

(20) 融雪剤廃水の低温処理 UASB 内における 嫌気性酢酸分解細菌の特定

今井 崇博^{1*}・荒木 信夫²・山口 隆司³・長野 晃弘⁴

¹ 東北大学大学院 工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

² 長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町 888)

³ 呉工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒737-8506 広島県呉市阿賀南 2-2-11)

⁴ 三機工業株式会社 技術開発本部 (〒242-0001 神奈川県大和市下鶴間 1742-7)

*E-mail: imai@water.civil.tohoku.ac.jp

前段に Upflow anaerobic sludge blanket (UASB)、後段に散水ろ床を設けた新規下水処理システムを低温廃水処理に適用し、UASB 内で酢酸分解に寄与する微生物を集積培養とクローン解析を組み合わせて明らかにした。集積培養は酢酸を基質として、培養温度 10℃と 30℃の条件で行った。集積培養 5 回目のサンプルに対してクローン解析を行ったところ、10℃の集積培養サンプルからは *Citrobacter freundii* と *Desulfomicrobium baculatum* に近縁な菌種が検出され、同 30℃のサンプルからは *Clostridium celerecrescens* と *Desulfovibrio* sp. に近縁な菌種が検出された。Fluorescence in-situ hybridization (FISH) 法を用いて UASB 汚泥から検出したところ、DAPI 染色に占める割合は *Citrobacter freundii* が約 2%、*Clostridium celerecrescens* が約 3%、水素酸化性硫酸塩還元細菌は約 6%であった。

Key words: low temperature wastewater treatment, upflow anaerobic sludge blanket, acetate-oxidizing bacteria, enrichment culture, clone analysis

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した^{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、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。

これまでに筆者らは、硫黄の酸化還元サイクルを活性化した処理システムによる融雪剤廃水の低温処理を担う微生物群集構造を、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析で明らかにした³⁾。その結果、UASB 内には *Acetobacterium* 属と *Desulfobulbus* 属などの数種の硫酸塩還元細菌が検出され、UASB は主として流入有機物の低分子化を担っていることが明らかとなった。しかし、UASB でも約 20%の COD が除去されていたにも関わらず、UASB 内に存在する酢酸分解細菌種を特定することはできなかった。

一般に有機物の嫌気性分解反応の中間代謝産物である酢酸は *Methanosaeta* や *Methanosarcina* といった

酢酸酸化性メタン古細菌が担う。また、硫酸塩が十分に存在する条件では完全酸化型の硫酸塩還元細菌が酢酸分解を担うという報告もある^{4,5)}。一方、Schnürerら^{6,7)}は中温条件において水素酸化性メタン古細菌との共生系により酢酸分解を行う *Clostridium ultunense* を単離培養し、Hattoriら⁸⁾は高温条件において *Thermacetogenium phaeum* を同じく単離培養した。

しかし、低温処理システムに関わる嫌気性酢酸分解細菌についての知見は世界的にもほとんど報告がされていないのが現状であり、本処理システムの処理効率の向上を図るためにはUASB内に存在する酢酸分解細菌を特定する必要がある。本研究では硫黄の酸化還元サイクルを活性化させた新規下水処理システムのUASB内での酢酸分解を担う細菌種を、酢酸による集積培養とクローン解析によって特定し、Fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) 法によってUASB汚泥からの検出を試みた。

2. 実験方法

2.1 実験装置及びサンプリング

実験装置の詳細は前報³⁾のとおりである。酢酸分解細菌の特定には、運転1032日目のUASBから採取した汚泥を用いた。

2.2 酢酸基質での酢酸分解細菌の集積培養

採取した汚泥から酢酸分解細菌を検出するために、酢酸を単一炭素源とした集積培養を行った。培地の組成はNH₄Cl (10mM), KH₂PO₄ (1mM), MgCl₂ · 6H₂O (1mM), CaCl₂ · 2H₂O (1mM), NaHCO₃ (30mM), Na₂SO₄ (10mM), CH₃COONa (10mM) とし、pHは7.0に調整した。培地は50ml バイアル瓶に入れた後N₂で気相部を置換し、密閉した。培養は、嫌気的に10℃と30℃で行った。当初、培養汚泥は1週間おきに植え継いだが、途中菌体が目視で確認できなくなったため、植え継ぎ3回目から植え継ぎまでの培養期間を1ヶ月に延長した。クローン解析には植え継ぎ5回目、培養90日のものを使用した。

2.3 クローン解析による酢酸分解細菌の同定

集積培養サンプルからのDNA抽出は中村⁹⁾らの方法に準拠した。植え継ぎ5回目、培養90日のサンプルから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 1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BLAST¹⁰⁾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)¹¹⁾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法による酢酸分解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℃)と洗浄液のNaCl濃度をTable 1に示す。FISH法はAmann¹²⁾の方法に準拠した。用いたプローブはCy-3で5'末端を修飾した。また、Citro458プローブは非特異的な結合を防ぐために、プローブ配列が1塩基異なり、蛍光標識を付加していないコンペティターをモル比1:1の割合で混合してFISH法に適用した。Citro458は*Citrobacter freundii*(DSM33039)、Clo999は*Clostridium celerecrescens*(DSM5628)、DSV687は*Desulfovibrio longus*(DSM6739)の純粋菌株を用いて最適ハイブリダイズ条件を決定した。

Table 1 List of 16S rRNA-targeted oligonucleotide used in this study

Method	Name	Sequence(5'-3')	Target	FA(%)	NaCl(mM)	Ref.
Cloning	EUB338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Most Bacteria	-	-	13
	UNIV1500.deg-R	GGYTACCTTGTACGACTT	All Organisms	-	-	14
FISH	Citro458	GCTGCGGTATTAAACCTC	<i>Citrobacter freundii</i>	20	0.166	This study
	Citro458-competitor	GCTGCGGTATTAAACAC				This study
	Clo999	ATCGTTACATCCCGGTCATT	<i>Clostridium celerecrescens</i>	5	0.585	This study
	DSV687	TACGGATTTCACCTCT	<i>Desulfovibrionaceae</i> , some members of <i>Geobacteriaceae</i>	0	0.900	15

3. 結果および考察

3.1 クローン解析による酢酸分解細菌の特定

UASB 内で酢酸分解に寄与する微生物種を特定するために、UASB 運転 1032 日目に採取した汚泥から酢酸を単一炭素源として調整した培地を用いて集積培養を行った。集積汚泥の DAPI 染色細胞の形態が数種まで減少した植継ぎ 5 回目、培養 90 日の集積培地から DNA を回収し、クローンライブラリーを作成した。Table 2 に得られたクローンライブラリーを示す。

10℃集積培養サンプルの有効クローン数は 30 であり、*Desulfomicrobium baculatum* と *Citrobacter freundii* に近縁な菌種がそれぞれ 10 クローン、17 クローンとほぼこの 2 種によって占められた。30℃集積サンプルの有効クローン数は 31 であり、*Desulfovibrio* sp. と *Clostridium celerecrescens* に近縁な菌種がそれぞれ 14 クローン、15 クローンが検出され、10℃集積培養サンプルと同様にほぼ 2 種のクローンが占めた。BLAST で近縁種とされた *Desulfomicrobium baculatum* と *Desulfovibrio* sp. 及び *Desulfovibrio carbinolicus* は水素資化性硫酸塩還元細菌である^{16,17)}。同様に、得られたクローンに近縁種とされた *Citrobacter freundii* は *Enterobacteriaceae* 科に属する通性嫌気性細菌であり^{18, 19)}、*Clostridium celerecrescens* は高分子有機物から有機酸を発酵する嫌気性菌である²⁰⁾。この両者は酢酸を生成する能力は有するものの、嫌気条件で酢酸を利用する能力があるか否かについては不明である。

Table 2 Sequence similarities to closest relatives from the clones that were obtained from sulfate-reducing acetate-oxidizing enrichment culture.

Closest relatives	Number of clone/total clones	sequence homology (%)
Cultivation temperature at 10°C		
<i>Sulfospirillum halorespirans</i>	2/30	99%
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	10/30	99%
<i>Citrobacter freundii</i>	17/30	99%
<i>Propionibacterium acnes</i>	1/30	98%
Cultivation temperature at 30°C		
<i>Desulfovibrio</i> sp. Clone B4	14/31	99%
<i>Clostridium celerecrescens</i>	15/31	99%
Uncultured bacterium clone IB-18	1/31	99%
<i>Desulfovibrio carbinolicus</i>	1/31	99%

3.2 FISH 法による酢酸分解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、ARB を用いて *Citrobacter freundii* と *Clostridium celerecrescens* に特異的なプローブ Citro458 と Clo999 を開発した。この両プローブを集積培地の細胞に適用したところ、それぞれの培地中の同形態の細胞を検出した (Fig.1-a, b 及び Fig.1-e, f)。また、水素資化性硫酸塩還元細菌の多くの種を検出する DSV687 プローブも集積培地中の細胞を検出することが可能であった (Fig.1-c, d, g, h)。これはクローン解析で近縁種とされた *Desulfomicrobium baculatum*, *Desulfovibrio* sp. と *Desulfovibrio carbinolicus* を検出したものと判断できる。まず、10℃集積培養サンプルに Citro458 と DSV687 を適用したところ、培地中の多くの細胞がこの 2 種のうちのどちらかのプローブで検出可能であった。同様に、30℃集積培養サンプルに Clo999 と DSV687 を適用したところ、ほぼすべての細胞がこの 2 種のどちらかのプローブで検出された。

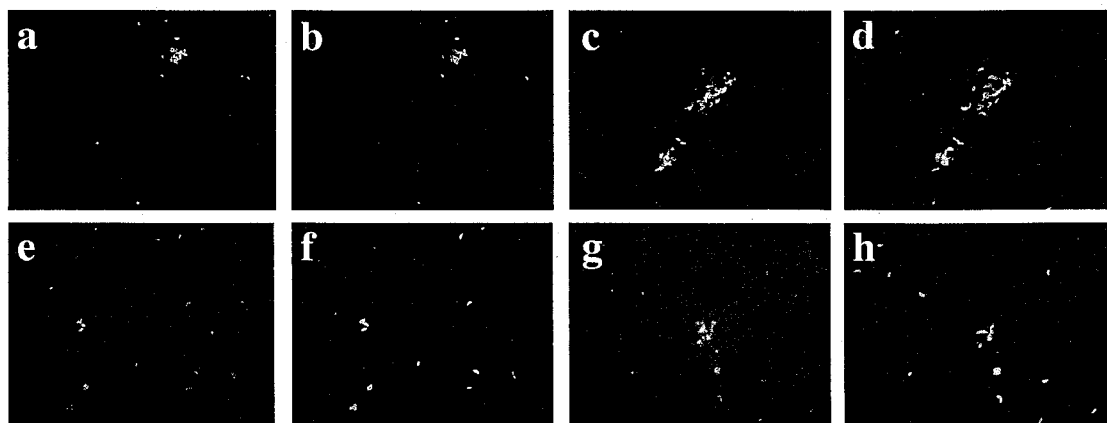


Fig.1 Fluorescence in-situ hybridization results of probe Citro458 (a, b), Clo999 (e, f) and DSV687(c, d, g, h) in the enrichment culture incubated at 10°C (a, b, c, d) and one at 30°C (e, f, g, h).

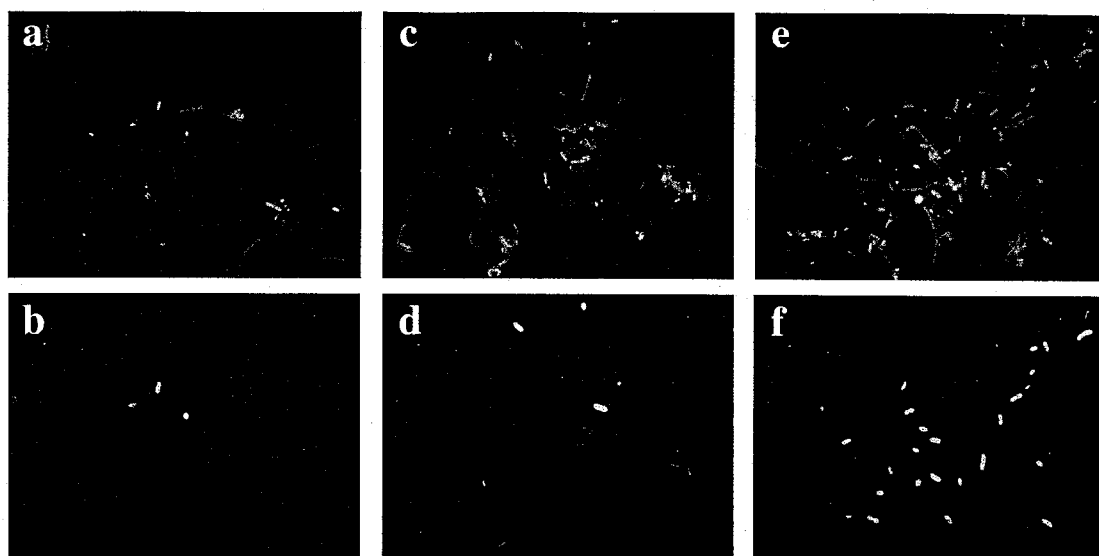


Fig.2 Whole cell hybridization with fluorescent oligonucleotide probe Citro458 (a, b), Clo999 (c, d), DSV687 (e, f) to the UASB sample. Identical fluorescent microscope fields were viewed by U-excitation (a, c, e) and by G-excitation (b, d, f).

Fig.2 に運転 1032 日目の UASB 汚泥に対して Citro458 プロブ、Clo999 プロブと DSV687 プロブを適用した FISH 写真を示す。いずれのプロブも UASB 汚泥から有意なシグナルが得られ、DAPI 染色細胞に対して Citro458 検出細胞が占める割合は $2.2 \pm 0.9\%$ ($n=10$)、Clo999 プロブは $2.6 \pm 1.1\%$ ($n=10$) であった。同様に、DSV687 プロブは $6.4 \pm 3.5\%$ ($n=10$) の割合で存在した。このことから、酢酸を単一炭素源とした集積培養で得た細菌が UASB 内でも生育しており、UASB 内での酢酸の分解は *Citrobacter freundii* や *Clostridium celerecrescens* と水素資化性硫酸塩還元細菌のいずれかが担っているものと推測される。

4. 考察

融雪剤廃水の低温処理に適用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の前段 UASB は、融雪剤廃水の主成分であるプロピレングリコールの酢酸への低分子化とともに一部の酢酸の分解が進行していた。もしこの酢酸分解菌が高濃度に保持できれば、前段 UASB での COD 除去率が向上し、システムのコンパクト化が図れる。また、低温においても活性を維持できる嫌気性有機物分解反応の最終段階を担う細菌種を特定することは水処理技術の開発において大変有意義であると考えられる。前段 UASB 汚泥の酢酸単一培地での集積培養の結果、

10℃ の集積培養条件では *Citrobacter freundii* と *Desulfomicrobium baculatum* の 2 種に、同 30℃ では *Clostridium celerecrescens* と *Desulfovibrio* sp. の 2 種に集積が進行した。本研究のように硫酸塩が十分に存在する条件では完全酸化型の硫酸塩還元細菌が出現するものと予想していたが、水素資化性硫酸塩還元細菌と発酵性の細菌の 2 種の細菌が集積培地に出現した。DSV687 プロブで検出される細菌群は水素資化性硫酸塩還元細菌であり、硫酸塩を利用して酢酸を直接分解するといった報告はない。したがって、集積培地内では酢酸の分解にともなって水素の生成が進行し、その水素を利用しているものと考えられる。このことから酢酸は *Citrobacter freundii* と *Clostridium celerecrescens* が水素生成をともなって分解したものと推測される。これら発酵性の細菌は、酢酸から可逆的に高分子の有機物を発酵する可能性がある。しかし、酢酸の分解が確認された集積初期の培地をはじめ全ての培地においても酢酸以外の有機酸やアルコールは全く検出されなかった。これらのことから、この発酵性の細菌が酢酸を水素と二酸化炭素に分解し、その水素を水素資化性硫酸塩還元細菌が利用したものと判断できる。この共生系は、これまで中温条件^{6,7)}や高温条件⁸⁾で報告されてきたものと同じ機作であると考えられる。すなわち、酢酸を直接二酸化炭素まで分解する反応に比較して、水素スカベンジャーによって水素分圧が十分に低く保たれて

いた場合においては、水素を経由する共生系の方が反応しやすくなるものである。また、低温条件においては水素資化性メタン古細菌による水素利用が著しく低下することが報告されており²⁾、酢酸分解の細菌のための低水素分圧の維持は水素資化性硫酸塩還元細菌が行う方が適しているといえる。今後は、*Citrobacter freundii* と *Clostridium celerecrescens* が水素利用硫酸塩還元細菌との coculture において酢酸を分解するか否について調査する必要がある。また、実際の UASB 内では Citro458 と Clo999 で検出される細胞の割合がほぼ等しかった。しかし、10℃の集積培養から出現した *Citrobacter freundii* による共生系の方がより低温度条件に適応したものであると考えられる。

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、その UASB 内に存在する酢酸分解細菌について、酢酸による集積培養を行ったサンプルでのクローン解析と UASB 汚泥への 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) 酢酸を基質として集積培養を行ったサンプルの EUB338-UNIV1500.deg によるクローン解析では、10℃集積培養サンプルからは *Desulfomicrobium baculatum* と *Citrobacter freundii* に近縁な菌種が優占し、30℃集積培養サンプルからは *Desulfovibrio* sp. と *Clostridium celerecrescens* に近縁な菌種が検出された。UASB 内での酢酸分解は完全酸化型硫酸塩還元細菌によるものではなく、*Clostridium celerecrescens* や *Citrobacter freundii* と水素資化性硫酸塩還元細菌の共生によって進行していることが示唆された。
- 2) FISH 解析の結果、UASB 汚泥には *Citrobacter freundii* の割合は DAPI 染色細胞に対して $2.2 \pm 0.9\%$ 、*Clostridium celerecrescens* は $2.6 \pm 1.1\%$ 、水素資化性硫酸塩還元細菌は $6.4 \pm 3.5\%$ であった。

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）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) 今井崇博, 荒木信夫, 文後佳久, 山口隆司, 高橋優信, 長野晃弘 (2005) 硫酸化還元サイクル活性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, 環境工学研究論文集 42: 571-579.
- 4) Harada H., S. Uemura, K. Momonoi (1994) Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate, *Water Science and Technology*, 28: 335-367.
- 5) Yoda M. M. Kitagawa, Y. Miyaji (1987) Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm, *Water Science and Technology*, 21: 1547-1556.
- 6) Schnürer A., F. P. Houwen, B. H. Svensson (1994) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration, *Arch. Microbiol.* 162: 70-74
- 7) Schnürer A., B. Schink, B. H. Svensson (1996) *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium, *Int. J. Syst. Bactriol.* 46: 1145-1152
- 8) Hattori S., Y. Kamagata, S. Hanada, H. Shoun (2000) *Thermoacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1601-1609
- 9) 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
- 10) Altschul S. F., T. L. Madden, A. A. Schafer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Millerand, D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- 11) Saitou N., M. Nei (1987) The neighbor-joining method, a

- new method for reconstructing phylogenetic tree, *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425
- 12) Amann R. I., J. Stomley, R. K. Devereux, D. A. Stahl (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 614-623
 - 13) Holger D., 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
 - 14) Weisburg W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, D. J. Lane (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.* **173**: 697-703
 - 15) 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
 - 16) Devereux R., M. Delaney F. Widdel, D. A. Stahl (1989) Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria, *J. Bacteriol.* **171**, 6689-6695
 - 17) Voordouw G. (1995) The genus *Desulfovibrio*: the centennial, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2813-2819
 - 18) Janda J. M., S. L. Abbott, W. K. W. Cheung, D. F. Hanson (1994) Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the *Enterobacteriaceae*, *Res. Microbiol.* **146**: 279-290
 - 19) Janda J. M., S. L. Abbott, W. K. W. Cheung, D. F. Hanson (1994) Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory, *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1850-1854
 - 20) Palop M. L., S. Valles, F. Pinaga, A. Flors (1989) Isolation and characterizaion of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium celerecrescens* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 68-71
 - 21) Conrad R., B. Wetter (1990) Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria, *Arch. Microbiol.* **155**: 94-98

(2006. 5. 26 受付)

Identification of Acetate-oxidizing Bacteria in the UASB Applied to Low Temperature Treatment of Deicing Fluid Wastewater

Takahiro IMAI¹, Nobuo ARAKI², Takashi YAMAGUCHI³ and Akihiro NAGANO⁴

¹Dept. of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

²Dept. of Civil Engineering, Nagaoka College of Technology

³Dept. of Civil Engineering, Kure College of Technology

⁴Sanki Engineering Co. Ltd.

Anaerobic acetate-oxidizing bacteria were identified in the up-flow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) applied to the low temperature treatment of sulfate-added wastewater of deicing fluid. Clone library analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA was employed to identify bacteria, in which acetate was supplied as an electron donor. Identified clones were dominated by those derived from *Citrobacter freundii* and *Desulfomicrobium baculatum* in the enrichment culture incubated at 10°C, and those from *Clostridium celerecrescens* and *Desulfovibrio* sp. in the enrichment culture incubated at 30°C. Almost all of the cells were detected by FISH analysis using only two kinds of probes specific for hydrogen-utilizing sulfate-reducing bacteria and for either *Citrobacter freundii* or *Clostridium celerecrescens* in the both enrichment culture. Those two kinds of bacteria could be an acetate-oxidizing member in each culture. FISH analysis revealed that *Citrobacter freundii*, *Clostridium celerecrescens* and hydrogen-utilizing sulfate-reducing bacteria actually existed in the UASB, and the ratio of them to DAPI-stained total cells were about 2%, 3% and 6%, respectively.