

## 酢酸塩・プロピオン酸塩を炭素源に用いた SBR の長期運転による微生物群集構造の変化

九州大学大学院 学生会員 永淵慶彦 九州大学

中村圭一

九州大学大学院 正会員 久場隆広

## 1. 目的

生物学的リン除去プロセス(EBPR)は、下水高度処理において広く用いられている。一方で、リン除去を担う微生物に関しては単離が困難であるため、その生化学的知見が不足している。近年、分子生物学が急速に発展したことにより、PCR法やDGGE法、FISH法を用いた複合微生物全体の群集構造解析が可能となった。そこで本研究では、炭素源等の運転条件を変化させた2つのSBR(SBR AとSBR P)を運転し、SBR内複合微生物系解析を行った。これによって、リン除去活性の高まりに伴う菌相の変化の把握や、リンの放出・摂取に関わる菌種の特性を目的とした。

## 2. 研究手法

## 2.1 SBR運転条件

2つの連続回分反応槽(SBR AとSBR P)を運転した。SBR Aは福岡市東部下水処理場のA<sub>2</sub>O法の無酸素槽より、SBR PはAO法の好気槽より種汚泥を採取した。リアクターには、有効容積4Lのジャーフェメンタを用いた。基質流入工程4分間を含む嫌気工程180分間、硝酸塩添加工程4分間を含む無酸素工程150分間、沈降時間25分間、流出工程5分間の1サイクル6時間で運転した。HRT12時間、SRT20日間とした。温度25℃、pH7.0±0.2に制御した。添加した嫌気工程用基質組成を表1に示す。炭素源として酢酸塩を用いた。無酸素工程開始時に0.25mM/cycleの硝酸塩を添加し、その後、無酸素工程内で消費される範囲内で徐々に添加量を増やした。装置内は、30分毎に5分間窒素ガスを用いて脱気した。SBR PにおけるSBR Aとの運転条件の違いは、炭素源として酢酸塩に代えてプロピオン酸塩を用いた点と、pH7.2±0.2に制御した点である。

## 2.2 化学分析・染色・FISH

定期的に、1サイクルにおけるTOC(酢酸塩もしくはプロピオン酸塩)・リン酸塩・硝酸塩濃度を測定した。同時に、ジャーフェメンタ内のMLSS・MLVSS、流出水中のSSも測定した。また、嫌気工程終了時・無酸素工程終了時に汚泥を採取し、ポリリン酸・PHB染色およびFISH法を施した。ポリリン酸染色にはGoharのボルチン顆粒染色法を、PHB染色にはズダン染色シリーズのBurdon法を用いた。FISH法に用いたprobeは、BET42a、PAO651、RHX991、GAM42a、GAOQ989である(表2参照)。全菌に対する染色としてはDAPI染色を用いた。それぞれのprobeで染まった菌量の全菌に対する割合の算定も併せて行った。

## 2.3 DNA抽出およびPCR-DGGE

SBR内汚泥サンプルからDNAを抽出し、16S rDNAを対象にしたprimer(357f・518r)を用いてPCRを行った。その後、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法により、PCR産物を菌種ごとに分離した。

表1 嫌気工程用基質組成

SBR A	
CH <sub>3</sub> COONa・3H <sub>2</sub> O	566.7 [mg/L] ( 100 [mg-C/L] )
NH <sub>4</sub> Cl	107.0 [mg/L] ( 28 [mg-N/L] )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	36.3 [mg/L]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・12H <sub>2</sub> O	143.4 [mg/L] ( 20 [mg-P/L] )
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	90.0 [mg/L]
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	14.0 [mg/L]
KCl	36.0 [mg/L]
酵母エキス	1.0 [mg/L]
EDTA	3.0 [mg/L]
微量金属溶液	0.3 [mL/L]

SBR P	
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COONa	266.7 [mg/L] ( 100 [mg-C/L] )

表2 FISH法に用いた蛍光 probe

Gene probe specificity	sequence (5'-3')
BET42a - <i>Proteobacteria</i>	gCCTTCCCACTTCgTTT
PAO651 <i>Rhodocyclus</i> spp.	CCCTCTGCCAACTCCA
RHX991 <i>Accumulibacter phosphatis</i>	gTCTCTTgCgAgCACTC
GAM42a - <i>Proteobacteria</i>	gCCTTCCACATCgTTT
GAOQ989 <i>Competibacter phosphatis</i>	TTCCCGgATgTCAAggC

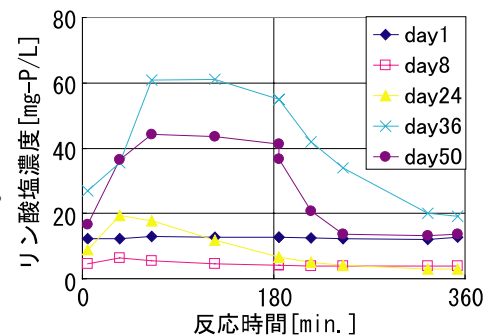


図1 SBR Aにおけるリン酸塩濃度変化

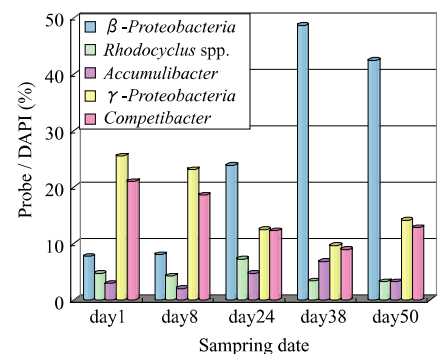


図2 SBR A内の各菌の占有率

キーワード EBPR、SBR、DGGE、プロピオン酸、嫌気、無酸素

連絡先 九州大学大学院 都市環境工学研究室 〒819-0395 福岡市西区元岡744番地

092-802-3424

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 代謝活性比較

各 SBR 内リン酸塩濃度変化を図 1、4 に示す。炭素源として酢酸塩を用いた SBR A の場合、day24 から嫌気工程における明確なリン酸塩の放出が見られた。無酸素工程においては、硝酸添加量が律速となっていたと思われるが、若干の過剰摂取しか観察されなかった。プロピオン酸塩を用いた SBR P の場合、day23 からリン酸塩の放出・過剰摂取が確認でき、day127 ではリン酸塩がほぼ完全に除去された。2つの SBR 共に、脱窒性脱リン細菌の特徴である嫌気工程のリンの放出が確認できるまでに約 20 日間(1SRT 間)を要した。また、リン酸塩の放出は見られるが、無酸素工程におけるリン酸塩の明確な過剰摂取は見られない期間が長期間あった。

#### 3.2 染色・FISH 法による比較

SBR A・SBR P 内に存在する各菌の全菌に対する占有率を図 2、5 に示す。SBR A・SBR P とともに運転開始から約 20 日以降、嫌気工程でのリンの放出量が徐々に増加した。それに伴い、*-Proteobacteria* の増加と *-Proteobacteria* の減少が見られた。また、GAOs 候補である *Competibacter* も同時に減少していたことから、PAOs と競合する GAOs が駆逐される傾向にあったと考えられる。さらに、SBR P においては、ほぼ完全なリン酸塩の除去が観察された day127 に、主要な PAOs である *Rhodocyclus*・*Accumulibacter* の占有率が増加した。プロピオン酸を用いることにより、GAOs の駆逐に加え、リン除去に大きく関わっている PAOs を高濃度集積できる可能性が示唆される。また、SBR A の day36、SBR P の day64 で、PHB または poly-P 蓄積細菌の増加が見られたことから、同時期に増加している *-Proteobacteria* に上述の細菌が多く含まれていると考えられる。

#### 3.3 DGGE バンドの経時的変化

SBR A・SBR P 内汚泥から抽出した DNA 断片に対して DGGE 法を施した結果を図 3、6 に示す。SBR A において、day24 と day36 のバンドパターンを比較すると、新たな菌種が増えバンド数が増加している。FISH の結果から *-Proteobacteria* に属する菌が増加したためと考えられる。SBR P で day1 から day23、64 とバンド数が増加したのも同様の原因であろう。その後 SBR P では day99 以降、徐々にバンド数が減少し、菌叢が単純化される傾向にあった。同時に FISH の結果より主要な PAOs である *Rhodocyclus*・*Accumulibacter* の占有率が増加していることから、特定の PAOs が優占する状態に菌叢が変化すると判断できる。PAOs は増殖速度が遅いため、多様な菌種の存在下では増殖しにくい可能性がある。また、SBR A の day36 において濃くなった DGGE バンド(A1)を切り出し DNA sequence を行った結果 *Dechloromonas* 近縁種であった。SBR P の day99 において淡くなったバンド(P1)は *Thiothrix* 近縁種、濃くなったバンド(P2)は *Dechloromonas* 近縁種であった。

### 4. 結果

異なる炭素源を用いて SBR やスクリーニング装置を運転した。両方の SBR において、リンの放出・過剰摂取が観察され、その後 SBR P においては、ほぼ完全なリン除去と *Accumulibacter* の蓄積を達成できた。このことから、PAOs の高濃度蓄積に対するプロピオン酸の効果が考えられる。菌種に関しては、嫌気工程でのリンの放出は *-Proteobacteria* の増加と相関が高く、リンの過剰摂取は *Rhodocyclus*・*Accumulibacter* の増加と相関が見られた。今回の実験では活性汚泥内の優先種と思われる菌種は DGGE バンドから検出できなかった。

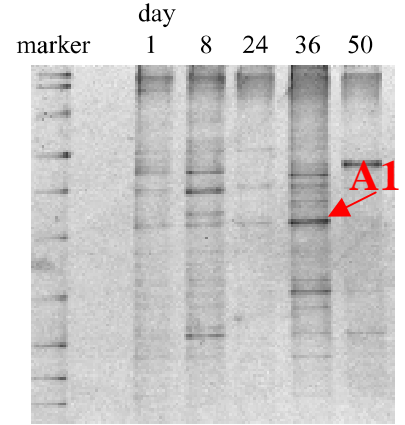


図 3 SBR A 内汚泥 DGGE バンドパターン

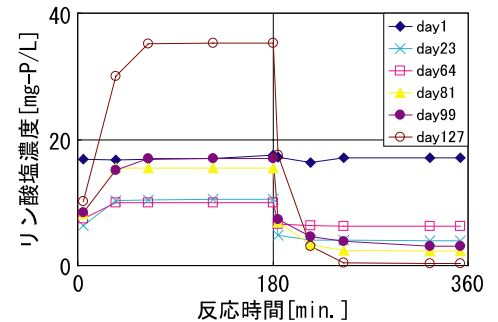


図 4 SBR P におけるリン酸塩濃度変化

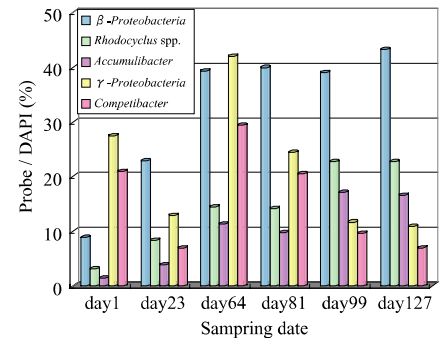


図 5 SBR P 内の各菌の占有率

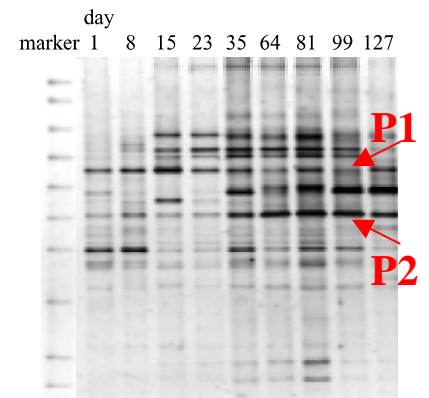


図 6 SBR P 内汚泥の DGGE バンドパターン