

PMA-PCR 法を用いた嫌気性消化汚泥の微生物叢解析：中温と高温の比較

東北大学工学部 学生会員 ○阿部天磨

八戸工業高等専門学校 正会員 矢口 淳一、東北大学大学院 正会員 李 玉友、久保田 健吾

1. はじめに

嫌気性消化は、汚泥処理の工程の一種であり、汚泥内に含まれる有機物を、嫌気性細菌によって分解し、最終的にはメタンガスを生成する。嫌気性消化には、汚泥の安定化、減量化、エネルギー回収というメリットがある。消化温度には中温（30～40℃）と高温（50～60℃）のプロセスがある。嫌気性処理は、複雑な有機物の加水分解による可溶性・低分子化から、低分子物質の酸発酵による揮発性脂肪酸、アルコール類の生成、そして、酢酸又は水素と二酸化炭素からのメタンガスの生成によって反応が進行している。それぞれの反応には異なった微生物群が関与している。微生物群集構造を知ることは消化プロセスの効率化、安定化のための第一歩になる。しかし、下水汚泥を処理する消化汚泥の場合、初沈汚泥や活性汚泥に含まれる好気性微生物などの死細胞が残存していても、それを区別できないために、それらを含んだ微生物群集構造解析が行われている。そこで本研究では propidium monoazide (PMA) に着目した。PMA は細胞膜を損傷している DNA にインターカレート後、光に暴露されることにより DNA と共有結合する色素である。PMA と共有結合した DNA は PCR 時に増幅されないため、細胞の生死を細胞膜の損傷で区別することができる。我々の研究グループでは中温消化汚泥の解析を行ってきたが、今回、高温消化汚泥の微生物群集を PMA-PCR 法を用いて解析し、中温のものと比較した。

2. 実験方法

対象は下水汚泥を高温嫌気性消化している A 浄化センターとした。A 浄化センターは標準活性汚泥で下水を処理し、最初沈澱池沈殿汚泥と余剰汚泥の混合汚泥を嫌気性消化している。この下水処理場から春、夏、秋の計 3 回、消化汚泥と初沈汚泥と活性汚泥のサンプリングを行った。採取した消化汚泥の一部は PMA で処理した。PMA 処理は、まず消化汚泥を PBS で 10 倍希釈し、そこに PMA を最終濃度で 100 μM になるように添加し、暗所・室温で 5 分間行った。その後、PMA-Lite を用いて 15 分間処理した。DNA の抽出は ISOIL for Beads Beating Kit (Nippongene) を用いて行い、341f-806r プライマーセットにより 16S r RNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的とした PCR を行った後、MiSeq によるシーケンシングを行った。データの解析は QIIME を用いて行った。具体的には、キメラ配列の除去後、97%の相似性で OTU 作成し、silva132 データベースを用いた相同性検索を行った。また中温の嫌気性消化汚泥について解析を行った Ni et al. (2020) のデータも合わせて解析を行った。サンプル間の比較を行うためのサブサンプリングは 40,000 リードとした。以降、消化汚泥を DS、PMA 処理した消化汚泥を DS-PMA、初沈汚泥を PS、余剰汚泥/活性汚泥を WAS と書く。

3. 実験結果

DS サンプルの OTUs、Chao1、Shannon はそれぞれ 1240.0 ± 53.0 、 2055.2 ± 151.7 、 5.9 ± 0.2 であった ($n=3$, 平均±偏差)。PMA 処理を行うと、この値がそれぞれ 536.0 ± 59.6 、 907.7 ± 109.4 、 4.7 ± 0.1 となり、特定の微生物群が PMA 処理により PCR 増幅されなくなっていることを示していた。すなわち、消化汚泥中に細胞膜が損傷し、死菌として存在している微生物群が一定数いることがわかった。また、中温の場合、DS サンプルの OTUs は 1804.3 ± 374.6 ($n=12$, 平均±偏差)であり、PMA 処理後は 1306.3 ± 338.1 となっていた。中温の場合、PMA 処理後の OTUs の減少率が約 28%、高温の場合は、約 57%となっており、高温の場合のほうが、PMA 処理を行うことでより多くの OTU が検出されなくなった。

キーワード 高温嫌気性消化、微生物群集構造、PMA

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 電話 022-795-7463

次に、門レベルでの微生物群集構造を図1に示す。DSにおいて、主要な微生物群は Coprothermobacteraeota、Proteobacteria (Alpha-, Delta-, Gamma-)、Firmicutes、Bacteroidetes、Thermotogae、Actinobacteria、Cloacimonetes、Synergistetes、Euryarchaeota、Hydrothermae、Patescibacteria、Chloroflexi、Caldiserica、Dictyoglomi、Acidobacteria (1%以上)であった。PMA 処理によって減少がみられた種は Proteobacteria、Actinobacteria であった。これらは消化されずに残存していた死滅した微生物だと考えられる。Proteobacteria について綱レベルで見ると Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria (主に Betaproteobacteriales) は減少がみられたが、Deltaproteobacteria には変化は見られなかった。これは中温消化槽と同様の結果であった。Actinobacteria の減少は中温消化槽の場合には見られず、高温消化汚泥に見られる特徴的な結果であった。その結果、DS-PMA においては、Bacteroidetes、Firmicutes、Coprothermobacteraeota、Cloacimonetes、Synergistetes、Thermotogae、Euryarchaeota、Patescibacteria、Chloroflexi、Hydrothermae、Caldiserica、Acidobacteria、Deltaproteobacteria (1%以上)であった。より詳細に見ると、Coprothermobacteraeota 門の *Coprothermobacter* 属 ($18.7 \pm 4.3\%$)、Synergistetes 門の *Acetomicrobium* 属 ($7.92 \pm 1.3\%$)、Bacteroidetes 門の Lentimicrobiaceae 科 (group W5) ($15.6 \pm 4.8\%$)、Cloacimonetes 門の Cloacimonadaceae 科 ($13.6 \pm 5.9\%$) が多く存在していた。*Coprothermobacter* 属はタンパク質分解に寄与していることが知られている。また *Acetomicrobium* 属は糖の分解に関与していると考えられる。Lentimicrobiaceae 科については中温で糖を分解する微生物が知られているが、高温環境下で生息する微生物についてはその機能はあまり知られていない。Cloacimonadaceae 科の group W5 は近年、高温プロキオン酸酸化細菌であることが報告されている。メタン生成古細菌の群集構造においては、酢酸資化性のメタン生成古細菌としては中温・高温共に *Methanosaeta* 属が多く見られた。水素資化性のメタン生成古細菌においては、中温で *Methanolinea* 属、*Methanoculleus* 属が多く見られたが、高温の場合は *Methanothermobacter* 属、*Methanobacterium* 属が多く見られた。

消化槽に投入される混合汚泥中に含まれる微生物の消化汚泥の微生物群集構造に与える影響を見るために主座標分析を行った。群集構造の違いを主座標分析 (weighted unifrac) により可視化したものが図2である。消化汚泥 (DS と DS-PMA) はクラスターを形成したが、PS と WAS からは離れており、異なる微生物群集構造が形成されていることが示された。また、DS-PMA は DS に比べて初沈汚泥や余剰汚泥の群集構造から遠いところにプロットされたことから、DS には混合汚泥由来の微生物による DNA が解析に影響を与え、消化槽内で処理に貢献している微生物群を正しく評価できていなかったと考えられる。

4. 結論

PMA 処理は、高温消化に関わっている微生物群をより正確に把握できる可能性を示した。特に高温消化においては中温消化に比べて微生物の多様性を多く見積もって評価していたと考えられ、これまでの下水汚泥処理高温嫌気性消化汚泥の微生物群集構造について再考する必要があると考えられる。

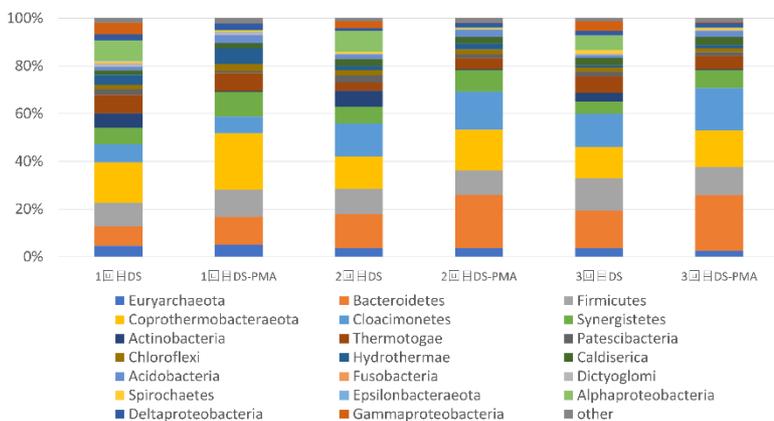


図1 高温嫌気性消化汚泥の微生物群集構造

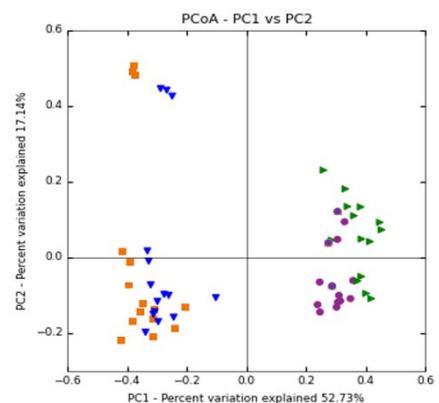


図2 主座標分析 (青：DS、橙：PMA-DS、紫：WAS、緑：PS)