

分子生物学的手法をもちいた 微生物群集解析の適用事例

Applications of Molecular Biological Techniques for the Analysis of Microbial Community in Biological Wastewater Treatment Plants



技術開発本部
水・汚泥技術開発部汚泥処理室
赤 司 昭
Akira Akashi
(医学博士)

活性汚泥プロセスをはじめとする生物学的排水処理は、ランニングコストが比較的安価であること、また、その装置構成が比較的単純で維持に特殊な技術を必要としないことから下水処理をはじめとして広く採用されている。しかしながら、水質浄化に係わる微生物に関する知見はほとんどなかった。分子生物学的手法の発達により生物学的排水処理装置の微生物群集を解析することが可能になった。本稿では、微生物群集構造の解析に適用される分子生物学的手法、とくにPCR法の概要とその適用事例について報告する。

Biological wastewater treatment processes such as activated sludge process have been widely used. But our understanding of those organisms was limited. Recent molecular biological techniques provided us new approaches to understand the population dynamics of microbial communities in biological wastewater treatment plants. In this report, we describe the overview of molecular biological techniques, and the application to the Analysis of Microbial Community in Biological Wastewater Treatment Plants.

Key Words :

生物学的排水処理
分子生物学的手法
P C R
D N A
R N A
活 性 汚 泥

Biological wastewater treatment
Molecular biological techniques

Activated sludge

まえがき

生活排水や工場等から排出される汚水の処理には、活性汚泥法等の生物学的排水処理が広く採用されている。通常、微生物による排水処理設備を維持管理する場合は、流入する排水の負荷に対して適切な微生物量、たとえば活性汚泥量を処理設備内に保持することが重要とされている。活性汚泥の濃度は主に浮遊性物質（SS）として管理され、活性汚泥に含まれる多種多様な微生物群を一塊の固形分として取扱っている。排水処理設備にかかる負荷の変動や水温低下などの外乱要因により排水処理状態が悪化し

た場合、汚泥に含まれる細菌の種類や数に変化が起きることは一般的に知られているが、従来のSS量の管理からはその変化を情報として伝えることは困難である。そのため、処理状態が悪化した場合の運転管理は熟練した管理者の経験や勘に頼らざるをえないのが実情である。

培養法により微生物の種類や数を測定することは可能ではあるが、長い時間を要すること（たとえば、窒素除去に係わる細菌の一つであるアンモニア酸化細菌の場合、約1カ月もの時間が必要）から、日々の排水処理設備の管理指標として適用することは困

難である。また培養法で検出される微生物量は、実際に生息する微生物のわずか1%にすぎない¹⁾といわれており残りの99%以上の微生物は生きているが培養できないことになる(いわゆるVNC: Viable but Non Culturable²⁾)。したがって、培養法で活性汚泥などに生息する微生物の全体像を把握するには無理があった。

近年、微生物の遺伝子(DNAやRNA)を対象にした分子生物学的手法の進歩により、生物処理設備に生息する微生物の種類や数を迅速かつ精度良く把握することが可能になった。

我々は排水処理設備の運転状況をオペレーターが客観的に評価できる管理指標を確立するため、排水処理設備に存在する微生物の遺伝子情報をモニタリングし、その情報に基づいて生物処理を維持管理するシステムの確立を目標として開発を進めている。分子生物学的手法の主なものとしては、T-RFLP法(Terminal restriction fragment length polymorphism: 装置内の何種類くらいの微生物がどのような比率で生息するかを解析する技術)、FISH法(Fluorescent in situ hybridization: 微生物の存在量や空間分布を視覚的に調べる方法)などが多用されているが、本稿ではPCR法(Polymerase chain reaction)により、水質浄化に係わる特定微生物の存在数量や活性の定量と処理性能を解析した事例について紹介する。

1. 汚泥を構成する微生物と分子生物学的手法(PCR法)の概要

1.1 汚泥を構成する微生物

汚泥の中には真性細菌(大腸菌やアンモニア酸化細菌などのいわゆる細菌)も古細菌(たとえば、メタン菌など)あるいは真核生物(たとえば、酵母、ツリガネムシ、ミジンコなど)も生息し、その解析対象はきわめて多様性に富んでいる。真性細菌一つを取ってみても、BOD除去に係わる細菌、窒素除去に係わる細菌、リン除去に係わる細菌等々多岐に及んでいる。また、窒素除去に係わる細菌にもその機能により、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、硝酸還元細菌、亜硝酸還元細菌、亜酸化窒素還元細菌に分類され、各機能を有する細菌は更に複数の細菌種から構成されている(図1)。

分子生物学的手法の発達により、活性汚泥を構成する真性細菌の全体像を解析したり、真性細菌の中でも特定の機能を有する細菌、たとえばアンモニア酸化細菌の存在量を定量することが可能になってきた。

1.2 DNAとRNAのどちらを対象に解析するか?

ウイルスを除く生物の細胞の中にはDNAと

RNAの両方が存在するが、解析対象がDNAかRNAかでえられるデータの意味合いが異なってくる(図2)。DNA(たとえば、16SrDNA)を対象にして解析をおこなった場合、処理装置内に存在する微生物の存在量や多様性(何種類の微生物が存在するか)を知ることができる。一方、RNAを対象にした解析では、個々の微生物の活性(元気度)を知ることができる。この2つを組み合わせれば、たとえば、処理装置の中に何種類くらいの微生物が存在し、流入水質の性状が変化した時に個々の細菌の活性にどのような影響を及ぼすかを解析可能である。

1.3 PCR(Polymerase Chain Reaction)の原理

PCR法は微生物が保有する特定の遺伝子(たとえば、16SrDNAや16SrRNA)を増幅する技術である。具体的には、活性汚泥からDNA(活性を調べたい場合はRNA)を抽出・精製後、特定の遺伝子とだけ結合(ハイブリダイズ)するプライマーと呼ばれる短いDNA(塩基(AGCT)が20個前後並んだもの)と混合し、酵素(Taq DNA Polymerase)反応をおこなうと、プライマーに挟まれた部分の

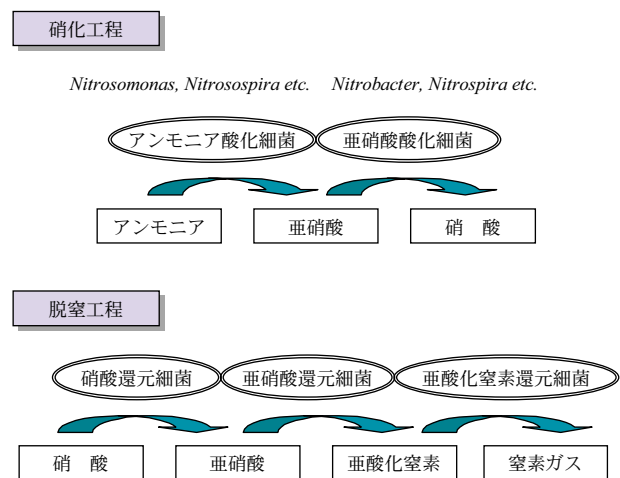


図1 硝化脱窒の工程とそれに関与する微生物

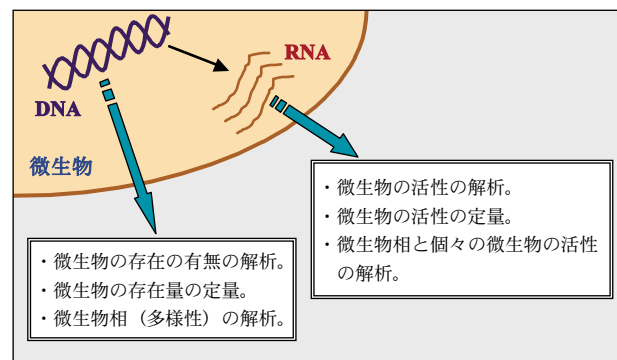
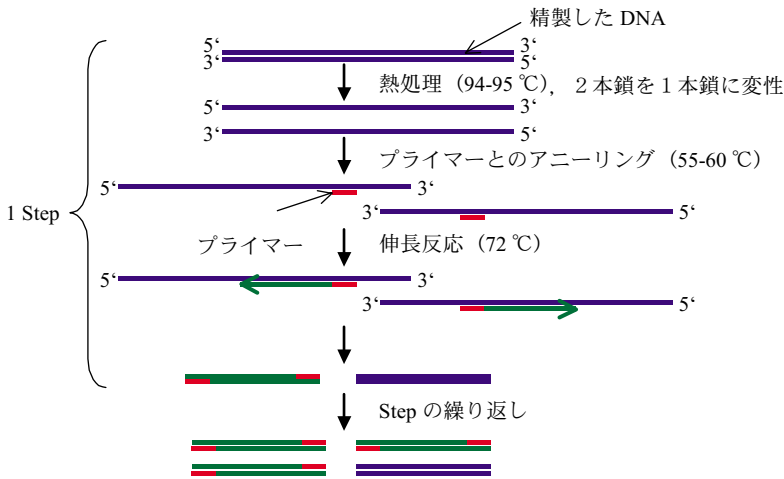


図2 解析の対象はDNAかRNAか?



この反応を20回繰り返すとターゲット遺伝子 (16SrDNA) が $2^{20}=100$ 万倍に増幅される

図3 PCR法の原理

DNAが増幅される(図3)。その際使用するプライマーのデザインを工夫することにより(つまり、AGCTの20個前後の並びが特定の細菌の特定の遺伝子とだけ結合するように並び替えること)、活性汚泥中の多種多様な細菌の中から特定の細菌(たとえば、硝化脱窒に係わるアンモニア細菌)だけを検出することも可能である。また、単なる検出にとどまらず、存在数量あるいは活性を定量することも可能である(定量PCR法)。ただし、PCR反応にはさまざまな誤差(DNA抽出が特定の微生物に偏る、PCR反応そのものの偏り)が含まれるため、注意を要する。

2. 適用事例

2.1 窒素除去プロセスの運転管理への適用

本プロセスに流入する排水は主にアンモニアと硝酸が含まれる窒素含有排水であり、BODはほとんど含まれていない。これらを生物学的硝化脱窒法により除去をおこなっている。窒素含有排水はまず硝化槽へ流入し、アンモニアが硝酸態の窒素に酸化された後、脱窒槽で窒素ガスに還元され除去される。

硝化槽と脱窒槽から定期的に活性汚泥を採取し、DNAを精製後c-PCR(競合PCR: competitive PCR)法によりアンモニア酸化細菌、亜硝酸還元細菌、亜硝酸還元細菌の存在数量を測定した。

排水処理設備の維持管理は通常活性汚泥あたりの負荷を指標としてもちいることが多いが、ここでは個別の細菌数の測定結果をもちいて、それぞれの細菌数あたりの窒素負荷を算出した。図4、図5および図6にアンモニア酸化細菌、亜硝酸還元細菌および亜酸化窒素還元細菌1 copyあたりのT-N負荷(mg-T-N/copies・日)と処理水のT-N濃度の相関を示す。各細菌数あたりのT-N負荷が高くなるにしたがい

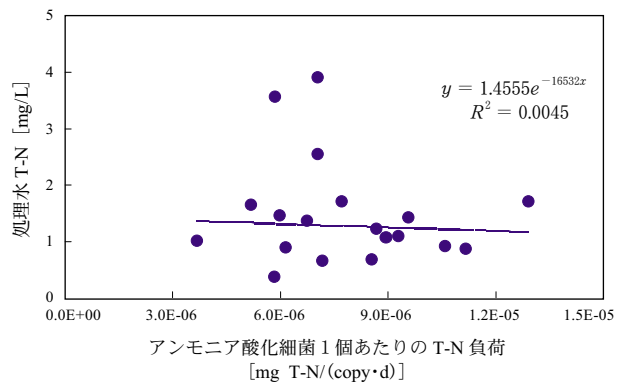


図4 アンモニア酸化細菌 1 個あたりの窒素負荷と処理水質の関係

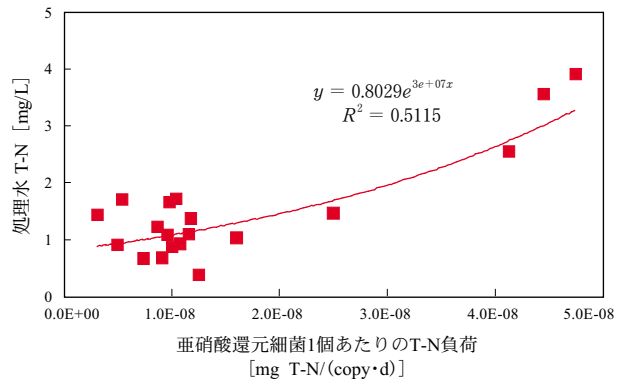


図5 亜硝酸還元細菌 1 個あたりの窒素負荷と処理水質の関係

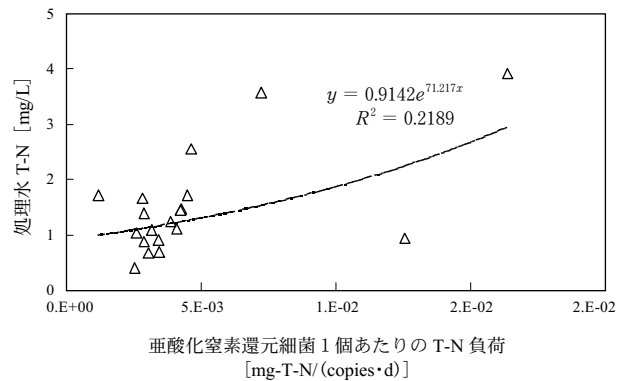


図6 亜酸化窒素還元細菌 1 個あたりの窒素負荷と処理水質の関係

処理水の T-N は上昇する傾向にあったが、図 5 に示すように亜硝酸還元細菌数あたりの T-N 負荷と処理水の T-N の相関性ももっとも高かった。つまり、亜硝酸から一酸化窒素への還元工程が本排水処理設備において律速段階にあると考えられた。したがって本設備では亜硝酸還元細菌の菌数あたりの負荷を適切に維持することにより、安定した処理水質がえられるものと考えられる。

以上の結果から排水処理設備に存在する多種多様な微生物の中で、処理性能を左右するキーとなる管理指標細菌の存在が明らかになった。この管理指標細菌の挙動を追跡することにより排水処理設備を容易に維持管理できる生物診断システムを以下に提案する。生物診断システムの一連の作業フローを図 7 に示し解説する。

(1) 定期診断

排水処理設備の汚泥をサンプリングして c-PCR 法等により管理指標である亜硝酸還元細菌の細菌数を測定する。

(2) 負荷の管理

亜硝酸還元細菌数の測定結果と流入 T-N 負荷から、細菌数あたりの負荷を算出する。次に図 6 から現在の細菌数負荷でえられる処理水質を予測する。予測処理水質が目標水質より低く余裕があればそのまま運転を継続する。

(3) 運転調整

図 6 より予測される処理水質が目標水質に対して余裕がない、あるいはオーバーする場合は、亜硝酸

還元細菌を増殖させて菌数負荷が小さくなるように運転調整をおこなう。調整方法は排水処理設備により異なるが、本排水処理設備における管理指標の亜硝酸還元細菌は従属栄養細菌に属するため有機源となるメタノールの添加量を増加することにより細菌を増殖させることが可能である。

過去の運転実績などからたとえば 1 週間後や 1 カ月後の流入負荷が予測可能であれば、水質予測データを基に適切な運転管理も可能になる。

2.2 メタン発酵槽の不具合の原因解明

メタン発酵槽の立ち上げ過程で発生した不具合の原因解明に分子生物学的手法を適用した事例を以下に紹介する。

生ゴミ、豚糞尿および農業集落排水汚泥を受け入れメタンガスを生成しバイオガス発電をおこなう施設に納入されたメタン発酵槽において、負荷がまだ低い立ち上げ初期に有機酸（主に酢酸）が蓄積し、なかなか回復しないという不具合が生じた。メタン発酵（嫌気性プロセス）における有機酸蓄積の主な原因として、表 1 に示すような因子が考えられてい

表 1 メタン発酵における有機酸蓄積の主な原因

①	微量金属の不足による代謝律速
②	毒性物質の混入による代謝阻害
③	過剰な負荷
④	物質移動の律速
⑤	水理学的な短絡流
⑥	窒素またはリンの不足

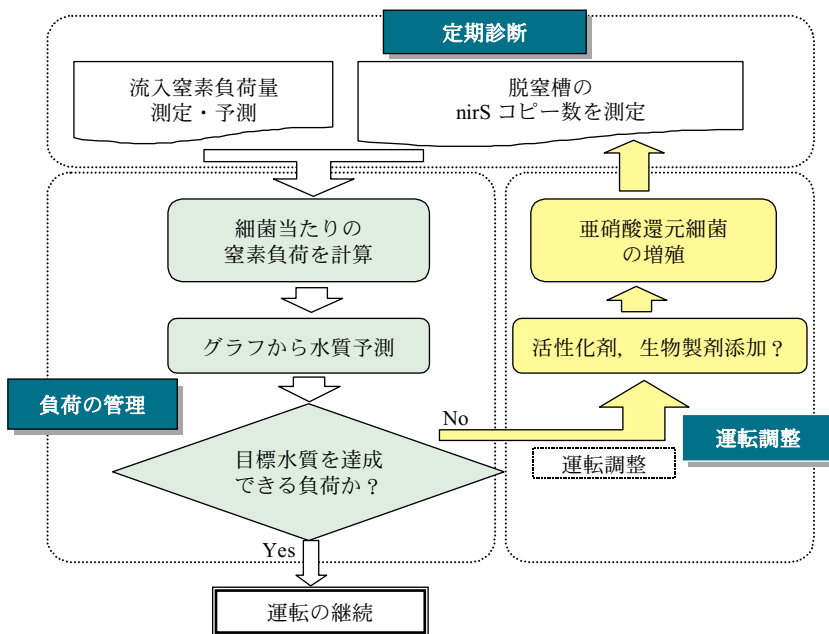


図 7 診断のフロー

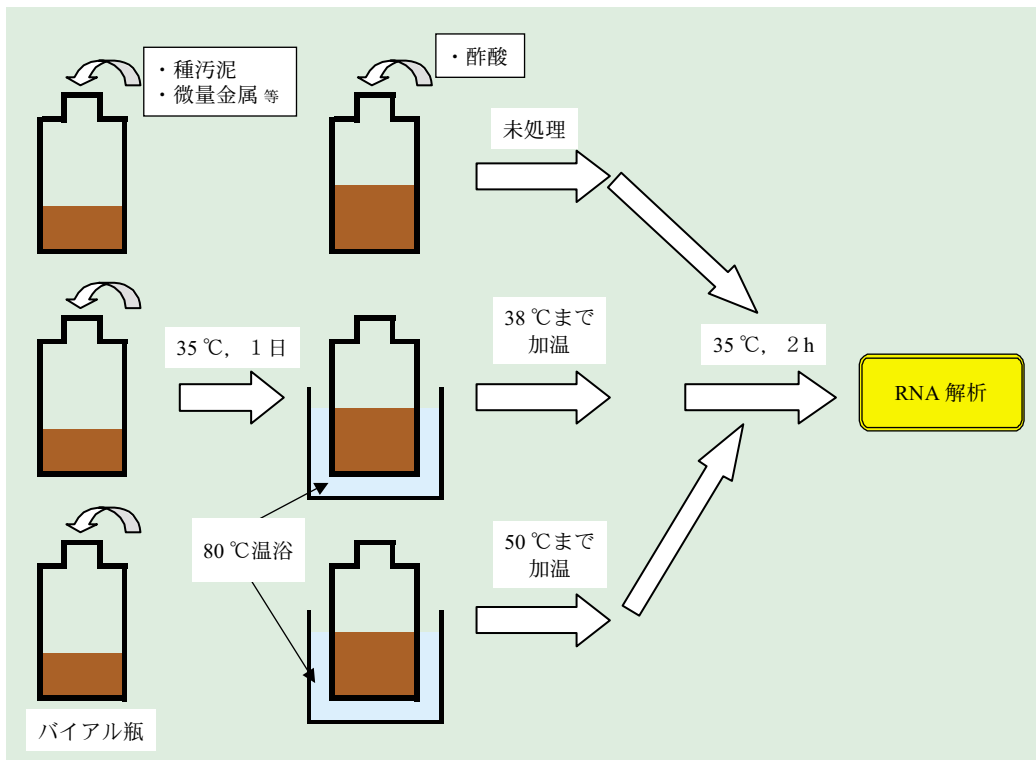


図8 熱のメタン発酵汚泥に対する影響の実験方法

る。³⁾ 微量金属の不足，毒性物質の混入の可能性についてはバイアル試験等により検討したが，その可能性は否定された（データ未掲載）。また，過剰負荷，物質移動の律速あるいは水理学的な短絡流の可能性についても検討をおこなったが否定された。さらに窒素またはリンの不足も投入原料の性質上否定された。そこで，現場の運転管理者も交え検討を重ねたところ，メタン発酵槽に投入した種汚泥の加温時の過熱が原因である可能性が考えられた。本メタン発酵槽の加温は，メタン発酵槽内の汚泥と温水を熱交換することによりおこなわれているが，立ち上げ開始時の種汚泥の昇温時間短縮のため80℃の温水中で50℃まで加温し，未加温の汚泥と混合していたことが判明した。

50℃の加温がメタン生成菌や酸生成菌に及ぼす影響を調べるため，50℃まで加温した汚泥と加温しない汚泥のRNA量を比較した。図8に示すように，メタン発酵汚泥を入れたバイアル瓶を80℃の温水中で50℃まで加温後メタン発酵槽の運転条件である35℃まで急冷したもの，80℃の温水中で38℃まで加温したもの，および80℃での加温はおこなわないものを用意し，メタン発酵槽の運転温度である35℃で2時間緩やかに振とう培養した。これらの汚泥からRNAを精製後cDNAを合成し，これを鋳型にして定量PCRをおこなった。酸生成菌，

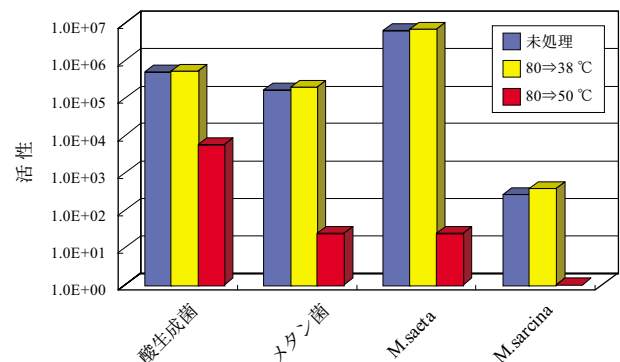


図9 酸生成菌，メタン生成菌，*Methanosaeta* および *Methanosarcina* の活性に及ぼす熱の影響

全メタン生成菌，およびメタン生成菌の中で酢酸を資化（酢酸を分解してメタンガスを生成）する *Methanosaeta* と *Methanosarcina* の16SrRNAに特異的なプライマーをもちいて酸生成菌とメタン生成菌の16SrRNA量を定量し，熱のそれぞれの細菌に及ぼす影響を調べた。

図9に定量PCR法によるRNA量の定量結果を示す。80℃で38℃まで加温した場合（棒グラフの黄色のバー）と80℃で加温しない場合（棒グラフの青色のバー）の酸生成菌，メタン生成菌，*Methanosaeta* および *Methanosarcina* のそれぞれの細菌で合成されたRNA量に差はなく，80℃で38℃まで加温しても各細菌の活性には何ら影響を及ぼ

さないことが判った。一方、80℃で50℃まで加温した場合（棒グラフの赤色のバー）、酸生成菌のRNA量は未加温の約10分の1まで低下した。メタン生成菌、*Methanosaeta* および *Methanosarcina* ではさらにダメージが甚大であり、RNA量は未加温の1000分の1から10000分の1まで低下した。

以上の結果から、立ち上げ初期に見られたメタン発酵槽での酢酸蓄積は、以下のメカニズムで起きたものと推定した。すなわち、種汚泥投入時の過熱が原因で酸生成菌とメタン生成菌の活性が低下する。しかし、酸生成菌のダメージはメタン生成菌にくらべると小さいため、ある程度の酸生成能は残存しており酢酸を生成し続ける。一方メタン生成菌（とくに *Methanosaeta* や *Methanosarcina* などの酢酸酸化メタン菌）に対するダメージは甚大であるため、酸生成菌が生成した酢酸を消費しきれずに徐々に酢酸が蓄積されたものと推測した。

む す び

分子生物学的手法の適用により今までブラックボッ

クスであった生物学的排水処理装置内の微生物に解明の手が及ぶようになってきた。我々のような排水処理に係わるものにとっての最大の関心事は、微生物の状態と装置の処理性能を関連づけ、それを運転管理や装置開発に結びつけることである。今回紹介したように、処理装置の性能と分子生物学的手法でえられた結果を関連付けた研究例も見られるようになってきており、分子生物学的な分析手法がBODやCODなどの水質分析と同様に日常管理でもちいられるようになる日も近いものと期待される。今後は、水質の予測や予測結果を基にしたリアルタイムな装置制御に結びつくような開発を進めていきたい。

[参考文献]

- 1) Amman, R. I. et al.: Microbiol. Rev., 59 (1995), 143.
- 2) Colwell, R. R., et al.: Bio/Technol., 3 (1985), 817.
- 3) R. E. Speece 原著 松井三郎・高島正信監訳、産業廃水処理のための嫌気性バイオテクノロジー、技報堂出版