

B-5

FISH 法を用いた下水処理場活性汚泥中の硫酸塩還元細菌と Type021N の調査

金沢大学大学院自然科学研究科 ○宮里直樹
 金沢大学工学部 池本良子
 東亜建設(株) 駒峯健治

1. 結論

活性汚泥処理において、最も多く報告されている処理障害はバULKING現象である。筆者らは、硫酸塩還元細菌が糸状性硫黄酸化細菌 Type021N によるバULKINGの一因であることを報告した。安定した固液分離と栄養塩除去を達成するために、活性汚泥の中にどのような硫酸塩還元細菌が、どのように存在しているのかを明らかにすることは非常に重要である。そこで、本研究では6種類の実下水処理場の活性汚泥を用い、活性汚泥中の硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌の群集について FISH 法を用いた調査を行った。

2. 実験方法

実験には Table1 に示した 6 ヶ所の実下水処理場活性汚泥を用いた。S, A, R 処理場は公共下水道の終末処理場、SL 処理場は流域下水道の終末下水処理場、T, TY 処理場は小規模な終末処理場で、オキシデーションディッチ法を用いている。

曝気槽より活性汚泥を採取し、直ちに実験室に持ち帰り、MLSS, SVI, 硫酸塩還元細菌数、糸状体長を測定した。また嫌気条件の回分実験により硫酸塩還元活性を、好気条件の回分実験により硫黄酸化活性を求め、さらに位相差顕微鏡による活性汚泥の観察を行った。また、パラフォルムアルデヒドを用いて活性汚泥を固定化した後、Amann(1995)らの方法^①を用いて FISH 法による観察を行った。FISH 法に用いたプローブを Table2 に示す、硫酸塩還元細菌を特異的に検出できる SRB プローブ 6 種類と金川^②が開発した Type021 プローブ 4 種類を用いた。

Table1 WTP used in the experiment

	下水道の種類	最大日計画水量 (m ³ /日)	下水処理方式	操縦方式
S	公共下水道	110,000	嫌気好気法 兼似嫌気好気法	完全分流式
A	公共下水道	168,000	嫌気好気法	一部合流式
R	公共下水道	90,000	嫌気好気法 兼似嫌気好気法	完全分流式
SL	流域下水道	58,000	嫌気好気法	完全分流式
T	公共下水道	8,400	オキシデーション ディッチ法	完全分流式
TY	特定環境保全 公共下水道	490	オキシデーション ディッチ法	完全分流式

Table2 DNA probes used in the FISH

Probe name	Target group	Sequence(5' → 3')
SRB385	SRB ⁺	CGGCGTCGGTGGCTCAGG
SRB660	Desulfobulbus	GAATTCCACTTTCCCTCTG
SRB687	Desulfovibrio	TACGGATTTCACCTCT
SRB221	Desulfobacterium	TGCGCGGACTCATCTTGAAA
SRB129	Desulfobactor	CAGGOTTGAAGGCAGATT
SRB657	Desulfonema	TTCCG(C/T)TTCCCTCTCCCATATA
G1B	Type021Ngroup I	TGTGTTGATTCCTTGC
G2M	Type021Ngroup II	GCACCACCGACCCCTTAG
B3M	Type021Ngroup III	CTCAGGGATTCTGCGCAT

SRB⁺ of the data proteobacteria plus several gram positive bacteria

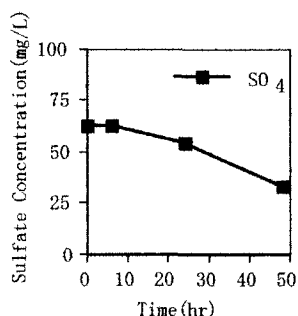


Fig1 Results of anaerobic batch experiments

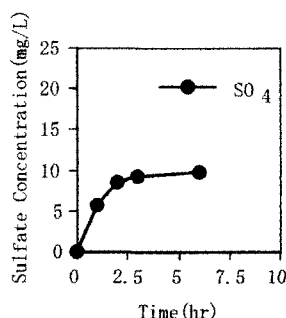


Fig2 Results of aerobic batch experiments

3. 実験結果と考察

SVI の値は T 処理場が 350 (ml/gMLSS) と最も高く、それ以外では 100~200 (ml/gMLSS) であり、糸状性細菌の現存量も T 処理場が最も多かった (table3)。Photo1 は、それぞれの活性汚泥の位相差顕微鏡写真である。S, A, SL 処理場には Eikelboom 分類で Type021N に分類される糸状性細菌が観察され、T 処理場では Type021N 以外の糸状の細菌が観察された。フロックの大きさは、S 処理場の活性汚泥で直径約 100~200 μm と大きく、A, SL 処理場では 100~150 μm とやや大きめであるのに対し、R, T, TY 処理場では 50~100 μm とやや小さめのものが形成されていた。

Fig1 は嫌気条件の回分実験の典型例、Fig2 は好気条件の回分実験の典型例を示したものである。硫酸塩濃度の減少速度を硫酸還元活性として求めた。好気回分実験の結果からも同様にして硫酸酸化活性を求めた。Fig3 は硫酸還元活性と硫酸酸化活性の関係を示したものである。硫酸還元活性の高い汚泥は、硫酸酸化活性も高い傾向にあることがわかる。処理場の種類に関わらず相関が認められたことから、従来から指摘しているように硫酸還元細菌が糸状性硫酸酸化細菌の増殖の一因であることが確認でき

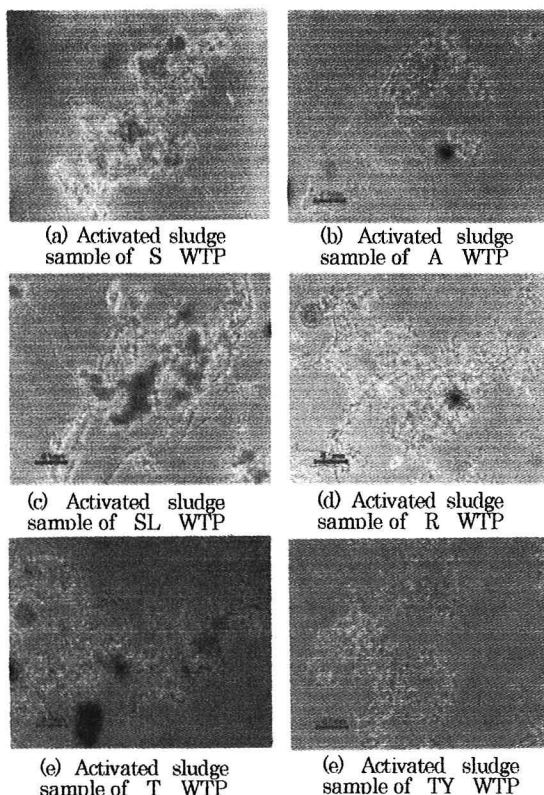


Photo1 Phase contrast

処理場名	MLSS (総量) (mg/L)	SVI (ml/gMLSS)	SRB菌数 (MPN/gMLSS)	糸状性菌 (on/gMLSS)	硫酸還元活性 (mg/L-h)	硫酸酸化活性 (mg/L-h)	フロック径 (μm)	糸状性細菌
S	2360 (9/26) 2560 (11/20)	200	1680000	105 165	0.89 0.72	1.85 1.46	100~200	Type021N
A	1280 (11/22)	120	3380000		0.15	0.21	100~150	Type021N
R	2000 (10/16)	200	4650000	96	0.24	0.78	50~100	ほとんど観察されず
SL	1600 (11/20)	200	1500000	141	0.85	1.88	100~150	Type021N
T	1600 (11/5)	350	581000	553	0.28	1.10	50~100	観察された
TY	8050 (11/5)	200	475000	98	0.06	0.31	50~100	ほとんど観察されず

る。

各処理場汚泥に FISH 法を適用した結果を Table4,5 および Photo2, 3, 4 に示す。糸状性細菌に関しては、S, SL, A 処理場汚泥において G2M プローブで特異的な蛍光が検出されたことから、S, SL, A 処理場活性汚泥内に存在していた糸状性細菌は Type021N group II の糸状性硫酸酸化細菌であることがわかった。R, T, TY 処理場汚泥中の糸状性細菌はこれらのプロローブで検出されなかったことから、Type021N は存在していないことが明らかとなった。

硫酸還元細菌に関しては、そのほとんどを検出できる SRB385probe で、どの活性汚泥フロックでも特異的な蛍光が検出された。しかし S と SL 処理場汚泥ではフロック全体に硫酸還元細菌の存在が確認できたのに対し、A, R, T, TY 処理場の汚泥フロックには局所的に存在していた。Probe660 で特異的な蛍光が検出される *Desulfobulbus sp* はすべての処理場活性汚泥で検出され、また Probe657 で検出される *Desulfonema sp* が S, SL 処理場汚泥で、フロック全体に観察された。また S 処理場汚泥においては、

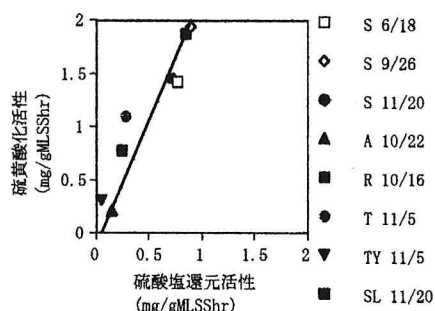
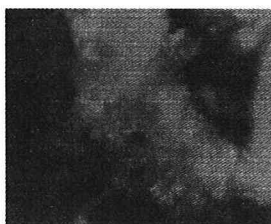


Fig3 Relationship between sulfate reducing activity and sulfur oxydizing activity in the activated sludge

Desulfovibrio sp, *Desulfobactor* sp.も検出された。しかし SL 処理場では観察されなかった。

S, SL 処理場で多く観察された *Desulfonema* spは、Soler Lake の底泥の酸素減少域に多く存在することが報告されている⁽³⁾。*Desulfonema* sp が糸状性硫黄酸化細菌 Type021Ngroup II の増殖に関係があることが示唆される。



(a) S WTP



(b) T WTP

(Photo2) In situ identification of SRB in activated sludge

Table4 Results of the FISH

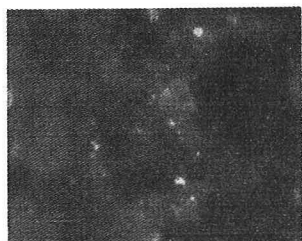
	SRB385 SRB*	SRB680 Desulfobulbus	SRB687 Desulfovibrio	SRB221 Desulfobacterium	SRB129 Desulfobactor
S	+++	++	+	-	+
A	++	+	-	-	-
R	++	+	-	-	-
SL	+++	+++	-	-	-
T	++	+	-	-	-
TY	++	+	-	-	-

+++ = Major, ++ = Sub major, + = Minor, - = No detected

Table5 Results of the FISH

	SRB657 Desulfonema	G1B Type021Ngroup I	G2M Type021Ngroup II	G3M Type021Ngroup III
S	++	-	+++	-
A	-	-	-	-
R	-	-	-	-
SL	++	-	++	-
T	-	-	-	-
TY	-	-	-	-

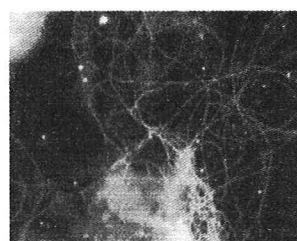
+++ = Major, ++ = Sub major, + = Minor, - = No detected



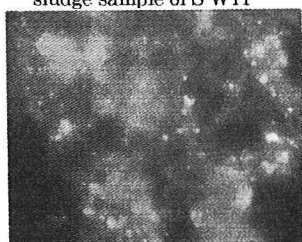
(a) *Desulfobulbus* in activated sludge sample of S WTP



(b) *Desulfonema* in activated sludge sample of S WTP



(c) Type021Ngroup II in activated sludge sample of S WTP



(d) *Desulfobulbus* in activated sludge sample of SL WTP



(e) *Desulfonema* in activated sludge sample of SL WTP



(f) Type021Ngroup II in activated sludge sample of SL WTP

(Photo4) In situ identification of SRB in activated sludge

(Photo3) In situ identification of Type021N in activated sludge

4. 結論

・6種類の活性汚泥の硫酸塩還元活性を調べた結果、硫酸塩還元活性の高い汚泥は硫黄酸化活性が高い傾向が認められた。

・6種類の活性汚泥中の硫酸塩還元細菌と糸状性細菌Type021NのFISH法による観察を行った結果、どの活性汚泥ブロック内にも硫酸塩還元細菌が観察された。硫酸塩還元細菌がブロックの至る所に観察された活性汚泥中には硫黄酸化細菌Type021Ngroup IIが増殖していた。その他の活性汚泥ブロックでは、硫酸塩還元細菌は局所的に固まって観察された。

・*Desulfobulbus* sp や *Desulfonema* sp が優先的に存在している活性汚泥では、硫黄酸化細菌 Type021Ngroup IIが存在していた。

参考文献：(1)Rudolf I Amann In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. Molecular Microbial Ecology Manual 3.3.6 1-15 1995 (2)Kanagawa, T., Kanagawa, Y., Aruga, S., Kohn, T., Matthias, Hand Michael, W.(2000). Appl Environ Microbiol. Nov.2000,p.5043-5052 (3)Dror Minz, Susan Fishbain, Stefan J. Green, Gerard Muyzer, Yehuda Cohen, Bruce E. Rittmann, and David A. Stahl Unexpected population distribution in a Microbial mat community: Sulfate reducing bacteria localized to the