FISH 法を用いた下水処理場活性汚泥中の細菌群集構造解析

秋山 隆志* 佐藤 弘泰** 味埜 俊** 松尾 友矩*

Analysis on Bacterial Community Structure in Activated Sludge of Wastewater Treatment Plant Using Fluorescence *in situ* Hybridization

Takashi AKIYAMA *, Hiroyasu SATOH**, Takashi MINO** and Tomonori MATSUO*

*Department of Urban Engineering, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656 Japan

**Department of Environmental Studies, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656 Japan

Abstract

Twenty activated sludge samples were collected from 15 wastewater treatment plants in 4 prefectures (Hokkaido, Saitama, Tokyo, and Okinawa) in each season throughout 1 year. They were analyzed by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) technique with 6 oligonucleotide probes (targeted for *Proteobacteria* α -, β -, γ -subclasses, Gram positive high G+C content group, *Cytophaga-Flavobacterium*, and *Eubacteria*), and image analysis using confocal laser scanning microscope (CLSM). Experimental results showed that: In every season *Proteobacteria* was predominant in more than half samples and among *Proteobacteria*, α - and β -subclasses were predominant in almost all samples. Any clear relation between bacterial community and geographical condition or treatment method was not observed. Either, any clear correlation between water qualities and bacterial population was not observed. But some seasonal change was remarkable; increase of α -subclass from winter to summer and decrease from summer to winter, and the opposite tendency of HGC group.

Keywords: activated sludge, wastewater treatment, Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), bacterial community structure

1.はじめに

活性汚泥による廃水処理はこれまで専ら経験的知見に基づいて管理や設計が行われてきた。しかし、近年廃水処理の高度化・安定化が求められるにつれ、多様な微生物群集の中で特に重要な役割をもつ微生物それぞれの、能力や特徴を考慮した運転管理が必要になってきている。

例えば硝化運転では通常の活性汚泥法より SRT を長めにとるが、これは活性汚泥中の平均的な微生物群より成長速度が遅いアンモニア酸化菌の性質を踏まえた運転方法である。あるいは、バルキング対策には嫌気好気プロセスや無酸素好気プロセスが解決策の一つとしてあげられるが、これは日本のバルキングの主たる原因である Eikelboom Type 021N が、脱窒能力を持たないために嫌気/無酸素下では増殖できないという特徴をうまく利用した解決策である。このように、窒素除去、リン除去、バルキング防止という活性汚泥法に関する3つの大きな問題については、そこにいる微生物の種類を考慮せずには語ることができない。

リン除去については、古くから脱リン細菌を捉える試みが EBPR (Enhanced Biological Phosphate Removal) プロ

セスについて行われてきた。その結果、プロテオバクテリア (紅色細菌) の中でも、 γ プロテオバクテリアサブクラスに属する、*Acinetobacter* 属の微生物が、EBPR プロセスでは大多数を占めているのではないかという結論が、いくつかの寒天培地を使った平板培養法による研究から導き出されていた。

1960年代から急激に発展してきた分子生物学は、1990年代に入って活性汚泥中の微生物群集構造へのアプローチに使われるようになった。その一つに FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法があげられる。FISH 法は微生物細胞の16S/23S rRNA をターゲットとし、検出したい微生物群集に特異的な配列に対して相補的な DNA 配列をもった15-20塩基程度のオリゴヌクレオチドプローブを、*in situ* でハイブリダイズさせ、観察・定量するものである。このため、培養中に微生物構造が変化するというバイアスがかかる余地がなく、ありのまま (*in situ*) の微生物構造を観察できるという点で非常に優れている。

FISH 法による EBPR プロセスの研究は、EBPR プロセス中の微生物群集構造に関する概念を根本から覆し、*Acinetobacter* はほとんど EBPR プロセス中に存在しない

*東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 〒113-8656 文京区本郷 7-3-1

**東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 〒113-8656 文京区本郷 7-3-1

Fig.1 Bacterial community structure in EBPR.

#1,2:Wagner *et al.*, 1993, Germany
 #3-7:Wagner *et al.*, 1994, Germany
 #8:Bond *et al.*, 1994, Australia (clone library)
 #9: Manz *et al.*, 1994, Germany
 #10,11:Kämpfer *et al.*, 1996, Germany
 #12:Snaird *et al.*, 1997, Germany

*a: Each legend entry should be referred to “Abbreviation of the target group” in Table 2

ことを明らかにした。Wagner, Bond, Manz らによる FISH 法およびクローンライブラリ法を用いた研究によれば、活性汚泥中で優占的なのはプロテオバクテリアクラスであり、その中でもβサブクラスが優占的である、という点で一致している¹⁾⁶⁾ (Fig. 1)。しかし、ドイツ国内はおろか、オーストラリアという地理的に大きく離れ、生活様式も異なる地域の活性汚泥中の微生物構造が似ているという事実に対しては更に検証が必要であろう。

本研究はこれらの結果を受けて、EBPR プロセスにとどまらず日本の様々な地域・規模・処理方式の活性汚泥試料を集め、FISH 法を用いて分析することにより、既往の結果について検証・比較するとともに日本の活性汚泥像を明らかにし、また水質データなどと比較することによって微生物群集を決定付ける要因を見出すことを試みた。

2.実験方法

2.1 試料採取時期及び場所

試料採取は'97 年秋 (11 月) に 1 回目の採取を行い、以降季節変化を追えるように'98 年 2 月 (冬)、'98 年 5 月 (春)、'98 年 8 月 (夏) の計 4 回、1 年間にわたって行った。試料採取場所は、できるだけ異なるサンプルが得られるように下水処理場を選定し、亜寒帯:北海道 3 処理場 3 系列、温帯都市近郊:埼玉県 4 処理場 4 系列、温帯都市部:東京都 5 処理場 10 系列、亜熱帯:沖縄県 3 処理場 3 系列の計 4 都道府県 15 処理場 20 系列について集め、分析を行った (Table 1)。

サンプルが送られてこなかったり、非特異結合が見られたりして実験に供せなかった欠損サンプルもあったため、分析できたサンプルは季節ごとに秋:20, 冬:18, 夏:19, 春 19 となった。

2.2 試料採取及び輸送方法

試料採取にあたっては 15ml の遠沈管にサンプルを入れ、低温輸送を利用する計画を立てた。輸送は低温かつ高速な輸送手段を利用するものの、北海道、沖縄という遠隔地については輸送するのに最大で 2 日の所要時間を見込まなければならない。輸送中の微生物相の変化を止めるため、遠沈管には 1.4 ml (10%相当) のエタノール

Table 1 Summary of the collected Samples

Prefecture	Plant name	Sample name	Treatment Process
Tokyo	O	Tokyo#1	Std ^{*a}
		Tokyo#2	〃
	S	Tokyo#3	〃
		Tokyo#4	〃
	NN	Tokyo#5	AO ^{*b}
	N	Tokyo#6	Std
		Tokyo#7	AO
	M	Tokyo#8	A2O ^{*c}
		Tokyo#9	Std
		Tokyo#10	〃
Saitama	FT	Saitama#1	〃
	I	Saitama#2	OD ^{*d}
	AJ	Saitama#3	OD
	AU	Saitama#4	Std
Hokkaido	FG	Hokkaido#1	〃
	AB	Hokkaido#2	〃
	B	Hokkaido#3	OD
Okinawa	MB	Okinawa#1	Std
	KB	Okinawa#2	〃
	NG	Okinawa#3	〃

*a: Standard activated sludge process,

*b: Anaerobic-aerobic process,

*c: Anaerobic-Anoxic-Aerobic process,

*d: Oxidation Ditch process.

を前もって加え、ここに 14 ml の目盛りまで試料を入れてもらうことにした。

北海道、埼玉県、沖縄県の各サンプルについては保冷宅配便を利用した。また、東京都のサンプルについては輸送や保存は水冷下で行い、原則としてサンプル採取当日に実験室に持ち込み処理をした。サンプル採取場所については通年で同じ系列・地点からサンプルを採取してもらうよう依頼した。

また、同時に試料採取日に一番近い日及び月平均の、50 近い項目の水質データや運転指標についてアンケートを行い、これを解析に利用した。

2.3 試料の固定及び定着

各試料が手元に届き次第、直ちに 4%パラホルムアルデヒド溶液で 4℃、2-3 時間で固定を行った。固定後、リン酸緩衝液 (PBS) で 5 分×2 回洗浄し、PBS と水冷エタノールを加え 1-2 倍希釈を行い、-20℃で保存した。試料がそろったところで、水冷しながら超音波分散 (Branson Sonifier 450, Krautkramer-Branson) を行った。フロックを破壊しつつ菌体を破壊しないように、強度は最小 (5W 前後)、時間は試料や季節によって 4-10 分を行った。分散後直ちに、ゼラチンコートした 7x2 ウェルつきスライドガラス (CeL-LINE, HTC Super Cured) に、1 ウェルにつき 1 サンプル、4,5 サンプルずつ定着させ、自然乾燥させた。乾燥したスライドガラスは 50%, 80%, 98% の 3 段階、各 3 分間エタノール脱水し、さらに自然乾燥させ、ハイブリダイゼーションを行うまで常温で保存した。固定及び定着は Amann⁷⁾らの方法に倣った。

Table 2 Used probes

Name	Target group	Abbreviation of the target group	Sequence(5'-3')	Reference
ALF1b	80% of <i>Proteobacteria</i> α -subclass, and some species of δ - ϵ -subclass	ALF	CGTTCGCTCTGAGCCAG	8
BET42a	<i>Proteobacteria</i> β -subclass	BET	GCCTTCCCACTTCGTTT	8
GAM42a	<i>Proteobacteria</i> γ -subclass	GAM	GCCTTCCCACATCGTTT	8
HGC69a	Gram positive high G+C content group	HGC	TATAGTTACCACCGCCCT	9
CF319a	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	CF	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	10
EUB338	<i>Eubacteria</i>	EUB	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	11

2.4 Fluorescence *in situ* Hybridization

ハイブリダイゼーションに用いたオリゴヌクレオチドプローブを Table 2 に示す。対象とした微生物群はプロテオバクテリア α 群 (以下 ALF 群) , β 群 (BET 群) , γ 群 (GAM 群) , サイトファーガフラボバクテリウム群 (CF 群) , グラム陽性高 G+C 含有群 (HGC 群) に真正細菌 (EUB 群) を加えた 6 種類である。プローブはすべて TaKaRa DNA 合成サービスに依頼した。真正細菌に対する微生物群の割合を知るため, XRITC (Rhodamine-X-isothiocyanate, フナコシ) 染色した群特異的プローブと Cy5 (Amersham) 染色した EUB プローブの二重ハイブリダイゼーションを行った。BET プローブと GAM プローブは配列に 1 ミスマッチしかないため, 目的プローブのみを XRITC 染色し, 両プローブを混ぜてハイブリダイゼーションを行った。また, ALF プローブと EUB プローブは最適ホルムアミド濃度が等しいため, 等量を混ぜて一度にハイブリダイゼーションに使用した。

初めにホルムアミド濃度の高い方 (=群特異プローブ) から, ハイブリダイゼーション溶液を 1 ウェルにつき 9 μ l 滴下し, 温度を 46 $^{\circ}$ C に保って 2 時間ハイブリダイゼーションを行い, 48 $^{\circ}$ C のもと, ウォッシングバッファで 20 分間洗浄を行った。スライドガラスが乾燥した後, さらに EUB プローブについて同じように 2 時間ハイブリダイゼーション - 20 分ウォッシング-自然乾燥というプロセスを繰り返した。ハイブリダイゼーション後, 乾燥したスライドガラスに褪色防止剤 SlowFadeLight (Molecular Probes) を適量加えた。最後にカバーガラスをかけ, 乾燥を防ぐために周囲をマニキュアでコートし, このスライドガラスを検鏡に供した。FISH 法については基本的に Amann⁷⁾らの方法に倣った。

2.5 画像解析による定量

スライドガラスは共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM; LEICA TCS-NT, Ar/Kr レーザー 488/568/647nm) 及び付属の CLSM アプリケーションを用いて検鏡した。検鏡には対物レンズ PL APO 63x/1.32 を用いた。

XRITC, Cy5 などの蛍光試薬以外にも, 自然界には例えば無機塩, クロロフィルといった構成物そのものから蛍光を発する物質が多数存在する。この蛍光を自家蛍光と呼ぶが, 自家蛍光は一般的に広い波長域で観察され, 特に短波長で観察されやすい。そこで蛍光物質の励起波長帯以外の波長帯を一つ自家蛍光に割り当てこの蛍光を観察すれば, 自家蛍光部分を知ることができる。目的微生物

群のプローブの蛍光部分を正確に把握するためには, その波長域の蛍光部分から他の波長域で観察された自家蛍光部分を引いてやればよい。

本研究では 3 つの励起波長を用い, B 励起を自家蛍光観察に, G 励起を XRITC 染色した群特異プローブに, Y 励起を Cy5 染色した EUB プローブにそれぞれ充てた。各サンプルにつき, 同視野の群特異蛍光画像と EUB 蛍光画像を 8 枚ずつ, 両画像の蛍光部分が過不足なく重なるように取得し, さらにそれぞれを自家蛍光画像と重ねあわせ, これを画像データ (TIFF 形式) として保存した。その後画像解析ソフト (Leica, Quantimet 600) を用いて, 蛍光部分でかつ自家蛍光でない部分の面積 (ピクセル数) を計測した。

対象微生物群の対 EUB 比は,

$$(S-A)/(E-A)$$

ここで S:群特異プローブの蛍光面積, E:EUB の蛍光面積, A:自家蛍光面積と定義した。

8 つの対 EUB 比データのうち, 最大と最小データを除いた 6 つのデータを平均し, これをそのサンプルの対 EUB 比とした。

なお, 1 つの平均値を出す際に用いた 8 つのデータ (これを 1 集団と表現する) のばらつきがどれくらいであったかについて, 使用した対 EUB 比データ全 380 集団の標準偏差を求めたところ, 平均 3.2, 最大 12.2, 最小 0.3 であった。それぞれの微生物群についてみれば, 同じく標準偏差の平均値でそれぞれ ALF 群 4.4, BET 群 4.0, GAM 群 2.9, HGC 群 3.0, CF 群 1.8 であった。ALF 群や BET 群といった存在比の大きい微生物群のデータ集団は, CF 群のような存在比の少ない微生物群のそれに比べてばらつきが大きかったといえる。また, 算出した平均値と各集団中の 8 つのデータの最大値, 最小値との差は, 対 EUB 比でそれぞれ平均+5.3 ポイント, -4.3 ポイントであった。

3. 実験結果と考察

3.1 優占群

通年の調査結果を Fig.2 に示す。

ALF 群, BET 群, GAM 群の真正細菌に対するそれぞれの割合の合計を真正細菌に対するプロテオバクテリアの割合と定義すれば, プロテオバクテリアが真正細菌全体の 50%以上を占めたサンプル数はそれぞれ 20 サンプル

Fig.2 Seasonal distribution of bacterial community structure of all samples.
Each legend entry should be referred to "Abbreviation of the target group" in Table 2.

ル中 17 サンプル (秋, プロテオバクテリアの平均値 =64%), 18 サンプル中 9 サンプル (冬, 同 49%), 19 サンプル中 8 サンプル (春, 同 44%), 19 サンプル中 11 サンプル (夏, 同 51%) であった (Table 3)。

調査した 5 微生物群の内訳は, 対象サンプル中通年でほとんど ALF 群, または BET 群が優占的であり, それ以外には冬に HGC 群が 5 サンプルで優占しているのみであった (Table 3)。

このことから, 下水処理場活性汚泥中ではプロテオバクテリアが主たる構成細菌であり, その中でも季節を通じて ALF 群, BET 群が優占的であるといえる。

このプロテオバクテリアが真正細菌中で優占的であるという結果は, 既往の海外の EBPR プロセスについて行われた結果とも一致している (Fig.1)。しかし, プロテオバクテリアのサブクラスに目を転じれば, 既往の研究において BET 群が 40-50% 近くを占める一方で, ALF 群は 10-20% であり, この点では BET 群 (全サンプル平均 22%), ALF 群 (同 20%) が比較的同割合を占めている本研究と異なった結果が得られている。

この原因については, 第一に EBPR プロセスと標準活性汚泥法との違い, 第二にそもそも海外と日本の原水の違い, 第三にセルカウント法と面積計算法という定量法の違いが考えられるが, 第一の点については AO 法, A2O 法と標準活性汚泥法のサンプルで微生物構造に大きな違いが見られない (むしろおなじ EBPR プロセスでも国内と海外の結果との間に大きな違いが見られる) ことから (後述), 第二, 第三が主な原因ではないかと考えられる。

HGC 群については, 既往の研究, 本研究ともに 5-30% と幅広い値をとっている。グラム陽性細菌はグラム陰性細菌に比べ細胞壁に含まれるペプチドグリカン層が厚く,

Table 3 Numbers of samples in which *Proteobacteria* was dominant or respective microbial group was most predominant (upper), and its average percentage of all samples (lower), in each season

	Autumn	Winter	Spring	Summer
<i>Proteobacteria</i>	19 64%	13 49%	11 44%	12 51%
ALF	9 26%	2 16%	6 16%	13 23%
BET	11 27%	11 23%	13 19%	6 20%
GAM	- 11%	- 10%	- 9%	- 8%
HGC	- 14%	5 19%	- 11%	- 9%
CF	- 10%	- 7%	- 3%	- 7%

オリゴヌクレオチドプローブが細胞内に浸透しにくい構造になっている。エタノール添加などによってこの細胞壁を壊し, プローブを浸透させやすくすることができ, 実際にエタノール固定をしたサンプルはパラホルムアルデヒド固定をしたサンプルよりも HGC 群が多いという結果も得られている^{9),12)}。一方で①グラム陰性細菌の細胞が壊れやすくなり, rRNA が細胞外に離散してしまうため, 正確な定量ができなくなる可能性があること, 及び②本グループの研究からエタノール処理を施してもプローブの浸透性があまり変わらないという結果が得られていることから, 本研究では HGC 群に対して特別な処理を施していない。

しかし、活性汚泥を対象とし、キノンプロファイル法など他の手法を用いて分析を行った本グループの研究（未発表データ）からは、HGC 群や LGC（グラム陽性低 G+C 含有細菌）群が高い割合を占めることが示唆されており、FISH 法で検出できなかった真正細菌、つまり ALF 群、BET 群、GAM 群、CF 群、一部の HGC 群以外の細菌群のうち、これらグラム陽性細菌群が占める可能性はかなり高いのではないかと想像される。

検出されなかった真正細菌群は季節によって異なっており、それぞれ平均で 12%（秋）、35%（冬）、42%（春）、33%（夏）となっている。これらの数値から、活性汚泥中には調査に使用した 5 プローブで検出できなかった真正細菌が 30-40% 存在し、このうちグラム陽性群が占める割合は少なくないと考えるのが妥当であろう。調査を開

始した秋のサンプルでは、検出できなかった真正細菌が少なく、突出している感があるが、この原因については不明である。

真正細菌以外の微生物（古細菌、真核生物）の存在については、既往の研究から DAPI で染色される微生物の 80% 程度が真正細菌であることがわかっている¹²⁾。したがって、非真正細菌が一種類の微生物群であったとしてもやはり活性汚泥中ではプロテオバクテリアが優占的であるといえる。

3.2 地域性・処理方式と微生物群集構造

地域性や処理方式が微生物群集構造に与える影響について検討した。Fig.3 は、各季節において微生物群集構造のクラスター分析を行ったものである。クラスターの距離としてユークリッド距離を、クラスターの凝集法とし

Fig.3 Cluster analysis of samples in autumn (upper left), winter (upper right), spring (lower left) and summer (lower right)

Table 4 Parameters used for coefficient correlation

Control indexes:	BOD-MLSS loading, MLSS, MLVSS, SVI, SRT, HRT, Nitrification control, Sludge returning ratio
Qualities of inflow and effluent water:	pH, Water temperature, BOD, COD, SS, TN, NH ₄ , NO ₂ , NO ₃ , TP, PO ₄ ,
Removal ratios:	BOD, COD, SS, TN, NH ₄ , TP
Conditions in aeration tank:	MLSS, MLVSS, SVI, DO

て群平均法 (UPGMA; Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) ¹³⁾を用いた。

北海道と沖縄の処理場では通年で約 10℃の水温差があり、また気候帯も異なるため、地域的に微生物群集構造が大きく異なることが予想された。処理方式についても標準活性汚泥法、嫌気好気法、嫌気無酸素好気法という、特にリン・窒素について処理水質が大きく異なる 3 つの処理方式で、微生物群集構造が違うのではないかと考えることは極めて常識的である。しかし、四季を通じて地域的にあるいは同じ処理方式で共通したクラスターができるという結果は得られなかった。したがって、地域性や処理方式が微生物群集構造に明らかな影響を与えているという事実は確認されず、また地域性などの大きな違いにもかかわらず微生物群集構造は極めて似ているといえる。

ただし、第 3 回目 (春)、4 回目 (夏) のクラスターについては、多少の混合はあるものの、非都市部 (クラスター左部) と都市部 (クラスター右部) というクラスターに大別することができる。また、特に春のサンプルでは OD 法の 3 サンプルや沖縄の 3 サンプルが並んで小さいクラスターを形成していることが興味深い。この小さなクラスターの形成要因は、他の季節を参照すれば、処理方式というよりもむしろ処理規模であろう。

したがって、処理規模に起因する要素が、群集構造に何らかの影響を与え、群集構造を決定づける要因の一つになっている可能性はありうる。

地域性、処理方式について言及すれば、既往の研究結果を見ても、同じ EBPR プロセスで群集構造は大まかには似ているが細部では大きく異なっている。またドイツとオーストラリアという極端に離れた地点の群集構造が、同じドイツ国内のものよりもクラスターとして近いというケースが存在することを考慮すれば、地域性・処理方式があまり微生物群集構造に影響を与えないという現象は十分考えられよう。

地域的に大きく離れ処理方法も違う活性汚泥中の微生物群集構造がよく似ているという現象は、微生物の多様性という観点から説明できるかもしれない。微生物は地球上のほとんどあらゆる場所に分布・生育しており、その中には例えば pH3 下でも生育可能な好酸性細菌、100℃以上で生育する超好熱菌なども存在し、彼らの生育環境は極めて多岐にわたる。このような幅広い生育環境を踏まえると、下水処理場の活性汚泥というものがそもそも極めて変化に乏しい環境であり、どれだけ運転条件等を変えようとその中に生育する微生物にとっては小さな変化に過ぎないのかもしれない。進化の過程で微生物が獲得してきた環境の変化に適応する能力が、地域性や処理方法の差異を吸収してしまうのだと考えることは可能で

あろう。

3.3 水質と微生物相

アンケートによって得られた 50 項目程度の水質データとそれぞれの微生物群の存在比との間の相関係数を調べた。対象項目は Table 4 に示す通りである。例えば冬の HGC 群と流入水全リン濃度、処理水全リン濃度との相関はそれぞれ 0.58, 0.63 を示すなど、高い相関係数がいくつかの水質項目と微生物群との間に見られたが、いずれも一つの季節についてのみの高い相関であり、通年あるいはその他の季節についても高い相関が得られた組合せはなかった。したがって、1 次的にある微生物群がある水質を変化させる影響を及ぼしているという事実はないといえることができる。例えば水温やリン・窒素除去率と微生物群との間に高い相関関係がないことから、前項で述べたように、地域性や処理方式と微生物群集構造の間に明確な関係がみられないという分析結果が裏付けられよう。

水質と微生物相との間に明確な相関関係が見つけられない理由には以下の 3 点が考えられる。

第一に、相関係数が低いということは単に 1 次的な直線関係にないということを示しているに過ぎず、例えば 2 次的に、あるいは複数の水質項目と複数の微生物群の組合せがある数式で表現されるといったようなことを否定するものではないという点である。第二に、この結果はクラス (綱) やサブクラス (亜綱) レベルでの「群集」が水質と相関がないということを示しており、より細分化したレベル (例えばアンモニア酸化細菌) では、ある水質 (アンモニア除去率) との相関があってもおかしくはない。これらの 2 点について検討する余地は残されているが、①複雑・多次元的な数式を考えるにはサンプル数が少なく、水質の欠損値も多いこと、及び②微生物群を機能面ではなく、16SrRNA の配列という面から分類するという手段をとっているため、微生物群の多寡と水質の間に相関がなくてもおかしくはなく、あっても意味付けが難しいことから、困難であると考えている。第三に、この水質データがサンプリング時点のものである場合は少なく、例えばサンプリング時から 5 日後のデータであったり、月 4 回の水質検査の平均値であったりと、「サンプリング時に一番近い」データであるという点である。つまり、水質データはサンプリング時の微生物群の生育条件を正確には反映しておらず、そのため水質と微生物相との関係が見えにくい。しかし、3.2 で述べたように、微生物にとって活性汚泥自体が固定された生育環境であるとすれば、それほど水質との明確な相関はないと考えた方が妥当であろう。

3.4 季節変化

いくつかの微生物群について、顕著な季節変化が観察

Table 5 Seasonal Change of each bacterial group.

a) Autumn to Winter

	Number of Increased Samples	Number of decreased samples	Average increase/decrease (Pt)
ALF	1	17	-11
BET	5	13	-4
GAM	11	7	-0
HGC	12	6	+5
CF	2	16	-2

b) Winter to Spring

	Number of Increased Samples	Number of decreased samples	Average increase/decrease (Pt)
ALF	10	8	-0
BET	4	14	-5
GAM	8	10	-2
HGC	1	17	-9
CF	1	17	-5

c) Spring to Summer

	Number of Increased Samples	Number of decreased samples	Average increase/decrease (Pt)
ALF	17	2	+7
BET	12	7	+2
GAM	10	9	-1
HGC	6	13	-2
CF	18	0	+5

された (Table 5, Fig.4)。秋から冬にかけては 18 サンプル中 17 サンプルで ALF 群が、16 サンプルで CF 群が減少し、HGC 群が 12 サンプルで増加した。冬から春にかけては HGC 群と CF 群が 18 サンプル中 17 サンプルで減少した。また春から夏にかけては ALF 群が 19 サンプル中 17 サンプル、CF 群が 18 サンプルで増加し、HGC 群が 13 サンプルで減少した。各微生物群の真正細菌全体に対する変化と、5 つの微生物群内での相対的な変化を総合すると、HGC 群が冬にむけて増加し、夏にむけて減少する傾向と、ALF 群が夏にむけて増加し、冬に向けて減少する傾向が顕著である。これら季節変化が地域に関係なく観察されるということは、微生物群が水温や気温といった季節変化のもたらす結果に影響されることを示している。一方で、前に述べたように地域的によく似た微生物構造をしていることとの対比は興味深い。

4. 結論

本研究では通年で各季節ごとに、4 都道府県 15 処理場 20 サンプルの下水処理場活性汚泥を集め、FISH 法及び CLSM による画像解析を用いて、5 つの微生物群について真正細菌に対する割合を分析した。その結果、以下のことが明らかになった。

1) プロテオバクテリアは 1 年を通じて過半数の試料で優占しており、その中でも ALF 群、BET 群が優占的であった。

2) 微生物群の多寡と地域性や処理方法との間にはあまり関係が見られなかった。

3) 同様に微生物群の多寡と水質の間にもあまり関係が

Fig.4. Seasonal change of average bacterial groups percentage against EUB (upper) / 5 groups (lower). Each legend entry should be referred to Table 2.

見られなかった。

4) HGC 群が冬に増加し、夏に減少する傾向と、反対に ALF 群が冬に減少し、夏に増加する傾向が顕著に見られた。

これらを一言でまとめると、日本の下水処理場の活性汚泥は微生物群レベルでは非常によく似ている、と言える。しかし一方で各処理場の処理水質は厳然として異なっており、今後より細かいレベルの微生物群集をターゲットとし、分子生物学的手法を組み合わせることによって、微生物の機能と水質との関係を明らかにしていくことで、廃水処理技術の発展が望めよう。

謝 辞

本研究の試料及びデータ採取にご協力頂いた各処理場および関係者の方々に感謝致します。

(原稿受付 1999 年 7 月 21 日)

(原稿受理 2000 年 2 月 2 日)

参考文献

- 1) Wagner, M. *et al.* (1993), Probing Activated Sludge with Oligonucleotides Specific for Proteobacteria: Inadequacy of Culture-Dependent Methods for Describing Microbial Community Structure, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1520-1525
- 2) Bond, P. L. *et al.* (1994), Phosphate-Removing Microbes – New Insights on Their Ecology, *Water* (Australia), December 1994
- 3) Bond, P. L. *et al.* (1995), Bacterial Community Structures of Phosphate-Removing and Non-Phosphate-Removing Activated Sludges from Sequencing Batch Reactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1910-1916.
- 4) Wagner, M. *et al.* (1994), Development of an rRNA-Targeted Oligonucleotide Probe Specific for the Genus *Acinetobacter* and Its Application for In Situ Monitoring in Activated Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 792-800.
- 5) Kämpfer, P. *et al.* (1996), Characterization of Bacterial Communities from Activated Sludge: Culture-Dependent Numerical

- Communities from Activated Sludge: Culture-Dependent Numerical Identification Versus In Situ Identification Using Group- and Genus-Specific rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes, *Microbial Ecology*, **32**, 101-121.
- 6) Snaird, J. *et al.* (1997), Phylogenetic Analysis and In Situ Identification of Bacteria in Activated Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2884-2896.
- 7) Amann, R. I. (1995), In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.3.6: 1-15, 1995.
- 8) Manz, W. *et al.* (1992), Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions, *System. Appl. Microbiol.* **15**, 593-600.
- 9) Roller, C. *et al.* (1994), In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides, *Microbiology*, **140**, 2849-2858.
- 10) Manz, W. *et al.* (1996), Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment, *Microbiology*, **142**, 1097-1106.
- 11) Amann, R. I. *et al.* (1990), Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology, *J. Bacteriol.*, **172**, 762-770.
- 12) Manz, W. *et al.* (1994), In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants, *Wat. Res.*, **28**, 1715-1723.
- 13) Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973), *Numerical Taxonomy*, San Francisco, W. H. Freeman.
- 14) Wagner, M. *et al.* (1994), Probing activated sludge with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotides, *Wat. Sci. Tech.* **29**, No.7, 15-23.