

畜産排水を対象とした連続流入間欠曝気式槽内の微生物叢と多様性解析

Identification and diversity analysis of microorganisms in livestock wastewater treatment with intermittent aerobic suspended-growth processes

松江工業高等専門学校 ○水田裕貴, 山口剛士

中国環境株式会社 山本祥平 長岡技術科学大学 山口隆司

1. はじめに

畜産経営から排出される汚水は、窒素やリン等が多く含まれ、公共用水域等に流出した場合には水質汚濁の原因になる。このため、水質汚濁防止法により、所定の水質を満たすよう処理を行うことが義務付けられている。特に、硝酸性窒素等（一般水質基準:100mg/l）については、暫定排水基準（600mg/l）が適用されている。水質汚濁防止法では、一般排水基準による排水規制を基本としており、暫定排水基準が適用されている特定事業場においても速やかに一般排水基準の達成を図ることが必要とされている。本研究で対象としている水処理施設では、豚舎から排出される家畜排泄物を処理しており、その処理水は排水基準を下回っている。しかし、排水基準が変更された場合、将来的に基準を満たせなくなる可能性がある。現在、本水処理施設では、連続流入間欠曝気式を採用し、処理水量を増やすために2つの曝気槽を設け、運転を行っている。各槽内では、曝気時間と曝気停止時間を設け、停止時には槽内が無酸素状態に近くなることで、脱窒反応を担う嫌気性微生物が活性化し窒素除去が期待されている。

そこで、本研究では連続流入間欠曝気方式の槽内における原核生物を明らかにすることを目的として、春期と夏期の水温が異なる時期について16S rRNAを標的とした微生物群集構造解析を行った。

2. 実験方法

(1) RNA 抽出

2017年6, 8月に家畜排せつ物を処理している連続流入間欠曝気式の2つの曝気槽から曝気中と曝気停止中、合わせて4サンプルを採取した。採取した汚泥はRNAの分解を防ぐために-80℃で保存した。RNA抽出は、ISOIL for RNAを用いた。抽出後、PCRに適用可能なcDNAの合成を行った。

(2) 16S rRNA を標的とした PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) は、Prime Script™ RT-PCR Kitを用いて行った。プライマーは16S rRNAに特異的なMi515f-Mi806rを用いた。

(3) 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析として次世代シーケンサーのMiSeq及び

QIIME softwareを用いて、連続流入間欠曝気方式の槽内に生息する微生物の同定を行った。その後、近縁種ツールであるBlastツール及びArb software²⁾を用いて、近縁種の推定を行った。

(4) R software を用いた種の多様性解析

本研究で解析を行ったサンプルの種多様性は、 α 多様性及び β 多様性を統計分析フリーソフト「R」を用いて解析した。

3. 実験結果および考察

(1) 微生物群集構造解析

6, 8月のすべてのサンプルにおいて *Proteobacteria* 門、及び *Bacteroidetes* 門に属する微生物が優占していることが明らかとなった(図1)。特に、*Proteobacteria* 門に属する微生物は、全サンプルにおいて過半数を占めていた。

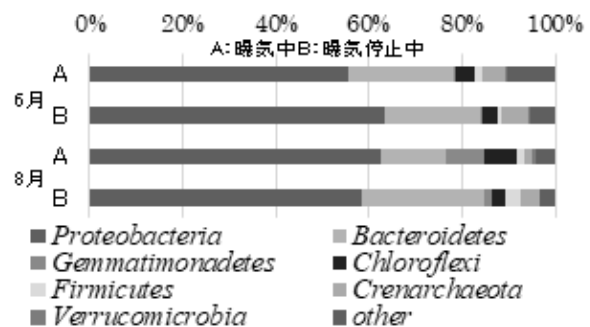


図1 6月及び8月における曝気槽1室内の門レベルでの微生物群集構造解析

図2に6, 8月の曝気槽1室に生息していた代表的な微生物を示す。6月サンプルにおいて常に10%以上を占めていた *Aquabacterium* 属に近縁な微生物は、硝化反応を担う細菌³⁾であり、本水処理装置の主な硝化反応を担っていると考えられる。8月サンプルで優占種であった *Schlegelella* 属に近縁な微生物は、好熱性硝化細菌と報告されているため⁴⁾、8月の処理槽内の水温が影響し優占していた硝化細菌が変遷したと考えられる。また、6月サンプルにおいて優占していた *Lautropia* 属に近縁な微生物は、脱窒能を有する微生物として報告されており、本装置内の窒素除去に関与していることが示唆された。しかし、曝気の有無による主要微生物の変遷が確認されなかったため、槽内は好気、嫌気性微生物が混合していたと推察する。

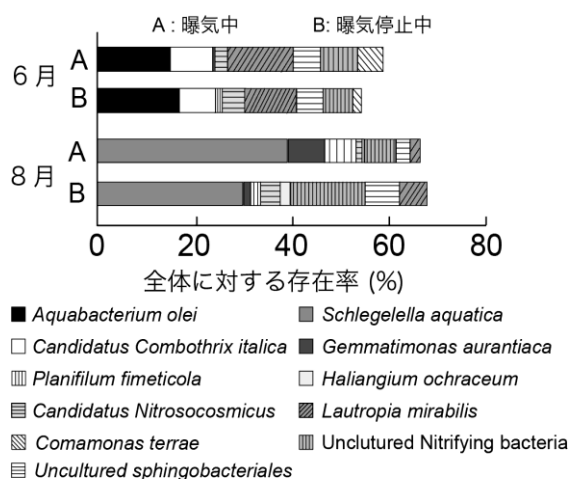


図2 装置内1室に生息する主要微生物の変遷

(2) R software を用いた種の多様性解析

図3にサンプルごとに低頻度出現である0.5%以下の OTU を除去し、再サンプリング数を1000に設定した α 多様性の解析結果を示す。縦軸にサンプルに含まれる種の数、横軸に再サンプリングしたリード数を示す。その結果、8月サンプルは、同リード数における種数が全体的に少なく、6月サンプルと比較すると多様性が低いことが示唆される。この要因として、8月の処理槽内では水温が高温になるため、好熱菌などの特定の微生物が優占し、処理槽内の多様性が減少したと考えられる。

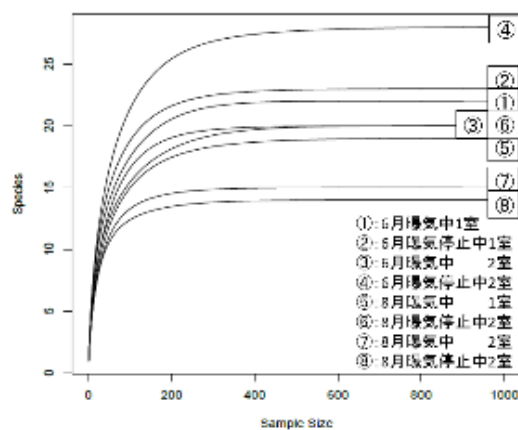
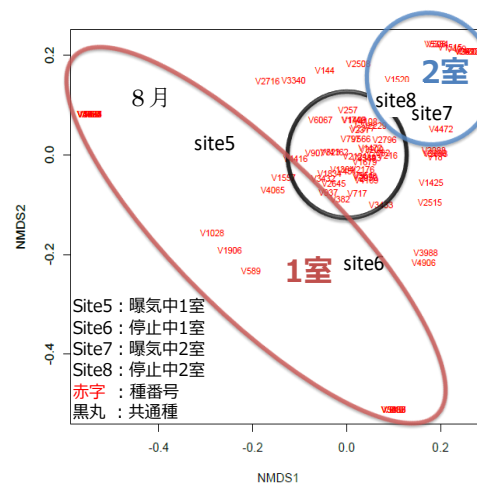
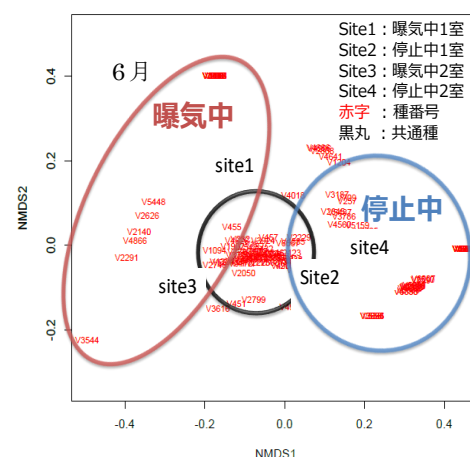
次に、図4に β 多様性の解析結果を示す。その結果、6月及び8月のサンプルは大きく OTU 組成が異なることが明らかとなった。6月サンプルでは、曝気槽1室と2室で OTU 組成が変化しなかったが、槽内における曝気の有無によって OTU 組成の違いが得られた。この結果は、嫌気性条件下にて、脱窒菌が活性化したこと起因していると考えられる。8月の4サンプルについては、曝気槽1室と2室で OTU 組成が異なることが明らかとなった。この結果から、曝気槽1室及び2室で異なる処理性能を有していることが考えられる。

4. まとめ

本研究では、連続流入間欠曝気式槽内に生息する微生物を明らかにするために6月及び8月の微生物群集構造解析を行った。その結果、曝気槽内における優占種の多くは、硝化細菌であった。6月サンプルにおいては硝化細菌と同程度の脱窒菌の存在も示唆された。曝気の有無による大きな変遷は確認できず、高い水温において好熱菌が優占し多様性が失われることが確認できた。

今後は、年間を通して本水処理施設槽内の微生物群集の変化を解析、また水質データを加えた多様性解析を行う予定である。

謝辞：採水及び水質データの提供にご協力賜りました。中国環境株式会社の皆様に感謝いたします。

図3 本処理槽内における α 多様性図4 水処理装置における β 多様性解析結果

参考文献

- 1)環境省, 排水基準を定める省令の一部を改正する省令の一部を改正する省令 2016.
- 2)Ludwig, Wolfgang, et al., Nucleic acids research 32.4 2004
- 3)Sibylle Kalmbach et al., Systematic and Evolutionary Microbiology 49.2 1999.
- 4)Khaled Elbanna et al., Systematic and Evolutionary Microbiology 56.12 2006.
- 5)Doyoung Park et al., Applied and Environmental Microbiology 83.12 2017.