

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：57601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07403

研究課題名(和文) 廃水処理における未解明現象「嫌気性バルキング」のメカニズム解明及び診断技術の創生

研究課題名(英文) Attempts at Elucidation of anaerobic bulking phenomenon for wastewater treatment and development of diagnostic technology of bulking-causative microorganisms

研究代表者

黒田 恭平 (Kuroda, Kyohei)

都城工業高等専門学校・物質工学科・助教

研究者番号：50783213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：フェノール模擬廃水を処理する中温嫌気性廃水処理反応槽内でグラニューール汚泥が肥大化・浮上した現象の解明とその診断技術の開発を試みた。環境ゲノム解析の結果、嫌気的フェノール分解に重要な微生物群の存在割合が著しく減少していることを確認した。また、元々優占していた未知アーキアの系統分類群の存在割合がバルキング現象発生時に著しく減少した。機能解析により、本アーキアは増殖に必要な栄養を他の微生物から獲得するアーキアであることが示唆された。天然鉱物である緑色凝灰岩を用いてバルキング抑制に向けた新規メタン発酵技術の開発を試みた結果、緑色凝灰岩添加によりメタン発酵を促進できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on sludge bulking occurred in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating phenol wastewater. In this study, to elucidate causative factors of the bulking, we performed metagenomic analysis of settling and floated granules. In addition, we attempted to develop methanogenesis facilitating technology using green tuff, which is porous and contains several conductive and essential minerals. Metagenomic analysis indicated that abundance of phenol, butyrate, and benzoate-degrading organisms and methanogens were suddenly decreased after bulking occurrence. Besides, abundance of predominant uncultured archaea in setting sludge were also decreased. By functional analysis, this archaea might have parasitic lifestyle in the UASB reactor. Using green tuff for development of methanogenesis facilitating technology, we confirmed that methane gas production rate was increased with the green tuff, suggesting that the material can be used to support methanogenesis.

研究分野：水環境微生物工学

キーワード：嫌気性廃水処理 グラニューール汚泥 バルキング現象 環境ゲノム解析 FISH法 メタン発酵促進

1. 研究開始当初の背景

上昇流嫌気性スラッジブランケット (UASB) 法は、多種多様な廃水に適用可能な優れた技術である。UASB 法の成功の鍵は、沈降性に優れた複合微生物群の凝集塊 (グラニュール汚泥) の安定的な保持であるが、グラニュール汚泥の沈降性の悪化に伴い槽外へ汚泥が流出する「バルキング現象」がしばしば問題となる。これまで、製糖工場廃水を処理する UASB 反応槽において糸状性細菌の増殖により引き起こされるバルキング現象が数例報告されているが、その発生メカニズムは未解明であり、抑制するための運転・管理技術の確立までには至っていない [1, 2]。このように、UASB 反応槽におけるバルキング問題を解決するための工学的・微生物学的研究は極めて限定的であり、様々な廃水種におけるバルキング原因微生物を対象とした研究が、廃水処理関連分野の新展開に向けた必須の課題である。

2. 研究の目的

このような背景の中、申請者らにより構築されたフェノール含有廃水を処理する UASB 反応槽において、沈降性の優れた通常のグラニュール汚泥 (以下、沈降汚泥) の平均的サイズ (直径 1-2 mm) の 10 倍以上にもなる凝集塊 (以下、浮上汚泥) が形成され、汚泥が反応槽内で浮上する現象が確認された。浮上汚泥は、沈降汚泥では見られないゼリー状の柔らかい汚泥性状を持っているため、沈降汚泥中の微生物が何らかの要因でゼリー状の物質を大量に産生し、浮上汚泥を形成することが推察された。本研究課題では、最先端のオミクス解析技術を適用し、フェノール含有廃水処理 UASB 反応槽で発生したバルキングに関与する微生物群を特定し、浮上汚泥形成に関与する原因物質とその産生を担う代謝経路を明らかにすることで、バルキング現象の発生メカニズムの包括的な解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 試料採取の採取

本研究では、液容積 10L の UASB 反応槽とスポンジ容積 44 L の下降流懸垂型スポンジ (DHS) 反応槽からなるフェノール廃水を処理する UASB-DHS システムを対象とした (図 1)。システム全体の処理悪化が起こる 282 日前を本研究での運転期間 1 日目とした (表 1)。物理化学的解析および微生物群集構造解析のため、UASB 反応槽保持汚泥を 4 つの異なる箇所 (反応槽下部から、5 cm: port1, 35 cm: port3, 65 cm: port 5, 流出水) から運転 73 日目 (Phase1: バルキング発生前) 及び 222 日目 (Phase5: バルキング発生後) に採取し、-80°C に保存した。

(2) 環境ゲノム解析

採取した汚泥は、FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて DNA 抽出を行い、

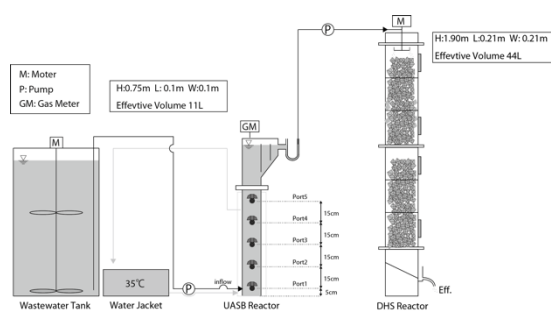


図 1 UASB-DHS システム

原核生物を対象としたプライマーセット Univ515F-Univ806R を用いて、16S rRNA 遺伝子を MiSeq (illumina) により解析し、QIIME ver. 1.9.1 を用いてデータの解析を行った。メタゲノム解析は、HiSeq2500 (illumina) を用いて行った。

(3) 浮上汚泥の物理化学的解析

採取した沈降汚泥 (port1) と浮上汚泥 (流出水から採取) 100 mL をメスシリンダーに入れ、30 分静置し、sludge volume (SV₃₀) を測定した。汚泥中の網羅的代謝産物比較解析のため、沈降汚泥および浮上汚泥を採取し、溶出液 (超純水および 100%エタノール) に浸し、分散処理後、遠心分離を行い、上澄みを 0.22 μm フィルターで濾過し、CE-TOFMS および LC-TOFMS 解析に供した。

(4) 浮上汚泥中の優占微生物の可視化

16S rRNA 遺伝子解析により、沈降汚泥および浮上汚泥で優占して検出された微生物群を可視化するため、16S rRNA を対象とした Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を適用した。検出には、全バクテリア (EUB338mix-Cy3), 全アーキア (ARC915-Cy3), *Syntrophorhabdaceae* 科 (Delta-TA664-Cy3), *Syntrophaceae* 科 (Syn424-Cy3), *Caldithrixales* 目 (Cald836-Cy3, 本研究で新たに設計), *Methanomicrobiales* 目 (MG1200-Cy3), *Methanobacteriaceae* 科 (MB1174-Cy3) を対象としたプローブと DNA 染色用の DAPI を用いた。試料には運転 223 日目の port5 から採取した汚泥を 4%パラホルムアルデヒドで 12 時間固定し、ハンディホモジナイザーで分散したものを用いた。浮上汚泥中の微生物細胞へのプローブ浸透性を向上させるため、凍結融解

表 1 UASB-DHS システムの運転条件

Phase	Days	COD inf.		Phenol inf.		OLR(kgCOD·m ⁻³ ·d ⁻¹)		HRT(hour)	
		(mgCOD·L ⁻¹)	(mgPhenol·L ⁻¹)	UASB	UASB-DHS	UASB-DHS	UASB		
1	1-135	4000	1700	8.0	2.8	34.7	12.0		
2	136-172	4000	1700	2.5	0.9	109.0	37.7		
3	173-184	4000	1700	5.0	1.8	54.5	18.9		
4	185-198	4000	1700	8.0	2.8	34.7	12.0		
5	199-245	4000	1700	2.5	0.9	109.0	37.7		
6	246-313	2000	850	8.0	2.8	17.3	6.0		
7	314-326	2000	850	1.9	0.7	72.7	25.1		
8	327-478	1000	425	2.0	0.7	34.7	12.0		

処理 (-80°C, 5分; 60°C, 5分) を10回行った。

(5) バルキング抑制に向けた新規メタン発酵技術の開発

植種汚泥には、実醤油製造廃水処理を行っていた低温 (20°C) ラボスケール UASB 反応槽の嫌気性グラニュー汚泥を用いた。回分培養実験では、Widdel 培地 (pH7.0, 無機塩培地) にイソロイシン, 2-メチル酪酸, プロピオン酸, 酢酸を 500 mgCOD/L になるように添加し, 20°C で嫌氣的に培養を行った。それぞれの試験区において, 緑色凝灰岩無添加 (コントロール), 粒径~300 nm (2 g/L), 粒径 1-5 mm (2 g/L) の培養系をそれぞれ duplicate で作製した (表 2)。本研究で使用する緑色凝灰岩には, ヒナイグリーン® (TGA 株式会社) を使用した。ガス量の測定は注射器を用いて定期的に測定を行い, ガス組成は TCD 型ガスクロマトグラフにより測定した。ガスの生成が停止した段階で同濃度の基質をそれぞれの培養系に添加し, 更なる集積培養を行った。

4. 研究成果

(1) グラニュー汚泥の物理化学的特性と微生物群集構造変化

はじめに, 沈降汚泥と浮上汚泥の物理化学的特性を評価するため, SV₃₀ を測定した。結果, 図 2 に示すとおり, 沈降汚泥は 30 分でメスシリンダー下部まで沈降したが, 肥大化した汚泥からなる浮上汚泥の SV₃₀ を測定することが不可能であった。この汚泥の肥大化が生じた原因を探るため, CE-TOFMS および LC-TOFMS を用いた沈降汚泥及び浮上汚泥抽出液のメタボローム解析を行い, 汚泥構成物質の違いを評価した。結果, LC-TOFMS を用いたネガティブモードにおける解析において, 幅広いピークが検出され, 他ピークの検出妨害が生じた。汚泥の洗浄方法の検討を行ったが, この幅広いピークを除くことができず, メタボローム解析による沈降汚泥及び浮上汚泥の構成物質の変化を評価することが難しいことから, 分子生物学的手法を用いて構成微生物群の違いを 16S rRNA 遺伝子解析により評価した。結果, 運転 73 日目 (Phase1) と 222

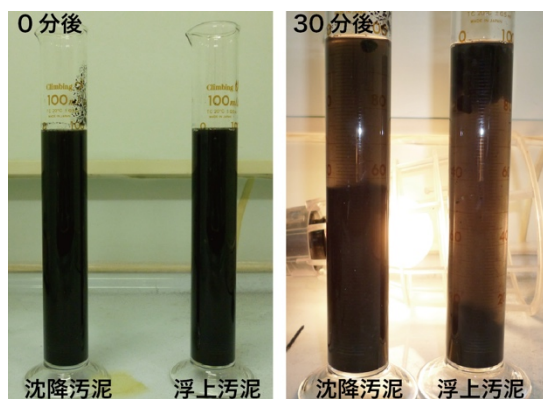


図 2 沈降汚泥及び浮上汚泥の SV₃₀ 試験結果

表 2 回分培養実験によるメタン生成試験結果

Substrate	Treatment	Gas production rate [mL/h]	Final gas volume [mL]
Isoleucine	no additional minerals	0.0422	3.25
	~300 nm minerals	0.0284	2.35
	1-5 mm minerals	0.0577	4.95
2-methyl butyrate	no additional minerals	0.1137	4.50
	~300 nm minerals	0.1355	4.75
	1-5 mm minerals	0.1462	5.10
Propionate	no additional minerals	0.1020	4.85
	~300 nm minerals	0.1360	4.65
	1-5 mm minerals	0.1426	5.50

日目 (Phase5) の微生物群集構造を比較すると, 嫌氣的フェノール分解にとって重要な *Syntrophorhabdaceae* 科に属する微生物群の存在割合が, port1 から port5 の平均で 9.7% から 1.4% と著しく減少した。同様に, フェノールの分解産物である安息香酸や酢酸分解に関与する *Syntrophaceae* 科, *Methanosaeta* 属等の微生物群の存在割合も減少していた。一方で, *Caldithriales* 目, *Treponema* 属に属する未知微生物群が, 浮上汚泥中でそれぞれ 13.9%, 12.1% と優占化しており, これら優占した微生物群が汚泥の肥大化現象に何らかの関与をしている可能性が考えられた。また, 運転 73 日目 で UASB の port 1 及び port3 から 5% 検出された未知アーキアはバルキング発生後に 1% 未満の存在割合まで低下した。系統解析の結果, 本アーキアは未培養上門である DPANN 上門に属していた。

(2) 浮上汚泥中に存在する優占微生物群の可視化

浮上汚泥中の優占微生物の可視化を行うため, FISH 法を適用した。固定した試料の全バクテリアを対象とした FISH 解析を行った結果, DAPI のシグナルに対して 5% 以下の微生物細胞のみ検出された。そのため, 浮上汚泥の形状からプローブの浸透性が悪化している可能性を考慮し, 試料の前処理として凍結融解処理を施した。結果, 全バクテリアのシグナルが向上し, DAPI のシグナルに対して 20% 以上のバクテリア細胞から蛍光が得られた。そこで凍結融解処理を施した試料を用いて沈降汚泥および浮上汚泥で優占する微生物群の検出を試みた結果, *Methanomicrobiales* 目, *Methanobacteriaceae* 科以外を対象としたプローブからは蛍光が殆ど検出されず, 浮上汚泥中のフェノール分解に重要な微生物群の生理活性が著しく低下していることが示唆された。汚泥の肥大化に関与している可能性のある *Caldithriales* 目に属する未培養系統分類群を対象とした FISH 法でも同様に蛍光が細胞から検出されなかった。本研究で新たに設計したプローブの交雑効率に問題がある可能性もあるため, Clone-FISH 法や異なる配列を対象としたプローブの設計などの必要性が考えられた。

(3) メタゲノム解析によるバルキングに関与する微生物群の同定

メタゲノム解析を行った結果、バルキング現象発生時に元々優占していた未知アーキアの系統分類群の存在割合が著しく減少していることが分かり、機能解析の結果、このアーキアは DPANN 上門に属し、増殖に必要な栄養を他の微生物から獲得することが示唆された。DPANN 上門に属するアーキアは他のアーキアを寄生主として増殖することが示唆されており、本研究で見出したアーキアが UASB 槽内のメタン生成アーキアの増殖を制御し、その異常増殖を抑える役割を担っていた可能性が示唆された。

(4) バルキング抑制に向けた新規メタン発酵技術の開発

嫌気性消化槽や UASB 法などに代表されるメタン発酵技術は、アルカリ度の不足による酸敗や必須元素の不足、反応槽からの汚泥の浮上・流出などによりしばしばプロセスに問題が生じる。本研究では、上記の問題を解決する方法として、天然鉱物である「緑色凝灰岩」に含まれる多様なミネラル（必須元素）、導電性金属成分に着目した。緑色凝灰岩は多孔質材料であり、71%の珪酸の他に、 Al_2O_3 13.1%、 Fe_2O_3 3.61%、 K_2O 2.57%、 CaO 1.22%、 MgO 1.22%、 Cu 0.01%、 Mn 0.09%のミネラルと導電性金属成分を複数含んでいることから、電子伝達促進及びミネラルの安定的供給、微生物担体としての役割が期待される。メタン発酵促進のため、マグネタイトなどのナノ金属を用いた電子伝達の促進などが研究されているが、純粋な微小金属は高価であるため実規模レベルで利用することが難しい。加えて、緑色凝灰岩を汚泥の保持担体として利用することにより、担体からの継続的なミネラルの供給と担体自体の比重（真比重約 2.2）による汚泥の浮上を防ぐことが期待される。

表 2 は回分培養実験によるイソロイシン、2-メチル酪酸、プロピオン酸を基質としたメタン生成速度の測定結果を示す。それぞれの基質において、十和田石粒径 1-5 mm 添加系のガス生成速度及び最終ガス生成量が一番大きい結果となり、十和田石添加によるメタン生成促進の効果が示唆された。それぞれの培養系の 16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物群集構造解析の結果、イソロイシン、2-メチル酪酸、プロピオン酸の系において *Methanosaeta* (37.5%)、*Romboutsia* (6.4%)、PL-11B10 (*Spirochaetes*, 5.0%)、*Syntrophomonas* (4.9%)、HA73 (*Synergistetes*, 3.0%) が優占していた。一方で、水素資化性アーキアはイソロイシン、2-メチル酪酸とプロピオン酸で *Methanospirillum* (1.8%) が優占しており、それぞれの基質で本メタン生成アーキアと共生関係が形成されていることが示唆された。今後、メタン生成速度の再測定試験を行うと共に、シントロフとメタン生成アーキアの共生関係、それぞれの培養条件での微生物群集構造の違

いを明らかにしていく。

<引用文献>

- [1] Y. Sekiguchi, H. Takahashi, Y. Kamagata, A. Ohashi, H. Harada, In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I, *Appl Environ Microbiol*, 67(12), 5740-9, 2001.
- [2] T. Yamada, T. Yamauchi, K. Shiraiishi, P. Hugenholtz, A. Ohashi, H. Harada, Y. Kamagata, K. Nakamura, Y. Sekiguchi, Characterization of filamentous bacteria, belonging to candidate phylum KSB3, that are associated with bulking in methanogenic granular sludges, *ISME J*, 1(3), 246-55, 2007.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

1. Kyohei Kuroda, Seiya Takami, Yuga Hirakata, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Masahito Yamauchi, Takashi Narihiro, Masayoshi Yamada (2016). Microbial community composition of floated and overgrown granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor, 11th International Forum on Ecotechnology in Penang (IFE11), p. 17, Malaysia.
2. 黒田恭平, 高見誠也, 平片悠河, 幡本将史, 山口隆司, 山内正仁, 成廣隆, 山田真義 (2017). フェノール模擬廃水を処理する UASB 反応槽保持汚泥の肥大化の原因探索, 第 51 回日本水環境学会年会講演集, p. 339.
3. 黒田恭平 (2017). エネルギー・食料生産技術の高効率化に向けた微生物学・分子生物学的解析手法の適用, 宮崎大学産学・地域連携センター 第 24 回技術・研究発表交流会, p. 83.
4. Kyohei Kuroda, Masashi Hatamoto, Masayoshi Yamada, Masahito Yamauchi, Takashi Yamaguchi (2017). Exploration of uncultured bacterial phyla in biological wastewater treatment systems, The 2nd International Symposium on Expertise of Engineering Design (2nd ISEED) in Kagoshima, p. 16, Japan.
5. 黒田恭平, 延優, 成廣隆, 山口隆司 (2017). 生物学的廃水処理汚泥を対象とした高解像度 16S rRNA 遺伝子解析, 第 20 回日本水環境学会シンポジウム, p. 148.
6. Kyohei Kuroda, Yu Ikedo, Tomoka Arata, Nana Ohmine, Hazuki Kurashita, Manami Kotsusa, Yuga Hirakata, Masashi Hatamoto,

Masayoshi Yamada, Masahito Yamauchi, Takashi Yamaguchi (2017). Detection of bulking-causative microorganisms in an upflow anaerobic sludge blanket reactor using molecular techniques, The 6th International GIGAKU Conference in Nagaoka (IGCN 2017), RD-058_sub105, Japan.

7. 黒田恭平, 延優, 幡本将史, 成廣隆, 山口隆司, 山内正仁, 山田真義 (2018). 天然鉱物を用いたメタン発酵促進技術の開発, 第52回日本水環境学会年会講演集, p. 577.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 恭平 (KURODA Kyohei)
都城工業高等専門学校・物質工学科・助教
研究者番号：50783213

(2) 研究協力者

山田 真義 (YAMADA Masayoshi)
鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・准教授
研究者番号：80469593

成廣 隆 (NARIHIRO Takashi)
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：20421844

延 優 (NOBU K. Masaru)
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員
研究者番号：40805644