

嫌気性グラニューール汚泥を構成する複合微生物群の網羅的群集構造解析

長岡技術科学大学 (学) ○中原 望、(学) 黒田 恭平
(正) 幡本 将史、(正) 山口 隆司

1. はじめに

上昇流嫌気性スラッジブランケット (UASB) 法は高濃度廃水を処理可能な優れた技術である。近年では、下水などの低濃度廃水処理や低温・高温で廃水処理が行われるなど、適用範囲を拡大している。UASB 反応槽が保持する嫌気性グラニューール汚泥の微生物群集構造解析を行う際に、16S rRNA 遺伝子や機能遺伝子を分子系統マーカーとしたクローニング法や T-RFLP 法などが用いられてきた [1]。近年では、次世代 DNA シークエンサーの開発により、一度の DNA シークエンシングで大量の遺伝子配列データを得ることが可能となり、微生物群集構造のハイスループットな解析が可能となった。

本研究では、嫌気性グラニューール汚泥を構成する複合微生物群の網羅的解析を目的として、運転条件の異なる UASB 反応槽から 14 種類のグラニューール汚泥を採取し、超並列 16S rRNA 遺伝子シークエンシングを行った。得られた 16S rRNA 遺伝子配列データの解析を行い、嫌気性グラニューール汚泥を構成する主要微生物群に関する基礎的知見の収集を行った。

2. 実験方法

本研究では、表-1 に示す UASB 反応槽からグラニューール汚泥を採取した。DNA 抽出は、FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals 社) を用いて行った。抽出した DNA を鋳型とし、原核生物の 16S rRNA 遺伝子を標的とした Univ515F-Univ806R のプライマーセットで PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。超並列 DNA シークエンシングには MiSeq reagent Kit v2 (500 サイクル, illumina 社) を用い、Caporaso らの方法 [2] に従った。得られた全ての 16S rRNA 遺伝子配列のデータ解析には QIIME [2] のパイプラインを用い、系統分類には Greengenes ver. 13_8 を用いた。得られた系統分類群は、Greengenes のデータベースに基づいて門レベルの分類を行った。

3. 実験結果

本研究では、14 種類の嫌気性グラニューール汚泥を採取し、超並列 16S rRNA 遺伝子シークエンシングを行った結果、13,862–30,335 リードの 16S rRNA 遺伝子配列を得た (表-1)。16S rRNA 遺伝子配列の相同性 97%以上を同一の operational taxonomic unit (OTU) と設定しグルーピングを行った結果、各種グラニューール汚泥から 810–3,208 の OTU を得た。また、Coverage は全てのグラニューール汚泥で 91%以上を示した。

16S rRNA 遺伝子配列に基づいて門レベルで分類した結果、各グラニューール汚泥において *Proteobacteria* 門が 0.9–41.2%、*Firmicutes* 門が 1.5–51.1%、*Euryarchaeota* 門が 3.1–36.5%、*Bacteroidetes* 門が 2.9–27.6%、*Chloroflexi* 門が 1.0–25.6% と高頻度に検出され (図-1)、上記 5 つの門が嫌気性グラニューール汚泥を構成する主要複合微生物群であることが示唆された。一方で、門レベルで未培養な WWE1, GN04, FCPU426 や *Synergistes* 門, *Spirochaetes* 門,

表-1 本研究で解析に使用した汚泥サンプルと超並列 16S rRNA 遺伝子シークエンス解析結果

Sample Name	Treatment Type	Temp. (°C)	Wastewater Type	No. of Sequence	No. of OTU [†]	Coverage
MUS	Anaerobic oxidation of sulfur	15	Molasses and sulfate	13862	1204	0.95
LUS	Anaerobic oxidation of sulfur	15	Lactate and sulfate	22896	1282	0.96
FUS	Anaerobic oxidation of sulfur	15	Formate and sulfate	20615	1051	0.97
SUS	Methanogenic	10–29	Sewage and sulfate	22255	1587	0.95
RUT	Methanogenic	35	Industrial rubber wastewater	16003	810	0.97
RUV	Methanogenic	35	Industrial rubber wastewater	21271	1615	0.95
FUM	Methanogenic	35	Industrial food-processing wastewater	30335	3208	0.91
AUM	Methanogenic	35	Industrial alcohol-producing wastewater	18553	1181	0.96
AUR	Methanogenic and denitrification	35	Industrial alcohol-producing wastewater	19456	1530	0.95
AUD	Methanogenic	55	High-strength alcohol distillation wastewater	25817	1110	0.97
MUT	Methanogenic	55	High-strength molasses wastewater	22925	839	0.98
MUM	Methanogenic	35	Molasses wastewater	21388	1833	0.95
IUS	Methanogenic	30	Industrial wastewater	20131	1379	0.96
DUJ	Methanogenic and denitrification	30	Sludge digester liquid	26719	1590	0.96

[†]Calculations based on the operational taxonomic units (OTUs) determined at an evolutionary distance of 0.03.

キーワード UASB 法, 嫌気性グラニューール汚泥, 網羅的微生物群集構造解析, 多様性解析

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 TEL.0258-47-9612 E-mail : s115043@stn.nagaokaut.ac.jp

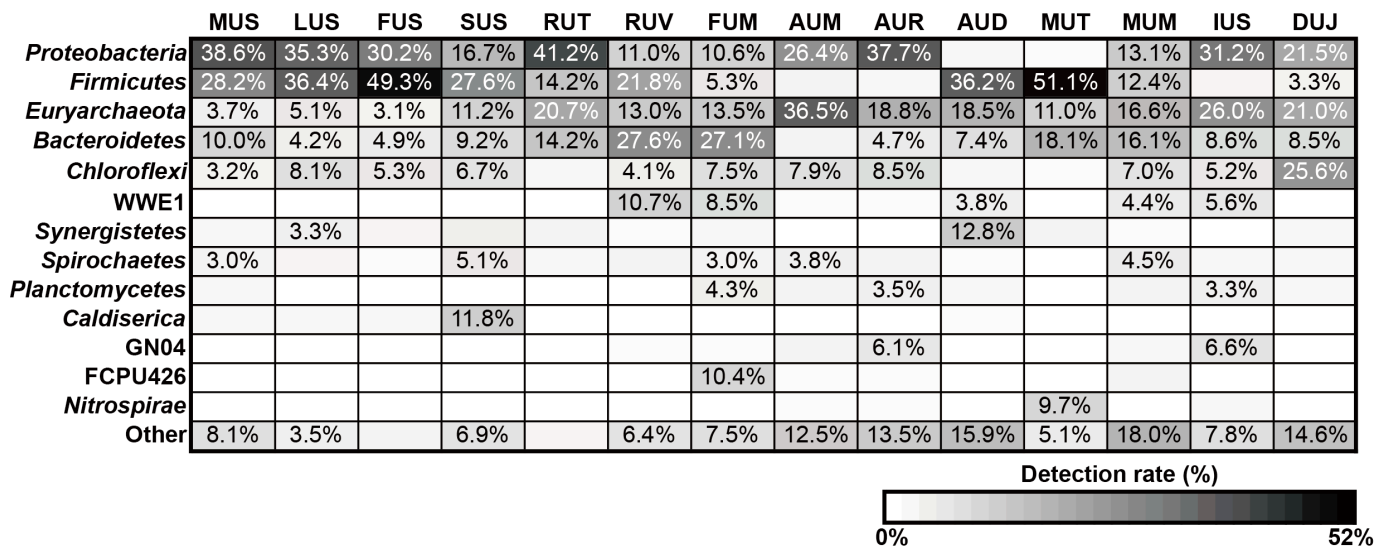


図-1 各嫌気性グラニューール汚泥において高頻度に検出された複合微生物群 (門レベル)

各系統分類群の検出率は >20.0%; 白文字, 20.0%–3.0%; 黒文字, <3.0%; ブランクセルとして図中に示した。

Planctomycetes 門, *Caldiserica* 門, *Nitrospirae* 門は嫌気性グラニューール汚泥から共通して検出されず, 各 UASB 反応槽の運転条件に応じて異なる検出パターンを示した。各グラニューール汚泥において最も多く検出された *Proteobacteria* 門は AUD 汚泥, MUT 汚泥においてはそれぞれ 1.4%, 0.9%と優占して検出されなかった。その原因として AUD, MUT は高温メタン発酵汚泥であることが挙げられる。これまで報告されている高温性栄養共生細菌・従属栄養性細菌の多くは *Firmicutes* 門に属しており, *Proteobacteria* 門に属する系統分類群は高温嫌気性グラニューール汚泥からほとんど検出されていない [3]。本実験結果においても, AUD 汚泥では, *Coprothermobacter* 属が 9.7%, MUT 汚泥では, *Coprothermobacter* 属が 12.7%, *Thermacetogenium* 属が 8.9%と, *Firmicutes* 門に属する高温性栄養共生細菌もしくは従属栄養性細菌が高頻度に検出された。WWE1 に属する系統分類群は比較的高濃度の廃水を処理する UASB 反応槽から採取した RUV (10.7%), FUM (8.5%), AUD (3.8%), MUM (4.4%), IUS (5.6%) において比較的多く検出された。WWE1 は嫌気性中温消化汚泥において比較的高頻度に検出されており, NanoSIMS 解析により細胞外でセルロースの加水分解を行うことが示唆されるなど, 生理機能も徐々に明らかとなっている [4]。 *Caldiserica* 門は SUS 汚泥において 11.8%と高い割合で検出されたが, 他の汚泥ではほとんど検出されなかった。高頻度に検出された *Caldiserica* 門の系統分類群は既知の培養株とかなり同源性が離れた未培養グループ (WCHB1-03) に属しており, 他の汚泥ではほとんど検出されなかったことから, 本グループの系統分類群は下水処理汚泥特異的に出現する可能性が考えられた。FCPU426, *Nitrospirae* 門はそれぞれ FUM 汚泥で 10.4%, MUT 汚泥で 9.7%と検出されたが他のグラニューール汚泥からはほとんど検出されなかった。そのため, FUM 汚泥もしくは MUT 汚泥で検出された FCPU426, *Nitrospirae* 門に属する系統分類群はそれぞれの UASB 反応槽の運転環境に応じて特異的に出現した可能性が考えられた。

4. おわりに

14 種類の嫌気性グラニューール汚泥を採取し, 超並列 16S rRNA 遺伝子シーケンシングを行った結果, 嫌気性グラニューール汚泥を構成する主要な微生物群は *Proteobacteria* 門, *Firmicutes* 門, *Euryarchaeota* 門, *Bacteroidetes* 門, *Chloroflexi* 門に属する系統分類群であることが示唆された。また, 都市下水処理 UASB 反応槽内グラニューール汚泥からは *Caldiserica* 門に属する系統分類群が 11.8%と高頻度に検出され, 他のグラニューール汚泥から検出されなかったことから, この *Caldiseica* 門に属する系統分類群は下水処理汚泥に特異的に出現する可能性が考えられた。

5. 今後の予定

今後は, 嫌気性グラニューール汚泥を構成する複合微生物群の更なる知見収集を目的として, 表-1 に示す嫌気性グラニューール汚泥以外の微生物群集構造解析を行い, 得られた 16S rRNA 遺伝子配列データとこれまで得られたデータを統合することで様々な嫌気性グラニューール汚泥の網羅的な微生物群集構造解析結果を得る予定である。

参考文献

[1] Talbot *et al.*, *Water Res*, Vol. 42, No. 3, pp. 513–537, 2008. [2] Caporaso *et al.*, *ISME J*, Vol. 6, No. 8, pp. 1621–1624, 2012. [3] Sekiguchi *et al.*, *Microbiology*, Vol. 144, Pt 9, pp. 2655–2665, 1998. [4] Liman *et al.*, *Microbiologyopen*, published online DOI: 10.1002/mbo3.144, pp. 1–11, 2014.