

電子産業廃水に含まれる TMAH および IPA 分解能をもつメタン生成古細菌の分離培養

新潟薬科大学 ○栗原 拓也 倉島 優仁 堀 沙織里
井口 晃徳 重松 亨
徳山工業高等専門学校 段下 剛志 長岡技術科学大学 惣中 英章
国立環境研究所 竹村 泰幸 珠坪 一晃

1. 目的

現代社会の IT 化による、スマートフォンや PC といった電子製品の大幅な普及に伴い、それらを製造する際に排出される電子産業廃水も増大し続けている。電子産業廃水は、半導体製造プロセスに使用され、人体や水生生物に毒性を及ぼすことが報告されている Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) や 2-propanol (IPA) を含有する。電子産業廃水の処理には、活性汚泥法が適用されることが一般的だが、曝気や余剰汚泥処理にコスト・エネルギーを多く必要とする。そこで、省エネ・低コストの処理が可能なメタン発酵プロセスに着目し、ラボスケールの Up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) リアクターによる常温 (18-19°C) 条件下における TMAH/IPA 含有廃水の処理性能を評価した¹⁾。その結果、有機物除去率は COD 基準で 90%以上と良好な性能を示し、UASB 法による処理の実現可能性を示すことが出来た²⁾。また、回分培養による UASB 汚泥の TMAH に対するメタン発酵特性評価試験において、TMAH は中間代謝産物の蓄積を伴うことなくメタン化し、メタン生成阻害剤 (Chloroform) を添加した条件では TMAH の分解およびメタン生成が速やかに停止することが確認された³⁾。UASB 汚泥の微生物群集構造を 16S rRNA 遺伝子を標的として解析したところ、TMAH で培養することでメタン生成古細菌である *Methanomethylovorans* 属古細菌が優占することを確認した。これらの結果から、TMAH の分解およびメタン化には *Methanomethylovorans* 属古細菌が密接に関与していると考えられる。本発表では上記の UASB 汚泥を分離源として用い、TMAH の分解に関与すると強く推定された *Methanomethylovorans* 属古細菌の分離培養を行ったのでそれについて報告する。

2. 実験方法

Methanomethylovorans 属古細菌の分離源には TMAH/IPA 含有廃水を処理する UASB 汚泥¹⁾を用いた。

分離培養は、TMAH (1,000 mg-COD/L) + Yeast Extract (40 mg-COD/L) を炭素源とした Widdel 培地を使用し、6 well plate method によるコロニー形成法および限界希釈法による分離培養を試みた。培養温度は当初 UASB リアクターの運転温度と同じ 20°Cで行っていたが、途中から 37°Cに切り替えて行った。

培養系の集積確認はメタン生成古細菌に特有な F₄₂₀ 自家蛍光観察、DAPI による全菌染色、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法、そして MiSeq (Illumina) による次世代シーケンス解析を複合的に適用することで行った。FISH 法では *Methanomethylovorans* 属古細菌に特異的な Mmv667IGC-Cy3、真正細菌に特異的な EUB338-Alexa488 プローブを使用した。分離株の 16S rRNA 遺伝子配列のほぼ全長を決定し、16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析として Arb software package を用い近隣結合法による系統樹を作成した。

3. 結果および考察

TMAH 処理 UASB 汚泥を微生物分離源とし、そこからコロニーを形成させて分離培養を試みたが、コロニーには多様な微生物種が混在しており、分離培養には至らなかった。そのためコロニーの菌体を分散し、限界希釈と継代培養を繰り返すことで分離培養を試みた。継代 2 回目 (培養開始 77 日後) の培養液に対して F₄₂₀ 自家蛍光観察を行ったところ、*Methanomethylovorans* 属と思われるメタン生成古細菌が多数確認された。継代 3 回目 (培養開始 55 日後) の培養液でも同様に集積されている様子が確認されたため、FISH 法による *Methanomethylovorans* 属古細菌の検出および MiSeq による微生物群集構造解析を行った。

キーワード Tetramethylammonium hydroxide, メタン発酵, *Methanomethylovorans* 属古細菌, 分離培養

連絡先 〒956-8603 新潟県新潟市秋葉区東島 265-1 新潟薬科大学 応用生命科学部 TEL 0250-25-5145

その結果、*Methanomethylovorans* 属古細菌は優占して存在しているものの、ホモ酢酸生成細菌である *Acetoanaerobium* 属細菌や、*Lentimicrobium* 属細菌などの真正細菌も混在していた (図 1)。TMAH の分解には、脱メチル化によるメタン生成古細菌単独での分解と、水素資化性メタン生成古細菌とホモ酢酸生成細菌を含む複数種の微生物の共生によって分解する経路が推定されている²⁾。この集積培養液には、TMAH を直接的に分解することが予想される *Methanomethylovorans* 属古細菌と、共生による分解に関与することが予想されるホモ酢酸生成細菌の両方が存在していたことから、本集積培養系では両方の経路での分解が進行している可能性が示唆された。

次に真正細菌の除去を目的に、Vancomycin (最終濃度 40 µg/mL) を添加し継代培養を行った。継代 4 回目 (培養開始 14 日後) の培養液の F₄₂₀ 自家蛍光観察を行い、*Methanomethylovorans* 属古細菌の集積を確認したところ、真正細菌と思われる細胞は検出されず *Methanomethylovorans* 属と思われる古細菌のみを確認できた。さらに継代培養 (継代 5 回目) を行い、培養開始 25 日後の集積培養液に対して DAPI による全菌染色 (図 2)、Miseq による微生物群集構造解析、GAM ブイヨン培地を用いた Pure Check を実施した。すべての結果において *Methanomethylovorans* 属古細菌以外の微生物の検出は認められず、*Methanomethylovorans* 属古細菌の分離培養は成功したと判断した。本分離株 (Mmv_isolate) は TMAH を基質として添加し、培養可能であることが確認された *Methanomethylovorans* 属古細菌であるものの、16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析の結果 (図 3) では、既知の *Methanomethylovorans* 属古細菌である *M. hollandica*, *M. uponensis*, *M. thermophila* と近縁であった (分離株との 16S rRNA 遺伝子配列の相同性はそれぞれ 98.8%, 99.3%, 97.8%)。

4. 今後の予定

本研究で分離培養した分離株の 16S rRNA 遺伝子配列は既知の近縁種と高い相同性を示していた。しかし、既知の近縁種においてはメチルアミン化合物やメタノールなどを基質として増殖することが知られているものの、TMAH の分解能は不明である。したがって、今後はこれらの近縁種についても TMAH の分解能を有するか確認を行っていく。また分離株の生理学的諸性質を明らかにし、本菌株の特徴づけを行っていく。

参考文献

1) Danshita et al., 2018, *J. Environ. Sci. Health.* 2) Chen et al., 2017, *Archaea.*

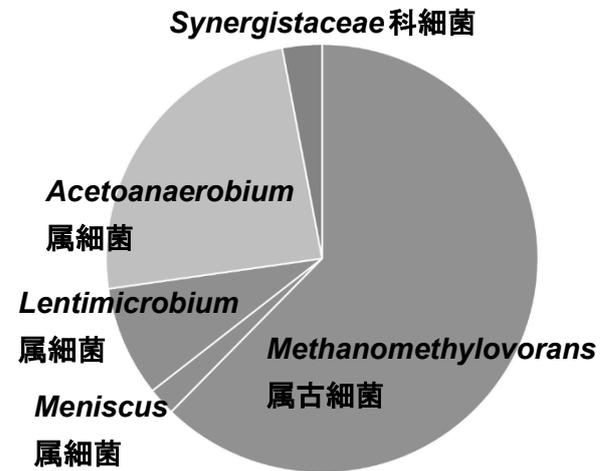


図 1 継代 3 回目の培養液の MiSeq による微生物群集構造解析に基づく各微生物の割合

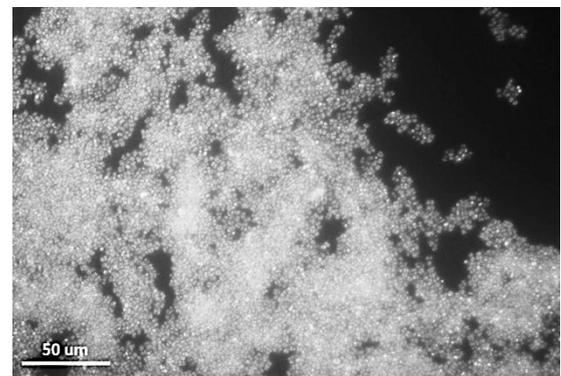


図 2 継代 5 回目の培養液 (培養開始 25 日後) の DAPI 染色による蛍光観察

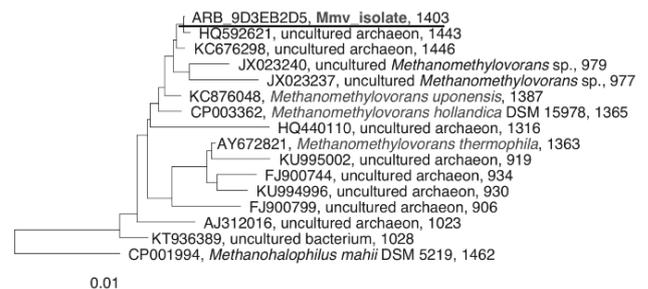


図 3 16S rRNA 遺伝子配列に基づく *Methanomethylovorans* 属における分離株の系統的位