

# MAR-FISH 法を用いた ポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積細菌の競合関係の評価

MAR-FISH analysis of competition between  
poly-phosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms

学籍番号 56839  
氏名 藤原 和也 (FUJIWARA, Kazuya)  
指導教員 味埜 俊 教授

## 1. 研究背景と目的

下水中に含まれるリンを処理する方法として、生物学的リン除去プロセスがある。本プロセスでリン除去に主要な役割を果たしているのが、ポリリン酸蓄積細菌 (Poly-phosphate Accumulating Organisms; PAOs) である。PAOs は体内にポリリン酸を蓄積できることから、嫌気槽内で優先的に増殖することができるため、他の微生物よりも有利に増殖できると考えられている。しかし、生物学的リン除去プロセス内には PAOs と基質競合の関係にある細菌群も存在する。ポリリン酸の代わりにグリコーゲンを貯蔵物質として利用するグリコーゲン蓄積細菌 (Glycogen Accumulating Organisms; GAOs) は、有力な競合細菌と考えられている。何らかの原因で GAOs が優占した場合、リン除去は著しく悪化する。安定したリン除去を実現するためには、GAOs の増殖を抑え PAOs に有利な条件で運転することが不可欠だが、PAOs と GAOs の競合関係については十分な知見が得られておらず、どのように運転すれば、PAOs に有利な条件が達成されるのか、不明確なのが現状だ。

そこで本研究では、PAOs と GAOs の競合関係に関する知見を集積するため、MAR-FISH 法を用いて解析を行った。培養時の pH が、PAOs あるいは GAOs の基質摂取に及ぼす影響を調査し、異なる pH 条件が基質競合に及ぼす影響を解析した。

## 2. 実験方法

本研究の流れを図 1 に示す。

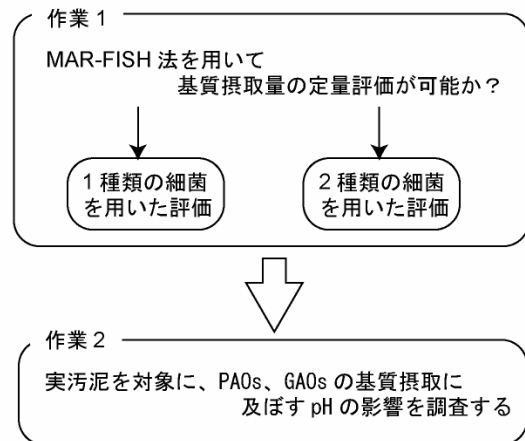


図 1 本研究の流れ

研究で使用した MAR-FISH 法は、MAR (Microautoradiography) 法と FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法とを組み合わせられた方法で

あり、どの細菌がどの基質を摂取したかを解析できる手法である。MAR 法では放射性同位体で標識した基質を細菌に摂取させる。するとその細菌からだけ、放射線が照射されるようになる。このサンプルを特殊な感光乳剤に接触させることで、菌体周辺に銀粒子の生成が観察される。これによって当該菌体が標識基質を摂取したことがわかる。FISH 法は特定の細菌種に特異的な遺伝子プローブを使用して、顕微鏡下でその細菌を識別することができる方法である。MAR-FISH 法は「誰が」「何を摂取したか」という情報を得るために多く用いられているが、「どれだけ摂取したか」という定量評価には用いられた事例は少ない。そこで本研究ではまず、MAR-FISH 法を用いて基質摂取量の定量評価が可能かどうか、確認することを試みた（作業 1）。MAR 法により、標識基質を摂取した菌体の周辺に生じる銀粒子の面積を測定し、その多寡が基質摂取量の多寡を表現しているかどうかを確認した。具体的には以下の 2 種類の実験を行った。実験 1: 純菌 (*E.coli* と *R.eutropha*) に対して、異なる量の基質を摂取させ、菌体周辺に生じる銀粒子面積（単位セルあたりの銀粒子面積）を算出、比較する。実験 2: 2 種類の純菌 (*E.coli* および *R.eutropha*) のどちらか一方に高濃度の基質を摂取させ、もう一方に低濃度の基質を摂取させて、菌体周辺に生じる銀粒子面積（単位セルあたりの銀粒子面積）を算出、比較する。

その後、実処理場から生物学的リン除去プロセスの汚泥を採取し、MAR-FISH 法を用いて PAOs と GAOs の競合関係を調査した。培養開始時の pH が異なる幾つかの系を用意し、培養初期の pH の違いが、PAOs あるいは GAOs の基質摂取量に及ぼす影響を調査した（作業 2）。

これにより、どの pH 条件でどちらの細菌が有利に基質摂取を行うのか、についての評価を試みた。作業 2 では同じ実験を 2 回実施した（実験 3-1 および実験 3-2）。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 MAR-FISH 法による基質摂取比較法の検討

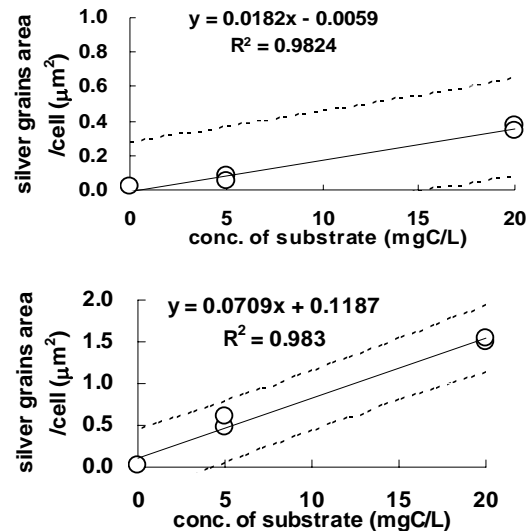


図2 実験1の結果。E.coliを用いた実験の結果(上段)と R.eutropha を用いた実験の結果(下段)を示す。実線は回帰直線を、点線は母平均の95%信頼区間を示す。

実験 1 の結果を図 2 に示す。E.coli を用いた場合でも R.eutropha を用いた場合でも、基質摂取量と菌体周辺に生じる銀粒子面積との間には、有意な正の相関が認められ (t-test,  $P < 0.05$ )、両者の間には直線回帰が認められた。このことから、放射性同位体で標識した基質を摂取した菌体に生じる銀粒子の面積は、摂取する摂取量が増加するに従って上昇することが明らかとなり、銀粒子面積を用いることで基質摂取量の多寡を評価することができることが示された。ただ、銀粒子面積の 95%信頼区間はある程度広い値を取っていることから、比較する銀粒子面積の値にわずかな差しか無い場合には、基質摂取量の大小の判定を慎重に行う必要がある

と考えられた。

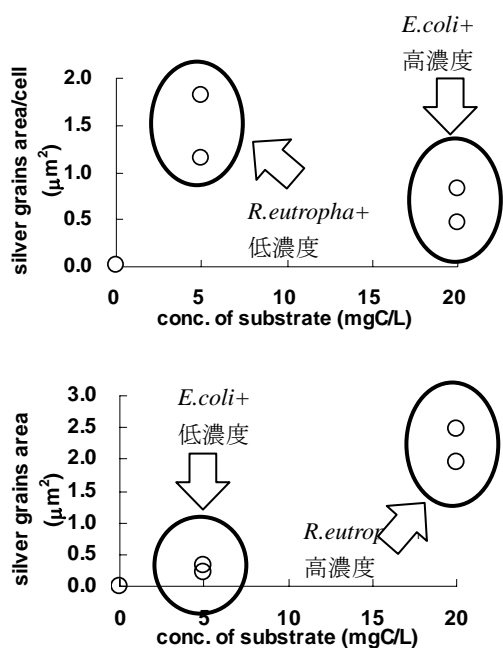


図3 実験2の結果. *E. coli* に高濃度の基質を摂取させ、*R. eutropha* に低濃度の基質を摂取させた実験(上段)と、*E. coli* に低濃度の基質を摂取させ、*R. eutropha* に高濃度の基質を摂取させた実験(下段)の結果。

実験2の結果を図3に示す。*R. eutropha* に低濃度の基質を摂取させ、*E. coli* に高濃度の基質を添加した実験系において、高濃度の基質を摂取させた *E. coli* の菌体周辺の銀粒子面積が、低濃度の基質を摂取させた *R. eutropha* のそれよりも小さい値を示した。このような結果が得られた理由として、放射性同位体で標識した基質が *E. coli* の菌体内で代謝され、外部に漏出した可能性が考えられた。このため、代謝様式の異なる複数の細菌種を対象として、銀粒子面積を用いて基質摂取量を評価することは、適当でないと考えられた。

### 3.2 pHがPAOs、GAOsの基質摂取に及ぼす影響の調査

実験1により、1種類の細菌が対象の場合は、銀粒子面積を用いて基質摂取量の多寡を評価できることが確認された。そこで実汚泥を用いて、培養時のpHがPAOsあるいはGAOsの基質摂取に及ぼす影響を、銀粒子面積を用いて評価した。結果を図4および図5に示す。

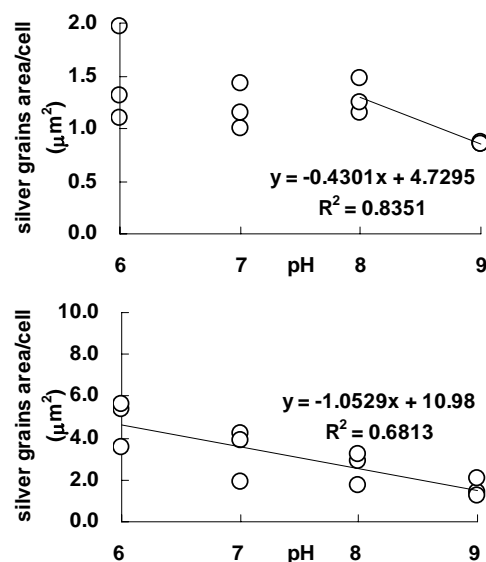


図4 実験3-1の結果. 培養初期のpHとPAOs(上段)あるいはGAOs(下段)周辺に生じた銀粒子の単位セル当りの面積..

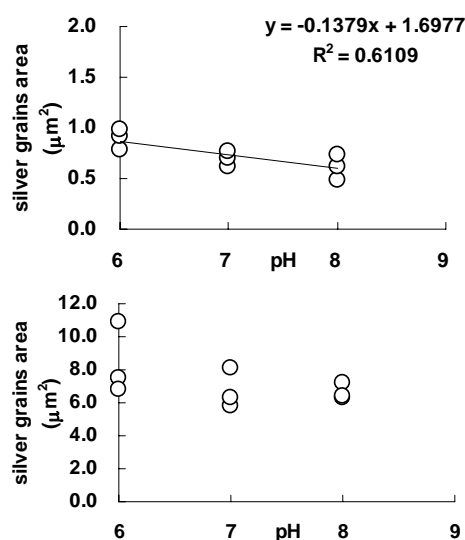


図5 実験3-2の結果. 培養初期のpHとPAOs(上段)あるいはGAOs(下段)周辺に生じた銀粒子の単位セル当りの面積.

実験 3-1 においては、Accumulibacter の基質摂取は pH 6 – 8 において変化が見られなかった。一方で pH 9 では pH 6 – 8 よりも有意に低い値を示した。pH 8 から 9 の範囲では、pH と銀粒子面積の間に負の相関関係が認められ (t-test,  $P < 0.05$ )、強い直線回帰が認められた (t-test,  $P < 0.01$ )。このため、Accumulibacter の基質摂取は pH 6 – 8 では pH の影響を受けず、pH が 9 まで上昇すると、負の影響を受ける可能性が示された。また Competibacter の基質摂取は pH 6 – 9 にかけて、pH の上昇に従って減少する傾向が見られた。銀粒子面積と pH の間には強い直線回帰が認められ (t-test,  $P < 0.05$ )、pH の上昇に伴って基質摂取が徐々に低下していく可能性が強く示唆された。

ところが、実験 3-2 からはこれと逆の結果が得られた (図 5)。Accumulibacter については、pH と銀粒子面積の間に有意な負の相関関係が認められた (t-test,  $P < 0.05$ )。このことから、Accumulibacter の基質摂取が、pH の上昇に伴って悪影響を受ける可能性が示された。また、Competibacter については pH と銀粒子面積の間に相関が認められず (t-test,  $P > 0.05$ )、pH が銀粒子面積に影響を及ぼしているとは言えなかった。

実験 3-1 および 3-2 の結果から、培養初期の pH が PAOs あるいは GAOs の基質摂取に及ぼす影響は一定でないとの結果が得られた。

#### 4. まとめ

本研究では、MAR-FISH 法によって基質摂取量の定量的な評価が可能かどうかを確かめたのち、MAR-FISH 法を用いて pH が PAOs あるいは GAOs に及ぼす影響について調査した。

MAR-FISH 法による定量評価の可否を調査

した結果、1 種類の細菌種を対象にした場合には、MAR-FISH 法を用いて基質摂取量の多寡を評価できることが示された。ただし、(1) 比較する銀粒子面積の値の差がごくわずかである場合には、基質摂取量の大小の判定は慎重に行う必要があること、(2) 複数の細菌種の基質摂取量を直接比較するのに、MAR-FISH 法を使用するのは不適當であること、が示された。

その後、MAR-FISH 法を用いて、初期 pH が PAOs あるいは GAOs の基質摂取量に及ぼす影響を調査した。結果、初期 pH は PAOs あるいは GAOs の基質摂取に悪影響を及ぼす場合と、そうでない場合とが両方観察された。このことから、培養時の pH が PAOs あるいは GAOs の基質摂取量に及ぼす影響は一定で無い可能性が示唆された。このため培養時の pH と PAOs-GAOs の競合の関係性 (どの pH 条件でどちらの細菌が有利に基質摂取を行っているか) については、明確な知見を得ることができなかった。pH が PAOs あるいは GAOs に及ぼす影響を把握するためには、実験 3-1、3-2 と同様実験を繰り返すことによって、多くのデータを収集する必要があると考えられた。