

# 活性汚泥中の PHA 蓄積細菌群集の分子生物学的手法による解析

## Molecular analysis of microbial community structure of

## PHA-accumulating organisms in activated sludge

学籍番号	46820
氏 名	押木 守 (Oshiki, mamoru)
指導教員	佐藤 弘泰 助教授

## 1. 研究背景と目的

現在の下水处理では、微生物の働きを利用した「活性汚泥法」が一般に用いられている。活性汚泥は複数種の微生物から成る複合系の微生物群集であるが、この中の一部の細菌が PHA (PolyHydroxyAlkanoate)蓄積能を有していることが知られている。これらの細菌は摂取した有機物を PHA の形態で貯蔵することができ、ある種の環境下においては PHA を用いた有利な生存戦略を図ることが知られている。

活性汚泥においてこのような PHA 蓄積の現象が広く観察されていることや、生物学的リン除去プロセスにおいては PHA 蓄積細菌の存在が重要視されていることなどから、活性汚泥内の PHA 蓄積細菌がどのような群集から成り立っているのかは興味深い。しかし、活性汚泥内の PHA 蓄積細菌に関する微生物学的な知見は乏しく、そもそも「PHA 蓄積細菌が活性汚泥中でどの程度の存在比を有しているのか？」といった基礎的な知見すら欠如している。PHA 蓄積細菌群集に関して基礎的な知見を収集することは活性汚泥プロセスの安定化に将来

的に貢献することができる可能性がある。本研究では活性汚泥内での PHA 蓄積細菌の群集構造に関して基礎的な知見を収集することを目指した。

## 2. 実験方法

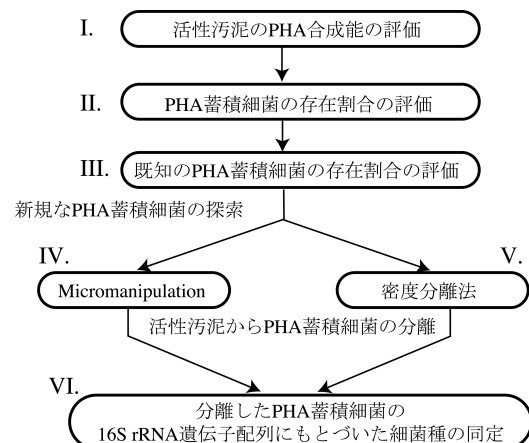


図 1 研究の全体像

図 1 に本研究の全体像を示した。まず, I. 節において酢酸を炭素源とした 2 時間のバッチ試験を行い、活性汚泥の有する PHA 合成能を評価した。なお, バッチ試験では好気, 亜硝酸, 硝酸, 嫌気条件を設定し, 電子受容体の違いが PHA 合成能に及ぼす影響も評価した。続いて II 節において, PHA を特異的に染色する Nile blue A(以降, NB と略する。)と, 全菌の核酸を染色する DAPI

を用いた二重染色を行い、バッチ試験後の活性汚泥に PHA 蓄積細菌が何割存在していたのかを定量評価した。III 節においては、これまでに PHA 蓄積能が確認されている *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” と *Candidatus* “*Competibacter phosphatis*” をそれぞれ検出する PAO mix, GB プローブを用いた FISH(*Fluorescent in-situ hybridization*)法を適用し、これらの細菌種が PHA 蓄積細菌群集内に占める割合を評価した。そして、活性汚泥中にこれらの細菌種以外の PHA 蓄積細菌がどの程度存在するのかを評価した。続いて、PHA 蓄積細菌を活性汚泥から分離し、細菌種の同定を試みた。活性汚泥から PHA 蓄積細菌を分離するための手法として、IV 節では *Micromanipulation* を用い、V 節では密度分離法を用いた。*Micromanipulation* ではガラスキャピラリーを用いて、NB 染色陽性細菌を活性汚泥から分離し、密度分離法においては PHA 蓄積細菌と非 PHA 蓄積細菌の有する浮遊密度の差を利用して、それぞれの分離を行った。IV, あるいは V の操作により分離された PHA 蓄積細菌から核酸抽出を行い、DGGE 法により解析を行った後に、興味のある DGGE バンドの塩基配列を特定した。最後に得られた塩基配列を系統解析し、PHA 蓄積細菌の候補種を特定した。

### 3. 実験結果および考察

三河島、中川、小菅処理場より活性汚泥を採取し、酢酸を唯一の炭素源としたバッチ試験を行ない、バッチ試験後の活性汚泥における PHA 含有率を評価した結果を表 1

に示す。三河島、中川処理場では AO 法だけでなく、A2O 法、CAS 法の運転回路からも活性汚泥を採取し、実験を行った。電子受容体の違いが及ぼした影響を三河島処理場 AO 法の試料と比較すると、好気(3.9%)、硝酸(1.9%)、亜硝酸(1.0%)、嫌気(0.7%)の順に PHA 含有率が低下しており、好気条件下において最も高い PHA 含有率が観察された。中川処理場の試料を用いて運転法の違いに注目して比較すると、AO 法(1.4%)、A2O 法(1.5%)、CAS 法(1.6%)となり、運転法の違いに関わらず同程度の PHA 含有率が観察された。また、異なる処理場間の最高 PHA 含有率を比較すると、三河島処理場(3.9%)、中川処理場(1.6%)、小菅処理場(1.8%)となり、三河島処理場において高い PHA 含有率が観察された。

これらの結果から、運転法や処理場の違いに関係なく、活性汚泥は一般的に PHA 合成能を有していることがわかった。また、PHA 合成には好気条件が最も適していることが判明した。

続いて、バッチ試験後の活性汚泥における PHA 蓄積細菌の存在割合を、NB 染色と

表 1 PHA 合成バッチ試験の結果

処理場名	運転法	電子受容体の種類	バッチ試験終了時のPHA含有率
三河島処理場	AO法	好気(O <sub>2</sub> )	3.9%
		亜硝酸(NO <sub>2</sub> )	1.0%
		硝酸(NO <sub>3</sub> )	1.9%
		嫌気(N <sub>2</sub> )	0.7%
	A2O法	好気(O <sub>2</sub> )	2.5%
		亜硝酸(NO <sub>2</sub> )	1.0%
		硝酸(NO <sub>3</sub> )	1.4%
		嫌気(N <sub>2</sub> )	0.0%
	CAS法	好気(O <sub>2</sub> )	3.7%
		亜硝酸(NO <sub>2</sub> )	0.9%
		硝酸(NO <sub>3</sub> )	1.2%
		嫌気(N <sub>2</sub> )	0.4%
中川処理場	AO法	好気(O <sub>2</sub> )	1.4%
	A2O法	好気(O <sub>2</sub> )	1.5%
	CAS法	好気(O <sub>2</sub> )	1.6%
小菅処理場	AO法	好気(O <sub>2</sub> )	1.8%

DAPIの二重染色によって、そしてPAO mix, GB プローブ陽性細菌の存在割合を FISH 法により評価した結果を図 2 に示す。

好気条件でバッチ試験を行った活性汚泥においてはいずれも PHA 蓄積細菌が全菌の約 1 割を占めていた。また、三河島処理場 AO 法の試料を用いて電子受容体の違いが及ぼした影響を評価すると、全菌に占める PHA 蓄積細菌の存在割合は好気条件で最も多く(約 14%), 硝酸(約 10%), 亜硝酸(約 7%), 嫌気(約 6%)の順に小さくなった。また、PHA 蓄積細菌群集において PAO mix, GB プローブ陽性細菌は 1~7 割程度を占めており、三河島処理場嫌気条件の試料以外では PAO mix, GB プローブ陽性細菌以外の細菌が主要な PHA 蓄積細菌であることがわかった。

これまでに知られていない PHA 蓄積細菌が活性汚泥中に多く占めることがわかったため、これらの PHA 蓄積細菌の同定を

試みた。PHA 蓄積細菌の分子生物学的同定を試みるに当たり、活性汚泥から PHA 蓄積細菌を分離する必要があった。当初は VI 節の micromanipulation による解析を行っていたが、芳しい結果が得られなかったため、新たな手法として V 節で密度分離法を適用し、PHA 蓄積細菌の分離を行った。中川処理場 AO 法、三河島処理場 A2O 法から採取した活性汚泥に対してそれぞれ 6, 15 時間のバッチ試験を行い、PHA 含有率を高めた活性汚泥を Percoll による密度分離に供した。密度分離後に得られた試料に対して NB と DAPI の二重染色を行った結果、密度分離後に得られた中川、三河島処理場の試料にはそれぞれ PHA 蓄積細菌が全菌の 9 割, 7 割存在し、密度分離法により PHA 蓄積細菌が高濃度に濃縮されたことを確認した。

続いて、密度分離法により得られた試料に対して FISH 法を適用した結果、中川(N),

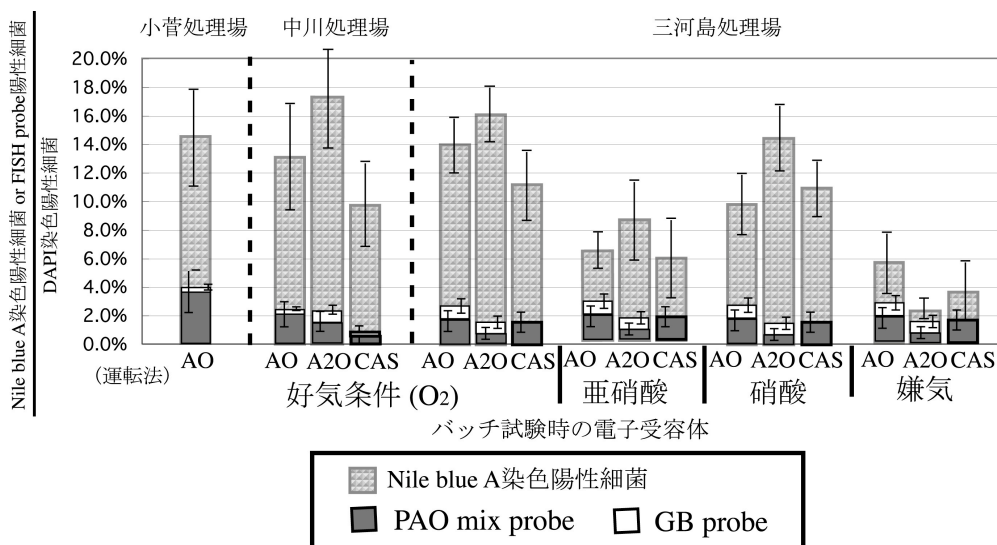


図 2 活性汚泥における PHA 蓄積細菌の存在割合および PAO mix, GB プローブ陽性細菌が占める割合

三河島(M)処理場の試料においてそれぞれ  $\beta$ -proteobacteria が (N:55%, M:57%),  $\gamma$ -proteobacteria が (N:14%, M:9%), Actinobacteria が(N:28%, M:28%)占めていることが明らかとなり、密度分離後に得られた試料はこれらの細菌群によって構成される群集構造を有していることがわかった。

密度分離後の試料から核酸抽出を行い、357fGC-907r,あるいは 968fGC-1392r プライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した後に、増幅産物を DGGE 解析し、興味のある DGGE バンドの塩基配列の特定、ならびに近縁種の推定を行った。その結果、中川処理場の試料から PAO mix 陽性細菌に帰属される塩基配列が得られ、また、中川、三河島処理場のいずれからも GB プローブ陽性細菌に帰属する塩基配列を得る事ができた。ここまでの結果により、密度分離法と DGGE 法を組み合わせることにより、PAO mix、GB プローブ陽性細菌といった活性汚泥中の PHA 蓄積細菌を同定できることが明らかとなった。

塩基配列を特定した DGGE バンドの中で、前述の FISH 法を用いた解析により検出された細菌群である $\beta$ -,  $\gamma$ -proteobacteria および Actinobacteria に帰属する塩基配列は PHA 蓄積細菌である可能性が高いと考えられるが、そのような細菌種としては $\beta$ -proteobacteria に属する 1. Dechloromonas-Ferribacterium-Azonexus lineage, 2. Thauera lineage, 3. Zoogloea lineage, 4. Comamonas-Acidovorax lineage 5. Putative novel  $\beta$ -proteobacteria が特定された。既往の知見か

らは、1, 2, 3, 4 グループの細菌種においては、これまでに単離された細菌株の中から PHA 蓄積能を有するものが報告されている。また、5 グループは酢酸を主な炭素源として運転されていたリアクターから検出されたクローンが属するグループであるため、酢酸の摂取に関与していた細菌種であることが示唆される。

#### 4. まとめ

本研究では活性汚泥における PHA 蓄積細菌の群集構造、ならびに細菌種の分子生物学的同定を目指した。その結果、活性汚泥は処理場や運転法の違いに関係なく、PHA 蓄積能を有し、活性汚泥中の細菌の約 1 割が PHA 蓄積能を有している事が明らかとなった。また、PAO mix, GB プローブを用いた FISH 法を適用した結果、活性汚泥中に存在する PHA 蓄積細菌の多くは未だ特定されていない細菌種であることが明らかとなった。そして、そのような細菌種を特定するために密度分離法と DGGE 法を組み合わせた解析を行ったところ、 $\beta$ -proteobacteria 内の 5 種類のグループが候補として特定された。

本研究では活性汚泥における PHA 蓄積細菌の群集構造を把握し、未知の PHA 蓄積細菌の候補種を特定することに成功した。活性汚泥における PHA 蓄積細菌の群集構造に関してはあまり研究が進んでいなかったが、本研究の成果の成果を利用し、更なる知見の充実が望まれる。