

EGSB リアクターの新たな嫌気性バルキングに関与する複数種の嫌気性バルキング原因菌の解明

豊橋技術科学大学 学生会員 ○原田淳、正会員 山田剛史

松江工業高等専門学校 学生会員 岡崎祐輝、正会員 山口剛士

産業技術総合研究所 非会員 成廣隆

住友重機械エンバイロメント株式会社 非会員 中野淳

1. はじめに

Expanded granular sludge bed (EGSB) リアクターは、Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) リアクターより高負荷運転に適しており、食品製造廃水を中心とした中・高濃度の有機性廃水を処理する中核的な技術となっている。しかしながら、EGSB リアクターの普及や適用廃水の拡大に伴い、安定的な運転に支障をきたす問題が、EGSB リアクターの立ち上げ時や、処理過程においてしばしば確認されている。それらの内、特に深刻な問題は、糸状性微生物の異常増殖によって、EGSB リアクター内部のグラニュール汚泥が突発的に浮上・流出する問題 (嫌気性バルキング) である。嫌気性バルキングが発生すると、設定した COD 容積負荷での運転が困難となり、EGSB リアクターの運転を停止しなければならない。廃水処理現場では、COD 容積負荷の操作や廃水処理システムの分割・統合により廃水成分の調整は可能であるが、嫌気性バルキングの発生メカニズムはおろかバルキング原因菌すら分かっていないため、即効性の高い対策が立てられずにいる。これまで、食品系有機性廃水を処理する実規模 EGSB リアクターの立ち上げ期間において、ある種の糸状性微生物の異常増殖による嫌気性バルキングが確認された。そこで本研究では、EGSB リアクターで発生する嫌気性バルキングの効果的な対策を確立するため、当該嫌気性バルキングに関与するバルキング原因微生物の解明と嫌気性バルキングの発生に関するバルキング原因微生物同士や他の微生物との相関を統計的に評価することを目的とした。

2. 実験方法

糖を主成分とする高濃度食品系有機性廃水を処理する実規模の中温 (37℃) EGSB リアクターより、嫌

気性バルキング汚泥と採取時期の異なる健全なグラニュール汚泥をそれぞれ採取した。汚泥の沈降性は、活性汚泥容量指標 (SVI) により評価した。それぞれの汚泥より DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を行った。塩基配列情報を基にした既存の分子系統群への帰属は、Quantitative Insights Into Microbial Ecology パイプライン¹⁾を用いて行った。バルキング原因菌に特異的な DNA プローブを設計するため、16S rRNA 遺伝子クローニング解析によって、バルキング原因菌の全 16S rRNA 遺伝子配列を決定した。バルキング原因菌の 16S rRNA に特異的な DNA プローブは、ARB プログラム²⁾を用いて設計した。設計した DNA プローブの親和性および特異性は、mathematical-fluorescence *in situ* hybridization (mathFISH) 法³⁾を用いて計算した後、計算された最適条件下において、バルキング原因菌の 16S rRNA 遺伝子を導入した大腸菌クローンを標的とした DNA-hybridization chain reaction-fluorescence *in situ* hybridization (HCR-FISH) 法⁴⁾を用いて実験的に評価

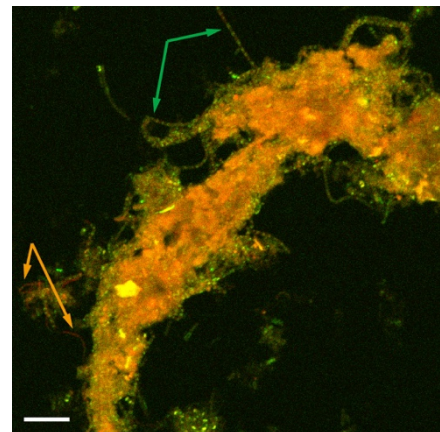


図1 バルキング原因菌に特異的な DNA プローブを用いた HCR-FISH 法を用いた嫌気性バルキング汚泥内のバクテロイデス門細菌 (緑) およびクロロフレキシ門細菌 (橙) の蛍光染色写真 (bar=10 μm)

キーワード EGSB リアクター、嫌気性バルキング、バクテロイデス門細菌、クロロフレキシ門細菌

連絡先 〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 TEL:0532-44-6925

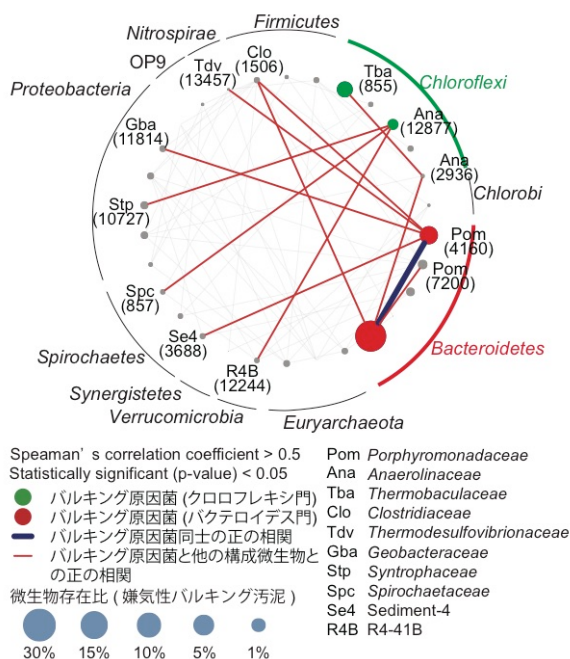


図2 嫌気性バルキング汚泥内に存在するバルキング原因菌同士やバルキング原因菌と他の微生物との相関関係

した。バルキング汚泥に存在するバクテロイデス門とクロロフレキシ門細菌の形態観察は、設計したDNAプローブを用いたHCR-FISH法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。バルキング原因菌同士やバルキング原因微生物以外の微生物との相関は、スピアマン順位相関係数を算出した後、Cytoscapeソフトウェア⁵⁾を用いて相関関係を図示した。

3. 実験結果・考察

嫌気性バルキング汚泥のSVIは、健全なグラニューール汚泥と比べて約3倍の値を示しており、嫌気性バルキング汚泥の沈降性の悪化が確認された。16S rRNA遺伝子アンプリコン解析の結果、嫌気性バルキング汚泥では、健全なグラニューール汚泥に対して、バクテロイデス門(2種)やクロロフレキシ門(2種)に属する未培養微生物の割合が、5~15%程度増加していた。当該未培養微生物の形態を明らかにするため、これらの微生物の16S rRNAに特異的なDNAプローブを設計した。設計した16S rRNAに特異的なDNAプローブを用いたHCR-FISH法は、バクテロイデス門とクロロフレキシ門に属する未培養微生物が糸状性であることを明らかにした(図1)。特に、バクテロイデス門のVadinHA17クラスターに属する糸状性細菌は、他のバクテロイデス門細菌やクロロフレキシ門細菌よりも高頻度に存在していた(図1)。こ

れらの結果は、バクテロイデス門のVadinHA17クラスターに属する糸状性細菌が主たるバルキング原因微生物であるが、他のバクテロイデス門やクロロフレキシ門に属する複数種の糸状性細菌も当該嫌気性バルキングに関与していることを示していた。

次に本研究では、バルキング原因菌同士や嫌気性バルキング汚泥内に存在する他の微生物との相関関係を統計的に評価した。スピアマンの順位相関係数を計算した後、微生物間の相関関係を評価した。その結果、バクテロイデス門に属する2種のバルキング原因菌の間には、強い正の相関があることがわかった。しかしながら、バクテロイデス門細菌とクロロフレキシ門細菌およびクロロフレキシ門細菌同士には、正の相関は確認されなかった。これらの統計解析結果は、バクテロイデス門細菌の異常増殖の要因は同一であるが、クロロフレキシ門細菌の異常増殖の要因とは異なることを示唆していた。

4. まとめ

本研究では、EGSBリアクターで発生した嫌気性バルキングに関して以下の2点を明らかにした。

- (1) 当該嫌気性バルキングには、バクテロイデス門やクロロフレキシ門に属する複数種の未培養糸状性細菌が関与していることを示した。
- (2) 複数種の微生物の異常増殖は、同一の要因よりむしろ、それぞれ異なる要因が関係していることが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、科研費基盤研究B(17H03333)および公益財団法人発酵研究所2017年度一般研究助成の助成を受けて実施致しました。ここに深謝致します。

参考文献

- 1) Caporaso, J. G. et al., Nature Methods 7, 335–336 (2010)
- 2) Ludiwig, W. et al., Nucleic Acids Res. 32(4): 1363–1371 (2004)
- 3) Yilmaz, L. S. et al., Environ. Microbiol. 77(3): 1118–1122 (2011)
- 4) Yamaguchi, T. et al., Environ. Microbiol. 17(7): 2532–2541 (2015)
- 5) Shannon, P. et al., Genome Res. 13: 2498–2504 (2003)