

嫌気性グラニューール汚泥のバルキングに關与する微生物の探索

長岡技術科学大学 (学) 豊永真由, (正) 山口隆司
産業技術総合研究所 (非) 関口勇地

1. 背景及び目的

上昇流嫌気性スラッジブランケット (UASB) 法では、複合嫌気性微生物群によって構成されるグラニューール状の汚泥 (グラニューール汚泥) が形成されることにより高濃度での汚泥保持を可能としており、その結果高濃度有機性廃水の高濃度処理が可能となった優れた技術である。近年、UASB 法によって処理される廃水種の拡大に応じて、反応槽内のグラニューール汚泥の沈降性が悪化し、汚泥が流出するバルキング現象が問題となることが報告されている。ひとたびバルキングが発生すると処理水質の著しい悪化が起こり、場合によっては反応槽内の汚泥を全て交換する必要が生じるため、処理現場においては深刻な問題である。今後 UASB 処理技術による廃水処理効率を安定的に維持するには、バルキングの原因の解明と、その制御技術の開発が重要である。これまで、高温処理 UASB 反応槽での汚泥のバルキングに關与する細菌として *Chloroflexi* 門に属する糸状性細菌が同定されている¹⁾。また、中温処理 UASB 汚泥のバルキング原因として、門レベルで未培養な糸状性細菌 (KSB3 門細菌) が同定された²⁾。本研究では、食品加工工場からの有機性廃水 (デンプン等が主成分) を処理する中温処理 UASB 反応槽内において観察されたグラニューール汚泥のバルキング現象に焦点を当てた。このバルキング現象は、これまで報告のある嫌気性バルキング現象とは異なる汚泥形態を示しており、原因となる微生物が不明である。そこで、本報告では、その原因を微生物学的レベルで特定するための試みに関する結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 サンプルング

グラニューール汚泥はデンプンを主成分とする実廃水 (食品加工工場からの有機性廃水) を処理するフルスケール中温 (37°C) UASB 反応槽から採取した。バルキング発生前、UASB 反応槽内には、大小 2 種類の良好な形状を示すグラニューール汚泥 (図 1A) が形成されていた。しかしながら、沈降性が悪化した汚泥が突発的に発生し、保持汚泥が処理水中に流出、UASB 反応槽の COD 除去率が低下した。大小 2 種類のグラニューール汚泥のうち直径 0.5-1 mm 程度の微小なグラニューール汚泥の表面に白色のフィラメント状の物質が確認されている (図 1B, C)。

2.2 塩基配列の決定及び系統解析

グラニューール汚泥のフィラメント状物質を構成する微生物を分子遺伝学的に同定するため、フィラメント部分を採取し、ビーズビーターを利用した物理的破碎法を用いて DNA 抽出を行った。微生物の 16S rRNA 遺伝子は、バクテリアに特異的なプライマーセット (バクテリアの 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマー EUB 338, EUB 338-I, EUB 338-II, EUB 338-III を混合したもの (EUB 338mixf)、バクテリアとアーキアに特異的なプライマー Univ 1492r)

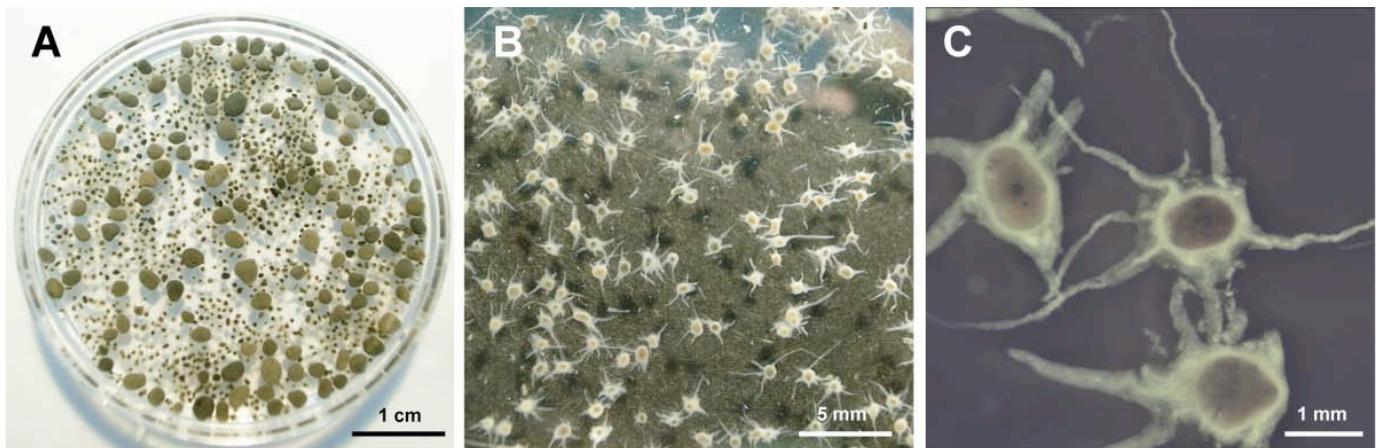


図 1 本研究で使用した中温処理 UASB 反応槽のグラニューール汚泥 (A) バルキング前の良好な形状をしたグラニューール汚泥, (B, C) フィラメント状物質が発生したグラニューール汚泥

キーワード UASB 法, 嫌気性グラニューール汚泥, バルキング現象, バクテリア, アーキア

連絡先 〒940 - 2188 新潟県長岡市上豊岡町 1603-1

長岡技術科学大学 環境・建設系 水圏土壌環境制御研究室 (TEL : 0258-47-1611)

及びアーキアに特異的なプライマーセット（アーキアの 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマー ARC 8f と Univ 1492r）を用いて PCR による増幅を行った。増幅した PCR 産物は、精製後に TA クローニングキットを用いてクローン化し、バクテリア及びアーキア共にランダムに 10 クローンずつ選択、その塩基配列を解析した。得られた塩基配列に基づき、ARB プログラムにより分子系統解析を行った。

2.3 FISH 解析

グラニュール汚泥のフィラメント部分を構成する主要微生物群を特定するため、fluorescence in situ hybridization (FISH)法によりフィラメント部分の微生物群を視覚化した。本研究では、バクテリアの 16S rRNA に特異的なプローブ (EUB 338mix)、アーキアに特異的なプローブ (ARC 915) と共に、フィラメント部分を構成するバクテリアの分子遺伝学的解析の結果最も高頻度に検出された phylotype (*Bacteroidetes* 門の未培養グループ) を対象に、以下に示す 2 種類のプローブの設計をした: UB657 (5'-GCCTACCTTGACCACACTCA-3', *E. coli* position 653 - 672), UB623 (5'-GTATCAACGGCAAGTCTACA-3', *E. coli* position 623 - 643)。使用したオリゴヌクレオチドプローブには、5' 末端に Cy3 を標識した。顕微鏡観察では、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 PASCAL, CARL ZEISS) を使用した。

3. 実験結果

本研究で焦点を当てたグラニュール汚泥は、デンプンを主成分とする実廃水（食品加工工場からの有機性廃水）を処理する中温 (37°C) UASB 反応槽で形成されたものである。植種源として 2 つの異なる UASB 反応槽より採取されたグラニュール汚泥を利用したため、該当 UASB 反応槽内には大小 2 種類の形態を示すグラニュール汚泥 (図 1A) が形成されていた。沈降性が悪化した際、大小 2 種類のグラニュール汚泥のうち直径 0.5 - 1 mm 程度の微小なグラニュール汚泥の表面に白色のフィラメント状の物質が確認され (図 1B, C), この構造により汚泥が浮上しやすくなっていることが推察された。一部のフィラメント状物質はグラニュール汚泥から剥離し、UASB 槽内から多数のフィラメント状物質が処理水中に流出している現象が見られた。そこで、本構造が汚泥のバルキングを引き起こしていると考え、フィラメント部分を顕微鏡観察した結果、フィラメント部分は糸状性微生物や桿菌等、複数種の形態を持つ微生物細胞により構成されていることが判明した。

フィラメント状構造体を形成する微生物種を特定するため、汚泥からフィラメント部分を採取し、バクテリアとアーキアを対象に 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリ解析を行った。その結果、バクテリアでは、*Bacteroidetes* 門の未培養グループに属する phylotype が 6 クローン (4 phylotypes) 検出された他、*Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱、*Chloroflexi* 門 (*Anaerolinea* 綱)、*Chlorobi* 門に属する phylotype がそれぞれ 1 クローンずつ検出された。またアーキアでは、*Methanomicrobiales* 目の未培養グループに属する phylotype が 4 クローンの他、*Methanomicrobiales* 目・*Methanospirillaceae* 科に属する phylotype などが検出された。この結果より、フィラメント部分は複数種のバクテリア及びアーキアによって構成されていることが推測された。

フィラメント部分の FISH 解析の結果、複数の形態を示すバクテリア、アーキアが観察された。バクテリアに特異的なプローブでは、糸状性の細胞の他、桿菌が蛍光を発していた。また、フィラメント部分の分子遺伝学的解析の結果、最も高頻度に検出されたバクテリアの phylotype (*Bacteroidetes* 門の未培養グループに属する phylotype, 3/10 クローン検出) を対象として設計した 2 種類のプローブを用いて FISH 解析を行った。その結果、両プローブ共にバクテリアの FISH 解析で見られた糸状性細胞が蛍光を発していることが確認され (図 2), 本微生物がフィラメント部分を構成する主要な微生物群の一つであることが明らかとなった。本微生物群がフィラメント部分を構成するために必須の微生物群であるかどうかは現時点ではまだ不明であり、今後フィラメントの形成を引き起こす微生物群を特定するため、さらに解析を進めたい。

4. 参考文献

- 1) Sekiguchi, Y. *et al.*, 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5740-5749
- 2) Yamada, T. *et al.*, 2007. *ISME Journal.* 1:246-255

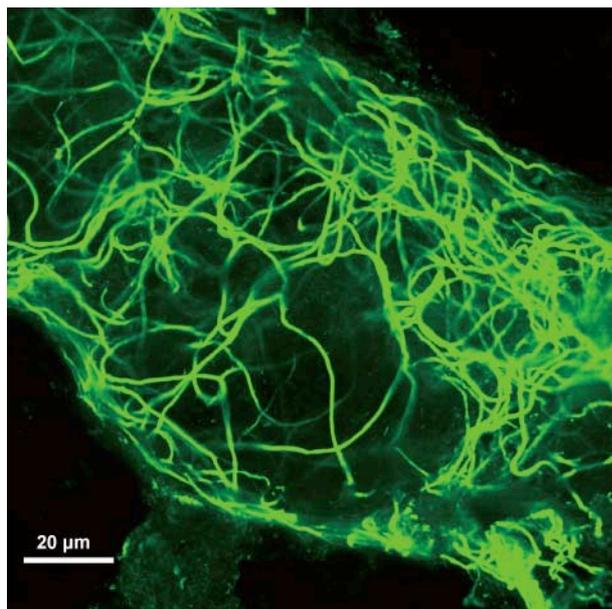


図2 フィラメントを構成する微生物群の FISH 解析像 *Bacteroidetes* 門の未培養微生物群を検出するプローブ (UB623 プローブ) による検出結果を示す。