

### 分子生物学的手法及び培養法による浸出水処理微生物群集構造の解析

東北大学工学部 学生会員 ○石川愛弓  
 東北大学大学院工学研究科 学生会員 渋谷幸子  
 正会員 久保田健吾  
 正会員 原田秀樹  
 産業技術総合研究所 非会員 玉木秀幸

#### 1. はじめに

廃棄物の最終処分がなされる埋立地からは、地表水、地下水の流入や降水に伴い浸出水が発生する。浸出水は埋立物の成分が溶け込んでいるため、塩分濃度が高く、重金属類、難分解性の有機物を含んでいる。ゆえに、適切な処理なしに放流することによって、周辺水系の水質汚濁が引き起こされる可能性がある。そのため、多くの埋立地には浸出水の処理場が併設されている。さらに近年では、焼却処理の高度化により、焼却灰中に含まれる無機塩類が高濃度となり、その結果浸出水中の無機塩類濃度も高濃度となるという、中間処理としての焼却処理が一般的ではない諸外国では見られない、日本の浸出水固有の現象が起こっている。このような環境下においても、硝化、脱窒及び有機物の分解を目的として生物処理が用いられており、実際に汚濁負荷の低減に寄与している。浸出水の水質の特異性から、生物処理過程に存在する微生物の中には、系統的に新規で、未だ機能が明らかになっていないものが多く存在していると予想され、そのような群集構造及び個々の微生物の機能を明らかにすることは、浸出水の処理メカニズムの解明、将来的には処理システムの最適化、また浸出水に含まれる難分解性有機物等の生分解に役立つ微生物資源の探索という面から極めて重要である。本研究では、クローン解析を始めとした分子生物学的手法の適用及び、浸出水中に存在する微生物を分離・培養することにより、浸出水処理硝化槽内微生物群集の解析を行った。

#### 2. 実験方法

宮城県内の最終処分場内の浸出水処理施設に設けられた、好気性硝化槽を調査対象とした。対象処分場において、浸出水は調整槽で水量、水質を均一化した後、第1凝集沈殿処理、生物処理、第2凝集沈殿処理、各種高度処理と順に処理され放流される。2011年7月と8月の2回、硝化槽とその流入水からサンプリングを行い、現地で水温、pH、DOを測定し、サンプルを持ち帰ってから窒素、TOC、各種金属、イオンを定量した。

8月のサンプルからDNAを抽出し、PCR法により *Bacteria* 及び *Archaea* の16S rRNA遺伝子を特異的に増幅

させ、クローンライブラリを作成、その後系統解析を行った。

分離培養の培地としてはサンプル水をろ過した後滅菌したものを、ゲル化剤としては agar の他、培養能を向上させると報告<sup>1)</sup>がある gellan gum を用いた。詳しい条件は表-1に示す。それぞれの培地に滅菌水で希釈し濃度を振ったサンプルを撒き、培養した。発現コロニーは、新しい固体培地に分離し、分離株は16S rRNA遺伝子解析を行った。また、8月のサンプルについては、80日あまりの培養期間中約10日毎に、サンプルを100倍希釈して撒いた各培地の発現コロニー数(CFU: Colony Forming Unit)をカウントした。

#### 3. 実験結果と考察

現地で測定した項目の2回の平均は、水温は流入水が23°C、硝化槽では24°Cであった。pHは流入水が8.1、硝化槽では6.5であった。DOは流入水が5.7 mg/l、硝化槽では4.6 mg/lであり、好気条件が維持されていた。また、窒素の定量の結果、流入水でアンモニア態窒素170 mg/l、亜硝酸態窒素0.26 mg/l、硝酸態窒素は0.16 mg/lであったのが、硝化槽では順に0.11 mg/l、0.034 mg/l、96 mg/lと、硝化が良好に行われていることが伺えた。TOCは8月のサンプルで流入水が84.5 mg/l、硝化槽では31 mg/lと、硝化槽内で減少していた。これは7月のサンプルでも同様であり、硝化に加え、有機物の分解が行われていることが示唆された。金属イオンの定量の結果、硝化槽で平均して7260 mg/lのナトリウム、15700 mg/lの塩化物イオンが含まれており、これより浸出水は海水と同程度の塩分濃度であると考えられた。一方で、マグネシウム濃度は3.0 mg/lと、海水と比較してわずかにしか含まれておらず、硝化槽内の浸出水の金属元素組成は海水と異なると言えた。

表-1 培養条件

サンプル	培地名	ゲル化剤	培地	培養条件	培養期間
7月	a培地	agar 1.5%	ろ液	27°C, 暗所	~35日
	a培地	agar 1.5%	ろ液		
8月	g-1培地	gellan gum 1.0%	ろ液 1.5倍希釈*	27°C, 暗所	~80日
	g-2培地	gellan gum 1.0%	ろ液 2倍希釈*		

\* 滅菌水にて希釈

キーワード 微生物群集構造解析 浸出水 硝化 接触酸化 分離・培養  
 連絡先 東北大学大学院 工学研究科 土木工学専攻

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 環境保全工学研究室 TEL: 022-795-3584

8月のサンプルの *Bacteria* クローンライブラリ作成後、計167クローンの16S rRNA 遺伝子のシーケンス全長を決定した。クローンの門および綱レベルでの微生物群集構造を分類したところ、15門に分類され、最も多くのクローンが属したのが *Proteobacteria* 門で、その割合は65%であった。また、Candidate division である OD1, TM6, TM7 の3門にクローンの16%が属しており、多くのクローンが特定の門に属するという結果になった。さらに、167クローンを97%相同性を閾値とした OTU に分類したところ、69の OTU が得られた。Coverage が0.77, ACE が113, Chao1 が117, Evenness Index が0.89 であり、本解析により対象微生物群集構造を広く捉えることができていること、また対象が非常に多様性に富んだ構造であると示唆された。優占(4クローン以上で構成)している10 OTU (計71クローン) について、NCBI の BLAST 検索により近縁種との相同性を調べたところ、近縁種と97%以上の相同性を示したものは2 OTU (各4クローン) で、クローン解析上優占しているものについては Candidate division も含め、その機能は未知であった(表-2)。高い相同性を示した2 OTU は、難分解性の硫黄化合物の分解に携わるとされる *Achromobacter* sp. および亜硝酸硝化細菌である *Nitrospira* sp. に近縁であった。さらに、アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas* 属, *Nitrosococcus* 属に98%以上の相同性を示す OTU (それぞれ2クローン, 1クローン) が得られたことから、これらのグループの菌が硝化を担い、良好な処理を実現していると考えられる。

8月のサンプルの CFU のカウントを行ったところ、その推移は図-1 のようであった。培養30日目までの CFU は g-1, g-2 培地で a-培地に比べ多く、ゲル化剤として gellan gum を用いることで、コロニーの発現が促されていると考えられた。分離・培養では、7月と8月のサンプルを培養したことにより、約400の分離株を得た。そのうち、16S rRNA 遺伝子のシーケンスが得られた計312株について NCBI の BLAST 検索で近縁種と、その近縁種との相同性を調べたところ、全分離株の半数以上(53%)が *Mycobacterium* sp. に99%以上の相同性を示した。この種に近縁なグループは、クローン解析で1%しか検出されなかったものの、その増殖が速いため、培養で優占したと考えられた。また、8%が多環芳香族炭化水素(PAH)分解菌である *Novosphings* sp. に99%以上の相同性を示し、クローン解析でも *Novosphings* sp. に近縁なクローンが2%得られていた。この他にも PAH の一種であるピレンの分解に携わる菌や、PAH を多く含むオイルシェールから分離された菌に97%以上の相同性を示す分離株が得られたことから、これらの菌が硝化槽内で難分解性有機物の分解を行い、有機物の除去に貢献していると考えられる。

さらに、分子系統学上高い新規性を示すと言える、近縁種との相同性94%以下の分離株として、a 培地から

*Mesorhizobium* sp. に近縁な7株と *Rhodospirillum* sp. に近縁な6株を得た。クローン解析において、前者は20クローン、後者は10クローンから成る OTU であり、これらの分離株について機能を調べることで、クローン解析における優占種の機能を知ることが可能になる。g-2 培地からは、系統解析ソフト Arb を用いて解析した結果、*Alphaproteobacteria* 綱に属し、近縁種 *Oceanibaculum pacificum* との相同性が88%と、分子系統学上高い新規性を示す株(110802\_g\_2\_50\_2 株、図-2) が得られ(図-3)、今後の生理学的、形態学的解析の結果によっては、新属以上の提案が可能と考えられた。今後、硝化槽内微生物叢のさらなる理解を目指し、クローン解析で優占していたグループの分離株の解析、さらに110822\_g\_2\_50\_2 株の purity の追加確認を行い、新属以上の提案を目指し、分析を行う予定である。

表-2 クローン解析における優先 OTU とその近縁種

OTU No.	クローン数	門分類	近縁種	相同性(%)
1	20	<i>Proteobacteria</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	93
2	15	<i>Proteobacteria</i>	<i>Fangia hongkongensis</i>	89
3	10	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	94
4	9	Candidate division TM7	-	-
5	5	Candidate division OD1	-	-
6	5	<i>Proteobacteria</i>	<i>Holospira curviuscula</i>	82
7	5	<i>Bacterioidetes</i>	<i>Aequorivita</i> sp.	94
8	4	<i>Proteobacteria</i>	<i>Dokdonella koreensis</i>	96
9	4	<i>Proteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i> sp.	98
10	4	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i> sp.	99

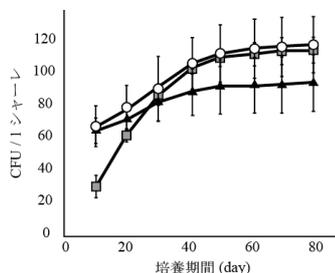


図-1 CFU の推移 (n=5)

○ g-1 培地 ▲ g-2 培地 ■ a 培地



図-2

110802\_g\_2\_50\_2 株  
(位相差顕微鏡にて撮影)

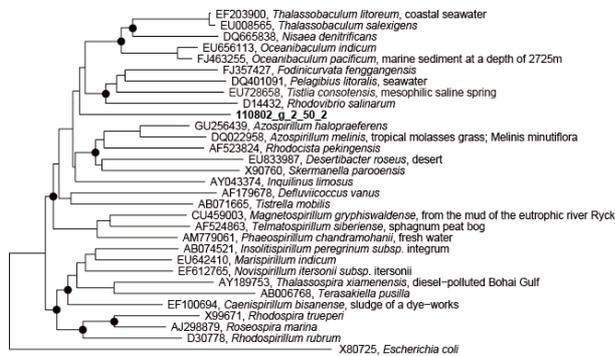


図-3 110802\_g\_2\_50\_2 株を含む科分離株の系統樹

(●: ブートストラップ値 75%以上)

参考文献

1) H. Tamaki et al., (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, 11, 1827-1834