

都市下水処理 UASB+DHS システムにおける DHS リアクターの微生物叢解析

東北大学 ○ 久保田 健吾, 林 幹大, タンドカール・マダン, 原田 秀樹

長岡技術科学大学 山口 隆司

1. 目的

我々の研究グループは、途上国に適応可能なシステムとして 1995 年から UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) + DHS (Down-flow Hanging Sponge) システムの研究を行ってきた。現在までに、様々なスポンジ担体形状、規模及び排水を用いて UASB+DHS システムの処理性能に関する研究を行ってきた結果、このシステムが優れた有機物除去能及びアンモニア除去能を示すことを明らかにした。この有機物除去及びアンモニア除去を微生物レベルで理解するには、反応に関与する微生物群集についての知見が欠かせないが、DHS リアクターの保持汚泥の微生物叢については殆ど分かっていない。そこで、本研究では DHS リアクター汚泥の *Bacteria* 及び AOB (Ammonia-Oxidizing Bacteria)、NOB (Nitrite-Oxidizing Bacteria) について、分子生物学的手法である PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)、Cloning、real-time quantitative PCR を用いて解析を行った。

2. 実験方法

汚泥は都市下水を処理している UASB+DHS リアクター (G3.2) からサンプリングした。サンプリングはリアクターに備え付けられた 10 個のポートから行い、上段から下段にかけて 1-10 の番号をつけた。汚泥から DNA を抽出後、*Bacteria* の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて PCR-DGGE 及び Cloning を行った。得られたシーケンスから FastGroup II を用いて 97% identity の条件で OTU (Operational Taxonomic Unit) 分類をし、多様性を解析した。また、*Nitrosomonas oligotropha*、*Nitrospira* 属の 16S rRNA 遺伝子を標的とした real-time quantitative PCR を行い、DNA の定量を行った。

3. 実験結果

3.1 PCR-DGGE

図 1 に DGGE バンドプロファイルの結果を示す。バンドパターンが、リアクター高さ方向 (DHS1~10) で段階的に変化していた。DHS リアクターは、スポンジを担体として用いた散水ろ床リアクターと言える。このバンドパターンの段階的変化は、散水ろ床リアクターを用いてリアクター高さ方向に *Bacteria* 及び AOB の 16S rRNA 遺伝子を対象として PCR-DGGE を行った文献¹⁾と一致していた。バンドパターンから DHS1、2 をグループ A、DHS3~5 をグループ B、DHS6~10 をグループ C と大きく 3 グループに分類した。その後 DHS リアクターの *Bacteria* の多様性を網羅する為に、A~C それぞれのグループについて、バンド数が多く多様性があると考えられる代表的なボックス (DHS1、4、8) について Cloning を行った。

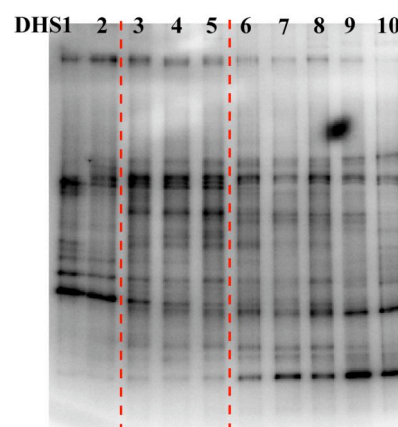


図1 DGGE バンドプロファイル

3.2 Cloning

図 2 に Cloning の結果を示す。DHS1、4、8 でそれぞれ 93、99、96 クローンを解析し、それぞれ 90%、71%、62%が *Proteobacteria* の近縁種であった。これは都市下水を処理する活性汚泥でも同様であり、Snaird ら²⁾は活性汚泥の約 90%が *Proteobacteria* に属したと報告している。

キーワード：DHS, 都市下水処理, 微生物叢解析, 分子生物学的手法

連絡先：〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学 環境保全工学研究室 TEL：022-795-7466

DHS リアクター高さ方向の挙動として、*Dechloromonas* 属、MOB (Methane-Oxidizing Bacteria)、AOB、NOB について注目した。*Dechloromonas* 属は、DHS1、4、8 でそれぞれ 40%、11%、3% であり、リアクター上部から下部にかけて割合が減少するといった挙動を示した。この菌は、活性汚泥などの好気性排水処理システムではマイナーな微生物である。しかし、DHS1 では *Dechloromonas* 属が 40% とクローンの割合は非常に高かった。*Dechloromonas* 属は、酢酸、プロピオン酸を炭素源として増殖する微生物である為、流入水の BOD 除去に貢献していることが考えられた。MOB は、DHS1、4、8 でそれぞれ 14%、5%、2% であり、リアクター上部から下部にかけて割合が減少するといった挙動を示した。この菌も *Dechloromonas* 属と同様に、活性汚泥ではマイナーな微生物である。しかし、UASB 処理水には溶存メタンが含まれている為、メタンを酸化する MOB の割合がリアクター上部で高くなったと考えられる。AOB 及び NOB は、DHS1 ではともに検出されず、DHS4 ではそれぞれ 1%、0%、DHS8 ではそれぞれ 3%、6% であり、リアクター上部から下部にかけて若干割合が高くなった。Cloning で検出された AOB と NOB は、*Nitrosomonas oligotropha*、*Nitrospira* 属の近縁種のみであった。これらの微生物は、他の AOB、NOB と比較して基質親和性が大きく、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が低い時に優占するとの報告が多い^{4, 5)} が、DHS リアクター流入水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度も $25.6 \pm 5.6 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ と低く、既往の報告と一致していた。

3.3 Real-time quantitative PCR

図 3 に、DHS 高さ方向における *Nitrosomonas oligotropha* と *Nitrospira* 属の 16S rRNA 遺伝子と $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の挙動を示す。*Nitrosomonas oligotropha* と *Nitrospira* 属は、DHS1~6 までは増加して DHS7 を頂点とし、DHS8~10 にかけてやや減少するといった同様の挙動を示した。リアクター上部の方が硝化細菌の割合が低くなる傾向があるが、DHS リアクターに滴下される UASB 処理水は DO 濃度が低く有機物が多いので、リアクター上部では従属栄養細菌が優占化しやすいと言える。抽出微生物のゲノムサイズが 4.6 Mbp (*E. Coli* と同じサイズ) であり、16S rRNA 遺伝子が 1 ゲノムに 1 copy 存在すると仮定し、4 種類のヌクレオチドの平均分子量を 331 とすると、抽出 DNA は理論的に DNA 1 ng 当たり 2.0×10^5 copies の遺伝子が存在する。この値を用いて全菌に対する *Nitrosomonas oligotropha* 及び *Nitrospira* 属の割合を計算すると、*Nitrosomonas oligotropha* は DHS1、4、8 でそれぞれ 0%、1%、5%、*Nitrospira* 属は DHS1、4、8 でそれぞれ 0%、11%、21% となる。*Nitrospira* 属については多少異なる値ではあるが、DHS1、4、8 における傾向は Cloning の結果と一致している。また、都市下水を処理する活性汚泥の β -Proteobacteria に属する AOB 及び *Nitrospira* 属の 16S rRNA 遺伝子定量を行った既往の報告では、(AOB、*Nitrospira* 属) は *Bacteria* に対してそれぞれ (2.9%、8.6%)⁶⁾、(1.0%、20.0%)⁷⁾ であった。よって DHS リアクター汚泥は、活性汚泥と同程度の割合で硝化細菌が存在すると言える。

参考文献

- 1) Roman, A. K. et al., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003. 2) Snaird, J. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997. 3) Horn, M. A. et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005. 4) 阿部憲一ら, 環境工学研究論文集, 2006. 5) 金田一智規ら, 環境工学研究論文集, 2003. 6) Harms, G. et al., *Environ. Sci. Technol.*, 2003. 7) Geets, J. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007.

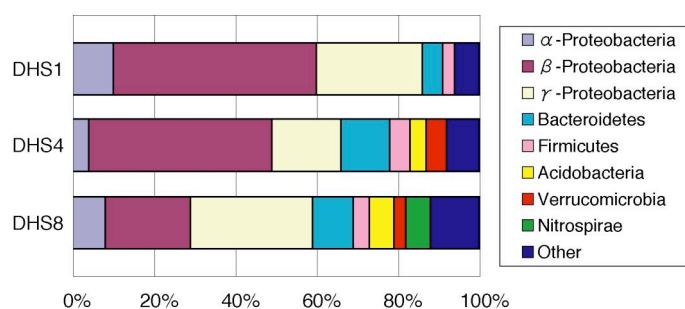


図 2 DHS1, 4, 8 の *Bacteria* クローンライブラリ

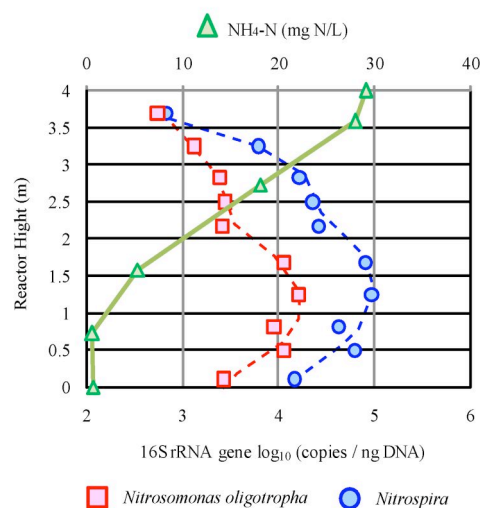


図 3 16S rRNA 遺伝子と $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の挙動