

## 異なる炭素源を用いたSBRの長期運転による微生物群集構造の変化

九州大学工学部 学生会員 ○中村圭一

九州大学工学部 学生会員 永淵慶彦

九州大学大学院 正会員 久場隆広

## 1. はじめに

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のジャーファーマンタを用いた。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。HRT 12 時間、SRT 20 日間とした。温度 25℃、pH 7.0 ± 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の代わりにプロピオン酸塩を用いた点と、pH 7.2 ± 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、ジャーファーマンタ内の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<br>β-Proteobacteria          | gCCTTCCCACTTCgTTT  |
| PAO651<br>Rhodocyclus spp.          | CCCTCTGCCAACTCCA   |
| RHX991<br>Accumulibacter phosphatis | gCTCTCTTgCgAgCACTC |
| GAM42a<br>γ-Proteobacteria          | gCCTTCCCACTTCgTTT  |
| GAOQ989<br>Competibacter phosphatis | TTCCCCggATgTCAAggC |

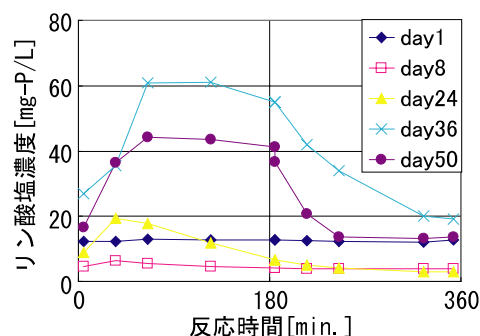


図 1 SBR A におけるリン酸塩濃度変化

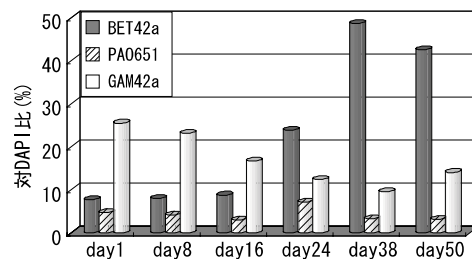


図 2 SBR A 内の各菌の占有率

### 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 FISH法による比較

各SBR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・P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、 $\beta$ -*proteobacteria*の増加と $\gamma$ -*proteobacteria*の減少が見られた。 $\gamma$ -*proteobacteria*にGAO(グリコーゲン蓄積細菌)候補が含まれることから、相対的に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*Rhodocyclus*の占有率が増加した。プロピオン酸を用いることにより、 $\gamma$ -*proteobacteria*に属するGAOsの駆逐に加え、リン除去に大きく関わっている*Rhodocyclus*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(染色結果未掲載)が見られたことから、同時期に増加している $\beta$ -*proteobacteria*にPHBまたはpoly-P蓄積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

各SBR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 $\beta$ -*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day99以降、徐々にバンド数が減少し、菌相が単純化される傾向にあった。同時に*Rhodocyclus*の占有率が増加していることから、特定のPAOs(ポリリン酸蓄積細菌)が優占する状態に菌相が変化したと判断できる。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。

### 4. おわりに

異なる炭素源を用いて2つのSBR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*Rhodocyclus*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 $\beta$ -*proteobacteria*の増加と相関が高く、リンの過剰摂取は*Rhodocyclus*の増加と相関が見られた。今後は、リン除去活性の高まった時期のDGGEバンドのDNAから菌種の同定を行う予定である。

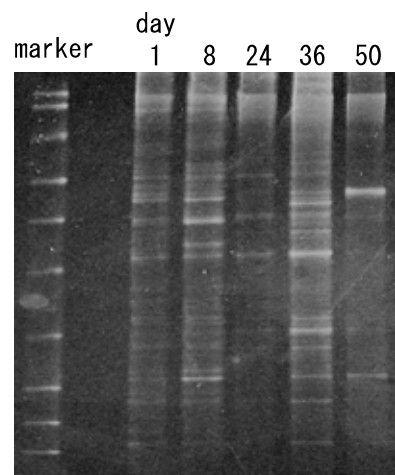


図3 SBR A内汚泥のDGGEバンドパターン

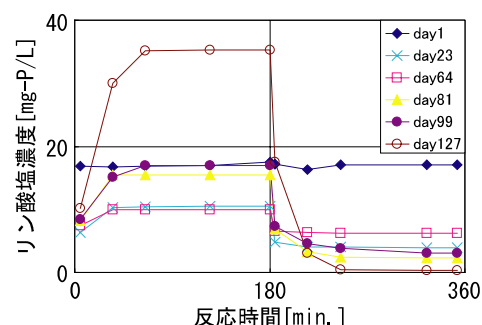


図4 SBR Pにおけるリン酸塩濃度変化

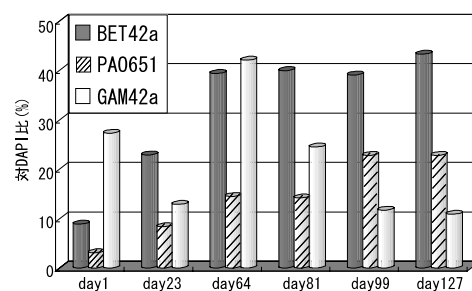


図5 SBR P内の各菌の占有率

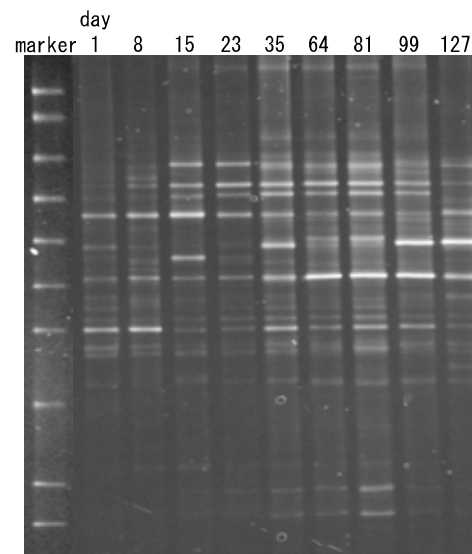


図6 SBR P内汚泥のDGGEバンドパターン