

培養法と分子生物学的手法を用いた好気処理汚泥内における 微生物群集構造解析とバチルス属細菌数の調査

長岡技術科大院・工 ○金子知世, 野沢和穂, 幡本将史, 牧 慎也, 山口隆司
群馬高専 青井 透

1. はじめに

近年では全国各地で汚泥や処理水といった下水由来の資源を食糧生産に利用する取り組みが盛んに行われている。活性汚泥法による下水処理過程では大量の汚泥が発生・廃棄されている。そのため、汚泥の農用地利用は農業生産のための土作りおよび廃棄物処理を兼ね備えた手段として着目されている。しかし、汚泥のリサイクルは建設資材としての利用が大部分を占めており、農用地への利用は1割程度に止まっている¹⁾。今後、さらなる汚泥利用拡大を図るためには、より高付加価値な農業資材の開発が必要であると考えられる。

一部のし尿処理場ではバチルス属細菌が汚泥内で優占化していることが報告されている²⁾。バチルス属細菌は植物病害の原因の一つである、フザリウム属のカビに対し阻害作用を持つことが知られており、バチルス属細菌が優占化している汚泥をコンポスト化することで、植物病害に対する防除作用を持つ高付加価値な土壌改良資材を安価に製造できると考えられる。バチルス属細菌が優占化した下水汚泥由来の土壌改良資材を作成するにあたり、活性汚泥中においてバチルス属細菌の優占化が課題となる。現在、活性汚泥中のバチルス属細菌の測定は寒天培地を用いる平板培養法を用い、目視でコロニー形状を判別し計測されている。本方法は熟練を要する方法であり、測定者が異なると結果の比較が困難になる可能性がある。また、好気処理汚泥内における細菌叢やバチルス属細菌の存在量に関する知見は未だ少なく、より多くの調査が必要である。

本研究では、好気処理汚泥内の菌叢構造、およびバチルス属細菌の優占化の把握を目的とし、複数の排水処理施設の汚泥を対象に平板培養法と微

生物群集構造解析を用いた調査を行った。

2. 実験方法

(1) 分析試料

分析試料は複数の農業集落排水処理施設・都市下水処理施設および養豚場の排水処理施設から採取し、解析に供した。

(2) 平板培養法

平板培養法によってバチルス属細菌の菌数を計測した。10³、10⁴、10⁵に希釈した試料をそれぞれ無菌的に培地(ニュートリエントブロス 8 g/L, グルコース 8 g/L, 溶性デンプン 10 g/L, 食塩 6 g/L, 寒天 17 g/L)へ100 μL滴下し、コンラージ棒で培地表面に均等に塗り広げ、恒温槽で32°C前後に保ち2日間培養を行った。その後コロニー形状を目視で観察し計測を行った。計測した細菌数は汚泥1gあたりに換算し、その値をバチルス属細菌数とした。

(3) 微生物群集構造解析

分析試料からのDNA抽出はFastDNA SPIN Kit for Soil (MP-Biomedicals)を用いて行った。また、抽出したDNAを鋳型とし、プライマーセットに16S rRNAを標的とした515F/806Rを用いてPCR増幅を行った。得られたPCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製し、次世代シーケンサーMiSeq (Illumina)により塩基配列を決定した。得られた塩基配列はGreengens ver. 13_8データベースを用いて系統分類を行った。

3. 結果および考察

(1) 好気処理汚泥内の菌叢構造

微生物群集構造解析より得られた門レベルでの菌叢構造を図-1に示す。全試料において *Proteobacteria* 門細菌および *Bacteroides* 門細菌の検出割合はそれぞれ19~54%、11~47%を占め、門レベルでの菌叢は類似

キーワード 好気処理汚泥, バチルス属細菌, 微生物群集構造解析

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 水圏土壌環境研究室 Tel 0258-47-1611-6646

していた。この結果は、他の研究者らの報告による活性汚泥微生物群集²⁾と類似しており、好気処理汚泥では半数を *Proteobacteria* 門細菌および *Bacteroides* 門細菌が占める傾向があると考えられる。

(2) バチルス属細菌の優占化

平板培養法より得られたバチルス属細菌数を図-2 に示す。全 19 試料中、林牧場 N1, 林牧場 N2, 西寧, 北京におけるバチルス属細菌数は $10^5 \sim 10^7$ 個/dry-g であった。それ以外の 15 試料ではバチルス属細菌数は 10^8 個/dry-g 以上であり、これらの汚泥中ではバチルス属細菌が優占化していると示唆された。

微生物群集構造解析で検出されたバチルス属近縁種の存在割合を図-3 に示す。バチルス属細菌近縁種の検出割合は、バチルス属細菌数の低かった 4 試料においては 0~0.014%であったのに対し、バチルス属細菌数の高かった 15 試料では 0.032~0.33%であった。平板培養法による計測結果と微生物群集構造解析から得られたバチルス属細菌近縁種の検出割合は似たような傾向を示すことが分かった。また、奥利根のバチルス属細菌数は 1.8×10^8 個/dry-g であったが、微生物群集構造解析の結果からはバチルス属細菌が検出されず、ゲオバチルス属細菌が 0.33%検出された。したがって、奥利根ではゲオバチルス属細菌を計測していたことが示唆された。平板培養法ではバチルス属細菌近縁種を把握することが可能であるが、微生物群集構造解析を併用することで、バチルス属細菌の優占化をより正確に把握することができると考えられる。バチルス属細菌数が 10^8 個/dry-g であった 15 試料中 14 試料からバチルス属細菌が検出された。したがって、これらの汚泥内ではバチルス属細菌が優占化していると示唆された。

4. まとめ

- 全ての試料において *Proteobacteria* 門細菌および *Bacteroides* 門の検出割合が半数を占めていた。
- 19 試料中 14 試料においてバチルス属細菌の優占化が示唆された。

参考文献

- 1) 国土交通省ホームページ,
http://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/crd_sewerage_tk_000124.html
- 2) 村上ら, 水環境学会誌 第 18 卷 第 2 号, 97-108, 1995
- 3) Wang X et al, Appl Environ Microbiol, vol.78, pp.7042-7047

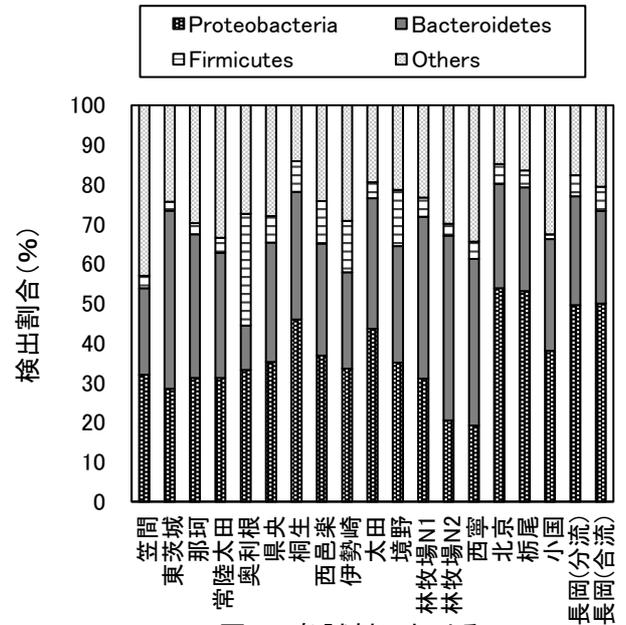


図-1 各試料における門レベルでの菌叢構造

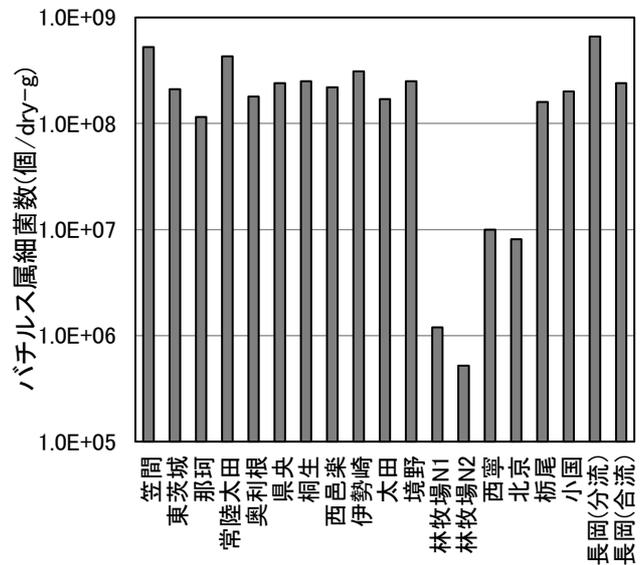


図-2 各試料におけるバチルス属細菌の菌濃度

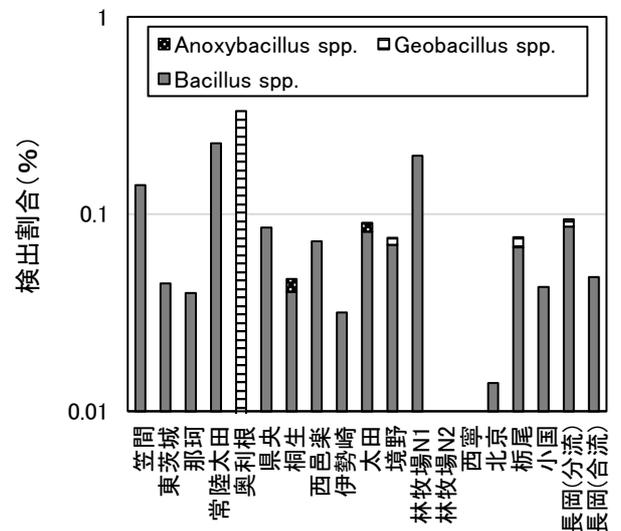


図-3 各試料におけるバチルス属細菌近縁種の検出割合