

高温 UASB グラニュール表面に存在する新規繊維状細菌の解析

長岡技術科学大学 山田剛史、高橋弘希、
関口勇地、大橋晶良、原田秀樹

1. はじめに

UASB反応槽内に形成されるグラニュール汚泥の表面では、しばしば非常に細い繊維状の微生物によって覆われていることが観察される。特に高温域(55°C付近)で運転を行うUASB反応槽内部で形成されるグラニュール表面では、ほぼ普遍的にこの種の微生物の存在が確認されており、この微生物が高温グラニュール形成機構において重要な役割を担っていることが推定されている。我々の研究室では、高温UASB反応器を用いて各種産業廃水の適用試験を数多く行っているが、それらの反応槽内部では必ずこの種の繊維状細菌がグラニュール表面を覆っていた。先の報告により[1]、このグラニュール表面を覆う微生物が分子系統的にGreen non-sulfur bacteriaに属する人為的に培養されたことのない細菌であることを推定したが、その生理学的な特徴やグラニュール内での役割については全くわかっていない。本研究では、高温グラニュール表面に存在する繊維状細菌を分離し、その生理学的な特徴を把握することによって、本繊維状細菌が高温UASBプロセスでどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。本研究では特に、高濃度の固形性有機物を含有する油揚げ製造廃水を供した高温UASB反応槽で観察された“ウニ状”グラニュール汚泥に着目し、その表面を構成していた繊維状細菌の解析と分離・同定を行ったので報告する。

2. 実験方法

油揚げ製造廃水処理高温UASB反応槽

油揚げ製造廃水を供する高温UASB反応槽には有効容積25Lの多段型高温(55°C)UASB反応器を用いた。使用した廃水はCOD_{Cr}濃度が約22,000mg/Lで、そのうちの約60%がタンパク質、脂質で占められていた。

油揚げ製造廃水処理高温UASB反応槽内のグラニュール汚泥の解析

UASB反応槽内保持微生物の解析には、実体顕微鏡、電子顕微鏡、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いて行った。反応槽内で形成された“ウニ状”グラニュールのFISH解析には、green non-sulfur bacteriaの一部の細菌を検出できるGNSB633プローブ[1]、及び古細菌を検出するARC915プローブを使用した。

繊維状細菌の培養、分離

繊維状細菌の培養には、油揚げ廃水処理高温UASB反応槽内部のグラニュール表面に出現した“紙縊(こより)”を用いた。“紙縊”部分は、実体顕微鏡観察下で注意深く採取し、幾度かの洗浄の後、培養に供した。集積培養には、スクロースをはじめとした各種有機物を添加し、分散処理を施した“紙縊”部分を植種後、嫌氣的に55°Cで希釈培養した。各希釈倍率において増殖が確認できた菌体には、GNSB633プローブによるFISH法を適用し、目的である細菌のスクリーニングを行った。分離した菌株の16S rDNAの解析は、細菌に特異的なプライマーセットで16S rRNA遺伝子をPCR増幅の後、直接塩基配列を決定した。

3. 実験結果及び考察

油揚げ製造廃水処理高温UASB反応槽でのウニ状グラニュールの出現

油揚げ廃水処理高温UASB反応器は、高温UASBプロセスの適用廃水種拡大を目的として本研究室で運転されていたものである。その内部に形成されたグラニュール汚泥は、電子顕微鏡観察より表面部分は完全に繊維状細菌に覆われていることが観察された。この繊維状細菌はGNSB633プローブによって蛍光を発したため、それらは本研究でターゲットとしているgreen non-sulfur bacteriaに属する細菌であることが確認された。この繊維状細菌を分離するため、このグラニュール表面部分を利用して考え得る限りの様々な培養法を試みたが、全て繊維状細菌以外の全く異なる微生物が増殖し、目的である繊維状細菌を培養することすら不可能であった。

一方、油揚げ廃水を用いてUASB反応槽の運転を継続していたところ、これまでの常識を覆すような興味深いグラニュールが観察された(Fig.1)。ウニを思わせるようなこのグラニュール(ウニ状グラニュール)は、運転を続けていくにつれ表層部より放射状に突起が派生して“紙縊(こより)”を作り、最終的には保持汚泥の大部分を占める

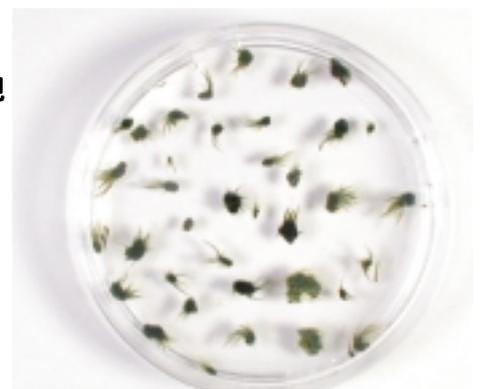


Fig.1 View of urchin-like granules retained in thermophilic UASB reactor.

Keywords : 高温 UASB プロセス、green non-sulfur bacteria、FISH

長岡技術大学 環境・建設系 水圏・土壌環境制御工学研究室

〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1 TEL:0258-47-1611-ext.6313 FAX:0258-47-9600

までに至った。この様なグラニューールの増殖が進行することによる有機物除去効率への影響は見られなかったが、このグラニューールは一般的なグラニューールと比較して浮上しやすく、保持汚泥量が減少していく危険性があることが示唆された。この“紙縊”部分がどういった形態の微生物により構成されているのか把握することを目的として、電子顕微鏡により表面を観察した。その結果、非常に細い繊維状微生物により構成されていることが判明した。これら繊維状微生物は、先にグラニューール表面を覆っていた繊維状細菌に形態的に類似しており、これらに特異的なDNAプローブGNSB633を用いてFISH法を適用した結果、ほぼその全ての部分を構成している繊維状微生物が蛍光を発することを確認した(Fig.2)。これにより、グラニューール表面に生息する繊維状細菌が異常増殖することで放射状に“紙縊”を形成し、本来のグラニューールの形態を変化させていたことが示唆された。そして、この繊維状細菌の過度な増殖はグラニューールのバルキング現象を引き起こす要因ともなるという一面もあるということが明らかになった。

“紙縊”部分を構成する繊維状細菌の分離の試み

以上のことから、GNSB633プローブで蛍光を発する繊維状細菌は、高温UASBプロセスにおいて、グラニューールの形成というプラスの面とグラニューールのバルキング化というマイナス面を司る細菌であることが示唆された。しかし、どのような要因がこの微生物の過度の増殖などに寄与しているのかということとは不明であった。それを明らかにするには、この繊維状細菌を分離し、その生理学的な特徴を把握する必要がある。先に述べたように、油揚げ廃水処理プロセスにおいて“紙縊”グラニューールの形成が観察されるまで本繊維状細菌を選択的に培養する有効な手段が見いだせなかったが、“紙縊”部分のほとんどがGNSB633プローブと反応する微生物によって構成されていることが判明したため、この部分を利用して希釈培養を試みればその選択的培養は可能であると考えられた。いくつかの基質を試した結果、スクロース(20mM)+抽出酵母(0.01%)、またグルコース(20mM)+抽出酵母(0.01%)を添加した系において、最も高い希釈倍率で繊維状かつGNSB633プローブと反応する細菌をほぼ純粋に培養することが可能であった。なお、植種の希釈倍率が低い系においては、形態の異なる、GNSB633プローブと反応しない細菌が選択的に増殖していた。目的である繊維状細菌の増殖が確認された系を、数回の継体培養の後ロールチューブ法に供し、系内の繊維状細菌を分離したところ、Fig.3に示すような株(UNI-1株)を分離することができた。本菌株の16S rDNAの塩基配列を決定したところ、系統的にGreen non-sulfur bacteriaに属したが、現在まで分離されている細菌の16S rDNAとは、最大でも80%以下の相同性を示すものであった(Fig.4)。従って本菌株はGNSB633プローブでも推定された通り、近縁な細菌が全く培養されていないものであった。

今後の予定

この繊維状細菌は、先に述べたとおり、グラニューール化及びそのバルキング化に重要な役割を担っていると考えられる。従って、この細菌のコントロールは、高温UASBプロセスを安定的に運転する上で重要となるであろう。今後は、この株の詳細な生理学的特徴を把握すると共に、この細菌が、グラニューール形成、また“紙縊”を形成し“嫌気性バルキング”を引き起こすメカニズム等を調査する予定である。

4. 参考文献

[1]Sekiguchi et al.1999, *Appl. Environ. Microbiol.*65,1280-1288

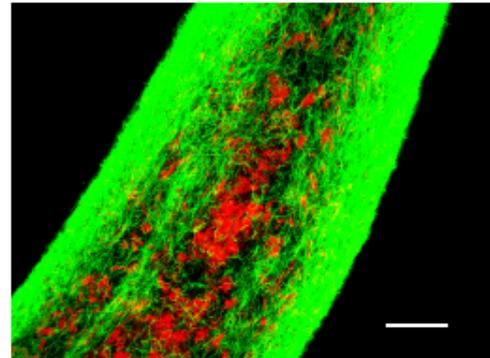


Fig.2 In situ hybridization of twisted paper string portion(koyori-like portion) viewed by confocal laser scanning microscopy. koyori-like portion simultaneously hybridized with Cy-5-labeled archaeal domain probe(ARC915, indicate as red) and rhodamine-labeled GNSB633 probe (for green non-sulfur bacteria, indicate as green)(bar 50 μ m)

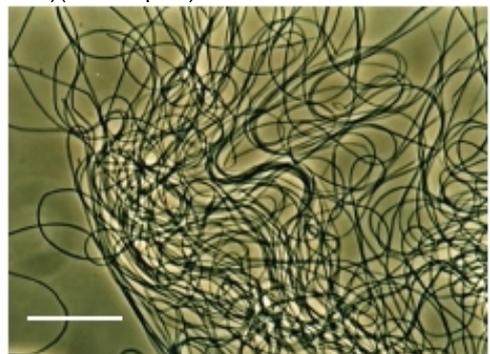


Fig.3 Phase contrast micrograph of filamentous anaerobes isolated in this study(bar 20 μ m)

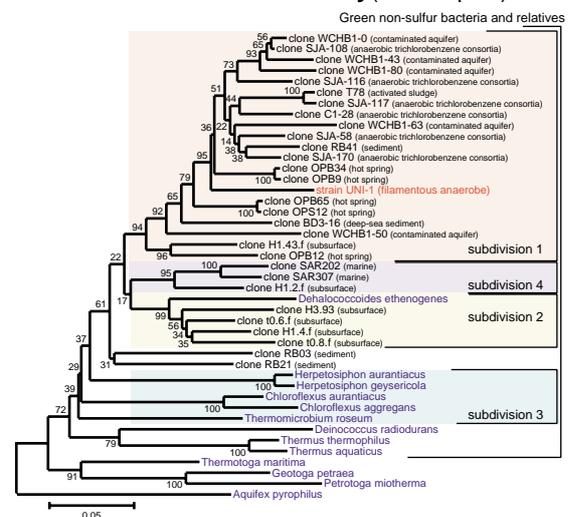


Fig.4 Phylogenetic tree of strain UNI-1 in the green non-sulfur bacteria. The habitat source of each environmental sequences is indicated in a bracket.