

蛍光染色による活性汚泥中のリン蓄積菌のモニタリング

青木 伸浩*、山田 和成*、川瀬 三雄*
那須 正夫**

*日本ガイシ株式会社 環境装置事業部 開発部 バイオ研究課
**大阪大学 薬学部

概要

廃水処理に広く利用されている生物脱リンプロセスにおいては、より高度な制御を行うため、リン蓄積微生物の個体数を正確かつ迅速に測定し、モニタリングする手法の開発が望まれている。

演者らは、これまでにリン蓄積微生物の体内に蓄積したポリリン酸を蛍光色素；DAP I (4',6-diamidino-phenylindole) により染色する事により、汚泥中のリン蓄積微生物の識別を可能にした。

本研究では、DAP I 染色したリン蓄積微生物の蛍光染色画像を画像処理することにより、汚泥中のリン蓄積微生物の数、また、リン蓄積微生物中のポリリン酸の含有量の測定を試みたので報告する。

キーワード

生物脱リンプロセス、リン蓄積微生物、蛍光染色、菌数測定、画像解析、モニタリング

1. はじめに

現在、生物学的水処理プロセスの運転制御においては、一般に系内で働いている微生物の指標としてMLVSSが用いられている。ところが、このMLVSSは懸濁有機物の総量であり、微生物以外の有機物あるいは処理に関与しない生物も含み、生物処理プロセスの運転制御指標としては満足なものではない。

プロセスのより高度な制御を行うために、微生物の個体数を正確かつ迅速に測定する技術の開発が望まれていた。通常、微生物の測定には培養法が用いられているが、長時間の微生物の培養、分離、同定が必要であり、数日から1ヶ月程度の時間を要し、プロセスへのリアルタイムでのフィードバックは困難であった。

演者らは、蛍光染色法の適用による、微生物の迅速測定技術の開発を目指し、ポリリン酸と結合する蛍光色素；DAP Iの利用により、リン蓄積微生物を識別できる可能性を見いだし報告した¹⁾。

本報告では、その延長として、蛍光法と画像解析により、活性汚泥中のリン蓄積微生物数が容易に測定できること、また、中村ら²⁾が分離したリン蓄積微生物である *Microcylunatus phosphovorius* 菌体中のリン含量と蛍光シグナル強度との間に相関を見いだしたので報告する。

2. 実験装置

本研究で用いた画像解析装置の概略図を図1に示す。蛍光顕微鏡は、ニコン製OPTIPHOTO2を用い、蛍光画像の取り込みは、顕微鏡に装着した冷却CCDカメラ(日本プリンストンインスツルメンツ製、RT E/CCD-1317K/1)で行った。画像データは、カメラコントローラ(日本プリンストンインスツルメンツ製、ST-133)を経由し、パーソナル

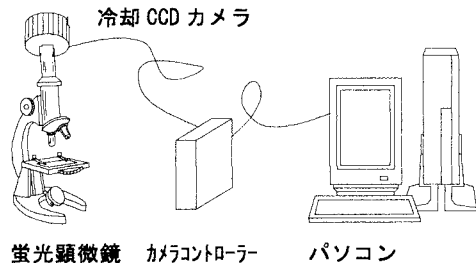


図-1、画像解析装置概略図

コンピューター（日本DEC製、Digital Celebris GL ST -5133）に入力し、画像処理を行った。画像の取り込みは、Meta Morph（日本プリンスインストルメンツ製、ver. 2.0）で行い、画像の解析は、Image Pro PLUS（プラネトロン製、ver. 1.3）で行った。

3、実験方法

【実験一、活性汚泥中の微生物数の測定】

①試料の作成、染色

実験に供した汚泥は、社内の実験槽より採取した。採取後、エタノールを終濃度50%V/Vになるように添加し、試料を固定した。次にリン酸緩衝液（PBS）または、生理食塩水を用いて2~3回洗浄し、PBSまたは生理食塩水に再懸濁させた。

その後、EAH（Ethidium Acridin Heterodimer、DNA色素）溶液を終濃度5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、室温、遮光下で30分間反応させた。次にDAPI（ポリリン酸色素）溶液を終濃度1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、室温、遮光下で20分間反応させた。

②蛍光顕微鏡観察及び取り込み

EAHとDAPIにより二重染色した試料を一定量、ポリカーボネイトタイプフィルター（25mm ϕ ）上に減圧用フィルターフォルダーを用いてトラップした後、蛍光顕微鏡で観察し、画像を取り込み解析を行った。蛍光顕微鏡での観察及び画像取り込みの際の、顕微鏡のフィルターは、EAH赤色蛍光（DNA由来・励起波長530nm、蛍光波長630nm）の場合、励起510-560nmのバンドパス、蛍光610nm以上透過、DAPI緑色蛍光（ポリリン酸由来・励起波長360nm、蛍光波長525nm）は、励起330-380nmのバンドパス、蛍光515-555nmのバンドパスを用いた。対物レンズの倍率は100倍。

③画像解析

冷却CCDカメラにより8ビット画像として取り込み、EAH蛍光（DNA由来）画像は、2値化したのちオブジェクト（微生物）のカウントを行い、全微生物数を測定した。

リン蓄積微生物の測定は、EAH赤色蛍光（DNA由来）画像とDAPI緑色蛍光（ポリリン酸由来）画像を合成した後に、2値化し、カウントした。また、適宜8ビット画像を着色し、カラー画像を得た。

【実験方法二、*Microcylindropsira phosphovorus* 中の蓄積リン含量の測定と蛍光強度の解析】

① *Microcylindropsira phosphovorus* の培養及びリン含量の測定

リン蓄積微生物として、中村ら²⁾が単離した *Microcylindropsira phosphovorus* (JCM9379) を使用した。使用した培地³⁾は、グルコース0.5g/L、ペプトン0.5g/L、グルタミン酸ナトリウム0.5g/L、イーストエキストラクト0.5g/L、 KH_2PO_4 0.44g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L、pH7であり、培養温度は、25 $^\circ\text{C}$ 。

L字管で2日間前培養し、坂口フラスコにて本培養を行った。所定時間ごとに、サンプリングし、遠心分離により集菌後、リン酸溶液（ KH_2PO_4 1.8g/L、 MgCl_2 0.6g/L）に再懸濁し、24時間振蕩し、リンの取り込みを行わせた³⁾。また、菌体濃度の測定は、660nmの吸光度、リンの定量は、モリブデン青吸光度法⁴⁾にて行なった。

②蛍光顕微鏡観察及び取り込み

実験一と同じ手順で、蛍光染色し、蛍光顕微鏡観察、画像の取り込みを行った。対物レンズの倍率は、10倍。

③画像解析

冷却CCDカメラにより8ビット画像として取り込み、DAPI緑色蛍光（ポリリン酸由来）画像を2値化し

たのちオブジェクト(微生物)のカウントを行った。各オブジェクト(微生物)毎の蛍光強度を測定し、平均する事により、微生物中の蓄積ポリリン酸由来のDAP I 蛍光強度を求めた。

4、結果と考察

【実験-1、活性汚泥中の微生物数の測定】

図-2、3、4に活性汚泥の蛍光顕微鏡画像の処理画像を示す。図-2は、EAHで染色されたDNAの蛍光画像であり、種々の形状の微生物が観察された。画像処理により個々の微生物をカウントした結果、画面上に微生物数は101個と測定できた。

また、図-3は、DAP Iで染色されたポリリン酸の蛍光画像であり、図-2と図-3を合成したものが図-4。図-4で明るく見える部分が、DNAを含有し、ポリリン酸を蓄積しているリン蓄積菌であると判断できる。カウントの結果、9個と測定できた。この結果より、今回、測定した活性汚泥中の全微生物中の約10% (9個/101個) がリン蓄積微生物であると考えられる。

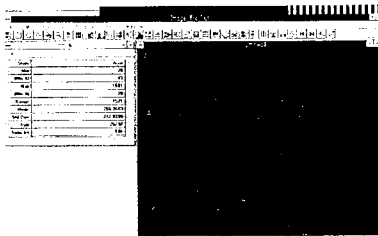


図-2、 汚泥のEAH蛍光写真

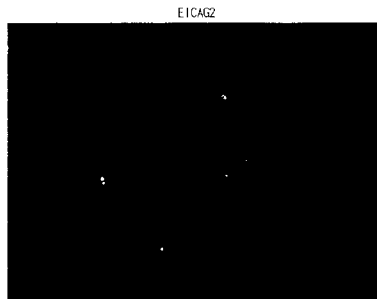


図-3、 汚泥のDAP I 蛍光写真

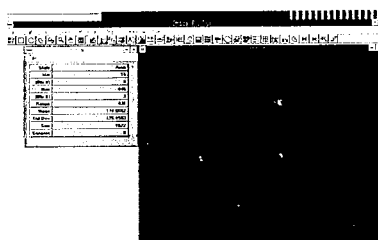


図-4、 リン蓄積微生物蛍光画像

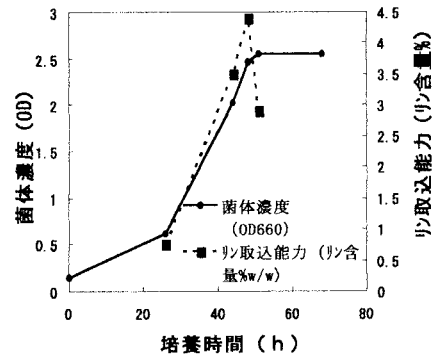


図-5、 培養経過とリン取り込み能力

【実験-2、*Microcylunatus phosphovorius* 中の蓄積リン含量の測定と蛍光強度の解析】

図-5に培養経過と各々の培養時間における菌体濃度とリン取込能力を示す。培養開始後、約40時間程度で定常期となった。培養の各時間によりリンの取り込み能力が異なっており、対数後期の菌体が最大の取り込みを示した。中村ら³⁾の報告でも対数後期の菌体の取込能力が高いことが示されており、ほぼ同様の結果となった。

リン含量の異なる *Microcylunatus phosphovorius* の蛍光顕微鏡画像の一部を図-6に示す。図-6 Aは、リ

ン含量0.76%W/Wの菌体蛍光画像、図-6Bは、4.4%W/Wの画像であるが、リン含量が高い6Bの画像上の菌体の方が強い蛍光を示している。各々の画像を図-7の如く画像処理し、微生物数だけでなく、個々の微生物の輝度値（蛍光の強度・明るさ）を測定し、平均を算出した。その結果を図-8に示す。

菌体のリン含量と蛍光強度との間には、相関が認められ、DAPIのポリリン酸由来の蛍光強度は、ポリリン酸の量を反映していると考えられる。

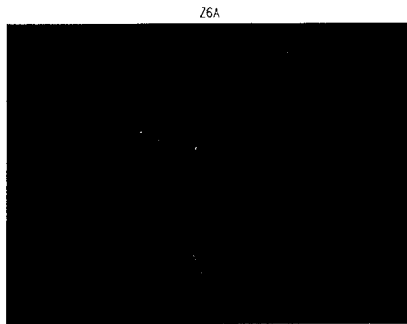


図-6A リン含量0.76%W/Wの菌体蛍光画像

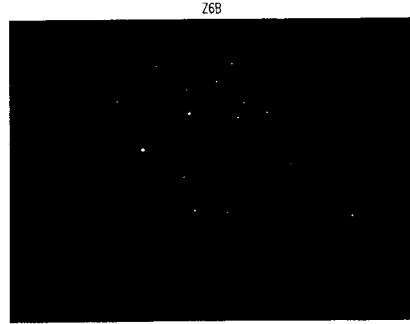


図-6B、リン含量4.4%W/Wの菌体蛍光画像

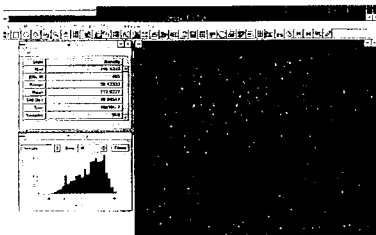


図-7、蛍光強度の測定

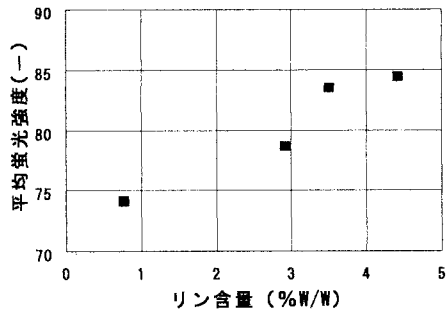


図-8、リン含量と平均蛍光強度

5、まとめ

本研究では、ポリリン酸に着目したEAHとDAPIの二重染色法を適用し、画像解析を行うことにより、非常に簡便かつ迅速に汚泥中のリン蓄積微生物数を測定することができた。また、ポリリン酸由来DAPI緑色蛍光の強度により、微生物中のリン蓄積量を評価する事ができた。

今後は、脱リンプロセスの汚泥を対象に、本法によるリン蓄積菌数、リン蓄積量を測定し、プロセスの処理特性との関係を検討する予定である。

6、参考文献

- 1) 山田ら：第33回下水道研究発表会講演集、p1045-1047(1996)
- 2) Nakamura, K. et al. : Int. J. Syst. Bacteriol., vol45, No.1, p17-22(1995)
- 3) Nakamura, K. et al. : J. Ferment. Bioeng., vol79, No.2, p190-192(1995)
- 4) 日本下水道協会編：下水道試験方法(1984)