

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18827

研究課題名（和文）真核・原核微生物の包括的マイクロバイーム解析による水処理生態系設計への挑戦

研究課題名（英文）Comprehensive microbiome analysis of eukaryotic and prokaryotic microorganisms to challenge the design of water treatment ecosystems

研究代表者

幡本 将史（Hatamoto, Masashi）

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20524185

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、廃水処理プロセス中に存在する全ての微生物群の構造と機能を理解するために、原核生物（細菌・アーキア）、原生動物、真菌類（カビ類）などの異なる微生物群に焦点を当て、統合的な解析を行った。活性汚泥を用いて、微生物群集のサイズ分画に基づく解析手法を開発し、フィルター分画による前処理を通じて微生物群集を詳細に解析した。その結果、今まで行われていた全ての微生物をまとめてDNA抽出して解析する手法が微生物群全体を正確に反映していない可能性が明らかとなり、生物処理プロセスの理解と技術的改善のための新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、廃水処理プロセスにおける微生物群集の解析を通じて、原核生物、原生動物、真菌類の関係を明らかにすることで、水処理生態系の総合的な挑戦した。サイズ分画を用いた解析手法の開発により、微小な未培養微生物や特有の生物群を詳細に調査することが可能となり、廃水処理技術の効率化に貢献する可能性がある。本研究成果は、他の複合微生物を用いたシステムにも応用可能であり、生物プロセスの技術向上に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the structure and function of microbial communities within the wastewater treatment process, this study emphasized the comprehensive analysis of diverse microbial groups, including prokaryotes (bacteria and archaea), protozoa, and fungi. Utilizing activated sludge systems, we developed an analytical methodology based on the size fractionation of microbial communities. Through the application of filter fractionation as a pretreatment step, our investigations revealed intricate details of microbial diversity and functionality. The results demonstrated that traditional DNA extraction and analysis methodologies, which analyzed all microorganisms together, may fail to accurately depict the entire microbial consortium. This discovery advances our understanding of biological treatment processes and paves the way for technological enhancements in this field.

研究分野：環境工学、土木環境システム

キーワード：活性汚泥 原生動物 MBR 膜 フィルター 18S rRNA 16S rRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物学的廃水処理においては原核生物(細菌・アーキア)のみならず原生動物や後生動物、カビなどの真菌類も重要な役割を担っている。これらのうち細胞サイズが比較的大きい微生物は光学顕微鏡で識別可能であるため、古くから研究例が多くあり運転指標に用いるなど情報は蓄積されている。一方、細菌・アーキアに対しては、視覚的には判別できないことから、分子生物学的手法が発達し、近年では rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析などで膨大なデータが収集されている。

これまでに、廃水処理プロセス中の原生動物や後生動物について、顕微鏡観察と分子生物学的解析手法の結果で明らかな差異がある事が報告されている。また、一般的に汚泥中の細菌を対象とした DNA 解析に用いる遠心分離などの前処理手法では原生動物などの形態を維持できず、顕微鏡観察で見過ごされる事がある。さらに、汚泥中の原生動物群を効率良く解析できるアンプリコンシーケンス解析手法が無い事など、廃水処理プロセス中の真核生物については古くから研究されているが故の問題点がある。

近年では、アメーバ様の原生動物に共生していると報告されている未培養細菌が膜分離活性汚泥法の膜の目詰まりの要因の一つである可能性が指摘されているほか、カビの菌糸様の生物や原生動物様の生物が膜面バイオフィームの一端を形成する様子が報告されており、原生動物や真菌類を網羅的に効率良く分析可能な手法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では、原核生物(細菌・アーキア)、原生動物や真菌(カビ類)など、これまで個別に解析されていた微生物群集の解析を統合的に実施することで、細菌・アーキア・原生動物・真菌の関係性の理解を目指す。特に、真核生物と原核生物とでは細胞サイズの違いがあり、単純な比較が難しいと考え、本研究では、サイズ分画による前処理法を適用し、活性汚泥中の微生物の解析を行う手法の開発を行った。これまでの研究蓄積がある廃水処理プロセスをモデルに本解析技術を適用し、水処理生態系の原核生物のみならず原生動物・真菌の関係を明らかにし、処理プロセスの機能向上に向けた端緒とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 解析対象とした下水処理システム

分流方式の都市下水処理場に膜分離活性汚泥法(MBR)の試験装置を設置し実験を行った。流入水はスクリーン通過後の下水を用い、簡易式の沈殿槽による処理後に実験に用いた。MBRは有効容積6Lの無酸素槽と曝気槽(膜槽)で構成した。実験には、平均孔径0.2 $\mu$ mの塩素化ポリエチレン製平膜を用いた。リアクターの運転は、定流量吸引ろ過方式を採用し、9分間膜ろ過、1分間停止というサイクルで間欠ろ過を行った。安定運転時の汚泥濃度はMLSSで12000mg/L前後に調整し、HRTは6時間とした。

原生動物を増加させるため、MBRにメッシュ担体(Fuchigami et al., 2021)を組み合わせたMBRリアクターの運転を行った。メッシュ担体は直径15cm、厚さ5cmの塩化ビニリデン合成繊維(空隙率96%)とし、メッシュ担体高さ40%を無酸素槽に浸漬させた。3つのメッシュ担体を無酸素槽に並列に設置し、回転速度は5rpmとした。水学的滞留時間は5.5時間に設定し、MLSS濃度が12000-13000mg/Lを維持できるように適宜汚泥の引き抜きを行った。

#### (2) 分析方法

活性汚泥および膜ファウリング発生時の膜面バイオフィームサンプル、メッシュ担体に付着している汚泥を採取した。汚泥は、そのまま遠心分離で集菌しDNA抽出に用いるものと、前処理として、適切な濃度に調整した汚泥を孔径200, 50, 30, 5 $\mu$ mのナイロン製フィルター(PluriSelect, Pluri Strainer)でろ過したサンプルとフィルター上に保持されたサンプルをそれぞれ回収して解析に用いた。さらに、微小細菌の解析のため孔径0.10 $\mu$ m, 0.22 $\mu$ m, 0.45 $\mu$ mの膜でろ過したサンプルも作成し解析を行った。

汚泥からのDNA抽出はFast DNA SPIN Kit for Soilを用いてビーズビーディング法により行った。得られたDNA産物に対して16Sおよび18S rRNA遺伝子を対象としたプライマーペアを用いてPCR増幅を行い、次世代シーケンサー(Illumina iSeq100, Miseq)によりシーケンス解析をおこなった。

また後生動物については、活性汚泥中に頻繁に出現するOligochaetes, Nematodes, testate amoeba及びRotiferの数を光学顕微鏡(10倍 $\times$ 10倍)で計測し、遺伝子解析との結果の比較を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) フィルターによる汚泥分画

廃水処理関連ではサイズ分画による前処理と微生物解析は実施されていないため、湖や海洋サンプルの場合picoplankton, nanoplankton, microplankton、それ以上の多細胞生物という分類で

解析を行う事があるのを参考に、廃水処理関連でのサイズ分画のフィルター候補を決めた。また、これまでにバクテリアの微生物群集解析の実績があるラボスケール下水処理試験装置の汚泥を対象に、各種フィルターによりサイズ分画を行い細胞を回収した。このとき、通常の手法では用いないような大口径のフィルターを用いて分画を実施した。その結果、活性汚泥はフロックを形成しているため、かなり大口径のフィルターでもトラップされてしまうことや、希釈および、フロックの分解処理後にフィルター処理をすると細かい分画まで可能となった。Table 1 に汚泥のフィルター処理後の DNA 抽出結果の一例を示す。1 つのサンプルをフィルターサイズの大きい方から順にろ過した物を DNA 抽出に用いた。その結果、30  $\mu\text{m}$  および 5  $\mu\text{m}$  のフィルターには残留物がほとんど存在せず、汚泥の場合多くサンプルは 50  $\mu\text{m}$  以上のフロックや原生動物、またそれ以下の浮遊細菌に分けられることが判明した。

Table 1 フィルター処理後の汚泥サンプルの DNA 抽出結果

No.	Sample Name	DNA conc.(ng/ $\mu\text{L}$ )
1	<200 $\mu\text{m}$ filtrate	152.0
2	<200 $\mu\text{m}$	255.4
3	<50 $\mu\text{m}$ filtrate	158.2
4	<50 $\mu\text{m}$	47.2
5	<30 $\mu\text{m}$ filtrate	163.0
6	<5 $\mu\text{m}$ filtrate	10.3
7	Raw sludge	212.0

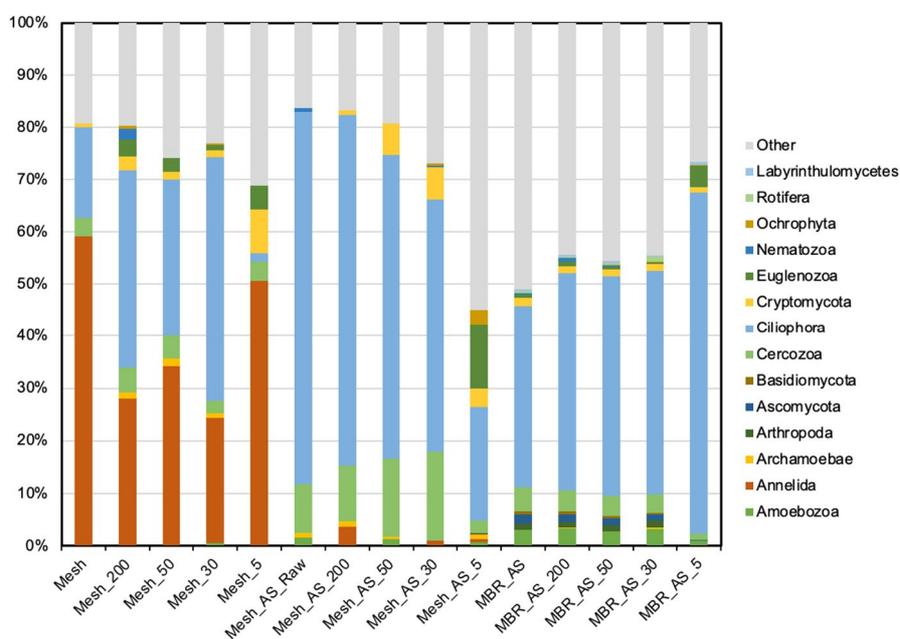


Fig.1 フィルター処理後の真核生物群集 (Mesh はメッシュ担体保持汚泥、AS は活性汚泥を示す。サンプル後の数字はフィルターの孔径を示す。)

メッシュ担体保持汚泥と MBR 活性汚泥の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいた真核生物群集解析結果を Fig.1 に示す。フィルター処理を行う事で、群集構造が変化することが確認できる。メッシュ担体保持汚泥では環形動物 Annelida と繊毛虫 Ciliophora が主要な構成生物であるが、その割合はフィルターのサイズにより大きく変化した。また、フィルターろ過を行わない、サンプルでは Euglenozoa が検出されなかったが、フィルターろ過を行う事で検出されるようになった。環形動物は体長の比較的大きな生物であり、メッシュ担体保持汚泥以外ではほとんど検出はされなかった。また、フィルター孔径の小さいサンプルからも検出されており、卵や幼生などの存在が考えられる。一方、活性汚泥サンプルについては、孔径の大きいフィルターろ過による影響はあまり見られず、今回使用した一番小さい 5  $\mu\text{m}$  のフィルターのろ液サンプルについてのみ、他のサンプルと生物群集構造が異なっていた。大型の後生動物である Rotifera(ワムシ類)は、10  $\mu\text{m}$  以上で多数検出されたが、5  $\mu\text{m}$  フィルターろ過サンプルでは検出されなくなった。一方、藻類の一種とされる光合成をしない従属栄養性生物は 5  $\mu\text{m}$  のフィルターろ過サンプルでのみ多数検出され、サイズによって検出できる種が変化していることが明確になった。その他にも 10  $\mu\text{m}$  のフィルターろ過までは検出できるグループと、5  $\mu\text{m}$  のフィルターろ過のサンプルで検出割合が増加するグループが存在しており、これらの結果から、活性汚泥では 10  $\mu\text{m}$  と 5  $\mu\text{m}$  がサイズ分画の一つの境目である可能性を見いだした。特に 5  $\mu\text{m}$  フィルターろ過処理サンプルでは藻類などが特異的に検出されており、細胞サイズの小さい生物が検出されたのか、細胞の断片などが混入したのかなどは今後検討が必要である。

メッシュ担体を導入した汚泥の解析結果では、顕微鏡観察結果と同様に環形動物 Annelida に分類される Oligochaetes が大量に検出された。一方で、顕微鏡観察では Rotifer に分離される

後生動物も観察されていたが、今回の 18S rRNA 遺伝子解析では、ほとんど検出がなかった。これらの実験結果から、現状では顕微鏡観察と遺伝子解析の併用が必要であると考えられる。なお、今回の 18S rRNA 解析では真菌類はなるべく検出されないプライマーセットを用いたが、用いるプライマーによっては、真菌類が多数検出されることも報告されており (Hirakara et al., 2019)、フィルターろ過とプライマーの組み合わせ、および顕微鏡観察の結果をそれぞれの検討が必要である。

## (2) フィルターによる汚泥分画を用いた原核生物解析

活性汚泥をフィルターで順にろ過したサンプルについて 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた解析結果を Fig.2 に示す。活性汚泥をそのまま解析したサンプルとフィルターろ過処理を行ったサンプルとでは微生物群集に大きな違いがあった。特に、活性汚泥サンプルでは Williamwhitmania と Paludibacter が約 3%、Arcobacter と Chryseobacterium が約 2% の割合で検出された。一方で、これら細菌はろ過後のサンプルでは、検出することができなかった。今回、汚泥の前処理として超音波

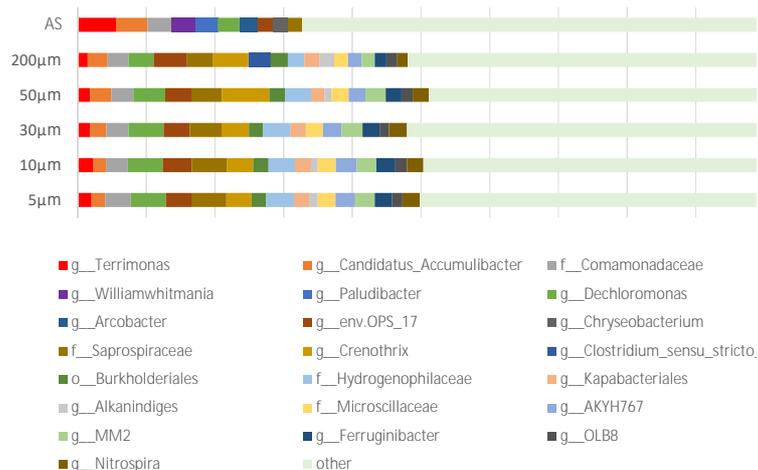


Fig.2 活性汚泥のフィルター処理後の微生物群集解析結果

分散などの処理は行わず、直接ろ過処理を行った。そのため、これら細菌は大きいフロック内部に存在する菌体であると考えられた。他の菌体は 200-5 µm のフィルターろ過においても菌体割合の変化が小さいため、フロックは形成しておらず浮遊している状態の菌体であると考えられる。特に、浮遊状態でのみ存在している菌体も確認できることから、全体の存在割合では少ないながらも特有な生育形態の微生物が存在している可能性が示された。

活性汚泥についてはさらに細かいフィルターでろ過処理を行い微生物群集解析を行った。その結果を Fig.3 に示す。0.2 µm のフィルターでろ過処理することで、微小細菌と考えられている Parcubacteria の検出率がろ過処理後におよそ 10 倍に高まることが分かった。また、Fluviicola 等も Parcubacteria と同様にフィルターろ過処理で検出割合が増加することが判明した。

本研究の結果、環形動物や線虫類など大型で個体数が他の原生動物と比較して少ない生物については、遺伝子解析と顕微鏡観察との差やフィルターろ過の再現性を得ることが困難な場合があった。これまでは、検鏡による分析で調査していた原生動物の群集解析について、フィルターを用いる事で微小サイズの種についても詳細に存在が調査できるようになった。また、原核生物についてもフィルターろ過を行う事で、微小細菌と呼ばれる未培養微生物群が検出される様になる事を明らかにした。以上の結果、本研究により、今まで行われていた全ての微生物をまとめて DNA 抽出して解析する手法が微生物群全体を正確に反映していない可能性が明らかになった。

### <引用文献>

- Fuchigami, S., Hatamoto, M., Takagi, R., Akashi, T., Watari, T., & Yamaguchi, T. (2021). Long-term treatment of municipal wastewater using a mesh rotating biological reactor and changes in the biofilm community. *Environmental Technology & Innovation*, 24, 102074.
- Hirakata, Y., Hatamoto, M., Oshiki, M., Watari, T., Kuroda, K., Araki, N., & Yamaguchi, T. (2019). Temporal variation of eukaryotic community structures in UASB reactor treating domestic sewage as revealed by 18S rRNA gene sequencing. *Scientific Reports*, 9(1), 12783.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三輪徹、幡本将史、滝本祐也、渡利高大、山口隆司
2. 発表標題 回転メッシュ担体の前段設置が膜分離活性汚泥法の処理性能及び汚泥性状に与える影響について
3. 学会等名 第26回 日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2023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	平片 悠河  (Hirakata Yuga)  (50887164)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員   (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
---------	---------