

B-15 実機嫌気性消化槽内における微生物多様性と 遺伝子多様性の経時変化

○島田 祐輔^{1*}・久保田 健吾²・原田 秀樹²・李 玉友²

¹東北大学大学院環境科学研究科 (〒985-8570 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-20)

²東北大学大学院工学研究科 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

* E-mail: shimada@ep11.civil.tohoku.ac.jp

1. はじめに

下水道は国内年間消費電力量のうち100 kW発電所の1年分の発電量にあたる約0.7%という大きな割合を占めるため、循環型システムへの転換が求められている。そのような中で下水汚泥は大きなエネルギーポテンシャルを持つとして期待が寄せられ、その処理を行う嫌気性消化槽は普及の傾向を見せている。そこで、槽のさらなる高効率化と簡易な処理方法の模索および生物学的観点からのプロセスの安定性の解明にあたり、嫌気性消化槽内で行われる有機物の分解経路を分子生物学的な解析により明らかにする事が求められている。本研究では、実下水汚泥処理嫌気性消化リアクターをスタートアップから約1年間モニタリングし、処理特性と槽内汚泥の微生物群集構造の経時変化を追った。

2. 実験方法

(1) 嫌気性消化槽

対象とした実機嫌気性消化槽は中温管理で運転されていたが、災害の影響により、およそ2年間の稼働停止状態にあった。この稼働停止期間中、槽内に存在していた汚泥は放置されていた。そこで、その放置汚泥を種汚泥とし、生汚泥および余剰汚泥を徐々に投入して運転を再開した。消化槽の連続処理性能に関するデータ(温度、発生ガス量、ガス組成、アルカリ度及びHRT)は処理場から提供していただいたものを用いた。

微生物群集構造解析のためのサンプリングは、立ち上げから約1年の間に7回行った。サンプリング時には、汚泥の温度、pH、ORPを測定した。さらに採取した汚泥のSS及びVSSと濾液のTOC、T-N、T-P、VFAを測定した。汚泥はPBSによる洗浄後、ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン)を用いてDNAを抽出した。

(2) 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析は16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスをRoche GS Juniorを用いて行った。プライマーはRDP (Ribosomal Database Project) のProbe Matchとsilva release115データベースを用いてBacteriaとArchaeaのカバレッジを確認し、本研究に適すると判断したBacteriaとArchaeaにユニバーサルな341F¹⁾と806Rm-mixのペアを用いた。806Rm-mixに関しては既報²⁾を元に修正を加えている。PCR反応試薬にはAmpliTaq Gold LD (Applied Biosystems)を用いた。PCR反応は、初期変性を95℃で10分行った後、変性(95℃ 30秒)、アニーリング(50℃ 30秒)、伸張反応(72℃ 45秒)を事前にサンプルごとに決定したサイクル数(25~30サイクル)を行い、最後に伸長反応を72℃で7分間行った。なお、ネガティブコントロールサンプルにおいては、35サイクルのPCRを行い、増幅が見られないことを確認した。PCR産物はMicrospin Columns S-400 (GE Healthcare)及びMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製し、Quant-iTTM PicoGreen ds DNA reagentにてその濃度を測定した。エマルジョンPCR以降の工程は、GS Juniorチタニウムシリーズのプロトコルに従った。シーケンスデータの解析には、QIIME³⁾(データベースはgreengenes 13.8)を用いた。

また、プライマーの違いによる群集構造解析結果の比較評価を行うために、4つのサンプルを用いて519Fm-mixと806Rm-mixプライマーペアによるアンプリコンシーケンスを行った。なお、519Fm-mixも既報²⁾を元に修正を加えている。加えて、BacteriaとArchaeaの存在量を既報⁴⁾のプライマーを用いて定量PCRにより求めた。

3. 実験結果と考察

(1) 消化槽の処理パフォーマンス

廃水処理プロセスの立ち上げは、まずHRT 100日で運転を開始し、段階的に汚泥の投入量を増加させることで

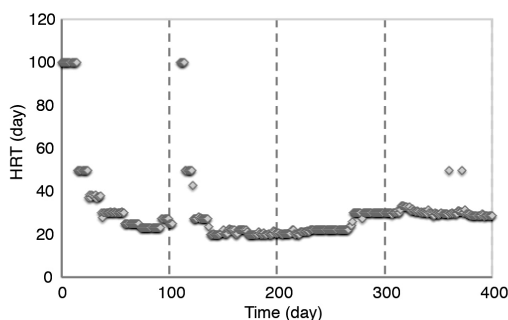


図1 HRTの経時変化

HRTを短縮し、負荷を上げる事で行った(図1)。汚泥の投入量に比例して消化ガスの発生量は増加を続けたが、立ち上げ100日を超えたところで機器のトラブルにより運転が一時的に中断された。その後は順調に処理が進み、立ち上げから約140日経過時にHRT 20日に設定し連続運転されたが、200日経過付近から消化ガスの発生量の減少などの槽内反応の不安定化(day182ではVFAの蓄積)が見られたため、汚泥の投入量を減少させて調整を行った。約270日経過したところでHRTを30日にしたところ安定したため、その状態で維持されている。槽内の温度は38℃程度で維持されていた。発生ガスはほぼメタンと二酸化炭素で構成され、それぞれおよそ6:4の比で存在している。

SS, VSSについては、day16ではそれぞれ7.6, 5.4 g/Lであったが、処理の経過とともにそれぞれ上昇し、day224ではそれぞれ16.3, 11.9 g/Lとなり、その後大きな変化は見られなかった。

(2) プライマーの評価

嫌気性消化においては、*Bacteria*に加え*Archaea*の微生物群集構造も重要である。*Bacteria*と*Archaea*それぞれについてアンプリコンシーケンスを行っている論文も見られるが、本研究においては*Bacteria*および*Archaea*を標的とするユニバーサルプライマーを用いることで、両ドメインの群集構造を同時に解析することとした。リバープライマーは806Rm-mixとし、フォワードプライマーを341Fあるいは519Fm-mixとした。806Rm-mixおよび519Fm-mixはRDPのProbe Matchによる解析結果より、より高いカバレッジとなるように変更した。両者の群集構造解析結果を比べると、*Bacteria*については存在率に違いがあるものの、主要な門は共通していた。主要な門の経時変化を比較すると*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*については日数の経過とともに存在率の上昇が見られ、逆に*Firmicutes*に関しては日数の経過とともに存在率の減少が見られた。しかし、519Fm-mixを用いた結果ではday16は*Chloroflexi*が

表1 シーケンスデータと生物多様性の評価

Time(d)	HRT(d)	Reads	OTUs	Chao1	Coverage	Shannon
16	50.0	5,734	413	737	0.97	5.76
60	25.0	5,797	416	640	0.97	5.77
116	50.0	11,666	540	819	0.98	6.16
182	20.0	10,860	683	1167	0.97	7.19
224	21.1	21,311	845	1125	0.99	7.12
273	30.0	12,153	724	1010	0.98	7.18
352	32.3	11,925	726	930	0.98	7.30

約40%の存在率を占めたのに対し、341Fを用いた結果では、約20%の存在率であった。また、519Fm-mixでは*Armatimonadetes*や*Planctomycetes*が、341Fでは*Candidatus TM7*がそれぞれ特異に検出された。一方、*Archaea*に関しては519Fm-mixではその存在率が解析した4つ全てのサンプルで0.5%以下となり、341Fを用いたときよりも過小に評価された。定量PCRによる結果では*Bacteria*と*Archaea*のコピー数の和を100%とした場合、*Archaea*の存在率は2.2-6.8%で推移しており、定量PCRの結果と群集構造の結果を比べると341Fの方が519Fm-mixよりも*Bacteria*と*Archaea*の実際の量的関係に近い微生物群集構造になっていると考えられた。より多くの*Archaea*のシーケンスが得られると言う点も考慮し、341Fをフォワードプライマーとして用いて解析を行うこととした。

両者で特有のシーケンスデータを取得した事実を考えるとRDPのProbe Matchとsilva release115データベースを用いて作成したプライマーだけでは補いきれないバイアスが生じていると考えられる。

(3) 微生物群集構造解析

今回の実験で得られたシーケンス情報について表1にまとめた。7つのサンプルに関して、約5,700-21,000 リードが得られ、それらは413-845のOTUsに分類された。サンプル中に存在するであろう全OTUを推測するChao1指標によるとday182以降のサンプルでは900-1,100となり、さらに生物多様性を示すShannon指標もday16では5.76であったものがday352では7.30にまで増加していることから、日数の経過とともにOTUの増加を伴って、生物多様性が拡大していることが伺えた。

次に今回のシーケンシングによって得られた微生物群集構造を門(*Proteobacteria*については綱)レベルでまとめたものを図2に示す。各サンプルのいずれかで1.0%以上の存在率を有したものの以外に関してはOthersとしてまとめた。まず*Bacteria*については、*Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*の4つの門が主要な門となった。*Proteobacteria*内の存在率に関してはこれまで多くの報告で*Betaproteobacteria*が優先するとされていたが、今回の結果では*Alphaproteobacteria*が最も優先し、次

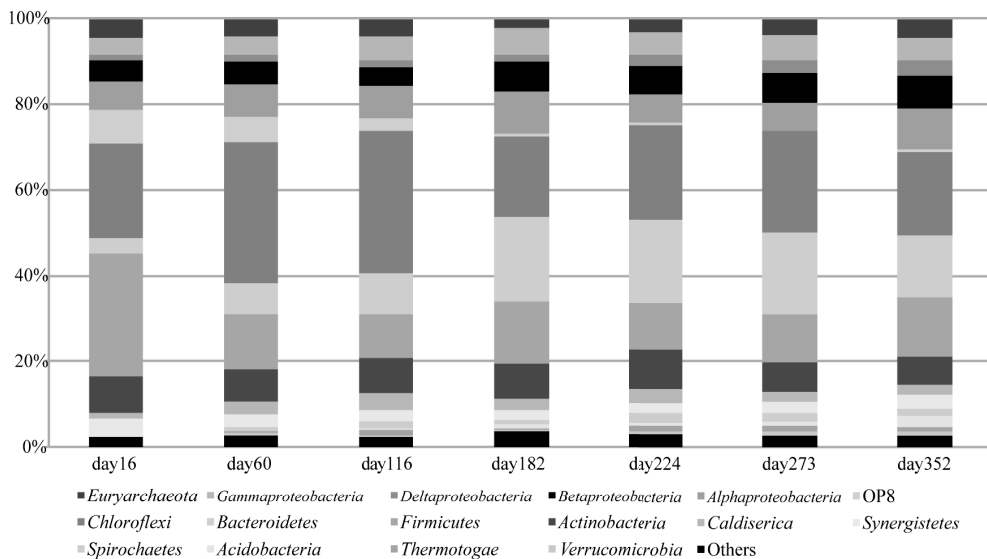


図2 門（綱）レベルでの微生物群集構造の経時変化

いで *Betaproteobacteria* が優先していた。519Fm-mixを用いた結果では *Betaproteobacteria* が優先していたことからプライマーの違いによるバイアスの可能性も考えられる。これらと *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* の4つの綱はすべて日数の経過とともに存在率を上昇させていた。

今回最も優先する門であった *Chloroflexi* に関しては day16 で約22%の存在率であったが、一度 day60 と day116 で存在率を30%以上にまで増加させた後、day182 では20%以下の存在率となり、さらにその後は20%前後の存在率で推移していた。

今回の結果では、*Chloroflexi* 門に含まれる *Anaerolineaceae* 科の T78 系統群に属するシーケンスが最も多く得られた。day16 には20%の存在率であったが、経時的にその割合は減少し、day352 では10.8%となった。この系統群は永久凍土下にあるメタンの噴出口で存在していた *Bacteria* という報告⁵⁾がある。また、*Candidatus OP8* についても同様の挙動 (day16 で7.9%が day352 で0.8%に変化) を示した。これらのグループは消化槽に放置された消化の進んだ汚泥中 (即ち汚泥負荷が低い) に多く存在し、HRTの短縮 (即ち汚泥負荷の上昇) とともに存在率を減少させていることから、汚泥負荷が低く、汚泥滞留時間の長い環境で優占する系統群である可能性が示唆された。

一方、*Archaea* は存在率が2.44.8%で推移し、その中では *Euryarchaeota* が最も優占し、それ以外の門はほぼ検出されなかった。綱としては *Methanomicrobia* と *Methanobacteria* のシーケンスが得られたが95%以上は *Methanomicrobia* という結果で、さらに *Methanomicrobia* の

中の *Methanosaetaceae* 科に類する *Methanosaeta* 属は *Archaea* 全体の約70%を占めていた。*Methanosaeta* は酢酸酸化性古細菌として知られ、day182 でVFAが蓄積した際に *Methanosaeta* の存在率が減少していたことから何らかの関係性があるとみている。この他に属レベルで分離培養されているメタン生成古細菌に分類できたのものには *Methanospirillum*, *Methanoculleus*, *Methanomethylivorans*, *Methanobrevibacter* などに含まれたが、それらは各サンプルの *Archaea* 全体の1.0-2.0%程度に留まった。

参考文献

- 1) Caporaso *et al.*, 2012, The ISME Journal, 6, 1621–1624
- 2) Sundberg *et al.*, 2013, FEMS Microbiol Ecol, 85, 612–62
- 3) Caporaso *et al.*, 2010, Nature Methods, 7, 335–336
- 4) Miyashita *et al.*, 2009, FEMS Microbiol Lett, 297, 31–37
- 5) Lamarche-Gagnon *et al.*, 2015, Extremophiles, 19, 1–15