

〈研究発表〉

ガス状 VOC 処理装置の機能評価を目的とした装置内微生物群集の観察

山形友美¹⁾, 清水博之¹⁾, 浅香直央¹⁾, 樋口能士¹⁾, 奥西将之²⁾

¹⁾ 立命館大学理工学部 (〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1, E-mail: higuchi@se.ritsumei.ac.jp)

²⁾ 三重大学生物資源学研究科 (〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577, E-mail: okunishi@bio.mie-u.ac.jp)

概要

ガス状 VOC (揮発性有機化合物) を微生物反応により処理する装置である生物脱臭装置を対象に、装置内の菌体 (バイオマス) の監視と制御を目的に、PCR-DGGE 法 (ポリメラーゼ連鎖反応法 - 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) を用いた微生物群集 (フロラ) 観察を行った。対象の装置は偏りのない微生物繁殖を目指す構造であったが、フロラは装置内充填層でほぼ均質であった。また充填担体の立体構造の外部と内部で比較すると、VOC ガスと直接接触する外部でのみ高密度に観察される属種が存在した。今後は、PCR-DGGE 法によるフロラ観察を、微生物生態の側面から装置を適正に維持・管理する手段として活用していく必要がある。

キーワード: 揮発性有機化合物, 生物脱臭装置, 微生物群集解析, PCR-DGGE 法

1. はじめに

筆者らは、ガス状 VOC (揮発性有機化合物) を微生物反応により処理する装置 (生物脱臭装置) の開発を行っている。この装置において処理性能に影響を与える要因としては、ガス温度、液相の pH や栄養塩濃度などが挙げられるが、適切な微生物反応を装置内に維持しつつ気相-生物相間の接触効率を確保するためには、適正な菌体量 (バイオマス) の維持・制御が不可欠である。また、装置内に繁殖している微生物群の集合体 (フロラ) としての役割、また装置内に存在し、ガス状成分の除去に寄与している主要菌株の情報を得ることは、装置起動時の植種や余剰バイオマスの洗浄などの方法を考察する上で重要である。

本報では、塗装工場排出ガスの処理を想定して行われた VOC 混合ガス生物脱臭試験の一環として、装置を長期運転した際の微生物フロラの変遷を、PCR-DGGE 法 (ポリメラーゼ連鎖反応法 - 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) を用いて観察し、装置内における主な菌株の同定を行った。

2. 実験方法

2.1 観察対象の生物脱臭装置

2 種混合 (イソブタノール, トルエン) ガスおよび 6 種混合 (酢酸ブチル, メチルエチルケトン, 酢酸メトキシブチル) ガスをそれぞれ処理対象とした、連続処理実験中の生物脱臭装置内充填層 (処理対象ガスと微生物が接触する固定床, 充填担体: ポリビニルホル

マール樹脂) を観察対象とした。充填層から採取した充填担体を PCR-DGGE 用のサンプルとし、DNA を抽出するまでの間 -80°C で凍結保存した。

2.2 DNA 抽出および PCR、DGGE の条件

QuickGene - Mini80 (DNA 抽出キット、FUJIFILM) を用いてサンプル中から DNA を抽出し、341F-GC および 907R のプライマーセットを用いて PCR により遺伝子を増幅した。増幅には Ex Taq (TakaRa) を使用し、タッチダウンプログラム (95°C で 5min のあと {95°C で 1min, 62°C で 1min:1 サイクルごとに 0.8°C 降下, 72°C で 1min} を 19 サイクルし、さらに {95°C で 1min, 52°C で 1min, 72°C で 1min} を 9 サイクル、最終ステップとして 72°C で 10min 実施) を使用した。その後増幅の確認を行うために、アガロースゲルを用いた電気泳動装置 (Mupid-exu, ADVANCE) を用いた。増幅確認後、DGGE を行った。DGGE では 40% のアクリルアミドゲルにて 20-55% の変性剤 (7M の尿素と 40% のホルムアミドを含む) を用い 60°C、60V で 16 時間電気泳動を行った (D-code, Bio-Rad)。電気泳動後、SYBR-Gold (invitrogen) で染色し、UV 照射下で泳動パターンを撮影した。また、ゲルからバンドを切り出し、再度 PCR で増幅させた後、シーケンス解析を行った。

2.3 シークエンス解析と菌株の同定

増幅確認した PCR 産物を精製 (Montage PCR Clean-Up Kit, ミリポア) し、サイクルシーケンスを行った。精製後、シーケンサーで塩基配列を決定した。配列が決定した約 500 塩基の塩基配列をもとに Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 検索し、最類似菌株を決定した。

3. イソブタノールガスおよびトルエンガスを処理対象とした生物脱臭装置内における微生物群集の解析

3.1 概要

本研究では、イソブタノール-トルエン混合ガスを処理している生物脱臭装置内の同一日（運転 96 日目）における充填層内のフロラ（マクロ分布解析）と、装置内の担体の一部をミニカラムに移行し、1 日ごとに計 7 日間採取したサンプルのフロラ（経時変化解析）を PCR-DGGE 法を用いて観察した。**Fig.1** の Lane B1

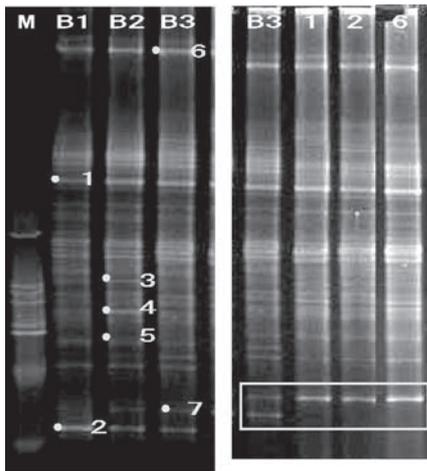


Fig.1: Photo of DGGE gel electrophoresis for bacterial flora at packed media taken from a biofiltration system treating VOC mixture of 2-Methyl-1-propanol and toluene

から Lane B3 は充填層のガス流入側、中間、出口側からそれぞれ取り出した担体試料の解析結果を、Lane 1、Lane 2、Lane 6 は担体をミニカラムに移行後、1 日目、2 日目、6 日目に採取した試料の解析結果を示している。主要なバンドを切り出し再増幅して得られた PCR 産物に対してシークエンス作業を行い、BLAST サーチによる菌株の同定を行なった。結果を **Table 1** に示す。

Table 1: Photo of DGGE gel electrophoresis for bacterial flora at packed media taken from a biofiltration system treating VOC mixture of 2-Methyl-1-propanol and toluene

Band	Species	Similarity	
		BP	ratio(%)
1	Uncultured bacterium	391/411	95.1
2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	489/497	98.4
3	<i>Comamonas</i> sp.	484/498	97.2
4	<i>Chromobacterium haemolyticus</i>	491/509	96.5
5	Uncultured bacterium	446/484	92.1
6	Uncultured bacterium	445/476	93.5
7	<i>Pseudomonas butanovora</i>	434/450	96.4

3.2 結果と考察

実験結果から、脱臭装置内には多数の微生物が存在し、フロラを形成していることがわかる。Lane B1 から Lane B3 (**Fig.1** 内左側) を比較した結果、フロラ構造に大差は認められなかった。本装置は、単位容積当りのガス処理速度を向上させる目的で、充填層内に均質に微生物を繁殖させるための構造を有しているが、本測定範囲内ではその目的が達成されていたと判断された。

次に装置内充填層から採取した試料とミニカラムに移行後採取した試料の結果 (**Fig.1** 内右側) を比較してみると、移行後に新種の繁殖が確認された (四角で囲まれた部分)。しかし、フロラ全体で比較するとほぼ差異はないと判断され、ミニカラムの一週間での観察期間の間にも変化はみられなかった。なお、バンド 2, 3, 7 はそれぞれ *Rhodococcus* 属、*Comamonas* 属、*Pseudomonas* 属のバクテリアであった。これらの菌株は VOC 物質を分解するという報告があり、本装置でも対象物質の分解に関わっている可能性が高い。

4. 多成分 VOC ガスを処理対象とした生物脱臭装置内における微生物群集の解析

4.1 概要

6 種混合ガスを処理している生物脱臭装置内において、異なる採取日のフロラ（マクロ分布解析）、また装置内の充填担体を内部-外部に切り分けた際のフロラ（マイクロ分布解析）を、それぞれ PCR-DGGE 法を用いて観察した。マイクロ分布解析においては **Fig.2** に示す形で担体の内部と外部を切断分取した。主要なバンドの PCR 産物に対して DNA シークエンスを行い、BLAST サーチにより菌株の同定を行なった。

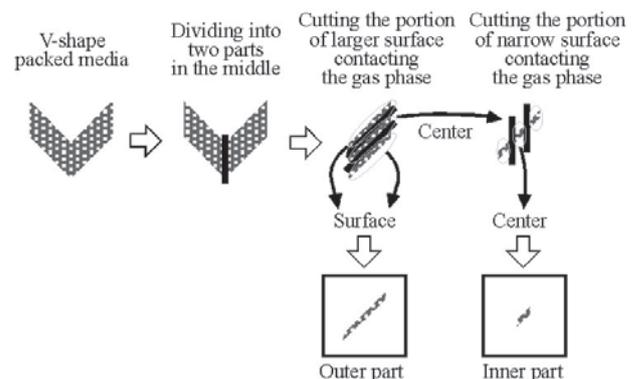
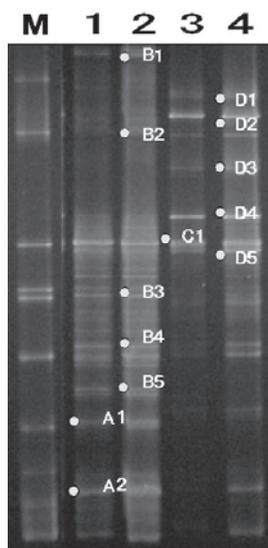


Fig.2: The method to cut and divide a packed media into the outer and the inner portions

4.2 結果と考察

Fig.3 は、担体内部-外部の DGGE 結果の比較である。運転 24 日目および 87 日目の担体内外部では、概ね同一位置にバンドが見られたものの、その濃さに差異が



Band No.	Elapsed time until the sampling moment	Sampling position
M	(Marker)	
1	24 days	Inner side
2	24 days	Outer side
3	87 days	Inner side
4	87 days	Outer side

Fig.3: Photo of DGGE gel electrophoresis for bacterial flora at inner and outer portions of packed media taken from a biofiltration system treating 6 VOC compounds mixture

5. 結論

PCR-DGGE 法を用いて、ガス状汚染物質の生物処理装置である生物脱臭装置を対象に、微生物フロアの経時変化および空間分布を観察した。主な結果は以下の通りであった。

- ①装置内充填層の位置による微生物フロアの著しい差異は認められず、対象の装置は微生物分布の均質化という目標を概ね達成できていたと判断された。
- ②菌株の同定結果より、VOC 物質の分解能を持つ *Rhodococcus* 属、*Comamonas* 属、*Pseudomonas* 属のバクテリアの存在が確認された。
- ③充填担体の外部と内部の微生物フロアを比較した結果、外部にのみ高密度で存在する菌株が存在した。

- ④装置内で、短期間では微生物フロアの大きな変化は見られなかったが、長期にわたる場合に一部菌種の消長が観察された。

本報では、観察対象の装置の微生物生態環境としての側面を PCR-DGGE 法を用いて診断し、概ね目標としている適切な微生物分布を有していることが確認された。今後は、菌体（バイオマス）が異常繁殖する前後や、処理性能に極端な変化が生じる前後でのフロアの変化を観察し、その成果に基づいて、PCR-DGGE 法を利用した装置の維持・管理手法を確立する必要がある。

参考文献

- 1) 奥西将之, 樋口能士: 生物脱臭装置を用いたトルエン分解に関わる微生物相の変遷, 第 20 回におい・かおり環境学会講演要旨集, pp79-82 (2007)

見られた。バンドの濃淡すなわち DNA 濃度の大小は、微生物量の大小に対応していると考えられるため、こうしたバンドに対応した属種の存在密度は、担体内部で低く外部で高いと判断された。VOC ガスに直接接触している外部のみで高密度に存在するこうした菌種は、VOC ガスを特異的に代謝する属種である可能性が高い。一方、外部-内部を通じて均等に分布している菌株は、外部の微生物が分解せずに内部へ拡散した VOC ガスの分解、あるいは他の微生物による代謝物の分解などに関与していたと推察される。一方、24 日目と 87 日目ではフロアに経時変化も認められた。例えば図中のバンド B5 は、24 日目には明瞭に表れているが 87 日目には消失している。既往の研究¹⁾では、生物脱臭装置の処理特性に変化が生じている時期に装置内の微生物フロアにも変遷が見られており、本研究でも同様の状況が観察された。さらに、同日に採取した担体の内外部でも相違が見られた。