

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H01576

研究課題名(和文) マルチオミクスデータと機械学習に基づく廃水処理プロセスの新規制御技術の創成

研究課題名(英文) Development of novel control technology for wastewater treatment process based on multi-omics data and machine learning

研究代表者

成廣 隆 (Narihiro, Takashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：20421844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な廃水処理プロセスに生息する機能未知微生物群の菌叢やゲノム情報と水質データ等を活用することで廃水処理の制御因子を発見することを目指し、以下の研究成果を得た。(1) 都市下水処理活性汚泥施設における流入負荷変動時における菌叢データから、アンモニア酸化細菌の存在量と負荷変動に関連性があることを見出した。(2) 食品工業廃水を処理するラボスケールリアクターのショットガンメタゲノム解析からアミノ酸分解フローを明らかにした。(3) PET製造廃水を処理するラボスケールリアクターを構築し、500日程度の連続処理実験を実施してCOD除去率90%以上を達成し、芳香族化合物の分解機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内閣府のバイオ戦略に謳われているバイオエコノミー社会の形成に向け、各種製造業における有機性廃水・廃棄物処理の効率化や高度化が求められている。その実現のために本研究では、廃水処理プロセスにおいて有機物分解や窒素除去といった生物反応の中核を担っているにもかかわらず、その代謝機能の全容が解明されていない微生物に着目し、都市下水や産業廃水を処理する好気性・嫌気性プロセスを対象として、微生物機能情報を菌叢、ゲノム、遺伝子発現といったマルチオミクスの観点から明らかにした。これらの成果から見出された微生物学的知見は、新しいリアクター設計や運転制御指針に向けた応用展開での活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We aim to discover the control factors of wastewater treatment by employing microbial community structure, metagenome assembled genome, and operational data. The major outcomes are (1) The microbial community analysis in activated sludge processes during the operational period after an increase in the wastewater flow rate showed that increased flow rate has an impact on Nitrosomonas populations. (2) Ecogenomic analysis of lab-scale anaerobic reactor treating food-processing wastewater revealed the biodegradation flow of amino acids. (3) We constructed a lab-scale reactor to treat polyethylene terephthalate production wastewater and achieved high COD removal rate. In addition, we elucidated the mechanism of aromatic compounds degradation based on metagenomic analysis. Overall, functionally and phylogenetically diverse microorganisms unite to form a metabolic network to perform bioconversion of organic/inorganic compounds in wastewater sludge microbiota.

研究分野：環境微生物学

キーワード：廃水処理 微生物 菌叢解析 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法や嫌気汚泥消化法等の生物学的水処理プロセスは、限りある水資源の循環と再利用を支える重要な社会基盤技術である。国内の自治体が管理する都市下水処理場を例に挙げると、2,100 箇所を超える活性汚泥プロセスと 700 基以上の嫌気汚泥消化タンクが全人口の約 77%に相当する 9,800 万人の下水を処理するため昼夜を問わず稼働している(日本下水道協会, 平成 26 年度統計)。産業界に目を向けると、全世界で 4,000 基以上の嫌気性廃水処理プロセスが高 COD 濃度の工場廃水等の処理に適用されている(van Lier, et al. Rev Environ Sci Bio/Technol, 2015)。さらに近年、石油化学原料に依存している社会からバイオ資源の有効利用に転換して持続的発展が可能な循環型社会の形成を目指すという、いわゆるバイオエコノミー社会の構築を目指す機運が国内外で高まっており、人間社会における資源循環の要に位置付けられる廃水処理の重要性が再認識されるとともに、現状の廃水処理技術を循環型社会に適合させるための技術革新が求められている(産業競争力懇談会, 2017 年度活動企画書)。このような要望の高まりを受け、内閣府が定める「バイオ戦略」においては有機性廃水・廃棄物処理技術がバイオエコノミーの拡大に寄与する市場領域の一つとして位置づけられた。

このような社会情勢を踏まえ、申請者らは国内外の 20 箇所以上の都市下水処理場を訪問し、現状の廃水処理技術が克服すべき課題を調査した。その結果、何らかの原因により処理水質が悪化した際には、これまでに培われてきた経験や知識を拠り所として流入下水量や曝気量を調整して数週間様子を見るなど、廃水処理の現場では経験則に基づく運転管理が日常的に実施されていることが浮き彫りとなった。このような対応が講じられていることの原因のひとつとして、廃水処理の中核を担う汚泥微生物群の 90%以上がこれまでに培養されていない未知微生物で占められており、個々の微生物の代謝機能や異種微生物間の相互作用等の全貌が未だに解明されていないことが挙げられる。今日に至るまで、申請者らを含む数多くの研究者により 16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物群集構造解析が実施され、汚泥を構成する微生物群の多様性とその動態の一端が明らかとなった。しかしながら、廃水処理の中核であるはずの微生物そのものの種類・存在量・代謝機能等の情報がプロセスの維持管理指標として一般化されるまでには至っていないのが現状である。

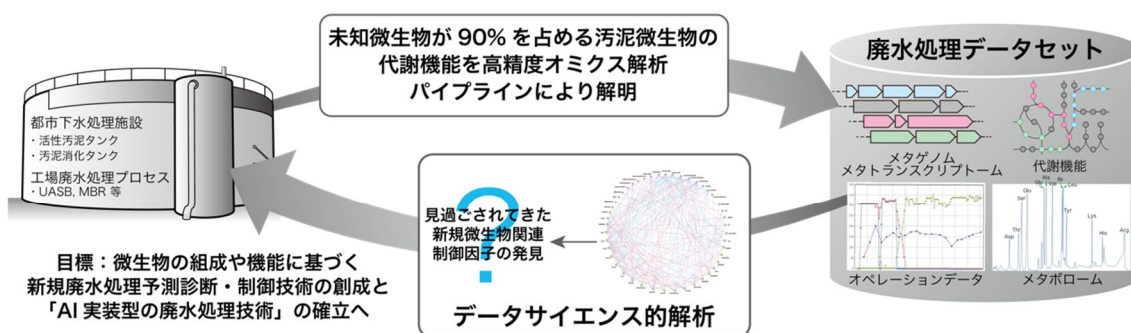


図 1. 本提案課題の概念図

2. 研究の目的

上述した現代の廃水処理技術が置かれている社会的・学術的背景を踏まえ、循環型社会に適合する次世代型の廃水処理技術の創成を目指すため、これまでの廃水処理研究で見過ごされてきた微生物機能が関連する「廃水処理制御因子」を見出すことを最終的な目標とし、未培養微生物が 90%以上を占める廃水処理汚泥微生物群の代謝機能を独自のオミクス解析パイプラインにより高精度に解析し、メタゲノム情報に基づく汚泥微生物群の機能遺伝子と代謝マップ、RNA 発現/代謝産物プロファイル、各種オペレーションデータに基づき統計学的解析等のデータサイエンス的解析を実施した。将来的には本研究の成果を実際の運転管理に活用することで「AI 実装型の廃水処理技術」の創成を目指す(図 1)。

近年の遺伝子シーケンシング技術の飛躍的な進歩により、メタゲノムやメタトランスクリプトーム解析が様々な研究分野に広まった。しかし、16S rRNA 遺伝子を標的とする微生物群集構造解析においてはデータ処理法のスタンダードが確立されているものの、汚泥微生物群の全ゲノム・全 RNA を対象としたメタオミクス解析は、数千種以上の微生物からなる汚泥試料の種多様性の高さが大量シーケンスリードからの個々の微生物ゲノムの再構築の妨げとなっていること、汚泥の大部分を占める未知微生物由来の機能未知遺伝子の正確な同定が進まず代謝機能解析が困難を極めること等の問題があり、誰もが簡単に実施できる状況ではない。我々は、最先端のバイオインフォマティクス技術と、廃水処理関連微生物の代謝機能に関する豊富な知識に基づき、シーケンスリードのクオリティトリミング、できるだけ長い塩基長の contig を得る

ためのアセンブル、contig の塩基組成とリード被覆度に基づいたゲノム再構築、独自に収集した主要代謝経路に關与する酵素のアミノ酸配列に基づくアノテーションを主な構成要素とする高精度オミクス解析パイプラインを構築してきた。そこで本研究では、この解析技術を活用して膨大な DNA/RNA/代謝産物データから汚泥微生物群が有する未知なる代謝機能を高精度に解析し、そこに各種オペレーションデータを紐付けした廃水処理データセットを複数構築する。得られたデータを基に、相関分析等の統計学的アプローチにより菌叢と水質・運転データとの関連付けを行うことで、廃水処理制御因子を見出すことを試みる。そのため本研究では、(1) 実規模都市下水処理施設における流入負荷変動が菌叢構造に及ぼす影響、(2) 食品系工場廃水に含まれるアミノ酸の嫌気分解フローの解明、(3) ポリエチレンテレフタレート (PET) 製造廃水のラボスケールリアクター処理実験の 3 つの中課題を設けることとした。

3. 研究の方法

(1) 実規模都市下水処理施設における流入負荷変動が菌叢構造に及ぼす影響

実規模都市下水処理施設の活性汚泥反応槽と消化タンクから汚泥試料を定期的に採取し、凍結保管するとともにオペレーションデータを蓄積した。また、それらの試料について 16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析を実施した。菌叢解析では、市販の DNA 抽出キットを用いて全ゲノムを抽出し、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的として PCR による増幅を行った。得られた PCR 産物を精製し、イルミナ社 MiSeq シークエンサーを用いてシークエンシングを実施した。シークエンサーからの出力データは QIIME2 ソフトウェアにより処理し、汚泥試料に存在する微生物の存在量と系統学的所属を解析した。

(2) 食品系工場廃水に含まれるアミノ酸の嫌気分解フローの解明

食品系工業廃水を模擬した人工廃水を供給するラボスケールの嫌気性上昇流汚泥床リアクターから採取した汚泥を対象としたショットガンメタゲノム解析を実施し、アミノ酸等の分解とメタン生成に關与する機能遺伝子群についての基盤情報を取得した。ショットガンメタゲノム解析では、市販の DNA 抽出キットを用いて全ゲノム DNA を抽出し、イルミナ社 MiSeq シークエンサーによりショットガンシークエンシングを実施した。出力された遺伝子リードを MEGAHIT ソフトウェアによりアセンブルしてコンティグを得た。さらに、MaxBin や Metabat といったピニングソフトウェアを用いて、k-mer 頻度やカバレッジ等を指標として単一の微生物に由来すると考えられるコンティグを抽出してドラフトゲノムを再構築した。ドラフトゲノムに含まれる機能遺伝子は、Prokka ソフトウェアや KEGG BlastKOALA (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>) 等を活用してアノテーションを実施し、代謝経路の推定を実施した。

(3) PET 製造廃水のラボスケールリアクター処理実験

石化産業の重要な材料である PET は、高純度テレフタル酸 (PTA) とジメチルテレフタル酸 (DMT) を原料に製造される。両製造プロセスから排出される廃水を混合一括処理することを目的とする嫌気性ラボスケールリアクターを構築し、段階的に有機物濃度を上昇させて連続処理実験を行った。菌叢解析とショットガンメタゲノム解析は、3(1)と 3(2)にそれぞれ記載した方法により実施した。

4. 研究成果

(1) 実規模都市下水処理施設における流入負荷変動に対する菌叢の変化

解析の対象とした都市下水処理施設では、一部の最終沈殿池の運転停止に伴い、前段の活性汚泥反応タンクへの流入下水量を一時的に上昇し、その後、通常負荷に戻すという変則的な運転が実施された。その間、処理水質は概ね良好な状態を保ったが、通常負荷に戻した後にアンモニアの一時的な蓄積が観測された (図 2)。流入下水負荷上昇からの 2 ヶ月に渡り活性汚泥の微生物群

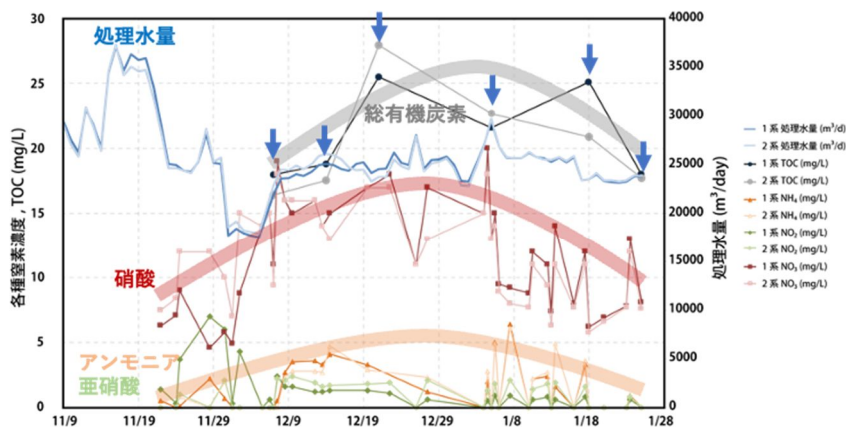


図2. 都市下水処理施設における流入負荷量と水質の変化

集構造を解析した結果、負荷上昇直後はアンモニア酸化細菌として知られるニトロソモナス属細菌の存在量が極めて低く、時間経過とともに存在量が回復する傾向にあった (図 3A)。存在量に基づくネットワーク解析を実施したところ、ニトロソモナス属細菌は粘液細菌群など多くの微生物と有意な相関関係を築いており、活性汚泥微生物ネットワークの中核微生物の一つで

あることが明らかとなった(図 3B)。本課題の成果は、「Effects of the Wastewater Flow Rate on Interactions between the Genus *Nitrosomonas* and Diverse Populations in an Activated Sludge Microbiome」と題した論文にとりまとめて国内発の国際誌において発表した (Narihiro T. et al., *Microbes Environments* 34(1):89-94, 2019.)

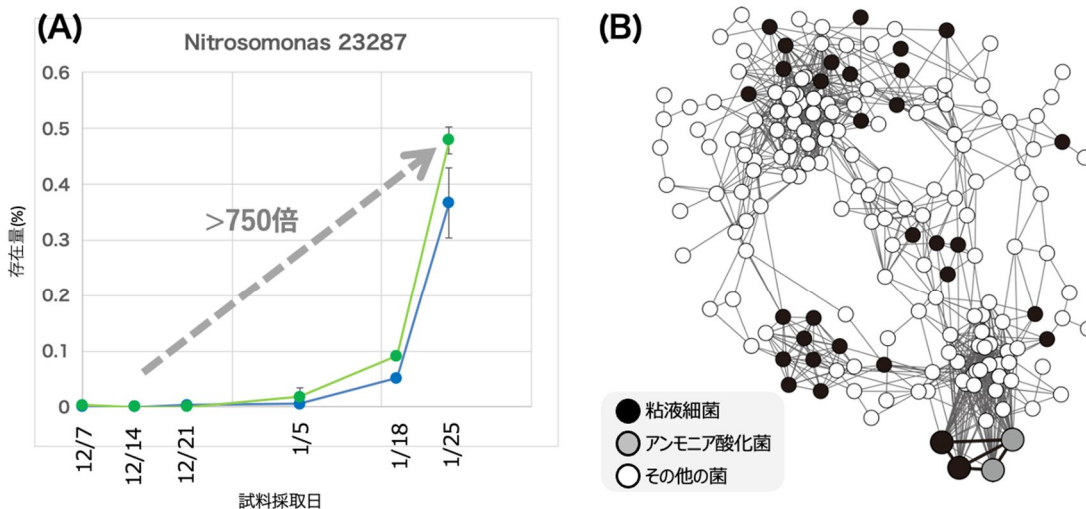


図3. アンモニア酸化菌*Nitrosomonas*属の存在量変化(A)とネットワーク解析(B)

(2) 食品系工場廃水のラボスケールリアクター処理実験

食品系工場廃水をモデル廃水としたラボスケールの嫌気性上昇流汚泥床リアクターから採取した汚泥を対象としたショットガンメタゲノムデータから、リアクター内で優占する 24 種の微生物由来のドラフトゲノムを回収し、それらの優占微生物群が有する代謝機能を解析した(図 4)。その結果、*Synergistota* 門や *Bacteroidota* 門に属する微生物が廃水に含まれる様々なアミノ酸の主たる分解者であることが明らかとなった。特に、*Bacteroidota* 門に属する未培養微生物群クレードに属する微生物のドラフトゲノムからは、好気性細菌が有するチロシン分解酵素群に類縁の酵素遺伝子が見出され、リアクター内部の極微量な酸素を利用しながら廃水中のチロシンを分解していることが示唆された。

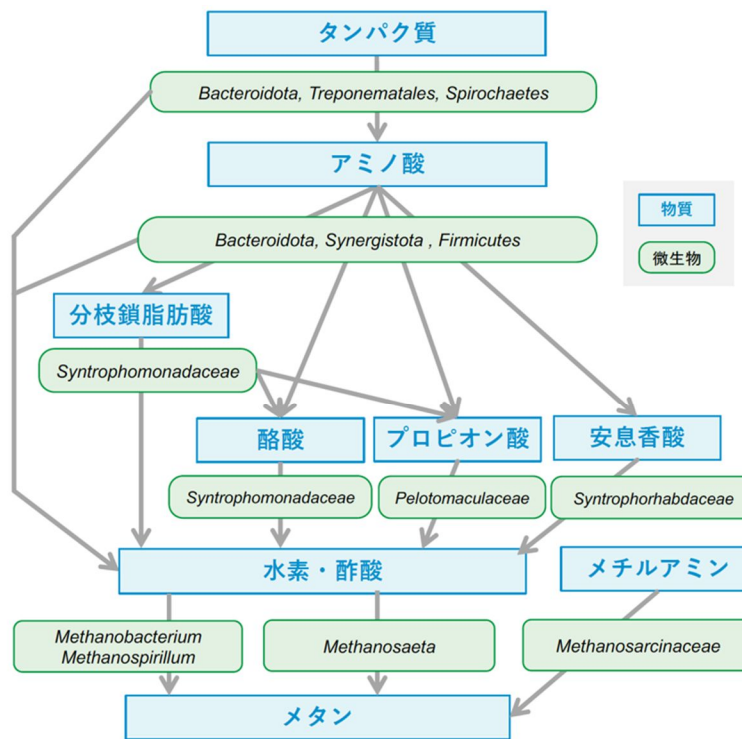


図4. 食品系工場廃水処理リアクターにおける有機物分解フローの概要

また、アミノ酸の分解から生じる揮発性脂肪酸のメタンへの分解は、*Syntrophomonadaceae* 科や *Pelotomaculaceae* 科に属する嫌気性細菌と、*Methanobacterium* 属といったメタン生成菌との協業によりなされていることが示された。さらに、*Solidesulfobivrio* 属に近縁の硫酸還元菌のドラフトゲノムからは窒素固定関連酵素が見出され、リアクター内で水素やアンモニアを供給することで他の嫌気性微生物群の生育や活性促進に寄与していることが示唆された。本課題の成果は、「Ecogenomics Reveals Microbial Metabolic Networks in a Psychrophilic Methanogenic Bioreactor Treating Soy Sauce Production Wastewater」と題した論文にとりまとめて国内発の国際誌において発表した (Narihiro T. et al., *Microbes Environments* 36(4):ME21045, 2021.)

(3) PET 製造廃水のラボスケールリアクター処理実験

本研究では、ラボスケールの嫌気性リアクターを用い、PTA 製造廃水と DMT 製造廃水の混合一括処理を実施し、段階的に廃水中の有機物濃度を上昇させて 500 日以上長期連続処理実験を実施した。その結果、廃水中の有機物を 90% 以上分解可能な運転処理条件を明らかにし、その分解速度は既報の PTA 製造廃水処理反応器の 1.2-4.4 倍を示した。DMT 製造廃水に含まれるギ酸が PTA 製造廃水に添加されることにより、ギ酸や水素を利用するメタン生成アーキアと、芳香族化合物の分解に関連しそうな嫌気性共生細菌の反応器内での存在量が増加し、PTA 製造廃水と DMT 製造廃水を混合することで効率的な一括処理が実現した。これら複合廃水に含まれる芳香族化合物の分解機構を解明するためショットガンメタゲノム解析を行った結果、ラボスケール嫌気性リアクター内において、廃水中に高濃度で存在するテレフタル酸、イソフタル酸、オルソフタル酸などの芳香族化合物を分解する微生物群を推定した。そのうち、特に *Syntrophorhabdus* 属に近縁の微生物は、これまで嫌気条件における微生物分解メカニズムが不明であったオルソフタル酸を分解する新しい代謝経路をもつことが示唆された (図 5)。本課題の成果は、「High-rate cotreatment of purified terephthalate and dimethyl terephthalate manufacturing wastewater by a mesophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor and the microbial ecology relevant to aromatic compound degradation」と題した論文にとりまとめて水環境工学分野のトップ国際誌において発表した (Kuroda K., Narihiro T. (共同責任著者) et al., Water Research doi: 10.1016/j.watres.2022.118581.2022)。

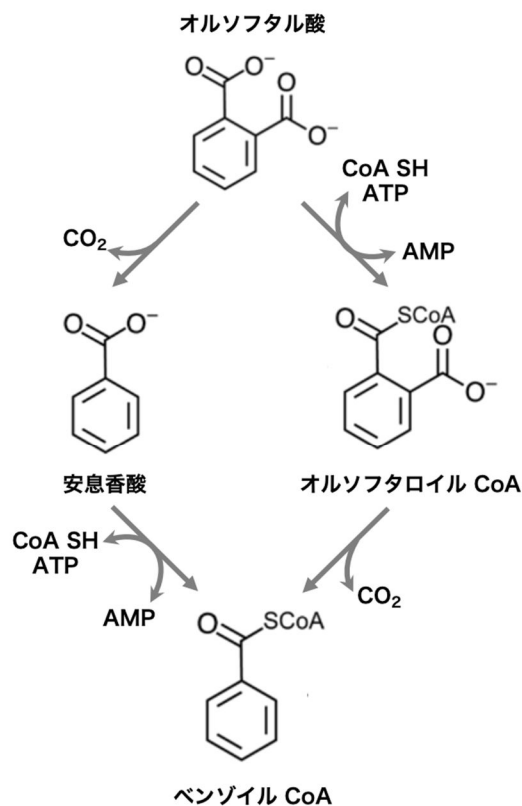


図 5 *Syntrophorhabdus* 属細菌のメタゲノム解析に基づくオルソフタル酸分解経路の推定

(4) まとめと今後の展望

本研究の成果から、廃水処理プロセスにおける制御因子の発見に繋がる重要な知見を得た。廃水の流入負荷量の変動が、窒素除去の要であるアンモニア細菌の存在量に大きな影響を与え、その回復にはさまざまな微生物との相互作用が働いていることが示唆された。また、高濃度有機性産業廃水の処理によく用いられている嫌気性リアクターにおいて、特定の微生物群が微量の酸素を利用してアミノ酸の分解を進行させていることが明らかとなった。さらに、プラスチックの原料である PTA/DMT 製造プロセスから排出される廃水を混合処理することが、微生物群によるメタン発酵反応に好影響を与えることが示された。これらの結果から、流入負荷量の調整、酸素濃度の調整、複数廃水の混合、といった要因が廃水処理の高度化の鍵を握ることが示唆された。今後、オミクス解析から見出された廃水処理における鍵代謝機能情報と、廃水の水質や運転パラメータとを、相関分析や機械学習といったデータサイエンス解析により統合的に解析することで、個々の廃水、あるいは個々の廃水処理プロセスにおける最適な運転制御条件を見出すためのデータ処理スキームを確立することを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kyohei Kuroda, Takashi Narihiro, Futaba Shinshima, Mio Yoshida, Haruka Yamaguchi, Hazuki Kurashita, Nozomi Nakahara, Masaru K Nobu, Taro Q P Noguchi, Masahito Yamauchi, Masayoshi Yamada	4. 巻 219
2. 論文標題 High-rate cotreatment of purified terephthalate and dimethyl terephthalate manufacturing wastewater by a mesophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor and the microbial ecology relevant to aromatic compound degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 118581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.watres.2022.118581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kuroda Kyohei, Narihiro Takashi, Nobu Masaru K., Toba Atsushi, Yamauchi Masahito, Yamada Masayoshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Ecogenomics Reveals Microbial Metabolic Networks in a Psychrophilic Methanogenic Bioreactor Treating Soy Sauce Production Wastewater	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME21045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wang Hui-Zhong, Lv Xiao-Meng, Yi Yue, Zheng Dan, Gou Min, Nie Yong, Hu Bing, Nobu Masaru K., Narihiro Takashi, Tang Yue-Qin	4. 巻 9
2. 論文標題 Using DNA-based stable isotope probing to reveal novel propionate- and acetate-oxidizing bacteria in propionate-fed mesophilic anaerobic chemostats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53849-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Narihiro Takashi, Nobu Masaru Konishi, Hori Tomoyuki, Aoyagi Tomo, Sato Yuya, Inaba Tomohiro, Aizawa Hidenobu, Tamaki Hideyuki, Habe Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of the Wastewater Flow Rate on Interactions between the Genus <i>Nitrosomonas</i> and Diverse Populations in an Activated Sludge Microbiome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 89 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME18108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 前田 稜太, 野口 太郎, 成廣 隆, 黒田 恭平
2. 発表標題 PET製造廃水処理UASB反応槽内保持汚泥に優占する門レベル未培養系統群の機能解明の試み
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成廣 隆
2. 発表標題 廃水処理の微生物生態から見えてくるもの
3. 学会等名 第34回日本微生物生態学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成廣 隆
2. 発表標題 Simplify and understand the wastewater treatment microbiome
3. 学会等名 The 9th Microbial Ecology & Water Engineering Specialist Conference, International Water Association (IWA) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新島二葉, 吉田実桜, 山口 陽香, 蔵下はづき, 中原 望, NOBU MASARU KONISHI, 成廣 隆, 野口太郎, 山田真義, 山内正仁, 黒田 恭平
2. 発表標題 高負荷PET製造廃水処理UASBリアクター内保持汚泥のマイクロバイオーーム解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成廣隆
2. 発表標題 汚泥マイクロバイーム解析による廃水処理技術高度化への研究展開
3. 学会等名 TIRIクロスミーティング2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田実桜、山口陽香、蔵下はづき、黒田恭平、成廣 隆、NOBU MASARU KONISHI、山田真義
2. 発表標題 UASBリアクターによるPET製造複合模擬廃水の高負荷連続処理実験
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成廣隆, Masaru K. Nobu, 黒田恭平, 山田真義
2. 発表標題 廃水処理微生物の群集構造やメタゲノムデータに何を語らせよう？
3. 学会等名 水環境学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成廣隆
2. 発表標題 汚泥マイクロバイームの世界を解き明かす
3. 学会等名 BioJapan2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口陽香, 蔵下はづき, 延優, 成廣隆, 山田真義, 黒田恭平
2. 発表標題 プラスチック製造過程における複合廃水を対象としたUASB 反応槽による連続処理実験
3. 学会等名 水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成廣隆
2. 発表標題 汚泥マイクロバイーム解析による廃水処理技術高度化への研究展開
3. 学会等名 産総研北海道センターワークショップ in 帯広 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Narihiro
2. 発表標題 Microbiome in Biological Wastewater Treatment Process.
3. 学会等名 The 2nd TISTR and AIST Mini Joint Symposium, Thailand (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	延 優 (Nobu Konishi Masaru) (40805644)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黒田 恭平 (Kuroda Kyohei) (50783213)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関