

実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の FISH 法による 群集解析及び定量評価

Community Analysis of Polyphosphate Accumulating Organisms in Full-scale Plants by FISH

学籍番号 46815
氏名 宇田 直樹 (Uda, naoki)
指導教員 佐藤 弘泰 助教授

1. 背景と目的

閉鎖性水域における富栄養化を抑制するために、栄養塩であるリンを排水から除去することは重要な課題である。微生物を利用した排水からのリン除去プロセスは多くの処理場で採用されているものの、流入水の負荷変動などによるリン除去の不安定性が指摘されており、安定で効率的な運転方法の確立が必要とされている。そのためには、リン除去を担うポリリン酸蓄積細菌の群集構造を明らかにする必要がある。近年発展著しい分子生物学的手法を用いた群集解析によって、*Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’ (以下、*Accumulibacter*)や *Actinobacteria* に属するポリリン酸蓄積細菌などいくつかのリン除去を担う細菌は同定されてきた。しかし、これまででポリリン酸蓄積細菌の全体像が明らかになったとは言い難い。

本研究では以下の 3 つの研究に分けて行った。①ポリリン酸蓄積細菌の群集解析及びグループレベルでの同定、②PCR-クローニング法を用いたポリリン酸蓄積細菌の系統学的な同定、③汚泥のリン含有率の生物

による寄与の評価及びポリリン酸蓄積細菌とリン含有率の相関性の解析、である。①および②では、ポリリン酸蓄積細菌の群集構造をおおまかに把握することを目的とし、③によって、それらの細菌のリン除去への寄与を考察する。

最終的に、これらの 3 つの研究によって得られた知見を統合することにより、実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の全体像の把握を目指した。

2. 実験方法

研究の流れを図 1 に示した。

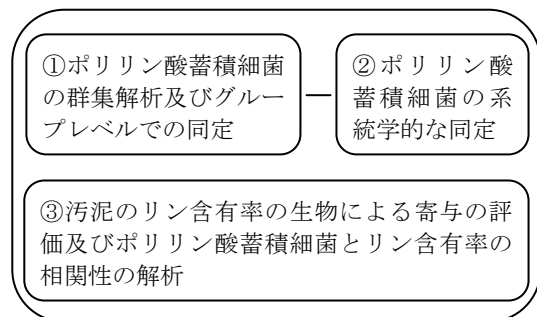


図 1 研究の流れ

FISH 法を中心とする分子生物学的手法を用いて、微生物群集解析を行った。FISH

法とは rRNA に相補的な配列を持った蛍光標識をつけたプローブによって特定微生物を検出する方法である。本研究で用いたプローブを表 1 に示す。この方法によって、①ポリリン酸グラニューールを染色する高濃度 DAPI 染色との組み合わせによるポリリン酸蓄積細菌に対する割合の定量、②系統的に特定できた細菌の検出、③真正細菌に対する標的細菌の割合の定量が可能である。

表 1 本研究で用いたプローブ

Probe	Specificity
Group specific	
ALF1b	Proteobacteria α
BET42a	Proteobacteria β
GAM42a	Proteobacteria γ
HGC69a	Actinobacteria
CF319a	CFB
GNSB_941	Green-non-sulfur-bacteria
LGC354mix	Firmucutes
TM7905	TM7
PAO	
PAOmix	Accumulibacter
Actino1011	Actino-PAO

①実処理場汚泥 6 試料と実験室汚泥 3 試料 (Run14; 酢酸系、Run5 ; ペプトン・酵母エキス系、Run13 ; グルタミン酸、アスパラギン酸系) に存在するポリリン酸蓄積細菌のうち各グループレベルプローブ及び Accumulibacter、Actino1011 陽性細菌で蛍光を発する細菌の割合を高濃度 DAPI と FISH の二重染色法により計数して定量した。

②Proteobacteria γ と Actinobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌の系統的な同定を試みた。それらにグループ特異的なプライマーによる PCR - クローニング法を行って、塩基配列の解読、プローブを設計して FISH 法により検出した。

③主要なポリリン酸蓄積細菌として同定されている Accumulibacter と Actino1011 陽

性細菌の真正細菌に対する割合を求め、汚泥のリン含有率との相関を求めた。活性汚泥には金属性のリンが含まれるため、それを除いた生物によるリン含有率を提案した。金属性リンは、冷却した弱酸(過塩素酸)で溶出させ測定した。

3. 結果及び考察

3.1 ポリリン酸蓄積細菌の群集解析

実処理場汚泥 6 試料に存在するポリリン酸を蓄積している細菌のうち各グループレベルのプローブで捉えられた細菌は、Proteobacteria β (Bet42a)、Actinobacteria (HGC69a)、Proteobacteria γ (GAM42a) に属する細菌のみであった。Proteobacteria α (ALF1b)、Cytophaga-flavobacteria-bacteroides (CF319a)、Green non-sulfur bacteria (GNSB_941)、Firmucutes (LGC354)、TM7(TM7905) に属する細菌のポリリン酸蓄積は確認することができなかった。

Accumulibacter、Actino1011 陽性細菌のポリリン酸蓄積細菌に対する割合はそれぞれ、20~60%を占め、これら 2 種を合わせると、50~80%を占めており、実処理場において主要なポリリン酸蓄積細菌であった。

しかし、上記の 2 種以外にも、Proteobacteria β 、Actinobacteria に属する球菌、桿菌などのポリリン酸蓄積を確認できている。また、Proteobacteria γ に属する細菌の中には、G バクテリアに類似した形状を持つポリリン酸蓄積細菌が存在していた。この 3 グループによって実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の 71%~88%を捉えることができた。

上述のように、実処理場に存在するポリ

リン酸蓄積細菌は、Proteobacteria β 、Proteobacteria γ 、Actinobacteria に属する細菌のみで、グループレベルで見たとき、その構成は似通っていたが、その存在割合は処理場ごとにばらつきがあることが分かった。

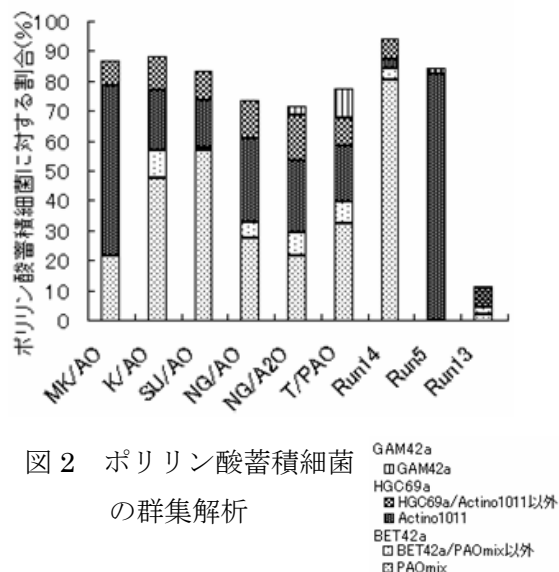


図2 ポリリン酸蓄積細菌の群集解析

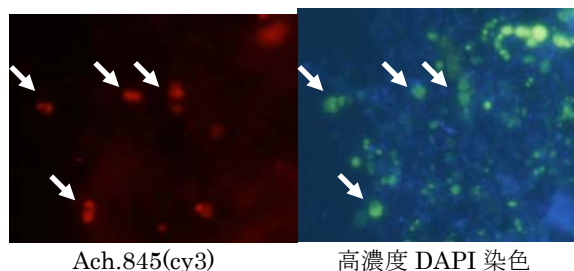
3.2 Proteobacteria γ 及び Actinobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌の同定

3.1の研究から、グループレベルで新規のポリリン酸蓄積が存在することが分かった。本節では、そのうちで、Proteobacteria γ に属する細菌と Run13 に存在するグループレベルプローブで捉えられなかった細菌の同定を試みた。Run13 で蛍光を発しなかった細菌に最適な細胞壁処理を行ったところ、これらは Actinobacteria に属する細菌であることが分かった。これと同じような群集構造が Run6(グルタミン酸系)でも形成されており、Run13 より群集構造が単純化されていたので Run6 の解析を中心に行った。PCR-クローニング法により得られたクローンを標的とするプローブを ARB に

よっていくつか設計した。それらの中で①の研究でポリリン酸を蓄積していた細菌と同じ形態をした細菌を捉えるプローブを設計することができた(表2)。これらにそれぞれ高濃度 DAPI と FISH の二重染色法を行ったところ、Ach.845 及び NOC.1032 プローブで捉えられる細菌がポリリン酸を蓄積していることを蓄積していることが分かった(図3、図4)。

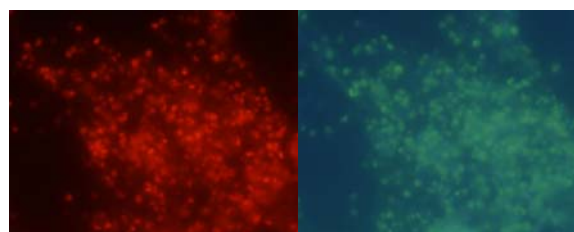
表2 設計したプローブの標的とする細菌

プローブ	標的の近縁種
Ach.845	Proteobacteria γ <i>Achromatium sp.</i>
NOC.1032	Actinobacteria <i>Nocardioides sp.</i>



Ach.845(cy3) 高濃度 DAPI 染色

図3 Ach.845 プローブを用いた FISH 法 (ポリリン蓄積の確認)



NOC.1032(cy3) 高濃度 DAPI 染色

図4 NOC.1032 プローブを用いた FISH 法 (ポリリン蓄積の確認)

3.3 実処理場活性汚泥のリン組成の解析及びポリリン酸蓄積細菌の定量評価

東京都の水再生センターの処理方式、処理系、日時の異なる 27 試料の採取を行った。汚泥中のリンを分画したところ、図5のよ

うになった。金属性リンは 2.2mgP/gVSS～14.4mgP/gVSS、汚泥全体のリンの 6～38% を占めていた。また、ポリリン酸蓄積細菌の代謝に関係のある生体内低分子ポリリン酸は 3.0mgP/gVSS から 29.8mgP/gVSS、汚泥全体のリンの 13～58% を占めていた。

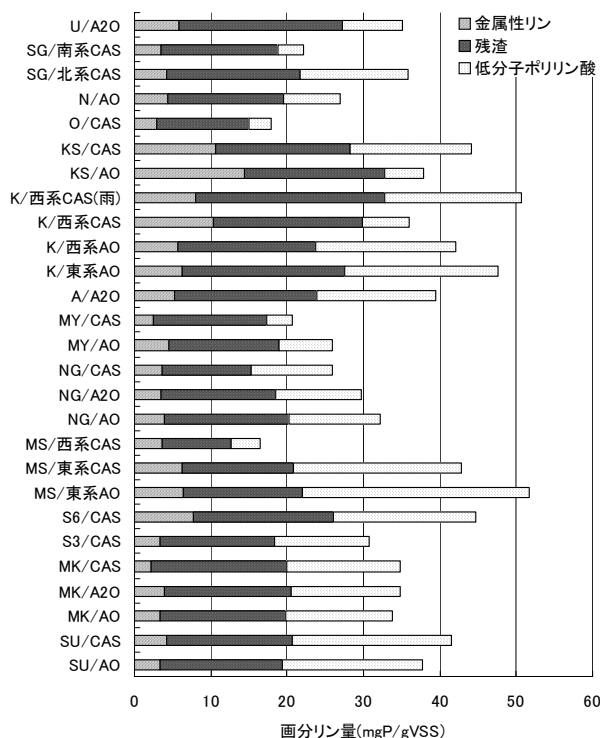


図5 実処理場活性汚泥のリン組成

FISH 法によって *Accumulibacter* と *Actino1011* 陽性細菌の真正細菌に対する割合をそれぞれ定量したところ、*Accumulibacter* は 0.5%～11.6% (平均 5.3%) 存在し、*Actino1011* 陽性細菌は 0.2～8.2% (平均 2.7%) 存在していた。これらの細菌と汚泥中の金属性リンを除いた生物学的リン含有率との相関を取ったところ、図6のようになった。*Accumulibacter* の存在量との相関は $R^2=0.62$ と高かった。また、*Accumulibacter* と *Actino1011* 陽性細菌の割合を単純に足し合わせた値との相関を取っても $R^2=0.62$ と高い相関が得られた。す

なわち、これらの細菌がリンを蓄積し、実際に汚泥のリン含有に寄与していることが分かった。しかし、汚泥のリン含有率はこの2種のみでは説明がつかず、その他のポリリン酸蓄積細菌の寄与が考えられた。

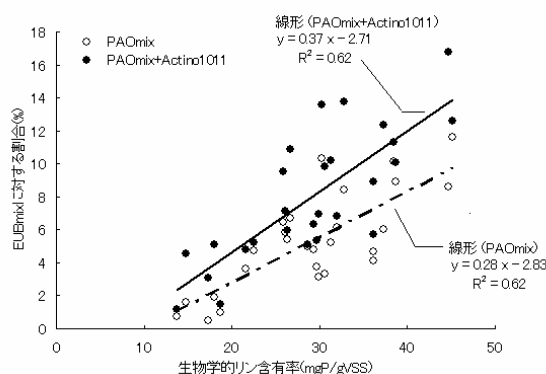


図6 *Accumulibacter* と *Actino1011* 陽性細菌の存在割合と生物学的リン含有率の相関

4. 総括

本研究により実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の全体像が大まかに把握することができた。実処理場において、*Accumulibacter* や *Actino1011* 陽性細菌が主要なポリリン酸蓄積細菌であったが、まだ同定がされていないポリリン酸蓄積細菌の寄与も大きかった。同定されていないポリリン酸蓄積細菌のうち、*Proteobacteria* γ と *Actino1011* に属するポリリン酸蓄積細菌の2種を系統的に同定することができた。これによりポリリン酸蓄積細菌の群集構造をさらに明確にすることができた。今後、さらなるポリリン酸蓄積細菌の同定およびそれらの寄与を解明することによって、これらの実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の全体像を完全に解明することができれば、生物学的リン除去プロセスのメカニズムの解明に寄与するはずである。