

浸出水を処理する微生物の群集構造解析及び分離・培養

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

廃棄物の最終処分場である埋立地からは、降雨や地表水、地下水の流入に伴い埋立物の成分を含んだ浸出水が発生する。浸出水は塩分濃度が高く、また重金属類、難分解性の有機物を含んでいるため、適切な処理なしに放流すると、周辺水系の水質汚濁を引き起こす可能性がある。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。近年、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っている。これは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である。このような環境下でも、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。浸出水の組成のユニークさから、この過程においては、系統的に多様かつ未だ機能が明らかになっていない微生物が多く存在していると考えられる。そのような叢の構造、処理メカニズム、及び個々の微生物の機能を明らかにすることは、浸出水の処理の最適化、また浸出水に含まれる重金属など微量元素の回収技術の開発においても重要である。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

宮城県にある埋立処分場に併設された排水処理施設内の好気性硝化槽を調査対象とした。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、砂ろ過処理、活性炭吸着処理、滅菌処理を順に行い、放流される。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、TOPO TA クローニングキットを用いてクローン

ライブラリを作成、その後系統解析を行った。

分離培養の培地に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 に加え、その使用により培養能が向上するという報告¹⁾がなされている 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、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、マグネシウムは 3.0 mg/l と、海水と比較してわずかにしか含まれていなかった。塩分濃度が同程度でありながらも、硝化槽内の組成は海水とは大きく異なると言える。

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月のサンプルについて *Bacteria* のクローンライブラリを作成し、167 クローンの 16S rRNA 遺伝子のシーケンス全長を決定した。これらの *Bacteria* の門および綱レベルでの微生物叢構造を分類した (表-1) ところ、クローンは 15 門に分類された。そのうち 65% が *Proteobacteria* 門に、また 16% が OD1, TM6, TM7 の 3 門の *Candidate division* に属しており、特定の種に多くのクローンが属していた。また、得られたクローンに対し 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 は 0.77, ACE が 113, Chao1 が 117 であり、本解析で硝化槽内の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ことが示唆された。4 クローン以上で構成される 10 OTU (71 クローン) のうち、NCBI の BLAST 検索で近縁種と 97% 以上の相同性を示したものは 2 OTU (各 4 クローン) で、*Candidate division* も含めクローン解析上優占しているものについてはその機能が未知であった。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。*Archaea* については現在解析中である。

8月のサンプルについて、CFU のカウントを行ったところ、図-1 のように推移した。培養 30 日までの CFU は a 培地に比べ g-1, g-2 培地で多く、培養初期において gellan gum がコロニーの発現を促していると考えられた。しかしそれ以降は CFU を増大させる結果とはならなかった。また、培養終期における g-1 培地の CFU は他 2 培地に比べ少なく、ろ液の希釈倍率が高いために培養能が低下したと考えられる。

表-2 *Bacteria* クローン解析

門・綱分類	クローン数	割合 (%)
<i>Proteobacteria</i>	109	65
<i>Bacterioidetes</i>	8	5
<i>Actinobacteria</i>	8	5
<i>Nitrospirae</i>	4	2
<i>Planctomycetes</i>	4	2
<i>Verrucomicrobia</i>	4	2
<i>Chloroflexi</i>	2	1
<i>Chlorobi</i>	1	1
<i>Firmicutes</i>	1	1
OD1	12	7
Candidate division TM6	3	2
TM7	11	7
total	167	100

7月と8月のサンプルを培養し、約 400 の分離株を得た。そのうち、現在までに 16S rRNA 遺伝子のシーケンスが得られている計 246 株について NCBI の BLAST 検索で近縁種との相同性を調べたところ、全分離株の 59% が *Mycobacterium* sp. に 99% 以上の相同性を示した。クローン解析では 1% しか検出されなかった種であるが、培養においてはその増殖が速いために優占したと考えられる。また、10% が多環芳香族炭化水素 (PAH) 分解菌である *Novosphingis* sp. に 99% 以上の相同性を示した。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 を多く含む石油に汚染された土壌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。

また、相同性 94% 以下の新規性の高い分離株は、a 培地から *Mesorhizobium* sp. に近縁な 7 株と *Rhodospirillum* sp. に近縁な 6 株が得られた。クローン解析で前者は 20 クローン、後者は 10 クローンの OTU を形成しており、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 NCBI の BLAST 検索の結果、*Alphaproteobacteria* 綱、*Parvibaculum* 属、*Parvibacterium* sp. に 89% の相同性を示す株 (110822_g_2_50_2 株) が得られた (図-2)。系統解析ソフト Arb では *Deffluviococcus* 属に属し、属内の近縁種との相同性は 86% と、分子系統学上、高い新規性を示していた。

今後、硝化槽内微生物叢のさらなる理解を目指し *Archaea* のクローン解析および *Bacteria* の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、株の系統学的、生理学的及び形態的特徴の分析を行う予定である。

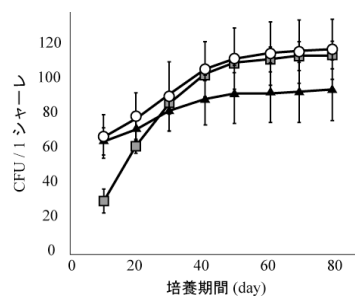


図-1 CFU 推移 (n = 5)

○ g-1 培地 ▲ g-2 培地 ■ a 培地

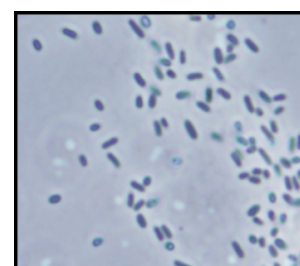


図-2

110822_g_2_50_2 株の
位相差写真

参考文献

- 1) H. Tamaki et al., (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, 11, 1827-18