

B-14 都市下水処理場の活性汚泥中における PHA蓄積微生物群集の解析

○酒井 孝輔^{1*}・三宅 佐和¹・井上 大介²・惣田 訓¹・池 道彦¹

¹大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

²北里大学 医療衛生学部 健康科学科 (〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1)

* E-mail: sakai@wb.see.eng.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

下水処理における余剰汚泥の処理にかかる多大なコストやエネルギーが問題視されているが、その解決策として余剰汚泥を資源・エネルギーへ転換して利用することが期待されている。本研究では、活性汚泥の資源価値を評価する指標の一つとして、活性汚泥中の微生物が炭素およびエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)に着目した。PHAは生分解性プラスチックとして注目されているだけでなく、余剰汚泥中でその含有率を高めれば、嫌気性処理に供した際にメタンガス回収量が増加することも示唆されている¹⁾。

活性汚泥は多種多様な微生物種により構成されており、その中に存在するPHA蓄積微生物も当然多様であると考えられる。また、オランダ・デルフト工科大学のグループがFeast-famine法で下水汚泥より集積したPHA高蓄積系の主要微生物が新属新種(*Plasticumulans acidivorans*)であることが近年明らかにされ²⁾、活性汚泥中には未知のPHA蓄積微生物も存在していると推測されるが、その調査事例は少ない³⁾。

そこで本研究では、複数の都市下水処理場から採取した活性汚泥中のPHA蓄積微生物群集を解析し、その多様性の解明を試みた。また、16S rRNA遺伝子を標的とした真正細菌群集の解析も実施し、PHA蓄積微生物群集の構造と真正細菌群集の構造との関係について考察した。

2. 実験方法

(1) 試料の採取およびDNAテンプレートの調製

2011年9-11月に標準活性汚泥(CAS)法、嫌気好気(AO)法、嫌気無酸素好気(A2O)法、膜分離活性汚泥(MBR)法、凝

集剤併用型ステップ流入式多段硝化脱窒(Step-feed)法の各処理方式を採用している下水処理場(A-F)において、曝気槽出口付近より8種の活性汚泥試料を採取した(表1)。

汚泥試料からのDNA抽出にはISOIL for Beads Beating (Nippon gene)を、抽出後のDNAの精製にはMagExtractor - PCR&Gel Clean up- (Toyobo)をそれぞれ用いて、添付のプロトコルに従ってDNAを抽出・精製して微生物解析に用いた。

表 1 対象処理場の運転条件と採取試料

処理場名	処理方式	SRT (d)	水温 (°C)	pH	MLSS (mg/L)
A	CAS	7.4 ^a	25.4	6.1	1480
B	CAS	8.1 ^a	25.3	6.7	2530
C	AO	7.5 ^a	24.2	6.6	1430
D	CAS	3.7 ^b	24.0	6.6	1250
	A2O	5.0 ^b	21.2	6.5	1920
E	MBR	79.7 ^b	30.1	7.1	7680
F	CAS	4.6 ^a	29.5	6.4	760
	A2O	12.7 ^a	28.7	6.4	1720
	Step-feed	22.6 ^a	28.6	6.2	2250

^a 採取月における平均値

^b 採取日直近の測定日の値

(2) 真正細菌群集の構造解析および定量

真正細菌群集の構造解析には、真正細菌16S rRNA遺伝子を標的とした terminal-restriction fragment length polymorphism(T-RFLP)法を用いた。16S rRNA遺伝子の増幅には、フォワードプライマーの5'末端を蛍光標識したプライマーセット[27F-FAM, 1392R]⁴⁾を用いた。増幅産物を制限酵素 *Hha*I、*Hae*III、*Msp*Iによってそれぞれ消化し、レーザー蛍光検出キャピラリー電気泳動によって、蛍光末端断片(T-RFs)パターンを得ると共に付属のソフトウェア

により断片長解析を行った。

また、真正細菌16S rRNA遺伝子の定量は、プライマーセット [EUB-933, EUB-r1387]⁹⁾を用いた3連のmost probable number-polymerase chain reaction(MPN-PCR)法により行った。

(3) PHA蓄積微生物群集の構造解析および定量

PHA蓄積微生物群集の構造解析は、PHA蓄積微生物が保持するPHA合成遺伝子(*phaC*)のクラスIとIIを標的としたT-RFLP法によって行った。*phaC*遺伝子の増幅にはフォワードプライマーの5'末端を蛍光標識したプライマーセット[CF1-FAM, CR4]⁹⁾を用い、増幅産物を制限酵素 *Mbo*I、*Acl*IIによってそれぞれ消化した後、(2)に示した方法に準じてT-RFLP解析を行った。*phaC*遺伝子には既存のT-RFsデータベースがないため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録された分類学的に同定されている微生物が有する*phaC*遺伝子の配列情報を入手し、断片長予測ソフトウェア(TRIFLE)⁷⁾により、T-RFsデータベースを作成した。このデータベースを用いて、検出されたT-RFsに該当する微生物種を推定した。

また、PHA蓄積微生物群集の定量は、*phaC*遺伝子を標的とするプライマーセット[CF1, CR4]⁹⁾を用いたMPN-PCR法により行った。

(4) 統計解析

微生物群集の分類、序列化手法として、主成分分析(PCA)を用いた解析を行った。PCAは、それぞれの制限酵素で消化したT-RFLP解析結果を連結し、各T-RF断片長の*P*値(*i*番目のT-RFのピーク面積を全T-RFsのピーク面積の総和で除した値)行列をデータセットとし、SPSS ver. 15.0 for Windowsを用いて行った。

3. 実験結果と考察

(1) T-RFLPプロファイルに基づくPHA蓄積微生物群集構造の推定

*phaC*を標的としたT-RFLP解析によって得られた試料ごとのT-RFsの構成比を図1に示す。検出された合計90種のT-RFsを新たに構築したデータベース上の微生物種と照合し、各試料でのPHA蓄積微生物群集の構成の推定を試みたが、*Mbo*Iを用いた解析で検出された56 bp (*Mesorhizobium*)と493 bp (*Alcaligenaceae*)のT-RFsしか該当するものがなく、ほとんどのT-RFsがデータベースには存在しないことが確認された。この理由として、本研究で研究されたT-RFsが*phaC*遺伝子に由来するものではない可能性が疑われた。しかし、Michinakaら⁸⁾は、下水汚泥

を植種源としたPHA蓄積微生物集積リアクターを立ち上げ、本研究と同一のプライマーセットを用いて、リアクター汚泥に存在する*phaC*遺伝子のクローニングを行い、PCR産物が全て*phaC*遺伝子であることを明らかにしている。このことから、本研究で検出されたT-RFsも*phaC*遺伝子に由来しており、下水汚泥中には多様な未知の*phaC*遺伝子が存在しているが示唆された。

また、F-Step-feedでは*Mbo*Iを用いた解析で67 bpとなるT-RFが50%近くを占め、他と大きく異なる構成を示した。

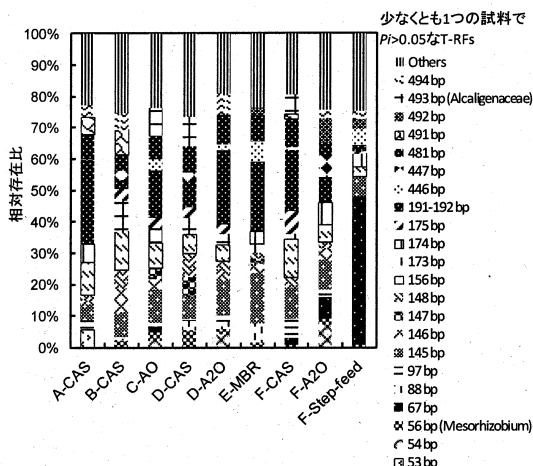


図1 *phaC* 遺伝子の T-RFLP 解析結果に基づく
PHA 蓄積微生物群集の相対存在比

(2) PHA蓄積微生物群集構造の類似性

各試料のPHA蓄積微生物群集構造の類似性を把握するため、*phaC*遺伝子を標的としたT-RFLP解析結果をPCAに供した。その結果、第1主成分(PC1) (寄与率59.8%)、第2主成分(PC2) (寄与率12.8%)を用いたスキャッターダイアグラムにおいて、F-Step-feed 以外の試料が大きなグループを形成した(図2A)。この結果から、F-Step-feedは特定のPHA蓄積微生物が選択された特殊な微生物群集を有していることが示唆された。F処理場のA2OとStep-feedでは同一の流入水が処理されているが、両処理方式でのPHA蓄積微生物群集構造の類似度が低いことから、F-Step-feedにおける特殊なPHA蓄積微生物群集構造はStep-feedという処理方式に特異的なものであることが推察された。

また、各主成分と各処理プロセスの環境因子や運転制御因子、廃水処理成績との相関を調べたところ、PC1とNH₄-N除去率の間に有意な正の相関が確認された($R^2=0.66$, $p=0.05$)。

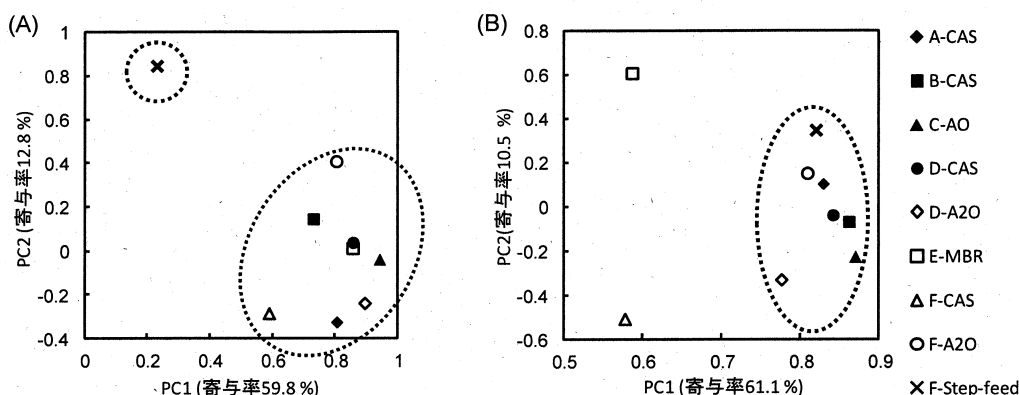


図2 活性汚泥中の微生物群集の T-RFLP 解析データを用いた PCA 結果

(A) *phaC* 遺伝子、(B) 16S rRNA 遺伝子

(3) 群集構造および遺伝子数による真正細菌群集と PHA 蓄積微生物群集の比較

真正細菌 16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 解析結果を PCA に供した。その結果、PC1 (寄与率 61.1%)、PC2 (寄与率 10.5%) を用いたスカッターダイアグラムにおいて、*phaC* 遺伝子の解析では他の試料との類似性が低かった F-Step-feed が、本真正細菌 16S rRNA 遺伝子の解析では大部分の試料が属するコアグループに含まれ、大きな差がないことが明らかとなった (図 2B)。また、真正細菌群集の構造に影響を及ぼす因子は PHA 蓄積微生物群集の構造に影響を及ぼす因子とは異なることが示されたことから、PHA 蓄積微生物群集は真正細菌群集全体の中ではマイナーな存在である可能性が考えられた。

そこで、MPN-PCR により 16S rRNA 遺伝子と *phaC* 遺伝子の定量を行った。*phaC* 遺伝子数の定量結果と、16S rRNA 遺伝子数に対する *phaC* 遺伝子数の割合を図 3 に示す。各試料中の *phaC* 遺伝子数は 1.1×10^9 – 2.2×10^9 copies/g-MLSS

であり、16S rRNA 遺伝子数に対して 0.03% にも満たない (4.6×10^{-5} – 2.9×10^{-4}) ことが明らかとなり、PHA 蓄積微生物群集は活性汚泥中では優占的な存在ではなく、マイナーな群集であることが確認された。

4. まとめ

本研究で得られた結果から、(1) 下水汚泥中には多様な未知の *phaC* 遺伝子が存在していること、(2) Step-feed 法により特定の PHA 蓄積微生物が選択された特殊な PHA 蓄積微生物群集が構成される可能性があること、および (3) PHA 蓄積微生物群は下水汚泥中では優占的な存在ではなくマイナーな群集であることが示された。

本研究では活性汚泥中の微生物群集構造解析および遺伝子数の定量により、処理場間で PHA 蓄積微生物群集が異なることを明らかにしたが、今後は、活性汚泥の PHA 蓄積能も調査し、PHA 蓄積微生物群集の構成が PHA 蓄積にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることが重要である。

謝辞：本研究の一部は科学研究費補助金若手研究 (A) (No. 24681010) による助成を受けて実施した。

参考文献

- 1) Huda et al. (2011) 4th IWA-ASPIRE Proceedings USB.
- 2) Jiang et al. (2011) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2314–2319.
- 3) Oshiki et al. (2008) *Water Sci Technol.* 58, 13–20.
- 4) Amann et al. (1995) *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- 5) Iwamoto et al. (2000) *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 129–141.
- 6) Sheu et al. (2000) *Microbiology* 146, 2019–2025.
- 7) Junier et al. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6452–6456.
- 8) Michinaka et al. (2006) *Biotechnol. Bioeng.* 95, 871–880.

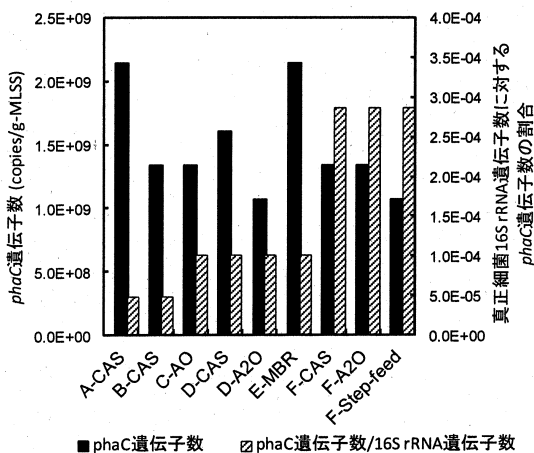


図3 MPN-PCR による *phaC* 遺伝子数と真正細菌 16S rRNA 遺伝子数に対する割合