

廃水処理システムへの適用を目指した 環境中からの微生物分離と系統分類に関する研究

呉工業高等専門学校 学生会員 ○糸入 祐也
呉工業高等専門学校 正会員 木村 善一郎

1. はじめに

現在、微生物学的廃水処理は最も普及したバイオテクノロジーであり、その一手法である活性汚泥法は、好気性細菌によって廃水中の有機物分解を行う手法である。活性汚泥は複数の微生物種によって構成される複合微生物系であり、構成微生物の系統的多様性により、様々な種類の有機物を含有する廃水等を破綻なく無機化することが可能である。我が国においてはあらゆる自治体において本法をベースとする廃水処理が適用されている。

一方で活性汚泥法は「汚れた水をきれいにする」すなわち「マイナスをゼロにする」ことを目的としており、「プラスを生み出す」ことを目指すものではない。しかしながら廃水の中でもメッキなどの金属加工工場から排出されるものには多くの貴金属が含まれていることが知られており、廃水質量当たりに含まれている質量では鉱石と変わらないことが指摘されている。すなわち廃水は資源としてとらえることも出来る。我が国は資源に乏しく、資源の再回収の重要性が指摘されており、廃水中からの低コストかつ環境負荷の少ないレアメタル回収技術は重要である。

我々の研究グループはこの問題に対し、バイオソープションと呼ばれる手法に着目した。バイオソープションとは微生物に有用物質を吸着させ、物質回収を目指す手法である。本研究では環境中から様々な細菌を分離し、その分離細菌に対してパラジウム吸着性を試験することで、廃水中貴金属の低コストな回収に有用な細菌の分離に取り組んだ。本研究全体のゴールは分離細菌株をバイオソープションに好適な株として育種した上で活性汚泥内に添加し（バイオオーグメンテーション）、

活性汚泥にバイオソープション能を付与すること、そして、バイオソープション付与活性汚泥を用いて都市排水からレアメタルを回収することである。

本研究では環境中からの貧栄養細菌かつ増殖スピードの速い細菌の分離を行った。この貧栄養細菌は、栄養要求性が低く、実応用の際のランニングコストを低減させることが期待できる。また増殖速度の多寡は廃液中の菌濃度に直結し、回収効率を向上させるために重要な特性となるため増殖速度の高い株が望ましい。

吸着性能の試験対象とするレアメタルはパラジウムを選定した。本元素は触媒能に優れ、自動車の排気ガス浄化触媒として用いられるなど、産業上重要な元素である。しかしながら資源埋蔵量は埋蔵量上位2か国の南アフリカとロシアで80%以上を占めており、安定供給の上で課題がある。まためっき処理においてパラジウムを含む廃水が発生するが、その回収には大量の化学薬品が用いられておりコストと環境負荷を生じさせている。そこで生物濃縮を用いた低コストな回収手法の普及が期待されている。

本研究の遂行過程で分離した有用株については系統解析を行った。種の同定・全ゲノム解析を行うことで、細菌種の遺伝的特性を明らかにし、既存種との比較を行った。さらに本研究において獲得した細菌は新種である可能性が示唆されたため、新種提唱に必要な実験を合わせて行った。

2. 環境中からの貧栄養微生物の分離

本研究では分離源として高専内の池の水を用いた。水系微生物には貧栄養細菌が多く生息していると推測され、分離源として有望と考えた。また貧栄養分離条件として1/5 R2A培地を用いた。

キーワード バイオオーグメンテーション, バイオソープション, パラジウム, 系統分類

連絡先 〒737-8506 呉市阿賀南2-2-11 呉工業高等専門学校

TEL 0823-73-8486

この培地は微量元素成分が一般的な LB 培地など
とくらべて多量に含まれていることから、多様な細
菌の獲得が期待されるため採用した。

獲得サンプルは室温にて 24 時間培養したのちに発
現したコロニーを回収した。獲得したコロニーは連
携先である産業技術総合研究所においてパラジウム
吸着性を試験した。パラジウム吸着性能は菌体をパ
ラジウム飽和水溶液に混和し 1 時間培養した後の菌
体を透過型電子顕微鏡で撮影することで評価した。
その中の 1 株が吸着性能を示した。その TEM 像を図
1 に示す。以後この株は **KR-1** と呼称する。

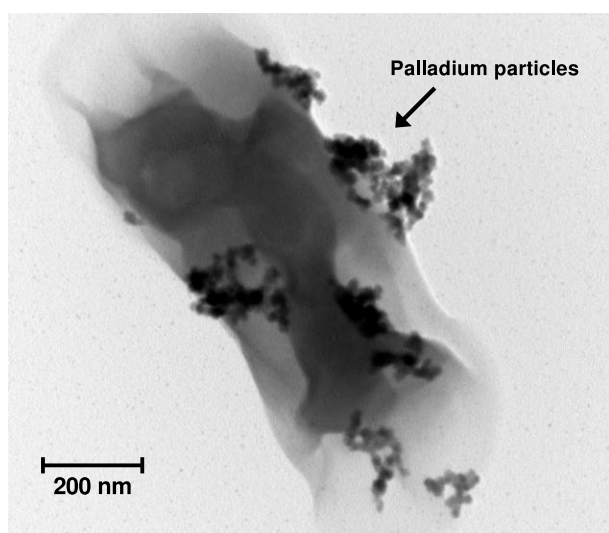


図 1 パラジウムを吸着している細菌の TEM 像

3. 系統解析

3.1 実験概要

系統解析を行うために全ゲノムシーケンスを行っ
た。この全ゲノムシーケンスはショートリードシー
ケンサーである Illumina 社製 MiSeq とロングリード
シーケンサーである Oxford Nanopore Technologies 社
製 MinION を用いた。この 2 種のシーケンサーから
出力されたデータをもとにハイブリットアセンブル
することで対象株のゲノム配列を決定した。

ハイブリッドアセンブルとは近年発展が目覚ましい
ロングリードシーケンサーを用いて、ゲノムアセン
ブルの品質を向上させるために考案された手法の一
つである。

一般に新規性の高い細菌のゲノムアセンブルでは
De novo な手法が用いられている。そのなかでも de
Bruijn Graph を作成して、リードを結合していく手法
が一般的に取られている。

既存の手法ではリード同士でオーバーラップするも
のを結合するアルゴリズムをとっていたが、このア
ルゴリズムはハミルトンパス問題となり、NP 完全で
あることが知られている。

そこでリードを分割し、de Bruijn Graph の解を探す
オイラーパス問題に変換することで計算量を減らす
手法が近年主流となっている。

しかしながら、ショートリードデータのみでは de
Bruijn Graph を完全に解くことができない。これはゲ
ノム内の反復領域や、マルチコピー遺伝子が存在し
ているためである。そこで反復領域長よりも長い領
域を読むことができるロングリードシーケンサーを
用いることで、de Bruijn Graph に解を与え、Contig
数の削減が可能となる。

さらに全ゲノム解析により決定した塩基配列をも
とに系統解析を行い既存種との系統学的比較を行っ
た。

3.2 ゲノムアセンブル

MiSeq と MinION を用いてゲノムシーケンスを行
った。表 1 にシーケンス結果の概要を示す。

表 1 シーケンス結果

	MiSeq forward	MiSeq reverse	MinION
総リード 数	2900662	2900662	46363
総塩基数 (bp)	437325920	437356969	264602962
平均 Q score	36.4	36.2	8.6
GC 含量 (%)	69.85	69.86	69.99

以上のデータをもとにハイブリットアセンブルを
行った。ハイブリッドアセンブルには Unicycler
v0.4.7 を用いた。表 2 にアセンブル結果を示す。なお
ここで示したカバレッジは Contig1 を 1 倍として相対
値を記載している。

表 2 アセンブル結果

Contig No.	塩基数 (bp)	GC 含量 (%)	カバレッジ (倍)
1	3333173	70.41	1.00
2	488446	71.47	0.83
3	301012	66.77	0.88
4	168714	69.91	0.54
5	121969	65.35	0.77
6	90449	62.36	0.85
7	53009	69.82	1.14

3.3 MLSA 系統解析

MultiLocus Sequence Analysis (MLSA)法を用いて系統解析を実施した。この手法はハウスキーピング遺伝子を複数用いた配列を用いることでブートストラップ値の改善・16SrRNA を用いた解析が困難な種の系統的分離が可能となる。

本研究では *atpD*, *dnaA*, *gyrA*, *rpoB* の4つの遺伝子を用いた。この4つを結合した配列をもとに MAFFT ver. 7.407 を用いてアライメントを行い、FastTree ver. 2.1.10 を用いて最尤推定に基づく系統樹を作成した。系統樹のルートを決めるために、*Thermus thermophilus* HB8^T をアウトグループとして用いた。作成した系統樹を図3に示す。図右下の縮尺は塩基置換率を示している。分岐点に付与した数字はブートストラップ値である。この結果より、既存種との遺伝的距離より *KR-1* が新規性の高い株であることが示唆された。

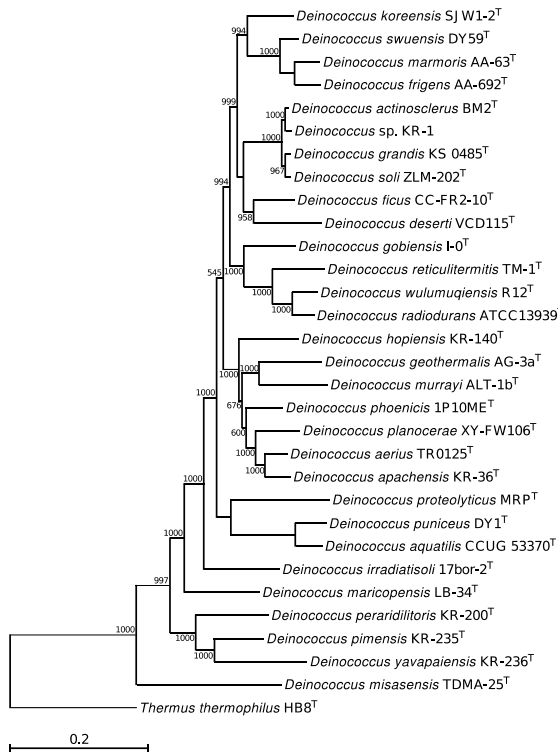


図3 MLSA 系統樹

3.4 ANI 系統解析

3.3 の結果より新種である可能性が示されたため、Average Nucleotide Identity(ANI)解析を実施した。この試験は全ゲノムの相同性を判定する試験である。これまで一般的に用いられてきた DNA-DNA ハイブリダイゼーションを置換する技術で、既往の研究より

相同性が 95-96%程度以下であれば新種であると言われている。

本研究では OrthoANI を用いて ANI を算定した。このアルゴリズムは既存の ANI 解析の問題点であった解析の非対称性を解決し、BLAST アルゴリズムを応用することで計算量の低減を図ったものである。この数値は厳密な ANI 値より 1%程度大きくなることが報告されている。3.3 で示された類縁株との ANI 解析結果を表3に示す。

表3 ANI 解析結果

	ANI 値(%)
<i>D. actinosclerus</i> BM2 ^T	95.69
<i>D. grandis</i> KS 0485 ^T	90.48
<i>D. soli</i> N5 ^T	90.78

4. まとめ

以上の結果よりこれらの結果が得られた

- ・ 環境中からパラジウム吸着能力のある細菌種の分離に成功した。
- ・ 分離細菌は貧栄養培地において高速で増殖可能な細菌である。
- ・ 分離細菌は新種細菌である

これらより、この菌株は既存の金属回収手法を向上する一助となる可能性を持っていると言える。

しかしながらこの菌株を用いて実際の廃水処理系に適応するには課題がある。実際の金属回収では、吸着後の汚泥からの金属分離が問題となるほか、廃水中に含まれる生育阻害物質（エンドトキシン等）も微生物の増殖の妨げとなる。よって今後この菌株をもちいて廃水処理を行うためにはこれらの課題の解決が必要となる。またさらに重要となるのは吸着する際に関係している遺伝子の解明である。これが解明できれば、遺伝子改変による本細菌の効率改善が見込まれるだけでなく、この遺伝子了他細菌に組み込むことで有害物質耐性の高い細菌に貴金属吸着能力を付与できると考えられる。

謝辞

TEM の撮影について産業技術総合研究所中国センター バイオ変換グループ 秋田紘長主任研究員・セルロース材料グループ 熊谷明夫研究員にご協力いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。