

東京大学大学院	工学系研究科	都市工学専攻	○山田 健二
東京大学大学院	工学系研究科	都市工学専攻	佐藤 弘泰
	同上		味埜 俊
	同上		松尾 友矩

1. はじめに

下水処理場などの嫌気性消化槽中では、好気性微生物をはじめとする多様な有機物（余剰汚泥等）が分解され最終的にメタン、二酸化炭素及び水等に転換されている。消化効率の向上やプロセスの安定化のために、嫌気性消化槽内で起こっている反応を知ることは重要である。反応は微生物反応であることは分かっているが、消化槽中のどの微生物がどのような役割を果たすのか、流入した好気性微生物などの有機物がどのように分解するのか、など反応による微生物の変化については分かっていることが多い。一方、近年開発された蛍光In-situ hybridization 法（FISH）は、微生物の培養なしに、反応槽内の特定微生物を検出できる手法として注目されている。検出には、菌体内rRNAと特異的に結合するプローブを用いて行っている。そこで、本研究では嫌気性消化槽に余剰汚泥が流入する系を想定し、その時の微生物の変動を観察するモデル実験を行った。すなわち、嫌気性消化汚泥とマーカーとなる好気性微生物を混合し、その変化過程を経時的にFISH法、キノン組成分析及び炭素の物質収支を測定することから推測し、微生物の自己分解に関する知見を得ることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 供試サンプルと実験方法

嫌気性消化汚泥は、実処理場の高温嫌気性消化槽タンク汚泥を種汚泥とし、実験室内リアクターの余剰汚泥を用いて嫌気状態、55℃で馴化した汚泥を用いた。

マーカー微生物は、*Acinetobacter calcoaceticus* (IAM12580)を純粋培養して用いた。この細菌は活性汚泥中に存在することが知られている。また、*Acinetobacter* 属特異的のプローブを用いて、FISH法で検出できる。さらに、優占キノン種は一般に活性汚泥中の微生物には少ない、ユビキノ-9（Q-9）である。

容量約70mlのバイアル瓶に、消化汚泥40mlとMLVSS換算で約10%となるように、純粋細菌を10ml加えた。バイアル瓶を密栓後、窒素置換により酸素を追い出し、嫌気的な条件で反応を行った（以下、反応バイアル瓶と記す）。反応は55℃で150rpmの巡回攪拌で行った（図1参照）。適時、1個ずつ反応バイアル瓶を開封し以下の測定を行った。

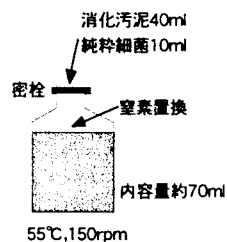


図1 実験条件

2.2 測定方法

FISH法¹⁾、キノン組成分析法²⁾、COD測定、発生ガス量及び組成分析は定法により行った。

FISH法では、*Acinetobacter* 属を検出するACA652 (5'-ATCCTCTCCCATACTCTA)、古細菌を検出するArch915 (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT)、及び真正細菌を検出するEub338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT)プローブを用いた。標識にはXRITC(excitation wavelength;580nm, emission wavelength;605nm)を用いた。また、存在割合の測定のためにDAPIで二重染色し、全菌数とした。計数は写真から直接計数法で行った。

3. 結果と考察

3.1 FISH法による観測結果

ACAプローブによって、*A. calcoaceticus* を特異的に検出することが確認された。また、嫌気性消化汚泥には

Acinetobacter 属は今回の実験ではほとんど見られなく、以下の本実験では、実質的にACAプローブは*A. calcoaceticus* を特異的に検出するものとみなした。

図2には、反応バイアル瓶内の*A. calcoaceticus* の割合の経時変化を示した。反応初期は全菌数に対して、*A. calcoaceticus* が約15%程度観測できた。そのまま10時間ぐらいいは、余り変化しなかった。その後、時間がたつにつれ、確認できる割合は減少し、2日間程度で数パーセントまで減少した。4日目以降は、ほとんど検出できなかった。一方、比較として嫌気状態55℃の水中で反応させた*A. calcoaceticus* は、やや蛍光が弱くなったが2日間後でも、ACAプローブによって検出できた。

このことから、消化汚泥中では、嫌気状態という要因以外に、酵素など何らかの物質の影響で溶菌やrRNAの減少が起こったと考えられる。

図3には、*A. calcoaceticus* の反応直後と2日後の蛍光顕微鏡写真を示した。上段はローダミン標識のACAプローブの蛍光を撮った写真であり、下段はDAPIによる全菌染色の蛍光を撮った写真である。反応直後には約15%程あったACAプローブの蛍光が、2日後には、ほとんど見えなくなった。

図4には、反応バイアル瓶内の古細菌と真正細菌の割合の経時変化を示した。古細菌の割合は、ほとんど変化が見られなかった。真正細菌の割合は、*A. calcoaceticus* の変化とはほぼ同様に低下した。今回の実験では元の嫌気性消化汚泥の変化はほとんど認められなかった。

以上から、元の嫌気性消化汚泥には目立った変化はなく、マーカー微生物の*A. calcoaceticus* のみ減少した。*A. calcoaceticus* は、消化汚泥によって、反応開始10時間後から48時間後の間に溶菌や菌体内rRNAの分解を起こしたものと考えられる。

3.2 キノン組成分析結果

図5の左側には、*A. calcoaceticus* に特徴的なQ-9に注目して、ユビキノン全体に対する割合を示した。初め17%程度であったものが、2日目には、13%程度に低下し、その後あまり変化はなかった。今回の実験で用いた嫌気性消化汚泥のQ-9含有率は5%程度であった。このことから、10日間ではすべてのキノンは分解されなかったといえる。

また、図5の右側には、ユビキノンに対するメナキノンの比率(MK/Q)を示した。MK/Q比率は、経過日数とともに大きくなる傾向が見られた。これは、好気性細菌の割合が小さくなったことや、メナキノンとユビキノンを両方持つ細菌ではメナキノンが多く生合成されたことを示唆した。

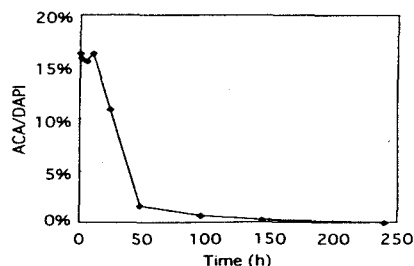


図2 *A. calcoaceticus* の経時変化

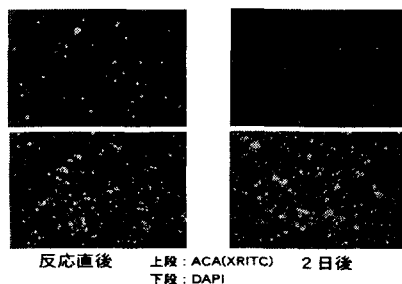


図3 蛍光顕微鏡写真

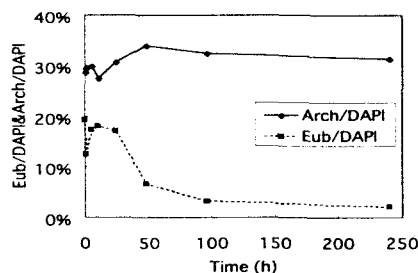


図4 Archaea, Bacteria の経時変化

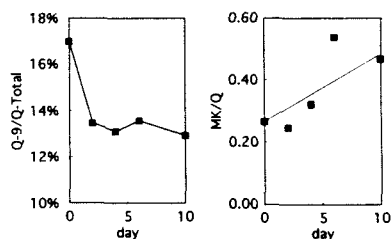


図5 キノン組成分析

今回の実験では、*A. calcoaceticus* 由来のキノンは、初めの2日間は分解し、その後安定となった。この理由は、活性のない休眠状態の*A. calcoaceticus* のキノンが細胞膜上に残っているためや、キノンの再利用が何らかの方法で行われていることが考えられるが、よく分からなかった。

3.3 COD及び発生ガス分析結果

図6には、COD当量の値を用いて、反応バイアル瓶内の炭素の物質収支を示した。

炭素はバイオマス分が減少し、6日目まで、ろ過水中の溶解性成分が増えた。その後、溶解性成分も減少した。メタンは、反応初期から徐々に発生して、6日目位から急激に増加した。

これは、バイオマスがはじめ、酸生成細菌によって溶解性の有機酸に分解され蓄積し、少し遅れて、メタン生成細菌が活発になり蓄積した有機酸をメタンに変換したことで説明できる。

10日後では、消化汚泥コントロールと比較して、メタン生成量が約10%程度多く、また、バイオマス分とろ過水分がほぼ等しくなった。このことから、添加した*A. calcoaceticus* 分のバイオマス分はほとんどメタンに変換されたものと思われる。

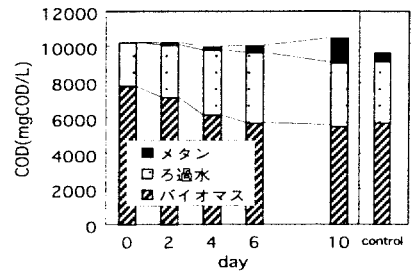


図6 炭素の物質収支

3.4 まとめ

FISH法から、*A. calcoaceticus* は、嫌気性消化汚泥中で10時間位は活性を保ち、その後、消化汚泥中の何らかの物質の影響で、48時間後までの間に溶菌、あるいは、活性の低下を引き起こされたと考えられる。

キノンは、48時間後までの間に、急速に分解し、その後一定となって残った。キノンが残った理由はよく分からなかった。

バイオマスは、はじめは徐々に、48時間後から顕著に、溶解性有機酸に分解された。さらに、溶解性有機酸の蓄積とともに、溶解性有機酸からメタンへの転換が始まり、144時間後から急速に転換された。10日後には、*A. calcoaceticus* 由来のバイオマスの大部分がメタンまで転換されたと考えられた。

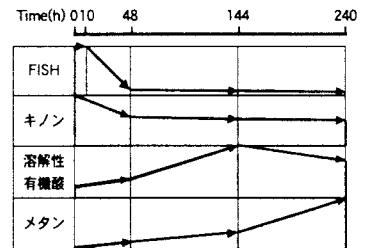


図7 まとめ

A. calcoaceticus は、嫌気性消化汚泥中では、10時間後位から溶菌やrRNAの分解が始まり、細胞の崩壊が引き起こされた。それに引き続いて、細胞構成成分の分解が48時間後位から顕著に起こった。一方、活性が低下し休眠状態になるものの存在も考えられたが、この点に関してははっきりとできなかった。

A. calcoaceticus の分解過程には、嫌気性消化汚泥が積極的に関与していた。

4. 結論

- 1) 嫌気性消化汚泥中では、好気性細菌*A. calcoaceticus* が減少する傾向がFISH法、キノン組成分析及び炭素の物質収支から、観測できた。
- 2) *A. calcoaceticus* の分解過程は、まず、2日間程度で溶菌あるいはrRNAが分解し、6日目位がピークとなるように菌体成分は徐々に分解されて可溶化し、さらに、10日間程度で大部分がメタンへと転換された。

5. 参考文献

- 1) R.I. Amann, 1995: Molecular Microbial Ecology Manual 3.3.6, pp.1-15, London: Kluwer Academic Publishers
- 2) 山田雄三、倉石衍、1982: 微生物の化学分類実験法 (駒形和男編)、pp143-155、東京、学会出版センター