

実規模嫌気性消化槽のスタートアップ及び安定期における 経時的な微生物群集構造の解析

東北大学工学部 学生会員 ○島田祐輔

東北大学大学院工学研究科 学生会員 竹村泰幸

東北大学大学院工学研究科 正会員 久保田健吾

東北大学大学院工学研究科 正会員 李玉友

東北大学大学院工学研究科 正会員 原田秀樹

1. はじめに

近年、地域における環境の保全や循環社会の創造に加えて、地球規模で生じている温暖化への対策やエネルギー対策に大きく貢献する廃棄物系バイオマスのメタン発酵の技術が注目を集めている。下水汚泥のメタン発酵すなわち嫌気性消化槽内の有機物分解は、酸生成細菌、脂肪酸酸化細菌、メタン生成古細菌などの多様な微生物が関与するいくつもの中間代謝過程を経て行われていることがわかっている。

嫌気性消化槽内の微生物群集構造に関しては、これまでも様々な分子生物学的手法によるアプローチで研究が行われ、すでに本研究で対象とした嫌気性消化槽では酸生成細菌とされる *Eubacterium* や *Clostridium* であったり、メタン生成古細菌とされる *Methanolinea* や *Methanoculleus* 槽全体に優先する属であることが確認されるなどの知見が存在するが、その結果の多くが安定期にある消化槽の汚泥を解析したものである。また、一般に嫌気性処理プロセスはスタートアップに時間を要することが知られている。このスタートアップはHRTや負荷などのパラメーターによってコントロールされ、処理性能をモニタリングしながら設定負荷まで到達させることによって行われるが、その際の微生物群集構造の変遷については、ラボスケールにおけるリアクターの知見は豊富にあるものの、実規模消化槽に関するものは数少ない。一方で実規模消化槽のスタートアップにアクセス出来る機会はあまりない。

今回、我々は下水余剰汚泥を消化する中温実規模消化槽のスタートアップから定期的に汚泥を採取を実施する機会を得て、消化槽のスタートアップから安定期における微生物群集構造の変遷を把握することを試みた。

2. 実験方法

本研究で実規模の中温嫌気性消化槽から汚泥のサンプリングを行い、パイロシーケンシングを用いた解析を行うまでに踏んだステップを図1に示した。

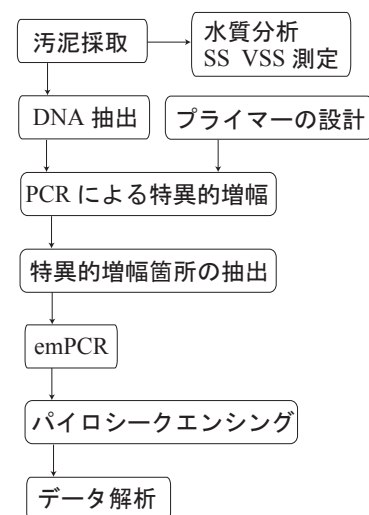


図1 本研究のフロー

2.1 汚泥の採取と水質分析

実規模中温嫌気性消化槽のスタートアップから約1年間、定期的に汚泥を採取した。サンプリング時には、汚泥の温度、pH、ORPを測定した。また採取した汚泥のSSおよびVSSを、濾液のTOC、T-N、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、T-P、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、VFAを測定した。消化槽の温度、発生ガス量、ガス組成、アルカリ度および汚泥投入量 (HRT) は処理場からデータを提供していただいた。

2.2 微生物群集構造解析

採取した汚泥は、PBSによる洗浄後、DNA抽出に供した。抽出にはNippon gene ISOIL for Beads Beatingを用いた。パイロシーケンサーを利用した16S rRNA遺伝子のアンプコンシーケンシングには、*Bacteria*と*Archaea*を標的とするユニバーサルプライマーの519Fm-mixと

806Rm-mixを用いることとした。プライマーは既報¹⁾をもとに、より多くの*Bacteria*と*Archaea*を網羅するように本研究で修正を加えたものである。この修正についてはRDP (Ribosomal Database Project) のProbe Matchとsilva release115データベースを用いて、既報プライマーのカバレッジを確認した。その結果、一部の門や嫌気性消化に重要役割を持つと考えられている*Anaerolineaceae*や*Propionibacteriaceae*らにミスマッチがあった。また*Archaea*についても一部網羅されていないグループが存在したため、それらを網羅できるようにプライマーを若干モディファイした (519Fm-mixと806Rm-mix)。

3. 実験結果及び考察

3.1 反応槽のモニタリング

本研究で対象とした中温嫌気性消化槽は、HRT 100日で運転を開始し、段階的に汚泥の投入量を増加させることでHRTを短縮させ、負荷を上げていった。汚泥の投入量に比例して消化ガスの発生量は増加し、その後HRT20日になったところで、消化ガス発生量が一時安定化した。しかしながら、その後pHが若干酸性側に傾き、消化ガスの発生量が減少するなどしたため、汚泥の投入量を減少させて槽内の調整を行った。HRTを30日にさせたところ、槽内pHも安定し、消化ガス発生量も安定したため、HRT 30日程度で維持されている。槽内の温度は立ち上げから38℃程度で維持されている。ガスの組成は常時CH₄:CO₂ = 60:40である。

SSは当初8g-SS/L程度だったが、リアクターが安定してから15g-SS/L程度を維持している。VSSも当初5g-VSS/L程度であったが、安定後は11g-VSS/L程度となった。VSS/SS比は0.75前後を維持している。濾液の水質分析の結果においてVFAは、スタートアップから安定期までガスクロマトグラフィの検出限界以下であったが、一度、槽内pHが低下した際に、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸が検出された。そこで微生物群集構造解析には、スタートアップ時および安定期の他、槽内pHが低下したときのサンプルを用いることとした。

3.2 パイロシーケンシング法を用いた解析

微生物群集構造解析には、パイロシーケンシング法によるアンプリコンシーケンスを行うこととした。図2に新たに作成したプライマー (修正後) が既報の515Fと806R (修正前) と比べて、TM7など7つの門における生物でプライマーの適応率が上昇したことを示した。これにタグシーケンスなどを付加したフュージョンプライ

マーにてPCRを行ったところ、特異的な増幅が確認された。さらに各サンプルにおける特異的増幅が必要濃度に到達するPCRサイクル数を決定した。図3にDNA抽出したサンプルに対し、決定したサイクル数でPCRを行い、標的となる360bp付近で特異的増幅が約1ng/μLに達した様子を示した。右の3つがサンプルと対応させた各々のフュージョンプライマーを混合し、左の3つはそれぞれのネガティブコントロールであり、サンプルの代わりに蒸留水を添加し、さらにサンプルより10サイクル多くPCRを行って増幅が起こっていないことが確認された。これにより、作成されたライブラリのPCRによるエラーはパイロシーケンシングの結果を解析したときに理論的に2¹⁰以下とすることができた。これを用いてパイロシーケンスによりスタートアップおよび安定期の微生物群集構造を解析する。

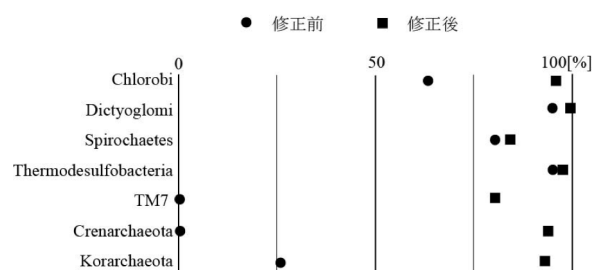


図2 RDPによるプライマーの検証

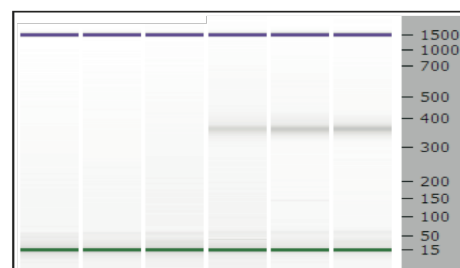


図3 Agilent 2100 Bioanalyzerによる特異的増幅の確認

4. 謝辞

本研究の実施にあたり、調査実施の承諾と運転管理データ提供等のご協力をいただいた処理場に感謝の意を示す。

参考文献

- 1) Caporaso *et al.*, The ISME Journal, 6, 1621–1624, 2012