

(63) 硫黄酸化還元サイクル活性型廃水処理法による
低温融雪剤廃水処理プロセス中の微生物群集の解析

Molecular Analysis of Microbial Community Structures in the Novel Sulfur Redox Action Process
Applied to Low Temperature Treatment of Deicing Fluid Wastewater

今井崇博*, 荒木信夫*, 文後佳久**, 山口隆司**, 高橋優信***, 長野晃弘****
Takahiro IMAI*, Nobuo ARAKI*, Yoshihisa BUNGO**, Takashi YAMAGUCHI**,
Masanobu TAKAHASHI*** and Akihiro NAGANO****

ABSTRACT; Microbial community structure was characterized in a novel wastewater treatment process facilitating a sulfur-redox cycle by microorganisms such as sulfate-reducing bacteria (SRB) and sulfur-oxidizing bacteria (SOB). A combined system consisting of an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) and an aerobic downflow hanging sponge (DHS) reactor was applied for low temperature treatment of deicing fluid wastewater. The whole process achieved over 90% of COD_{Cr} removal efficiency with less than 30 mg-COD_{Cr}/L in the final effluent, at an operating temperature of 8 °C and at an HRT of 12h. In UASB sludge, *Acetobacterium* sp. and *Desulfobulbus* sp. were found to be predominant species as the relative abundance to DAPI-stained total cells was 10% and 14%, respectively, by clone libraries of 16S rRNA genes and fluorescence in situ hybridization (FISH). Relatively high sulfate reducing activity from acetate was determined by serum vial tests, but the absolute identification of acetate utilizing SRB could not be made through molecular techniques. In DHS sludge, *Tetracoccus* sp., *Thiomonas* sp. and *Acidithiobacillus* sp. could be a numerically dominant component of microbial communities for removal of residual COD and sulfur oxidation in UASB effluents.

KEYWORD; low temperature wastewater treatment, upflow anaerobic sludge blanket, sulfate-reducing bacteria, microbial community structure, 16S rRNA gene clone library

1. はじめに

現在、都市下水をはじめとした低濃度廃水の処理は活性汚泥法などの好気性生物処理法が広く適用されている。しかし、活性汚泥法は膨大な入力エネルギーを必要とし、さらには大量の余剰汚泥の生成といった欠点が指摘されている。これらの問題を解決するために、筆者らは Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) 法と好気性ろ床を組み合わせた硫黄の酸化還元サイクルを活性化した新規下水処理システムを開発中である^{1, 2)}。このシステムは前段の UASB で硫酸塩還元細菌が硫酸塩を還元すると

*長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology)

**呉工業高等専門学校 環境都市工学科 (Dept. of Civil Engineering, Kure National College of Technology)

***広島県産業科学技術研究所 (Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science of Technology)

****三機工業株式会社 (Environment System Division, Sanki Engineering Co. Ltd.)

ともに有機物を分解し、後段の好気性ろ床で硫黄酸化細菌が硫化物を硫酸塩まで酸化し、その処理水の一部を前段の嫌気槽に返送することで硫酸塩還元細菌の活性を保持するものである。このシステムの特長は、通常の嫌気性処理の最終段階を担うメタン生成菌が低温条件で急激に活性を低下させるのに対し、硫酸塩還元細菌は比較的低温条件下でもその活性を保持することから³⁾、低水温期においても一定の処理能力を維持する点にある。本システムの鍵となる硫酸塩還元細菌は油田、北極海堆積物や土壌など多岐の環境にわたって生育することが報告されており^{4, 5)}、硫酸塩を電子受容体、有機物を電子供与体とする嫌気性従属栄養細菌である⁶⁾。

このシステムは低濃度廃水の常温処理への嫌気性処理の適用を可能にするものである。そこで、冬期に航空機や車両の付着雪氷の除去に利用されている有機性融雪剤の処理⁷⁾に本システムを適用したところ、処理水温が 10℃以下の条件においても良好な処理成績を得た。廃水の低温処理についてはこれまで様々な方法が検討されてきたが^{8, 9, 10, 11, 12)}、低水温処理の際に出現する微生物群集に関する知見は世界的にもほとんど報告されていないのが現状である。本システムを低濃度廃水、特に低水温処理への普及を図るには系内に構築された微生物群集を明らかにする必要がある。さらに、低水温処理で鍵を握る微生物群についてはそれらをモニターし、リアクター内に高濃度に保持する技術を開発する必要がある。本研究は硫黄の酸化還元サイクルを活性化したシステムを融雪剤の低温処理に適用し、システム内の汚泥の微生物群集を明らかにするものである。

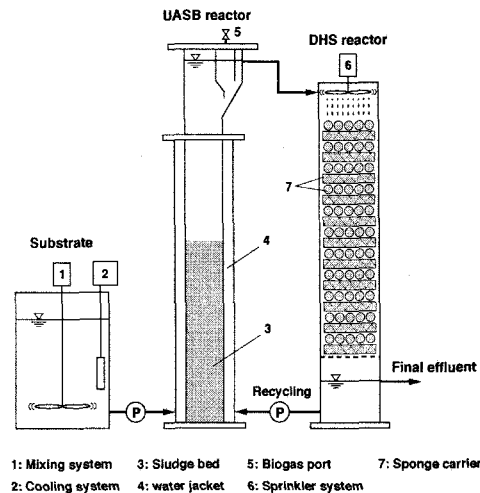


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental set-up.

2. 実験方法

2.1 実験装置及びサンプリング

Fig.1 に実験装置の概要を示す。実験装置は UASB とスポンジ型散水ろ床（以下 Downflow Hanging Sponge: DHS と略す）で構成した。UASB はカラム高さ 70cm、内径 10×10cm に気固液分離装置（以下 GSS と略す）を設置し、容積 10L（カラム容積 7L, GSS 容積 3L）とした。DHS はカラム高さ 102cm、内径 20×20cm の中に 25×25×17cm のスポンジ担体 90 本を設置した。スポンジ担体は格子状に高さ 55cm、1 段 5 本、合計 18 段積み上げた。UASB 処理水は DHS の上部から滴下し、DHS 下部の沈澱槽の上澄み液を循環比 2（運転日数 0~545 日）または循環比 1（運転日数 545~715 日）で UASB に返送して運転を行った。実験装置は温度調節を行うために冷蔵庫内に設置した。Table 1 にシステムの運転条件を示す。各運転条件は RUN1~5 とし、システム全体の HRT を 12~52 hr、処理温度 8~14℃の条件で運転した。基質として RUN1~3 はプロピレングリコールと酵母エキスを、COD_{Cr}（以下 COD と称す）550mg-COD/L、

Table 1 Operating condition

RUN	Day	HRT (hr)	UASB temp. (°C)	Sulfate conc. (mg-S/L)	Carbon source
1	0-105	52	14	50	Propylene glycol
2	106-354	24	8	50	Propylene glycol
3	355-505	24	8	50	Propylene glycol
4	506-569	24	8	90	Antifreeze
5	570-653	12	8	90	Antifreeze

NH_4^+ 20mg-N/L, PO_4^{2-} 10mg-P/L に設定した。RUN4~5 は融雪剤廃水を水道水で希釈し、550mg-COD/L になるように調整したものを供給した。基質には硫酸塩を添加し、濃度は 50~90mg-S/L に設定した。廃水はプロピレングリコールを主成分とし、プロピオン酸 (10~20mg/L) と酢酸 (1~5mg/L) を含んでいる。微生物群集の解析には運転開始 620 日目の UASB と DHS から汚泥を採取して用いた。

Table 2 List of 16S rRNA-targeted oligonucleotide used in this study

Method	Name	Sequence(5'-3')	Target	FA(%)	Ref.
Cloning	EUB338mix-F	AC(A/T) CCTACGGG(T/A)GGC(T/A)GC	Most Bacteria	-	17
	SRB385-F	CCTGACGCAGCGACGCCG	Some sulfate-reducing bacteria of the δ -proteobacteria, other δ -proteobacteria and Gram-positive bacteria	-	18
	UNIV1500.deg-R	GGYTACCTTGTTCGACTT	All Organisms	-	19
FISH	EUB338	GCTGCCTCCGTAGGAGT	Most Bacteria	30	17
	ARC915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	Archaea	35	20
	SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	Identical with SRB385-F	30	18
	SRB385Db	CGGCGTTGCTGCGTCAGG	Family <i>Desulfobacteriaceae</i> , and non sulfate-reducing bacteria	30	21
	DSV1292	CAATCCGGACTGGGACGC	<i>Desulfovibrio</i> spp.	10	22
	Dsbb660	GAATTCCACTTTCCCTCTG	<i>Desulfohalobium</i> spp.	30	23
	DSB129	CAGGCTTGAAGGCAGATT	<i>Desulfobacter</i> spp.	15	23
	DBM221	TGCGCGGACTCATCTTCAA	<i>Desulfobacterium</i> spp.	25	23
	AW	GGCTATTCCTTTCCATAGGG	<i>Acetobacterium</i> sp.	15	24

2.2 UASB 汚泥の硫酸塩還元活性試験

UASB 汚泥の硫酸塩還元菌の有機物分解能を評価するために、数種の基質を用いてバイアル活性試験を行った。汚泥試料は UASB 下部より 20cm の高さから採取し、リン酸緩衝液を用いて洗浄、ホモジナイズした後、嫌気的条件下で、バイアル瓶に培地と汚泥試料を分注した。活性試験は 122mL バイアル瓶を用い、煮沸操作により溶存酸素を追い出した培地（無機塩、リン酸バッファー、微量元素、レサズリン）に還元剤 ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 最終濃度 250mg/L) を添加し、pH を 7.0 ± 0.1 に調整した。基質はそれぞれ、酢酸、水素、プロピレングリコール、酪酸、プロピオン酸、乳酸をエネルギー源とし、初期硫酸塩濃度 100mg-S/L, 初期 COD 濃度 2000mg-COD/L として調整した。バイアル内汚泥濃度は 3500~4000mg-VSS/L とし、硫酸塩還元活性は硫酸塩の減少により評価した。

2.3 処理システム内の 16S rRNA 遺伝子クローン解析

汚泥サンプルからの DNA 抽出は中村ら¹³⁾の方法に準拠した。運転 620 日目の UASB 汚泥と DHS 汚泥から DNA をそれぞれ回収し、16S rRNA 遺伝子をターゲットに PCR 増幅を行った。使用したプライマーセットを Table 2 に示す。PCR 産物は Gene Clean Kit (Q-BIO gene) を用いて精製した後、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) によってクローン化した。その後、制限酵素 *Hae*III, *Taq*I (TaKaRa) を用いて RFLP 解析を行いグループ化した。グループ化した 16S rRNA 遺伝子断片はオートシーケンサーマルチキャピラリー DNA 解析システム CEQ8000 (BECKMAN COULTER) を用いて塩基配列を決定し、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLAST¹⁴⁾ により既知種から相同性の高い菌を検索した。系統解析には The ARB project (<http://www.arb-home.de/>) の塩基配列データベースツール ARB を使い、近隣結合法 (N-J 法)¹⁵⁾ を用いてクローンの系統的な位置を推定した。また、その系統解析の確かさは 1000 回のブートストラップにより検証した。

2.4 FISH 法による *Acetobacterium* 属細菌と硫酸塩還元細菌の検出

本研究で使用したプローブと標的微生物、最適ホルムアミド (FA(%)) 濃度 (ハイブリダイゼーション温度 46°C) を Table 2 に示す。FISH 法は Amann¹⁶⁾ の方法に準拠した。ARC915, SRB385, Dsbb660 プローブは TRITC で, EUB338, DSV1292, DSB129, DBM221, AW プローブは Cy-3 で, SRB385Db プローブは Cy-5 で, それぞれ 5'末端を修飾した。

3. 実験結果

3.1 リアクターの処理特性

Fig.2 に COD 濃度の経日変化を示す。RUN 1 ではスタートアップ期間として HRT 52 hr で運転したところ, 処理性能は 30 日程度で安定した。以降, RUN 1 では流入基質に対する UASB の除去率で $37 \pm 8\%$, 全システムで $86 \pm 4\%$ となった。RUN 2 では HRT を 24 hr に短縮して運転した。流入全 COD $537 \pm 166\text{mg/L}$ に対し, UASB 処理水は $221 \pm 72\text{mg/L}$, 最終処理水は $127 \pm 56\text{mg/L}$ を得た。システム全体の除去率は $76 \pm 10\%$ であった。RUN 3 では硫酸塩還元を促進させる目的で, UASB に流入する硫酸塩濃度を 90mg-S/L に増加した。硫酸塩増加は UASB の有機物分解に良好な影響を与え, 硫酸塩増加直後から有機物分解が進行した。平均全 COD は基質で $445 \pm 64\text{mg/L}$ の流入に対し, UASB 処理水では $115 \pm 37\text{mg/L}$, 最終処理水では $29 \pm 9\text{mg/L}$ と良好な水質が得られた。これは UASB の除去率で $35 \pm 10\%$, システム全体の除去率で $94 \pm 3\%$ となる。

RUN 4, 5 についてはプロピレングリコールを主成分とする融雪剤廃水を供給した。RUN 4 では UASB の除去率は $19 \pm 9\%$ と RUN 3 に比べて減少したが DHS の有機物分解能は高く維持しており, システム全体の除去率で $90 \pm 5\%$ が得られた。HRT 12 hr に短縮した RUN 5 では UASB の除去率が $16 \pm 7\%$ と減少したものの, RUN 4 同様に DHS は UASB 処理性能の低下を緩和し, システム全体の除去率で $93 \pm 5\%$ を維持した。

Fig.3 に RUN 3 において循環流である UASB 流

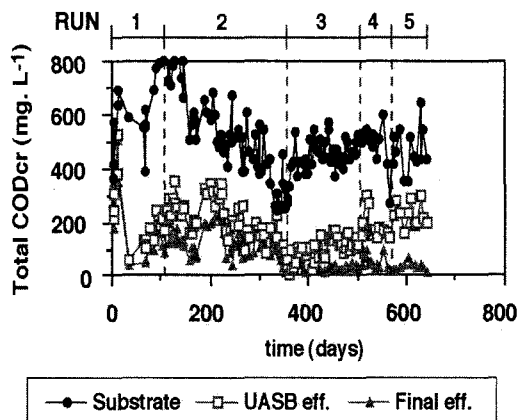


Fig.2 Time course of total-COD concentration during treatment in UASB/DHS system.

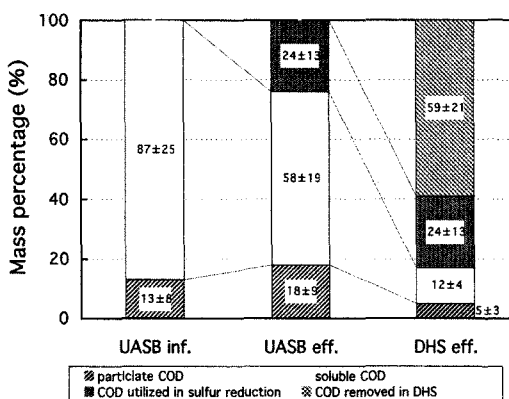


Fig.3 COD mass balance of UASB/DHS system on the RUN 3.

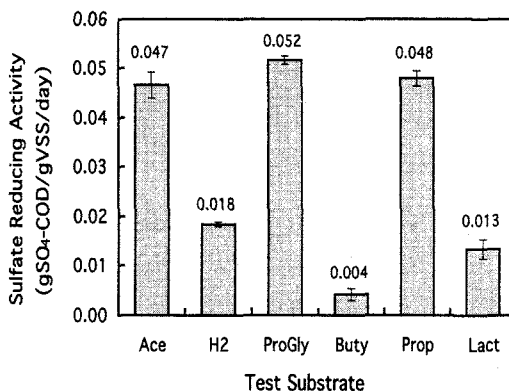


Fig.4 Sulfate reducing activities at different substrates determined by vial tests at the 650-day

入 COD を 100% とし, UASB, DHS に関する COD 収支を示す。UASB 流入におけるシステム全体の COD の分解寄与率は硫酸塩還元利用, 好気性利用がそれぞれ 24%, 59% であった。システム全体の有機物分解は, UASB の硫酸塩還元による有機物分解に加え, DHS が保持する耐冷性の好気性微生物による有機物分解が寄与していることが分かった。

Fig.4 に UASB 汚泥の試験温度 5℃ での各基質の硫酸塩還元活性試験の結果を示す。酢酸 (Ace), 水素 (H₂), プロピレングリコール (ProGly), 酪酸 (Buty), プロピオン酸 (Prop), 乳酸 (Lact) を基質として活性試験を行ったところ, 酢酸, プロピレングリコール, プロピオン酸基質において比較的高い硫酸塩還元活性を示した。

3.2 処理システム内の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析

UASB で有機物の分解に寄与している微生物群集を明らかにするため, 運転 620 日目に採取した汚泥を試料にクローンライブラリーを作成し, 系統解析を行った。**Table 3** に得られたクローンライブラリーを示す。EUB338mix-F/UNIV1500.deg-R のプライマーセットで検出されたクローンは 15 種類で, UASB 汚泥は極めて単純な微生物群集であることが判明した。有効クローン数 117 から極めて高い割合で *Acetobacterium* 属が検出された。*Acetobacterium* 属細菌はグリコールなどの有機物を酢酸まで発酵分解する嫌気性細菌であることから^{25, 26)}, この細菌が流入するプロピレングリコールを酢酸まで分解していると考えられる。その他に検出されたクローンは *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Bacilli* に属するものであった。得られたクローンの中で硫酸塩還元能を持つと報告されている細菌群に属していたのは *Syntrophobacter fumaroxidans* だけであった。

活性試験から UASB 汚泥は様々な基質を利用する硫酸塩還元活性を保持していることが確認されている。そこで, 硫酸塩還元細菌を標的に SRB385-F/UNIV1500.deg-R のプライマーセットでクローン解析を実施した。有効クローン数 70 から *Desulfohalobus* 属が 11 クローン, *Desulfovibrio* 属が 6 クローン, *Desulfomicrobium* 属が 3 クローン検出された。19 クローン検出された *Uncultured bacterium clone PL-11B10* と 9 クローン検出された *Uncultured bacterium clone IA-23* の系統的位置はどちらも硫酸塩還

Table 3 Sequence result of UASB/DHS clone at 620-day

Closest relatives	Number of clone/total clones	Sequence homology (%)
Analysis of UASB		
EUB338mix-F/UNIV1500.deg-R		
<i>Uncultured Acetobacterium sp.</i>	96/117	99%
<i>δ-proteobacteria UCB clone PL-11B10</i>	3/117	96%
<i>Hafnia alvei</i>	3/117	98%
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	2/117	98%
<i>ε-proteobacteria UCB clone DCE10</i>	2/117	99%
<i>Clostridia UCB clone IA-23</i>	2/117	98%
<i>Aquaspiillum psychrophilum</i>	1/117	99%
<i>Rahnella sp. 'CDC 21234'</i>	1/117	99%
<i>Clostridia UCB clone RA13CB</i>	1/117	97%
<i>Bacteroidetes UCB clone mle-2</i>	1/117	99%
<i>OP9 UCB clone vadin CA02</i>	1/117	97%
<i>Clostridia UCB clone mle-9</i>	1/117	98%
<i>Acrobacter sp. Clone I72</i>	1/117	99%
<i>Clostridia UCB clone SHA-1</i>	1/117	99%
<i>Clostridia UCB clone KD2-97</i>	1/117	97%
SRB385-F/UNIV1500.deg-R		
<i>δ-proteobacteria UCB clone PL-11B10</i>	19/70	96%
<i>D.bulbus elongatus</i>	11/70	97%
<i>Clostridia UCB clone IA-23</i>	9/70	98%
<i>Clostridia UCB clone ZZ12C4</i>	7/70	98%
<i>D.vibrio magneticus</i>	6/70	98%
<i>Sedimentbacter sp. BRS2</i>	5/70	95%
<i>D.microbium baculatum</i>	3/70	99%
<i>Clostridia UCB clone RFLP 34E</i>	3/70	97%
<i>Clostridia UCB clone RB9C5</i>	2/70	94%
<i>Alkalibacterium sp. 12A2</i>	1/70	92%
<i>Uncultured rumen bacterium U29-G07</i>	1/70	95%
<i>Clostridia UCB clone A-2AX</i>	1/70	93%
<i>Clostridia UCB clone Rs-E70</i>	1/70	91%
<i>Clostridia UCB clone SHA-1</i>	1/70	99%
Analysis of DHS		
<i>Uncultured Acetobacterium sp.</i>	81/169	99%
<i>Tetracoccus cecii</i>	55/169	99%
<i>Microbacterium sp. OUCZ212</i>	6/169	99%
<i>Clostridium bowmanii</i>	5/169	99%
<i>Legionella lytium</i>	3/169	97%
<i>Leucobacter aridicollis</i>	3/169	99%
<i>Acinetobacter sp.</i>	2/169	99%
<i>Clostridia UCB clone DE2.5</i>	2/169	93%
<i>Brucella melitensis</i>	2/169	98%
<i>Mesorhizobium sp. Wifl-1</i>	1/169	97%
<i>Desulfobacter postgatei</i>	1/169	99%
<i>Thiomanas sp. B3</i>	1/169	99%
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	1/169	99%
<i>Alpha proteobacteria LMG20591</i>	1/169	100%
<i>Desulfohalobus elongatus</i>	1/169	96%
<i>Clostridia UCB clone AHU14</i>	1/169	99%
<i>α-proteobacteria UCB clone 4P32</i>	1/169	99%
<i>Sphaerobacteridae UCB clone HN1-15</i>	1/169	94%
<i>Blautellaceae bacterium isolate SS5</i>	1/169	98%

※UCB:abbreviated name of *Uncultured Bacterium*

元細菌に属さないことが判明した。

次に、DHS 汚泥に構築される微生物群集の解析を EUB338mix-F/UNIV1500.deg-R のプライマーセットで行った。得られたクローンは 19 種類で、そのうちの 2 種だけで 169 クローン中 136 クローンを占めた。UASB 汚泥と同様に DHS 汚泥も極めて単純な微生物群集であることが判明した。この 2 種は *Acetobacterium* 属と *Tetracoccus* 属である。DHS の硫黄の酸化還元サイクルのキー微生物である硫黄酸化細菌については *Thiomonas* 属と *Acidithiobacillus* 属が検出された。

3.3 FISH 法による *Acetobacterium* 属細菌と硫酸塩還元細菌の検出

クローン解析の結果をもとに UASB および DHS 汚泥を試料に FISH 解析を実施した。各プローブの DAPI 染色細胞に対する割合を Table 4 に示す。EUB338 プローブで検出される細胞の割合は DAPI 染色細胞に対して UASB 汚泥で $58.0 \pm 6.1\%$ ($n=10$)、DHS 汚泥で $52.2 \pm 5.4\%$ ($n=10$) であった。これはシステム内が 10°C 以下と低温のため、活性の低い細胞や溶菌が進行しない死滅細胞が系内に滞留しているものと考えられる。Fig. 5 に運転 620 日目の UASB 汚泥に対して SRB385 プローブ、Dsb660 プローブ、AW プローブを適用した FISH 写真を示す。UASB 汚泥に *Acetobacterium* 属細菌は $10.4 \pm 3.3\%$ ($n=10$)、*Desulfobulbus* 属細菌は $13.8 \pm 4.7\%$ ($n=10$) の割合で存在した。EUB338 プローブで検出された活性を有する (ある程度の 16S rRNA を量を含む) 細胞の割合を考慮すると、UASB 汚泥はこの 2 種の細菌が極めて大きなポピュレーションを占めていると判断できる。また、SRB385 プローブの検出頻度は Dsb660 プローブの結果よりも大きいことから *Desulfobulbus* 属以外の硫酸塩還元細菌も存在している。一方、*Desulfobacteriales* 科に属する多くの完全酸化型硫酸塩還元細菌を検出する SRB385Db プローブと、メタン生成古細菌を検出する APC915 プローブのシグナルは UASB 汚泥からは検出することはできなかった。DHS 汚泥のクローン解析で多数検出された *Acetobacterium* 属細菌は FISH では検出できなかった。

Table 4 Ratio of cells detected with the probes to DAPI stained total cells in UASB and DHS sludge.

Probe	UASB	DHS
EUB338	$58.0 \pm 6.1\%$	$52.2 \pm 5.4\%$
ARC915	×	—
SRB385	$37.2 \pm 5.5\%$	—
SRB385Db	×	—
Dsb660	$13.8 \pm 4.7\%$	—
DSB129	×	—
DBM221	×	—
AW	$10.4 \pm 3.3\%$	×

※ ×: Not detected, —: Not examined

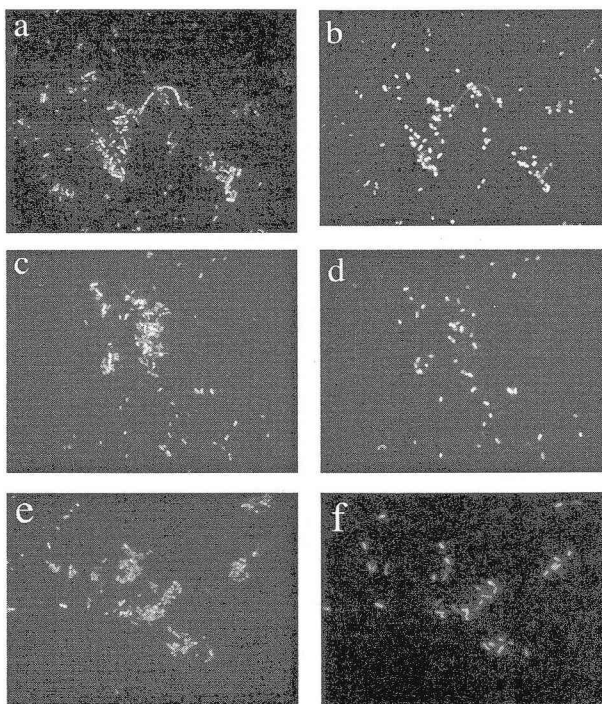


Fig.5 Whole cell hybridization with fluorescent oligonucleotide probe SRB385 (a, b), Dsb660 (c, d), AW (e, f) to UASB sample. Identical fluorescent microscopic fields were viewed by U-excitation (a, c, e) and by G-excitation (b, d, f).

4. 考察

本研究は 10℃以下といった低温条件でも良好な処理成績を達成した硫黄の酸化還元サイクルを活用した新規廃水処理システム内に構築された微生物群集を明らかにするためにクローン解析や FISH 法を適用した。UASB および DHS 汚泥の EUB338mix-F/UNIV1500.deg-R によるクローン解析では 20 種程度のクローンしか分離されず、単純な微生物群集を呈していた。特に UASB 汚泥には *Acetobacterium* 属の占める割合が極めて大きく、この細菌は融雪剤廃水の主成分であるプロピレングリコールを酢酸に分解していたものと予想される。硫酸塩還元細菌としては *Desulfobulbus* 属、*Desulfovibrio* 属、*Desulfomicrobium* 属が検出され、FISH 解析では *Desulfobulbus* 属細菌の存在率が高かった。*Desulfobulbus* 属細菌は、硫酸塩の存在で、卓越してプロピオン酸を分解する報告がされていることから²⁷⁾、融雪剤廃水に含まれるプロピオン酸を分解していたものと考えられる。Run3, 4 では流入した COD 成分のそれぞれ約 30%と約 20%が UASB 内で除去されていた。嫌気条件下の COD 除去はメタン生成古細菌によるメタン生成もしくは硫酸塩還元反応や脱素素反応といった嫌気呼吸で進行する。UASB の Run3, 4 ではガスがほとんど生成していないことからメタン生成反応や脱素反応は卓越していない。FISH 解析においても UASB 汚泥から古細菌を検出する ARC915 プローブのシグナルは全く検出されず、活性試験においても汚泥のメタン生成活性は極めて小さな値であった（データ非表示）。一方、硫酸塩還元活性試験では酢酸を単一炭素源とした条件でも硫酸塩還元が進行しており、UASB での COD 成分の除去は完全酸化型硫酸塩還元細菌が遂行していたものと推定される。しかし、本研究で実施したクローン解析においては完全酸化型硫酸塩還元細菌に近縁なクローンは検出することはできず、多くの完全酸化型硫酸塩還元細菌を検出する SRB385Db プローブの FISH シグナルも得ることが出来なかった。今後は UASB 内で COD 除去を担う細菌、特に酢酸の分解に関与している硫酸塩還元細菌の特定が課題である。

DHS では UASB で除去できなかった成分のさらなる除去と還元硫黄の酸化が進行する。UASB 流出水の COD 成分は主に酢酸であり、DHS で極めて良好に分解が進行した。これはクローン解析で多数のクローンが検出された *Tetracoccus* 属細菌が担ったものと考えられる。DHS 汚泥には UASB 汚泥のクローン解析と同様に *Acetobacterium* 属のクローンが多数検出されたが、FISH 解析ではシグナルが得られなかった。これは *Acetobacterium* 属細菌が UASB 流出水に混濁して DHS に流入し補足されたものの、低温条件のために溶菌が進行せずに死滅細菌として存在していたものと推測される。DHS 汚泥には硫黄酸化細菌として *Thiomonas* 属と *Acidithiobacillus* 属のクローンも検出された。DHS では低水温条件下でも硫黄酸化反応は良好に進行しており、これらの硫黄酸化細菌が反応を担っていたと考えられる。

5. 結論

硫黄の酸化還元サイクルを活用した廃水処理システムを融雪剤廃水の低温処理に適用したところ 10℃以下の条件でも 90%以上の COD 除去率を達成した。このシステムを構成する UASB および DHS に構築された微生物群集について 16S rRNA 遺伝子断片を標的としたクローン解析と FISH 法を適用して解析したところ、以下の知見が得られた。

- 1) UASB 汚泥の EUB338mix-F/UNIV1500.deg-R によるクローン解析では 15 種、SRB385-F/UNIV1500.deg-R によるクローン解析では 14 種とわずかな種類のクローンしか分離できず、その微生物群集は極めて単純であった。FISH 解析の結果、UASB 汚泥には EUB338 プローブで検出される細胞の割合は DAPI 染色細胞に対して $58.0 \pm 6.1\%$ であり、*Acetobacterium* 属細菌は $10.4 \pm 3.3\%$ 、*Desulfobulbus* 属細菌 $13.8 \pm 4.7\%$ でこの 2 種の細菌が大きな割合を占めていた。

- 2) UASB では硫酸塩還元反応による COD 除去が進行し、酢酸を単一炭素源とした硫酸塩還元活性試験においても 5℃で 0.047 gSO₄-COD/gVSS/day の値を示したが、完全酸化型の硫酸塩還元細菌に近縁な細菌は検出することができなかった。
- 3) EUB338mix-F/UNIV1500.deg-R によるクローン解析では DHS 汚泥から 19 種しか分離されず、DHS 汚泥も単純な微生物群集を呈していた。*Tetracoccus* 属と *Acetobacterium* 属のクローンの他に硫黄酸化細菌として *Thiomonas* 属と *Acidithiobacillus* 属に近縁のクローンが検出された。しかし、*Acetobacterium* 属細菌は FISH では検出することができなかった。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費（基盤研究（C）, 課題番号 16560489）, NEDO 産業技術研究事業費助成金（課題番号 01B63001d）の助成を受けて遂行したものである。ここに記して、感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 角野晴彦, 山口隆司, 谷川大輔, 岡崎優子, 荒木信夫, 川上周司, 山崎慎一, 原田秀樹 (2003) 全段 UASB 後段好気槽を組み合わせたシステムの硫黄酸化還元サイクルを利用した下水処理, 環境工学研究論文集 **40**, 431-440.
- 2) 角野晴彦, 高橋優信, 山口隆司, 阿部憲一, 荒木信夫, 山崎慎一, 霜崎敏, 長野晃弘, 西尾尚道 (2004) 無加温パイロットスケール UASB と固定床型接触曝気槽による都市下水連続処理, 環境工学研究論文集 **41**, 69-77.
- 3) Isaksen M. F. B. B. Jorgensen (1996) Adaptation of psychrophilic and psychrophilic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** 408-414
- 4) Voordouw G., S. M. Armstrong, M. F. Reimer, B. Fouts, A. J. Telang, Y. Shen, D. Gevertz (1996) Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1623-1629
- 5) Ravensschlag K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jorgensen, R. Amann (2000) Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3592-3602
- 6) Devereux R., M. Delaney, F. Widdel, D. A. Stahl (1989) Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria. *J. Bacteriology* **171**, 6689-6695
- 7) Tham P., Kevin J. K. (2004) Anaerobic biodegradation of aircraft deicing fluid in UASB reactors. *Water Research* **38**, 2515-1528
- 8) Lettinga G., S. Rebac, S. Parshina, A. Nozhevnikova, J. B. van Lier, A. J. M. Stams (1999) High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1696-1702
- 9) Elmitwalli T., G. Zeeman, G. Lettinga (2001) Anaerobic treatment of domestic sewage at low temperature. *Wat. Sci. Tech.* **44**, 4, 33-40
- 10) Elmitwalli T. A., V. Sklyay, G. Zeeman, G. Lettinga (2002) Low temperature pre-treatment of domestic sewage in an anaerobic hybrid or an anaerobic filter reactor. *Bioresource Technology* **82**, 233-239
- 11) Lier J. B., S. Rebac, P. Lens, F. van Bijen, S. J. H. O. Elferink (1997) Anaerobic treatment of partly acidified wastewater in a two-stage expanded granular sludge bed (EGSB) system at 8°C. *Wat. Sci. Tech.* **36**, 6-7, 317-324
- 12) Lettinga G., S. Rabac, G. Zeeman (2001) Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *TRENDS*

- 13) 中村明靖, 荒木信夫, 山口隆司, 山崎慎一, 大橋晶良, 原田秀樹 (2002) Real-time PCR 法と Competitive PCR 法を用いた *Nitrosomonas* 属の 16S rDNA 及び *amoA* 遺伝子の定量. 環境工学研究論文集 **37**:365-375
- 14) Altschul, S.F., T. L. Madden, A. A. Schafer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Millerand, and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402
- 15) Saitou N., M. Nei (1987) The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecul. Biology and Evolution* **4**,406-425
- 16) Amann, R. I. (1995) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Micro. Ecol. Manual* **3.3.6**, 1-15
- 17) Holger Daims, A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, M. Wagner (1999) The domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all Bacteria: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. *System. Appl. Microbiol.* **22**, 434-444
- 18) Amann R. I., Stomley, J. Devereux R. K., Stahi D. A. (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 614-62
- 19) Weisburg W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriology* **173**, 697-703
- 20) Stahi D. A. R. Amann (1991) Development and application of nucleic acid probes. In E Stackebrandt and M. goodfellow (ed.), Nucle acid techniques in bacterial systematic. *Jphn Wiley & Sons Ltd., Chichester England* 205-248
- 21) Rabus R., M. Fukui, H. Wilkes, F. Widdel (1996) Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic environment culture utilizing alkyl benzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3605-3613
- 22) Manz W., M.Eisenbrecher, T. R. Neu, U. Szewzyk (1998) Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotide. *FEMS Microbiology Ecology* **25**, 43-61
- 23) Devereux R. M. D. Kane, J. Winfrey, D. A. Stahl (1992) Genus- and Group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Sys. Appl. Microbiol.* **15**, 601-609
- 24) Kusel K., H. C. Pinkart, H. L. Drake, R. Devereux (1999) Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of sea grass *Halodule wrightii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5117-5123
- 25) Wagener S., B. Schink (1988) Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 561-565A
- 26) Bainotti A. E., N.Nishio (2000) Growth kinetics of *Acetobacterium* sp. on methanol-formate in continuous culture. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 191-201
- 27) Harmsen H. J., A. D. L. Akkermans, A. J. M. Stams, W. M. Vos (1996) Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2163-2168