

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04299

研究課題名（和文）ファージと生理活性物質による標的糸状性細菌の特異的制御と活性汚泥の固液分離向上化

研究課題名（英文）Specific control of target filamentous bacteria and improvement of solid-liquid phase separation of activated sludge using phage and bioactive substances

研究代表者

新田見 匡（Nittami, Tadashi）

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：20377089

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

研究成果の概要（和文）：活性汚泥と処理水の固液分離において、慢性的な障害のある国内の下水処理施設を対象に、活性汚泥に優占する微生物の解析を行った。その結果、既知のKouleothrix属の糸状性細菌のほか、Bacteroidetes門のSaprospiraceae科、および同科に近縁な系統に属する新たな糸状性細菌を検出した。本研究では新規糸状性細菌の一部についてその系統を特定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性汚泥法は技術的に確立された廃水処理法として世界で広く普及している。しかし活性汚泥中の糸状性細菌の過剰な増殖によって生じる活性汚泥の固液分離障害は、未だ解決されない最大の運転障害の一つである。本研究では国内の施設における同障害の一因が、Bacteroidetes門の新たな糸状性細菌の優占にある可能性を示した。また同糸状性細菌の増殖を抑制できるバクテリオファージの存在を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed microorganisms dominant in activated sludge in a municipal wastewater treatment plant with chronic problem in the solid-liquid phase separation of activated sludge and treated water. In addition to existing filamentous bacteria, Kouleothrix, we detected new filamentous bacteria belonging to the family Saprospiraceae of the phylum Bacteroidetes and to a lineage closely related to the same family. In this study, we were able to identify the phylogeny of some of the new filamentous bacteria.

研究分野：環境生物化学工学

キーワード：用排水システム 生物環境プロセス 糸状性細菌 バクテリオファージ 生物活性物質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法は技術的に確立された廃水処理法として世界的に広く普及している。しかし活性汚泥中の糸状性細菌の過剰な増殖によって生じる活性汚泥の固液分離障害(沈降・圧密不良)は、未だ解決されない最大の運転障害の一つである。活性汚泥の固液分離障害は、放流水質の悪化、腐敗臭の発生などの維持管理上の問題、また病原性微生物の飛散・蔓延等の公衆衛生上の問題をもたらす。さらには反応槽内の活性汚泥濃度の低下とそれに伴う廃水処理性能の悪化、汚泥循環量の増大を招き、廃水処理施設の電力使用量を増大させる要因となっている。

糸状性細菌の増殖を抑制するため、これまで活性汚泥反応槽をブラックボックスとして扱う経験的な制御が行われてきた。しかし鍵となる糸状性細菌を把握せず、細菌群集全体を制御する非特異的な方法では、得られる効果に限界があった。廃水処理施設の固液分離障害を解決するには、障害を誘引する細菌種の把握とその特異的な制御方法の確立が必要である。

2. 研究の目的

糸状性細菌が活性汚泥フロック内部で増殖すると、フロックは隙間の多いゆるい構造となり、その膨化が誘引される。また糸状性細菌が活性汚泥フロックから伸張して増殖することにより、フロック間の凝集が妨げられる。活性汚泥に過度の膨化や凝集阻害が生じると、沈殿による固液分離に支障をきたすことが知られている。そこで本研究では、下水処理施設において活性汚泥の固液分離障害を誘引する糸状性細菌種について調査を進めるとともに、その増殖をファージや生理活性物質を利用して特異的に制御することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 活性汚泥試料の採取と微生物群集の分析

活性汚泥試料と DNA 抽出

慢性的な固液分離障害が発生している都市下水処理施設(1施設5系列)より、2~3週ごとに活性汚泥試料を1年間採取した。採取した活性汚泥試料は Tris-EDTA buffer (T₁₀E₁, pH 8.0) で洗浄した後、DNA の抽出に供するまで -20℃ で保存した。DNA の抽出は土壤等から DNA を抽出するためのキット (ISOIL for Beads Beating, ニッポンジーン, 東京) を用いて行った。また分光光度計 (NanoVue Plus, GE ヘルスケア・ジャパン, 東京) により、抽出した DNA の濃度を測定した。

アンプリコンシークエンシング

固液分離障害が顕著であった2つの系列の試料について、活性汚泥より抽出した DNA 試料に対し、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的としたアンプリコンシークエンシングを行った。アンプリコンシークエンシングにより各試料の細菌群集を調べ、試料中で優占する細菌の系統について把握した。一連の操作と解析は既報 (Nittami *et al.* 2020 (雑誌論文 2)) に従って行った。

(2) 糸状性細菌の分析

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

(1) で採取した活性汚泥試料を 4%(w/v)パラホルムアルデヒド、または 96%(v/v)エタノールにより固定し、FISH 分析に供するまで -20℃ で保存した。各種 FISH プローブを用いて FISH を行い、試料中に優占する細菌の形態と系統を把握した。FISH の操作は既報 (Nittami *et al.* 2020 (雑誌論文 2)) に従って行った。

FISH プローブのデザイン

(2) の FISH 分析で糸状性細菌が優占していることを確認した活性汚泥試料について、その DNA 試料より 16S rRNA 遺伝子 (約 1,500 bp) を PCR で増幅し、クローニングに供した。得られたクローンの塩基配列を解読し、ARB によりクローンの塩基配列を有する細菌を標的とした FISH プローブをデザインした。

(3) ファージの分離

(1) で採取した活性汚泥試料を遠心分離、および膜ろ過に供して懸濁物質を取り除き、ファージ混合液を調製した。調製したファージ混合液をカルチャーコレクションより購入した糸状性細菌の分離培養株と共培養した。共培養は各糸状性細菌に適した条件で、液体培地または寒天培地を使用して行った。

4. 研究成果

(1) 都市下水処理施設の微生物群集

アンプリコンシークエンシングの結果、固液分離障害が顕著であった2つの系列の活性汚泥の細菌叢を種レベルで解析した場合、いずれも Bacteroidetes 門 Saprospiraceae 科の細菌種と Chloroflexi 門 *Kouleothrix* 属の細菌種が優占していることが分かった。

(2) 固液分離障害を誘引する新たな糸状性細菌

固液分離障害が顕著であった2つの系列の活性汚泥試料について、Saprospiraceae科などの細菌群を染色する既存のプロープ CFB719 を用いて FISH 分析を行った。CFB719 を使った FISH 観察の結果、Eikelboom type 1863、および *Haliscomenobacter hydrossis* に類似した形態の糸状性細菌が、活性汚泥中に優占しているのを確認した(図1)。type 1863 はこれまで活性汚泥の固液分離障害と関係のない糸状性細菌だと考えられてきた。そのため固液分離障害との関係が明らかになれば重要な知見となる。またバクテロイデス門の type 1863 については報告例が少なく、特異的な FISH プロープはデザインされていなかった。一方、*H. hydrossis* については固液分離障害との関係が報告されており、特異的な FISH プロープ HHY-654 および HHY-T5 が既報においてデザインされていた。しかしそれら既存のプロープでは、CFB719 で検出した *H. hydrossis* 形態の細菌(図1b)の多くは染色されなかった。そのため今回検出した同糸状性細菌の多くは、これまでに報告されていない系統に属するものであると考えた。

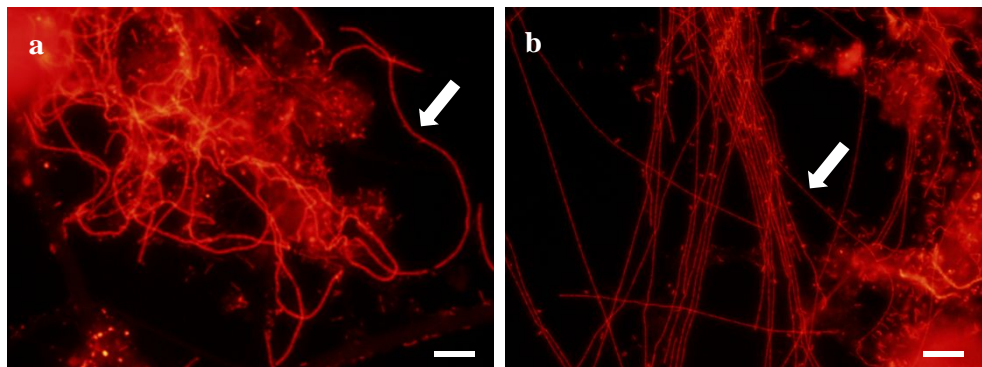


図1 CFB719 プロープを用いた活性汚泥の FISH 画像。a) type 1863 形態の糸状性細菌(新田見ら, 2020(学会発表2の講演要旨)より転載) b) *H. hydrossis* 形態の糸状性細菌。図中の矢印は各形態の糸状性細菌を指している。各スケールバーのサイズは 10 μm 。

FISH 分析で type 1863 形態、および *H. hydrossis* 形態を示す糸状性細菌が優占していた活性汚泥試料について、その 16S rRNA 遺伝子(約 1,500 bp)のクローン解析を行った。得られたクローンの塩基配列情報をもとに、それらに近縁な系統を標的とした FISH プロープをデザインし、同プロープを使った FISH 分析を行った。その結果、デザインした新たなプロープで各形態の糸状性細菌を検出することができた(図2)。しかしいずれの形態の細菌も、CFB719 で検出されるものの一部のみが新たなプロープで検出されることが分かった。したがって両形態の糸状性細菌は、今回デザインしたプロープの標的よりも広範な系統に属することが予想された。

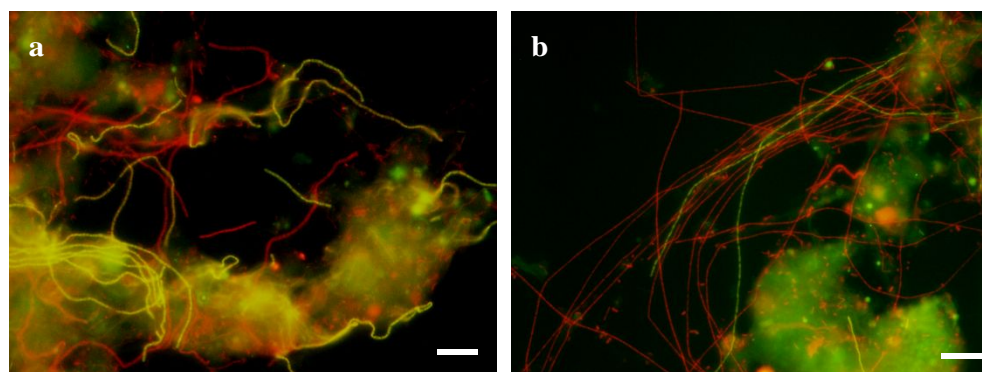


図2 新規プロープ(Fluos(緑))と CFB719(Cy3(赤))を使った FISH 画像。黄色は緑と赤の染色の重複を表す。a) type 1863 形態の糸状性細菌(新田見ら, 2020(学会発表2の講演要旨)より転載) b) *H. hydrossis* 形態の糸状性細菌。各スケールバーのサイズは 10 μm 。

(3) 糸状性細菌を宿主とするファージ

分離培養された *Kouleothrix* 属の細菌5株と *H. hydrossis* 1株をカルチャーコレクションより入手し、下水処理施設の活性汚泥試料より調製したファージ混合液との共培養を行った。その結果 *H. hydrossis* については、寒天培地での培養において、プラークが形成された。これはファージを使って *H. hydrossis* を溶菌し、*H. hydrossis* の増殖を制御できる可能性を示唆するものであった。しかし検出したプラークよりファージを分離することはできず、残念ながらファージの特定には至らなかった。

上記のとおり、本研究では当初の研究計画で想定していなかった Saprospiraceae 科などに属する新たな糸状性細菌を多数検出した。活性汚泥中における同科とその近縁の系統に属す細菌群の高い存在割合を考えると、本研究で検出した以外にも未知の糸状性細菌が多数存在する可能性がある。そのためそれら新規の糸状性細菌を特定し、既知の糸状性細菌とともに制御しなければ、活性汚泥の固液分離障害を解決できないとの考えに至った。そこでまずはこの Saprospiraceae 科などに属す新規糸状性細菌の全容解明に優先して取り組むため、当初の研究計画を変更し、新たな研究課題を開始することとした。本研究課題において目的としながら実施できなかった「生理活性物質を利用した糸状性細菌の特異的制御」については、新たな研究課題において実施したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Nittami T., Batinovic S. | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 Recent advances in understanding the ecology of the filamentous bacteria responsible for activated sludge bulking | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology | 6. 最初と最後の頁 759 ~ 775 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.13634 | 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 Nittami Tadashi, Kasakura Risa, Kobayashi Toshimasa, Suzuki Kota, Koshiba Yusuke, Fukuda Junji, Takeda Minoru, Tobino Tomohiro, Kurisu Futoshi, Rice Daniel, Petrovski Steve, Seviour Robert J. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Exploring the operating factors controlling Kouleothrix (type 1851), the dominant filamentous bacterial population, in a full-scale A20 plant | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 6809 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63534-2 | 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 |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤愛、大石将和、武田稯、新田見匡、金田一智規、飛野智宏、栗栖太 |
| 2. 発表標題 バルキング活性汚泥に優占するバクテロイデス門の新たな糸状性細菌の解析 |
| 3. 学会等名 第56 回日本水環境学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新田見匡、甲田柁紀、加藤愛、武田稯、金田一智規、飛野智宏、栗栖太 |
| 2. 発表標題 バルキング活性汚泥に優占するtype 1863糸状性細菌に特異的なFISHプローブの開発 |
| 3. 学会等名 第55 回日本水環境学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nittani T, Rice D, Suzuki K, Takeda M, Tobino T, Kurisu F, Petrovski S, Seviour R J |
| 2. 発表標題 Correlation between Dominant Filament Kouleothrix (type 1851), the Settleability of Activated Sludge Biomass, and Other Operating Factors in a Domestic A2O Plant in Japan |
| 3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference (MEWE 2019) (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 | 栗栖 太 (Kurisu Futoshi) (30312979) | 東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授 (12601) | |
| 研究分担者 | 飛野 智宏 (Tobino Tomohiro) (90624916) | 東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師 (12601) | |

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 | | |
|---------|---------|--|--|
| オーストラリア | ラトローブ大学 | | |