

B-17 硫酸塩含有廃水の低温処理で構築された嫌気性汚泥の 微生物群構造解析

長岡工業高等専門学校 ○今井崇博 荒木信夫
呉工業高等専門学校 文後佳久 山口隆司

1. はじめに

現在、硫黄酸化還元サイクルを活用した新規下水処理システムが注目されている。このシステムは前段の嫌気槽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、後段の好気槽で硫黄酸化細菌が硫酸塩を硫化物まで酸化し、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。従来の UASB 法では、有機物分解の最終段階はメタン生成菌が担っているため、低温条件下では活性が低下し十分な処理能力が得られなくなる。硫酸塩還元細菌は低温条件下でも比較的活性を保持できるので、10℃以下の低温条件排水での硫酸塩還元細菌の利用は有効である。本研究では新規下水処理システムを低温排水に適用したラボスケールリアクター内に構築された嫌気性汚泥の微生物構造を 16S rRNA 遺伝子のクローニング解析や FISH 法といった分子生物学的手法を用いて明らかにした。

2. 実験方法

2.1 実験装置及びサンプリング

ラボスケールリアクター⁽¹⁾は、前段を UASB 反応器、後段にスポンジ充填型散水ろ床（充填率 50%）で構成し、8～10℃の低温条件下で運転している。廃水は、プロピレングリコールを主成分とし、酢酸、プロピオン酸が含まれる融雪剤(COD_{Cr} 420mg/L)を用いた。運転条件は、HRT を 12hr に設定し、基質 pH7.0、循環比 1.0 から成る。微生物相解析には運転開始 620 日目のサンプルを用いた。この時点では、前段 UASB の硫酸塩は UASB 流入時 79mg-S/L に対して UASB 流出時には 29mg-S/L まで減少し、COD 除去率は 90%以上を達成していた。

2.2 低温 UASB 内の 16S rDNA クローン解析

サンプル汚泥内の DNA 回収にはビーズビーダー法を適用した。細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的な EUB338mix-F(5'-AC(A/T) CCTACGGG(T/A)GGC(T/A)GC-3') と細菌、古細菌に特異的な UNIV1500-R(5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')のプライマーセットを用い、PCR 増幅を行なった。その後、PCR 産物を Gene Clean Kit(Q-BIO gene)を用いて精製し、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) によってクローン化し、塩基配列の決定を行なった。

2.3 FISH 法

FISH 法は Amann⁽²⁾の方法に準拠して行なった。16S rRNA 標的オリゴヌクレオチドプローブには硫酸塩還元細菌に特異的な SRB385(5'-CGGCGTCGCTGCGTCAGG-3')、*Desulfohalobus* 属に特異的な Dsbb660(5'-GAATTCACACTTTCCCTCTG-3')を用い、5'末端に SRB385 は FITC 標識、Dsbb660 には TRITC 標識を付加した。ポジティブコントロールに *Desulfohalobus elongatus* (DSM2908)を用い、両プローブの最適ハイブリダイゼーション条件(46℃、ホルムアミド濃度 30%)を決定した。

3. 実験結果

3.1 低温 UASB 内のクローン解析

Table-1 Sequence result of low temperature gulanular sludge clone

Clone name	Number of clone/total clones	Closest relatives	sequence homology(%)
clone-01_low-temp.	1/115	Rahnella sp. 'CDC 21234'	99%
clone-06_low-temp.	96/115	uncultured Acetobacterium sp.	99%
clone-37_low-temp.	1/115	uncultured bacterium clone RA 13C8	97%
clone-42_low-temp.	2/115	Uncultured bacterium clone E23	97%
clone-43_low-temp.	1/115	Uncultured bacterium mle-2	99%
clone-46_low-temp.	1/115	Uncultured bacterium clone synarCH02	97%
clone-49_low-temp.	1/115	Uncultured bacterium mle1-9	95%
clone-55_low-temp.	1/115	Uncultured epsilon proteobacterium	98%
clone-56_low-temp.	2/115	Epsilon proteobacterium JDS1	99%
clone-63_low-temp.	2/115	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone BIOEST-22	97%
clone-65_low-temp.	1/115	Comamonadaceae bacterium PIV-4-2	98%
clone-72_low-temp.	3/115	Ewingella americana isolate B791	99%
clone-109_low-temp.	1/115	Uncultured bacterium clone fcr150	94%
clone-122_low-temp.	1/115	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SHA-1	99%
clone-140_low-temp.	1/115	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 280	99%

低温 UASB 内の細菌の多様性を明らかにするため、運転 620 日目に採取した汚泥から抽出した 16S rRNA 遺伝子をターゲットにしたクローン解析を行ない、その系統解析を行なった。Table-1 に実験のクローンライブラリを示す。相同性は BLAST search によって調べた。115 クローン解析し、uncultured *Asetobacterium.sp* に近い菌種が極めて高い頻度で検出された。このことから、低温 UASB 内には *Acetobacterium* 属が優占して存在していることが示唆される。また、ARB を用いてクローン配列の系統位置を推定し、得られた出現微生物の Class レベルでの検出割合を Fig.1 に示す。*Acetobacterium* 属は *Clostridia* に属する微生物であるので、*clostridia* の割合が卓越している。

この UASB 内でキーとなる硫酸塩還元細菌については ARB による系統解析の結果、2 クローンが *Syntrophobacter* 属に類似する微生物であることが判明した。*Clostridia* 以外にも *Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Bacilli* なども検出された。

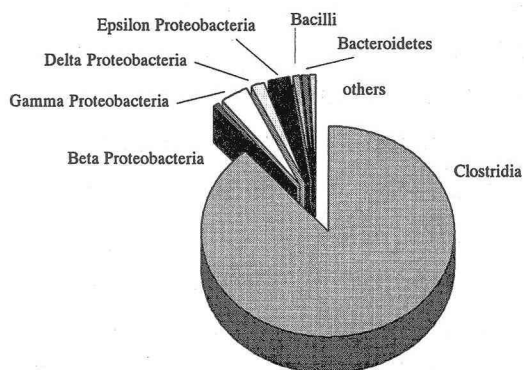


Fig.1 Composition of 16S rRNA gene clone library

3.2 FISH 法による硫酸塩還元細菌の検出

クローン解析の結果では硫酸還元菌の存在はないと考えられる。しかし、運転 650 日目の、活性試験の結果では低温 UASB 内の微生物群は適用したすべての基質において硫酸塩還元活性を有している (Fig.2)。そこで本研究では低温 UASB 内の硫酸塩還元細菌をターゲットにした FISH 法を試みた。Fig.3 に運転 620 日目にサンプルに対し FISH を行なった結果を示す。その結果、低温 UASB 内から高い頻度で硫酸塩還元細菌が検出された。DAPI 染色細胞に占める割合は SRB385 を用いた FISH では $47.2 \pm 5.5\%$ ($n=10$) で、Dsb660 を用いた FISH では $23.3 \pm 4.1\%$ ($n=10$) であった。

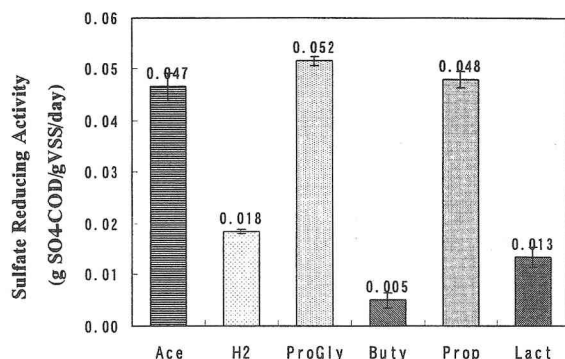


Fig.2 Sulfate reducing activities at different substrates determined by vial tests at the 650-day

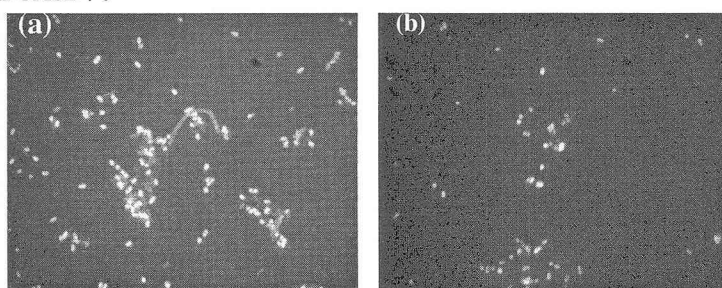


Fig.3 In-situ hybridization of SRB385(a) and Dsb660(b)

4. まとめ

本研究ではクローン解析と FISH 法から、低温 UASB 内の菌相を解明した。クローン解析の結果からこの UASB 内には *Acetobacterium* 属が優占して存在することが明らかになった。しかし硫酸塩還元細菌をターゲットにした FISH 解析の結果、DAPI 染色に占める硫酸塩還元細菌の割合は約 50% になり、クローン解析の結果と相関性が見られなかった。そのため、今後 FISH 法による *Acetobacterium* 属の検出、PCR による硫酸塩還元細菌由来遺伝子の増幅が必要となる。

また、FISH 法により低温 UASB 内から硫酸塩還元細菌が検出されたことから、硫酸塩還元細菌も有機物分解に寄与していることが示唆され、今後、他のプローブを用いた FISH 法による硫酸塩還元細菌の検出と、クローン解析による菌種の再特定が必要となる。

参考文献

- (1)文後佳久、谷川大輔、山口隆司、山崎慎一、荒木信夫、原田秀樹、長野晃弘.2003. 硫黄の硫酸還元プロセスによる低温排水処理特性. 環境工学研究フォーラム講演集. 40:76-78
- (2)Amann, R. (1995) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. Molec. Microbiol. Ecol. Manual, 3.3.6:1-15