

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：87402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550105

研究課題名(和文)膜分離活性汚泥法における未知油分解微生物群の高感度同定と微生物制御法の開発

研究課題名(英文) Ultra-high sensitive identification of unknown lipid-degrading microorganism in activated sludge to develop of microbiological control for membrane bioreactor

研究代表者

田中 亮一 (Tanaka, Ryoichi)

熊本県産業技術センター(ものづくり室、材料・地域資源室、食品加工室)・その他部局等・研究主任

研究者番号：50468063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：油含有廃水の活性汚泥処理において律速段階の一つである長鎖脂肪酸分解に焦点を当て、RNA-stable isotope probingと次世代シーケンサーの融合による新しい実験手法を用い、パルミチン酸分解に関与する未知の活性汚泥微生物群の高感度同定を行い、パルミチン酸分解に関与している稀少微生物群を検出した。新しい実験手法は、環境中における未知微生物機能を高感度に同定できることを実証した。また、微生物学的知見に基づくMBRの高活性管理技術の確立に向けて、小型MBR装置とオリーブ油を使用した油含有廃水を用いた試験運転を行い、MBRのファウリングや機能低下に関与する微生物を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We focused on the long chain fatty acid degradation that is one of rate-limiting step on lipid degrading process in the activated sludge treatment, unknown microorganism involved in degrading palmitic acid in the activated sludge was identified with a new fusion method of RNA-stable isotope probing (SIP) and 16S rRNA gene deep sequencing. Furthermore, rare species of microorganism taking in palmitic acid were revealed. The new powerful method of RNA-SIP and next generation sequencer technology was demonstrated to be useful in ultra-high sensitive identification of unknown microorganisms in environment.

To develop control technology of a high performance membrane bioreactor (MBR) for lipid-degradation, a small scale MBR was operated using wastewater including the olive oil, and microbes induced fouling and functional decline on the MBR in oily wastewater treatment were revealed.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Stable isotope probing 16S rRNA gene sequencing 長鎖脂肪酸分解 Activated sludge Membrane bioreactor

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化を原因とする気候変動は、多くの地域に降水量の変化を引き起こし、洪水や干ばつの被害が広がっている。また、地球温暖化による海水の水位上昇は、沿岸地域の塩害を引き起こし、飲料水、農業用水に多大な被害がでることが予想され、今後「水資源」の重要性が益々高まることが考えられる。我が国でも気候変動による水不足と局地的な豪雨被害が年々顕著になってきており、水量と水質の悪化が懸念され、「国民の安全・安心を脅かす問題」となりつつある。このような環境変化による水問題に対し、「安全・安心な水の安定供給」が強く求められている。安全・安心な水の供給は、従来の上水道による水供給以外に、工場等の廃水を再処理し、その水を再利用できる自立供給型のシステムを構築することで新たな水供給が可能となり、水の安定供給の問題を解決できる。しかし、上水道を利用していない工場等は廃水処理システムの設置スペースが限られており、省スペースでエネルギー効率・運転安定性の高い廃水処理システムの開発が急務である。

現行の廃水処理リアクターは、試行錯誤の繰り返しによって、施設設計や運転管理の面から改良されてきた。しかし経験則でのみマニュアル化されたプロセスの設計・管理手法では、現状以上に限界処理速度を向上させることや原因不明のトラブルを回避することは難しい。この状況を打開し、廃水処理能力向上のブレークスルーを達成するためには、プロセスの直接の担い手である高処理能微生物群の実体解明が必要不可欠である。従来までの微生物群集構造解析によりプロセス内に存在する微生物の「種類」と「分布」が次第に明らかにされつつあるが、廃水処理の高効率化・安定化の鍵をにぎる中核微生物の「機能(はたらき)」は未だ手つかずのままである。水処理再生の過程でその律速段階を担う未知微生物群を、SIP法により同定し、さらに次世代シーケンサー解析でその生理性質を解明・制御することができれば、科学的知見に裏付けられた高性能で維持管理が容易な高度水処理プロセスの構築が実現可能である。

2. 研究の目的

本研究では、環境中の未培養微生物の「機能(はたらき)」を、分離培養を介することなく、直接同定することができる「SIP(Stable isotope Probing)法」と大規模塩基配列解読が可能な「次世代シーケンサー」を有機的に結び付けることで、活性汚泥法用いた廃水処理における中核微生物の生理機能を詳細に解明する。次に、ここで得られる高度水処理に必須な微生物学的知見(高処理能微生物群の追跡法・活性化法)を、今後、技術発展と地域発展が最も見込まれる水処理再生技術「膜分離型廃水処理装置

(Membrane Bioreactor: MBR)」の設計・運転管理に生かし、エネルギー効率性・運転安定性・ハンドリング性に優れた省エネ型 MBR を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 廃水処理の油を分解する中核微生物群の同定

MBR の微生物処理槽(活性汚泥)で油の成分である長鎖脂肪酸の分解を担っている未知油分解微生物を SIP 法により同定した。実験方法は以下の3つのステップで行った(図1)。

^{13}C -パルミチン酸(1,2,3,4 標識)を基質として、廃水処理施設より取得した活性汚泥を 25 ℃ で振とう培養した。 ^{13}C -パルミチン酸を取り込んで重くなった(長鎖脂肪酸分解能(油分解能)を有する)微生物を含む活性汚泥微生物を集菌した。

^{13}C -パルミチン酸によって培養した微生物群から核酸を抽出し、そのうち同位体を取り込んで重くなったものを超遠心により分離した。さらに重い核酸画分も回収した。

同位体ラベルの核酸を次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ株式会社) による微生物群集構造解析に供し、同位体を取り込んだ油分解菌(長鎖脂肪酸分解微生物)を系統的に同定した。ここで、長鎖脂肪酸分解状態を把握するために PLFA 分析、パルミチン酸分析を行った。

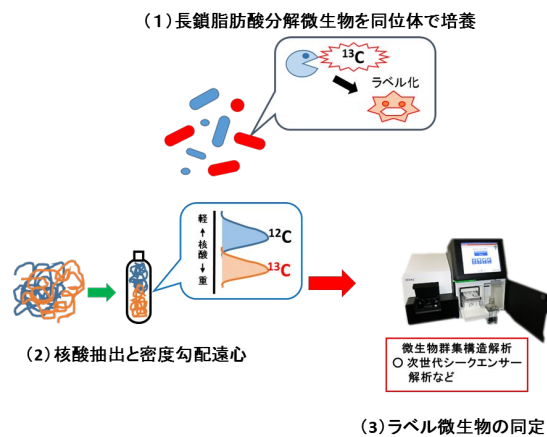


図1. SIP法による未知油分解微生物の同定

(2) 高性能廃水処理システム開発のための油含有廃水の MBR での運転評価と機能低下の微生物同定

連続培養試験が可能な MBR 装置を設計・試作を行い、油分解微生物やその機能性分離膜との調和性に関する知見を統合して、油含有廃水処理の試運転を実施した(図2)。

装置は、容積 230L、3 槽からなる好気条件、水理学的滞留時間(HRT)2 日、返送汚泥 115L/日で設計、運用した。

微生物学的知見に基づく MBR の高活性管理

技術の確立に向けて、MBR 装置とオリーブ油を使用した油含有廃水を用い、試験運転を行った。運転条件において油濃度を段階的に上げることで処理機能低下とファウリングを誘引させ、pH、DO、MLSS、全有機炭素(TOC)、COD-Cr、アンモニア濃度、膜間差圧を分析した。油分解において MBR 機能低下を引き起こす微生物の分析を 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした次世代シーケンスで行い、実廃水処理の実証試験で問題となるファウリングにおける微生物の検証を行った。



図 2. 膜分離型廃水処理装置(MBR)

4. 研究成果

(1) 廃水処理の油を分解する中核微生物群の同定

有機系廃水の活性汚泥処理において律速段階の一つである長鎖脂肪酸分解に焦点を当て、RNA-SIP と 16S rRNA gene deep sequencing の融合によりパルミチン酸分解に關与する未知の活性汚泥微生物群の同定を行った。

活性汚泥をバイアル瓶に封入し、 ^{13}C -パルミチン酸を添加後、25 で振とう培養を行った。培養は 108 時間まで行った。なお、対照区として ^{12}C -パルミチン酸による培養系を用意した。サンプルは、0, 12, 24, 36, 48, 108 時間ごとにサンプリングし、パルミチン酸分析、全有機炭素(TOC)、リン脂質脂肪酸(PLFA) 分析を行った。 ^{13}C -パルミチン酸添加、 ^{12}C -パルミチン酸添加の両サンプルとも培養経過に伴い、パルミチン酸と TOC の減少が観察された。TOC の分析では、継時的に同じ割合での減少が見られたが、パルミチン酸の分析では、培養初期 12 時間までの減少が大きく、培養 48 時間以降の後半は緩やかに減少していた。また、PLFA の ^{13}C 標識を GC-MS SIM で解析したところ、パルミチン酸の結果同様に培養初期において微生物による ^{13}C -パルミチン酸の取り込みが活発であることが明らかとなった。

培養 48 時間の活性汚泥より RNA を抽出し、超遠心による密度分離を行った。その後、各 RNA 密度画分を 16S rRNA 遺伝子を標的とした MiSeq による deep sequencing に供した。シーケンスの結果を門、綱、目、科、属のレ

ベルで解析した。その結果、各密度画分において微生物群集の全体像に大きな違いは見られなかった。しかし、属レベルの ^{13}C 培養系の高密度画分において ^{12}C 培養系と比べ相対存在量が顕著に増加している新規な微生物が検出され、パルミチン酸が稀少微生物群に取り込まれることを見出した(図 3)。現在、その系統遺伝学的解析を進めている。これらの結果より、次世代シーケンサーの RNA-SIP への適用により、環境中における未知微生物機能を高感度で同定できることを実証した。

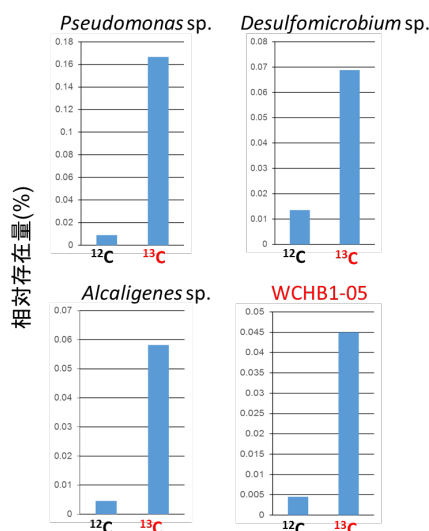


図 3 . 少数微生物ながら同位体を取り込む微生物(油分解菌)

(2) 油含有廃水の MBR での運転評価と機能低下の微生物同定

油添加濃度を段階的(0~800 ppm)に上げることで処理機能低下とファウリングを誘引した。分析は、pH、DO、MLSS、TOC、COD-Cr、アンモニア濃度、膜間差圧を行った。

油添加前、MBR 処理水は、TOC 50 mg/L、COD 80 mg/L、アンモニア濃度は 18 mM と、安定しており、大きな変化は見られなかった。汚泥処理槽 1 と 2 の MLSS は、7,000 mg/L 前後から徐々に増加し、10,000 mg/L 前後になった。また、膜間差圧も MLSS 同様に 35 kPa 程度の上昇がみられた。オリーブ油添加後、油濃度 200~400 ppm では、TOC、COD、アンモニア濃度は、大きな変化は見られなかったが、MLSS、膜間差圧は上昇が見られた。油濃度 600 ppm 以降は、TOC、COD、アンモニア濃度において急激な上昇が見られ、MLSS は 20,000 mg/L 前後、膜間差圧も 40 kPa 以上と上昇した。これらの結果より、600 ppm を超えると処理性能が低下することが明らかとなった。

次に微生物解析を 16S rRNA 遺伝子をターゲットに次世代シーケンサーを用いて行った。その結果、油添加後(200 ppm 以降)に微生物群衆構造が劇的に変化することが明

らかとなった(図4)。

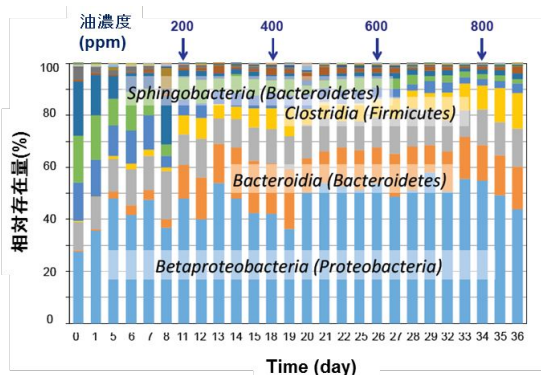


図4. 油添加と微生物群集構造の変化

MBR の機能低下過程、膜間差圧上昇時の汚泥中の微生物群、膜に付着する微生物群を次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子解析によって明らかにした(表1,表2)。

| OTU | Closest relative | Phylogenetic group | Accession number | Sequence identity (%) |
|-----|---|--------------------|------------------|-----------------------|
| 1 | Bacteroidales bacterium CF | Bacteroidetes | CP006772 | 94 |
| 2 | Petrimonas sulfuriphila strain BN9 | Bacteroidetes | NR_042987 | 97 |
| 3 | Fusibacter sp. SA1 | Firmicutes | AF491333 | 100 |
| 4 | Fusibacter sp. SA1 | Firmicutes | AF491333 | 97 |
| 5 | Acholeplasmatales bacterium canine oral taxon 375 | Tenericutes | JN713547 | 89 |
| 6 | Parabacteroides chartae strain NS31-3 | Bacteroidetes | NR_109439 | 94 |
| 7 | Bacteroidales bacterium CF | Bacteroidetes | CP006772 | 91 |
| 8 | Corynebacterium sp. XJ149Q-12-2NCR2 | Actinobacteria | JQ975896 | 100 |
| 9 | Parabacteroides chartae strain NS31-3 | Bacteroidetes | NR_109439 | 93 |
| 10 | Alcaligenes faecalis subsp. Faecalis strain SND_5 | Betaproteobacteria | KJ555096 | 100 |

表1. 膜間差圧上昇時(ファウリング過程)に汚泥より同定された微生物群(10種)

| OTU | Closest relative | Phylogenetic group | Accession number | Sequence identity (%) |
|-----|--|---------------------|------------------|-----------------------|
| A | Diaphorobacter nitroreducens strain SL-205 | Betaproteobacteria | JX974341 | 100 |
| B | Bacterium B1C2-8 | Bacteroidetes | EU481656 | 99 |
| C | Bacterium SCGC AAA018-G4 | OD1 | HQ290495 | 80 |
| D | Brevundimonas terrae strain 266XY9 | Alphaproteobacteria | KF818660 | 100 |
| E | Hydrogenophaga defluvi strain hyd1 | Betaproteobacteria | AM942546 | 99 |
| F | Azonexus hydrophilus strain d8-2 | Betaproteobacteria | EF158391 | 100 |
| G | Acidovorax delafieldii strain N035b | Betaproteobacteria | KC252710 | 100 |
| H | Bellilinea caldifistulae strain GOMI-1 | Chloroflexi | NR_041354 | 88 |
| I | Corynebacterium humireducens NBRC106098 strain MFC-5 | Actinobacteria | GQ421281 | 99 |
| J | Lutispora thermophile strain EBR46 | Firmicutes | NR_041236 | 89 |

表2. ファウリング過程に膜に付着する優占微生物群(10種)

これらの微生物群は、MBR のファウリングや機能低下に関与することが強く示唆され、MBR 運転時の膜ファウリングの指標微生物として MBR 診断に有効であることが示唆された。

今後、油分解の律速に関わる長鎖脂肪酸分解微生物と MBR のファウリングなどの機能低下に関与する微生物を指標としたモニタリングの手法を確立することによって、高機能廃水処理 MBR システムを構築できるものと思われる。

引用文献

堀 知行、Stable Isotope Probing 法とその応用、CMC 出版「難培養微生物研究の最新技術 II」、2010、pp.28-40

5. 主な発表論文等

(学会発表)(計2件)

堀 知行、佐藤 由也、ナバロ ロナルド、田中 亮一、柳下 宏、羽部 浩、尾形 敦、膜分離活性汚泥槽への油添加により、誘発される膜ファウリングとその原因微生物群、日本生物工学会、2014年9月11日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

堀 知行、青柳 智、田中 亮一、尾形 敦、超高感度 rRNA-Stable Isotope Probing による未知環境微生物群の機能解析、日本農芸化学会、2015年3月29日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 亮一(TANAKA, Ryoichi)
熊本県産業技術センター・食品加工室・研究主任
研究者番号: 50468063

(2)連携研究者

堀 知行(HORI, Tomoyuki)
産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員
研究者番号: 20509533