

実排水処理施設における FISH 法を用いた細菌相解析

広島大学大学院 学生会員 ○梶原 寛司

広島大学大学院 正会員 金田一 智規

広島大学大学院 正会員 尾崎 則篤

1. 背景

現在、多くの下水処理施設では標準活性汚泥法に代表される生物処理法が利用されている。生物処理には細菌を中心とする多くの微生物が関与しているが、それらの生理学的特性の多くが未だ解明されていない。そのため、既往の処理施設では経験則に頼った運転を行っており、微生物の活性を最大限に発揮しているとは言いがたい。よって、このような処理に携わる微生物の生理学的特性を把握することが微生物の高活性維持につながり、処理効率の向上につながるのではないかと期待されている。

従来、細菌の生理学的特性を把握するための研究方法としては培養に基づく手法が一般的であった。しかし、培養法の中でも特に純粋培養は、微生物の共生関係などを考慮していないものであるため、培養法より得られた特性は必ずしも実環境中のものとは一致しない。そこで、培養を介さずに処理に携わる細菌の生理学的特性を把握するために、近年、分子生物学的手法が排水処理分野に適用され始めた。

2. 目的

本研究では、分子生物学的手法の一つである FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)法を実排水処理過程に適用し、実際に処理を担っていると考えられる細菌の検出を行い、実排水処理施設における年間を通じた処理性の変化と、FISH 法を用いて得られた細菌の構成比の変化とを関連付けて考察を行うことを目的とする。

3. 実験内容

(1)対象とした処理施設の概要

対象とした処理施設(以下対象施設)の概要を表 1 に示す。本研究では、表 1 に示した水質項目に加え、DOC とイオン態窒素の測定を行った。

(2)構成比の算出法

FISH 法を用いて、全細菌と解析対象とする細菌を 2 種類の蛍光色素(FITC、TRITC)によって染め分ける。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、同一視野

におけるそれぞれの蛍光面積の定量を行い、全細菌の面積から目的とする細菌の面積を除いたものを対象とする細菌の構成比とした。細菌は、一般的に下水処理過程に多く存在すると言われているものを解析対象とした。

表 1 対象施設の概要

処理法		嫌気・好気活性汚泥法
流入水	BOD(mg-O · L ⁻¹)	80~100
	TN(mg-N · L ⁻¹)	35~50
	TP(mg-P · L ⁻¹)	3~5
流出水	BOD(mg-O · L ⁻¹)	3~6
	TN(mg-N · L ⁻¹)	25~30
	TP(mg-P · L ⁻¹)	0.1~0.3

4. 水質測定に関する結果と考察

(1)有機物

図 1 に、DOC 濃度と炭素量換算した BOD 濃度の季節変化を示した。DOC 濃度は溶存態全有機炭素量を表しているのに対し、BOD 濃度は好気的条件下で微生物分解可能な有機物量を表している。よって、DOC 濃度から炭素量換算した BOD 濃度を差し引いたものは難分解性物質であると考えられる。図 1 より、流出水中に存在する難分解性物質は、夏から冬にかけて増加した。よって夏と冬では水質の変化が認められ、その理由としては微生物の活性の変化などに伴う処理効率の変化や微生物の代謝経路の変化、または流入水水質の変化などが考えられる。

(2)栄養塩類

栄養塩類の測定結果では、有機物測定時に見られたような季節変化は確認されず、各測定項目の平均値は表 1 で示したような結果となった。

5. 細菌相解析に関する結果と考察

対象施設では、反応槽を 7 槽に分け、第 1 槽目を嫌気槽とし、第 2~7 槽を好気槽とした運転を行っている。本研究では第 1、7 槽内の細菌を解析対象とした。以下にそれぞれの槽の解析結果を示す。

(1)好気槽

図2に好気槽の細菌相解析結果を示す。図2より、*β-Proteobacteria*と*γ-Proteobacteria*が夏から冬にかけて顕著に減少していることが分かる。図1より、夏から冬にかけて流出水中の難分解性物質の増加が見られることから、*β-Proteobacteria*と*γ-Proteobacteria*が難分解性物質の増加に関与していることが示唆された。一方、夏から冬にかけて*α-Proteobacteria*は増加していることが確認できる。*α-Proteobacteria*は、2004年11月に脱窒浮上(汚泥中の細菌の脱窒作用によって生じた窒素ガスを含む汚泥ブロックが浮上する現象)が生じた時の浮上汚泥中にも多く確認されたことから*α-Proteobacteria*の増加が脱窒浮上を引き起こすのではないかと考えられる。

(2)嫌気槽

嫌気槽の細菌相解析結果を図3に示す。図3より、嫌気槽でも夏から冬にかけて*β-Proteobacteria*と*γ-Proteobacteria*の減少と*α-Proteobacteria*の増加が見られた。すなわち、嫌気槽と好気槽の構成比はほぼ同じ変動を示したことから、細菌相に影響を与える因子としては、嫌気・好気といった一時的な状況の変化よりも、流入水質や水温といった環境因子の変化が深く関与しているのではないかと考えられる。

脱窒浮上が生じた2月の嫌気槽では、*α-Proteobacteria*の減少が見られた。しかし、図2、3を比較すると、2月の嫌気槽と好気槽の*α-Proteobacteria*の構成比では約2倍の差があることから、*α-Proteobacteria*が脱窒浮上に関与しているとすると、2月の好気槽と嫌気槽の差は浮上汚泥中に含まれているのではないかと考えられる。

6. 結論

- ・夏から冬にかけて流出水中の難分解性物質が増加していることが確認され、同時に*β-Proteobacteria*と*γ-Proteobacteria*の減少が確認された。したがって、*β-Proteobacteria*と*γ-Proteobacteria*が難分解性物質の増加に関与していることが示唆された。
- ・夏から冬にかけて*α-Proteobacteria*の増加が見られ、冬に脱窒浮上が生じた。その際、浮上汚泥中に*α-Proteobacteria*が多数確認されたことから、脱窒浮上には*α-Proteobacteria*が関与していることが示唆された。

7. 今後の課題

- ・現在、細菌相に関しては2ヶ月ごとのモニタリングを行っているため、今後は1ヶ月ごとの解析を行い、より正確な変動を把握する。
- ・今回利用したFISH法以外の分子生物学的手法であるPCR-DGGE法を用いた同定や、16S rRNA遺伝子に基づく系統解析によって得られた結果と今回FISH法によって得られた結果とを比較検討する。

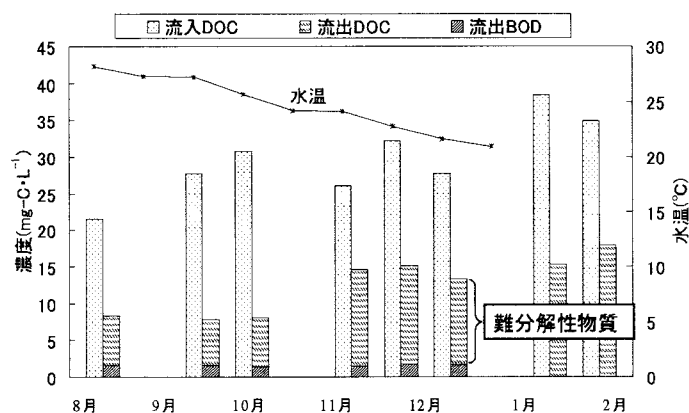


図1 有機物の季節変化

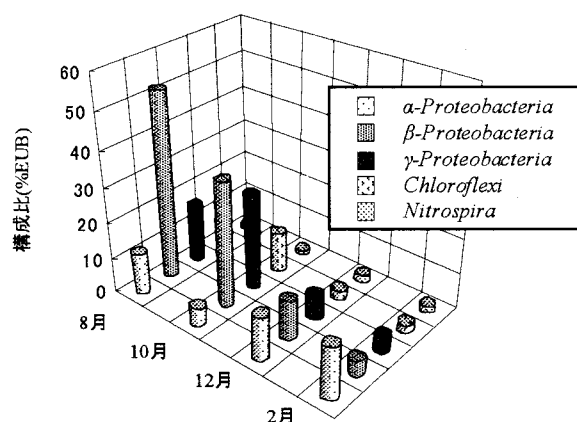


図2 好気槽内細菌相の季節変化

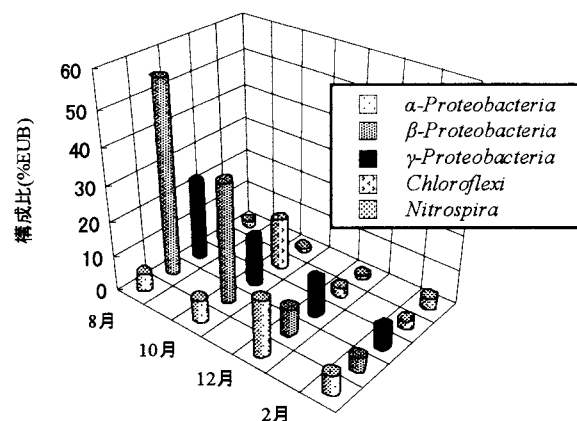


図3 嫌気槽内細菌相の季節変化