

消化汚泥のメタン活性試験と FISH 法による嫌気性細菌の観察

日本下水道事業団 技術開発部 正 ○田中 松生 三羽 宏明
長岡技術科学大学 環境システム系 正 関口 勇地 正 原田 秀樹

1. はじめに

嫌気性消化プロセスより生じる消化ガスの有効利用は、地球温暖化ガス削減分と評価でき、下水処理施設においても、今後、積極的な消化ガスの利用と更なるメタン収率の向上が求められてくる。最終的にメタン転換を担う経路には酢酸および水素資化性のメタン菌群が存在し、これら菌群のバランスが安定した消化ガスの発生およびガス組成に関連するものと考えられる。このため本調査では国内で稼働している中温消化タンク（～45℃未満、平均 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ ）から採取した汚泥を対象に、酢酸及び $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ を基質としたメタン活性試験（H10 年 10 月, 28 箇所 ; H11 年 10 月, 10 箇所）を実施し、11 年度の調査ではメタン活性試験と同時に FISH 法によって嫌気性菌の観察を行った。

2. バイアル瓶によるメタン活性試験

活性試験は、バイアル瓶（120ml）中に消化汚泥を（16～20ml）採取し、表 - 1 に示すとおり基質、緩衝液、栄養塩類を加え液相部 50～40ml とし、37℃にて嫌気状態で振とう培養させ経時的に発生するメタンガス量を測定し、活性速度を求めた。この手法では基質が律速とならない条件で培養を行うため、消化汚泥中に存在する潜在的なメタン菌群の活性を評価することが出来る。試料汚泥自体に高濃度の塩類が含まれているが、実験では所定のミネラル、リン酸緩衝剤（25mM）、を加え、 $\text{pH} = 7 \pm 0.2$ となるようバイアル試験開始時に pH 調整を行った。

表-1 メタン活性試験条件

試験基質	酢酸	H_2/CO_2
気相 ml	72	82
液相 ml	50	40
基質濃度 mgCOD/l	2000	80/20(%v/v)
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ mg/l	250	250
NaHCO_3 mg/l	1000	3000
栄養塩・微量元素	適宜	適宜

表-2 FISH法-プローブと特異細菌

プローブ	特異細菌
EUB338	細菌特異的
ARC915	古細菌特異的
MX825	<i>Methanosaeta</i> 特異的
MS1414	<i>Methanosarcina</i> 等特異的

3. FISH 法による嫌気性菌の観察

（試料の固定） 消化汚泥の採取は、安定し汚泥が引き抜かれている時間帯に採取に出向き、消化汚泥 10ml を 5 % パラホルムアルデヒド溶液 40ml にて固定し、冷温した状態で 1 ～ 約 30 時間内に試験室に持ち込み、PBS による洗浄後、エタノール + PBS 溶液によって -20°C で保存しこれを試料とした。採取時の消化汚泥濃度は 7,000～15,000mg-VS/l であった。

（EtBr 全菌染色） 固定した試料を希釈したものをメンブレンフィルターでろ過し、Ethidium Bromide で染色後、顕微鏡観察によって、VSS 当りの全菌数を測定した。（×1000 倍希釈 15 視野）

（FISH 法による観察） In situ hybridization には、16S rRNA の一部を標的とした表 - 2 に示すプローブを利用した。消化汚泥に対する in situ hybridization は hybridization buffer（0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl [pH7.2], SDS 0.01%）を用い、46℃で 2 時間行った。その stringency はホルムアミドの濃度（EUB338, 5% ; ARC915, 35% ; MS1414, 35% ; MX825, 20%）によって調整を行った。プローブの洗浄は、プローブを含まない同ホルムアミド濃度の hybridization buffer を用い、48℃で 20 分を行った。落射顕微鏡はオリンパス BX-50 を用い 1 サンプル 15 視野の観測から菌数を測定した。

キーワード 下水汚泥 中温嫌気性消化 メタン活性 FISH 法 ARC915

（連絡先）〒335-0037 戸田市 下笹目 5141 Tel 048-421-2693 Fax 048-421-7542

(DAPI 染色)

FISH 法での観察が終了したスライドグラス上に DAPI 染色溶液 (10 μ g/ml) を 10 μ l 滴下し、約 5 分間室温で染色し、蒸留水でリンスした後、室温で乾燥させ、落射顕微鏡での観察を行った。DAPI でカウントした同視野でのプローブによるカウント数を求めた。

4. 実験結果

図-1 は H10 年 10 月および H11 年 10 月実施した酢酸と水素資化性メタン活性試験の関係を同じグラフにプロットしたものである。酢酸基質の活性値と H_2+CO_2 基質の活性が正の相関関係にあるプロットの一郡と、相対的に水素資化性の活性値が低い傾向にある汚泥が観測出来た。図-2 は Ethidium Bromide で染色した全菌数とメタン活性試験の関係を示したものである。VS 当りの全菌数の上昇とともにの最大活性値を示すプロットの分布は高まる傾向にあった。

消化汚泥の嫌気性細菌の FISH 法による観察では、プローブの蛍光が非常に弱く、夾雑物も多くカウントは非常に困難であったが、ARC915 プローブでの観察では、消化汚泥の全般的な傾向として *Methanosaeta* 様の菌体が多く確認され、*Methanospirillum* 様の菌体がかろうじて検出された。

MX825 プローブでは明らかに *Methanosaeta* とわかる菌体の蛍光が観察された。MS1414 での観測では、相当数の視野を観測したが、それ様の菌体の確認は難しかった。EUB338 プローブでは多種の形態を持つ菌体を多数検出した。DAPI 染色による全菌数に対する EUB338 標的菌数と ARC915 菌数はそれぞれ平均値で 63%、12%であった。(表-3) しかしながら MX825、MS1414 標的菌数のカウントは信頼できるものではなかった。

5. まとめと課題

・酢酸資化性メタン活性は 0.05~0.20kg-COD/kgVS/day の範囲に活性があり、水素資化性メタン活性は 0.02~0.35kg-COD/kg-VS/day と広範囲に値が分布した。

・ARC915 プローブを用いた観察では *Methanosaeta* 様の古細菌が多く観測された。蛍光が弱い理由として r RNA の含有量が少ないことが考えられるが、今後さらにこれら消化汚泥を対象とした FISH 法について検討する必要がある。

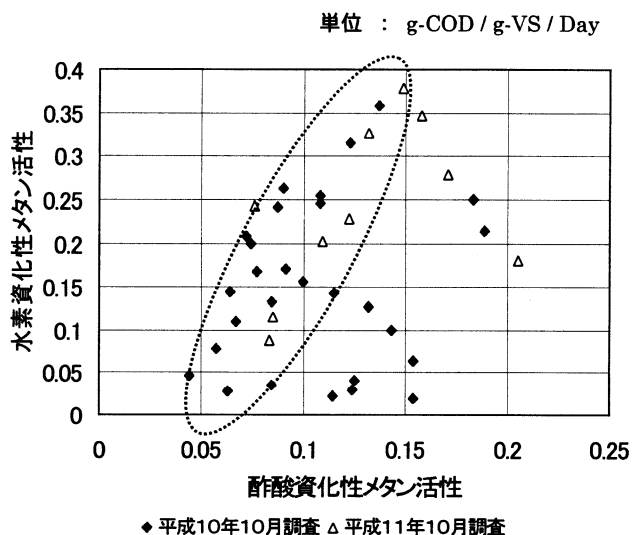


図-1 メタン活性試験結果

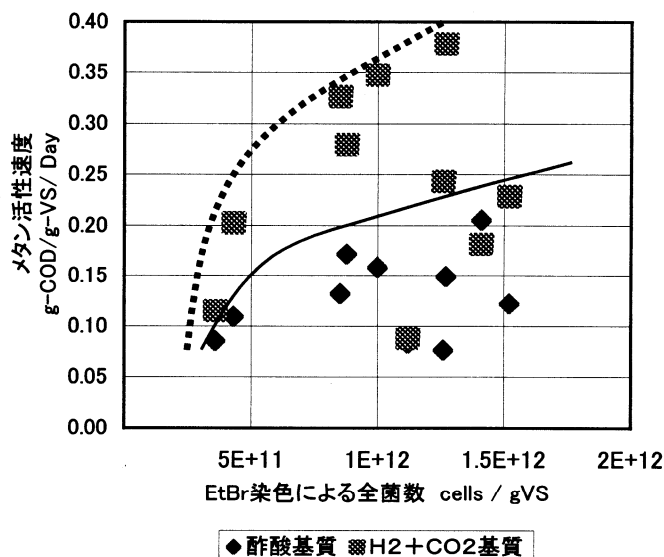


図-2 EtBr 全菌数 - メタン活性値

表-3 全菌数 (DAPI) に対する標的細菌の割合 単位: %

N0.	EUB338	ARC915
AD-1	59	20
AD-2	69	9
AD-8	68	8
AD-9	72	13
AD-10	72	14
AD-14	55	10
AD-15	53	11
AD-16	57	16
AD-19	60	14
AD-25	68	7
平均	63	12