

VII-9

高温接触酸化処理法における微生物群集の
FISH法およびキノンプロファイル法を用いた解析

東京大学大学院工学系研究科 学生会員 栗栖 太

正会員 佐藤 弘泰、味埜 俊、松尾 友矩

1. はじめに

高温接触酸化処理法は、高濃度の有機性排水を処理する方法として近年開発された。本法では担体となる木片に排水を吸収させ保持し、木片間の間隙に送気することにより酸素を供給する。微生物による有機物の酸化分解によって放出される熱により、反応槽は45-75℃に保たれ分解反応が進行する。処理が高温で進行するので、適切な運転条件下では投入した水分をすべて水蒸気として系の外に排出させることができる。

演者らは、本処理法の処理機構を、微生物群集の挙動に基づいて解明するべく研究を進めている。FISH法・キノンプロファイル法は培養を必要とせず、実状に近い群集組成に関する情報が得られることから、これらの手法を用いた微生物群集の解析を行った。

2. リアクター運転条件

実験装置の図をFig.1に示す。反応槽容積は10Lであり、槽内は常時ゆっくりと搅拌した。担体には2-4mm大の木片をもちいた。基質はペプトン・酢酸ナトリウムを主な炭素源とした人工基質（9700mgC/L）とし、1日1回投入した。また、基質とともにコーン油（790mgC/g）も投入し、自然でできる濃度（＝投入した基質の持つ熱量で基質の水分が蒸発できる濃度）となるようにした。実験前半（Run 1）および後半（Run 2）の運転条件をTable 1に示す。これは反応槽の熱収支を改善するための条件変更である。ここでRun2においては、装置上の問題により反応槽外部（搅拌モーター）から熱が供給されてしまう結果となった。Run1の運転を開始する際に、嫌気好気式活性汚泥（MLSS:4000mg/L）200mlと水800mlを加え、植種と含水率の調整をした。なお、Run2では、Run1の木片を引き続き使用したため、植種は行っていない。

3. 反応槽の温度変化と炭素ベースの分解率

Fig.2は、反応槽内の温度を示したものである。また図中、矢印で示した期間は反応槽の加温を行ったことを示す。Run1のうちで、反応槽が50℃に保たれている間は平均して投入炭素源の90%が排出され（Fig. 3）、良好な分解を示した。しかし、加温を中断すると、温度が下がり、分解率も悪くなった。

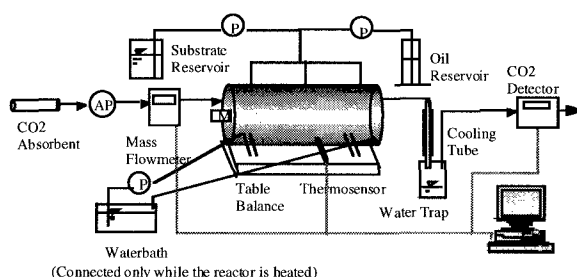


Fig.1 Experimental Setup of TCOP Reactor. The reactor is wrapped in insulation (not shown above).

Table 1 Operation condition for Run2, changed from Run1

	Run1	Run2
Insulation	single roll	double roll + styrofoam box
Heat-loss coeff.	$16.4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	$8.7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$
Media	4L	6L
Substrate	200mL/d	300mL/d
Corn oil	20mL/d	40mL/d

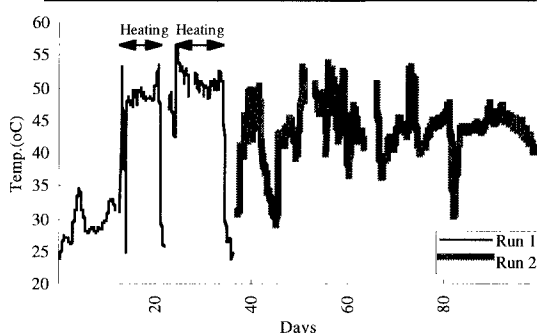


Fig. 2 Hourly change in temperature

キーワード：高温接触酸化処理法・微生物群集解析・FISH法・キノンプロファイル法

〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1 Tel. 03-3812-2111 ext. 6248 Fax. 03-5802-3756

Run2においては、攪拌が停止していた期間（42-45日目）を境に、徐々に分解活性が落ちてゆき（Fig.3）、投入した油や基質が反応槽内に蓄積していった。Run2の後半において、非常に分解率が低いにも関わらず反応槽内温度が40℃以上に保たれているのは、上述のような外部からの熱供給があったためである。Run2においてRun1より分解率が低く、また悪化していった原因としては、反応槽内に油分が蓄積していく過程で、担体の微生物保持能力・保水力・酸素供給能力が悪化していったためと思われる。

4. 微生物群集解析

1) FISH法による解析結果

リアクター内の生物相を、Table 2に示すプローブを用いてFISH法により定量し、比較したものがFig.4である。なお、サンプルとしては、担体に除菌水を加えて超音波分散により抽出したものをを用いた。

2.5日後・12日後では、その組成に違いはあるものの、Proteobacteriaが全体の大きな割合を占めていた。ところが、30日後以降のサンプル（30,57,72,80,88日後）においては、EUBプローブでは鮮明に検出できるにもかかわらず、残り5種類の群特異的プローブではそのほとんどが検出できなかった。EUBのみで検出される菌は、一様に短径1μm弱、長径3μm程度の桿菌であった。

2) キノンプロファイル法による解析結果

Run2の運転開始前(37日目)、及び57,72,80,88日目(Run2)のサンプルのキノンプロファイルをとったものがFig.4である。ここで、37日目のサンプルは、Run1運転終了後20日間室温・準好気状態で放置されていたものである。

Run2の運転開始前から運転開始後20日の間にプロファイルは大きく変化し、群集組成が変わっていることを示唆している。しかし、それ以降はプロファイルがあまり変わっておらず、MK-7が常に全体の7割以上を占めていた。

3) 群集解析のまとめ・考察

2.5,12日後の反応槽温度は30℃前後の中温領域であり、30,57,72,80,88日後は45-50℃付近の高温領域である。FISH法による解析で明らかになった群集構造の違いは、反応槽温度の違いによるものと思われる。すなわち、運転初期の中温領域では、Proteobacteriaを主体とした菌相を形成しており、その後高温になった時に菌相が大きく変化し、好温性の細菌が優占となったと結論できる。

45-50℃付近の高温条件下で優占となっていた菌種としては、FISH法・キノンプロファイル法の結果をあわせると、グラム陽性低G+C群の数が考えられる。その中でも、*Bacillus*属が既知の好温性の種を含んでおり、もっとも可能性が高いのではないと思われる。

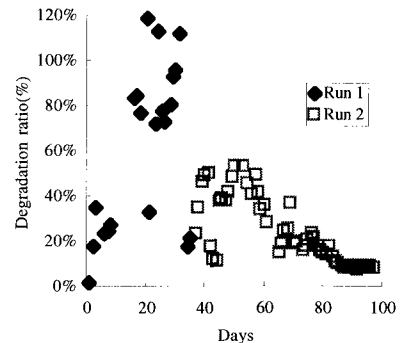


Fig. 3 Degradation ratio based on carbon

Table 2 Oligonucleotide Probe for FISH analysis

Probe	Specific to
Eub338	(Eu)Bacteria
Alf1b	α-subgroup
Bet42a	Proteobacteria β-subgroup
Gam42a	γ-subgroup
CF319a	most Cytophaga-Flavobacterium
HGC69a	Gram positive bacteria with high G+C content

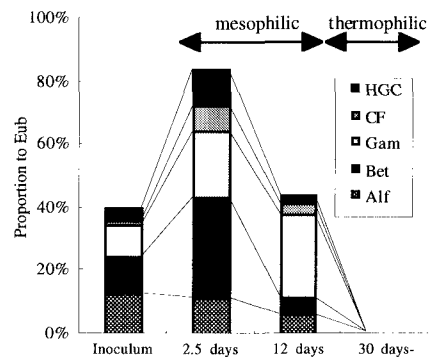


Fig.4 Bacterial Population analyzed by using FISH method. '30days-' stands for 30, 57, 72, 80, 88 days.

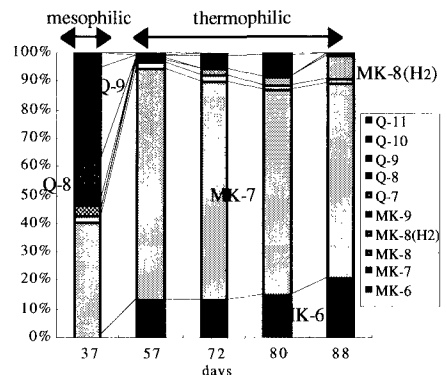


Fig.5 Change in quinone profile