

嫌気性バルキング原因菌の微生物機能情報の解明と高速メタン発酵リアクターのバルキングメカニズムの理解

P-32

山田 剛史

豊橋技術科学大学 環境・生命工学系

連絡先 E.mail: tyamada@chem.tut.ac.jp

研究背景と研究目的

EGSB リアクターの立ち上げ時に発生した嫌気性バルキング現象



EGSB 法の普及やそれに伴う適用廃水種の拡大に伴って、EGSB リアクター内の汚泥が突発的に浮上して流出する現象 (嫌気性バルキング) が確認されてきている。当該リアクターで確認された嫌気性バルキング汚泥は、健全なグラニューク汚泥に比べて汚泥沈降が 3 倍程度沈降性が悪化していた。ひとたび嫌気性バルキングが発生すると、処理効率が低下するのみならず、リアクターを停止せざるえない事態が生じる。しかしながら、その発生メカニズムはおろか原因菌すら不明であり、即効性の高い対策が立てられずにいる。

研究目的

本研究では、その発生メカニズムを推定するため、バルキング原因菌の微生物機能情報を明らかにすることを目的とする。

研究結果と考察

16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析によるバルキング汚泥と健全な汚泥内微生物群集構造の比較

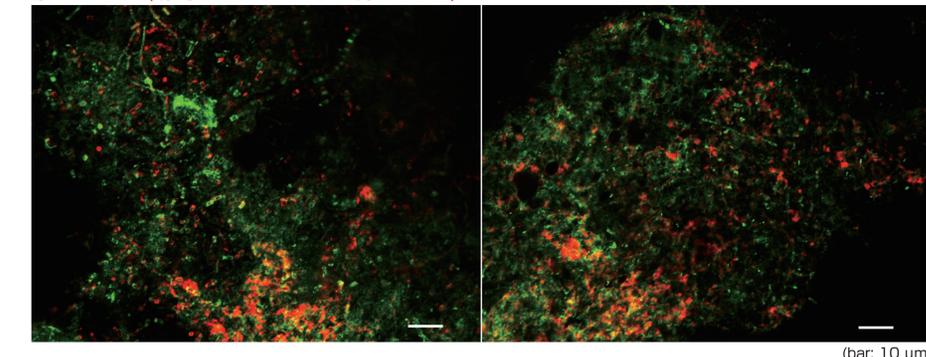
OTU ID	Taxonomy				Bulking SVI ₁₄₅ 1mL-g-VSS ⁻¹	Healthy SVI ₁₉ 0.0mL-g-VSS ⁻¹	Healthy SVI ₂₀ 0.0mL-g-VSS ⁻¹	
	phylum	order	family	genus				
OTU 1	Euryarchaeota	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobacterium	●	●	●	← UP
OTU 2	Euryarchaeota	Methanomicrobiales	Methanocorpusculaceae	Methanocorpusculum	●	●	●	← UP
OTU 3	Euryarchaeota	Methanosaeinales	Methanosaeetaceae	Methanosaeeta	●	●	●	← UP
OTU 4	Aegirbacteria				●	●	●	
OTU 5	Bacteroidetes	Bacteroidales	VadinHA17		●	●	●	
OTU 6	Bacteroidetes	Ignavibacteriales	Melioribacteraceae		●	●	●	
OTU 7	Bacteroidetes	SJA-28			●	●	●	
OTU 8	Chloroflexi	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Anaerolinea	●	●	●	← UP
OTU 9	Chloroflexi	Anaerolineales	Anaerolineaceae	UCG-001	●	●	●	← UP
OTU 10	Chloroflexi	RBG-13-54-9			●	●	●	← UP
OTU 11	Chloroflexi	SBR1031			●	●	●	
OTU 12	Dependentiae	Babeliales			●	●	●	
OTU 13	Firmicutes	Clostridiales	Caldicoprobacteraceae	Caldicoprobacter	●	●	●	
OTU 14	Firmicutes	Clostridiales	family_XIV		●	●	●	
OTU 15	Firmicutes	D8A-2			●	●	●	
OTU 16	Firmicutes	DTU014			●	●	●	
OTU 17	Latescibacteria				●	●	●	
OTU 18	Modulibacteria	Moduliflexales	Moduliflexaceae	Candidatus Moduliflexus	●	●	●	
OTU 19	Nitrospirae				●	●	●	
OTU 20	Proteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	●	●	●	
OTU 21	Proteobacteria	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	Geobacter	●	●	●	← UP
OTU 22	Proteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophaceae	Smithella	●	●	●	← UP
OTU 23	Proteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophaceae		●	●	●	← UP
OTU 24	Proteobacteria	Syntrophobacteriales	Syntrophobacteraceae	Syntrophobacter	●	●	●	
OTU 25	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae		●	●	●	
OTU 26	Verrucomicrobia	Pedosphaerales	Pedosphaeraceae		●	●	●	

Detection rate (%) ● 1 ● 5 ● 15 ● 30 全体の1%以下のリード配列は除去

16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を行ったところ、嫌気性バルキング汚泥において、健全なグラニューク汚泥に対して有意に増加していた微生物種は、ユリアーキオータ門 (2 種)、クロロフレキシ門 (2 種) およびプロテオバクテリア門 (3 種) に属する微生物種であった。

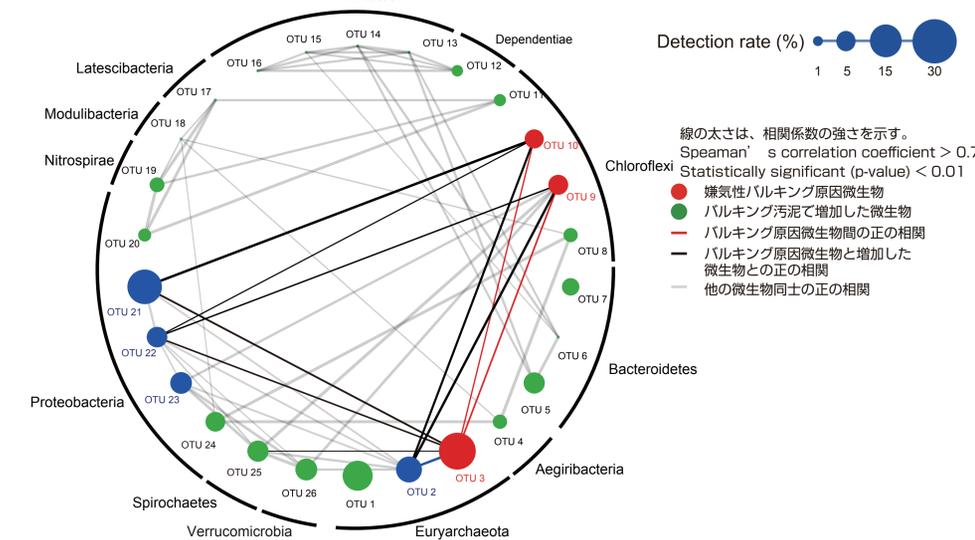
高感度微生物検出法である In situ DNA-HCR 法を用いた嫌気性バルキング原因微生物の同定

緑: GNSB941 (標的: Chloroflexi 門細菌)
赤: MX825 (標的: Methanosaeeta 属アーキア)



糸状性の形態を示すメタノサエタ属アーキアとクロロフレキシ門細菌が嫌気性バルキング汚泥に多数存在しており、嫌気性バルキングに強く関与していることを示していた。

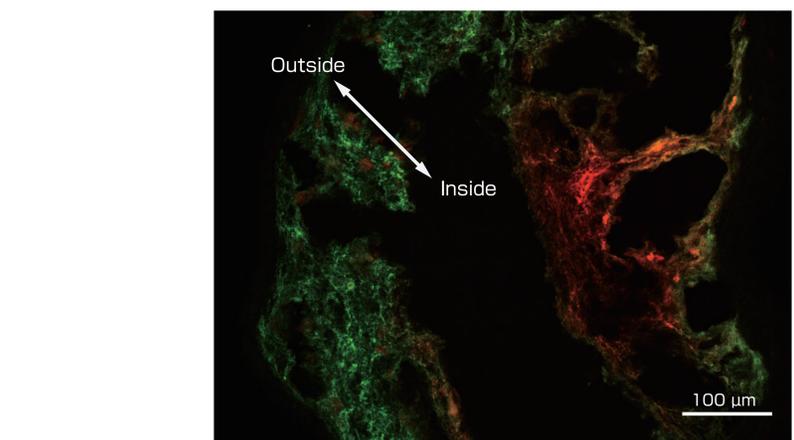
スピアマンの順位相関係数を用いた嫌気性バルキング原因菌同士や他の構成微生物との相関関係の評価



嫌気性バルキング原因微生物同士に強い正の相関があり、同一の要因 (運転条件や環境要因の変化) によって異常増殖した可能性がある。
バルキング汚泥において増加が確認された糸状性の形態を有していない微生物とバルキング原因微生物の間には、強い正の相関が得られた。これらの結果はバルキング原因微生物の異常増殖のみならず、他の構成微生物の異常増殖と複合的に発生していたことを示唆していた。

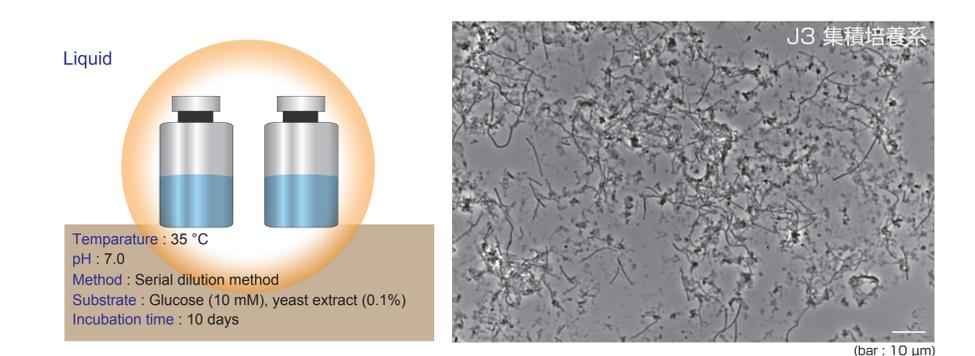
健全なグラニューク汚泥におけるバルキング原因菌の空間分布

緑: GNSB941 (標的: Chloroflexi 門細菌)
赤: MX825 (標的: Methanosaeeta 属アーキア)



メタノサエタ属アーキアとクロロフレキシ門細菌に特異的な DNA プローブを用いた Fluorescence in situ hybridization 法を適用した。クロロフレキシ門細菌は汚泥表面に存在し、メタノサエタ属アーキアは汚泥内部に存在することが分かった。
クロロフレキシ門細菌の異常増殖はグラニューク汚泥の表面形状を変え、メタノサエタ属アーキアの異常増殖はグラニューク汚泥内部からの破壊をもたらしたため、懸濁性物質が多く形成されたことを示唆された。

バルキング汚泥に存在するアナエロリネア綱細菌の分離・培養



バルキング原因菌の空間分布調査の結果、アナエロリネア綱細菌は、糖のような発酵過程の比較的初期の有機物を利用することが示唆されたため、グルコースと酵母抽出液で集積培養を行った。
バルキング汚泥を接種源とした集積培養では、新規のクロロフレキシ門アナエロリネア綱細菌 J3 株 (バルキング原因菌) を集積させることに成功した。16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析では、J3 株の集積度は約 50% であった。
J3 株は、バルキング原因菌と推定される OTU9 と同一の塩基配列を有していた。

結論

メタノサエタ属とアナエロリネア綱に属する複数種の微生物が糸状性の形態をしていることから、嫌気性バルキングに関与していることが示唆された。
嫌気性バルキングのバルキング原因菌の異常増殖は、同一の要因 (運転条件や環境要因の変化) によって発生した可能性がある。
空間分布調査と集積培養法を用いることによって、バルキング原因菌の一つである新たなアナエロリネア綱細菌の集積に成功した。