食品工場排水処理施設における活性汚泥の細菌群集構造と汚泥沈降性との関連性

加藤 史子^{*, **} 飯泉 太郎^{*} 中村 寛治^{***}

Relationship Between Bacterial Community and Sludge Settleability in an Activated Sludge Process for Food Industry

Fumiko KATO^{*, **}, Taro IIZUMI^{*} and Kanji NAKAMURA^{***}

* Kurita Global Technology Center, Kurita Water Industries Ltd., 1-1, Gochoyama, Kawada, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi, 329-0105, Japan

** National Institute of Vegetable and Tea Science, National agriculture and Food Research Organization, 2769 Kanaya, Shimada-shi, Shizuoka, 428-8501, Japan

*** Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University, 1-13-1, Chuo, Tagajo-shi, Miyagi, 985-8537, Japan

Abstract

The bacterial community in a full-scale activated sludge plant for the food industry was investigated for about a year using terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. The microscopic observation and 16S rDNA-based analysis indicated that the filamentous bacteria that were most frequently observed in this plant were *Caldilinea*-like bacteria, and that the *actinomycetes* bacteria that were dominant in the scum were *Dermatophilus*-like bacteria. The *Tetrasphaera* sp. of *actinomycetes* was also detected in the aeration tank. According to the T-RFLP analysis, *Caldilinea*-like bacteria tended to appear frequently when diluted sludge volume index (DSVI) deteriorated unstably and easily. This suggests that these filamentous bacteria had a negative influence on sludge settleability, however, no correlation between the intensity of the T-RF and DSVI was observed. The influence of *actinomycetes*, on the other hand, was not clear, because these bacteria were detected even when DSVI was low and stable, although they increased when DSVI increased. Therefore, other factors also would have influences on sludge settleability in this plant. We also applied multidimensional scaling analysis on the bases of T-RFs to evaluate the whole bacterial community. The plots obtained were roughly divided into two groups, showing that the community structure changed depending on the sludge settling character.

Key words : bacterial community, terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), activated sludge, sludge settleability

1. はじめに

活性汚泥法の運転管理上の深刻な問題のひとつに、沈殿槽における固液分離障害がある。糸状性細菌の過剰増殖による糸状性バルキングの他、細胞外多糖類の過剰分泌による粘性バルキング、フロック分散、フロック解体、および脱窒反応による汚泥浮上などに分類され、それらが複合的に関与しているケースもある。これらの障害は、運転条件や水質の変化に伴い繁殖した微生物の作用に起因することから、障害原因を特定したり、初期異常を検知し未然に予防を行うためには、個々の処理施設毎に処理状況と指標となる微生物の関係を予め熟知しておくとともに、日常的に活性汚泥槽内の指標微生物の消長を把握す

ることが必要である。しかしながら、微生物相の評価は従来、顕微鏡観察に基づく経験的判断により行われるため、原生動物など肉眼で識別できる微生物は観察が可能であるが、フロック内の細菌相については判別が極めて困難であった。また、活性汚泥に出現する細菌の多くは純粋培養が困難であるため、十分な研究がなされておらず、個々の細菌とその働きに関する知見も極めて不十分であった。

しかし近年、分子生物学的手法の進歩により、培養できない細菌を対象とした分類学や生態学が大きく進展した。排水処理分野においても、糸状性細菌をはじめ各種細菌を検出するためのプローブやプライマーが設計され、FISH法による細菌の検出^{1)~5)}や、定量的PCR法による定量⁶⁾が可能となった。また、DGGE法⁷⁾や16S rDNAクローンの解

* 栗田工業(株) クリタ開発センター 〒329-0105 栃木県下都賀郡野木町川田五丁山1-1

** (独)農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所 〒428-8501 静岡県島田市金谷2769 (現在)

*** 東北学院大学 〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1

析^{5, 8, 9)}により、活性汚泥中の細菌群集の全体像と個々の細菌の推移を把握できるようになった。今後、このような解析手法が、活性汚泥中の微生物と汚泥沈降性との関連性の評価に利用され、運転管理に応用されることが期待される。しかし、実装置における汚泥沈降性と細菌群集構造の関係について長期的な調査と解析を試みた例は少ない。

そこで本研究では、食品工場の排水処理施設における活性汚泥の細菌群集構造を約1年間、16S rDNAを標的としたTerminal-Restriction Fragment Polymorphism (T-RFLP)法¹⁰⁾により調べた。T-RFLP法は、蛍光標識したプライマーを用いてPCRを行い制限酵素で消化した後、蛍光標識を有する末端断片 (T-RF) の位置と量をシーケンサーで検出して、細菌群集構造を評価する手法であり、DGGE法やランダムクローニング法と比べて、簡便かつ短時間で解析が可能である。本研究では、糸状性細菌および放線菌由来のT-RFを推定し、その増減と汚泥沈降性ならびに運転条件との関連性を調べるとともに、多次元尺度法により群集構造全体の変化を解析し、沈降性との関連についても検討した。

2. 方 法

2.1 活性汚泥施設と運転管理項目

1) 活性汚泥施設：2003年4月17日から2004年3月24日の期間、食品工場の排水処理施設において、活性汚泥および沈殿槽上澄液を定期的にサンプリングした。活性汚泥システムの概要をFig.1に示す。曝気槽は3槽に仕切られており、活性汚泥は曝気槽の最後段にて採取した。また、2003年4月24日には曝気槽に発生したスカムも採取した。

2) 運転管理項目：原水および沈殿槽上澄液のTOCは、No.5Cの濾紙で濾過した後、全有機炭素・全窒素自動分析装置 (TNC-6000, 東レ製) で測定した。曝気槽および返送ラインのMLSS (汚泥濃度：Mixed Liquor Suspended Solid) はJIS K0102に基づいて測定した。

3) 汚泥容量指標の測定：曝気槽液をNo.5Cで濾過した沈殿槽上澄液で4分の1に希釈し、活性汚泥沈降性を測定した。同一試料についてMLSSを測定し、DSVI (希釈汚泥容量指標：Diluted Sludge Volume Index) を算出した。

4) 顕微鏡観察：活性汚泥の観察には、位相差顕微鏡 (ECLIPSE E600W, ニコン製) を用いた。ブロック形状および糸状性細菌の存在量は、総合倍率100倍で観察した。糸状性細菌の存在量はTable 1に示した基準により視覚的に評価した。また、糸状性細菌について総合倍率100倍で全体の形態やすべり運動性、400倍で細部 (隔壁や直径など) を観察し、グラム染色、ナイセル染色、およびイオウテストを行い¹¹⁾、Eikelboomの方法¹²⁾に基づいてタイプを同定した。

2.2 16S rDNAによる細菌群集の解析

1) DNA抽出およびPCRによる16S rDNAの増幅：活性汚泥1 mlを遠心分離 (8000×g, 5分, 4℃) し、沈殿物から既報の論文¹³⁾に従ってDNAを抽出した。抽出したDNAは真空乾燥後、TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に溶解し、不純物を除去するためMicrospin-S300HR (GEヘルスケアバイオサイエンス製) で精製した。精製DNA溶液をテンプレートとしてPCRを行い、16S rDNAを増幅した。PCR混合液の全容量は 50 μl とし、2.5 U のEx Taq DNA

polymerase (タカラバイオ製), 200 μMのdNTP, 5'末端をリン酸化したプライマーBact0009f¹⁵⁾ およびBact1492r¹⁶⁾ (Table 2) をそれぞれ 20 pmol 使用した。その他の反応液組成はEx Taq DNA polymeraseのマニュアルに従った。サーマルサイクラーには、GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer製) を使用し、Pre-heating; 94 °C, 2 min に続き、第1段階; 94°C, 20秒, 第2段階; 55°C, 30秒, 第3段階; 72 °C, 2分を20サイクル繰り返し、Post extension; 72°C, 7分の温度条件下でPCRを行った。

Fig. 1 Schematic diagram of the activated sludge systems

Table 1 Subjective scoring of filamentous bacteria abundance

Level	Abundance	Explanation
5	excessive	Almost all microorganisms are filament.
4	abundant	Filaments are overwhelming majority.
3	common	The length of filament is more than the half of floc diameter mostly.
2	some	The length of filament is less than the half of floc diameter mostly.
1	none	No filamentous bacterium is observed.

Table 2 Summary of primers used in this study

Used for	Primer/Probe	Sequence (5' to 3')	References
PCR	Bact0003	ATTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(14)
	Bact0009f	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	(15)
	Bact1492r	ACGGYTACCTTGTACGACTT	(16)
	T7 promoter primer	CTAATACGACTCACTATAGG	
Sequencing	M13 primer M3	GTAACACGACGGCCAGT	
	Bact0003ST	ATTGAAGAGTTTGATCC	(14)
	Bact519r	GWATTACCGCGGCKGCTG	(17)

K:T, G M:A, C W:A, T Y:C, T

2) 16S rDNAクローンの取得および解析：PCR産物をMicrospin-S300HRで精製し、プラスミドpT7Blue cloning / expression region を用いてTAクローニングを行った。形質転換した大腸菌コロニーの少量をTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH8)) に懸濁し、95°Cで2分間熱処理して大腸菌からDNAを溶出させた後、氷冷した。このDNA溶出液をテンプレートにPCRを行った。PCR混合液の組成は基本的に2.2-1)と同様にし、プライマーペアはT7 promoter primer およびM13 primer M3 (いずれもタカラバイオ製) を用いた。PCR反応は、Pre-heating; 95°C, 5分に続き、第1段階; 94°C, 30 秒, 第2段階; 55°C, 30秒, 第3段階; 72°C, 1分を30サイクル繰り返し、Post extension; 72°C, 10分を行った。次に、このPCR産物をテンプレートとして、Bact0003¹⁴⁾ およびBact1492r¹⁶⁾ プライマーペアを用いて、再びPCRを行った。PCR混合液の組成および反応条件は、反応サイクル数を30サイクルとした点を除いて2.2-1)と同様に行った。

PCR産物 1 μl を3種類の制限酵素 (BstUI, MspI, Sau96I) によりそれぞれ消化し、アガロース電気泳動により切断パターンを比較してすべて同じ切断パターンを示すクローンを同一のPhylotype として分類した。各クローンの塩基配列はBact0003ST¹⁴⁾ (5'→3'方向) およびBact519r¹⁷⁾ (3'

→5'方向)をプライマーとし、5'末端側500 basesを決定した。DNA伸長反応にはBigDye Terminator Kit (アプライドバイオシステムズジャパン製)を用い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズジャパン製)を使用した。得られた塩基配列データはインターネット上でRibosomal Database Project II (RDP)と照合し相溶性検索を行った。

3) T-RFLP解析: 2.2-1)で抽出したDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR混合液の組成および反応条件は基本的に2.2-1)と同様にし、プライマーは5'末端を6-FAMで標識したBact0009fおよび5'末端をNEDで標識したBact1492rを用いた。PCR産物はMicrospin-S400HR (GEヘルスケアバイオサイエンス製)で精製し、制限酵素 (*Bst*UI, *Msp*UI, *Sau*96I)で消化した。消化した16S rDNAはABI PRISM 310 Genetic AnalyzerによりGene Scanモードで解析し、T-RFLP (0~550 basesの範囲)のElectropherogramを得た。

4) 多次元尺度法によるT-RFLPピークデータの解析: 曝気槽の活性汚泥のT-RFLP解析結果について、20~519 basesの領域で得られたT-RFのピークデータを、1base刻み(四捨五入)でピーク面積比(%)により整理した後、統計解析ソフトSPSS 10.0J (SPSS, Inc.)により、距離行列に置き換え二次元プロットを得た¹³⁾。なお、ピーク面積が1%以下のものに関しては解析対象外とした。

3. 結果

3.1 活性汚泥施設と運転管理項目

MLSSあたりのTOC負荷、曝気槽水温、SRTおよびMLSSの測定結果をFig.2に示す。工場のシャットダウンのため、原水流入が完全に停止した7月22日から8月5日までの期間は、これらの運転管理項目は測定せず、曝気方式は連続曝気から間欠曝気(1日に数回)に切り替えた。この期間を除いたMLSSあたりのTOC負荷は0.06~0.78 kg TOC・kg⁻¹ MLSS・day⁻¹ (平均0.35 kg TOC・kg⁻¹ MLSS・day⁻¹)であった。なお、原水のBOD濃度はTOC濃度の約1.6倍であった。曝気槽水温は、28~38℃ (平均32.6℃)であり、特に11月下旬までは34℃を超えることが多かった。SRTは、11月上旬まで5~10日であったが、それ以降は約3日に短縮した。MLSSは、調査開始時には6000 mg・l⁻¹前後であったが、5月下旬から7月上旬にかけて徐々に低下し、その後は4000 mg・l⁻¹前後であった。曝気槽のDOは、1段目で1~6 mg・l⁻¹ (平均4.1 mg・l⁻¹)、2段目では2~8 mg・l⁻¹ (平均4.4 mg・l⁻¹)、3段目で1 mg・l⁻¹以下 (平均0.2 mg・l⁻¹)であった (7月22日~8月5日を除く)。

原水および沈殿槽上澄液のTOC測定結果をFig.3に示す。調査期間中のTOC除去率は、82~97%であった。

3.2 汚泥沈降性と顕微鏡観察結果

汚泥沈降性の測定結果およびTable 1の基準に基づき評価した糸状性細菌の存在量をFig.4に示す。DSVIは2003年4月17日から11月上旬にかけて大きく変動した。特に6月26日~7月2日および9月17日は300 ml・g⁻¹を超え、極めて沈降性が悪い状態であった。その後、11月6日以降はDSVIの変動は小さく、200 ml・g⁻¹以下で安定に推移した。

顕微鏡観察の結果、糸状性細菌はDSVIが高い時期に多い傾向がみられた (Fig.4)。もっとも出現頻度の高い糸状性細菌はまっすぐかやや湾曲した形状で、直径1 μm以下、

ナイセル染色陰性、グラム染色陰性であり、Eikelboomの方法¹²⁾によりType0803と同定された (Fig.5 a)。この糸状性細菌は、主としてブロック外に浮遊しており、沈殿槽上澄液の濁質の主成分となっていた。またブロック内部には、真の分岐を有し、ナイセル染色陽性、グラム染色陽性の放線菌と同定された細菌が多く観察された。放線菌は、調査期間中、曝気槽において頻繁に発生していたスカム中に大量に観察され、スカムの原因細菌になっていると考えられた (Fig.5 b)。この他、ブロック内にはType021NおよびType0041/0065と同定される糸状性細菌が観察された。

Fig. 2 Operational condition of activated sludge system

Fig. 3 Total organic carbon concentration of influent and effluent water

Fig. 4 Diluted sludge volume index and score of filamentous bacteria abundance

a) Type0803 like bacteria in effluent water

b) Actinomycetes in scum on aeration tank

Fig. 5 Photographs of Type0803 like bacteria (a) and actinomycetes

3.3 糸状性細菌および放線菌由来のT-RFLPピークと近縁種の推定

Type0803様の糸状性細菌が多く観察された6月4日の沈殿槽上澄液および放線菌が多く観察された4月24日のスカムについて、T-RFLP解析およびクローンの取得・解析を行った。その結果、沈殿槽上澄液のT-RFLP解析 (*MspI*消化) では、512 bases におおむね単一のピークが検出された。16S rDNAクローン解析結果と照合した結果、本T-RFは *Chloroflexi* 門の *Class Anaerolinea* に属する *Caldilinea aerophila* (AB 067647) と高い相同性 (91.8%) を有する細菌由来であることがわかった。これらの結果より、沈殿槽上澄液の観察されたType0803様の糸状性細菌は、*Caldilinea* 属と近縁の細菌と推測した。また、スカムのT-RFLP解析 (*MspI*消化) では、Fig.5b) に示した放線菌由来とみられるおおむね単一のピークが276 basesに検出された。クローン解析結果と照合したところ、本T-RFは *Actinobacteria* 門 *Actinomycetale* 目 (放線菌目) に属する *Dermatophilus chelonae* (DSM 44178) と最も高い相同性 (92.2%) を有する細菌由来であることが明らかとなったことから、スカム中の放線菌は *Dermatophilus* 属と近縁な種と推測した。

3.4 曝気槽活性汚泥における16S rDNAクローンの解析結果

16S rDNAクローンの取得・解析は、3.3で述べた沈殿槽上澄液およびスカムの他に、2003年4月17日、6月12日、7月31日、8月7日および2004年3月4日の曝気槽の活性汚泥について行った。その結果、これらの7検体から全部で78種類のクローンが得られた。曝気槽の活性汚泥から得られたクローンは多様で、同一のPhylotypeとして分類できるクローンは少なかった。系統解析の結果、*Proteobacteria* の β

subdivisionに属する細菌が15種類、*Actinobacteria* に属する細菌が12種類、*Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* に属する細菌が8種類、*Proteobacteria* の α subdivision および *Proteobacteria* の γ subdivision に属する細菌がそれぞれ5種類、Gram Positive Bacteria の *Eubacterium tenue* subgroup に属する細菌が3種類あり、その他、*Proteobacteria* の ϵ subdivision および *Chloroflexi* に属する細菌が各1種類あった。また、分類できない細菌が24種類あった。このうち、RDPの相同性スコア S_{ab} 値が0.6以上の細菌がヒットしたクローンをTable 3に示す。

3.5 曝気槽活性汚泥のT-RFLP解析結果

2003年4月17日から2004年3月24日までに採取した曝気槽の活性汚泥47サンプルについてT-RFLP解析を行った。Fig.6にElectropherogram (*MspI*消化パターン) を示す。検出されたピークは全部で120種類あった。*Caldilinea* 属に近縁なType0803様の糸状性細菌由来のT-RFは512 bases (ピークA) に検出された。スカムから検出された *Dermatophilus* 属の近縁種は276 bases (ピークB) に検出された。また、この他に *Actinomycetale* 目に属する細菌由来のT-RFとして、*Tetrasphaera* sp. の近縁種が144 bases (ピークC) に検出された。これらのT-RFのピーク面積比 (%) とDSVIの推移を比較した (Fig.7)。

ピークAは、11月上旬までは頻繁に検出されたが、その後次第に減少し、12月2日以降は検出されなくなった。一方DSVIは、4月17日から11月上旬までは不安定であったが、11月以降 $200 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ 以下で安定に推移した。このことから、ピークAは汚泥沈降性が変化しやすい不安定な時期に検出される傾向にあることが示された。しかし、11月上旬までのピークAの増減とDSVIの変動の傾向は一致していないことから、2003年6月および9月のように、DSVIが $300 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ を超す重度の沈降性悪化には、他の要因も関与していると考えられた。

放線菌由来のピークCは、調査期間を通じて頻繁に検出されたが、2003年6月および9～10月には特に多く検出され、その増加パターンはDSVIの上昇パターンと類似していた。もう一方の放線菌由来のピークBは、出現頻度はピークCほど高くなく、2003年9月のDSVI上昇時には増加しなかったが、6月の上昇時には増加した。しかし、放線菌由来のこれらのピークは、DSVIが $200 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ 以下に低下した11月以降にも検出されており、沈降性悪化との明確な関連性はみられなかった。

以上、T-RFLP解析により、糸状性細菌および放線菌の消長を把握することができた。しかし、これらのピーク面積比の推移とDSVIの傾向は必ずしも一致せず、その他の要因も沈降性悪化に影響を及ぼしていると考えられた。顕微鏡観察による糸状性細菌の存在量とDSVIとの傾向は一致していたことから、Type0803様以外の糸状性細菌が沈降性悪化に影響を及ぼした可能性も考えられるが、本研究ではこれらの細菌由来のT-RFを特定することはできなかった。

3.6 T-RFLPピークデータの多次元尺度法による解析

細菌群集構造全体の変動の様子を把握するため、T-RFLPピークデータを用いて多次元尺度法による解析を行った。Fig.8に結果を示す。2003年7月31日、8月7日および2004年1月23日のプロットは他のプロットから著しく離れ

Table 3 Phylogenetic position and frequency of clones obtained in this study

Division	Closest Species, Strain and Accession no.	Sequenced clone Name*	No. of Clones	Corresponded T-RFLP Peak
<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldilinea aerophila</i> [AB067647] (0.93)	030604-SS	7	A
<i>Flexibacter-Cytophaga</i>	clone 1811 [env.1911] (0.618)	030731-AS	1	
<i>bacteroides</i>	clone MK21 [AF87074] (0.707)	030604SS-12	3	
	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> ATCC 13524(T) [F.ferrugin] (0.605)	030612AS-28	1	
		030731AS-5	6	
	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> str. LP 8 [AB015480] (0.701)	030612AS-3	1	
	<i>Sphingobacterium comitans</i> [Sph.commtins] (0.616)	030612AS-29	1	
	str. SBR 2026 [str.2026] (0.629)	030731AS-3	1	
		030612AS-7	1	
	clone 49511 [AF09805] (0.667)	030731AS-10	1	
	clone 49511 [AF09805] (0.938)	030731AS-1	1	
		030612AS-22	1	
Gram positive bacteria				
<i>Eubacterium tenue</i> subgroup	1194 clone AH040 [AF125204] (0.674)	040304AS-11	1	
	<i>Megasphaera cerevisiae</i> str. VTT-E-85230 [Megcerevi] (0.623)			
	<i>Megasphaera elsdenii</i> str. B159 ATCC 17752 [meg.elsden] (0.623)	030731AS-30	1	
	<i>Veillonella ratti</i> ATCC 17746 [AF186071] (0.794)	030731AS-14	1	
<i>Actinobacteria</i>	1341 clone 37 [Y15796] (0.820)	040304AS-6	1	
	1368str.LP2 [AB030911] (0.845)	040304AS-3	1	C
	<i>Dermatophilus chelonae</i> DSM 44178 (0.698)	030731AS-11	1	B
	<i>Dermatophilus chelonae</i> DSM 44178 (0.707)	030612AS-24	1	B
	<i>Dermatophilus chelonae</i> DSM 44178 (0.713)	030424Scum-5	5	B
		040304AS-26	1	B
		030612AS-17	1	B
	<i>Micobacterium</i> HE5 str. HE5 [AJ012738] (0.899)	030731AS-17	1	
	Mount Coot-tha region (Brisbane,Australia) 5-10cm depth soil DNA clone MC19 [env.MC19] (0.609)	030731AS-7	1	
	str. AS2988 [AF060671] (0.785)	030604SS-3	4	
	str. Lp2 [AB030911] (0.622)	030417AS-11	1	C
	str. Lp2 [AB030911] (0.711)	030417AS-7	1	C
	str. Lp2 [AB030911] (0.845)	030612AS-4	1	C
	<i>Tetrasphaera</i> sp.Ellin149 [AF408992] (0.909)	030417AS-3	3	C
a subdivision of <i>Proteobacteria</i>	clone BSV03 [AJ229177] (0.829)	030417AS-12	1	
	<i>Paracoccus versutus</i> IAM 12814(T) [Par.versu2] (0.861)	030417AS-18	1	
	<i>Paracoccus versutus</i> str.IAM 12815 [Par.versu3] (0.861)		1	
	<i>Pseudaminobacter defluvii</i> str. TH1051 [Pab.dfluv] (0.919)	040304AS-12	1	
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> [Rps.palu10] (0.947)	030417AS-37	1	
	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.str. WCU-G13 [Rps.WCUG13] (0.973)	030417AS-14	1	
B subdivision of <i>Proteobacteria</i>	1382str. OS isolate ac-16 [J46748] (0.726)	040304AS-21	1	
	405 str. GR-10 [Ps.spGR10] (0.709)	030807AS-16	2	
	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>Cattleyae</i> cattleyae NCPFB 961(T) [Av.avevcat] (0.712)	040304AS-10	1	
	<i>Acidovorax</i> LW 1 str. LW 1 [AJ130765] (0.929)	030612AS-8	1	
	<i>Aquaspirillum gracile</i> str. D4 ATCC 19624(T) [Aqsp.graci.] (0.716)	030424Scum-11	2	
	<i>Azoarcus</i> mXyN1 str. mXyN1 [Azc.MxyN1] (0.733)	030417AS-22	1	
	<i>Duganella zoogloelides</i> ATCC 19544 [Dg.zooglo7] (0.705)	030417AS-6	1	
	<i>Duganella zoogloelides</i> ATCC 19544 [Dg.zooglo7] (0.900)	030417AS-17	1	
	<i>Nitrosomonas</i> sp. Str. Nm84 [Nm.spNm84] (0.928)	030731AS-29	1	
	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> str. A3 [Ruv.gelat3] (0.736)	030731AS-2	1	
	str. OS isolate ac-16 [J46748] (0.713)	030612AS-16	1	
	str. OS isolate ac-16 [J46748] (0.717)	030731AS-8	1	
	str. rJ13 [AB021331] (0.781)	030417AS-36	1	
	str. SBR1022 [str.1022] (0.945)	030424Scum-31	2	
	str. SBR1037 [str.1037] (0.939)	030417AS-5	2	
γ subdivision of <i>Proteobacteria</i>	<i>Achromatium</i> JD2 [AF129549] (0.670)	040304AS-37	1	
	<i>Acinetobacter</i> sp. Str. 10095 [Z93450] (0.859)	030807AS-4	6	D
	<i>Ecothiorhodospira vacuolata</i> str.BN9512; beta DSM 2111(T) [Ec.vacuola] (0.654)	040304AS-5	2	
	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>Pneumophila</i> str. Chicago 2 ATCC 33215 [Leg.pneum] (0.838)	030731AS-20	1	
	str. BrG3 [U51103] (0.797)	030731AS-4	1	
ε subgroup of <i>Proteobacteria</i>	str. BD1-5 [AB015518] (0.637)	030424Scum-3	3	
Unclassified	Bacterial species 16S rRNA gene, isolate HB1-3 [B16SHB13] (0.642)	040304AS-38	1	
	clone R121025 [AJ244325] (0.627)	030424Scum-19	2	
	<i>Cytophaga</i> sp. [AJ224414] (0.844)	030417AS-28	2	
	<i>Cytophaga</i> sp. [AJ224414] (0.849)	030424Scum-40	2	
		030612AS-26	1	
	<i>Cytophaga</i> sp. [AJ224414] (0.825)	040304AS-23	4	
	<i>Cytophaga</i> sp. [AJ224414] (0.849)	040304AS-34	1	
	Denitrifying Fe-oxidizing bacteria 16SrRNA gene [DFU51103] (0.735)	030731AS-9	1	

* Clone name shows sampling date, sample type and serial number in order from right. Here, 'SS' means suspended solid in effluent water, 'AS' means activated sludge in aeration tank, and 'Scum' means the scum floated on aeration tank.

Fig. 6 Electropherogram of 5'-T-RFLPs of *MspI* digested 16S rDNA amplified from activated sludge
A: *Caldilinea* sp., B: *Dermatophilus* sp., C: *Tetrasphaera* sp., D: *Acinetobacter* sp.

Fig. 7 Transition compared with DSVI and each peak area

Fig. 8 Multidimensional scaling analysis based on T-RFLP electropherogram

ており、細菌群集構造が大きく変化したことがわかる。その他のプロットは中央に位置したが、11月以降のプロットはやや左に集中する傾向がみられた。

プロットが大きくシフトした2003年7月31日および8月7日のDSVIは、 $100 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ 以下であり、調査期間中で最も低かった。また中央左下に位置していた11月以降には、DSVI $100 \sim 200 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ の範囲で安定して推移した。これに対し、プロットが中央に分布した2003年4月17日～7月23日および8月13日～11月7日の時期は、DSVIが大きく変動し不安定な状況にあった。DSVI $200 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ を超えた2003年5月15日、6月18日、6月26日、7月2日、9月11日、および9月17日のプロットは、いずれもFig.8の実線で囲んだ中央右寄りの

領域に位置した。これらの結果から、汚泥沈降性が悪化しやすい不安定な時期と、良好な状態で安定している時期では、細菌群集構造が異なっていることが示された。

2003年7月31日および8月7日のプロットの大きなシフトは、2003年7月22日から8月にかけて原水の流入が停止し、曝気方式を間欠に切り替えたことが原因と考えられる。このときのT-RFLP Electropherogramは、他の時期に比べて検出ピークが少なく、特に8月7日はこの日のみピークDが検出された (Fig.6)。クローン解析の結果、ピークDは、*Proteobacteria* の γ subdivision に属する *Acinetobacter* sp. に近縁な種と推定された (Table 3)。また、2003年11月以降のプロットが左に移行したのは、曝気槽水温の低下およびSRTの短縮が原因と考えられる (Fig.2 c)。なお、2004年1月23日のプロットが左に大きくシフトした原因は不明である。本研究で把握していない何らかの因子によると考えられるが、群集構造の変化は一時的であり、翌週からは元の位置に戻った。

4. 考 察

本研究では、食品工場の排水処理施設における活性汚泥の細菌群集構造を、T-RFLP法を中心とした分子生物学的手法により解析した。その結果、1種類の糸状性細菌および2種類の放線菌について近縁種を推定し、これらの細菌の消長を追跡することができた。本研究では、沈殿槽上澄液やスカムなど、糸状性細菌や放線菌が濃縮された試料を用いることで、効率よくクローン獲得、近縁種推定を行うことができた。KaewpipatらはDGGE法により活性汚泥の細菌群集構造を解析し、汚泥沈降性との関連性を調べた⁷⁾。しかし、彼らの報告では、糸状性細菌が増加し汚泥沈降性が悪化しても、糸状性細菌由来のDNAの存在割合は非常に低いことから、該当するバンドを検出できず、細菌群集構造の変化も認められなかった。本研究では、曝気槽活性汚泥のT-RFLP ElectropherogramにおけるピークAの面積比は最も多い時で10.8%であり (Fig.7)、その消長とDSVIとの関連性を把握することができた。

沈殿槽上澄液で優占していた糸状性細菌は、*Chloroflexi* 門の *Caldilinea* 属に近縁な種と推定された。曝気槽活性汚泥のT-RFLP解析の結果、本細菌は汚泥沈降性が変化しやすい不安定な時期に検出される傾向があり、汚泥沈降性に悪影響を及ぼしている可能性が示された。しかし、ピークAの増減とDSVIの変動の傾向は一致していないことから、極度の沈降性悪化には、他の要因も関与していると考えられた。*Chloroflexi* 門は4つの亜門に分類され、このうち活性汚泥からは *Chloroflexi*-1 と *Chloroflexi*-3 が検出されている⁵⁾。*Chloroflexi*-1 の *Caldilinea aerophila* (AB 067647) は、Yamada¹⁸⁾ らがメタン発酵プロセスより単離しその特性を調べている他は詳細な報告例がなく、通常の好気性活性汚泥における出現条件や特徴はよくわかっていない。本糸状性細菌は、顕微鏡観察によるEikelboomの分類法ではType0803と同定された。しかし、EikelboomによるとType0803の出現しやすい環境は $0.2 \text{ kg BOD} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ MLSS} \cdot \text{day}^{-1}$ 以下の低負荷環境とされている¹¹⁾。今回調査した活性汚泥施設のBOD負荷は平均 $0.54 \text{ kg BOD} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ MLSS} \cdot \text{day}^{-1}$ (原水のBOD/TOC=1.6として換算) と高いことから、Eikelboomが報告しているType0803とは別種であると考え

られる。本細菌は、曝気槽水温の低下およびSRTの短縮に伴い消失した。

曝気槽スカムで優占していた放線菌はActinomycetales目のDermatophilus属に近縁な種と推定された。放線菌(Actinomycetes目)は活性汚泥からは複数の属が検出されているが¹⁹⁾、本研究で調査した活性汚泥施設ではActinomycetes目のDermatophilus属の近縁種(ピークB)およびTetrasphaera属の近縁種(ピークC)を含む計12種類のクローンが検出された。曝気槽活性汚泥のT-RFLP解析の結果、汚泥沈降性が著しく悪化した2003年6月および9~10月に、これらの放線菌の両方あるいはいずれかが増加していた。一般的に放線菌はスカムの原因菌としてよく知られているが、本活性汚泥の顕微鏡観察の結果、フロック内部にも多く観察されたことから、その硬い分岐した糸状体がフロックの圧密性を悪化させた可能性が考えられる。しかし、これらの放線菌は、沈降性が低下した時期も検出されたことから、沈降性悪化にどの程度寄与しているかは不明である。放線菌は、脂肪など疎水性物質を含む原水を好み、水温15℃以上、比較的高い有機物負荷(0.1~0.7 kg BOD・kg⁻¹ MLSS・day⁻¹)で発生しやすいとされる¹¹⁾。本研究で調査した施設も、期間通じて高負荷で水温も高かったため、負荷が下がり間欠曝気方式に変更したシャットダウン時には一時的に減少したものの、それ以外の時期には高頻度で検出され、SRTを短縮しても消失しなかった。

以上に述べたように、本研究で着目したピークA、ピークB、およびピークCの消長だけでは沈降性悪化のメカニズムを十分に説明できず、その他の細菌や、フロックの物性(粒径や形、粘性物質の量など)も沈降性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、細菌群集の全体的な変化を把握するため、多次元尺度法による解析を行った。その結果、細菌群集構造は、沈降性が悪化しやすい不安定な時期と、良好な状態で安定している時期に大まかに分かれることがわかった。このことから、活性汚泥のように多種類の細菌が存在し、個々の細菌の特定が困難な系における動態の評価には、多次元尺度法が有用であることが示された。今後、本排水処理施設において、T-RFLP法によるモニタリングを継続するとともに、他の排水処理施設においても同様の解析を行い、活性汚泥に出現する細菌の種類と出現環境に関する情報を蓄積していきたい。

5. ま と め

T-RFLP法を用いて、食品工場の排水処理施設における活性汚泥の細菌群集構造を約1年間評価し、汚泥沈降性との関連性を調べた結果、以下の結論を得た。

1) 沈殿槽上澄液に浮遊していた糸状性細菌と、曝気槽スカムで優占していた放線菌のT-RFLPピークおよび16S rDNAクローンをそれぞれ取得した。塩基配列に基づいて種を同定した結果、糸状性細菌はCaldilinea属の近縁種、放線菌はDermatophilus属の近縁種であることがわかった。このほか放線菌目に属する細菌として、曝気槽液からTetrasphaera属に近縁名種が検出された。

2) 1) で特定した1種類の糸状性細菌および2種類の放線菌について、曝気槽液における消長をT-RFLP解析により調べた。その結果、糸状性細菌は汚泥沈降性に悪影響を

及ぼす可能性が示唆されたが、本細菌の増減と沈降性データは必ずしも一致しなかった。一方、放線菌には、沈降性との明らかな関連は見出されなかった。これらの結果から、沈降性の悪化には、その他の要因も関与していると考えられた。

3) T-RFのピークデータを多次元尺度法によって解析し、細菌群集構造全体の変動を評価した結果、プロットは大まかに、汚泥沈降性の悪化しやすい時期と、良好な状態で安定している時期に分類できた。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、山梨大学大学院 河野哲郎准教授には顕微鏡観察方法について助言をいただきました。ここに深く感謝します。

(原稿受付 2006年12月29日)

(原稿受理 2007年6月13日)

参 考 文 献

- 1) Wagner, M., Amann, R., Kampfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N. and Schleifer, K. H. (1994) Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge, *System. Appl. Microbiol.*, **17**, 405-417.
- 2) De Los Reyes III, F.L., Ritter, W. and Raskin, L. (1997) Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1107-1117.
- 3) De Los Reyes, M.F., De Los Reyes III, F.L., Hernandez, M. and Raskin, L. (1998) Quantification of *Gordona amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobic digester systems with oligonucleotide hybridization probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2503-2512.
- 4) Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M. and Wagner, M. (2000) Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom Type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5043-5052.
- 5) Bjornsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G. W. and Blackall, L. L. (2002) Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal, *Microbiology*, **148**, 2309-2318.
- 6) Kanagawa T., Aruga S., Kurata S. and Kamagata Y. (2001) Quantitative analysis of filamentous bacteria in activated sludge by a new real-time quantitative PCR method with a quenching primer (QP-PCR), *Proceeding of 9th international symposium on microbial ecology*, 386.
- 7) Kaewpipat, K. and Grady Jr., C.P.L. (2002) Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors, *Water Science and Tech.*, **46**, 19-27.
- 8) Christensson, M., Blackall, L. L. and Welander, T., (1998) Metabolic transformations and characterization of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 226-234.
- 9) Dabert, P., Sialve, B., Delgenes, J. P., Moletta, R. and Gordon, J. J., (2001) Characterization of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 500-509.
- 10) Liu, W. T., Marsh T. L., Cheng H. and Forney L. J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4516-4522.
- 11) 日本下水道協会編 (1997) 糸状微生物「下水試験方法」, pp.630-651.
- 12) Eikelboom, D. H. (2000) Process control of activated sludge plants by microscopic investigation, IWA Publishing, London, UK.
- 13) 中村寛治, 鈴木義彦, 石田浩昭 (1999) フェノールによるトリクロロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の解析, *環境工学研究論文集*, **36**, 1-10.

- 14) 中村寛治, 石田浩昭, 飯泉太郎, 鈴木義彦 (2001) バイオステイミューレーションのプロセス管理を目的とした16S rDNA遺伝子による微生物群集構造の解析, 環境工学研究論文集, **38**, 175-186.
- 15) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治 (2001) テトラクロロエチレンを分解する微生物群の集積培養および土壌カラムにおけるテトラクロロエチレンの分解, 環境工学研究論文集, **38**, 163-174.
- 16) Guschin, D. Y., B. K. Mobarry, D. Proudnikov, D. A. Stahl, B. E. Rittmann and A. D. Mirzabekov. (1997) Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2501-2507.
- 17) Lane, D., J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing , in "Nucleic acid techniques in bacterial systematics" (Ed. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., pp117-175, JOHN WILEY & SONS.
- 18) Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A. and Harada, H. (2005) Diversity, localization and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7493-7503.
- 19) Blackall, L. L., Parlett, J. L., Hayward, A. C., Minnikin, D. E., Greenfield, P.F. and Harbers, A.E. (1989) *Nocardia pinensis* sp. nov., an *Actinomycete* found in activated sludge foams in Australia, *J. Gen. Microbiol.*, **100**, 99-122.