

# 分子生物学的手法を用いた水処理装置の 微生物診断技術

Molecular biological techniques for the analysis of  
microbial communities in biological water treatment plant



(技)第2研究開発部第5研究室  
赤 司 昭  
Akira Akashi

活性汚泥処理方式を初めとする生物学的水処理装置は古くから多用されてきた。しかしながら、それらに参与する微生物に関する知見はほとんどないのが現状である。その理由として従来の培養を介する分析方法では、培養できない微生物が多く存在するため、処理に係わる微生物の全貌を解析できないことが挙げられる。しかし、最近の分子生物学的手法の発達により、培養を介さずに環境や処理装置内の微生物集団を解析することが可能になった。本稿では、FISH法、DGGE法等の分子生物学的手法に基づいた水処理装置内の微生物集団の解析手法について紹介すると共に、嫌気性廃水処理装置内の微生物集団の解析例について紹介する。

Biological water treatment processes such as activated sludge have been widely used. But our understanding of those microorganisms is limited, since many environmental bacteria cannot be cultivated by conventional techniques. Recent molecular biological techniques provided us new approaches to understand the dynamics of microbial communities in environment or biological water treatment plants. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) provides us a powerful tool to detect the target bacteria in microbial communities. By using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), we can analyse the diversity microbial community. These novel techniques would offer us useful information for the optimization of process operation and the development of high performance equipments.

## **Key Words :**

生物学的水処理  
分子生物学的手法

Biological water treatment  
Molecular biological technique polymerase chain  
reaction (PCR), denaturing gradient gel electropho-  
resis (DGGE), fluorescent *in situ* hybridization  
(FISH)

## まえがき

活性汚泥を初めとする廃水処理や鉄バクテリアを用いた上水からの鉄除去等、生物学的用・廃水処理は、運転費用が安価であり運転方法さえ適切であれば優れた性能を発揮することから、古くから頻用されてきた。また、産業界で最も利用されている微生物利用は廃水処理であると言われてるように、微生物を利用した用・廃水処理は我々の生活に深く関わっている。しかし、それらに係わる微生物に関する知見は、他の産業、例えば、醸造や医薬品製造などで利用される微生物に比べ貧弱と言わざるを得ない。

その理由は主に2つの理由に起因すると考えられる。まず、醸造や医薬品製造等に利用される微生物は、純粋培養されたものであるのに対し、廃水処理では種々の微生物から構成される集団を利用する点である。つまり、前者では、ある特定の優れた機能を持つ微生物を利用するため、その微生物の代謝や遺伝学に関する詳細な研究が進められ、変異や遺伝子操作等により種々の改良が進められてきた。一方、用・廃水処理では、多種多様な微生物の作用によりその性能が得られるため、一般的には、特定の微生物に着目しても、その微生物の機能が、処理性能を反映しているとは言い難い。第2に、今までは、この微生物集団を解析する適切な手法がなかった点である。従来の微生物の検出方法として、ある栄養素を含んだ寒天培地にサンプルを塗布し、そこに生育したコロニーの数で対象とするサンプルに生息する微生物の数を推定する方法（培養法）が広く採用されてきた。しかし、培養可能な微生物は、実際に環

境や廃水処理装置内に存在する微生物のせいぜい10%程度と言われており<sup>2)</sup>、残りの90%以上の微生物は、生きてはいるが培養できない（Viable but nonculturable: VNC）<sup>3)</sup>ことになる。したがって、培養可能な微生物だけを対象とした研究では、用・廃水処理装置の性能（処理水質）と微生物の関係を正しく把握することは不可能である。

最近、分子生物学的手法の発達により、培養操作をおこなうことなく微生物集団を解析することが可能になった。本稿では、分子生物学的手法を用いた水処理装置内の微生物集団の解析方法について概説する。

## 1. 細菌数の測定

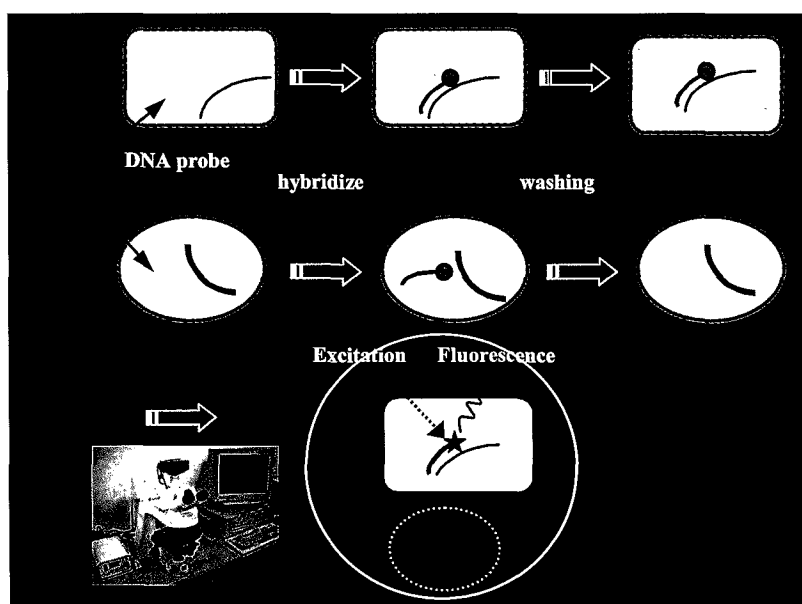
### 1.1 全菌数の測定

培養に依存しない微生物の計数法として、顕微鏡下で直接計数する方法がある。すなわち、微生物細胞内のDNAやタンパク質と親和性のあるDAPI（4,6-diamidine-2-phenylindole）、あるいは、FITC（Fluorescein-isothiocyanate）などの蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡で観察する方法である。本方法は、分散性の良いサンプルの場合正確に菌数を測定することができるが、活性汚泥のようにフロックを形成している場合には、超音波処理等の前処理を行い分散する必要がある。

### 1.2 特定細菌の計数

#### 1.2.1 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法)

蛍光色素を用いた方法では、全細菌数の計測は可能であるが、目的とする特定の細菌との区別はできない。特に、硝化・脱窒やメタン発酵のように特殊



第1図 FISH法の原理  
Fig. 1 Principle of FISH

な機能を有する細菌が、全細菌の中にどれだけ存在するか調べたい場合には、FISH法 (fluorescent *in situ* hybridization 法) により解析可能である。第1図に示すように、FISH法は、蛍光標識したDNAプローブと細菌の標的遺伝子を反応 (hybridize)<sup>4)</sup> させ、目的とする細菌だけを検出する方法である。一般的には、細菌の標的遺伝子として16SrRNAが多用される。16SrRNA分子には、細菌の科、属、種レベルで共通の配列が存在するので、目的とする細菌に応じたDNAプローブを使用することにより、特定の細菌だけを検出できる。また、16SrRNAの細胞内の量と細菌の活性は関連するので、個々の細菌の蛍光強度からそれぞれの細菌の相対活性を把握することも可能である。

本法は、単に目的とする細菌を計数できるだけでなく、グラニュール汚泥のように、立体構造をもつ微生物群集内における特定細菌の分布を目視的に観察できる等の利点がある。逆に、16SrRNAの量が少ない、つまり、活性の低い細菌は蛍光強度が弱いため検出は困難である<sup>8)</sup>。また、目的とする細菌以外の細菌とのDNAプローブの非特異的結合、自家蛍光等の問題がある。さらには、DNAプローブが設計されている細菌しか検出できない欠点もある。

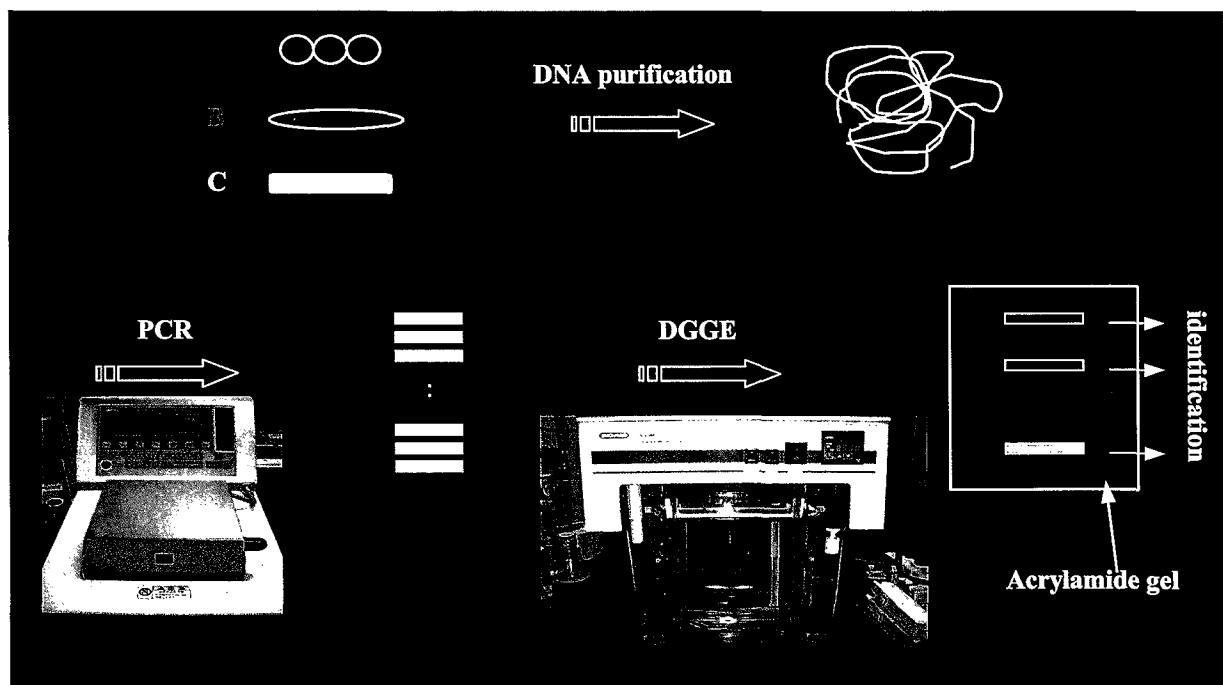
FISH法の適応例として活性汚泥のアンモニア酸化細菌を解析した例がある。アンモニア負荷が高い集積培養系では、アンモニア酸化細菌の検出と計数

は可能であったが、都市下水処理場や河川のようにアンモニア負荷の低い場合は検出が困難であった。<sup>8)</sup> 感度を上げる方法として、YamaguchiらによりHNPP/Fast Red TR-FISH法が開発された<sup>9)</sup>。本法を用いることにより、従来のFISH法に比べ約10倍の蛍光強度を得ることができ、今までは検出困難であった河川水中の細菌群集構造の解析が可能になった。<sup>10)</sup> その他にも、嫌気性廃水処理装置のグラニュール汚泥の古細菌 (メタン生成菌) と真性細菌 (酸生成菌) の分布状態の解析、<sup>11), 12)</sup> バルキングの原因となる活性汚泥中の糸状性細菌の検出例など種々の細菌の検出に利用されている。<sup>13), 14)</sup>

## 2. 細菌の多様性の解析

### 2.1 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE 法)

前述のように、生物学的水処理装置内には、多種多様な細菌種が存在する。これらの細菌の多様性を解析する手法としてDGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法がある。<sup>15)</sup> 一般的には、細菌の16SrRNA遺伝子の特定領域 (variable region と呼ばれる領域で、その配列は細菌種毎に異なる) をPCR (Polymerase Chain Reaction) で増幅した後、ポリアクリルアミドゲルを支持体とするゲル中で電気泳動し、16SrRNAの塩基配列の違いで分離する方法である (第2図)。2本鎖DNA (PCR産物に2本鎖DNA) に比べ、部分的に1本鎖に解離したDNAはポリアクリルアミドゲル中で移動度が遅



第2図 DGGE法の原理  
Fig. 2 Principle of DGGE

くなる。また、2本鎖DNAの解離は、温度、変性剤濃度と塩基配列が関係する。したがって、変性剤（尿素とホルムアミドの混合物）が濃度勾配を形成して存在するポリアクリルアミドゲル中で電気泳動をすると、同じ長さのPCR産物でもその塩基配列の違いによりDNAの解離度が異なり、分離することができる。DGGEにより分画したバンドの1本1本は異なる微生物に由来するので、バンドのパターンから生息する微生物の多様性を把握することができる。さらに、電気泳動により分画したDNAバンドをゲルから抽出して再度PCRにより増幅後、その遺伝子配列を調べ、データベースからその菌種を推定することも可能である。

PCRにより増幅する対象を16SrRNA遺伝子(DNA)とするか16SrRNAそのものとするかで得られた結果の解釈が若干異なる(第3図)。16SrRNA遺伝子(DNA)をターゲットとしてPCRを行い、DGGE解析した場合、存在する細菌種の多様性を知ることができる。一方、16SrRNAをターゲットにしてPCR、厳密にはRT-PCR(Reverse Transcriptase-PCR)、を行いDGGE解析した場合細菌種の多様性の他に、各細菌の活性を調べることも可能である<sup>16)</sup>。

本法は、種レベルで処理装置内の細菌の多様性や活性を把握できる点で極めて有用な技術であるが、いくつかの問題点も指摘されている。まず、微生物からの核酸(DNA, RNA)の抽出効率である。つまり、処理装置内には、多種多様の微生物が存在し、それぞれの微生物の殻(細胞壁)の固さもまちまちである。したがって、核酸の抽出方法によっては、壊れやすい微生物の核酸が優先的に抽出される恐れがある。次に、PCR反応時のバイアスやキメラ生成の問題も指摘されている。また、DGGE自体も使用するポリアクリルアミドゲルの濃度や変性剤の

濃度勾配の違いにより解像度が大きく変わることを我々は経験している。

DGGE法は、未知の微生物群集の多様性を比較簡単に解析できるため、様々な処理装置の微生物を対象に多くの研究が行われてきた。コンポスト化過程における微生物種の変遷<sup>18), 19)</sup>やバイオレメディエーション実施時の細菌群集構造解析<sup>20)</sup>あるいは、嫌気消化槽グラニュール汚泥の酸生成菌やメタン菌の多様性解析<sup>21)</sup>等枚挙にいとまがない。

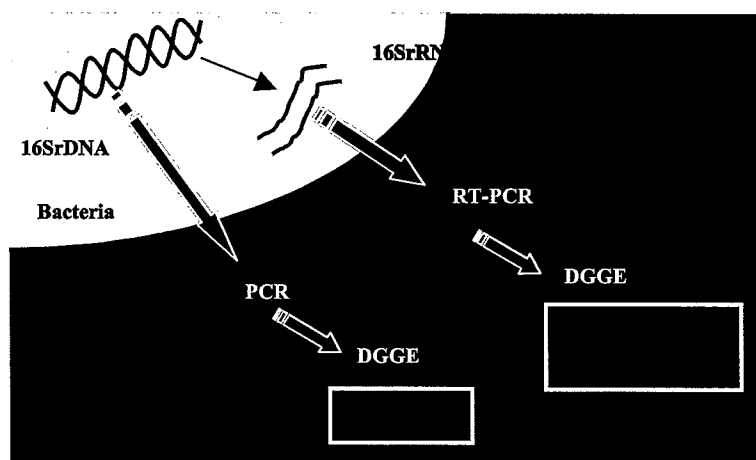
## 2.2 その他の手法

DGGEの他に細菌種の多様性の解析に多用される手法として、T-RFLP(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)がある。これは、5'末端を蛍光標識したプライマーを用いて行ったPCR産物を適当な制限酵素で切断した後、蛍光物質で標識されたDNA断片をDNAシーケンサー等で分画する方法である<sup>22)</sup>。そのDNA断片の位置から細菌種を比較することが可能であり、また、断片の数から細菌種の多様性を解析することができる。本法もDGGE法と同じく微生物からの核酸の抽出とPCR増幅を伴うため、それらに係わる問題点が指摘されている。本法の適応例として、下水処理場の活性汚泥の解析等がある<sup>23)</sup>。

## 3. DGGE法によるフタル酸処理UASBの嫌気性微生物群の解析例

### 3.1 背景

フタル酸化合物は、プラスチック製品の可塑剤として多用されており、世界で年間1~2億トン生産されている。従来、フタル酸化合物を含む廃水は、活性汚泥で処理されてきたが、近年嫌気性廃水処理を適応する例が多くなってきている。しかし、フタル酸化合物の分解に係わる嫌気性細菌に関する知見は全くない。以下に、フタル酸化合物処理装置の安定かつ高効率な運転管理を行うための知見を得るこ



第3図 DGGE法による微生物の多様性と活性の解析

Fig. 3 Analysis of microbial diversity and activity by DGGE

とを目的として実施した微生物集団の解析例について紹介する。

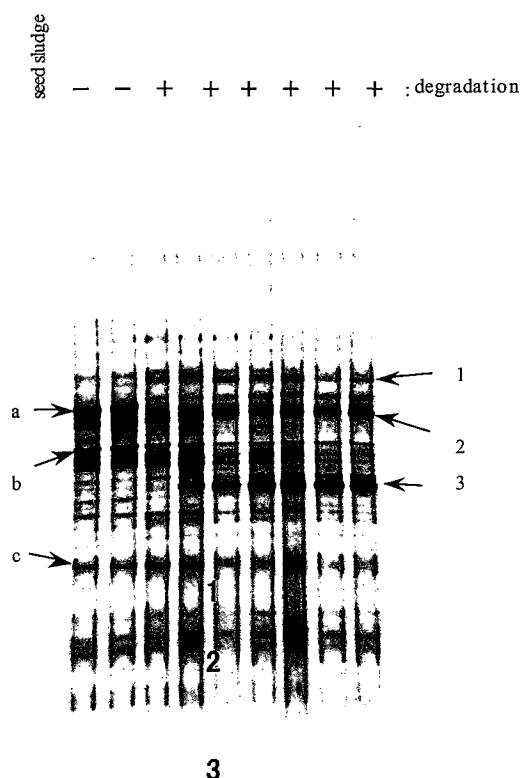
### 3.2 実験方法

フタル酸化合物の分解に関与する微生物の解析が容易に行えるようフタル酸化合物を唯一の炭素源とする廃水で装置を立ち上げた。種汚泥として、ビール工場のグラニューール汚泥を使用した。フタル酸濃度の測定は、HPLCにより測定した。グラニューール汚泥は適宜サンプリングし、核酸を抽出した。その核酸の16SrRNAの特定領域をPCRにより増幅した後、DGGE解析に供した。また、DGGEパターン解析の結果、種汚泥及びフタル酸未分解時には観察されず、分解時に特異的に出現したDNAバンドをフタル酸化合物の分解に関与する微生物と推定した。

### 3.3 結果

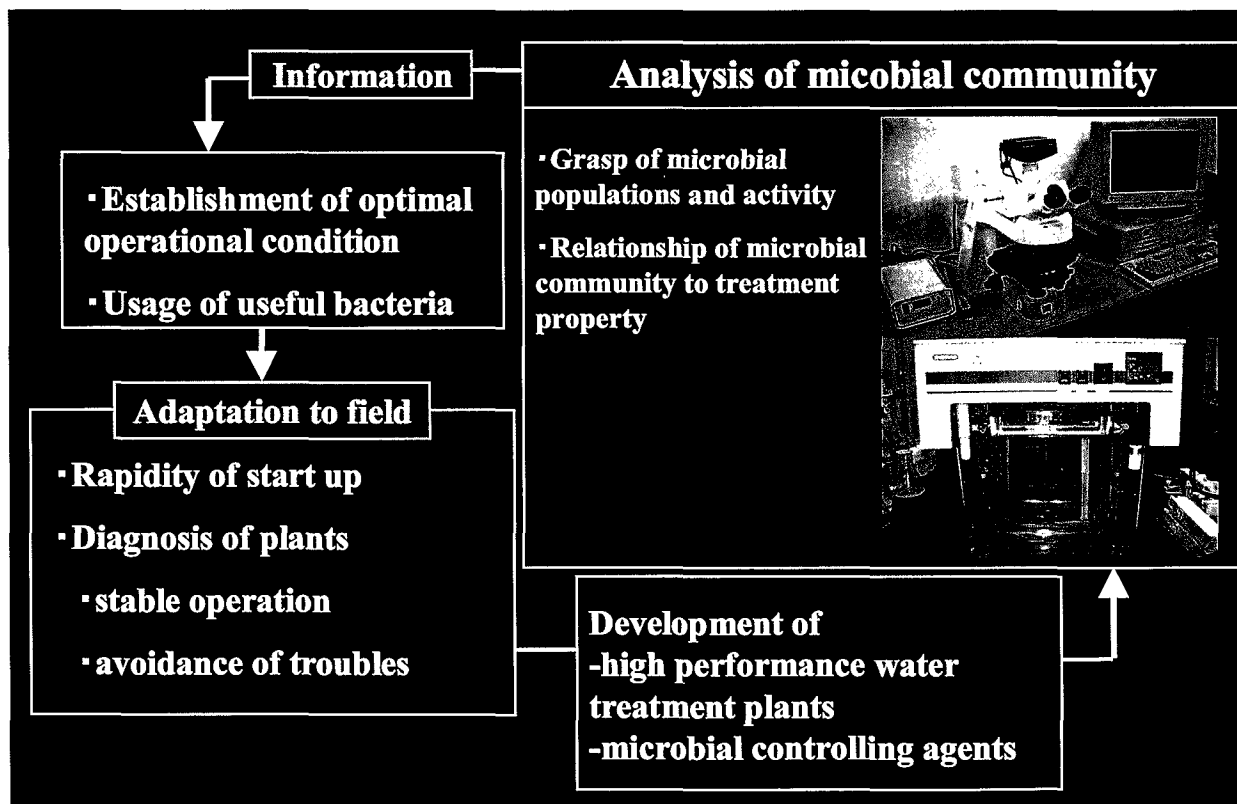
投入したグラニューール汚泥にフタル酸化合物の分解活性が出現するまでに約2ヶ月という長期間を要した。これは、ビール工場というフタル酸化合物との接触がない装置のグラニューール汚泥を種汚泥として用いたためだと思われる。

第4図に処理過程の様々な時期に採取したグラニューール汚泥に存在する真性細菌（酸生成菌，フタル酸化合物分解菌も含まれる）の多様性をDGGE法で解



第4図 DGGE法によるフタル酸化合物処理装置内の細菌群の解析

Fig. 4 DGGE analysis of microbial community in phthalic acids-degrading anaerobic granular sludge



第5図 分子生物学的手法による水処理装置内の微生物の解析と応用

Fig. 5 Molecular biological techniques for analysis of microbial communities and their applications

析した結果を示す。それぞれのバンドは、基本的には一つ一つの細菌種に対応している。したがって、バンドパターンを比較することにより、処理過程での細菌種の変遷、ひいては、フタル酸分解活性を持つ細菌を特定することが可能となる。なお、本実験は、16SrRNAをターゲットとしたRT-PCR産物をDGGEにより解析した。したがって、出現したバンドの濃度が濃い細菌種は、活性が高い（つまり、活発に活動している）ことを意味する。

種汚泥やフタル酸化合物の分解活性が見られないときにa, b, cの3本のバンド（細菌）は、時間が経過するに従って消滅、あるいは、濃度（活性）は低くなった。一方、1～3の3本のバンド（細菌）は、種汚泥やフタル酸化合物の分解がない汚泥には存在せず、分解活性が見られる汚泥にのみ見られた。従って、これら3本のバンド（細菌）がフタル酸化合物の分解に関与していると考えられる。

以上のように、DGGE法を用いることにより、比較的短時間で目的とする微生物を推定することができる。今後は得られた情報を基に、運転管理の最適化や高効率処理装置の開発に結びつけるような研究に発展させていきたい。

## むすび

分子生物学的手法の適応により、今までブラックボックスであった生物学的水処理装置内の微生物に解明の手が及ぶようになった（第5図）。しかし、今まで発表された論文等を眺めてみると、「ある手法を用いて処理装置内の微生物群集の解析が可能であった」止まりで、装置の処理性能との関連づけを行った研究は少ないように思われる。我々水処理に係わるものにとっての最大の関心事は、微生物の状態と装置の処理性能との関連づけであり、今後はこの研究をいかに実施し、運転管理や装置開発に適応

するかが重要になると思われる。さらには、運転管理に携わる現場の方々にとっては、リアルタイムな、あるいは、装置の状態の予測が可能なデータの入手が最も重要であると思われる。これらの点も考慮しながら今後の研究開発を進めていきたいと考える。

## [参考文献]

- 1) 金川貴博：バイオサイエンスとインダストリー, 59 (2001), p731
- 2) Amman,R.I. et al. : Microbiol. Rev.,59 (1995), p.143
- 3) Colwell,R.R., et al. : Bio/Technol.,3 (1985), p.817
- 4) Ammann,R.I et al. : Appl. Environ. Microbiol.,58 (1992) p.3007
- 5) Gutell, R.R., et al. : Microbiol. Rev., 58 (1994), p.10
- 6) Van de Peer et al. : Nucl. Acids Res., 24 (1996), p.3381
- 7) Wagner, R. : Arch. Microbiol., 161 (1994), p.100
- 8) 小沼晋他：環境工学論文集：36 (1999), p.19
- 9) Yamaguchi, N. et al. : Appl. Environ. Microbiol., 62 (1996), p.275
- 10) 山口進康他：用水と廃水, 39 (1997), p.12
- 11) 荒木信夫他：環境工学論文集, 36 (1999), p.11
- 12) Markel, W., et al. : Wat. Res., 33 (1999), p.2392
- 13) Wagner, M. et al. : System. Appl. Microbiol., 17 (1994), p.405
- 14) Kanagawa, T. et al., : Appl. Environ. Microbiol., 66 (2001), p.5043
- 15) Muyzer, G et al. : Appl. Environ. Microbiol., 59 (1993), p.695
- 16) Duineveld, B. M et al., : Appl. Environ. Microbiol., 67 (2001), p.172
- 17) 石井浩介他：Microbes Environments, 15 (2000), p.59
- 18) Aoshima, M. et al., : J. Biosci. Bioeng., 91 (2001), p.456
- 19) Pedro, M. S., et al., : J. Biosci. Bioeng., 91 (2001), p.159
- 20) 谷桂津治他：環境技術, 30 (2001), p.27
- 21) Wu, J-H., et al., : Microbiology, 147 (2001), p.373
- 22) Liu, W., et al., : Appl. Environ. Microbiol., 63 (1997), p.4516
- 23) Hiraishi, A. et al., : J. Biosci. Bioeng., 90 (2000), p.148

## 連絡先

赤 司 昭 技術開発本部  
(医学博士) 第2研究開発部  
第5研究室  
主任研究員  
T E L 078 - 992 - 6525  
F A X 078 - 992 - 6504  
E-mail a.akashi@pantec.co.jp