

〈特集〉

嫌気性処理における微生物群集構造解析

久保田 健 吾¹⁾

¹⁾ 東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻
(〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06 E-mail: kengo.kubota.a7@tohoku.ac.jp)

概要

嫌気性処理技術は、創エネルギー型廃水・廃棄物処理法として、低炭素社会構築の観点からも着目されている。嫌気性処理において、高分子有機物は様々な微生物が一連の分解反応に関わることで、メタンと二酸化炭素に分解される。この複雑な微生物群集構造の解明には、培養によらず遺伝子情報に基づいて行う解析が広く用いられている。本稿では、下水汚泥を処理する嫌気性処理プロセスにおける原核生物および真核生物の群集構造解析について、幾つかの例を取り上げながら、嫌気性微生物群集構造解析の現状について紹介する。

キーワード：嫌気性処理, 微生物群集構造, 下水汚泥
原稿受付 2017.12.27

EICA: 22(4) 36-40

1. 嫌気性処理

廃水・廃棄物の生物学的な処理方法は、大きく好気性処理と嫌気性処理に分けられる。好気性処理は、清澄な処理水が得られる一方、エアレーションや発生活性汚泥の処理にエネルギーや費用が多くかかる。一方の嫌気性処理は、好気性処理に比べ処理水の水質は劣るものの、高負荷を許容し、メタンとしてエネルギーを回収できる、余剰汚泥発生量が少ないなどのメリットがあり、特に高濃度有機性廃水や下水汚泥、畜産し尿などの処理に広く用いられている¹⁾。中でも下水処理過程で発生する下水汚泥は、発生量が膨大であり、また産業廃棄物として処理する必要があるため、下水処理にかかるコストを圧迫している（日本では、年間約215万トン発生²⁾）。下水汚泥は、脱水したのち焼却され、建築資材として再利用されるなどしているが、近年の低炭素社会構築への流れ、そしてFIT法によるバイオガス発電の高価買い取り制度などの施行により、下水汚泥を嫌気性消化しそこからエネルギーを回収する、という流れが着目されている。

嫌気性処理は、幾つかの異なる微生物の働きにより有機物が最終的にメタンや二酸化炭素になる³⁾。一般に多糖類やタンパク質、脂質などの高分子有機物の加水分解、単糖やアミノ酸、脂肪酸などの低分子有機物からプロピオン酸や酪酸などの揮発性脂肪酸の生成（酸生成）、低分子有機物や揮発性脂肪酸からの酢酸生成、そして酢酸などのC1化合物や水素からのメタン生成によって反応が進行する。それぞれの反応には異なる微生物群が関与していることが知られている。特に酢酸生成の過程においては、単糖や脂肪酸などを分

解する微生物と、それに伴って発生する水素を速やかに利用するメタン生成古細菌との共生が必要であるなど、嫌気性処理プロセスにおいては様々な微生物が複雑に絡み合い、反応が進行している。

2. 嫌気性処理における微生物群集構造

嫌気性廃水・廃棄物処理プロセスにおける微生物群集構造解析は多くの研究者によって行われている。本稿では、下水汚泥を処理する嫌気性消化プロセス内の微生物群集構造解析を例として取り上げ、紹介する。

2.1 原核生物群集構造

下水汚泥を処理する嫌気性消化プロセスは、世界各国の下水処理場で採用されており、その微生物群集構造は多くの研究者によって解析されてきている。Rivièreらが2009年に発表した論文では、7つの異なる嫌気性消化槽内の微生物群集構造をおよそ1万クローンの塩基配列を決定することで明らかにしている⁴⁾。その結果、*Bacteria*については、調査したほとんどの消化槽に共通して存在している Operational Taxonomic Unit (OTU) (コアグループ)、幾つかの消化槽に共通している OTU、そして各消化槽に特異的なグループに分けられるとしている。コアグループは、*Chloroflexi* 門、*Betaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門、*Synergistetes* 門に属する6つの OTU で構成されており、特に *Chloroflexi* 門の *Anaerolineaceae* 科 T78 系統群に属する OTU は、ほとんどの消化槽で10%以上存在していたと報告している。

Rivièreらの報告以降、嫌気性消化汚泥の微生物群

集構造解析に用いる塩基配列情報の獲得方法は、クローンライブラリを構築して塩基配列を決定する方法から、パイロシーケンサーや MiSeq などの次世代シーケンサーを用いて一度に多くのサンプルから大量の塩基配列情報を得る方法に変わっていった⁵⁾。次世代シーケンサーを用いると1ランに投じるコストは高くなるが、大量のサンプルを同時に解析することができるため、サンプルあたりのコストは安くなる。例えば MiSeq を用いて 96 サンプル同時に解析をすれば、嫌気性消化汚泥の微生物群集構造を見るのに十分なシーケンスリード数が得られる。このときのサンプルあたりのコストは DNA 抽出や PCR、精製などを含めても 10,000 円程度である。

このような背景の下、我々の研究グループも国内の下水処理場に設置されている下水汚泥を処理する嫌気性消化汚泥の微生物群集構造の解析を行った。5 箇所の下水処理場に設置されている嫌気性消化槽から採取した合計 12 サンプルの微生物群集構造解析を行った。サンプリングは同じ反応槽から異なる時期に複数回、行った。その結果、調査した消化槽においては、基本的な群集構造は他の文献と変わらず^{4,5)}、*Bacteroidetes* 門、*Betaproteobacteria* 綱、*Deltaproteobacteria* 綱、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、WWE1、*Spirochaetes* 門、*Synergistetes* 門などが多く見られた。群集構造の違いを主座標分析 (unifrac weighted) により可視化すると、解析したサンプルは各処理場ごとでグループを形成したが、そのグループから外れたところにプロットされる場合もあった (Fig. 1)。運転条件や季節変動など様々な要因が考えられるが、どのような因子が群集構造の形成に影響を与えるのかを明ら

かにすることが今後の課題である。

2.2 反応槽スタートアップ時における群集構造の変遷

嫌気性消化プロセスの立ち上げには幾つかの方法がある。近隣の消化槽から汚泥を搬送し、種汚泥として用いる方法や下水汚泥そのものに含まれる微生物群を利用する方法がある。また何らかの理由により消化槽が停止していた場合、その中に残存していた汚泥からプロセスを立ち上げることもある。本稿では、自然災害により 2 年以上停止した反応槽内に室温で保管されていた汚泥を用いた嫌気性消化プロセスのスタートアップにおける微生物群集構造の変遷をモニタリングした結果を紹介する⁶⁾。

スタートアップは、水理的滞留時間 (HRT) 100 日から開始し、段階的に短縮していき、HRT 20-22 日の間で運転を行った。その後、徐々に汚泥脱水性能の低下が見られ、また消化槽内においても発泡が見られたため、HRT を 27-30 日として連続運転を行った。この期間、経時的に汚泥をサンプリングし、その微生物群集構造解析を行った。塩基配列情報は、パイロシーケンシングにより行い、キメラチェック後のシーケンスリード数として各サンプルから 4,500-12,000 程度得られた。OTU、Chao1 とともにリアクターが立ち上がっていくと共に増加し、それに伴って Shannon 指数が増加した。これは、リアクターのスタートアップに伴い、より多様な微生物を含む構造に変化していったことを示している。

門レベル (*Proteobacteria* 門においては綱レベル) での経時変化を見ると、運転開始直後のサンプルでは、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、*Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Actinobacteria* 門、*Synergistetes* 門など定常期に構成される主要な門に加えて、OP8 が 8% 程度存在していた。一方で定常期に主要な門・綱であると報告されている *Deltaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門、*Spirochaetes* 門などの存在率は低かった。これは長期間の保管条件下において、消化汚泥内に含まれていた有機源の多くが消費され、栄養源が枯渇した状態に近い環境、すなわち貧栄養環境が構築され、その環境に適した微生物群が優占したためだと考えられる。リアクターの負荷が徐々に増大し、HRT が 20-22 日あるいは 27-30 日のあたりで安定して運転される頃には *Deltaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門、*Spirochaetes* 門、*Acidobacteria* 門などはそのポピュレーションを増加させた一方、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、OP8 などはスタートアップ時期に比べてその相対存在率は減少し、様々な論文で報告されている下水汚泥を処理する群集構造により近い形となった。*Archaea* の大部分は *Euryarchota* 門であり、

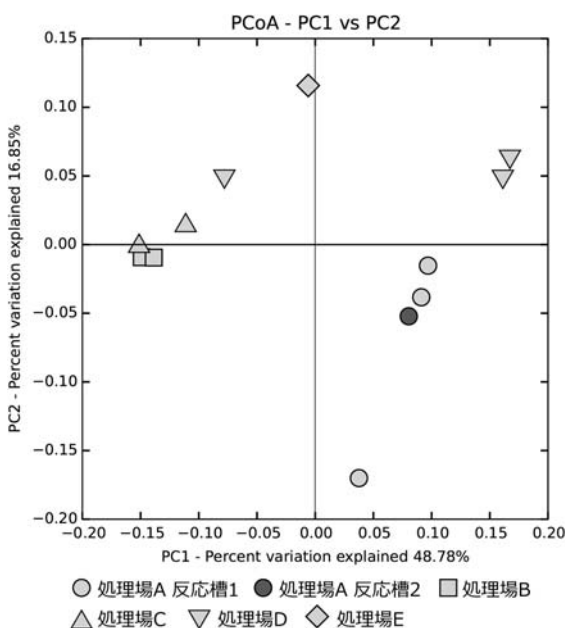


Fig. 1 Principal coordinate analysis of the 12 digester sludge samples taken from 5 different sewage works in Japan.

スタートアップ時から、負荷に関わらず3-5%程度の割合で推移していた。

このような群集構造の推移を主座表分析で可視化すると、スタートアップから負荷の増大と共に群集構造が遷移し、HRTが20-22日あるいは27-30日の定常運転時には安定した群集構造を形成していることが分かった。また消化槽内に見られる群集構造は、消化槽に投入される初沈汚泥や余剰汚泥の群集構造とは大きく異なっていた。さらに主座標分析におけるプロットは、消化汚泥、初沈汚泥、余剰汚泥それぞれが異なる群集構造であることを示しており、嫌気性消化過程において消化槽内に独自の微生物群集構造が形成されていることが明らかになった。

2.3 真核生物群集構造

好気性処理において真核生物、特に原生動物などは、汚泥の減容化やプロセス管理の指標としてその重要性が認識されている。一方、嫌気性処理においては多くの研究が原核生物の群集構造に着目して行われてきており、真核生物の嫌気性処理における重要性は未解明である。しかしながら、嫌気性の真菌などがセルロースなどの分解に関わっていることが知られているように、真核生物が嫌気性処理において生態学的な役割を担っている可能性は大いにあり得る。Matsubayashiらは、下水汚泥を処理する嫌気性消化汚泥内の真核生物について、18S rRNA 遺伝子のクローンライブラリを作成し、その多様性を評価した⁷⁾。近年では次世代シーケンサーを活用したハイスループット解析が主流となっているが、下水汚泥を処理する消化汚泥内に存在する真核生物の解析例は皆無に等しく、rRNA 遺伝子情報がほとんどデータベース上に存在していない状況であったため、18S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅可能なプライマーを用いて増幅したPCR産物を解析した。rRNA 遺伝子のデータベースとしては、silvaが知られているが⁸⁾、silvaにおいて真核生物はデータベースにおいて1,200塩基長以上のものが採用されており、嫌気性消化汚泥から採取される真核生物のほぼ全長(1,800塩基長)のデータを回収して登録することは、次世代シーケンサーによる解析のためにも重要なデータベースになると考えている。

まず各サンプル汚泥中に真核生物がどのくらいの割合で存在しているかを確認するために5つの嫌気性消化汚泥サンプル中の *Eukarya*, *Bacteria*, *Archaea* の rRNA 遺伝子を定量PCRにより測定した。*Eukarya* 由来の rRNA 遺伝子コピー数は $3.1 \times 10^2 - 1.8 \times 10^3$ copies/ng であり、全 rRNA 遺伝子コピー数 (*Eukarya*+*Bacteria*+*Archaea* を100%とする) に対する *Eukarya* の割合は0.1-1.4%であった。*Archaea* 由来の rRNA 遺伝子のコピー数は $2.0 \times 10^3 - 2.3 \times 10^4$

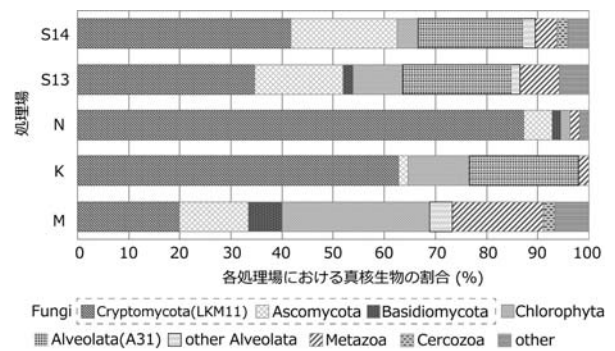


Fig. 2 Eukaryotic community structures of the 5 anaerobic sludge samples.

copies/ng (2.0-9.1%) であり、大部分を *Bacteria* が占めていた。定量PCRによる遺伝子定量結果は、遺伝子の数を定量しているだけで、この結果が必ずしも細胞レベルでの存在率には結びつかない。真核生物の *rrn* コピー数は原核生物に比べて多い場合が多いことを考慮すると、嫌気性の真核生物は多く見積もっても1%の存在率には満たないと推察される。この数字をどう捉えるかは意見が分かれるところであろうが、個人的にはそれなりの数の真核生物が存在している可能性があるという事実には驚いている。

その真核生物の群集構造を明らかにするために、251クローンからなるライブラリを構築し、塩基配列を解読した。Fig. 2に各処理汚泥内における上門/門レベルでの真核生物の群集構造を示す。Fungiに属する門が約70% (167/251) を占め、そのうちの76.0% (127/167) が、Cryptomycota門のLKM11系統群に属していた。Cryptomycota門の次にFungi内において優占していたのはAscomycota門であったが、その割合は17.4% (29/167クローン) とLKM11系統群の1/5程度であった。またFungi以外には、Alveolata上門、Chlorophyta門、Cercozoa門の他、Metazoaに属するクローンがそれぞれ14.3% (36クローン)、10.8% (27クローン)、0.8% (2クローン)、6.4% (16クローン) を占めていた。

OTUレベルでは、2つの下水処理場の消化槽から採取したサンプルにおいてAlveolata上門Protalveolata門Perkinsidae科A31系統群がおおよそ20%程度存在し、優占していた。他の処理場の消化槽からはこの系統群に属するOTUは検出されなかったが、地理的に離れた2つの処理場の消化槽から検出されたことから、何らかの環境要因により優占し、かつ嫌気性消化における何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

嫌気性消化汚泥中に存在するLKM11系統群に属する真核生物は、分子系統学的に多様性が高いと考えられる。LKM11系統群は1999年に初めて湖の堆積物から検出され、その後、土壌、海、活性汚泥などからも

検出されている未培養クラスターである⁹⁾。LKM11系統群についてはその生理・生態が未解明なところが多い。我々が行った活性汚泥の真核生物群集構造解析においても、LKM11系統群はFungiの70%以上を占める主要なグループであった。川や土壌などの自然環境中だけではなく、一連の下水処理において何らかの役割を担っていると考えられる。

クローン解析で多く検出されたLKM11系統群とA31系統群をFISH法により検出するために、LKM11系統群とA31系統群に特異的なプローブを設計した。嫌気性消化汚泥内には様々な夾雑物が存在したため(特にG励起)、設計したプローブとEuk516プローブによる二重染色をCARD-FISH法により行い、両方のプローブ由来の蛍光が得られた細胞のみを検出することで、真核生物細胞の同定に成功した。これらの細胞の大きさは2-8 μm であった。活性汚泥における原生動物などのように顕微鏡観察のみでの検出は難しく、その検出・同定には、何らかの染色技術を用いる必要がある。

3. 嫌気性処理に関わる微生物の機能解明

rRNA遺伝を分子マーカーとして用いることで、原核生物や真核生物の群集構造を明らかにすることができることは上述の通りである。一方で、解析によって得られる遺伝子情報のほとんどが未培養微生物に由来するものであり、嫌気性処理プロセスにおける機能や役割は不明である。未培養微生物群の機能解明には幾つかの方法がある。1つはメタゲノム解析による遺伝学的な機能推定である。Nobuらは、嫌気性処理プロセスに多く見られる*Euryarchaeota*門のグループWSA2(あるいはArc I)が、メチル基を還元してメタンを生成する機能を有することをメタゲノム解析によって明らかにしている¹⁰⁾。これによりこのグループには、'*Candidatus Methanofastidiosa*'という綱の名前が提案されている。また別の方法として、同位体標識した基質をトレーサーとして用い、DNA-stable isotope probing (SIP)法などのように遺伝子レベルで¹¹⁾、あるいはMicroautoradiography-fluorescence in situ hybridization (MAR-FISH)法¹²⁾やnano-scale secondary ion mass spectrometry (nanoSIMS)とISH法による微生物同定法¹³⁾などのように細胞レベルで微生物代謝を可視化して、機能解明を行うなどがある。これらの技術は、群集構造解析で得られる系統群の機能やプロセスにおける役割を議論するために不可欠であるが、上述した機能解明技術がrRNA遺伝子解析のように比較的容易に扱えるようになるには今しばらく時間が必要であると思われる。

4. おわりに

微生物群集構造の解析は、シーケンサーの技術革新、インフォマティクスツールの拡充、データベースの充実に伴い、比較的容易に行えるようになってきた。微生物群集構造を明らかにすることは、反応槽内で起きている微生物学的反応を理解することへの第一歩である。様々な微生物の関わりによって進行する嫌気性消化プロセスにおいては、諸反応の進行に必要な微生物群を安定して維持していくことが重要な鍵となる。またリアクターのスタートアップ時においては、微生物群集の変遷をモニタリングすることで、より迅速かつ安定したスタートアップが可能になる。ポータブルシーケンサーが商用化されるなど、微生物群集構造の情報はより容易に得られるようになってきている。微生物情報をプロセスの制御に活用していくためにも、どのような環境条件下でどのような微生物群集構造が形成されるのか、今後更に情報を蓄積していく必要がある。

参考文献

- 1) 片岡直明: 嫌気性生物処理技術の特徴と発展の流れ, エバラ時報, Vol. 229, pp. 27-38 (2010)
- 2) 国土交通省 HP: 資源・エネルギー循環の形成, http://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewage/crd_sewage_tk_000124.html
- 3) T. Narihiro and Y. Sekiguchi: Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update, Current Opinion in Biotechnology, Vol. 18, pp. 273-278 (2007)
- 4) D. Rivière, V. Desvignes, E. Pelletier, S. Chaussonnerie, S. Guerhazi, J. Weissenbach, T. Li, P. Camacho and A. Sghir: Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge, The ISME Journal, Vol. 3, pp. 700-714 (2009)
- 5) C. Sundberg, W. A. Al-Soud, M. Larsson, E. Alm, S. S. Yekta, B. H. Svensson, S. J. Sørensen and A. Karlsson: 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters, FEMS Microbiology Ecology, Vol. 85, pp. 612-626 (2013)
- 6) 島田祐輔, 久保田健吾, 原田秀樹, 李玉友: 実機嫌気性消化槽のリスタートアップによる微生物群集の経時的変化, 第50回日本水環境学会, pp. 269 (2016)
- 7) M. Matsubayashi, Y. Shimada, Y. -Y. Li, H. Harada, K. Kubota: Phylogenetic diversity and *in situ* detection of eukaryotes in anaerobic sludge digesters, PLoS ONE, Vol. 12, pp. e0172888 (2017)
- 8) P. Yilmaz, L. W. Parfrey, P. Yarza, J. Gerken, E. Pruesse, C. Quast, T. Schweer, J. Peplies, W. Ludwig, F. O. Glöckner: The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks, Nucleic Acids Research, Vol. 42, pp. D643-D648 (2014)
- 9) K. Matsunaga, K. Kubota and H. Harada: Molecular diversity of eukaryotes in municipal wastewater treatment processes as

- revealed by 18S rRNA gene analysis, *Microbes and Environments*, Vol. 29, pp. 401–407 (2014)
- 10) M. K. Nobu, T. Narihiro, K. Kuroda, R. Mei and W. -T. Liu : Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methylreducing methanogen, *The ISME Journal*, Vol. 10, pp. 2478–2487 (2016)
- 11) M. Hatamoto, H. Imachi, Y. Yashiro, A. Ohashi and H. Harada : Detection of active butyrate-degrading microorganisms in methanogenic sludges by RNA-based stable isotope probing, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, pp. 3610–3614 (2008)
- 12) T. Yamada, K. Kikuchi, T. Yamauchi, K. Shiraishi, T. Ito, S. Okabe, A. Hiraishi, A. Ohashi, H. Harada, Y. Kamagata, K. Nakamura and Y. Sekiguchi : Ecophysiology of uncultured filamentous anaerobes belonging to the phylum KSB3 that cause bulking in methanogenic granular sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, pp. 2081–2087 (2011)
- 13) K. Kubota, Y. Morono, M. Ito, T. Terada, S. Itezono, H. Harada and F. Inagaki : Gold-ISH : A nano-size gold particle-based phylogenetic identification compatible with NanoSIMS, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 37, pp. 261–266 (2014)