

B-48 晴天時流入下水の微生物群集解析による 汚水マーカー微生物の探索と処理工程における 挙動の解析

○三上 雄一郎^{1*}・栗栖 太²・春日 郁朗¹・古米 弘明²

¹東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

²東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター (〒1113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

* E-mail:mikami@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. 背景と目的

我が国において比較的古い時期に下水道を整備した地域では、雨水と汚水を同一管渠で排除する合流式下水道を多く採用している。合流式では、管渠の遮集能力もしくは下水処理場の処理能力を超えるような雨水の流入がある場合には、未処理下水が雨天時合流式下水道越流水(Combined Sewer Overflow: CSO)として受水域に排出される。CSOとして排出される汚濁負荷としては生活廃水等の汚水に加え、都市の不浸透面からの表面流出水、管路内堆積物があり、汚濁物質により各負荷源の寄与は異なる¹⁾。従って、CSO由来汚濁負荷の流出挙動を把握するためには、それぞれの汚濁負荷源の影響を正しく理解することが必要となる。

未処理下水の放流に伴う糞便汚染を調べる為には、糞便中に含まれるヒト糞便由来物質に注目した解析が行われる。ヒト糞便に特異的な物質としてはコプロスタノールなどの化学物質が用いられることもあるが、多くの場合は腸内細菌である大腸菌が用いられる。ヒトの腸内に常在している微生物としては、大腸菌のほかにも、*Bacteroidales* 目細菌が糞便中における存在割合が大きく、ヒトの腸内に特異的に存在する種も報告されており、ヒト糞便による影響を特異的に検出可能である。さらに分子生物学的手法の発達によって、同細菌の遺伝子マーカーをターゲットとした短時間での定量法も報告されている²⁾。

糞便汚染指標となる微生物のように、特定の環境に特異的に存在している微生物が特定できれば、廃水の由来を知ることができ、雨天時に下水に加わる汚濁負荷起源と生活廃水等の汚水の識別もできるようになる可能性がある。また近年の次世代高速シーケンシング技術の向上により環境細菌叢に対する迅速な解析手法が確立しつつあり、こうした微生物の特定に用いることができる可能性がある。

そこで本研究では複数の下水処理場晴天時流入水の微生物群集を次世代高速シーケンシングにより解析し、晴天時下水に特徴的な細菌叢構造および晴天時下水を特徴づける微生物の候補を明らかにすることを目的とした。また既往の知見から糞便由来のマーカー微生物として有力なヒト特異 *Bacteroides* の遺伝子マーカーを処理工程ごとに測定し、従来からの糞便指標細菌である大腸菌や、Total *Bacteroidales* の遺伝子マーカーと分布や挙動について比較した。

2. 実験方法

(1) 試料採取

関東地方の3つの下水処理場(W1、W2、W3)から試料を採取した。採水は平成24年の7月から10月にかけて行い、W1、W2では流入水と放流水を採取し、W3ではそれらに加え生物反応槽中の活性汚泥懸濁液と二次処理水を採取した。

(2) DNA 抽出

流入水、二次処理水および放流水については、それぞれ 10ml、100ml の試料から吸引ろ過により Isopore membrane filter (0.22 μ m, Millipore) 上に菌体を捕捉し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを用いて膜を溶解させるとともに DNA の抽出を行った。汚泥懸濁液については、2ml の試料を 13000rpm、20℃ で 5 分間遠心分離し上澄みを捨てた後、TE を 2ml 加えて懸濁、洗浄、再度同条件で遠心分離を行い、ペレットを回収した。FastDNA® SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals)を用いペレットから DNA を抽出した。抽出した DNA は次の処理まで -20℃ で冷凍保存した。

(3) 次世代シーケンサーを用いた微生物群集解析

サンプル毎に固有のバーコード配列を付加したユニバーサルプライマー(Unv519F-Unv802R)を用い

て、各試料の 16SrRNA V4 可変領域を増幅した。その後、各 PCR 増幅産物を等量ずつ混合し解析試料とした。その後の 454GS FLX+(Roche)を用いたシーケンス解析は、マクロジェン・ジャパンに外注し、各試料の DNA 配列データを取得した。取得した DNA 配列データは、すべての試料のデータを合わせて解析し相溶性 97%以上の相溶性を持つものを Operational Taxonomic Units(OTUs)とした。形成された OTU の代表配列を Green genes の 16SrRNA データベースと照合して菌種帰属を行い、各試料中および試料間の細菌構造を解析した。

(4) ヒト特異 *Bacteroides*²⁾、Total *Bacteroidales*²⁾、大腸菌³⁾、全細菌⁴⁾の DNA コピー数は LightCycler®480 System II(Roche)を用いたリアルタイム PCR により定量した。解析は全て TaqMan プローブ法により行っており、各プライマー、プローブおよびサーマルコンディションは既報に基づき設定した。

3. 実験結果および考察

(1) 晴天時処理場流入水の微生物群集構造

W1、W2、W3における晴天時流入水からそれぞれ2527、4654、2741リードの配列データを取得し、3試料合わせて1043種類のOTUに整理された。それぞれW1、W2、W3で485、555、488OTUであり、試料間のOTU数に大きな差はみられなかった。各OTUの代表配列から帰属した菌種を門分類でまとめた結果、全ての流入水試料において、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Actinobacteria*の4門で全体の菌叢の90%以上が構成されていることが確認できた(図1)。Linら(2013)⁵⁾およびMacLellanら(2010)⁶⁾はそれぞれ香港、ミルウォーキーの都市下水処理施設における流入下水を採取、微生物群集解析を行っている。前者の結果によると、香港の流入水はその63%が*Proteobacteria*で構成されており、次いで*Firmicutes*、*Actinobacteria*

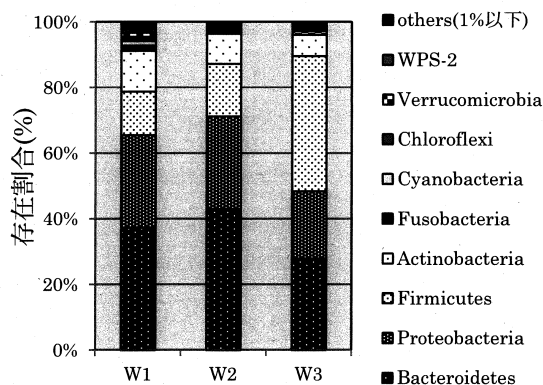


図1 門レベルの分類に基づく晴天時流入水の微生物群集構造

で全体の90%程度が構成されていると報告されていた。しかし今回の解析で多くの割合を占めていた *Bacteroidetes*はほとんど確認されていなかった。一方後者の場合では、59%が*Proteobacteria*、次いで *Bacteroidetes*と *Firmicutes*で37.5%を占めておりこの3門で95%以上構成されていたが、*Actinobacteria*は全体の1.2%に留まり、今回の結果(平均存在割合±標準偏差: $9.4 \pm 3.0\%$)との相違が確認できる。

(2) 汚水マーカー微生物の探索

3処理場から採取した晴天時流入水より作成した合計1043種類のOTUのうち155種類のOTUが全ての試料に共通して存在していた。さらにその155種類から全ての試料において0.5%以上の割合で存在していたOTUは14種類であった(図2)。これらの内 *Flavobacteriaceae*が最も存在割合が大きく(平均存在割合±標準偏差: $16 \pm 11\%$)、次いで *Methylophilaceae*($3.7 \pm 0.49\%$)、*Bifidobacterium*($3.6 \pm 1.1\%$)となった。これら14OTUでW1、W2、W3それぞれにおいて35%、52%、36%を占めており、各処理場で500OTU前後確認されていた細菌種のうちわずか14OTUの微生物によって全体の菌叢の3分の1から半分が構成されていることが分かる。MacLellanら(2010)⁶⁾はミルウォーキーの処理場流入水について同様にOTUレベルで存在割合を解析している。結果として、最も存在割合が大きかった細菌種が *Moraxellaceae*(15.46%)となり、次いで *Aeromonadaceae*(11.34%)、*Carnobacteriaceae*(6.97%)、*Lachnospiraceae*(5.49%)と報告されている。今回の解析で最も多く検出された *Flavobacteriaceae*については報告されておらず、OTUレベルでみた場合においても、流入水の菌叢は

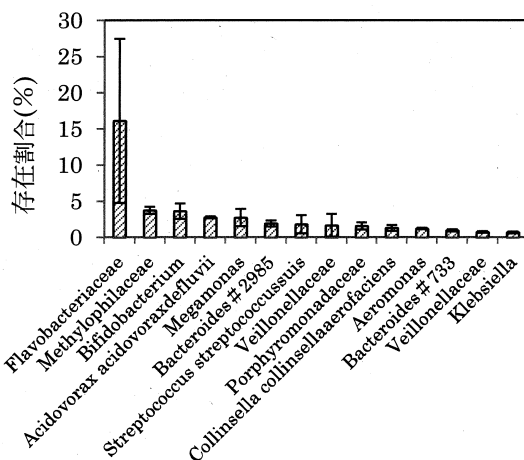


図2 3か所の下水処理場晴天時流入水に共通して存在する微生物種(平均存在割合0.5%以上)

国により大きく異なっている可能性が示された。これら 14 OTU の微生物は、関東圏の晴天時処理場流入水の特徴づける微生物の候補と考えることができる。

(4) 流入水および処理水における *Bacteroides* と大腸菌

それぞれの流入水におけるヒト特異 *Bacteroides* 遺伝子マーカーの DNA 濃度は平均して $6.6 \pm 5.2 \times 10^5$ copies/ml だった(図 3)。一方で全細菌、Total *Bacteroidales*、大腸菌遺伝子マーカーについてはそれぞれ、 $4.1 \pm 2.4 \times 10^7$ 、 $2.7 \pm 1.7 \times 10^6$ 、 $1.1 \pm 0.64 \times 10^4$ copies/ml で流入していた(図 3)。それぞれの細菌指標と比較すると、全 *Bacteroidales* 目細菌の内およそ 25% がヒトの糞便に特異な *Bacteroides* で占めており、また従来から糞便汚染の指標として用いられている大腸菌と比較して、2 オーダー以上多く存在していることが分かる。また処理を経てヒト特異 *Bacteroides* は、 $1.8 \pm 0.90 \times 10^3$ copies/ml の濃度で放流されており、流入水と同様に大腸菌(4.4×10 copies/ml)と比較すると 2 オーダーほど多く分布していた。

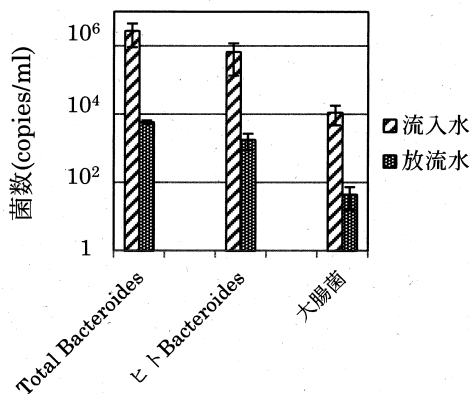


図 3 処理前後の *Bacteroides* および大腸菌の菌数

(5) 下水処理工程における *Bacteroides* と大腸菌の挙動

流入水中の細菌数に対する各工程の細菌数を対数で示し、処理工程における各細菌指標の挙動を示した(図 4)。図 3 同様、最終的な除去率は各指標ともほぼ同じとなったが、大腸菌が生物反応槽から二次処理水として移行する際に大きく減少しているのに対し、*Bacteroides* 指標は生物反応槽の段階でその大部分が除去されていることがわかる。大腸菌は、生物反応槽では 0.6 log 程度減少し、残ったものの大部分は汚泥に吸着されていたため、沈殿槽で除去されたと考えられる。一方、*Bacteroides* は、生物反応槽において Total *Bacteroidales* で 2.5 log、ヒト特異 *Bacteroides* で 3.3 log も減少しており、生物反応槽において遺伝子レベルで分解され除去された可能性が考えられる。Okabe ら(2007)は環境水中における *Bacteroides* の消長の要因として、温度と生物

による捕食、分解の影響について言及している。今回確認された *Bacteroides* の生物反応槽における除去挙動についても活性汚泥に常在している生物における捕食や、分解作用により除去されたと考えられるが、大腸菌に対してはこの作用は大きく影響を及ぼさない事が示唆された。

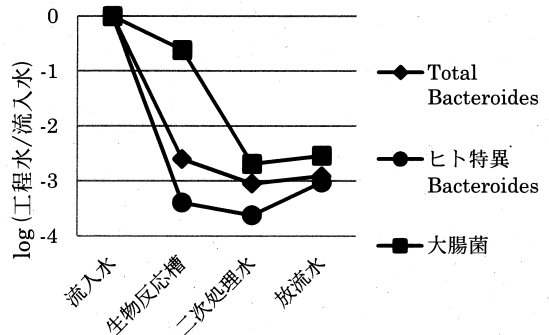


図 4 下水処理工程における *Bacteroides* および大腸菌の菌数の挙動

5. まとめ

本研究では、晴天時処理場流入水を対象に微生物群集解析を実施し、都市污水に特徴的な細菌群集構造および污水を特徴づける微生物について調査を行った。さらに污水マーカー微生物として有力なヒト特異 *Bacteroides* の分布と挙動について解析を行った。門レベルにおける解析の結果、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Actinobacteria* の 4 門で流入水全体の 90% 以上が構成されていた。さらに OTU 毎では、*Flavobacteriaceae*、*Methylophilaceae*、*Bifidobacterium* などの微生物が異なる処理場で共通して存在しており、国内、とくに関東圏の都市污水を特徴づけている可能性が示唆された。また流入水におけるヒト特異 *Bacteroides* は 10^5 オーダーで流入し、それは全 *Bacteroidales* 目細菌の 25% を占め、大腸菌よりも 2 オーダー大きい値であった。さらに下水処理工程においては、大腸菌が最終沈殿池で除去されているのに対し、*Bacteroides* は生物反応槽で除去されており、異なる挙動を示すことがわかった。

6. 参考文献

- (1) Gasperi J. et al, Water Research 44(2010) 5875-5886
- (2) Richard H. et al, Systematic and Applied Microbiology 33 (2010) 348-357
- (3) Camilla B. et al, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 19(2007) 6321-6325
- (4) Mangala A. et al, Microbiology 148 (2002) 257-266
- (5) Lin Y. et al, Applied Microbiology and Biotechnology 97(2013) 2681-2690
- (6) McLellan SL. et al, Environmental Microbiology 12(2) (2010), 378-392
- (7) Okabe S. et al, Applied Microbiology and Biotechnology 76(2007) 935-944