

嫌気性バルキング現象に関与する新規糸状性細菌の解析

長岡技術科学大学 ○(学) 山田 剛史、(正) 井町 寛之、
(正) 大橋 晶良、(正) 原田 秀樹
産業技術総合研究所 (正) 関口 勇地、(正) 鎌形 洋一
富士化水工業株式会社 (正) 白石 皓二

1はじめに

良好な沈降性を示す UASB グラニュール汚泥の表面には、糸状性微生物がその全体を覆うように存在していることがしばしば観察される。このことは、これらの糸状性微生物がグラニュール汚泥の形成において重要な役割を担っていることを示唆している。さらに、これらの糸状性微生物が何らかの原因によって異常増殖し、沈降性の悪い汚泥を形成する現象（嫌気性バルキング）を引き起こすことも確認されている [1]。従って、この種の微生物は良好なグラニュール汚泥の形成とともにその維持においても重要であり、その詳細な知見を得ることは UASB 反応槽を安定的に運転する上で極めて重要な課題である。

先に報告した研究により、我々は高温グラニュール汚泥表面に存在する糸状性細菌が Green non-sulfur bacteria (GNSB), subdivision 1 (SD1) に属する細菌であることを示すとともに、このグループに属する細菌が嫌気性バルキングを引き起こすことを明らかにした [1]。現在までのところ、嫌気性バルキング現象を引き起こす可能性を有する微生物として認知されている微生物はこの種の細菌のみである。しかしながら、最近、食品加工工場からの糖系廃水を処理する中温性 UASB 反応槽内において、GNSB, SD1 細菌とは形態学的に明らかに異なる微生物によるとと思われるグラニュール汚泥のバルキング化が観察された。興味深いことに、本処理プロセスにおいては、バルキングを起こす前のグラニュール汚泥表面にバルキングを引き起こしたと考えられる糸状性微生物と形態学的に類似した微生物が観察されていた。本研究では、バルキング化した本グラニュール汚泥を詳細に解析し、そのバルキングの原因微生物の特定と、その分子遺伝学的同定、及びその微生物の特異的検出技術の確立を行った。また、バルキング化する前の汚泥表面に存在していた糸状性微生物の同定を行い、バルキング原因菌と思われる微生物との関連を調査した。

2実験方法

糖系廃水処理中温 UASB 反応槽内のバルキング化グラニュール汚泥の解析

バルキング化した中温 UASB 反応槽内保持微生物の解析では、各種光学及び電子顕微鏡による形態観察、16S rRNA 遺伝子に基づくクローンライブラリー法による分子遺伝学的同定、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法による特異的検出を行った。グラニュール汚泥内構成微生物のクローンライブラリーの作成は、バルキング化した汚泥部より DNA を抽出し、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットで PCR 増幅後、クローニングを行い、得られたクローンをランダムに 30 個解析した。糸状性細菌を特異的に検出する DNA プローブの設計は、得られたクローン配列を元にして、ARB プログラム (<http://www.arb-home.de/>) を用いて行った。FISH 解析では、GNSB 細菌を特異的に検出する GNSB936 プローブ [2] と、古細菌を特異的に検出する ARC915 プローブ、真正細菌に特異的な EUB338 プローブ、及び新規糸状性細菌用に設計した新規プロローブ (3KSB1238: 5'-CCGCTGTCCTCCCCATT-3') を利用した。

バルキング化前のグラニュール汚泥内におけるバルキング原因糸状性細菌の空間分布

バルキング化する前の良好な沈降性を示していたグラニュール汚泥内におけるバルキング原因糸状性細菌の空間的分布を把握するため、グラニュール汚泥の切片を作成し、各種プロローブ (3KSB1238 プローブ 及び古細菌を特異的に検出する ARC915 プローブ) による FISH 法を適用することで特定した。

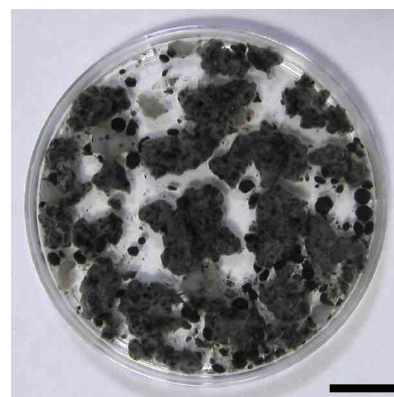


Fig.1 Photograph of bulking granular sludge. (bar, 1.0cm)

3. 実験結果及び考察

糖系廃水処理中温 UASB 反応槽内のバルキング化グラニュール汚泥の解析

Keywords : UASB、グラニュール汚泥、嫌気性バルキング現象、糸状性細菌、FISH

長岡技術科学大学 環境・建設系 水圏・土壌環境制御工学研究室

〒941-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 TEL: 0258-47-1611-ext.6646 Fax 0258-47-9630

食品加工工場から排出される糖系廃水を処理する UASB 反応槽では、極めて沈降性の良いグラニュール汚泥が形成されていた。しかしながら、その処理に伴い汚泥が急激に浮上し全く沈降しなくなる現象が観察された。その汚泥を観察したところ、白く比較的粘性の高いフロック状の物質が発生し、それが汚泥の大部分を占めていた (Fig. 1)。グラニュール汚泥の多くはそのフロック状の物質に覆われており、複数のグラニュール汚泥がその中に内包された形でワフワフした大きな集塊体を形成していた。その白いフロック状の物質を顕微鏡観察したところ、その大部分が比較的太い糸状性微生物によって構成されていることが明らかになった。従って、本プロセスで観察された汚泥の浮上現象は本糸状性微生物の異常増殖によるバルキング現象であることが判明した。この形態は、現在まで知られている GNSB,SD1 細菌とは明らかに異なるものであった。本フロック状物質に対し FISH 法を適用したところ、GNSB,SD1 細菌に特異的なプローブ (GNSB936) や古細菌に特異的な ARC915 プローブでは蛍光を発しないが、細菌に特異的なプローブ (EUB338) で蛍光を発した。本結果より、本糸状性微生物は少なくともの真正細菌に属すると推定されたため、フロック状の物質から DNA を抽出し、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子用のプライマーセットで PCR を行い、クローン解析 (30 クローン) を行った。その結果、最も高頻度に検出されたクローン (30 クローン中 27 クローン) は、分子系統的にどの門にも属さない極めて新規な細菌由来の塩基配列であった。得られた塩基配列が、フロック状物質に優占的に存在する糸状性微生物由来のものであるかを確かめるため、この塩基配列に特異的な DNA プローブ (3KSB1238) を作成しバルキング汚泥に対して FISH 法を適用した。その結果、本プローブは、フロックを構成する糸状性細菌のみを特異的に検出することが判明した (Fig. 2)。以上のことから、本糸状性細菌は、現在まで全く分離・培養されたことのない、門レベルで未知な細菌であることが明らかとなった。

バルキング化前のグラニュール汚泥内におけるバルキング原因糸状性細菌の空間分布

次に、バルキング化前のグラニュール汚泥に、本研究で作製したバルキング原因糸状性細菌を特異的に検出するプローブを適用した。その結果、グラニュール汚泥表面に存在する糸状性微生物が本プローブと反応することが観察された (Fig. 3)。本グラニュール汚泥の電子顕微鏡観察を行った際、グラニュール汚泥表面が比較的太い糸状性細菌によって覆われていたことが確認されていたが、本微生物がバルキング原因細菌と同じ種類の微生物であることが明らかとなった。以上の結果は、以下の点を明らかにした。(1) 白いフロック状のバルキング化を引き起こす原因微生物は門レベルで未知な糸状性微生物である。(2) 本微生物は、通常グラニュール汚泥の表面付近に存在する。(3) グラニュール汚泥表面に存在する本糸状性細菌が、何らかの原因で異常増殖を起し、汚泥のバルキング化を起している可能性がある。この現象は、先に報告された GNSB-SD1 細菌群の挙動と類似している。

4. 今後の予定

今後は、本糸状性細菌の分離・培養を行った後、その詳細な生理学的情報を調査することによって、どのような影響により本細菌が異常増殖し、グラニュール汚泥のバルキング化引き起こすかを明らかにしていく。

5. 謝 辞

本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発」の助成を受けて行われた事を付記して謝意を表します。

参考文献

- [1] Sekiguchi et.al. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5740-5749
- [2] 山田ら 第35回水環境学会講演会講演集, 391

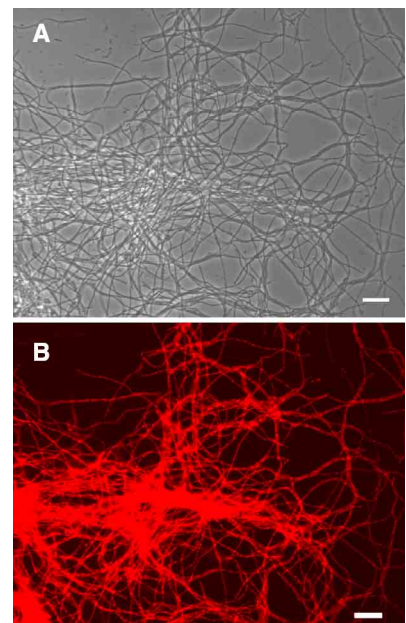


Fig.2 In situ hybridization of novel filamentous microbes with 3KSB1238 probe. (A) Phase contrast micrograph. (B) Fluorescent micrograph of the same field as panel A, showing that the filamentous cells were stained with 3KSB1238 probe (bar, 20μm).

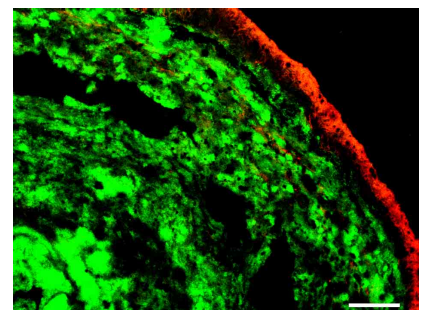


Fig.3 In situ hybridization of section of granular sludge with 3KSB1238 (red) and domain Archaea specific probe ARC 915 (green) (bar, 50μm).