

異なる産業廃水を処理するグラニュール汚泥の微生物群集の比較

宮城県仙台二華高校

○三浦花梨

宮城県仙台二華高校

針生紗雪

東北大学大学院工学研究科

浦崎幹八郎

宮城県仙台二華高校

庄子俊男

東北大学大学院工学研究科

久保田健吾

1 目的

現在生活や産業で使用された水は物理学的処理、化学的処理、生物学的処理など様々な方法で処理されている。そのうち、生物学的嫌気性廃水処理技術は有機物をメタンガスや水素等のエネルギーとして回収することができる。廃水処理技術の研究を行うにあたり、微生物群集構造とその動態を把握することが不可欠である。

本研究では、異なる実産業廃水を嫌気性処理するグラニュール汚泥の微生物群集の解析を行った。加えて、FISH (Fluorescence *in-situ* hybridization) 法による微生物分布の可視化を行った。

2 調査方法

3種類の異なる工場廃水を処理する嫌気性反応槽内よりグラニュール汚泥を採取した。それぞれをサンプル A、サンプル B、サンプル C とする。

(1) FISH 法

汚泥サンプルは、採取後直ちに、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、エタノールと PBS を 1:1 で混合させた溶液中で、-20°C で保存した。その後クライオスタット (Leica, CM3050S) により 30 μ m の厚さにスライスした。作成した切片に対して、FISH 法を適用した。使用したプローブは、*Bacteria* に特異的な EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'、5'末端に Cy 3 を付加)、および

Archaea に特異的な ARC915 (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'、5'末端に Alexa Fluor488 を付加) とした。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl-Zeiss, LSM710) により行った。

(2) 微生物群集構造解析

サンプル A,B,C を対象に次世代シーケンサーを用いた微生物群集構造解析を行った。DNA 抽出には ISOL for Beads beating (ニッポン・ジーン) を使い、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的とした 341F-806R プライマーセットを用いて PCR を行った。その後、Miseq によるシーケンシングを行い、QIIME を用いて微生物群集解析を行った。

3 実験結果及び考察

図 1 にサンプル A の FISH 法解析結果、図 2 にサンプル A,B,C の微生物群集構造解析の結果を示す。

(1) FISH 法解析結果

FISH 法をグラニュール汚泥の切片に対して行った結果、表層を *Bacteria* が覆い、その内側に *Archaea* が分布する傾向が示された。嫌気性処理では、*Bacteria* と *Archaea* が共存し、廃水中に含まれる有機物を最終生成物であるメタンにまで分解する。メタンを生成するのが *Archaea* であるメタン生成古細菌であるため、*Archaea* が内装に分布する傾向を示したと考えられる。

キーワード：嫌気性廃水処理、グラニュール汚泥、微生物群集解析、FISH 法

連絡先：〒984-0052 宮城県仙台市若林区連坊一丁目四番一号 （電話：022-296-8101）

（２）微生物群集構造の解析結果の比較

３つのサンプルの解析結果における *Proteobacteria* 門の *Deltaproteobacteria* 綱、*Chloroflexi* 門、*Euryarchaeota* 門の３つに注目する。それぞれのサンプルについてこの順番で割合を示す。サンプル A では、28%、13%、21%、サンプル B では 19%、18%、13%、サンプル C では 9%、34%、24%となっている。

サンプル A では、*Deltaproteobacteria* 綱が 4 分の 1 以上を占めている。*Deltaproteobacteria* 綱には、嫌気性廃水処理に関わるものが多く存在することが知られている。サンプル A において、*Deltaproteobacteria* 綱は優占的であった。

サンプル B では、*Euryarchaeota* 門が他のサンプルと比べ、10%ほど少ない値となっている。本研究における解析結果で *Euryarchaeota* 門に属する微生物の多くはメタン生成古細菌であった。メタン生成古細菌はメタン生成経路における最終処理を行う細菌である。この微生物が少ないということは、サンプル B でのメタン生成が少なく、より負荷が低いサンプルであった可能性が考えられるため、今後、リアクターの運転条件も踏まえて解析を行っていく必要がある。

サンプル C では、*Chloroflexi* 門が多く存在し、そのうち *Anaerolineae* 綱がほとんどをしめていた。*Anaerolineae* 綱は、炭水化物やアミノ酸を分解することが知られているため、サンプル C が処理する廃水は、サンプル A、B と比較してそれら炭水化物、あるいはアミノ酸を多く含有するものであると推察される。

４ まとめ

本研究によって、微生物は異なる廃水を処理する中でそれぞれの廃水の特性に適応した微生物群集構造となることが確認された。本研究では、綱レベルの分類による考察にとどまったため、今後は、より詳細な分類による考察を行いたい。

謝辞

本研究は、「中谷医工計測技術振興財団」の助成を受けたものです。ここに深く感謝の意を表します。

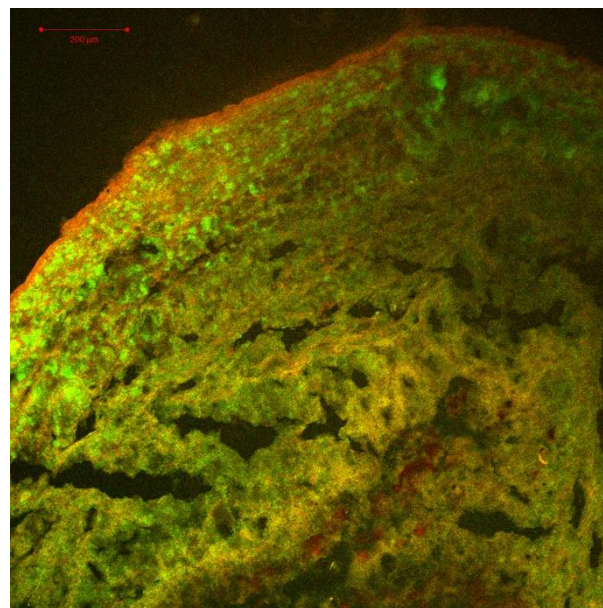


図 1 サンプル A の FISH 法解析結果

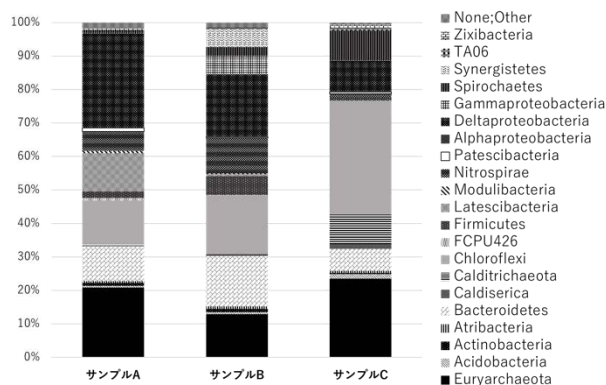


図 2 微生物群集構造解析結果

表 1 サンプルの A,B,C の 3 要素の割合

	サンプルA	サンプルB	サンプルC
Deltaproteobacteria綱	28%	19%	9%
Chloroflexi	13%	18%	34%
Euryarchaeota	21%	13%	24%

参考文献

- 1) 三井農林株式会社、「第 4 回 細菌の分類体系」
<https://www.mitsui-norin.co.jp/mmid/knowledge/yokota/index4.html>
 、2019/6/14 更新、2020/11/21 閲覧
- 2) 製品評価技術基盤機構「アナエロリネア属細菌
 (Anaerolinea thermophila UNI-1T (= NBRC 100420T))」
<https://www.nite.go.jp/nbrc/genome/project/annotation/analyzed/at1.htm> 2020/11/21 閲覧