

抄録

膨張粒状汚泥床由来の嫌気性粒状汚泥を用いた 分光測定及び菌叢解析による染料脱色評価

稲葉知大*¹ 山口真美 谷口 輝*² 佐藤由也*¹ 青柳 智*¹ 堀 知行*¹

井上寛之*³ 藤田雅彦*⁴ 岩田真教*² 岩田佳大*² 羽部 浩*¹

Evaluation of dye decolorization using anaerobic granular sludge from an expanded granular sludge bed based on spectrometric and microbiome analyses

INABA Tomohiro, YAMAGUCHI Mami, TANIGUCHI Akira, SATO Yuya, AOYAGI Tomo, HORI Tomoyuki, INOUE Hiroyuki, FUJITA Masahiko, IWATA Masanori, IWATA Yoshihiro and HABE Hiroshi

The Journal of General and Applied Microbiology 68, 242-247 (2022)

キーワード：嫌気性粒状汚泥、脱色、膨張粒状汚泥床、微生物群集構造、繊維染料

嫌気性膨張粒状汚泥床（EGSB）から採取した粒状汚泥を用いて、模擬排水中の 11 種類の染料の脱色について評価したところ、7 日間の培養後に 8 種類の染料の生物学的脱色（94% 以上の脱色）が観察された。EGSB 粒状汚泥から抽出した 16S rRNA 遺伝子アンプリコンの次世代シーケンサー解析により、染料が存在しない場合と比較して染料の存在下では、*Palubacter propionicigenes* 属細菌の相対存在量が最も増加していることが示された（11 の染料の平均 7.12 倍）。

実験方法

1. 染料別排水の脱色試験

(1) 模擬排水の調製

11 種類の染料 Reactive Blue 19 (RB19), Reactive Blue 21 (RB21), Reactive Blue 27 (RB27), Reactive Red 21 (RR21), Reactive Red 23 (RR23), Reactive Red 180 (RR180), Reactive Yellow 15 (RY15), Reactive Yellow 17 (RY17), Reactive Yellow 23 (RY23), Reactive Yellow 37 (RY37) 及び Reactive Yellow 160 (RY160) と繊維加工剤を用いて表 1 の模擬排水を調製した。

表 1 模擬排水の組成（単位：mg/l）

小麦澱粉	632	PVA	104	アクリル系糊剤	104	平滑剤	528
帯電防止剤	104	NH ₄ Cl	456	KH ₂ PO ₄	132	MgSO ₄ ・7H ₂ O	12
CaCl ₂	24	NaHCO ₃	600	FeCl ₃ （無水）	6	ZnCl ₂	1.2
CoCl ₂ ・6H ₂ O	1.2	染料	160				

(2) 脱色試験

250ml の模擬染色排水と 50ml の EGSB 粒状汚泥を 500ml の三角フラスコに入れてパラフィルムで密閉し、微好気性条件下 37°C で 7 日間培養した。2 日後及び 7 日後に溶液を採取し、孔径 0.8µm のメンブレンフィルターを用いて濾過後、それぞれの染料の極大波長における吸光度を測定した。

2. 粒状汚泥微生物叢の解析

7 日後に取り出した EGSB 粒状汚泥を破碎し、細胞溶解法¹⁾により DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子 V4 領域のユニバーサルプライマーで PCR を実施し、次世代シーケンサー解析（MiSeq、イルミナ社製）を行った。得られたシーケンスデータに関し、キメラを除去した高いクオリティ（q>30）の配列を系統的に解析した。遺伝子配列の相同性は、NCBI 塩基配列データベースの BLAST プログラムにより決定し、微生物多様性の評価には QIIME ソフトウェアを用いた。

* 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所 * 2 株式会社愛研化工機 * 3 (現)技術開発部 * 4 (現)企画管理部
この研究は、『新エネルギー等のシーズ発掘・事業化に向けた技術研究開発事業（バイオマス）「エネルギー変換効率向上による染色排水脱色技術開発」（NEDO）』の予算で実施した。

結果と考察

1. 染料別排水の脱色試験

8種類の染料（RB19、RB21、RR21、RR23、RR180、RY15、RY17及びRY23）について、7日間の培養後の脱色率は94%以上となり、特に、RR21、RR180及びRY15は培養2日以内に達成していた。一方、RB27、RY37及びRY160の脱色速度は遅く、7日後の吸光度の残留は12.3~43.3%であり、特にRY37及びRY160はEGSB粒状汚泥のみでの脱色は適していない可能性がある。

表2 各染料の最大波長（ λ_{max} ）及び脱色率（%）

染料	RB19	RB21	RB27	RR21	RR23	RR180	RY15	RY17	RY23	RY37	RY160
λ_{max} (nm)	592	664	595	511	520	539	414	428	427	399	404
脱色率 (%) 2日後	87.6	84.0	68.9	96.1	83.3	99.0	93.3	86.1	86.6	52.0	36.2
脱色率 (%) 7日後	94.2	96.5	87.7	99.8	96.7	99.7	100	100	96.5	77.2	56.7

2. EGSB粒状汚泥微生物叢の解析

種汚泥ではメタン生成菌である *Methanobacteria* 及び *Methanomicrobia* がそれぞれ相対存在量 26.3% と 11.5% で優占化していた。EGSB粒状汚泥を模擬排水で培養した際、種汚泥でそれぞれ 2.4% と 1.4% であった *Beta-proteobacteria* と *Gamma-proteobacteria* は、模擬排水に染料を添加しない場合はそれぞれ 20.5% と 8.5% に増加したが、RY160以外の染料存在下では増加しなかった。また、*Thermotogae* 門は減少傾向となった。

EGSB粒状汚泥の色素脱色に関連する細菌種についてはほとんど知見がないため、染料の存在下で増加した種を特定するために OTU レベルの系統解析を行った。EGSB粒状汚泥の中で相対存在量が 1% を超えて増加したのは、OTU3171 (*Paludibacter propionigenes* と 92% の相同性)、OTU5465 (*Treponema stenostreptum* と 96% の相同性)、OTU1881 (*Syntrophobacter sulfatireducens* と 98% の相同性) 及び OTU3555 (*Saccharicrinis fermentans* と 90% の相同性) の 4 種であった。*Paludibacter propionigenes* は、可溶性澱粉と一部の炭水化物を消費してプロピオン酸と酢酸を生成するとの報告²⁾、染料 Reactive Red 2 (RR2) を嫌氣的に分解するリアクターの中で Fe_3O_4 の添加とともに *Paludibacter* 属の相対存在量が増加し RR2 の分解が促進されるとの報告³⁾がある。さらに、UASB粒状汚泥中の *Syntrophobacter sulfatireducens* は、硫酸塩の還元と酢酸塩の生成の両方に関与し⁴⁾、色素は末端電子受容体として硫酸塩と競合する可能性が報告⁵⁾されていることなどからも、*Paludibacter propionigenes* 及び *Syntrophobacter sulfatireducens* に関連する OTU が EGSB粒状汚泥における色素脱色で役割を果たす可能性があることを示唆している。

文 献

- 1) Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M., Liesack, W : Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient, *Environ. Microbiol.*, 7, 382–395(2005).
- 2) Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D., Ueki, K : *Paludibacter propionigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56:39–44 (2006).
- 3) Wang, Z., Yin, Q., Gu, M., He, K., Wu, G : Enhanced azo dye Reactive Red 2 degradation in anaerobic reactors by dosing conductive material of ferrous oxide, *J. Hazard Mat.*, 357, 226–234 (2018).
- 4) Li, J., Wang, J., Luan, Z., Deng, Y., Chen, L : Evaluation of performance and microbial community in a two-stage UASB reactor pretreating acrylic fiber manufacturing wastewater, *Bioresour. Technol.*, 102, 5709–5716(2011).
- 5) van der Zee, F. P., Bisschops, I. A. E., Blanchard, V. G., Bouwman, R. H. M., Lettinga, G. et al: The contribution of biotic and abiotic process during azo dye reduction in anaerobic sludge, *Water Res.*, 37, 3098–3109 (2003).