

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22925

研究課題名(和文) 遺伝子オントロジーによる活性汚泥の理解 ブラックボックスから生命システムとして

研究課題名(英文) Understanding of gene ontology of activated sludge

研究代表者

本多 了(Honda, Ryo)

金沢大学・地球社会基盤学系・准教授

研究者番号：40422456

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)：下水処理場から採取した活性汚泥にペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)およびペルフルオロオクタン酸(PFOA)それぞれを混入した培地をセミバッチ方式で投入し、汚泥の馴致試験を行った。馴致した汚泥にPFOSとPFOAを含む培地にそれぞれを投入してバッチ分解試験を行った。その結果、PFOAとPFOSで馴致した汚泥のいずれの場合もPFOAに対して分解性を示した。一方、PFOSに対しては、どちらの馴致汚泥においても分解性が見られなかった。対照試験としてオートクレーブを行った汚泥ではPFOAの減少はみられなかったことから、馴致していない元の汚泥にPFOA分解能をもつ微生物が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルフルオロアルキル化合物(PFAS)は微量でも強い毒性をもち、国内外で土壌や地下水・表流水にしばしば検出されて問題となっている。特に毒性と残存性の高いPFOSとPFOAは米国・日本国内でも水質環境基準設定され、汚染環境の浄化や水環境への拡散防止が急務である。しかし、PFASは非常に安定な化合物であり、通常の生物処理プロセスで分解除去することが困難である。本研究の成果は、PFASを含む廃棄物処分場や汚染土壌の浸出水・洗浄水の処理や、PFASを含む水道水源のRO膜による浄水処理後濃縮水のPFAS除去利用に適用でき、PFASによる水源汚染問題の解決につながる。

研究成果の概要(英文)：Return sludge from a local wastewater treatment was employed to be acclimatized with step-wise increase of PFOS or PFOA dose. The sludge culture was replaced every day with synthetic wastewater containing PFOS or PFOA, whose concentration increased in every 5 days up to 20 µg/L under aerobic condition. After 20-days of acclimatization, sludge acclimatized with each of PFOS and PFOA were inoculated for batch biodegradation experiment. With PFOS-acclimated sludge (PFOS-AS), PFOS was decomposed approximately 20% after 14 days of incubation. On the contrary, PFOA was highly tolerant because no biodegradation was observed with PFOA- nor PFOS-acclimated sludges.

研究分野：環境微生物学

キーワード：活性汚泥 トランスクリプトーム 難分解性物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

かつてはブラックボックスであった活性汚泥は、1990年代以降、16S rRNA 遺伝子による進化系統分類に基づいた微生物群集解析によって、どのような微生物種によって構成されているのか、その種構成が運転条件やプロセスによってどのように変化するのか、などが明らかにされてきた。しかし、これらの微生物がどのような代謝を行って、活性汚泥の機能が発揮されているかについては、ほぼ未解明である。

近年、遺伝子発現情報を代謝経路などの機能情報と結び付ける (= 遺伝子オントロジー) 解析のための生命システム情報データベースが充実してきており、腸内フローラや海洋環境などの複合微生物系における代謝発現に関する理解が進んでいる。同じく複合微生物系である活性汚泥の代謝に着目した機能の解明を行うための期は熟したと言える。

2. 研究の目的

本研究では、活性汚泥で知られている次の 2 つの現象について、それを引き起こす基本的な代謝メカニズムを明らかにすることを目的とした。

- (1) 有機物の細胞への取り込みから分解、フロック形成に至る代謝の変化
- (2) 汚泥微生物による難分解性物質の分解機構

3. 研究の方法

当初の研究目的(1)については、実験室規模リアクターによる人工下水の連続処理実験を行う予定であったが、新型コロナウイルス感染症の影響でリアクター実験が困難となったため、研究目的(2)の難分解性物質の分解について、バッチ培養試験を中心に行うこととした。対象の難分解性物質には、発がん性と催奇形性が知られているペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) およびペルフルオロオクタン酸 (PFOA) を選定した。

3. 1. 汚泥の馴致

下水処理場から採取した返送汚泥を種汚泥とし、人工下水による半回分方式の培養を行った。人工下水の組成は OECD (2010) に従って調製した。2~3 日ごとに汚泥培養液の一部を取り出して人工下水を投入して好気性条件下で培養した。汚泥は 3 槽に分けて培養し (a) PFOS による馴致、(b) PFOA による馴致、(c) PFOS/PFOA 添加なし (対照系) の 3 種類の培養汚泥を作成した。馴致は、人工下水中の PFOS または PFOA の投与量を 5 日ごとに 0、5、10、20 $\mu\text{g/L}$ と段階的に増加させて計 20 日間行った。

3. 2. PFOS/PFOA 生分解実験

PFOS および PFOA のそれぞれで馴化させた汚泥と馴化させていない汚泥を、Ramirez et al. に従って、20 mL の Kirk 液体培地に接種し、バッチ式生分解実験に利用した。また、汚泥への吸着や自己分解の影響を調べるためにオートクレーブによる滅菌処理した汚泥も同様の条件で試験した。20 $\mu\text{g/L}$ の PFOS と 20 $\mu\text{g/L}$ の PFOA の混合物を、ゴム栓とシールクリップを付けた 50 mL のガラスバイアルにスパイクし ($n=3$)、30 °C で振盪培養し、2~4 日ごとにヘッドスペースを周囲の空気と入れ替えて酸素を供給した。

各ガラスバイアル内の培養液を、6 時間後、1 日目、2 日目、7 日目、14 日目に採取し、13,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離して上澄み液とパレットを分離した。次に、使用したガラスバイアルとスラッジをリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、付着した PFOS および PFOA を回収した。その後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、付着した PFOS および PFOA を回収した。洗浄後、すべての液体サンプルを最終的に 40 mL に採取し、抽出まで 4 °C で保存した。

3. 3. PFOS および PFOA の分析

各液体試料には、同位体標識された 1 mg/L $^{13}\text{C}_4$ -PFOS および 1 mg/L $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 標準試料 50 μL をスパイクした。サンプル中の PFOS および PFOA は、Oasis WAX (150mg, 6cc) 固相抽出カラム (Waters, U.S.A.) による固相抽出により濃縮した。すなわち、0.1%のアンモニア/メタノール 4 mL、メタノール 4 mL、Milli Q 水 4 mL でカラムのコンディショニングを行った後、サンプルを 5 mL/min 以下の速度でカラムにロードし、4 mL の酢酸アンモニウム緩衝液で洗浄した。その後、カラムを真空下で 2 分間乾燥させ、4 mL のメタノールと 4 mL の 0.1%アンモニア/メタノールを用いて 15 mL の PP 製コニカルチューブに溶出した。溶出液を 40 °C の窒素気流下で蒸発乾燥させたものを 0.5 mL の 50%メタノールと Milli Q 水で再溶解したものを LC-MS/MS 分析に供した。

PFOS および PFOA の定量は、LC-MS/MS (Nexera X2 HPLC シリーズ, Sciex 3200 トリプル四重極型質量分析計, 島津製作所) を用いて行った。HPLC カラムには、Inertsil ODS-4 カラム (粒径 3 μm , 2.1 \times 100 mm, GL サイエンス) を用い、イオン化は ESI 方式、検出は多重反応モニタリングモードで測定した。サンプルから得られた抽出液 5 μL をオートサンプラーで注入し、移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム: アセトニトリル (1:1) 溶液を用い、流量は 0.2 mL/min に設定

した。

3.4. 微生物群集解析

微生物群集解析は、6時間培養後の培養液を用いて行った。培養液を13,000×gで5分間の遠心分離を行った沈渣から、ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo research, USA)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAについて16SrRNA遺伝子V3-V4領域を標的としてMiseqによるPair-endアンプリコンシーケンシング(2×300bp)を行った。得られたリードから、プライマー配列と品質の低い配列を除いた後、FLASH(ver. 1.2.11)によりペア配列を結合した配列について、Qiime2(ver 2020.8)のdada 2プラグインでキメラ配列とノイズ配列を除去した後、代表配列とOTU表を作成した。feature classifier プラグインを用いて、取得した代表配列をGreengene (ver 13.8)のOTUを比較し、97%相同性を基準として系統推定を行った。

4. 研究成果

4.1. PFOS, PFOAの生分解

滅菌汚泥、PFOS馴化汚泥(PFOS-AS)、PFOA馴化汚泥(PFOA-AS)で行ったPFOSとPFOA生分解実験の推移を図1に示す。PFOS-ASでは、培養2日後にPFOS濃度が10%程度まで徐々に低下し、14日後には20%程度まで上昇した。PFOA-AS条件では、初期には顕著な分解は見られなかったが、14日後には20%の分解に達することができた。さらに、活性汚泥条件でも14日後にはPFOS濃度が約35%減少した。この結果から、PFOSは低濃度であっても汚泥由来の微生物群集によって分解されることが示唆された。さらに、オートクレーブ汚泥の条件では、有意な減少は認められなかった。今回のバッチ式生分解試験で汚泥中にPFOSが吸収されなかったのは、コントロールを完全に滅菌したことが原因であると考えられる。このように、本研究での馴化汚泥を用いたPFOSの生分解は、先行研究(Dasu et al. 2012; Zhang et al. 2016; Benskin et al. 2013)と比較して、効率的であったことが示された。

一方、PFOAについては、いずれの条件でも、14日間の実験でPFOA濃度の有意な低下は見られなかった(図1b)。このことから、馴化汚泥中にPFOAを分解できる微生物が存在しなかったと考えられる。既往研究においてもPFOAはPFOSより分解が一般的に困難であることが知られており、本研究の結果は、廃水汚泥由来の微生物群において、PFOAを分解するのが非常に困難であることを裏付けた。

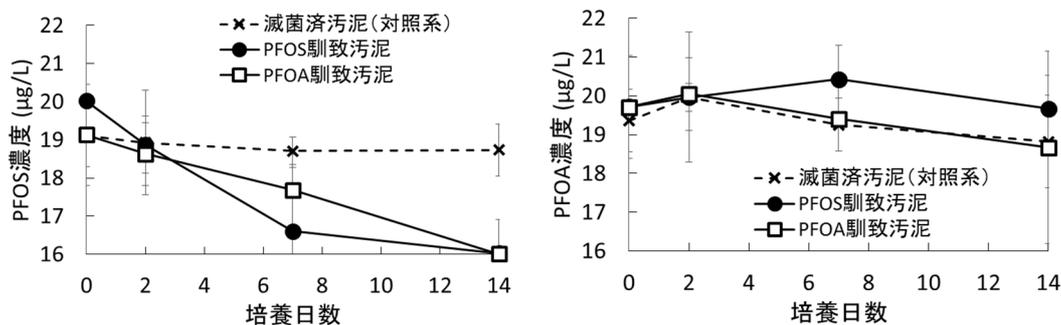


図1. 滅菌汚泥、PFOS馴化汚泥、PFOA馴化汚泥による(a)PFOSと(b)PFOAの生分解。

4.2. 馴化した汚泥の微生物群集

活性汚泥、PFOS馴化汚泥、PFOA馴化汚泥における*Arthrobacter*の相対的な存在率は、それぞれ約30%、45%、50%であった。本研究では、すべての種類の汚泥に*Arthrobacter*属が多く含まれていることから、PFOSの優れた分解に寄与する重要な微生物であると考えられる。*Arthrobacter*属は、飢餓状態、高張・低張状態、酸化ストレス、重金属ストレス、低温ストレスなど、様々な環境ストレスに適応できる微生物として知られている。また、*Arthrobacter*種は、トリアジン、有機リン、アルカロイド、ベンゼン、およびその誘導体を分解することができること報告されている(Guo et al. 2019)。

PCA分析の結果から、活性汚泥(AS)、PFOA馴化汚泥(PFOA_AS)、PFOS馴化汚泥(PFOS_AS)の微生物プロファイルが異なることが示された。各汚泥の差異において寄与率が大きい微生物種のリストを表1に示した。よく知られている汚染物質分解性の*Arthrobacter*属とPFOS生分解性の*Pseudomonas*属(Kwon et al. 2014)がどの汚泥試料においても優勢であった。

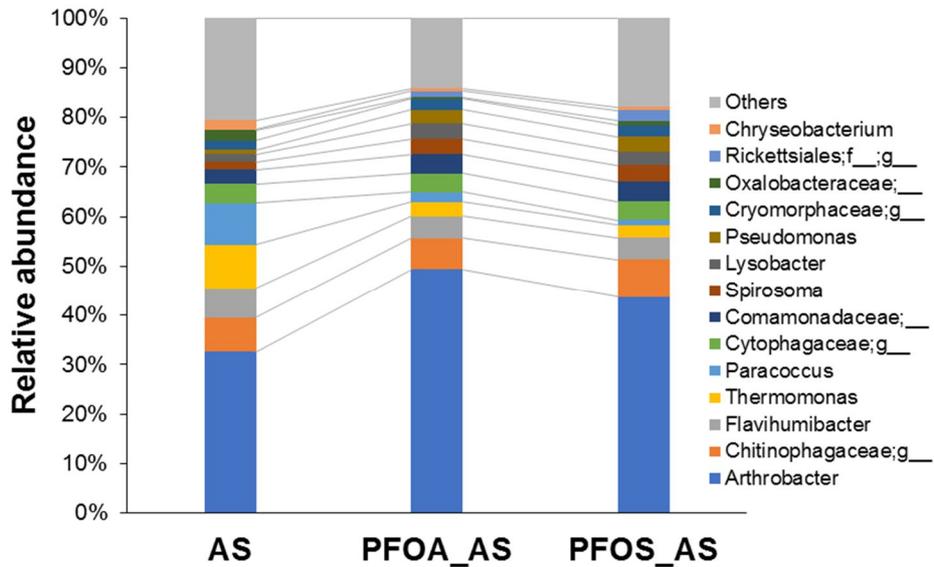


図2. 活性汚泥(AS)、PFOA 馴化汚泥(PFOA_AS)、PFOS 馴化汚泥(PFOS_AS)の微生物群集構造(続レベル)。3%未満のOTUは「Others」とした。

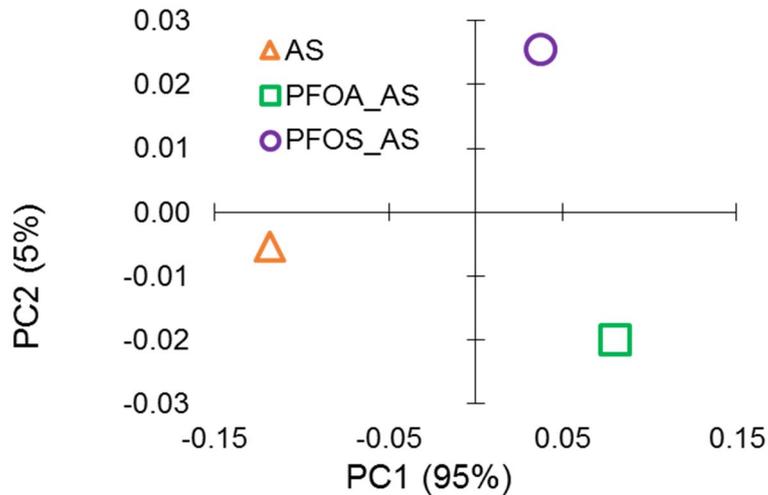


図3 主成分分析による活性汚泥(AS)、PFOA 馴化汚泥(PFOA_AS)、PFOS 馴化汚泥(PFOS_AS)の比較

表1. 主成分負荷量.

Phylum	Class	Family	Genus	PC1	PC2
Actinobacteria	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	0.085	-0.012
Proteobacteria	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.011	0.003
Bacteroidetes	<i>Cytophagia</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Spirosoma</i>	0.009	0.003
Bacteroidetes	<i>Saprospirae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	(Unclassified)	-0.001	0.007
Bacteroidetes	<i>Saprospirae</i>	<i>Chitinophagaceae</i>	<i>Sediminibacterium</i>	0.006	0.003
Proteobacteria	<i>Alphaproteobacteria</i>	(Unclassified)	(Unclassified)	0.007	0.006
Proteobacteria	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	(Unclassified)	0.006	0.001
Proteobacteria	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Janthinobacterium</i>	0.005	0.002
Proteobacteria	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Lysobacter</i>	0.008	0.000
Cumulative proportion:				95%	100%

新型コロナウイルス感染症の影響による実験中断により、連続処理リアクターによる代謝実験を行うことができなかったが、汚泥馴致により難分解性物質 PFOS と PFOA の分解能を持つ汚泥微生物の集積に成功した。研究の遅れにより期間内に解析を終えることができなかったが、バッチ培養試験において RNA-Seq のための試料採取は行っており、今後、馴致しなかった汚泥と馴致汚泥の遺伝子オントロジー解析を行い、代謝経路について明らかにするための足がかりを得た。

<引用文献>

- Benskin, J. P., Ikononou, M. G., Gobas, F. A. P. C., Begley, T. H., Woudneh, M. B., & Cosgrove, J. R., 2013. Biodegradation of N-ethyl perfluorooctane sulfonamide ethanol (EtFOSE) and EtFOSE-based phosphate diester (SAmPAP diester) in marine sediments. *Environmental Science and Technology*, 47(3), 1381-1389.
- Dasu, K., Liu, J., & Lee, L. S., 2012. Aerobic soil biodegradation of 8:2 fluorotelomer stearate monoester. *Environmental Science and Technology*, 46(7), 3831-3836.
- Guo, X., Xie, C., Wang, L., Li, Q., Wang, Y., 2019. Biodegradation of persistent environmental pollutants by *Arthrobacter* sp. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(9), 8429-8443.
- Kwon, B. G., Lim, H. J., Na, S. H., Choi, B. I., Shin, D. S., & Chung, S. Y., 2014. Biodegradation of perfluorooctanesulfonate (PFOS) as an emerging contaminant. *Chemosphere*, 109, 221-225.
- OECD, 2010. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Technical Report 209). Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation. Guideline 16.
- Ramírez, D. A., Muñoz, S.V., Atehortua, L., Michel, F. C., Jr., 2010. Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. *Bioresource Technology*, 101 (23), 9213-9220.
- Zhang, S., Lu, X., Wang, N., & Buck, R. C., 2016. Biotransformation potential of 6:2 fluorotelomer sulfonate (6:2 FTSA) in aerobic and anaerobic sediment. *Chemosphere*, 154, 224-230.

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 1件）

1. 発表者名 Sorn Sovannlaksmy, Hiroe Hara-Yamamura, Ryo Honda
2. 発表標題 Biodegradation of PFOS and PFOA using acclimated sludge.
3. 学会等名 The 13th AUN/SEED-Net Regional Conference on Chemical Engineering 2020 (国際学会)
4. 発表年 2021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	松浦 哲久 (Matsuura Norihisa) (90771585)	金沢大学・地球社会基盤学系・助教 (13301)	
研究分担者	原 宏江 (Hara Hiroe) (70823524)	金沢大学・地球社会基盤学系・助教 (13301)	

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
---------	---------