

(59) テレフタル酸含有廃水を対象とした 粒状活性炭膨潤床型嫌気性反応器の菌相解析

日高 平^{1*}・千 智¹・森 修一¹・河村正純¹・本間 康弘²・津野 洋¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540京都市西京区京都大学桂C1)

²荏原エンジニアリングサービス (株) プロセス開発統括部プロセス技術室
(〒251-8502 神奈川県藤沢市本藤沢4-2-1)

* E-mail: hidaka@water.env.kyoto-u.ac.jp

テレフタル酸含有廃水を対象とした粒状活性炭膨潤床型嫌気性反応器として、人工廃水および実廃水を対象とした3系列を長期的に運転した。COD除去率やテレフタル酸除去率で90%以上を達成でき、メタンへの転換効率はテレフタル酸を含む有機物の種類によらずほぼ一定であった。ランダムクローニング法による菌相解析では、*Archaea*としてUncultured crenarchaeote TP-D1、ならびにUncultured archaeon 44A-1およびUncultured archaeon 39-2の近縁種が、*Bacteria*としてUncultured bacterium SHA-22が高頻度で検出された。高占有率で検出された*Archaea*についてプライマーを設計し、リアルタイムPCRによる定量を行った。定量結果とテレフタル酸分解の指標としてのメタン生成速度と間に相関関係が見られ、リアルタイムPCRによる定量が反応器の設計・操作因子の検討に有用であることを明らかにした。

Key Words : terephthalate, anaerobic degradation, microbial structure, granular activated carbon (GAC), expanded-bed reactor

1. はじめに

ポリエチレンテレフタレートなどの原料として世界中で利用されている高純度テレフタル酸の製造工程より排出されるテレフタル酸含有廃水の処理は、好気性による生物処理が一般的であるものの、汚泥発生量が少ない点、運転費用が安い点、メタンなどの有価物を回収できる点などから、嫌気性処理が注目されてきている¹⁾。より安定かつ効率的な処理を目指して、Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)、生物膜付着担体や二相式を用いた反応器²⁾³⁾⁴⁾の研究も進みつつある。テレフタル酸の嫌気的分解に関わる微生物群の把握や定量は、反応機構を明らかにしより効率的な反応器を開発するために重要である。近年分子生物学的手法による研究が急速に進みつつあり、Wuら⁵⁾は、テレフタル酸を対象としたUASB反応器で、*Bacteria*として δ -*Proteobacteria*に属するグループTA および *Chloroflexi* (門) などを、*Archaea*として *Methanosarcina* *concili*などを検出している。グループTAは、芳香族を分解している嫌気性システムで検出される *Syntrophorhabdaceae*科に属するとされている⁶⁾。Qiuら⁷⁾⁸⁾は、*Methanospirillum hungatei*共存下でテレフタル酸を分解する

Pelotomaculum terephthalicum および *Pelotomaculum isophthalicum* を報告している。Chenら⁹⁾は、テレフタル酸含有廃水を対象とした高温完全混合反応器で反応に関わる微生物群として、*Bacteria*の *Desulfotomaculum* 属および新門候補OP5、ならびに*Archaea*の *Methanosarcina* 属を報告している。

一方筆者らは、難分解性有機物含有廃水の嫌気性処理技術として、粒状活性炭膨潤床型嫌気性反応器の開発を行ってきている¹⁰⁾。これは、活性炭の物理的な吸着効果および表面に付着増殖する生物膜による生物分解効果を同時に活用することが可能であり、テレフタル酸含有廃水への適用も期待できる。しかしながら、テレフタル酸含有廃水を対象とした粒状活性炭膨潤床型嫌気性反応器の長期的な運転における処理特性や、反応に関わる菌相に関する研究例は見られない。

本研究では、テレフタル酸含有廃水を対象とした粒状活性炭膨潤床型嫌気性反応器として、人工廃水および実廃水を対象とした3系列を長期的に運転した。そして、処理特性を把握し分子生物学的手法により反応器内の微生物群集を解析し、処理状況を把握する上で指標となり得る微生物群集の定量方法を検討することを目的とした。

2. 実験方法

(1) 反応器の連続運転

本研究で用いた粒状活性炭膨潤床型嫌気性反応器の概略を図1に示す。反応器の直径は10 cm, 有効容積は10 Lで, 周囲に取り付けられたウォータージャケットに温水を循環させることで, 反応器内の水温は実験期間中一貫して35℃に保った。流動担体として粒状活性炭 (FILTRASORB 400, 東洋カルボン社製) を各反応器に1.5 kg投入した。マグネットポンプにより反応器上部から底部へ内部溶液を循環させることで上昇流を発生させ粒状活性炭の流動化を図り, 循環流量は活性炭の膨潤率が25%となるように調整した。その際の粒状活性炭流動床容積は4.3Lであった。発生したメタンガスは, ガスバックにより捕集した。

本研究では, 流入水, 植種微生物, 運転期間および運転操作因子が異なる上記の反応器を3系列独立して運転した (以下各々をRun 1~3とする)。Run 1は, 基礎的な知見を得るために人工廃水を対象とし, Run 2および3は実廃水を対象とした。人工廃水は, 実廃水を模擬するとともに単純化し, テレフタル酸 (80~450 mg/L), 酢酸 (500~1000 mg/L), 栄養塩 (K_2HPO_4 0.35; KH_2PO_4 0.23; NH_4Cl 0.50; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.41; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.25 g/L) および微量元素 (ピリドキシンHCl, 0.1; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3; 葉酸 0.02; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1; ビオチン, 0.02; H_3BO_3 0.9; チアミン HCl, 0.05; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.6; リボフラビン, 0.05; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.03; ニコチン酸, 0.05; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.06; パントテン酸カルシウム, 0.05; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1; p-アミノ安息香酸, 0.05; システインHCl, 300; チオクト酸, 0.05 mg/L) から作成した。実廃水試料は, 高濃度テレフタル酸を含有する工程から得られる原液を水道水により10倍以上に希釈し酢酸を添加することで, テレフタル酸濃度が60~440 mg/L, 酢酸濃度が1000 mg/L程度となるようにした。これは, 実際に工場から排出される時点での廃水と同程度の有機物組成にするためである。Run 1の運転開始時には, 下水汚泥の嫌気性発酵槽の汚泥100 mLを種汚泥として添加した。Run 2および3では, Run 1からのそれぞれ678日目および940日目の流出水を2 L/dで5日間流入させることで植種した。Run 1は, 有機物負荷率 (OLR) を0.2~2.9 kgCOD/(膨潤床 $m^3 \cdot d$) の範囲で1342日間運転した。Run 2は, 実廃水への適用性を把握するために, 0.1~3.2 kgCOD/(膨潤床 $m^3 \cdot d$) の範囲で662日間運転した。Run 3は, 再現性の確認のために, 実廃水を対象に, より早くOLRを増加させながら0.4~6 kgCOD/(膨潤床 $m^3 \cdot d$) の範囲で789日間運転した。400日目~514日目の間は運転を停止したものの, その間も温度は35℃に維持した。

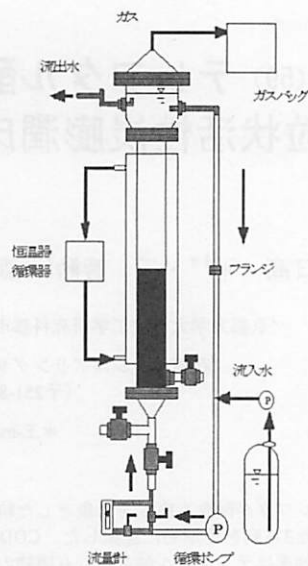


図-1 反応器の概要

(2) 水質分析方法

CODcrはDR-2400 (Hach社) で, 発生ガスの生成量および組成については赤外線式ガス濃度測定装置CGT-7000 (島津製作所) で測定した。テレフタル酸濃度は254 nmにおける吸光度により測定し¹¹⁾, その適用性は液体クロマトグラム法により確認した (住友金属テクノロジーへの分析依頼)。その他の基本的な水質項目は下水試験方法¹²⁾に準拠して行った。

(3) 菌相解析方法

反応器内の微生物群集の解析を, 千ら¹³⁾¹⁴⁾と同様のランダムクローニング法で試みた。DNA抽出は, DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を利用しLysis法に基づいてサンプリング直後に行った。電気泳動により抽出DNAを確認した後, それを鋳型DNAとしてPCRを行った (PTC-200, MJ research)。PCRは, TaKaRaのpremix taq 酵素, ならびに大半の真正細菌・真核細菌・古細菌の16S rRNA遺伝子を対象とするUniv.519F-Univ.1406Rプライマー¹⁵⁾を用いた。PCR条件は, 94℃×4分+ (94℃×1分+60℃×1分+72℃×1分) ×30サイクル+72℃×10分とし, 900 bpの目的バンドを確認した。回収・精製後, TA-cloningを行い, シークエンス解析 (Univ.519Fプライマー) を行った。シークエンス解析は, タカラバイオのジェノミクスセンターのシークエンシングサービスを利用した。得られたデータは, ほとんどシークエンス長600~700bp程度であり, 相同

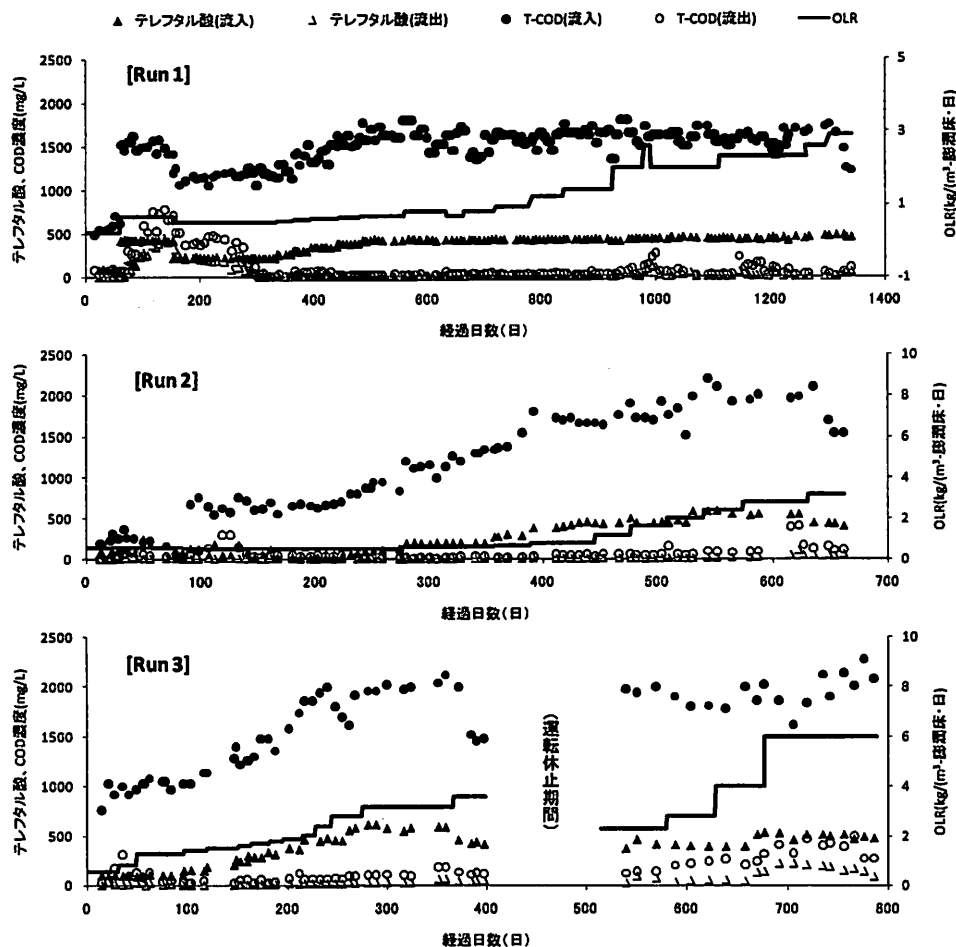


図2 水質の経時変化

性検索プログラム (BLAST ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) により解析した。相同性98%以上で、操作的分類単位 (OTU) を分類した。系統樹は、MEGA4¹⁰⁾を用いて、ClustalWによるアライメントおよび近隣結合法により作成し、Bootstrap解析 (1000回) を行った。

鍵となる微生物群をリアルタイムPCR法により定量するためのプライマーを、primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)、BLAST、およびGene-walker program (<http://www.cybergenes.com/primerdesign/>) を用いて開発した。アニーリング温度の最適化、増幅曲線分析および融解曲線分析を行い、リアルタイムPCRへの適用性を確認した。最後にPCR増幅産物の塩基配列を解読し、BLASTを行い、プライマーが特定の目的とする微生物の16S rRNA遺伝子を増幅していることを確認した。全菌の定量として、Univ.519F-Univ.1406Rプライマー¹⁹⁾を用いた定量もあわせて行った。16

S rRNA遺伝子の定量は、蛍光色素 (SYBR Green I, Roche) によるリアルタイムPCRで行った (Light Cycler 12, Roche)。PCR条件は、95℃×10分 + (95℃×10秒 + 60℃×10秒 + 72℃×30秒) ×30サイクルとした。外部標準DNA溶液は混合液より抽出されたDNA溶液を用いてPCRによってDNAを増幅することで作成し、そのDNA濃度は吸光度の測定により決定した (ND-1000, NanoDrop)。これにより作成された検量線を用いて、サンプル中に含まれるDNA濃度を決定した。

3. 実験結果および考察

(1) 処理特性

各Runでの代表的な水質の経時変化を図2に示す。流

出テレフタル酸濃度が10 mg/L以下を安定して維持するようになるまでの期間をスタートアップ期間とすると、各Runのスタートアップ期間はそれぞれ300, 130および70日ほどであり、それ以降は処理成績が安定した。Run 3の植種水を得た時のRun 1の運転負荷率はRun 2の時より高く多くの菌体が蓄積していたため、Run 3ではRun 2より高負荷運転であるにもかかわらずスタートアップ期間を短縮できたと考えられる。これらより、スタートアップ期間の短縮を図るには、予め集積培養された嫌気性テレフタル酸分解微生物にて微生物植種を行うことが有効であると示された。いずれのRunでも、COD除去率やテレフタル酸除去率が90%以上を達成していた。Run 3の運転停止期間の影響も大きく見られなかった。テレフタル酸およびそれ以外のCOD成分からのメタンガス生成割合の関係を図3に示す。ここでは、全COD除去率から算出したメタン生成速度（横軸）に対して、実測メタン生成速度（実測値のプロットで、(a)+(b)に相当）およびテレフタル酸以外のCOD成分の除去から算出されるメタン生成速度（その他による算出値のプロットで、(b)に相当）の関係を示している。後者は、溶解性CODとテレフタル酸の測定値の差をその他の有機物とみなして、反応器流入から流出でのその他の有機物の濃度差に流量を乗じてみかけの減少速度を算出し、メタンガスに換算してメタンガス生成速度とした。両者のプロットの差（(a)に相当）が、テレフタル酸の分解から生じたメタン生成速度となる。基質の全CODに対してテレフタル酸のCODが約3割を占めており、また図3で(a)の部分が約3割を占めており、同程度の割合である。これより、メタンへの転換効率、テレフタル酸および酢酸など他の有機物の種類によらずほぼ一定であったと考えられる。

(2) 菌相解析

ランダムクローニング法では、毎回90程度のクローンの分析を行った。Run 1, 2および3で、それぞれ6~18, 17~34および10~22のOTUに分類された。実廃水を対象としたRun 2および3では、より多様な菌相が形成されていたことになる。検出されたOTUは、以下のパラメータを用いて表1に示すように分類した。

$$[\text{検出率}(\%)] = m \cdot n^{-1} \cdot 100 \quad (1)$$

$$[\text{最大占有率}(\%)] = \max(p_i) \quad (2)$$

ここで、 m は各RunであるOTUが検出された回数、 n は各Runでの分析回数、および $p_i(\%)$ は各Runでの i 回目の分析でのそのOTUの占有率 ($i=1, 2, \dots, n$) を表す。人工廃水によるRun 1で頻繁に検出されたOTUが特に、今回対象としたテレフタル酸含有廃水の処理に関わっている可能性が高いと考え分類Aとし、その中で最大占有率の大小でAaおよびAbとした。Run 1では頻繁に検出されなかつ

たものの、Run 2もしくは3で高占有率もしくは高頻度で検出されたOTUは分類Bとした。それ以外のOTUは分類Cとした。全分析で、205種類のOTUが検出されたものの、そのうち187はそれほど頻繁には検出されなかった（分類C）。分類A（AaもしくはAb）および分類BとされたOTUを表2にまとめて示す。このなかで、Uncultured crenarchaeote clone TP-D1は、最も近縁なデータと比較して、相同性は97%以下であり、"Uncultured crenarchaeote clone TP-D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence"（アクセッション番号：DQ898142）として、GenBank（National Center for Biotechnology Information）に登録したものである。これらは、テレフタル酸そのものの分解に直接関わっているとはいえないかもしれないものの、今回対象としたテレフタル酸含有廃水の処理に関わる微生物群集と考えられる。

Run 1では、Uncultured crenarchaeote TP-D1、ならびに Uncultured archaeon 44A-1およびUncultured archaeon 39-2の近縁種が毎回の分析で、高占有率で検出された（分類Aa）。Methanobacterium beijingense および Uncultured bacterium SHA-22の近縁種も高頻度で検出されたものの、

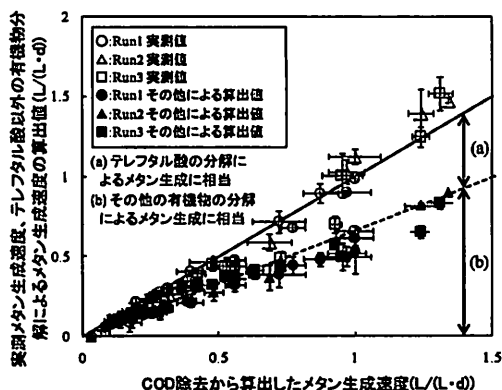


図3 メタン生成速度の関係

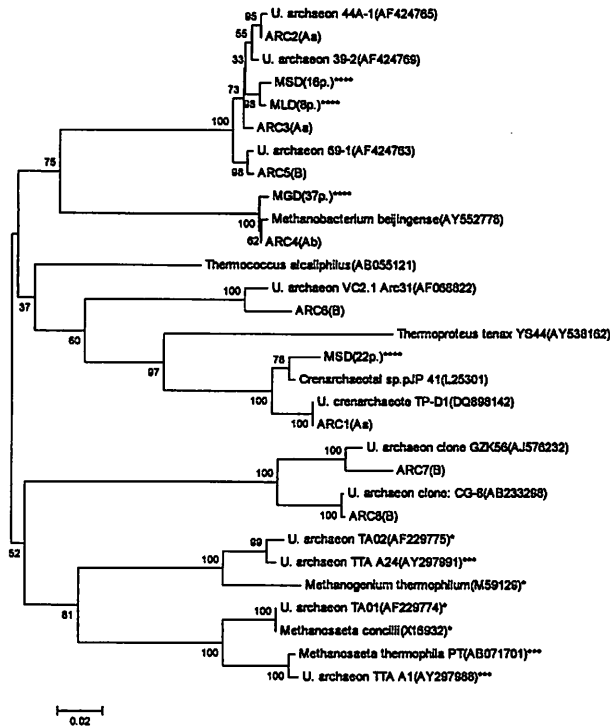
表-1 OTUの分類

		分類	OTU数
Run 1 での 検出率 70% 以上	Run 1 での最大占有率 20%以上	Aa	3
	Run 1 での最大占有率 20%未満	Ab	2
Run 1 での 検出率 70% 未満	Run 2 もしくは 3 で、最大占有率 10%以上、もしくは検出率 40%以上	B	13
その他		C	187
合計			205

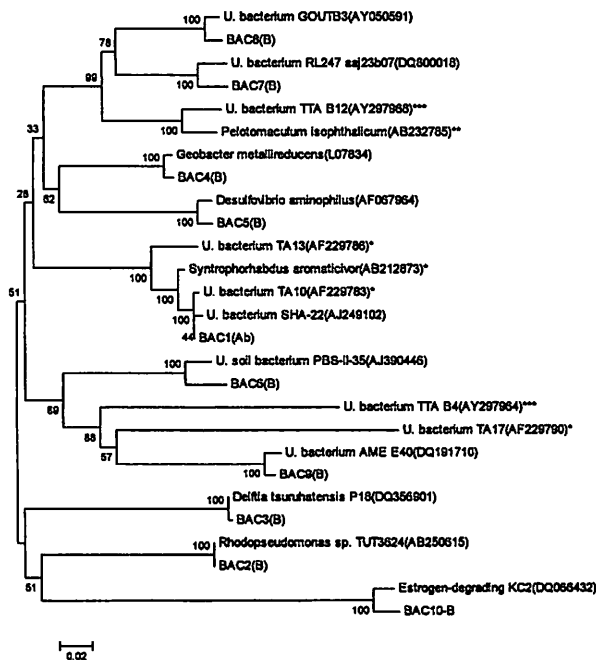
表2 OTUの経時変化

OTU (分類)	近縁種	平均 相関性	Run1(H)										Run2(H)										Run3(H)									
			884	967	989	1045	1063	1079	1101	1129	1165	1193	205	288	366	422	450	486	514	22	100	118	156	184	220	248	279	749	761			
ABC1 (Aa)	Uncultured crenarchaeote clone TP-D1	(100%)	33%	56%	53%	70%	84%	67%	30%	66%	33%	40%	2%				5%	1%	6%		9%					5%		6%				
ABC2 (Aa)	Uncultured archaeon 44A-1	99.4%	30%	20%	34%	10%	4%	7%	31%	17%	25%	25%	49%	59%	20%	12%	28%	54%	5%	34%	42%	48%	37%	74%	56%	20%	34%	41%				
ABC3 (Aa)	Uncultured archaeon 39-2	99.0%	21%	14%	9%	7%	5%	7%	15%	4%	12%	13%	12%	14%	13%	3%	5%	1%	5%	2%												
ABC4 (Ab)	<i>Methanobacterium bryantiae</i> strain 4- 1	99.8%		2%	2%	3%	2%		1%	4%	8%	9%	2%	1%	2%		1%	2%	3%	3%	3%		2%									
ABC5 (B)	Uncultured archaeon 69-1	99.6%								1%			1%	1%		16%	7%	11%	15%		1%				3%	1%	1%					
ABC6 (B)	Uncultured archaeon VC2.1 Arc11	95.3%												1%							12%	2%		1%	2%							
ABC7 (B)	Uncultured archaeon clone CZK56	95.0%																			36%	18%	4%									
ABC8 (B)	Uncultured archaeon gene clone: CG-8	99.7%													1%	3%	2%	8%	4%													
BAC1 (Ab)	Uncultured bacterium SHA-22	99.4%	2%	1%		2%	3%		4%		1%	3%	1%	1%	2%	27%	16%	15%	10%				1%		3%	1%	1%					
BAC2 (B)	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. TUT3624	99.7%														1%						15%	19%									
BAC3 (B)	<i>Deiflia insubarenensis</i> strain P18	99.8%													12%					1%												
BAC4 (B)	<i>Geobacter metallicedens</i>	99.0%																	42%													
BAC5 (B)	<i>Desulfotomaculum ambophilus</i>	97.9%									1%					3%	2%	1%				1%	6%	2%	1%							
BAC6 (B)	Uncultured soil bacterium PBS-J1-35	95.3%														3%	9%	3%														
BAC7 (B)	Uncultured bacterium clone RL247_ast33b07	95.7%																							35%	55%	49%	39%				
BAC8 (B)	Uncultured bacterium clone COUTB3	97.8%																	21%													
BAC9 (B)	Uncultured bacterium clone AME E40	98.0%								1%						1%		1%	1%													
BAC10 (B)	Estrogen-degrading bacterium KC2	97.4%											3%	6%	3%																	

a) Archaea



b) Bacteria



(Aa), (Ab), (B): 本研究で検出された OTU の分類
 *: テレフタル酸含有廃水を対象とした中温反応器で検出⁹⁹⁾
 **: テレフタル酸含有廃水を対象とした中温反応器で検出⁹⁾
 ***: テレフタル酸含有廃水を対象とした高温完全混合反応器で検出²⁾
 **** (MSD, MLD, and MGD): 中温の実施設で検出された OTU¹⁰⁾, () 内の p の前の数字は、その際の検出率 (%) を示す

図-4 分類AおよびBのOTUの系統樹

占有率は低かった（分類Ab）。Run 2で最も検出されたのはUncultured archaeon 44A-1の近縁種で、平均占有率は35%であった。Uncultured bacterium SHA-22, Uncultured archaeon 39-2, および*Methanobacterium beijingense*の近縁種、ならびにUncultured crenarchaeote TP-D1も検出されていた。Uncultured archaeon 44A-1の近縁種はRun 3でも最も検出された。Run 2および3では、Run 1では検出されないOTUが高占有率もしくは高頻度で検出された（分類B）。実廃水を対象としたために、組成や濃度に変動があり、テレフタル酸および酢酸以外の有機物の分解に関わる微生物相が変動したためであると考えられる。ただし、Run 2および3で共通して高検出率だったOTUではない。人工廃水を対象としたRun 1でよく検出された分類AのOTUが特にテレフタル酸含有廃水の処理に直接もしくは間接的に関わっている可能性が高く、反応器の設計・操作因子を議論する上での指標としては適切だと考えられる。分類AおよびBのOTUの系統樹を図4に示す。筆者らが以前、高温生ごみ発酵槽（TGD）、中温生ごみ発酵槽（MGD）、高温下水汚泥発酵槽（TSD）、中温下水汚泥発酵槽（MSD）、高温畜産廃棄物発酵槽（TLD）および中温畜産廃棄物発酵槽（MLD）の6実施で行った菌相解析の結果¹⁶も合わせて示した。また、テレフタル酸の嫌気的な分解に関する他の研究例の結果^{20,21}も含めた。Uncultured archaeon 44A-1およびUncultured archaeon 39-2は、MSDおよびMLDで検出されたOTUに近縁であった。いずれのRunでも近縁種が検出されたUncultured archaeon 44A-1は、Williamsらにより、下水汚泥を対象とした嫌気性発酵槽から検出されている（アクセッション番号：AF424765）ものの、その特性は明らかでない。*Methanobacterium beijingense*は、MGDで検出されたOTUに近縁であった。*Methanobacterium beijingense*は、嫌気性発酵槽から分離されており、37℃およびpH7.5~7.7の条件下で活動する水素資化性のメタン生成菌であることが知られている¹⁷。高温発酵槽（TGD、TSDおよびTLD）で検出されたOTUの近縁種は、本研究で検出されていない。本研究で検出されたArchaeaのOTUは、Chenら²、Wuら⁹およびQiuら²⁰が示している微生物相とは異なっていた。本研究で検出されたOTUの近縁種の一部は、テレフタル酸を特に扱っていない嫌気性発酵槽の実施設から検出されている。テレフタル酸の分解に直接関わっているのではなく、メタン生成反応の段階などで間接的に関わっており、基質や運転条件などにより優占種として検出されるArchaeaは異なっていると考えられる。ただしメタン生成反応はテレフタル酸の分解処理の中で重要な反応であり、実際テレフタル酸およびそれ以外のCOD成分からのメタン生成反応は、図3に示されているように同時に進行していたことから、間接的にはテレフタル酸の

分解を表す指標になると考えられる。

*Bacteria*としては分類Aの中でUncultured bacterium SHA-22の近縁種のみが検出された。詳細は不明であるものの、芳香族の分解を行っている嫌気性発酵槽で検出されているグルーブTAおよびフタル酸を分解する細菌である*Syntrophorhabdus aromaticivorans*に近縁である⁹。よって、Uncultured bacterium SHA-22の近縁種は、検出率は低かったもののテレフタル酸の分解に関わっている可能性が高いと考えられる。

分類BのOTUは、系統樹上でも全く異なる位置であった。実下水を対象としたことにより得られており、これからもテレフタル酸の分解に直接関わっていないものと考えられる。

表-3 設計プライマー

ターゲット	配列 (5'-3'); 上段F/下段R	増幅サイズ (bp)
Uncultured archaeon 44A-1	ACGAACGAGACCCCTTGC ATCTA	224
	CAACCCCTCAATCCGAAC AAGA	
Uncultured archaeon 39-2	TAGACGGACCGCCACTGC TA	287
	GCCTCACTAGACCCAC TAA	
Uncultured crenarchaeote TP-D1	AGGGGAGCAAAGGGGAT TA	251
	GTCAGCTTGGCCTTCATT CTAC	

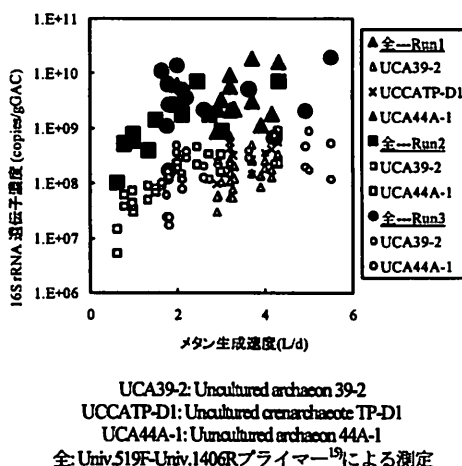


図-5 16S rRNA遺伝子濃度とメタン発生速度の関係

(3) リアルタイムPCRによる定量

菌相解析の結果より、分類AaとしたOTUの近縁種 (Uncultured archaeon 44A-1, Uncultured archaeon 39-2および Uncultured crenarchaeote TP-D1) について、リアルタイムPCRを用いた定量を試みた。分類AbとしたOTUの近縁種 (*Methanobacterium beijingense* および Uncultured bacterium SHA-22) については、リアルタイムPCRを用いた定量を行わなかった。特に Uncultured bacterium SHA-22 近縁種は直接テレフタル酸の分解に関わっている可能性が高いものの、必ずしも毎回検出されていたわけではないので、指標としての利用には不安があり、今回は確実に定量できると考えられた分類Aaを対象とした。表3に示すプライマーを設計し、最適アニーリング温度を検討したところ、60℃であった。これらのプライマーを用いて増幅した断片は、ターゲット微生物である Uncultured archaeon 44A-1, Uncultured archaeon 39-2 および Uncultured crenarchaeote TP-D1 の塩基配列と、それぞれ97.9, 99.6および96.9%の相同性が得られ、定量可能であると判断した。10¹~10⁵ copies/μL の濃度範囲で検量線は直線性を示していた。

16S rRNA遺伝子濃度とメタン発生速度の関係を図5に示す。濃度は、反応器に投入した粒状活性炭 (granular activated carbon, GAC) 1gあたりで示している。Runの違いによらず同様の傾向が見られ、メタン発生速度の増加に従い2L/dまでは16S rRNA遺伝子濃度が増加しており、それ以上ではほぼ一定であった。全微生物をターゲットとした16S rRNA遺伝子濃度は、10⁹~10¹⁰ copies/gGAC程度であり、Uncultured archaeon 44A-1, Uncultured archaeon 39-2およびUncultured crenarchaeote TP-D1の16S rRNA遺伝子濃度は10⁸~10⁹ copies/gGAC程度であった。これらの値は、既往研究と同程度である¹⁸⁾¹⁹⁾。Uncultured crenarchaeote TP-D1の16S rRNA遺伝子はRun 2および3でほとんど検出されず、ランダムクローニング法での低い占有率に一致していた。Uncultured archaeon 44A-1およびUncultured archaeon 39-2の近縁種は、テレフタル酸の分解後も含めたメタン生成反応に関わっていると考えられる。Uncultured crenarchaeote TP-D1もテレフタル酸含有廃水の分解過程のどこかで関わっていると考えられるものの、占有率が低く、定量も難しいと考えられる。テレフタル酸およびそれ以外のCOD成分からのメタン生成速度の割合はおおむね一定であることが示されているので、メタン生成速度はテレフタル酸分解に関連していると考え、これらの微生物をターゲットとした定量結果はメタン生成速度と関連があったことから、間接的な評価ではあるものの、テレフタル酸含有廃水処理の反応器の設計・操作因子を議論するための有用な指標になるものと考えられる。

4. 結論

本研究では、テレフタル酸含有廃水として人工廃水および実廃水を対象とした粒状活性炭膨潤嫌気性反応器の3系列を、長期的に運転した。COD除去率やテレフタル酸除去率で90%以上を達成でき、メタンへの転換効率はテレフタル酸を含む有機物の種類によらずほぼ一定であった。分子生物学的手法により反応器内の微生物群集を解析し、処理状況を把握する上で指標となり得る微生物群集の定量方法を検討した。以下に得られた結論をまとめる。

- 1) ランダムクローニング法による菌相解析では、*Archaea*としてUncultured crenarchaeote TP-D1、ならびにUncultured archaeon 44A-1およびUncultured archaeon 39-2の近縁種が、*Bacteria*としてUncultured bacterium SHA-22の近縁種が高頻度で検出された。
- 2) Uncultured archaeon 44A-1, Uncultured archaeon 39-2およびUncultured crenarchaeote TP-D1を定量しうるプライマーを設計し、リアルタイムPCRによる定量を行った結果、反応器の運転におけるメタン生成速度との間に関係が見られた。メタン生成速度はテレフタル酸分解に関連しており、間接的な評価ではあるものの、リアルタイムPCRによる定量がテレフタル酸含有廃水処理の反応器の設計・操作因子を議論するための有用な指標になるものと考えられた。

謝辞：菌相解析の一部では楠田育成京都大学技術職員の協力を得ており、感謝いたします。本研究の一部はNEDO助成事業「安定的・効率的な嫌気性廃水処理装置の開発」によるものであり、関係各位に、謝意を表します。

参考文献

- 1) Macarie, H., Noyola, A., and Guyot, J. P.: Anaerobic Treatment of a petrochemical wastewater from terephthalic acid plant. *Water Sci. Technol.*, 25(7), 223-235, 1992.
- 2) Chen, C.L., Macarie, H., Ramirez, I., Oimos, A., Ong, S. L., Monroy, O., and Liu, W. T.: Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate. *Microbiology*, 150, 3429-3440, 2004.
- 3) Kleerebezem, R., Ivako, M., Pol, L.W.H., and Lettinga, G.: High-rate treatment of terephthalate in anaerobic hybrid reactors. *Biotechnol. Prog.*, 15, 347-357, 1999.
- 4) Kleerebezem, R., Beckers, J., Pol, L.W.H., and Lettinga, G.: High-rate treatment of terephthalic acid production wastewater in a two-stage anaerobic bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 91(2), 169-179, 2005.
- 5) Wu, J.H., Liu, W.T., Tseng, I.-C., and Cheng, S.S.: Characterization of

- microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology*, 147, 373-383, 2001.
- 6) Qiu, Y.L., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., and Sekiguchi, Y.: *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Appl. Environ. Microb.*, 74(7), 2051-2058, 2008.
 - 7) Qiu, Y.L., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Tseng, I.C., Cheng, S.S., Ohashi, A., and Harada, H.: Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomer-degrading microbes from methanogenic sludge treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Appl. Environ. Microb.*, 70(3), 1617-1626, 2004.
 - 8) Qiu, Y.L., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Tseng, I.C., Cheng, S.S., Ohashi, A., Harada, H., and Kamagata, Y.: *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. *Arch. Microbiol.*, 185(3), 172-182, 2006.
 - 9) 河村正純, 津野 洋, 宗宮 功: 粒状活性炭流動床型嫌気性反応器のフェノール廃水処理における負荷変動応答特性に関する研究. 下水道協会誌論文集, 35(427), 119-127, 1998.
 - 10) 津守嘉彦, 越川博元, 尾家俊康, 津野 洋: 粒状活性炭膨張床型嫌気性反応器を用いたテトラクロロエチレン処理. 土木学会論文集, 804/VII-37, 43-50, 2005.
 - 11) Fajardo, C., Guyot, J.P., Macarie, H., and Monery, O.: Inhibition of anaerobic digestion by terephthalic acid and its aromatic byproducts. *Water Sci. Technol.*, 36(6-7), 83-90, 1997.
 - 12) 日本下水道協会: 下水試験方法-1997年版-, 1997.
 - 13) 千 智勲, 日高 平, 洪 鋒, 越川博元, 岩崎大介, 津野 洋: 生ごみを対象とした高温メタン発酵槽における微生物群集解析. 環境工学研究論文集, 44, 625-632, 2007.
 - 14) Cheon, J., Hidaka, T., Mori, S., Koshikawa, H., and Tsuno, H.: Applicability of random cloning method to analyze microbial community in full-scale anaerobic digesters. *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 1389-1723, 2008.
 - 15) Lane, D. J.: 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., Goodfellow, M., editors. Chichester: Wiley, pp.115-175, 1991.
 - 16) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.: MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599, 2007.
 - 17) Ma, K., Liu, X., and Dong, X.: *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, 55, 325-329, 2005.
 - 18) Yu, Y., Lee, C., Kim, J., and Hwang, S.: Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, 89(6), 670-679, 2005.
 - 19) Sawayama, S., Tsukahara, K., and Yagishita, T.: Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresour. Technol.*, 97, 69-76, 2006.

(2009.5.22受付)

Microbial diversity in terephthalate digestion using expanded-bed granular activated carbon anaerobic reactor

Taira HIDAKA¹, Ji Hoon CHEON¹, Shuichi MORI¹, Masasumi KAWAMURA¹,
Yasuhiro HONMA² and Hiroshi TSUNO¹

¹Dept. of Urban and Environmental Engineering, Kyoto University

²Process Development Dept., Process Research and Development Div.,
Ebara Engineering Service Co., Ltd

An expanded-bed granular activated carbon anaerobic reactor was developed to treat wastewater containing terephthalic acid. More than 90% of both COD and terephthalate were stably removed and transformed simultaneously to methane. Uncultured crenarchaeote TP-D1, and Operational Taxonomic Units closely related to uncultured archaeon 44A-1 and uncultured archaeon 39-2 were detected as the key microbes associated with anaerobic treatment of wastewater containing terephthalic acid. Primer pairs were designed to quantify the key microbes using real time polymerase chain reaction. Methane production rate increased when 16S rRNA gene concentrations of the key microbes were higher. Quantification of these microbes can be useful to discuss the reactor conditions, as the terephthalate degradation corresponded to the methane production.