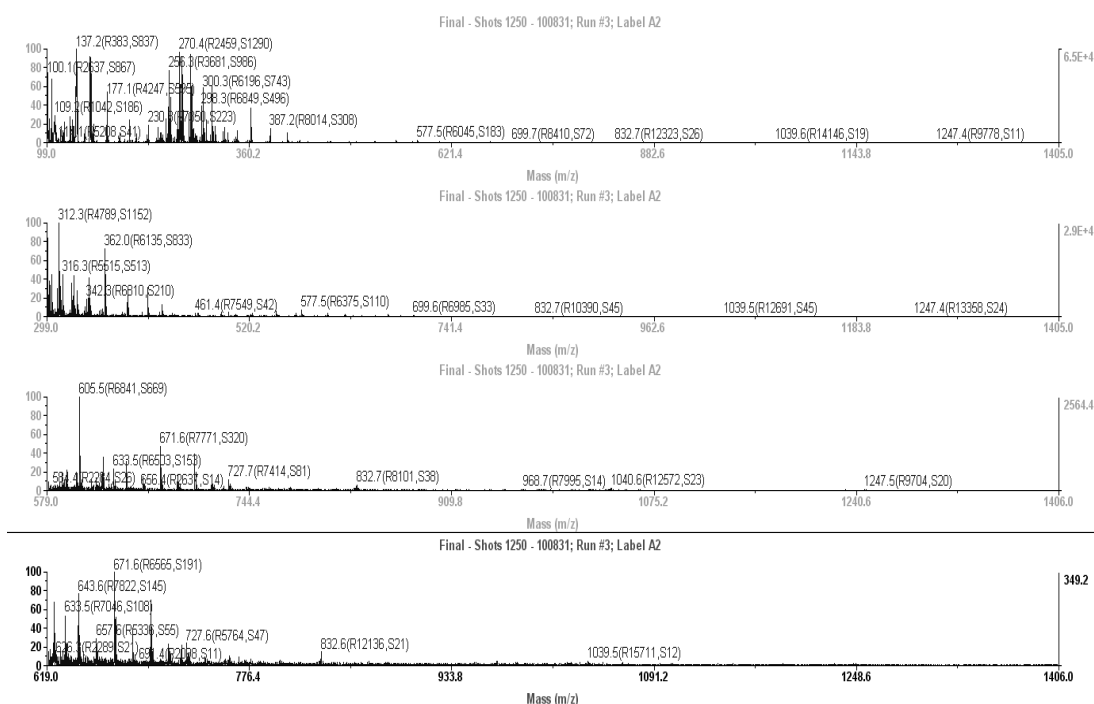


図 5.2 質量電荷比(x 軸)の範囲を変化させたマトリックスのスペクトル図

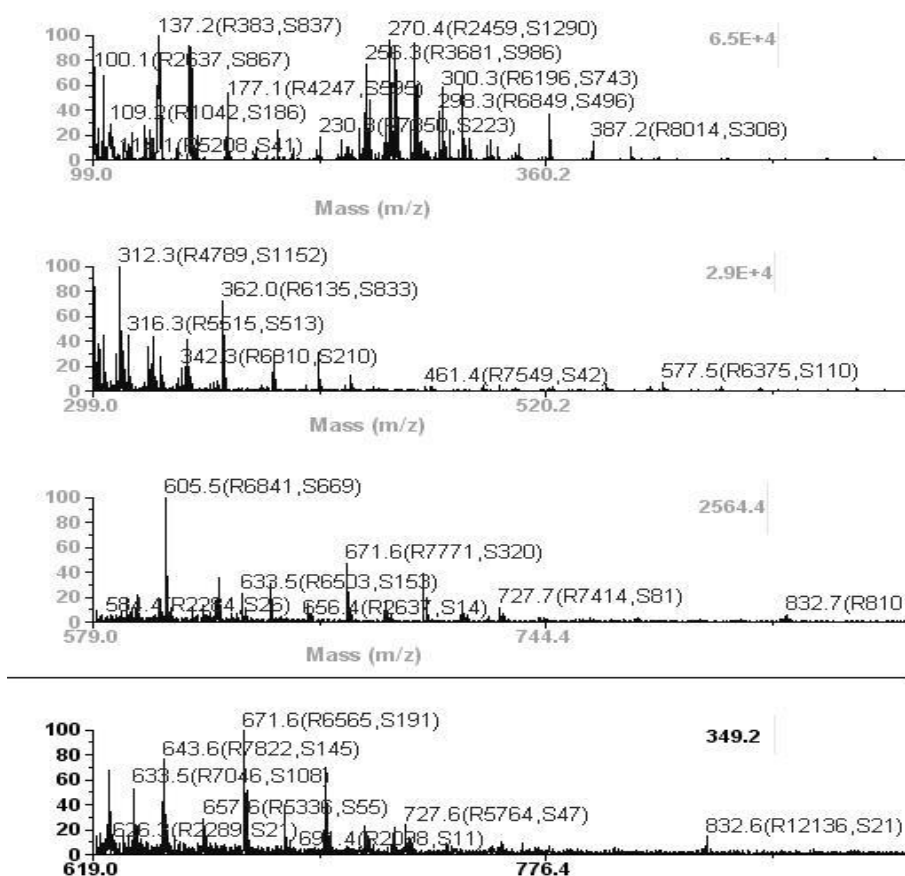


図 5.3 低質量電荷比に注目したマトリックスのスペクトル図

5.3 サンプルとマトリックスの混合比

本節では、3.2.1 で前述したサンプルとマトリックスの混合比率が本研究にどの程度影響を与えるのか調べることを目的とした。その理由として、サンプルとマトリックスの混合比率が変化することによって、ピークの相対強度が変化してしまうことは3.2.1 に前述したとおりである。しかし、各サンプル間で混合比率を統一することによって、マトリックスや溶解液由来のピークを各サンプル間で平準化させることができ、微生物群集構造の変化を検出にはさほど影響を及ぼさなくすることができるのではないかと考えたからである。

サンプルは、2010年9月11日のS1,S2,WLの嫌気工程終了後の3種類の汚泥を用いた。マトリックスは5.1と同様に10mg/LのDHB溶液を用い、溶解溶液は50%エタノールを用いた。

汚泥のサンプル調製は、1mLの汚泥を各リアクターから採取し、遠心分離に供した。遠心分離後のサンプルの上澄み液を捨て、99.5%エタノールを100 μ L添加し、良く混合させた。混合後に再び遠心分離に供し、この上澄み溶液をサンプル原液とした。

サンプル原液とマトリックスの混合比率は、合計で8 μ Lになるように以下の表5.1のように調製した。以下の表5.1のように調製したサンプルを0.5 μ Lをプレートにアプライした。実験・解析条件は前述した4.5と4.6のように行った。

実験結果の一例としてS1-1、S1-2、S1-3の3つを比較したスペクトル図を5.4に、すべての結果を主成分分析でまとめたものを図5.5に示した。また、各サンプルは再現性確認のため2個ずつプレートにアプライして実験を行った。

表 5.1 サンプルとマトリックスの混合比率の値

番号	サンプル	サンプル：マトリックスの比
Control-1	エタノールのみ	1:3
Control-2		1:1
S1-1	S1	1:3
S1-2		1:1
S1-3		3:1
S2-1	S2	1:3
S2-2		1:1
S2-3		3:1
WL-1	WL	1:3
WL-2		1:1
WL-3		3:1

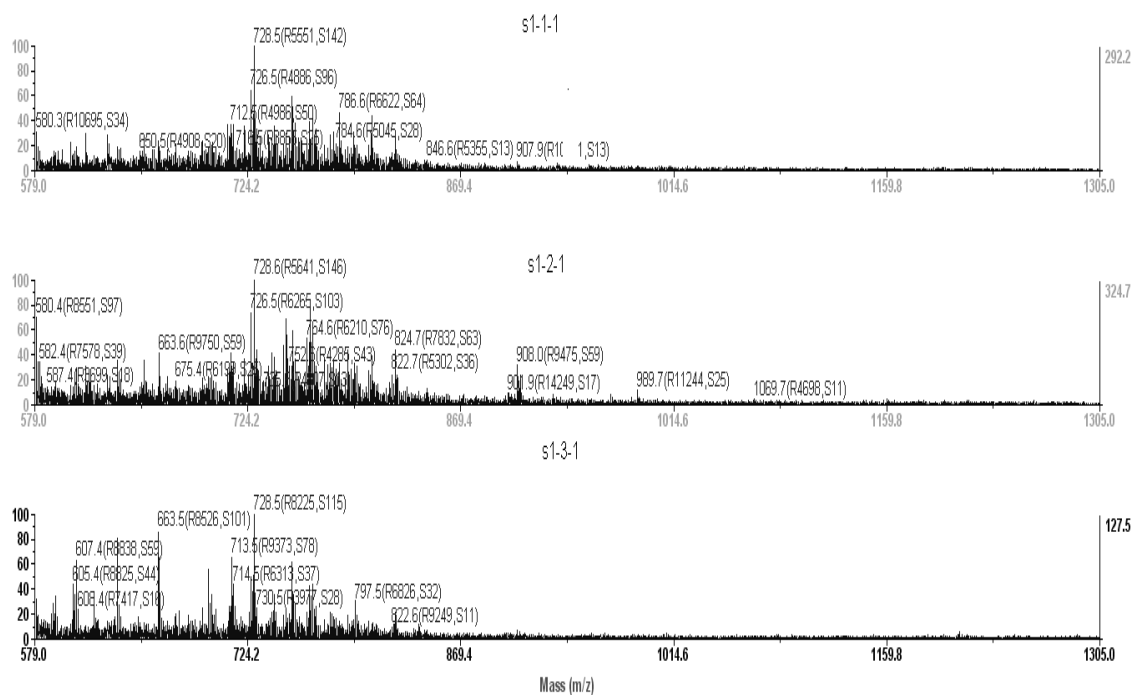


図 5.4 サンプルとマトリックスの混合比率のスペクトルの結果一例(S1 汚泥)

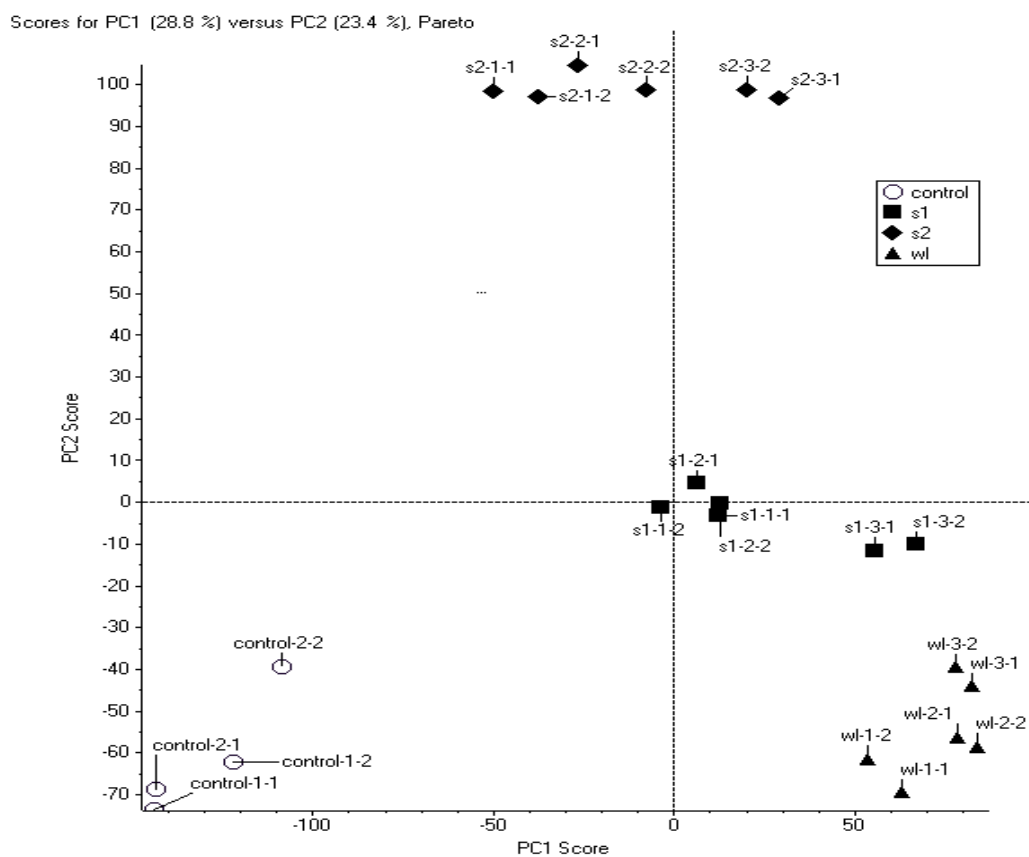


図 5.5 サンプルとマトリックスの混合比率の主成分分析の結果

図 5.4 より、サンプルとマトリックスの混合比率を変化させることによって、スペクトル図の形がそれぞれ異なっていることがわかる。しかし、図 5.5 を見ると S1 シリーズ間での結果には大きな相違はなく、各サンプル同士で固まっていることが分かる。他の汚泥にも同様のことが言え、各スポットが近い位置で固まっていることが分かる。

以上のことから、サンプルとマトリックスの混合比率を変えることによって、スペクトル図の結果にある程度の相違は見られるが、主成分分析によると他サンプルとの相違が大きいため、サンプルとマトリックスの混合比率は本研究ではあまり影響を及ぼさないことが分かった。

以上のことから本研究では、次項以降ではサンプルとマトリックスの混合比率は 1:1 で行うこととした。

5.4 微生物群集構造の比較

5.1 と 5.2 で、MALDI-TOFMS を用いる際に注意しなければいけないマトリックス由来のバックグラウンドやサンプルの混合比率の検討を行った。本節では、本手法を用いることによって、異なる微生物群集構造をきちんと検出できるのかどうかを確認することを目的としている。

5.2 と同様な方法で実験を行い、2010 年 9 月 30 日に各 S1,S2,WL リアクターから汚泥を 1mL 採取した。採取した汚泥を遠心分離に供し、上澄み液を捨てた。99.5%エタノールを 100 μ L 添加し、良く混合させた。その後、再び遠心分離に供し、上澄み液をサンプル原液とした。マトリックス溶液は、50%エタノールで溶解した 10mg/L の DHB を使用した。サンプル原液とマトリックスを 1:1 で混合させ、0.5 μ L をアプライし MALDI-TOFMS に供した。

また、本節では MALDI-TOFMS に供したのと同じ活性汚泥を用いて、分子生物学的手法による微生物群集構造も調べた。実験は、4.4 に前述したとおりに行った。

分子生物学的手法による実験結果を図 5.6 に MALDI-TOFMS による実験結果のスペクトル図の一例を、図 5.7.1 に MALDI-TOFMS の結果を主成分分析にまとめたものを図 5.7.2 に、各質量電荷比と主成分の関係をまとめたものを 5.7.3 に示した。また、MALDI-TOFMS の実験は、再現性確認のため各サンプル 3 回スポットずつアプライし実験を行った。なお、図 5.7.2 の凡例で control と記述してあるものはエタノールとマトリックスを混合させただけのサンプルであり、S1,S2,WL は各汚泥サンプル調製したものとマトリックスを混合させたサンプルである。

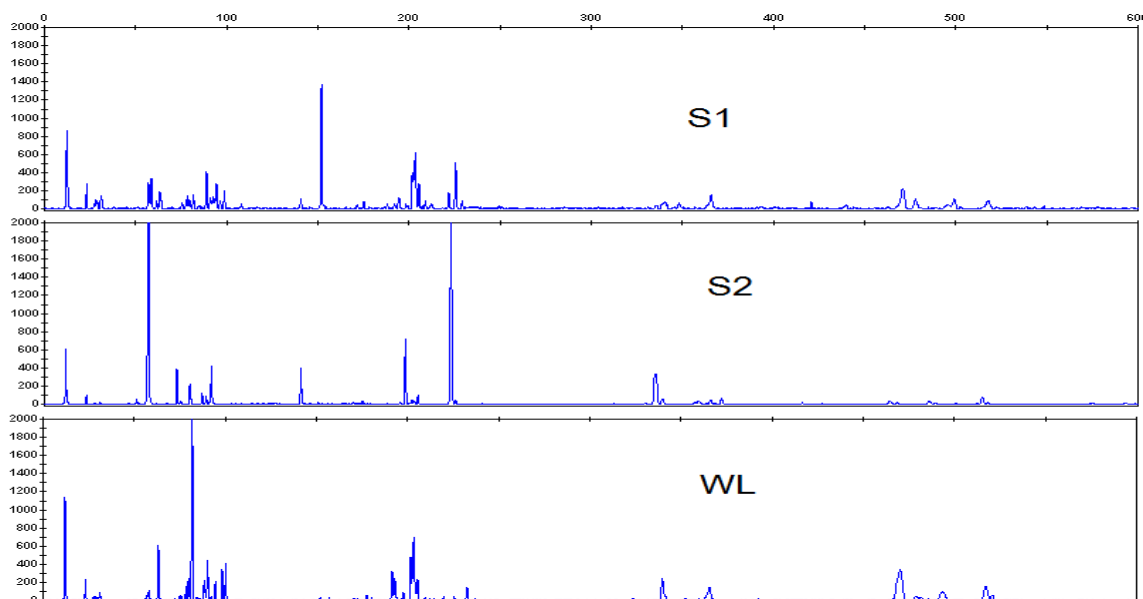


図 5.6 微生物群集構造の比較実験の T-RFLP 結果

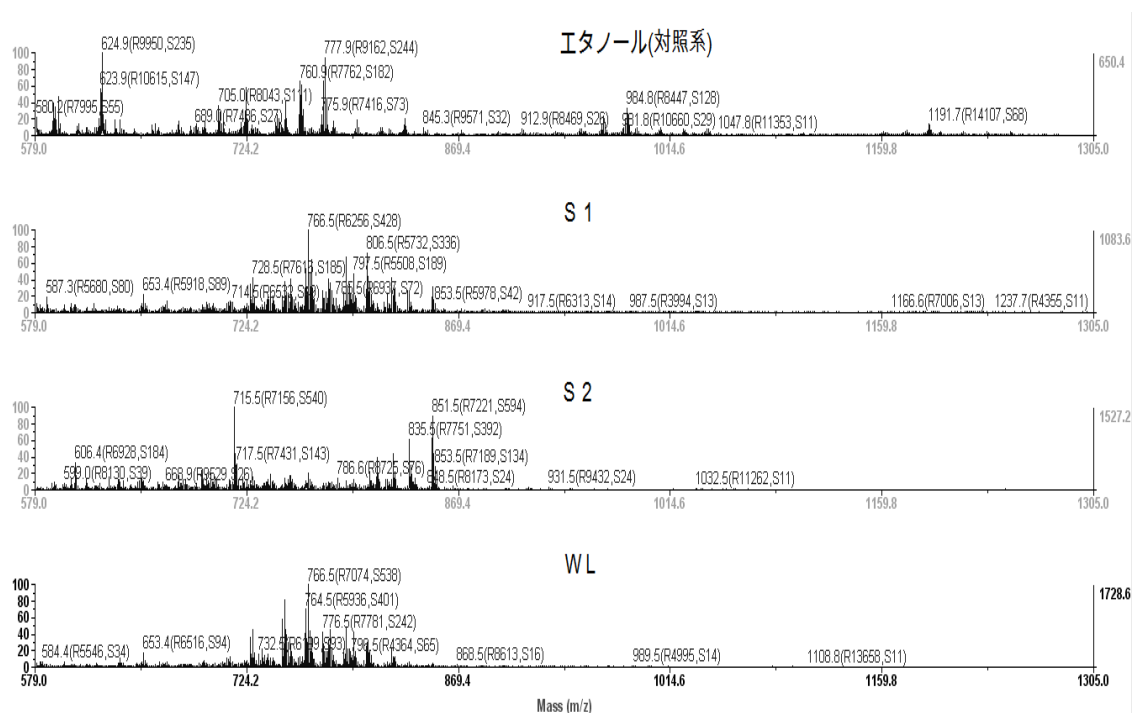


図 5.7.1 微生物群集構造の比較実験のスペクトル結果

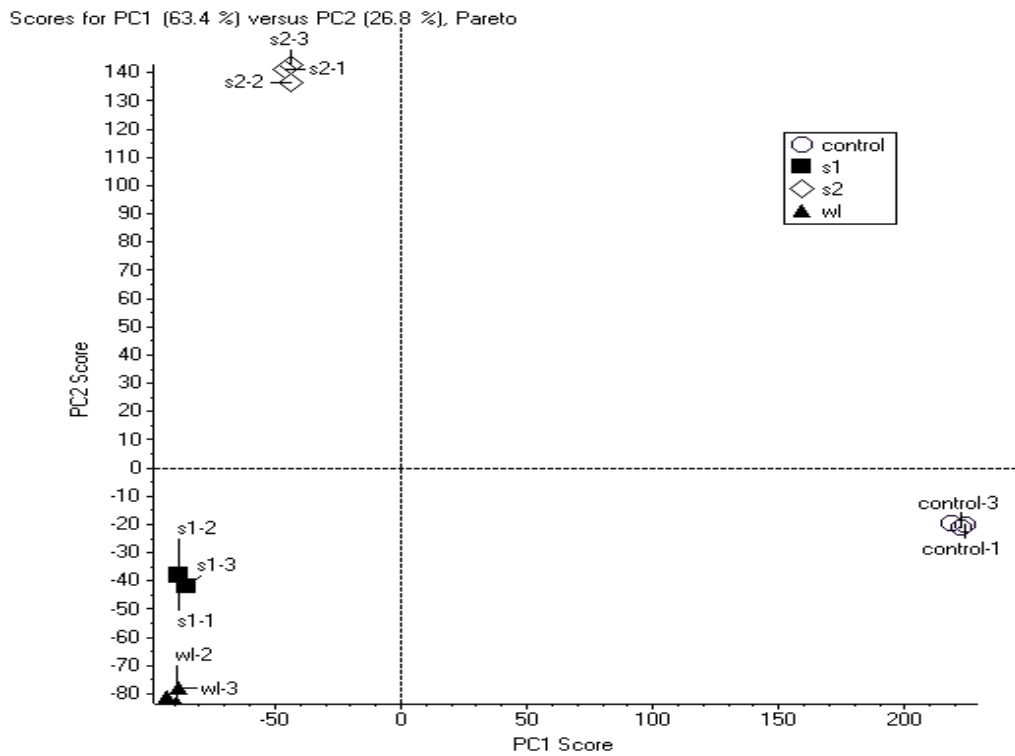


図 5.7.2 微生物群集構造比較実験の MALDI-TOFMS の主成分分析の結果

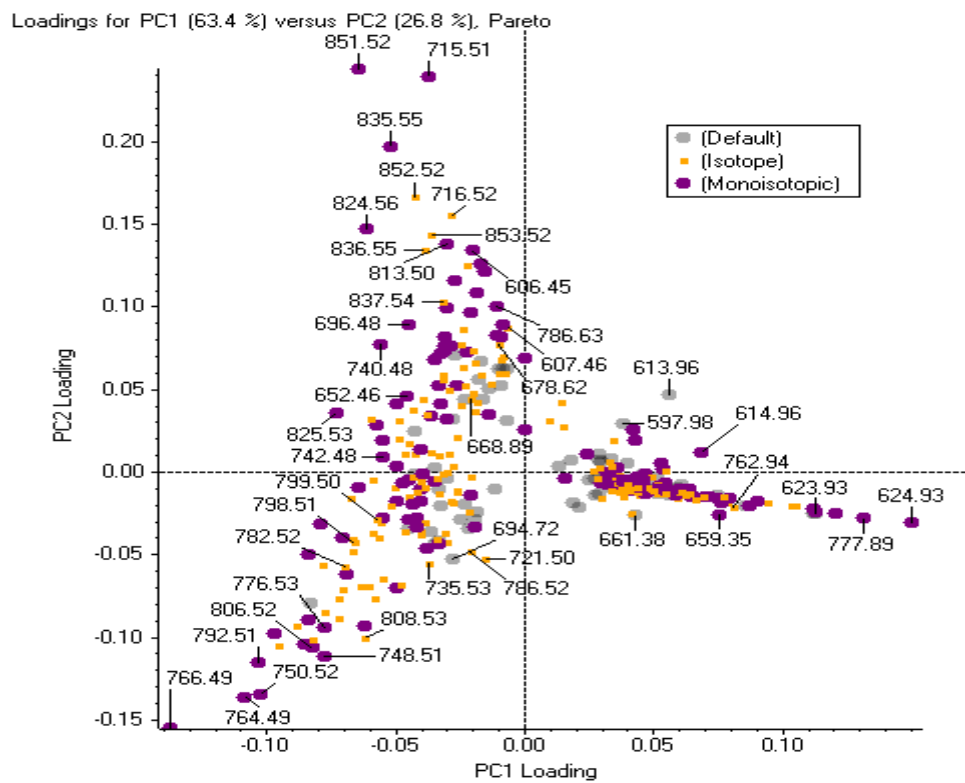


図 5.7.3 微生物群集構造比較実験の各質量電荷比と主成分の関係

図 5.6 より、各汚泥の微生物群集構造が T-RFLP の結果では明らかに異なっていることがわかる。しかし、図 5.7.1 によると、S1 と WL 汚泥のスペクトルの結果は非常に似ていることが分かる。そして、図 5.7.2 の主成分分析の結果では、S1 と WL は似通っている所にデータがあるが、区別が出来る程度離れている。

また、実験 5.2 と 5.3 は MALDI-TOFMS に関してはほとんど同様な方法で実験を行った。異なる点は採取した汚泥の日付が異なることである。しかし、両実験の主成分分析の結果である図 5.5 と 5.7.2 を比較すると、各スポットの位置が異なることがわかる。9 月 11 日と 9 月 30 日の汚泥の相違としては、S2 の汚泥は安定してリン除去が良好ではない。9 月 11 日は S1 と WL は突如リン除去が悪化し、その後 9 月 30 日には両リアクターはリン除去能が良好になっている。このことから、日々のリアクター内で変化が起こっていることが考えられ、その影響が反映したのかも知れない。または、この両実験ではマトリックス溶液の組成は同じではあるが、完璧に一緒ではない。10mg/L という非常に低濃度で調製しているため、調製時の少しのずれが結果に反映してしまったのかもしれない。

以上のことから、サンプルを比較する際は、同日に調製したマトリックス溶液を使用することとし、異なるマトリックス溶液で実験を行ったサンプルとの比較は困難であると考えられる。

5.5 微生物群集構造の経時変化の比較

本節では 5.4 の実験を踏まえ、リアクター内の日々の変化が本手法はどの程度影響を受けるのかを調べることを目的とした。さらに、突如リン除去能が悪化している時期に注目することによって、MALDI-TOFMS の結果と T-RFLP の結果でどのようなものが得られるのかにも注目した。

対象とするサンプルは S1 と S2 の 2 種類にした。理由としては、S2 は比較的に安定してリン除去能が良好ではないが、S1 は突如リン除去能が悪化するなどして変化が大きいためこの 2 つの汚泥を選定した。採取汚泥の日付は 2010 年の 4 月から 6 月までの約 2 カ月の嫌気工程終了時の汚泥を使用した。サンプリングの時に -20℃ に冷凍保存していた汚泥を自然解凍させ、そこから 1mL の汚泥をそれぞれ採取した。その汚泥を遠心分離に供し、上澄み液を捨てた。その後 100μL の 99.5% エタノールを添加し、良く混合させた。その後再び遠心分離に供し、その上澄み液をサンプル原液として使用した。マトリックス溶液は、50% エタノール溶液に 10mg/L の DHB になるように調製した。サンプル原液とマトリックス溶液は 1:1 で混合させ、MALDI-TOFMS に供した。また、4.4 で前述した分子生物学的手法も用いて、活性汚泥の経時変化における微生物群集構造の変化を確かめた。

この時期のリン濃度の推移を以下の図 5.8 にまとめた。また、MALDI-TOFMS の結果を図 5.9 と 5.10 にまとめた。MALDI-TOFMS の結果を主成分分析の結果を図 5.11 と 5.12 にまとめた。また、各サンプルは再現性確認のために 2 個ずつアプライし、実験を行った。

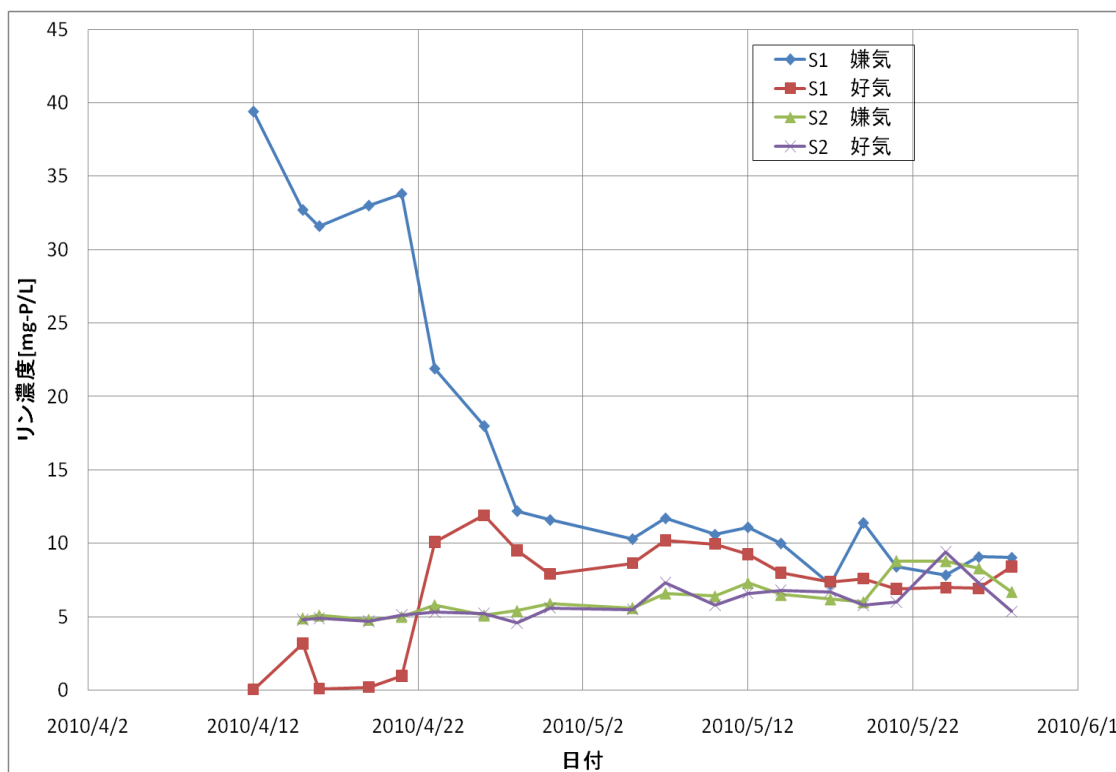


図 5.8 2010 年 4 月から 6 月における S1 と S2 のリン濃度の推移

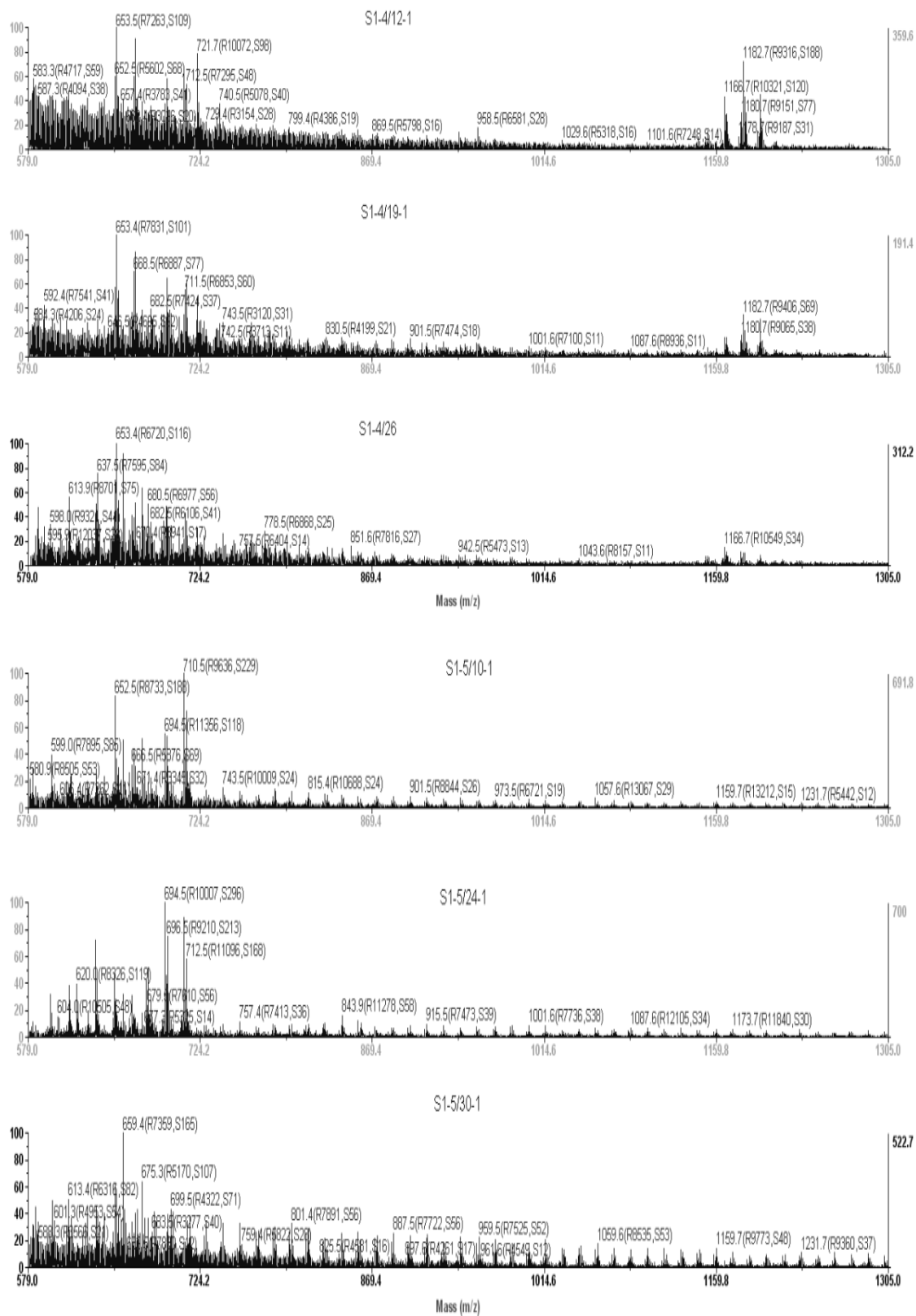


図 5.9 S1 における経時変化のスペクトル図の一例

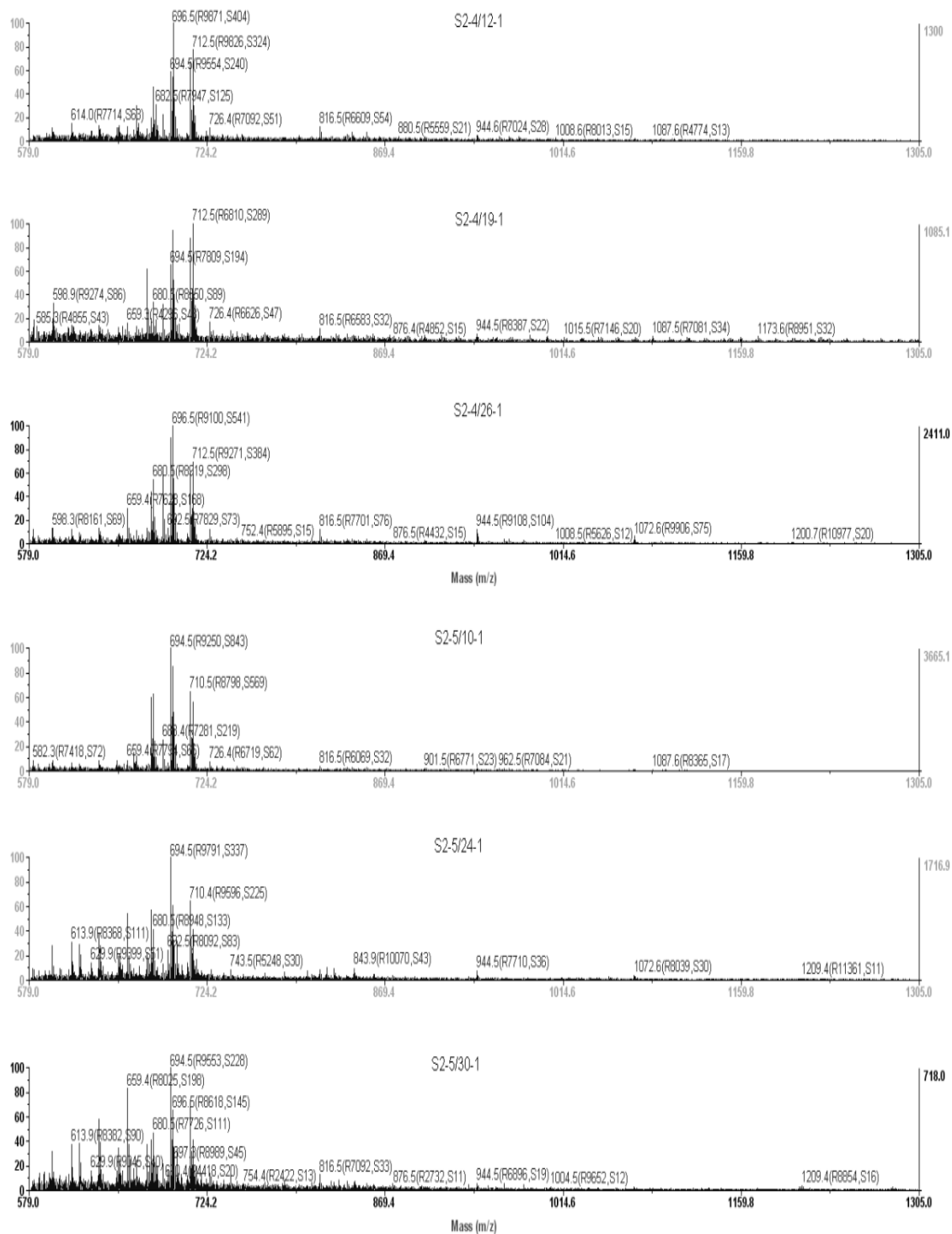


図 5.10 S2 における経時変化のスペクトル図の一例

なお、各プロットについている数字は汚泥採取の日付と対応させた。

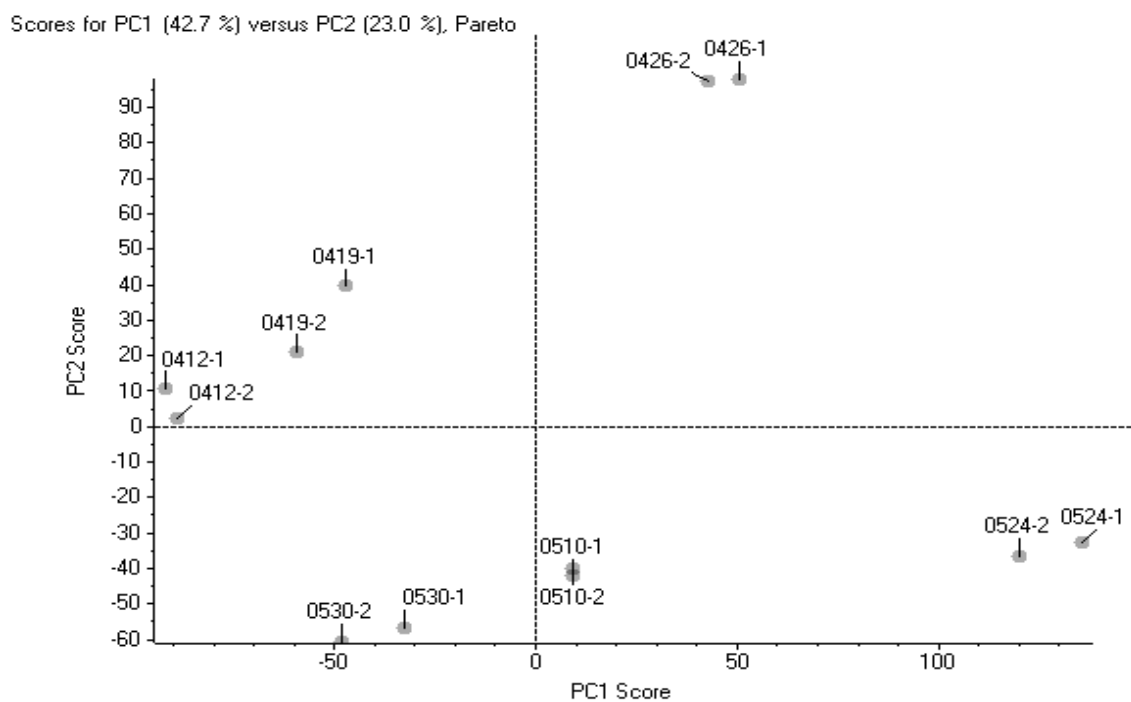


図 5.11 S1 汚泥における経時変化 MALDI-TOFMS の主成分分析結果

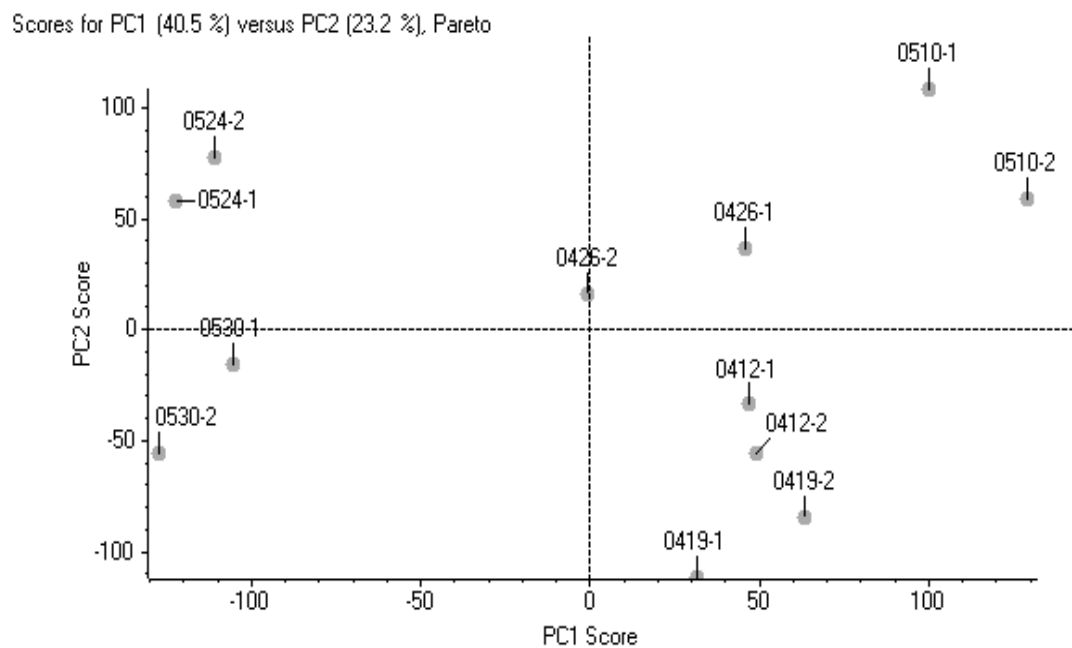


図 5.12 S2 汚泥における経時変化 MALDI-TOFMS の主成分分析結果

図 5.8 より、この期間中の S1 リン濃度は 4/21 を境にリン除去能が急激に悪化していることがわかる。このことから、4/21 の前後のサンプルを比較することによって、微生物相互作用物質の手がかりになる結果が得られる可能性がある。

図 5.9 より、MALDI-TOFMS のスペクトル図だけでは 4/21 前後の顕著な相違を見つけることが出来なかった。そこで図 5.11 の主成分分析の結果を見ると、4/26 のサンプルが他のスポットと比べると大きく離れていることが分かる。そして、5 月以降のサンプルは図の下側に集中している。

一方、S2 汚泥はこの期間は安定してリン除去能が良好ではないことが図 5.8 からわかる。さらに 5/20 以降にほんの少しリン除去能が悪化していることがわかる。この結果を踏まえて図 5.10 の MALDI-TOFMS の結果を見てみると、S1 と同様にスペクトルの結果だけでは、各サンプル間の相違があるかどうかの判断は困難である。そこで、図 5.12 の主成分分析の結果を見ると、S1 と同様に各サンプル間でのデータにばらつきあり、特に 5 月後半のサンプルが他のサンプルと大きく異なっていることがわかる。

S1 はリン除去能の顕著な変化があり、S2 は大きな変化はない。しかし、図 5.11 と 5.12 の結果では、S1、S2 共に各サンプル間には違いがあるように思われる。主成分分析は、対象とするサンプル間で分析を行うため、サンプル間の中で大きな変化を見つけて主成分としているため、全体で小さな変化だとしても大きくスポットが離れてしまうことがある。

そこで、S1 と S2 の両方のサンプル同じを主成分分析にかけてみることにした。その結果を図 5.13.1 にまとめ、S1 と S2 サンプルの各質量電荷比と主成分との関係をまとめた図を図 5.13.2 にまとめた。

Scores for PC1 (37.6 %) versus PC2 (18.3 %), Pareto

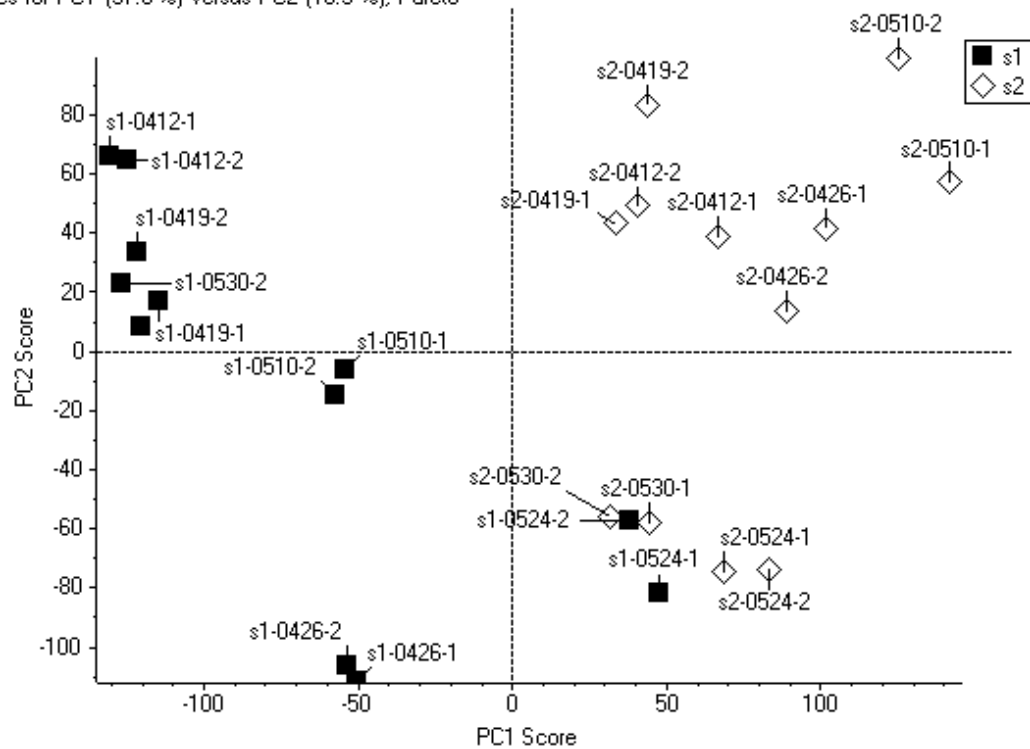


図 5.13.1 S1 汚泥と S2 汚泥の MALDI-TOFMS の主成分分析の比較結果

Loadings for PC1 (37.6 %) versus PC2 (18.3 %), Pareto

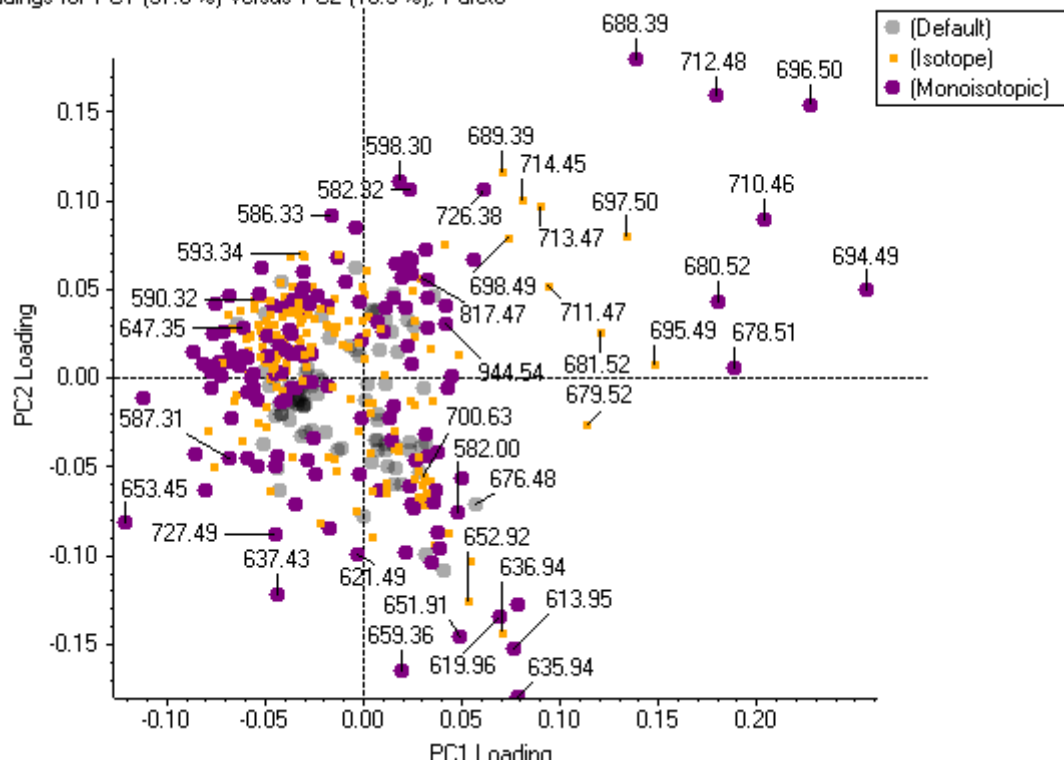


図 5.13.2 S1 汚泥と S2 汚泥の各質量電荷比と主成分の関係

図 5.13.1 より、S1 においては、リン濃度に大きな変化があった 4/26 と 5/24 のサンプルが他の S1 サンプルとは大きく異なっており、図 5.11 と同様な結果が得られている。一方 S2 においては、リン除去能が少しだけ悪化した 5/24 と 5/30 が他の S2 のサンプルと異なっていることが分かる。図 5.12 と比較すると、図 5.12 では全体にスポットが分散しているのに対し、図 5.13.1 では右側半分に集中しており、S1 の変化よりも S2 の変化が小さいことがわかる。

以上のことから、主成分分析を行う際にも各サンプル間の変化の大きさを調べたい場合は同時に主成分分析を行うことによって、調べることができる可能性が示唆される。

また、S1 におけるリン除去が急激に悪くなった 4/21 以降のサンプルの 4/26 の S1 汚泥に注目し、637.43 の質量電荷比の各サンプルの検出強度を比較し、以下の図 5.14 にまとめた。

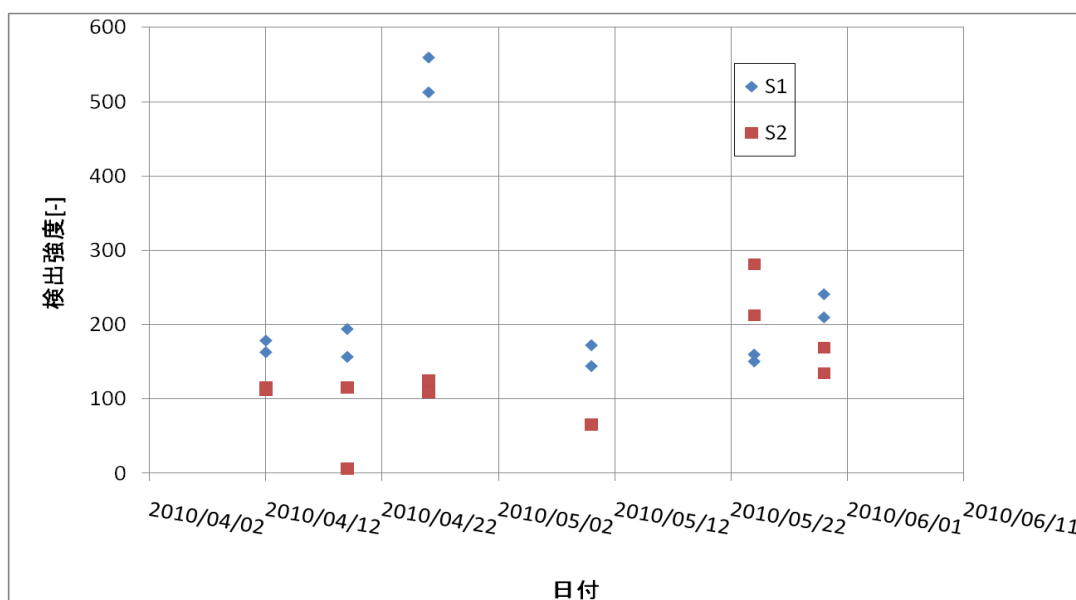


図 5.14 質量電荷比 637.43 における各サンプルの検出強度の関係

図 5.14 より、S1 において急激にリン除去能が悪化した 4/26 のサンプルが非常に高い検出強度を示している。しかし、5/10 の S1 のサンプルでは、他のサンプルと同等程度しか検出されなかった。質量電荷比 637.43 が何なのかは定かではないが、リン除去能になんかしらの影響を与えている可能性は大いにありえる。

さらに、この両者の汚泥を分子生物学的手法による微生物群集構造の比較を行った。この結果を以下の図 5.15 と 5.16 にまとめた。

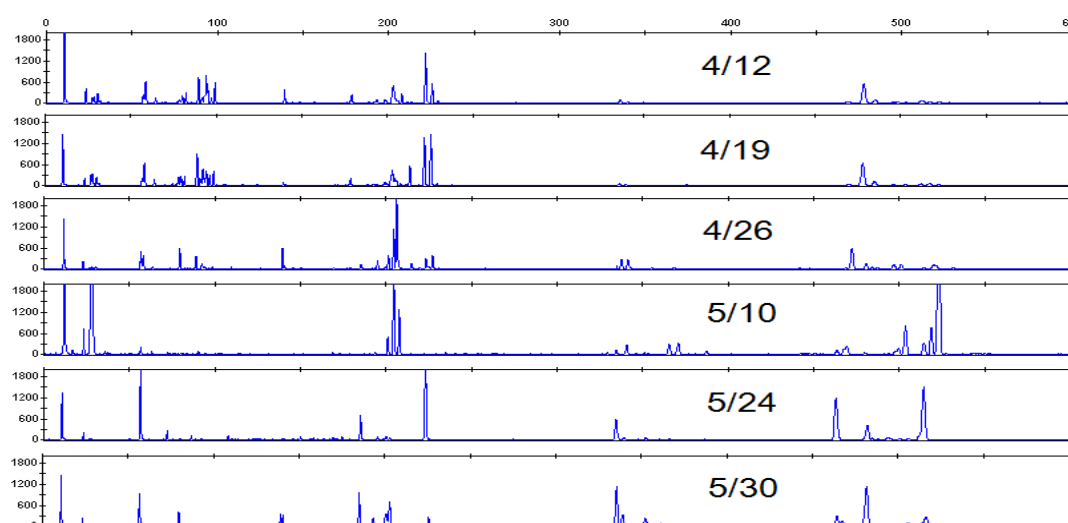


図 5.15 S1 における経時変化 T-RFLP の結果

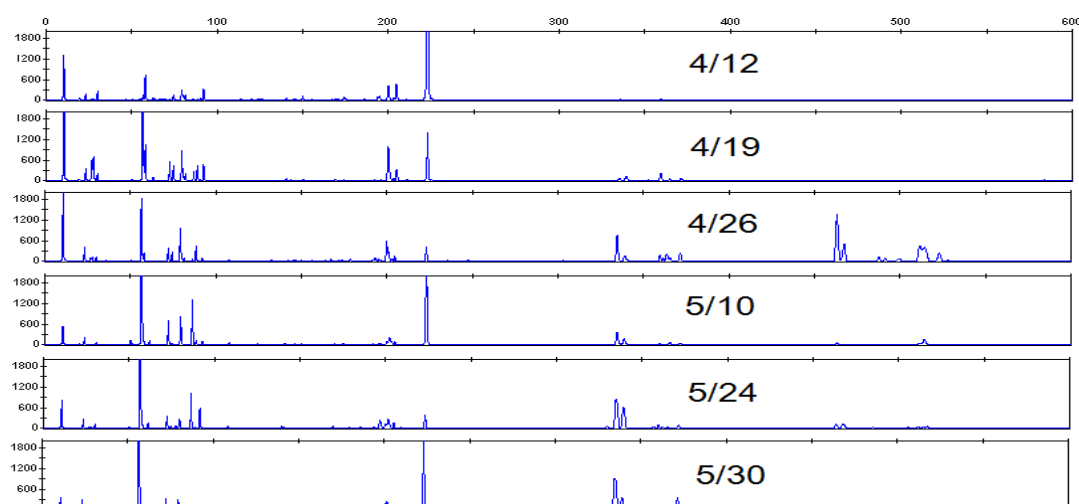


図 5.16 S2 における経時変化 T-RFLP の結果

図 5.15 より、S1 の汚泥は 5/10 以降に微生物群集構造が大きく変化していていることがわかる。また、200bp あたりでは、4/26 と 5/10 に急激に検出強度が上昇し、それ以降は減少していることがわかる。一方、図 5.16 では S1 ほど微生物群集構造に変化が表れなかった。しかし、ピークが出現・消失などをしており、ある程度の変化があったのかもしれない。

S2 汚泥においては、MALDI-TOFMS による分析では経時変化によるある程度の変化を検出したが、T-RFLP 法ではあまり変化を検出しなかった。T-RFLP 法では、異なる微生物であっても制限酵素によって、同じ長さで切断されてしまうと、ピークとしては一本として表れてしまう。本手法と T-RFLP 法による分析のどちらが正しいということは難しく、どちらの方法も微生物群集構造の変化を検出できると考えることが出来、どちらの方法も長所と短所があるということを認識し、実験を行っていく必要がある。

5.6 抽出物の比較

本研究では、活性汚泥から抽出した化学物質を新たな活性汚泥に添加し、その抽出した化学物質がどのように・どの程度微生物群集構造に影響を及ぼすのかを調べることを目的としている。そこで、本節では、各リアクターから採取した汚泥から、それぞれ固液抽出法によって化学物質を抽出する。それぞれの抽出物がどの程度異なるのかをMALDI-TOFMSによって調べることを目的としている。

化学物質の抽出は、4.2.1に前述した方法で行った。この抽出液と10mg/LのDHBマトリックス溶液を1:1で混合させてMALDI-TOFMSに供した。

MALDI-TOFMSに供したものを主成分分析で分析した結果を以下の図5.17.1に、各質量電荷比と主成分の関係を図5.17.2にまとめた。

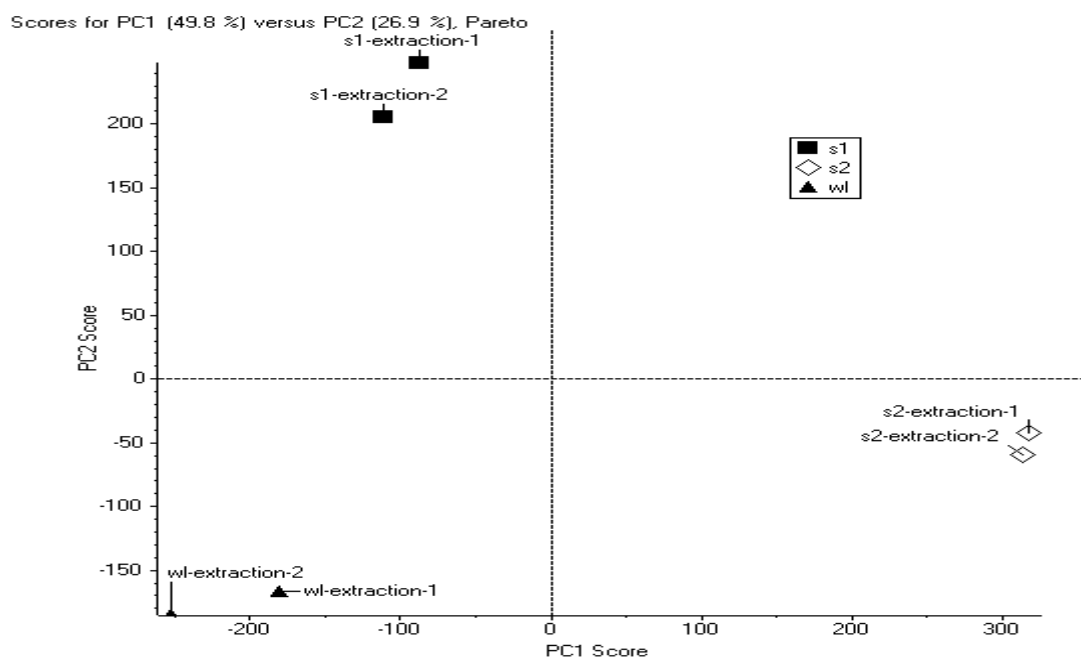


図 5.17.1 各汚泥からの抽出物比較 MALDI-TOFMS の結果

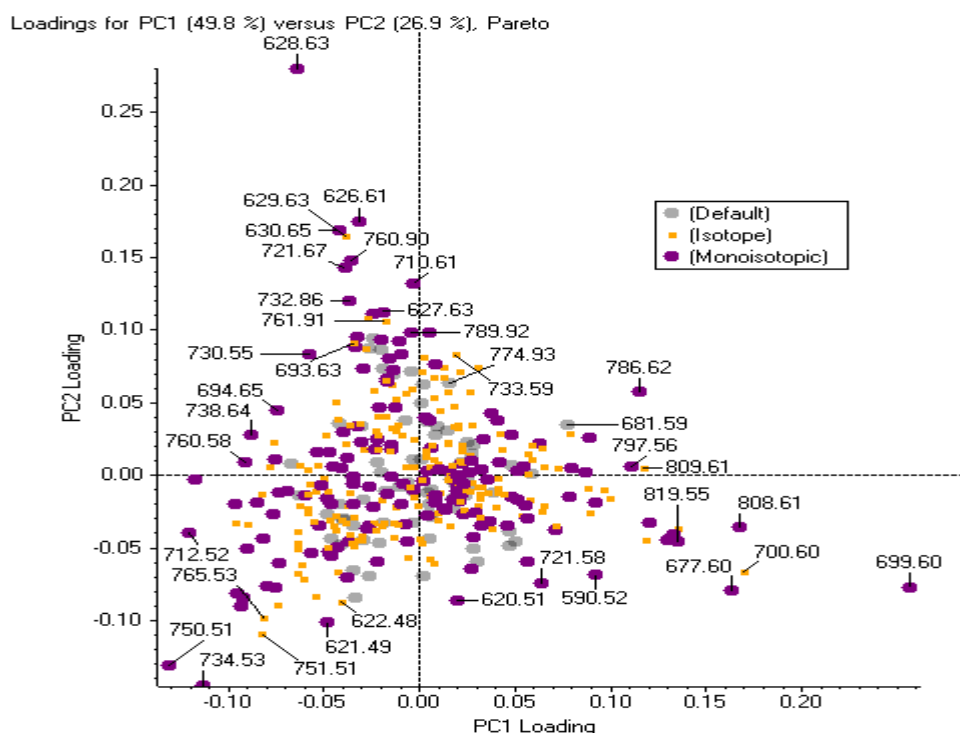


図 5.17.2 抽出物における各質量電荷比と主成分との関係

図 5.15 より、各汚泥からの抽出物はそれぞれ大きく異なることが分かる。また、本研究では微生物由来の化学物質をエタノールによる固液抽出法で抽出している。一方で、MALDI-TOFMS に供するために、リアクターから採取した汚泥にエタノールを添加・混合して、それをマトリックス溶液と混合させて MALDI-TOFMS に供している。つまり両方の実験ともに、エタノールを用いている。したがって、両方の実験共に、同じものを見ている可能性も否定はできない。両方の実験の相違は、汚泥を一旦凍結乾燥させているかどうかの違いである。汚泥の採取時期が異なるので一概には言えないが、図 5.7.3 と 5.16 の質量電荷比と主成分の関係の図によると、異なる質量電荷比の物質が主成分になっていることがわかる。したがって、汚泥から抽出物と MALDI-TOFMS に供するためのサンプル調製は異なる物質を見ていると考えることができる。

第 6 章 微生物相互作用物質による微生物群集構造への影響

5 章で MALDI-TOFMS で微生物相互作用物質を検出するために基礎的な検討を行ってきた。5 章の結果より、本手法を用いることによって異なる汚泥間での微生物群集構造の相違を検出することが出来、また、同じ汚泥での経時変化も検出することができた。

本章では、5 章の結果をふまえて、汚泥から抽出した化学物質を新たな汚泥に添加し、その化学物質による微生物群集構造の影響を検出することができるのかを調べることを目的としている。

6.1 抽出物添加・無添加による微生物群集構造の影響

本節では、4.2.1 で抽出した化学物質を新たな微生物に添加し、無添加系との MALDI-TOFMS の主成分分析の結果を比較することによって、抽出物による微生物群集構造に影響を調べる。

使用した培養用の汚泥は、2010 年 9 月 14 日の S1,S2,WL の 3 種類の嫌気工程終了時の汚泥を使用した。抽出物は 5.6 で使用したものと同一のものを使用した。

抽出物添加系では、それぞれの抽出液を 100 μ L ずつ各ウェルに分注した。自然乾燥をさせた後に同じ作業を 2 回繰り返し、合計で 300 μ L の抽出液が各ウェルに分注されている状態にした。このとき、対照系として、99.5%エタノールも同様に各ウェルに自然乾燥させた。

乾燥後に各リアクターから採取した汚泥を各ウェルに 150 μ L ずつ分注した。その後の培養に関しては 4.3 に前述したように行った。また、以下の表 6.1 に実験に用いた培養用汚泥と添加化学物質の一覧表をまとめた。なお、S1 抽出物と記述してあるものは、S1 汚泥から固液抽出法を用いて抽出したものである。

MALDI-TOFMS の主成分分析の結果を図 6.1,6.2,6.3 に、T-RFLP の結果を図 6.4,6.5,6.6 にまとめた。凡例の no は抽出物やエタノールを全く添加せず、汚泥のみ培養した系であり、control は培養用汚泥にエタノールを添加し培養した系である。

表 6.1 抽出物添加・無添加実験のサンプル調製の一覧表

サンプル番号	凡例の表示	培養用活性汚泥	添加化学物質	添加量
1	No	S1	なし	0
2	Control		エタノールのみ	300 μ L
3	S1		S1 抽出物	300 μ L
4	S2		S2 抽出物	300 μ L
5	WL		WL 抽出物	300 μ L
6	No	S2	なし	0
7	Control		エタノールのみ	300 μ L
8	S1		S1 抽出物	300 μ L
9	S2		S2 抽出物	300 μ L
10	WL		WL 抽出物	300 μ L
11	No	WL	なし	0
12	Control		エタノールのみ	300 μ L
13	S1		S1 抽出物	300 μ L
14	S2		S2 抽出物	300 μ L
15	WL		WL 抽出物	300 μ L

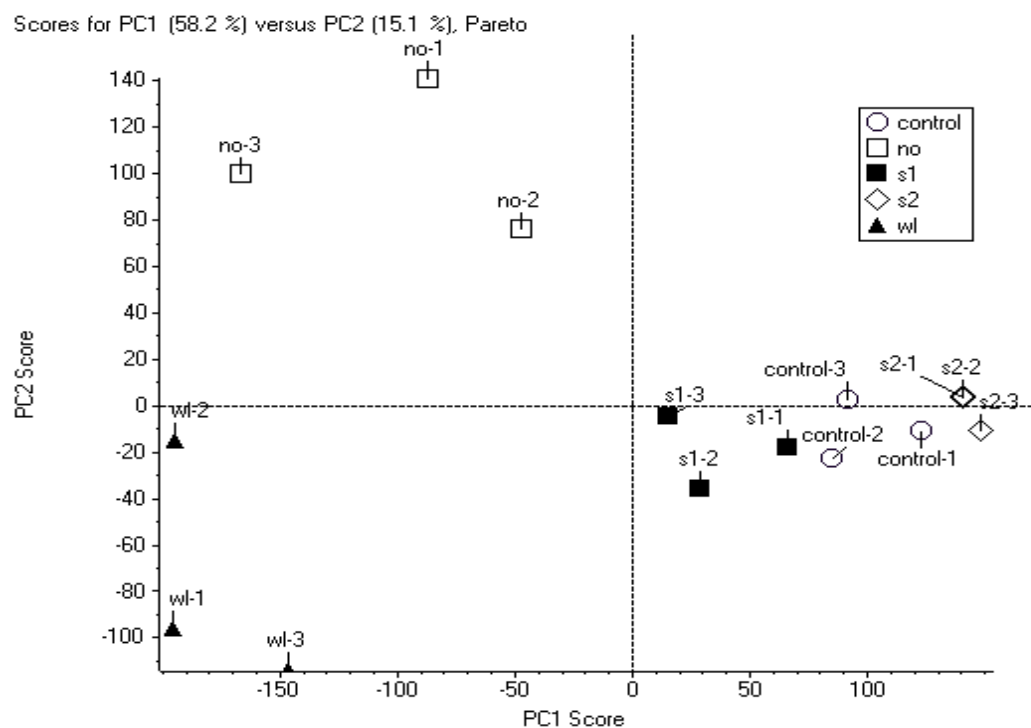


図 6.1 S1 汚泥における各抽出物添加・無添加系 MALDI-TOFMS の主成分分析の結果 (サンプル番号 1-5)

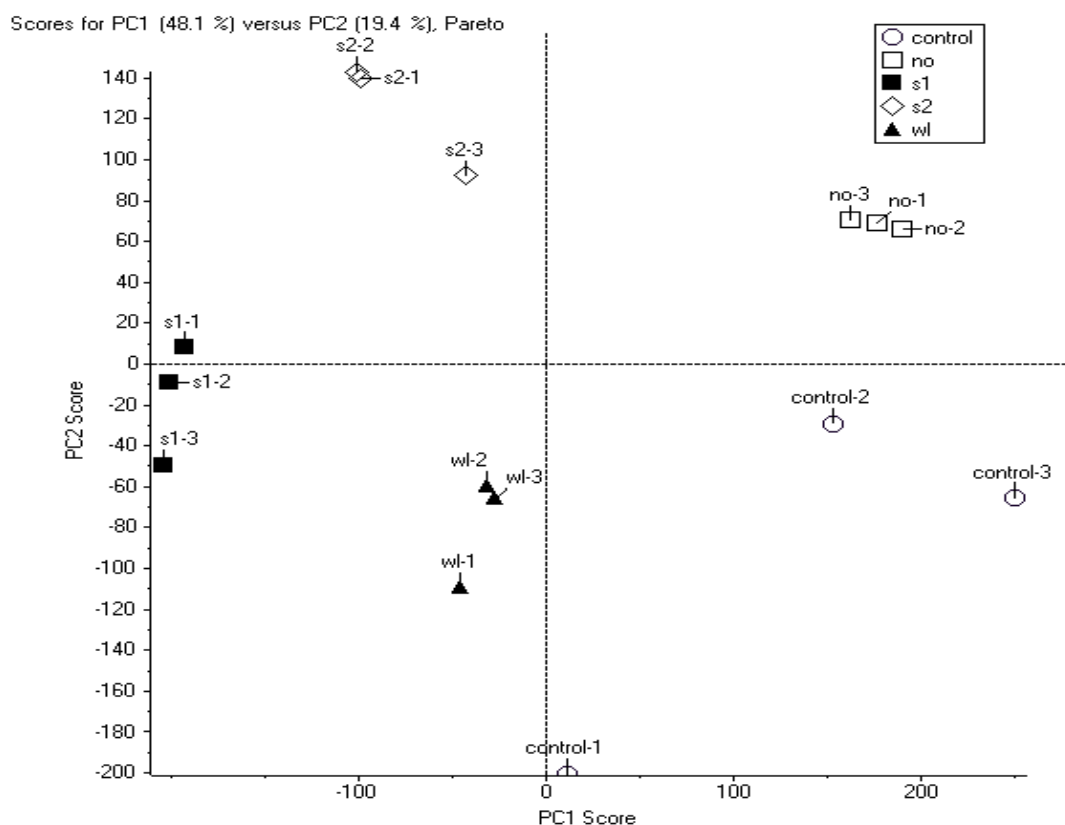


図 6.2 S2 汚泥における各抽出物添加・無添加系 MALDI-TOFMS の主成分分析の結果
(サンプル番号 6-10)

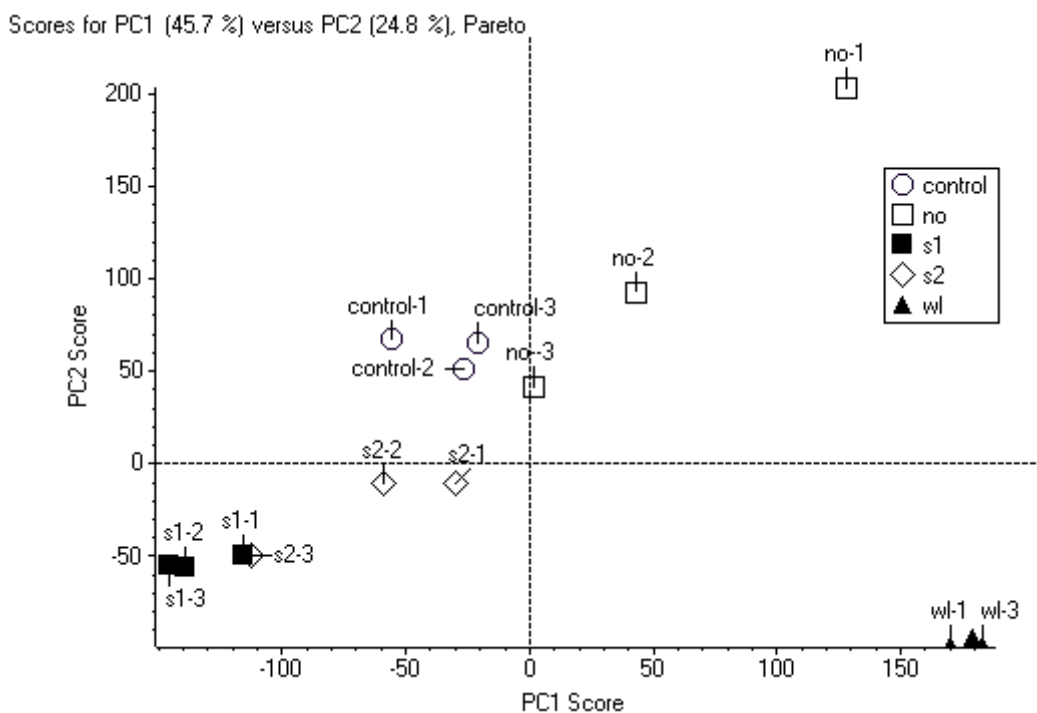


図 6.3 WL 汚泥における各抽出物添加・無添加系 MALDI-TOFMS の主成分分析の結果
(サンプル番号 11-15)

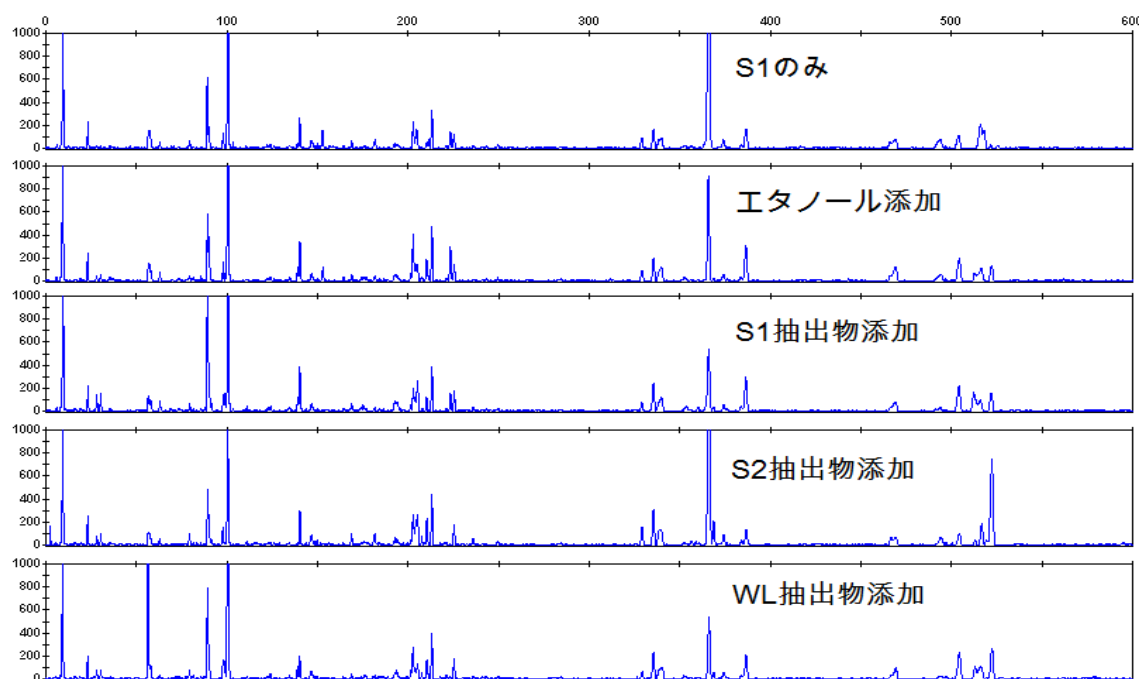


図 6.4 S1 汚泥における各抽出物添加・無添加系の T-RFLP の結果
(サンプル番号 1-5)

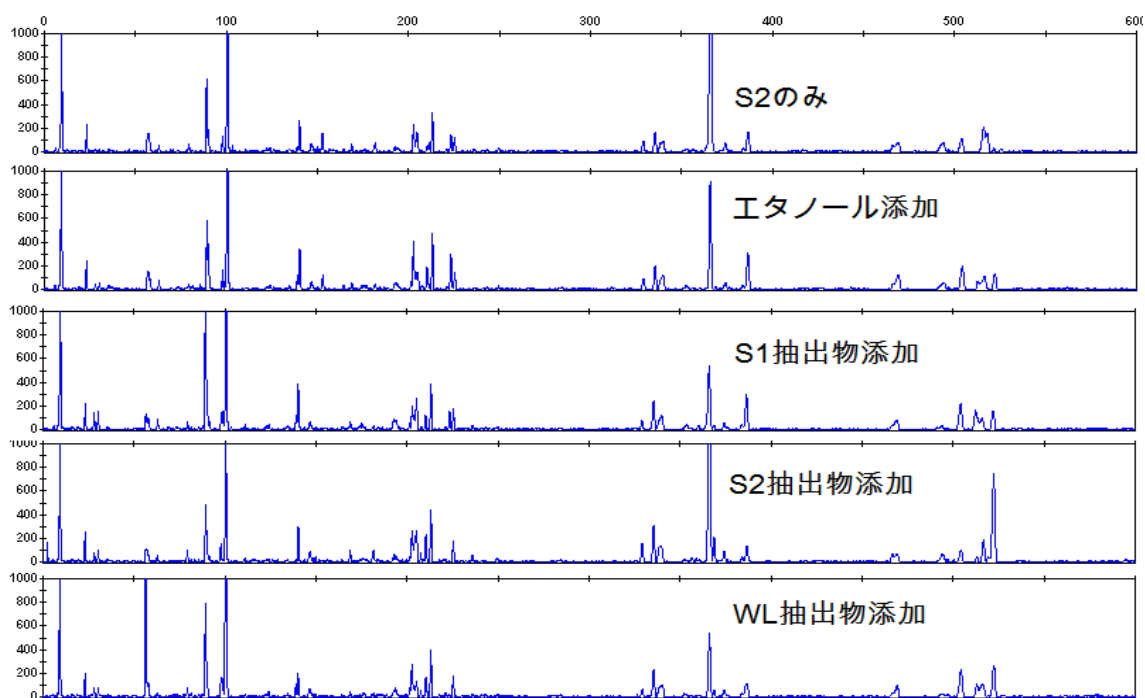


図 6.5 S2 汚泥における各抽出物添加・無添加系の T-RFLP の結果
(サンプル番号 6-10)

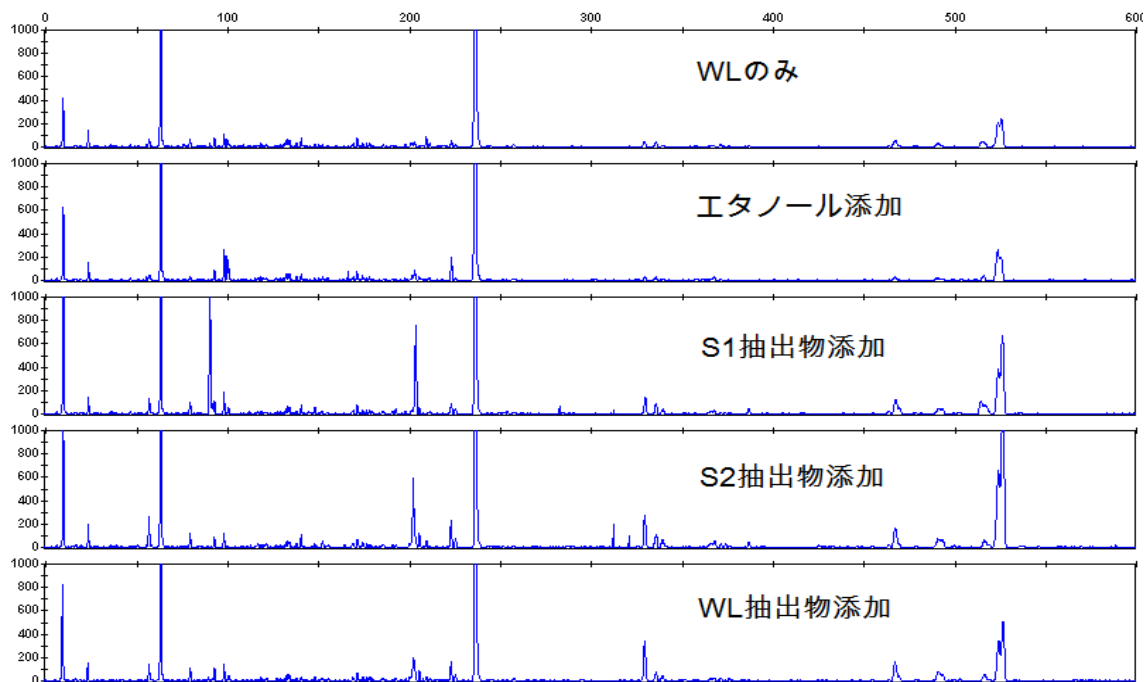


図 6.6 WL 汚泥における各抽出物添加・無添加系の T-RFLP の結果
(サンプル番号 11-15)

MALDI-TOFMS による主成分分析の結果を見ると、多少なりとも無添加系とエタノール添加系では、相違が出た。しかし、T-RFLP の結果をみると、無添加系とエタノール添加系では、大きな相違はないと考えられる。

前述の 5.4 の微生物群集構造の比較の実験では、T-RFLP は異なる汚泥の比較であったため、比較が容易であった。しかし、本節の実験は、同じ汚泥を用いており、化学物質の影響によって微生物群集構造がするという仮定をおいて実験を行っている。そして各抽出物の影響による相違が汚泥そのもの異なる 5.4 の実験結果よりも大きくならないと考えられる。以上のことから、抽出物が微生物群集構造に影響を及ぼしているか T-RFLP の結果を主成分分析による解析を行って、各 T-RFLP の図が統計的に相違があるかどうかを調べた。

T-RFLP の結果を主成分分析による解析を行った結果を以下の図 6.7,6.8,6.9 にそれぞれまとめた。

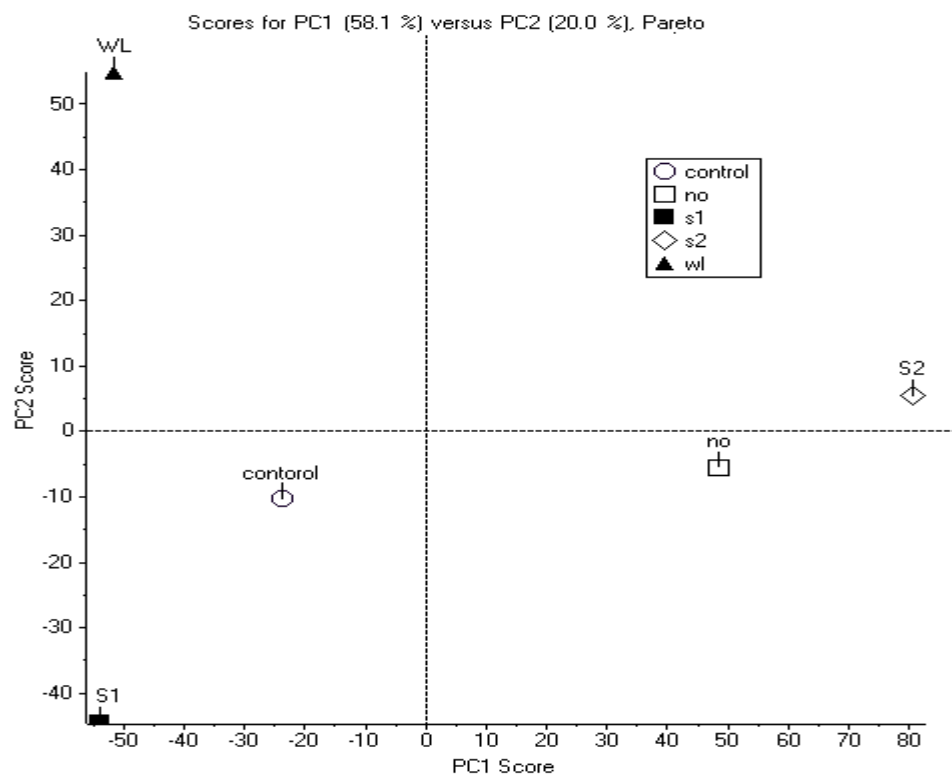


図 6.7 S1 汚泥における抽出物添加・無添加系の T-RFLP を主成分分析した結果

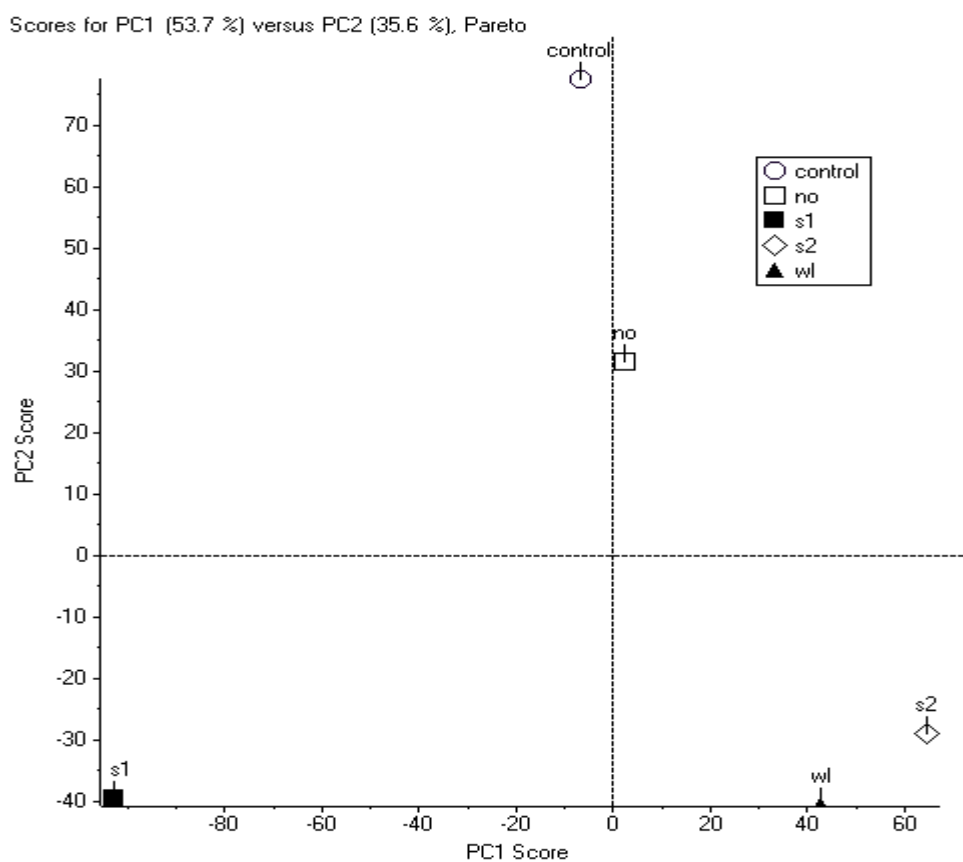


図 6.8 S2 汚泥における抽出物添加・無添加系の T-RFLP を主成分分析した結果

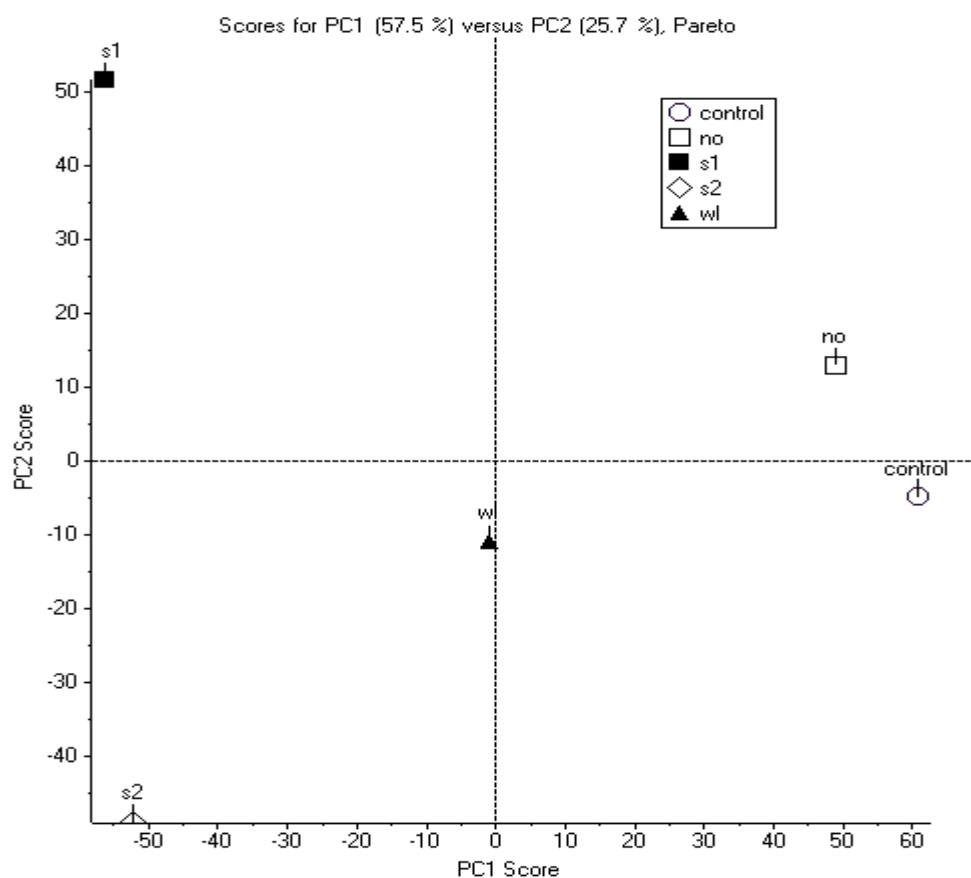


図 6.9 WL 汚泥における抽出物添加・無添加系の T-RFLP を主成分分析した結果

図 6.7, 6.8, 6.9 より、抽出物無添加系とエタノール添加系を比較すると、多少なりともエタノールによって微生物群集構造が変化してしまっていることがわかる。しかし、図 6.9 では、エタノールの影響よりも S1 や S2 活性汚泥から抽出した化学物質を添加することによって微生物群集構造が大きく変化していることが明らかにわかる。図 6.7 や 6.8 においてもエタノール添加系と抽出物添加系では微生物群集構造に及ぼす影響に差があるといえる。

また、MALDI-TOFMS と T-RFLP の両者の主成分分析の結果を比較すると、各サンプル間での相違が両者の主成分分析の結果に反映していると考えられる。

本研究では、あくまで微生物相互作用物質の迅速かつ簡便な検出方法の開発を目的としており、本手法を用いることによって微生物群集構造の変化を検出することができたので、本節以降において分子生物学的手法による検討は行わないこととした。

6.2 分画抽出物による微生物群集構造への影響

前述の 6.1 の実験で、各抽出物が各汚泥の微生物群集構造に影響を及ぼしていることを本手法で確認することができた。そこでさらに本節では、先ほどと同様の抽出物を分画し、どの画分に微生物群集構造に大きな影響を及ぼす化学物質が含まれているのかを調べることを目的としている。

活性汚泥から化学物質を抽出する際に、本研究ではエタノール溶剤による固液抽出法を用いた。固液抽出法は、固体に含まれる化学物質が有機溶剤に溶解すれば、抽出された化学物質はすべて有機溶剤中に含まれることになる。したがって、本研究では、活性汚泥という多種多様な微生物が混在しているサンプルから化学物質を抽出しているため、多種多様な化学物質が抽出液の中に含まれていると推察される。したがって、6.1 の実験で汚泥から抽出した化学物質によって微生物群集構造が変化することが確認することができたが、どの化学物質が大きな影響を及ぼしているか不明である。そこで、本節では、固相抽出法の原理を用いて、各抽出物を分画し、その分画した抽出物を先ほどと同様に新たな汚泥に添加し、培養させた後の微生物群集構造の変化を MALDI-TOFMS によって確認することによって分画抽出物の微生物群集構造への影響を調べることにした。

抽出物は 4.2.1 と同様のものを使用し、分画は 4.2.2 に前述した方法で行った。分画液は 1mL あるので、各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、自然乾燥させた。理論的には、3mL の抽出液を 5 つに分画し、それを 10 つのウェルに分注しているため、各ウェルに抽出液の原液が 60 μ L ずつ分注されていると考えられる。対照系の実験では、99.5%エタノールを 50 μ L を添加し、自然乾燥させた。

培養用の汚泥は、2010 年 12 月 12 日の S1 と WL の 2 種類を用いた。培養は 4.3 に前述した方法で行った。

実験は以下の表 6.2 の一覧表にまとめた通りに行った。MALDI-TOFMS の主成分分析の結果は以下の図 6.10 にサンプル番号 1,2,3,10 を、図 6.11 にサンプル番号 1-9 を、図 6.12 にサンプル番号 1,2,10-16 を、図 6.13 にサンプル番号 17,18,19,26 を、図 6.14 にサンプル番号 17-25 を、図 6.15 にサンプル番号 17,18,26-32 をまとめたものを示した。

表 6.2 の見方としては、0%S2 と表記してある系は、「S2 抽出液を 0%エタノール溶液で分画したもの」である。

表 6.2 分画抽出物による微生物群集構造の影響実験のサンプル調製の一覧表

サンプル番号	図の表記	培養用汚泥	添加化学物質	添加量
1	No	S1	なし	0 μ L
2	Control		エタノール	50 μ L
3	S2-all		分画なし S2	50 μ L
4	0		0%S2	100 μ L
5	20		20%S2	100 μ L
6	40		40%S2	100 μ L
7	60		60% s_2	100 μ L
8	80		80%S2	100 μ L
9	100		100%S2	100 μ L
10	WL-all		分画なし WL	50 μ L
11	0		0%WL	100 μ L
12	20		20%WL	100 μ L
13	40		40%WL	100 μ L
14	60		60%WL	100 μ L
15	80		80%WL	100 μ L
16	100		100%WL	100 μ L
17	No	WL	なし	0 μ L
18	Control		エタノール	50 μ L
19	S1-all		分画なし S1	50 μ L
20	0		0%S1	100 μ L
21	20		20%S1	100 μ L
22	40		40%S1	100 μ L
23	60		60%S1	100 μ L
24	80		80%S1	100 μ L
25	100		100%S1	100 μ L
26	S2-all		分画なし S2	50 μ L
27	0		0%S2	100 μ L
28	20		20%S2	100 μ L
29	40		40%S2	100 μ L
30	60		60% s_2	100 μ L
31	80		80%S2	100 μ L
32	100		100%S2	100 μ L

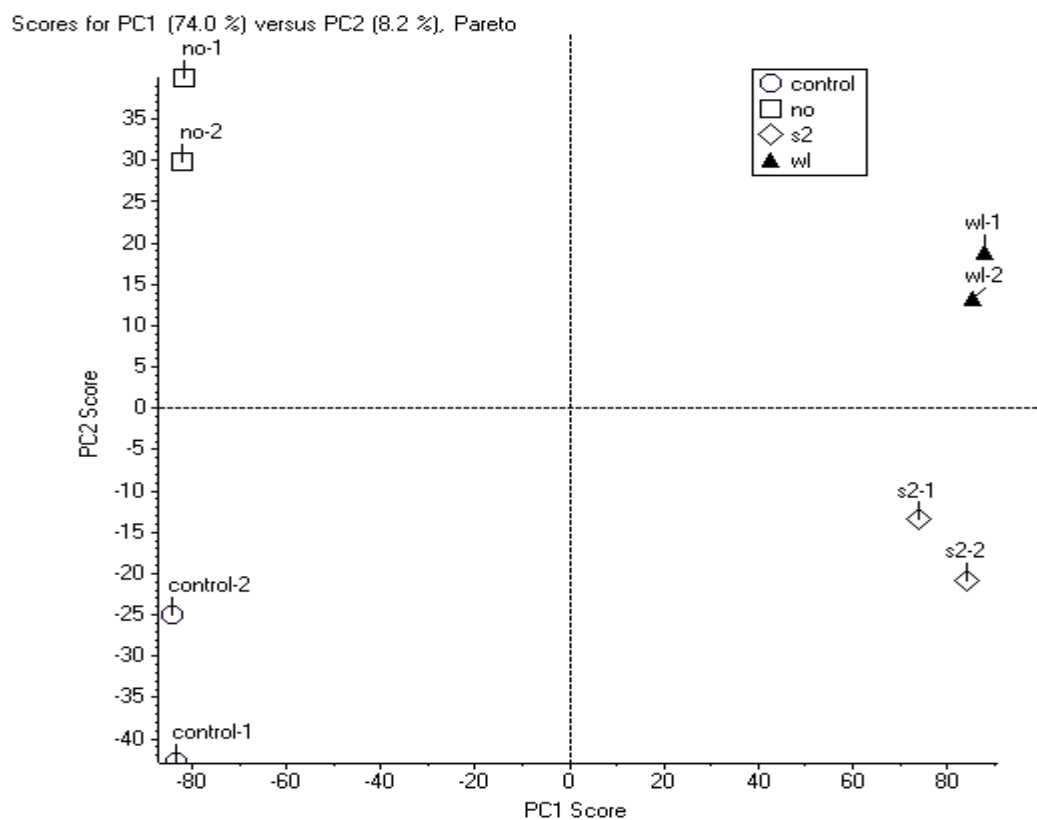


図 6.10 S1 汚泥における対照実験の MALDI-TOFMS の主成分分析の結果
(サンプル番号 1,2,3,10)

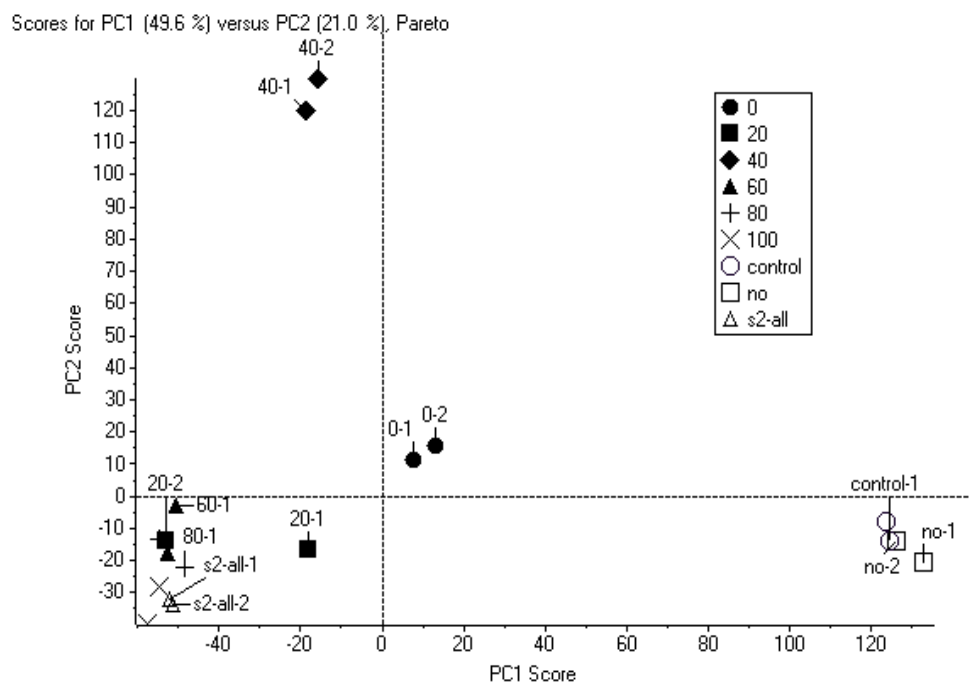


図 6.11 S1 汚泥における分画 S2 抽出物による MALDI-TOFMS の主成分分析の結果
(サンプル番号 1-9)

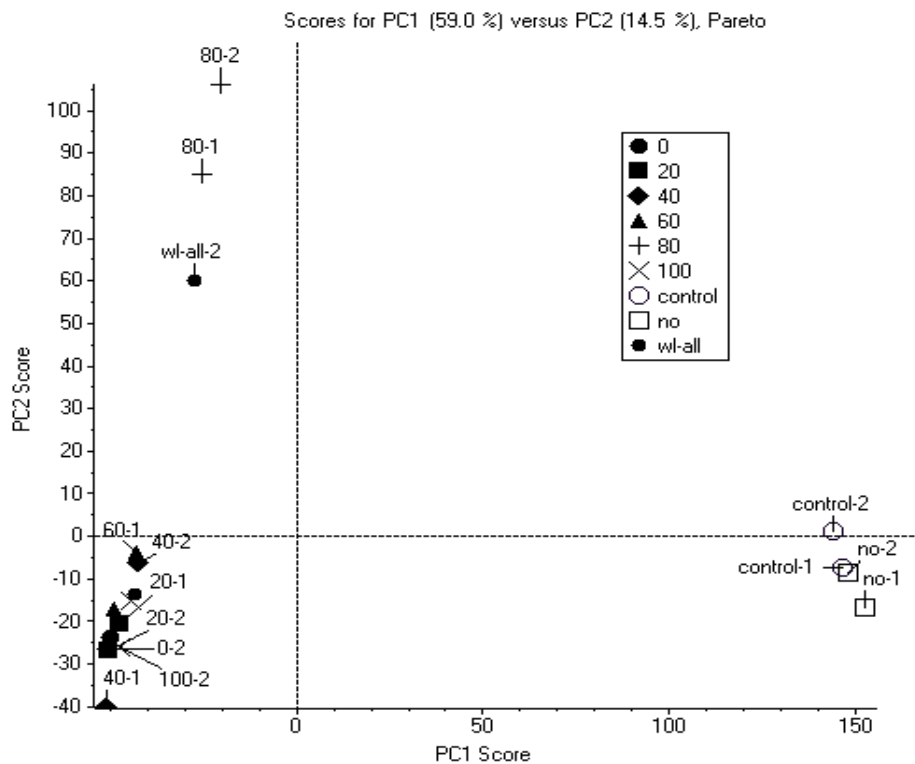


図 6.12 S1 汚泥における分画 WL 抽出物による MALDI-TOFMS の主成分分析の結果
(サンプル番号 1,2,10-16)

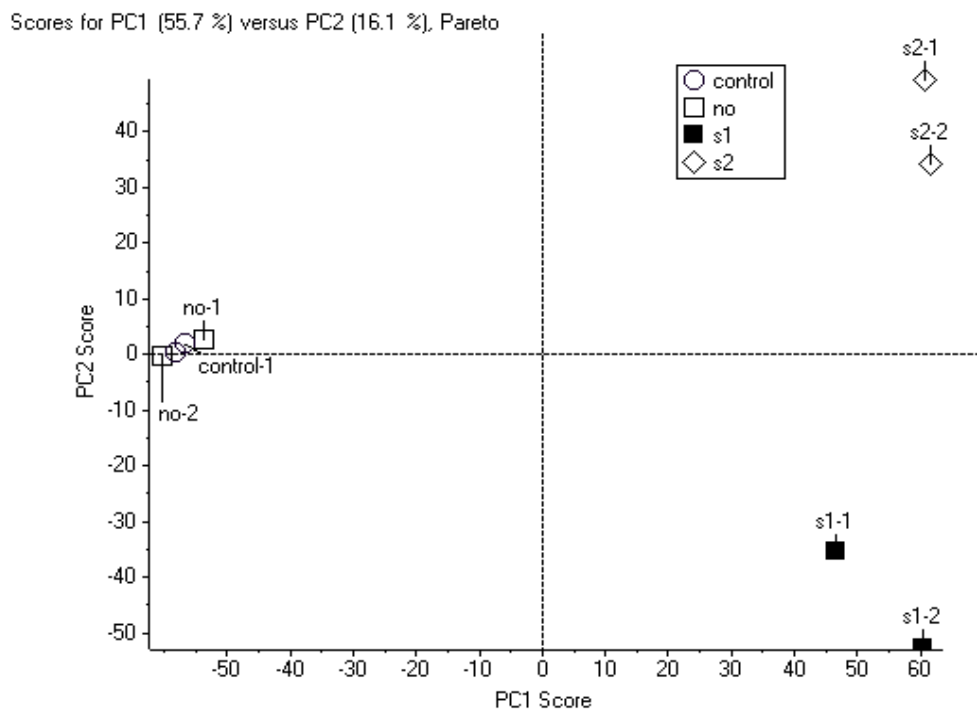


図 6.13 WL 汚泥における対照実験の主成分分析の結果
(サンプル番号 17,18,19,26)

Scores for PC1 (36.4 %) versus PC2 (9.3 %), Pareto

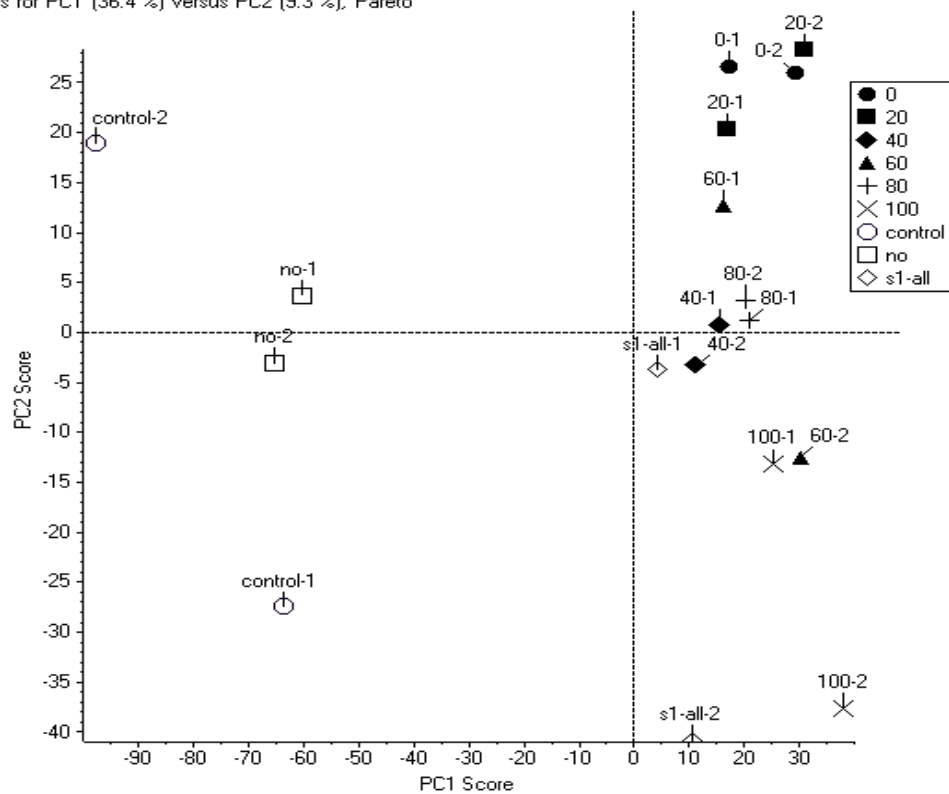


図 6.14 WL 汚泥における分画 S1 抽出物による主成分分析の結果
(サンプル番号 17-25)

Scores for PC1 (35.3 %) versus PC2 (12.3 %), Pareto

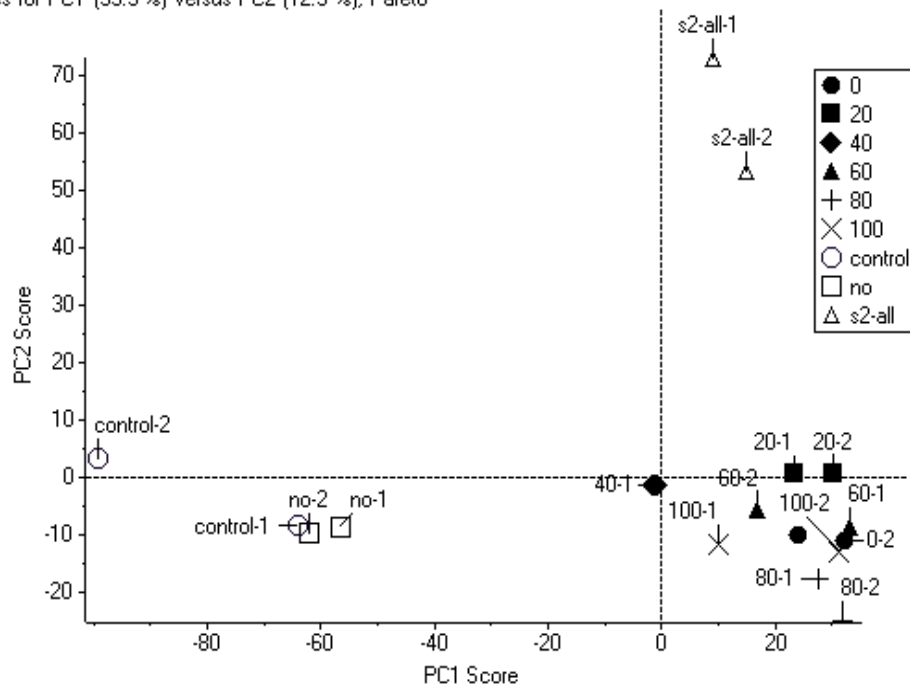


図 6.15 WL 汚泥における分画 S2 抽出物による主成分分析の結果
(サンプル番号 17,18,26-32)

図 6.10 と 6.11 を比較すると、図 6.10 では無添加系とエタノール添加系では大きな差が出てしまったが、図 6.11 では、無添加系とエタノール添加系ではほとんど差が出てこなかった。これは、両者ともにエタノールによる微生物群集構造の変化はあったが、分画した S2 抽出物を添加することによって、微生物群集構造が大きく変化したためエタノール添加系が無添加系と近くなったと推定される。図 6.12 においても同様のことが考えることが出来、分画した WL 抽出物の影響が非常に大きいことがわかる。さらに、図 6.12 から分画していない WL 抽出物を添加したものと 80%エタノール溶液で溶出した分画液を入れたもののスポットが近くなっていることがわかる。このことから、S1 汚泥における WL 抽出液添加による微生物群集構造の変化は 80%エタノール溶液で分画した成分が多く影響している可能性がある。

一方 WL 汚泥における分画抽出液による微生物群集構造の実験では、図 6.13 より S1 と S2 の抽出液を添加することによって、微生物群集構造が大きく変化していることがわかる。この結果をふまえて図 6.14 をみると、分画 S1 成分によって微生物群集構造が大きく変化していることが分かる。さらに無分画の S1 抽出液と 40%,80%,100%エタノール溶液で分画物を添加して系が類似の結果を示したことから、これらの分画成分に微生物群集構造に大きな影響を及ぼす成分が含まれている可能性がある。

さらに、各 S1 と WL の汚泥に対してどの抽出物の分画成分が影響を調べるために、図 6.11 と 6.12 を統合させたものを図 6.16 に、図 6.14.と 6.15 を統合させたものを図 6.17 としてまとめたものを以下に示した。

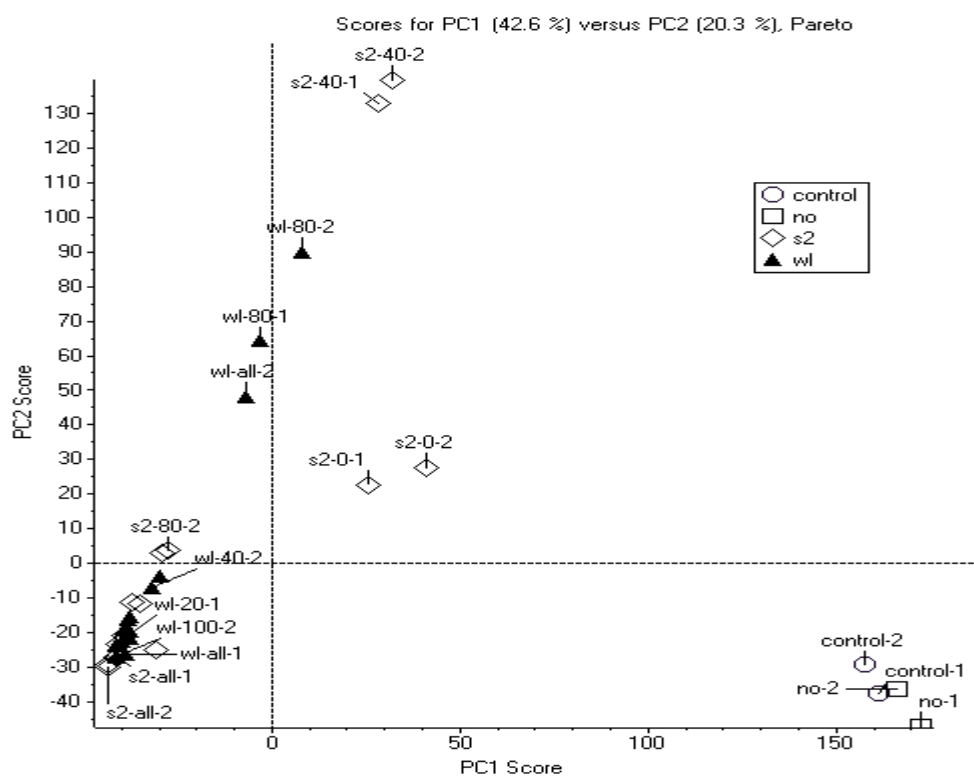


図 6.16.1 S1 汚泥における各分画抽出物による微生物群集構造の主成分分析結果
(サンプル番号 1-16)

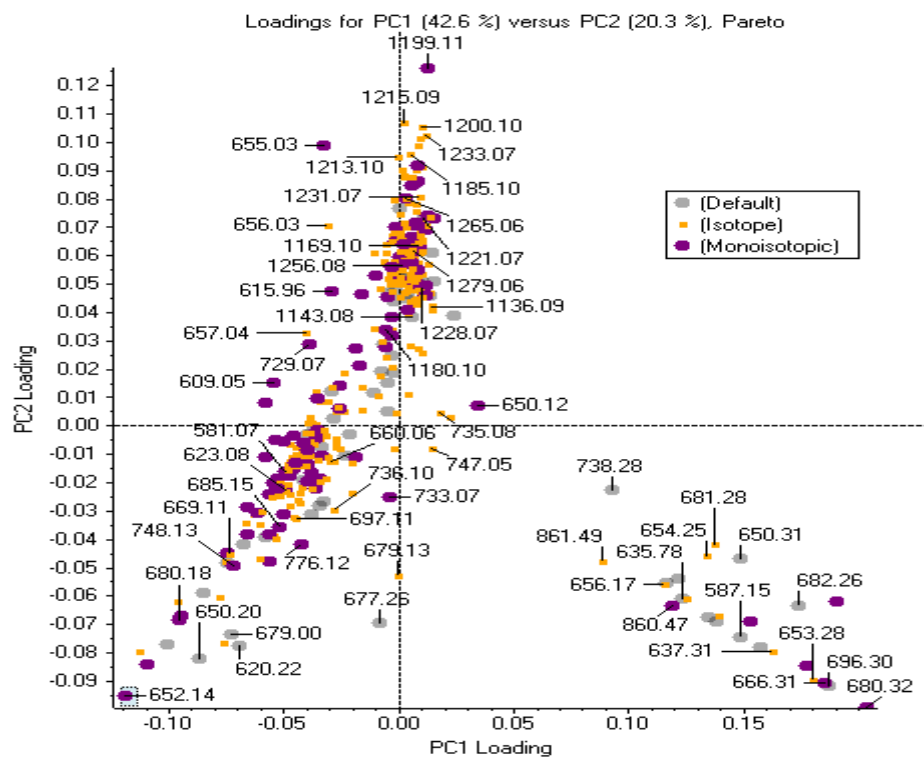


図 6.16.2 図 6.16.1 の各質量電荷比と主成分の関係
(サンプル番号 1-16)

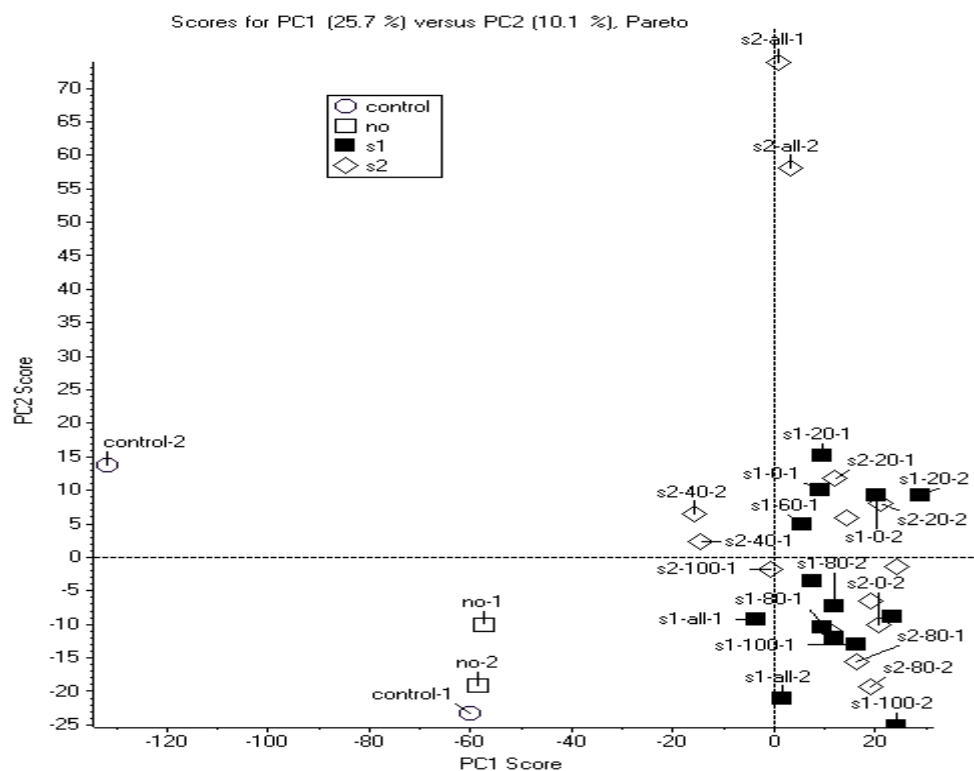


図 6.17.1 WL 汚泥における各分画抽出物による微生物群集構造の主成分分析の結果
(サンプル番号 17-32)

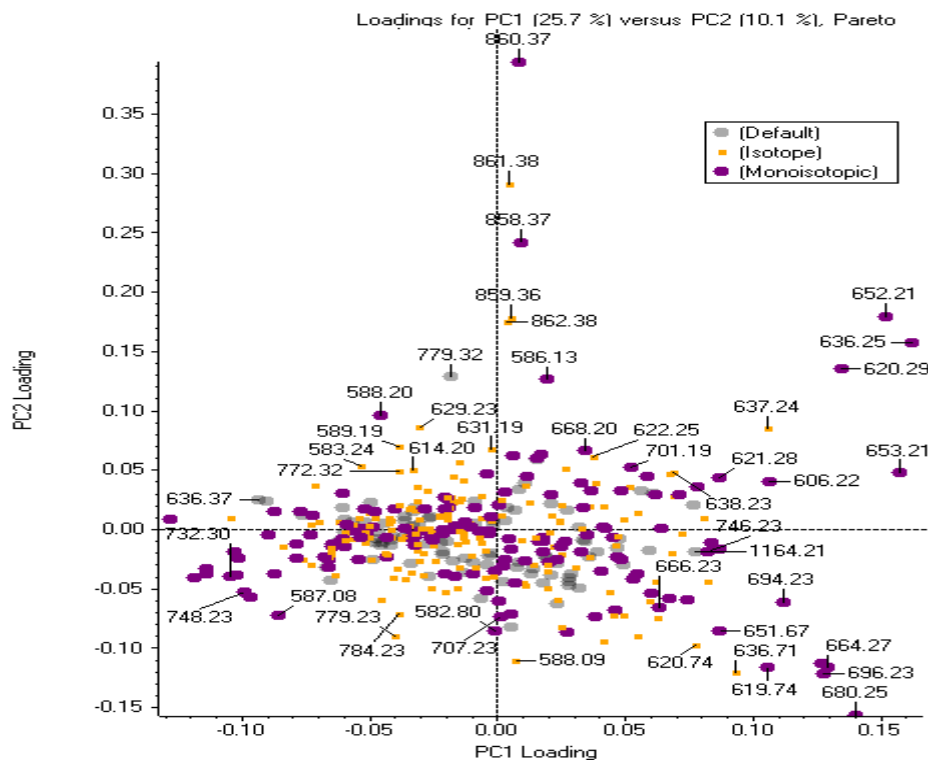


図 6.17.2 図 6.17.1 の各質量電荷比と主成分の関係
(サンプル番号 17-32)

図 6.16.1 より、エタノール添加系と各分画抽出物添加系では、微生物群集構造が大きく異なっていることが分かる。特に大きな影響を及ぼしていると考えられる分画成分は、S2-40 や WL-80 であった。WL-all と WL-80 は、比較的に近い位置にあるため、WL-all の影響は WL-80 による影響が大きいと考えることができる。一方で S2-40 と S2-all の位置は離れていることが分かる。これは、S2-40 各分だけの影響力が大きいにも関わらず、他の各分成分が含まれていることによって、S2-40 の影響を阻害しているとも考えることもできる。これは、2.2.6 に前述した相乗効果の逆の働きが活性汚泥内にあったのかもしれない。

図 6.17.1 より、エタノール添加系と各分画抽出物添加系では、微生物群集構造が異なっていることが分かる。図 6.14 では、S1 分画液によって WL 汚泥の微生物群集構造が大きく変化しているように見えた。しかし、図 6.17 をみると、S2 分画液の微生物群集構造の変化と比較すると、S1 分画液の影響はさほど大きくないと考えることができる。WL 汚泥においては、S2-all の抽出液の影響が一番大きかったと考えることができる。各分画液ごとの影響はさほど大きくないが、2.2.6 で前述した各分画成分の相乗効果によって、S2-all の影響が大きくなったと考えることができる。

6.2 の実験において、分画抽出物による微生物群集構造の変化を見てきたが、ある特定の分画成分が微生物群集構造に大きな影響を及ぼしているかの結果が得られたが、一方で各分画成分の相乗・逆相乗効果による影響と考えられる結果も得られた。本研究においては、影響大きい分画成分の特定にまでは至らなかったが、本手法によって微生物群集構造の変化を検出することを確認することが出来た。

また、各質量電荷比と主成分の関係については、図 6.16.2 では 1199 などの高質量電荷比のものが、図 6.17.2 では約 860 のものが微生物群集構造に影響を及ぼしていると考えられる。

第 7 章 その他影響があると思われる実験条件の検討

本章では、今までの実験で検討をしていなかった実験条件を検討することによって、本手法における有用性の検討を行うことをした。

7.1 分画抽出物の総量

5.6 の実験では各ウェルに 300 μ L 添加し、その化学物質による微生物群集構造の影響を調べた。しかし、6.2 の分画抽出物は理論的には 60 μ L しか各ウェルに添加していない。これは 5.6 の実験と比較すると 5 分の 1 の量しか添加していない。分画したとはいえ、これらの実験を比較するのは必ずしも適切とはいえない。そこで本節では、分画抽出物の総量を増やして添加し、微生物群集構造の変化を検出することとした。

4.2.2 に前述した操作を繰り返し 3 回行い、理論的な抽出物が各ウェルに 180 μ L になるように分画液を用意した。分画抽出物の総量を増やした以外は前述の 6.2 と同様の実験を行った。培養用の汚泥は 2010 年 12 月 20 日の嫌気工程終了時の S1 と WL 汚泥を使用した。

実験は以下の表 7.1 のように培養用および抽出用汚泥を使用した。

図 7.1 にサンプル番号 1-16 を、図 7.2 にサンプル番号 17-32 をまとめたものを示した。

表 7.1 分画抽出物による微生物群集構造影響実験のサンプル調製一覧表(実験 6.2 の 3 倍)

サンプル番号	図の表記	培養用汚泥	添加化学物質	添加量
1	No	S1	なし	0 μ L
2	Control		エタノール	150 μ L
3	S2-all		分画なし S2	150 μ L
4	S2-0		0%S2	100 μ L
5	S2-20		20%S2	100 μ L
6	S2-40		40%S2	100 μ L
7	S2-60		60% _{s2}	100 μ L
8	S2-80		80%S2	100 μ L
9	S2-100		100%S2	100 μ L
10	WL-all		分画なし WL	150 μ L
11	WL-0		0%WL	100 μ L
12	WL-20		20%WL	100 μ L
13	WL-40		40%WL	100 μ L
14	WL-60		60%WL	100 μ L
15	WL-80		80%WL	100 μ L
16	WL-100		100%WL	100 μ L
17	No	WL	なし	0 μ L
18	Control		エタノール	150 μ L
19	S1-all		分画なし S1	150 μ L
20	S1-0		0%S1	100 μ L
21	S1-20		20%S1	100 μ L
22	S1-40		40%S1	100 μ L
23	S1-60		60%S1	100 μ L
24	S1-80		80%S1	100 μ L
25	S1-100		100%S1	100 μ L
26	S2-all		分画なし S2	150 μ L
27	S2-0		0%S2	100 μ L
28	S2-20		20%S2	100 μ L
29	S2-40		40%S2	100 μ L
30	S2-60		60% _{s2}	100 μ L
31	S2-80		80%S2	100 μ L
32	S2-100		100%S2	100 μ L

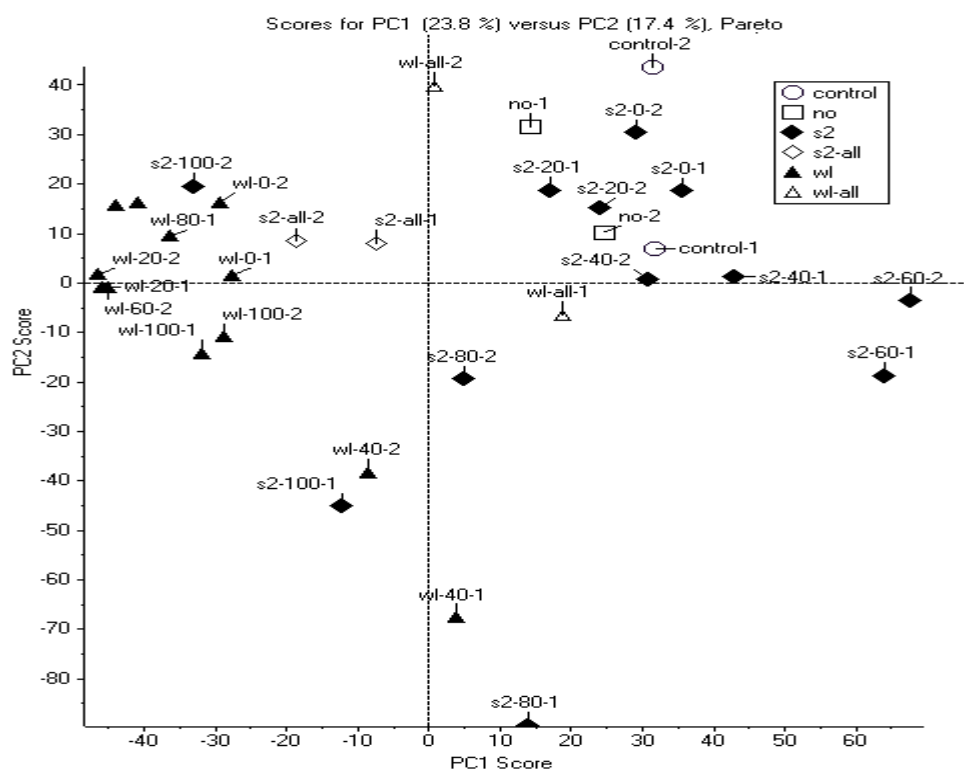


図 7.1 S1 汚泥における各分画抽出物による微生物群集構造の MALDI-TOFMS の結果
(サンプル番号 1-16)

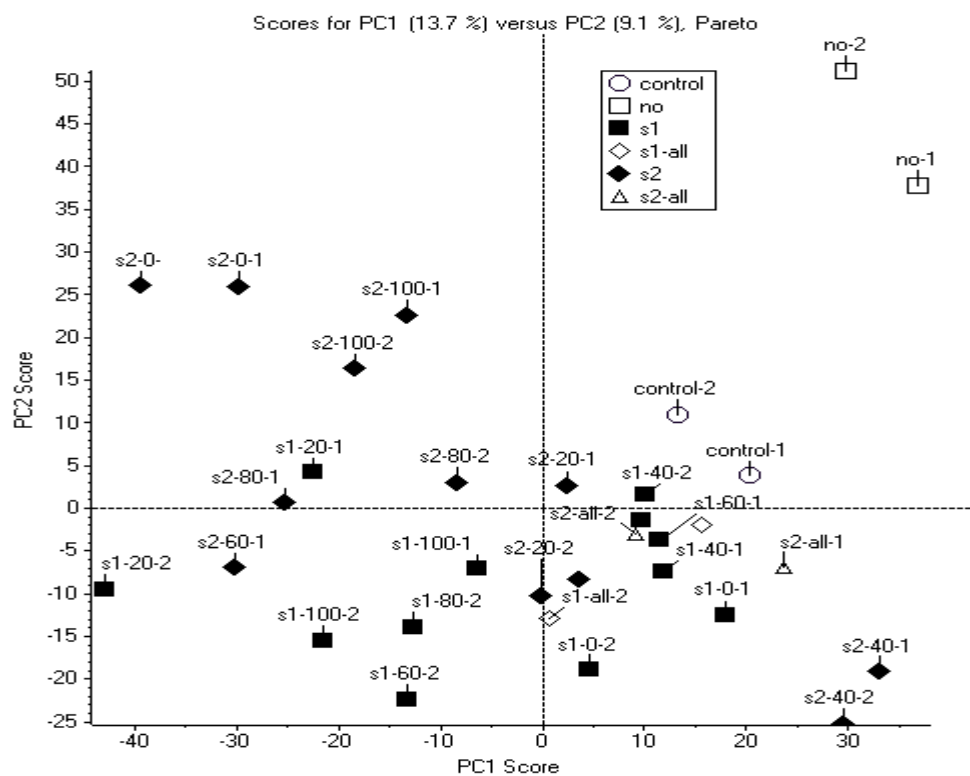


図 7.2 WL 汚泥における各分画抽出物による微生物群集構造の MALDI-TOFMS の結果
(サンプル番号 17-32)

図 7.1 と 7.2 より、分画液の総量を増やして、微生物群集構造の影響を調べたが、エタノール添加系と無分画抽出物添加系では、無添加系とエタノール添加系のスポットがはなれてしまい、6.2 の実験と比較すると分画物による微生物群集構造も影響をあまり及ぼしていないと思われる結果が得られた。

環境ホルモンは濃度がある閾値を超えると、高濃度になるとかえって影響を及ぼさないといった報告もされている⁽³⁰⁾。

また、本節の実験においても逆相乗(阻害)作用と考えられるような結果が得られた。

7.2 sep pak による影響

本研究では、化学物質による微生物群集構造の影響を調べることを目的としている。その際に注意した点が、微生物群集構造に影響を及ぼしている化学物質が、微生物由来ではない化学物質が微生物群集構造に影響を及ぼしてしまっている可能性が考えられることである。従って、本研究の実験の際には出来る限り、プラスチック製の実験器具を使わずガラス製のものを使用し、またプラスチック製の実験器具を使う際は、どの実験においても同じ会社のものを使用するなどして、できるだけ実験器具による影響を平準化するなどの工夫をしてきた。

しかし、抽出物の分画の際に使用した sep pak はプラスチックでできている部分があり、溶出力が強いエタノールを使用することによって、プラスチックから化学物質が溶出してしまっている可能性が考えられる。したがって、sep pak による微生物群集構造の変化を調べる必要がある。

具体的には、4.2.2 の抽出物の分画では、汚泥からの抽出した抽出物を水で希釈し、その希釈溶液を sep pak にロードして、分画を行った。そこで、sep pak の影響を見るために抽出物ではなく、固液抽出法で用いた有機溶剤であるエタノール溶液を希釈して、同様な方法で分画を行った。

培養用の汚泥は 7.1 と同じ 2010 年 12 月 20 日の嫌気工程終了時の S1 と WL 汚泥を使用した。実験は以下の表 7.2 のようにして行った。

実験の結果は、前述の 7.1 の実験と同じ時期に開始し、同じ培養用汚泥をしようしているため、すべて同じ主成分分析を行った。S1 培養汚泥の結果を図 7.3 に、WL 培養汚泥の結果を図 7.4 に示した。

表 7.2 sep pak による影響実験

サンプル番号	図の表記	培養用汚泥	添加化学物質	添加量
33	No	S1	なし	0 μ L
34	Control		エタノール	150 μ L
35	Eth-0		0%エタノール	100 μ L
36	Eth-20		20%エタノール	100 μ L
37	Eth-40		40%エタノール	100 μ L
38	Eth-60		60%エタノール	100 μ L
39	Eth-80		80%エタノール	100 μ L
40	Eth-100		100%エタノール	100 μ L
41	No	WL	なし	0 μ L
42	Control		エタノール	150 μ L
43	Eth-0		エタノール	100 μ L
44	Eth-20		0%エタノール	100 μ L
45	Eth-40		20%エタノール	100 μ L
46	Eth-60		40%エタノール	100 μ L
47	Eth-80		60%エタノール	100 μ L
48	Eth-100		80%エタノール	100 μ L

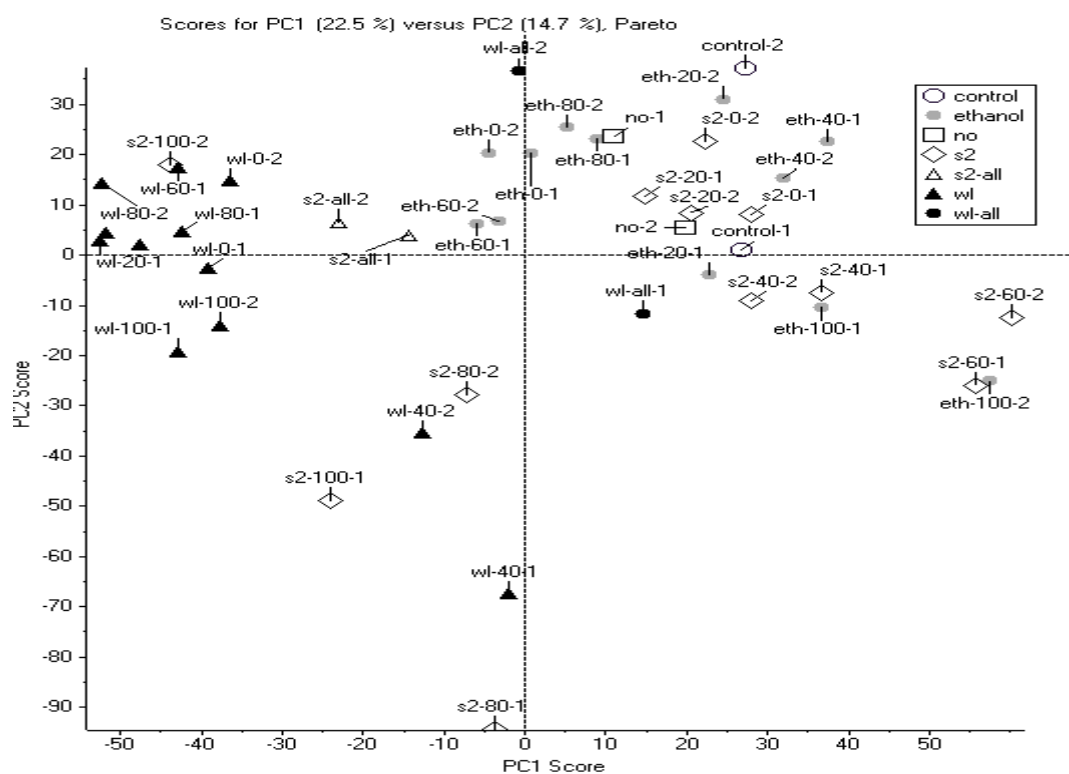


図 7.3 S1 における sep pak による微生物群集構造の MALDI-TOFMS の結果
(サンプル番号 1-16,33-40)

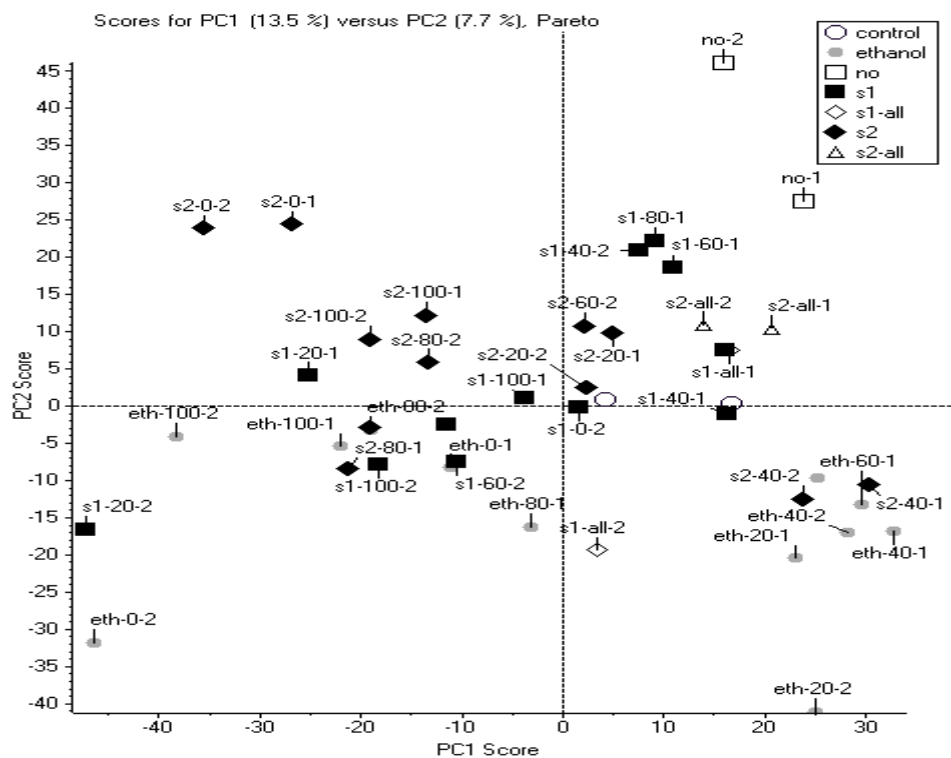


図 7.4 WL における sep pak による微生物群集構造の MALDI-TOFMS の結果
(サンプル番号 17-32,41-48)

図 7.3 より、エタノール分画液の影響は、エタノール添加系のスポットとある程度近い位置にあることがわかる。一方で、図 7.4 においては、他の分画抽出物と同等の結果が得られているものも存在している。

以上のことから **sep pak** の影響もある程度、微生物群集構造に影響を及ぼしてしまうこともあることが分かった。これを **sep pak** の影響を無くす手段としては、本研究では HPLC による抽出物の分画を行うことによって、**sep pak** による影響を無くすることもできると考えられる。

7.3 プレートの位置による影響

培養後の各ウェルを観察してみると、水の蒸発の仕方などが異なっていることがある。ウェルの場所による影響も考えられるため、その影響を調べた。

マイクロプレートに添加物を入れない **WL** の汚泥を添加し、培養を行った。ここで培養用の汚泥を入れる場所を左、中央、右の 3 つに分け、さらにその 3 つを上、中、下の 3 つに分け、計 9 か所のウェルを使って培養を行った。プレート配置は以下の図 7.5 に示した。

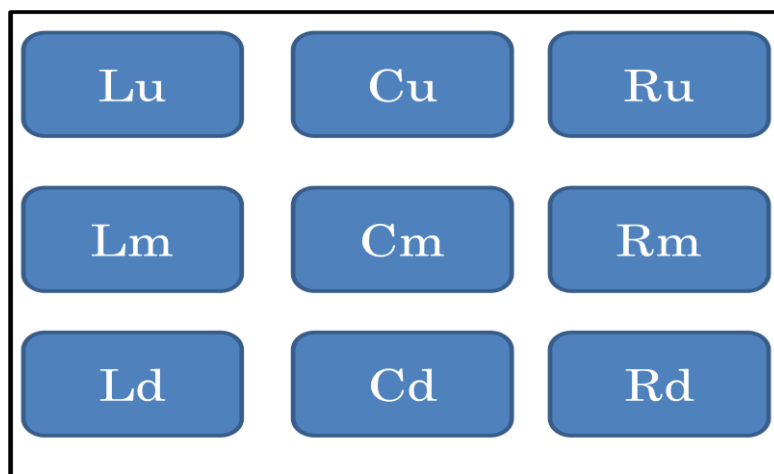


図 7.5 培養汚泥の培養位置を示した図

実験の結果を以下の図 7.6 に示した。

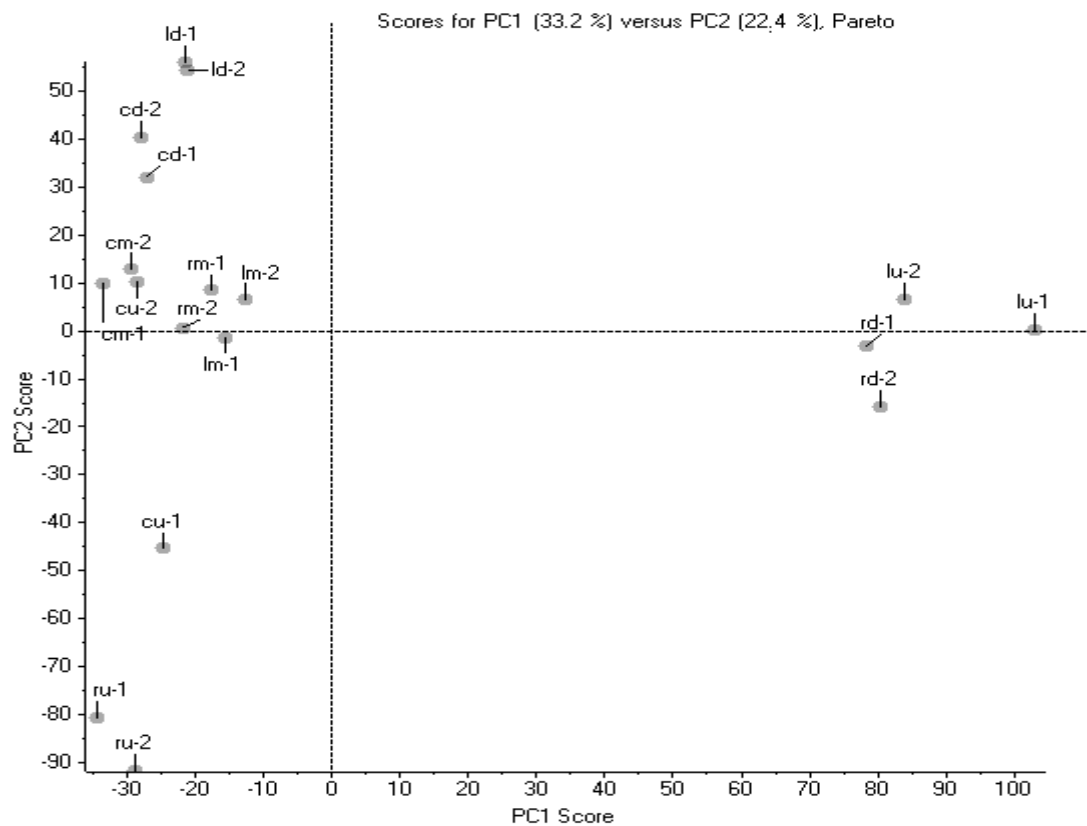


図 7.6 WL 汚泥におけるプレートの位置による培養後微生物群集構造の相違

図 7.6 より左上と右下の二つが他のウェルと比較すると大きく異なっていることが分かる。

本研究においては、左上のウェルを使うことはしばしばあった。右下のウェルにおいては、コントロールなどの対照実験に用いることがたまにあった。

今後の実験においては、プレートの端をできるだけ使わないなどの措置を取ることが必要になってくると考えられる。

第 8 章 総括

本研究では、活性汚泥内の微生物相互作用物質の迅速かつ簡便な検出方法の開発をし、その手法を用いて、微生物相互作用物質の探索の試みを目的として研究を行ってきた。研究の目的を達成するために、MALDI-TOFMS の性質を理解したうえで、そのバックグラウンド等の注意すべき点を確認し、その後、活性汚泥から抽出した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を本手法で検出することを試みた。そして、抽出化学物質を分画することによって、微生物群集構造に大きな影響を及ぼす化学物質の特定を試みた。

8.1 研究の成果

第 5 章では、MALDI-TOFMS を微生物相互作用物質検出方法として利用するために、確認しなければいけない基礎的条件について検討した。本手法を用いることによって異なる活性汚泥における微生物群集構造の相違を検出することができた。また、同一の汚泥であっても、経時変化における微生物群集構造の変化を検出することができた。さらに、各汚泥から固液抽出法によって化学物質を抽出し、その抽出物自体の相違も本手法で検出することができた。以上のことから、本手法を用いて短時間である程度の微生物群集構造の変化を検出することができた。

第 6 章では、第 5 章の結果をふまえて、活性汚泥から抽出した化学物質を新たな活性汚泥に添加し、マイクロプレートを用いた培養を行い、その化学物質による微生物群集構造の変化を本手法と分子生物学的手法である T-RFLP 法の結果を比較した。両実験ともに主成分分析による統計的な解析によって、微生物群集構造の変化を検出することができた。この実験をふまえて、前述の抽出物を固相抽出キットである sep pak で分画を行い、その分画抽出物を新たな活性汚泥に添加することによって、その分画抽出物の微生物群集構造の変化を見た。ある分画抽出物がある微生物群集構造に大きな影響を与えられられる結果も得られた。その一方で、各分画成分による相乗作用や阻害作用と考えられる結果も得られた。

本研究を通して、MALDI-TOFMS を用いた微生物群集構造の変化を従来の T-RFLP 法と比較すると約 10 分の 1 の時間で検出することができた。

8.2 今後の展望

本研究は、分画成分による微生物群集構造の変化を見てきたが、実験数が多くなく、特定化学物質による微生物群集構造の影響を見ることができなかった。本手法を用いて、分画成分による微生物群集構造の影響を今後さらに調べていくことが肝要であり、ある程度分画成分が定まったら、マイクロプレートによる培養ではなく、実験室規模リアクター等の規模の大きいプロセスでその分画成分がどのような影響を及ぼすのかを調べるが必要になってくると考えられる。

また本研究においては、化学物質による微生物群集構造の変化に注目して実験を行ってきた。しかし、微生物群集構造の変化のみに注目していたため、化学物質の添加が汚泥に対して良い方向に働いたのか、また、悪い方向に働いたのかの判断が困難であった。そこで、リン摂取速度などの EBPR プロセスに関連する代謝速度等と比較することによって、微生物相互作用物質がどのように働いたのかがわかると考えられる。

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、安定した処理水の得るために役立てていく必要があると考える。

参考文献

- (1) 藤田正憲、池道彦 「バイオ環境工学」 シーエムシー出版 2006
- (2) 大森俊雄、野尻秀昭、堀之内正枝、春日和 「環境微生物学」 昭晃堂 2000
- (3) Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A.M.. Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research*. 41(11), 2007, pp.2271-2300.
- (4) Rice, E, L Allelopathy, 2ndED., Academic Press. 1984
- (5) 中井智司、山田信吾、細見正明 ホザキノフサモが放出する脂肪酸のシアノバクテリアに対する増殖抑制効果 水環境学会誌 27(2) 2004 pp125-130
- (6) 中井智司、山田信吾、村上昭彦 大型水生植物のアレロパシー 用水と廃水 40(2) 1998 pp5-10
- (7) Neal, J. L., Inhibition of nitrifying bacteria by grass and forb root extracts. *Can J Microbiol* 15(6): 1969 pp633-635
- (8) Einhellig, F. A. and Rasmussen, J. A.. Synergistic Inhibitory Effects of Vanillic and Para-Hydroxybenzoic Acids on Radish and Grain-Sorghum. *Journal of Chemical Ecology* 4(4): 1978 pp425-436
- (9) Noguera, D. R., Araki, N. and Rittmann, B. E. Soluble Microbial Products in Anaerobic Chemostants. *Biotechnology and Bioengineering* 44(9): 1994 pp1040-1047
- (10) Ross, N., Deschenes, L., Bureau, L., Clement, B., Comeau, Y. and Samson, R. Ecotoxicological assessment and effects of physicochemical factors on biofilm development in groundwater conditions. *Environmental Science & Technology* 32(8): 1998 pp1105-1111
- (11) Chudoba, J. Inhibitory Effect of Refractory Organic-Compounds Produced by Activated Sludge Microorganisms on Microbial Activity and Flocculation. *Water Research* 19(2): 1985 pp197-200
- (12) 亀井翼、丹保憲仁 好気性生物化学プロセスからの代謝産物の挙動と性質(IV) 下水道協会誌 19(213): 1982 pp32-41
- (13) Fukase, T., Shiota, M. and Miyaji, Y. The role of an anaerobic stage on biological phosphorus removal. *Water Science & Technology* 17(2-3): 1985 pp69-80
- (14) Cech, J. S. and Hartman, P. Glucose-Induced break down of Enhanced Biological Phosphate Removal. *Environmental Technology* 11(7): 1990 pp651-656
- (15) Liu, W. T., Nakamura, K., Mathuo, T. and Mino, T. Internal energy-based competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating bacteria in biological phosphorus removal reactors—Effect of P/C feeding ratio. *Water Research*

- 31(6): 1997 pp1430-1438
- (16) Okunuki, S., Kawaharasaki, M., Tanaka, H. and Kanagawa, T. Changes in phosphorus removing performance and bacterial community structure in an enhanced biological phosphorus removal reactor. *Water Research* 38(9): 2004 pp2433-2439
 - (17) 足立崇博、中原忠篤、吉見幸彦、川原崎守、中村和憲 嫌気好気活性汚泥におけるポリリン酸蓄積細菌 No.38 株と他の細菌との競合 1995 水環境学会年会講演集 p19
 - (18) 大田智久 嫌気好気式活性汚泥法における化学物質を介した生物間相互作用に関する基礎的検討 1998 年度修士論文
 - (19) 市橋修 活性汚泥微生物の栄養塩除去関連代謝におけるアレロパシー作用 2005 年度博士論文
 - (20) 小川旦 マイクロプレートを用いた活性汚泥内の化学的微生物相互作用の検出 2008 年度修士論文
 - (21) Reinhard Kramer, and Kirsten Jung. *Bacterial Signaling*. Wiley Blackwell 2010
 - (22) 島津製作所 HP <http://www.an.shimadzu.co.jp/tofms/axima/princpl1.htm>
 - (23) Applied Biosystems 4800 plus MALDI TOF/TOF Analyzer 簡易操作マニュアル
 - (24) Bruce Alberts ら著 *Essential 細胞生物学* 南江堂 2003
 - (25) 佐藤弘泰、小貫元治、味埜俊 活性汚泥中微生物群集構造解析のための超音波破碎と希釈による新規 DNA 抽出手法の開発 2008 環境工学研究論文集 Vol.45 pp225-232
 - (26) 高梨正訓、押木守、小貫元治、佐藤弘泰、味埜俊 超音波破碎・希釈法による DNA 抽出のバイアス評価 2009 46 回環境工学研究フォーラム講演集 pp170-172
 - (27) 大倉一郎、北爪智哉、中村聡 著 新版 生物工学基礎 講談社サイエンティフィック 2002
 - (28) 日本生化学会 基礎生化学実験法 第 1 巻基本操作 東京化学同人 2001
 - (29) 日本下水道協会 下水道試験法 上巻下巻 日本下水道協会 1997
 - (30) Frederick S. vom saal, Barry G. Timms, Monica M Montano, Paola Paranza, Kristinaa Thayer, Susan C. Nagel, Minati D. Dhar, V. K Ganjam, Stefano Parmigiani, and Wadev. Welshons. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94): 1997 pp. 2056–2061

謝辞

本論文を作成するにあたって、多くの方に大変お世話になりました。

佐藤弘泰准教授は、私の指導教官として研究の進め方から実験装置の使い方に至るまで様々な面でアドバイスをしてくださりました。英語が得意ではない私のためにゼミのときに日本語で説明をしてくださり、本当に親身になってご指導してくださいました。

鯉渕幸生講師は、私の副指導教官として本論文に対して、様々な意見を下さり、重要な指摘をしてくださいました。

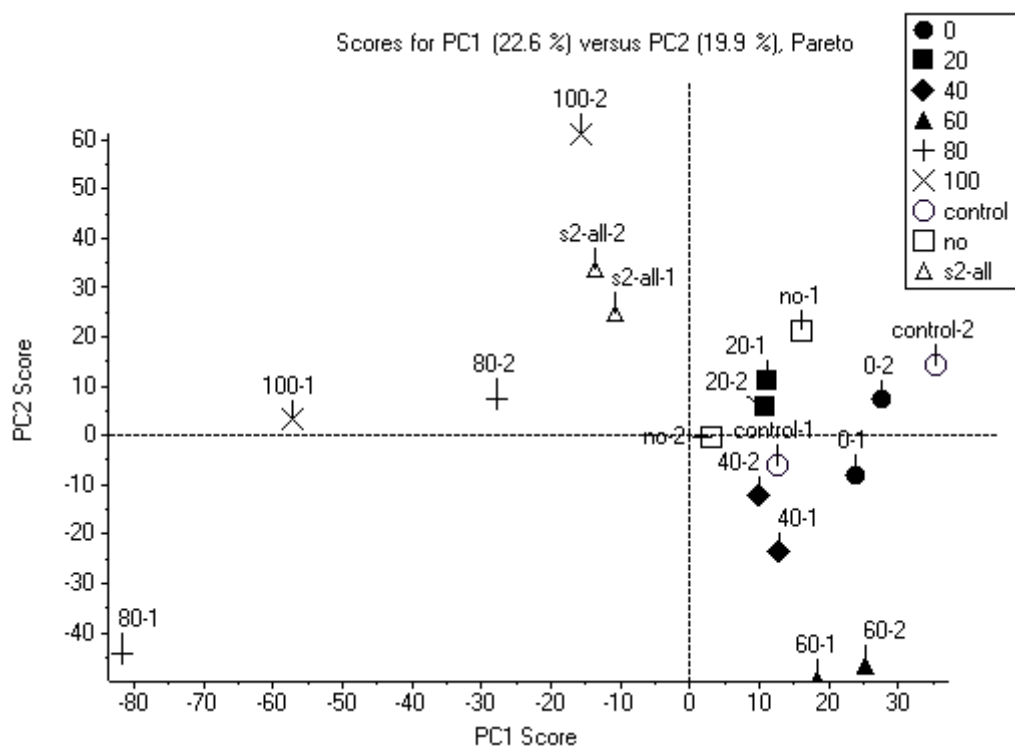
北海道大学、押木守博士研究員は、私が修士 1 年の右も左もわからない時に実験方法や研究に対する姿勢など公私ともに私を支えてくださりました。

研究室の先輩方には、英語が得意では私に対して英語の指導をしてくださり、留学生の母国語を教えてくださいなど様々な面で貴重な経験をさせてくださいました。

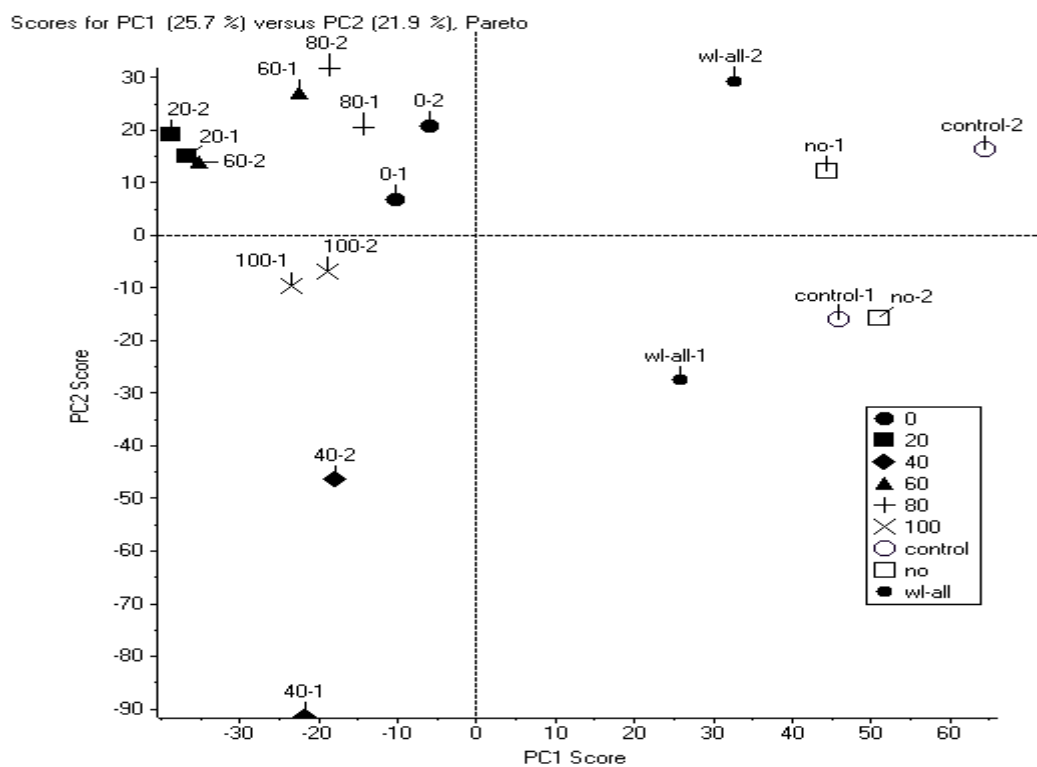
社会文化環境学専攻の同期は、同じ研究室に同期がいない私に対してとても温かく接してくれて精神的に辛い時に支えになってくれました。

最後に私の修士課程での生活を温かい気持ちで見守ってくれた両親に深い感謝を申し上げます。

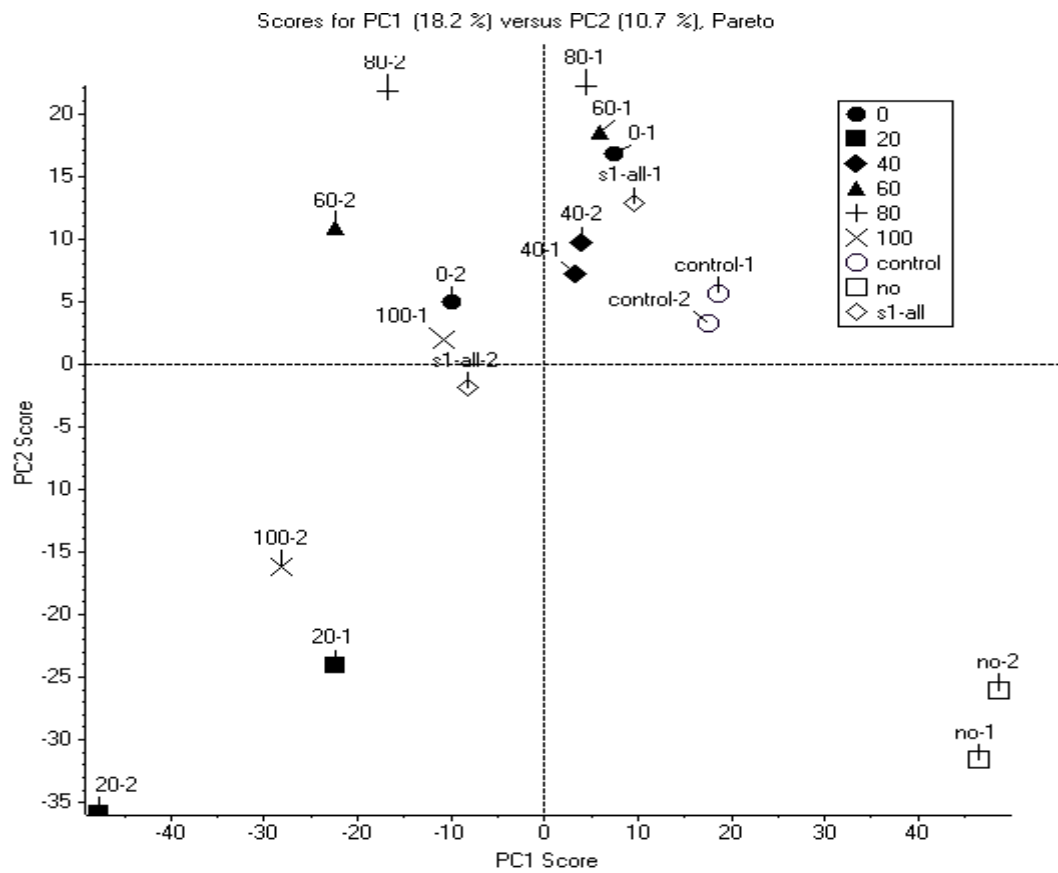
付録



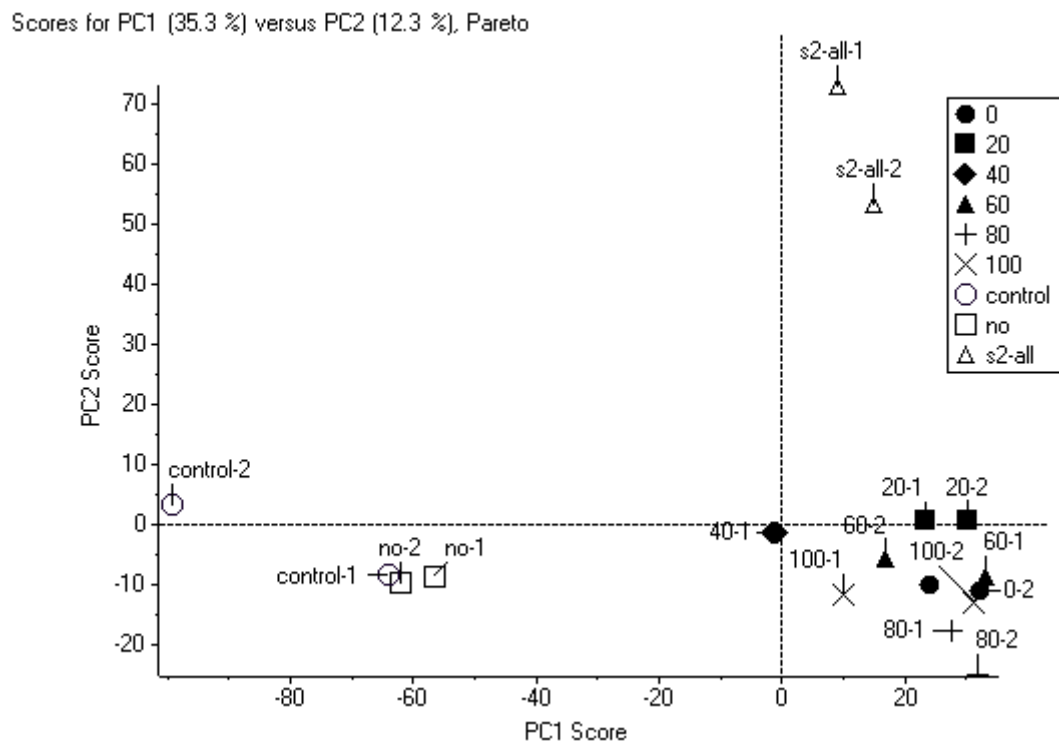
S1 汚泥における分画 S2 抽出物添加の実験結果(実験 7.1)



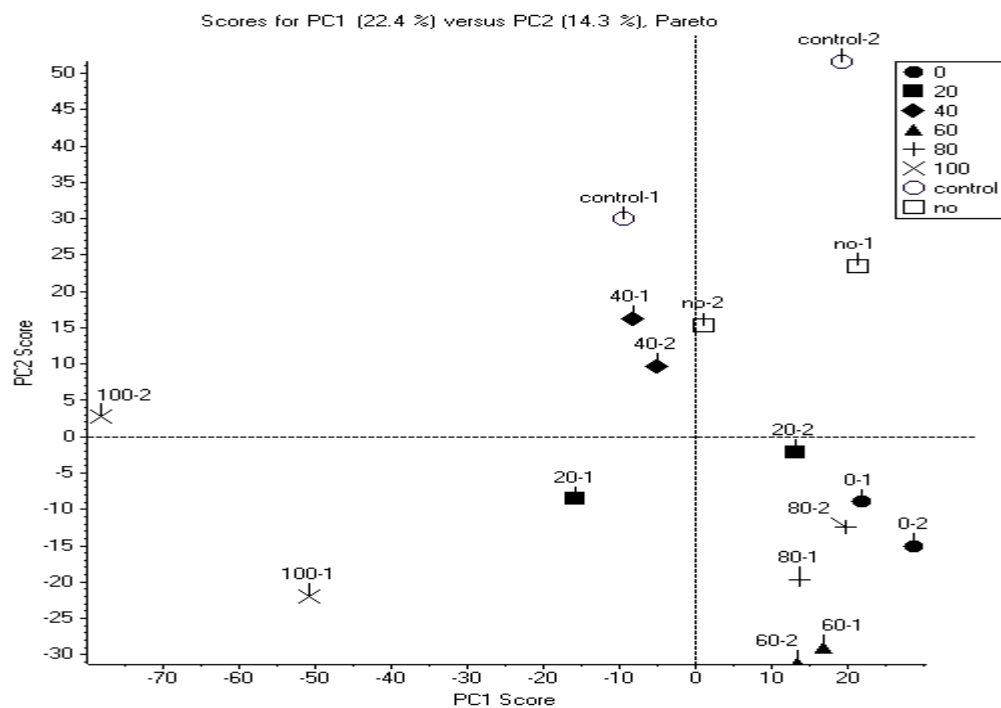
S1 汚泥における分画 WL 抽出物添加の実験結果(実験 7.1)



WL 汚泥における分画 S1 抽出物添加の実験結果(実験 7.1)

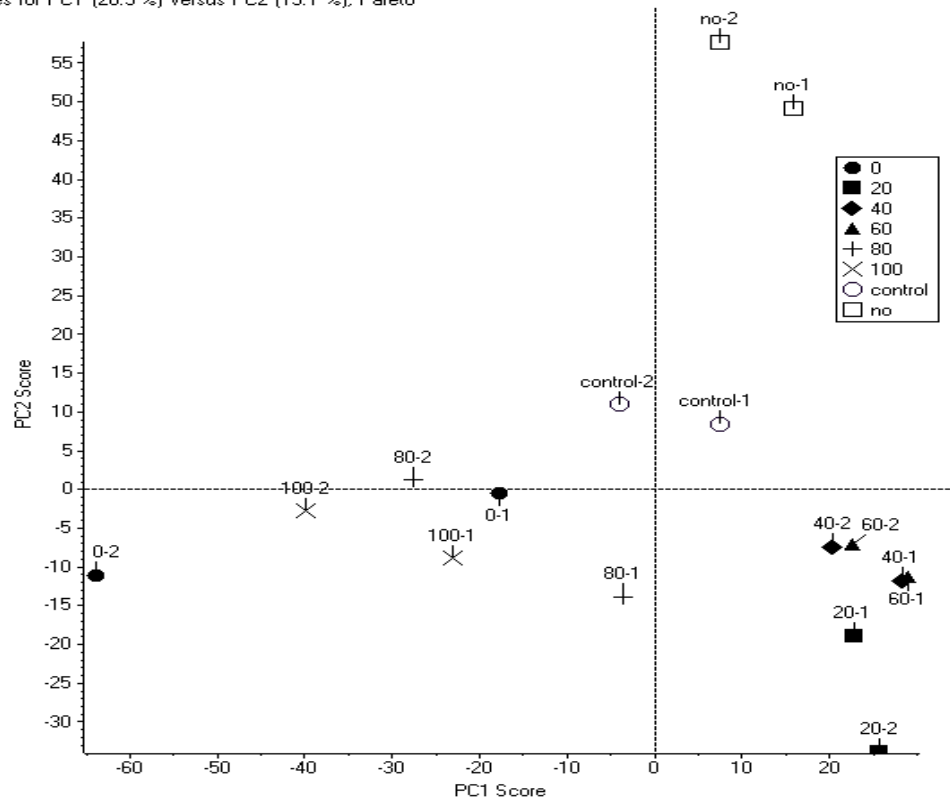


WL 汚泥における分画 S2 抽出物添加の実験結果(実験 7.1)



S1 汚泥におけるエタノール分画液添加実験の結果(実験 7.2)

Scores for PC1 (20.9 %) versus PC2 (15.1 %), Pareto



WL 汚泥におけるエタノール分画液添加実験の結果(実験 7.2)