

# 分子生物学的手法をもちいた生物学的 廃水処理装置の微生物相の解析 —フタル酸分解嫌気性細菌の特定—



(技)研究開発部第5研究室  
赤 司 昭  
Akira Akashi

## Analysis of Microbial Communities in the Biological Wastewater Treatment Systems with Molecular Biological Techniques —Specification of phthalate-degrading anaerobic bacteria using RT-PCR-DGGE—

分子生物学的手法の発達により、培養を介さずに廃水処理装置内の微生物集団を解析することが可能になった。本稿では、RT-PCR-DGGE法をもちいて、フタル酸を処理する上向流嫌気性ブランケット反応器(UASB)内のフタル酸分解細菌を特定した結果について報告する。ビール工場より採取したグラニュール汚泥を種汚泥として、テレフタル酸とイソフタル酸を炭素源とする廃水でUASB反応器を立ち上げた。種汚泥、および、経時的にサンプリングした汚泥の微生物群集の解析から、種汚泥や分解活性のない汚泥には存在せず、分解活性のある汚泥のみに特異的に出現する細菌、すなわち、フタル酸分解菌を3種特定した。

Recent development of molecular biological techniques provided us new approaches to the analysis of microbial dynamics in biological wastewater treatment systems. Phthalate-degrading anaerobic bacteria were specified using molecular biological technique, RT-PCR-DGGE. An upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor was inoculated with granular sludge from a full-scale UASB reactor treating brewery wastewater, and was fed with synthetic wastewater containing terephthalate and/or isophthalate as carbon source. Changes in bacterial diversity during treatment of both compounds were monitored with DGGE. Three specific bands were observed in the granular sludge which degraded terephthalate and isophthalate, but not in seed sludge and the sludge which did not degrade the compounds. DGGE pattern did not change in the granular sludge during the feed of terephthalate-containing wastewater. After the change of component of the influent to isophthalate, one of these three bands was disappeared. These results indicate that two kinds of bacteria participated in the degradation of both terephthalate and isophthalate, and that the other contributed the degradation of terephthalate in an anaerobic granular sludge system.

### Key Words :

上向流嫌気性ブランケット法	Upflow anaerobic sludge blanket (UASB)
嫌気性細菌	Anaerobic bacteria
テレフタル酸	Terephthalic acid
イソフタル酸	Isophthalic acid
ポリメラーゼチェーンリアクション	Polymerase chain reaction (PCR)
変性剤濃度勾配ゲル電気泳動	Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

## まえがき

活性汚泥法や上向流嫌気性プランケット法(UASB)等の生物学的廃水処理方法は、ランニングコストが安価で、運転管理も比較的容易であることから有機性廃水の処理方法として広くもちいられている。本来、生物学的処理方法では、そこに生息する微生物により廃水の浄化がなされるわけであるから、それらの微生物の状態を把握しながら、運転管理がなされるべきである。しかしながら従来、これらの生物学的廃水処理装置の運転は、流入原水と処理水の水質を指標にしてもっぱら現場担当者の勘と経験に頼る部分が大であった。つまり、装置の性能を左右する微生物に関してはブラックボックスのまま運転がなされてきた。

廃水処理装置内には多種多様な微生物が存在し、これらの微生物の共同作用により浄化がおこなわれているが、このような複合微生物群集を解析する適りな手法がなかった。従来微生物の検出・定量に使用されている培養法では、廃水処理装置(環境)に生息する微生物のせいぜい10%しか検出できないといわれており<sup>1)</sup>、残りの90%以上の微生物は、生きてはいるが培養できない(Viable but nonculturable: VNC)<sup>2)</sup>ことになる。したがって、培養可能な微生物だけを対象とした研究では、処理装置の性能と微生物との関係を正しく把握することは不可能である。

医学・生物学分野で発展した分子生物学手法が、環境微生物の研究に適用されるようになり、培養操作を経ずに廃水処理装置内の微生物群集を解析することが可能になった。中でも、Polymerase Chain Reaction (PCR)法<sup>3)</sup>、Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH)法<sup>4)</sup>、および、Denaturing Gradient Gel electrophoresis (DGGE)法<sup>5)</sup>の貢献は大きく、今までブラックボックスであった装置内の微生物群集に関する理解を飛躍的に深めた。

本報告では、細菌の16SrRNAをターゲットとしてRT-PCR-DGGE法を活用してUASB装置内のフタル酸分解細菌を特定した例について報告する。テレフタル酸をはじめとするフタル酸は、世界で製造される化学物質の上位50位内に入る大量合成品であり、1994年における全世界でのテレフタル酸生産量は、年間1000万トンにも達する<sup>6)</sup>。従来、本物質を含有する廃水は、活性汚泥法等の好氣的廃水処理方法により処理されていた。近年、UASB等のエネルギー消費の少ない嫌氣的処理方法をフタル酸含有廃水の処理に適應する例が増えてきている。1999年の報告では、世界で約10基の実装置が稼働、もしくは、

建設中とのことである<sup>7)</sup>。当社では、PANBIC-Hをはじめとする嫌氣的処理装置を製造・販売しており、フタル酸もそれらの処理対象のひとつになりうるものと考えられる。このように、実機レベルの運転が実施されているにもかかわらず、フタル酸を分解する嫌気性細菌に関する情報はきわめて少ない。

最近、Wuら<sup>8)</sup>はテレフタル酸を処理するUASB装置より採取したグラニューール汚泥を種汚泥として、テレフタル酸を唯一の炭素源とする廃水で馴養し、そこに生息する微生物群集を明らかにした。しかし、彼らは、これらの微生物群のうち、どの細菌がテレフタル酸の分解に関与しているかについては明らかにしていない。

本研究では、フタル酸を処理する嫌氣的処理装置の微生物学的側面からの運転指標の確立を目的として、PCR-DGGEをもちいて、テレフタル酸やイソフタル酸の分解に関与する嫌気性微生物を特定した結果について報告する。

## 1. 材料・方法

### 1.1 フタル酸処理UASB反応器の運転

φ100×1000 mm (容積約8 L)の反応器にビール工場より採取したグラニューール汚泥を約2.7 L投入し、テレフタル酸(TP)とイソフタル酸(IP)の両成分を炭素源とする廃水を連続的に供給することにより立ち上げた。反応器の温度は、35~37℃になるように制御した。表1に廃水組成と計画TOD-SS負荷を示す。運転立ち上げは、TOD-SS負荷0.05 kg/kg/dより開始し、フタル酸の分解率を見ながら徐々にアップした。その後、廃水組成をTP単独、次いで、IP単独に換え運転した。

### 1.2 微生物群集の解析

グラニューール汚泥に生息する微生物群集の解析は、DGGE法により実施した。経時的にサンプリングしたグラニューール汚泥からRNAを精製し、真性細菌(酸生成細菌)に特異的なプライマーセットをも

表 1 UASBの運転条件  
Table 1 Operating condition of UASB reactor

Run	Composition of Influent	TOD-SS Loading (kg/kg/d)
1	TP* + IP**	0.05, 0.1, 0.2
2	TP	0.2
3	IP	0.1, 0.15, 0.2
4	TP	0.1, 0.15, 0.2

\* TP: Terephthalate

\*\* IP: Isophthalate

ちいた RT-PCR により 16SrRNA の V3 領域を含む DNA を増幅した。PCR 産物は、40~45 %の変性剤濃度勾配の6.5 %ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した。

### 1. 2. 1 RNA の精製

グラニュール汚泥の RNA は、TRIzol Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) をもちいて抽出し、引き続き、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) で精製した。すなわち、グラニュール汚泥約100 mgと 1 mL の TRIzol Reagent, ならびに、0.2 mL のクロロホルムを混合し、1 mL のガラスビーズ (直径0.1 mm) を含む 2 mL 容のスクリーキャップチューブ中で、3 000 rpm, 3 分間振とうすることにより抽出した。粗精製した RNA は、DNase 処理により混在する DNA を分解後、RNeasy Mini Kit をもちいて精製した。

### 1. 2. 2 RT-PCR

cDNA の合成は、逆転写酵素 ReverTra Ace (東洋紡) をもちい、製造者の推奨する反応条件によりおこなった。すなわち、90 °C, 5 分熱変性した0.1 μg の RNA に25 pmoles の random hexamer, 1 mM の dNTP, 反応溶液, および、100 U の逆転写酵素を加え、25 °C で15分処理した後、42 °C で45分反応することにより cDNA を合成した。

PCR は、真性細菌の16SrRNA 遺伝子の V3 領域を増幅する GC-PRBA338f と PRUN518r<sup>9)</sup> をプライマーとしてもちいた。反応液は、10 ng の cDNA, 2 mM の dNTP, 2 mM の MgSO<sub>4</sub>, 0.5 μM のプライマー, 1 U の耐熱性 DNA polymerase (KOD-Plus-, 東洋紡), および、1 × KOD-Plus-buffer (東洋紡) より成る。この反応液を94 °C, 2 分処理後、94 °C 30秒, 65 °C 30秒, 72 °C 30秒の反応を10回、引き続き、94 °C 30秒, 60 °C 30秒, 72 °C 30秒の反応を10回、さらに、94 °C 30秒, 56 °C 30秒, 72 °C 30秒の反応を

12回おこない、16SrRNA 遺伝子を増幅した。計32 回の増幅反応後、72 °C 7 分の反応を1 回おこなった。PCR 産物は、マイクロコン-100 (Millipore) で脱塩・濃縮した後 DGGE に供試した。

### 1. 2. 3 DGGE

DGGE は、40~45 %の変性剤濃度勾配 (100 % 変性剤は、40 %ホルムアミドと 7 M 尿素の混合物である) を含む6.5 %ポリアクリルアミドゲルを使用した。脱塩・濃縮した500 ng の PCR 産物をアプライし、50 V 30 分の泳動後、200V 5 時間の泳動をおこなうことにより実施した。泳動終了後、ゲルを SYBR Gold で20分染色後、302 nm の紫外線を照射して観察した。

## 2. 結 果

### 2. 1 UASB によるフタル酸の処理

UASB 反応器は、ビール工場の UASB 反応器から採取したグラニュール汚泥を種汚泥として立ち上げた。表 1 に示すように、まず、テレフタル酸とイソフタル酸の両成分を炭素源とする廃水を連続的に供給することにより装置を立ち上げた (Run 1)。計画 TOD-SS 負荷0.05 kg/kg/d より運転を開始し、その後テレフタル酸とイソフタル酸の分解を見ながら順次0.1 kg/kg/d, 0.2 kg/kg/d に負荷をアップした。引き続き、廃水組成をテレフタル酸単独廃水に換え約 1 ヶ月運転した後 (Run 2), イソフタル酸単独廃水に換え運転した (Run 3)。

図 1, 2 にそれぞれテレフタル酸の一日当たりの除去量とガス発生量の推移を示す。運転開始後テレフタル酸とイソフタル酸の分解活性が出現し始めるまでに約90日必要とした。その後徐々に両成分の除去量は上昇し、TOD-SS 負荷0.1 kg/kg/d 運転時のテレフタル酸の最大除去量は10.6 g/d (除去率78.4 %), イソフタル酸の最大除去量は3.1 g/d (除去率99.3

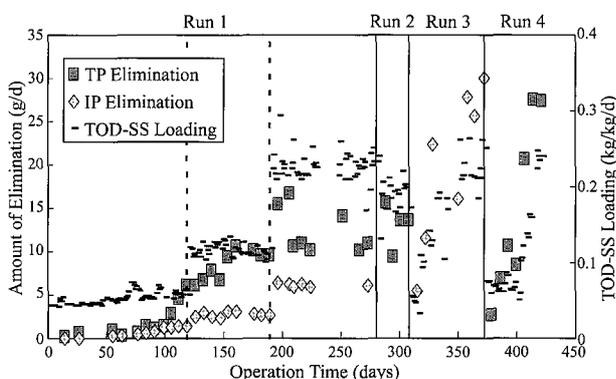


図 1 フタル酸分解の経時変化  
Fig.1 Change of phthalate degradation

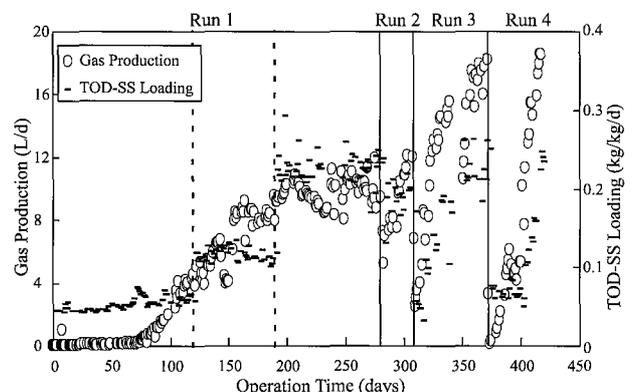


図 2 ガス発生量の経時変化  
Fig.2 Change of gas production

%)であった。TOD-SS 負荷0.2 kg/kg/d 運転時は、それぞれ16.7 g/d (除去率56.4%)と6.4 g/d (除去率91.1%)であった。0.2 kg/kg/d における運転期間中、イソフタル酸の除去量は、6 g/d 前後ではほぼ一定だったのに対し、テレフタル酸の除去量は一定せず、不安定であった。また、除去量が増大するに従い、ガス発生量も増大した。

テレフタル酸とイソフタル酸の両成分を含有する廃水の処理を280日間継続したが、両成分の除去量の増加は認められなかったため、廃水組成をテレフタル酸単独廃水に変更し処理を継続したが (Run 2)、除去量の上昇は認められなかった。

引き続き、廃水組成をイソフタル酸単独に換え処理をおこなった (Run 3)。負荷の上昇にともない除去量も急激に上昇し、TOD-SS 負荷0.25 kg/kg/d 運転時に最大30.1 g/d (除去率89.7%)の除去量がえられた。

なお、実験期間中、処理水の酢酸濃度は10 mg/L 未満であった。

## 2.2 RT-PCR-DGGE 法によるフタル酸分解細菌の特定

### 2.2.1 テレフタル酸とイソフタル酸含有廃水での馴養期間中における細菌群集の変化とフタル酸分解細菌の特定

図3にテレフタル酸とイソフタル酸両成分を含有する廃水でグラニューク汚泥を馴養した期間 (Run1) における細菌群集の経時変化を RT-PCR-DGGE により解析した結果を示す。種汚泥 (レーン1)、および、フタル酸の分解活性のない汚泥

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TP Elimination (g/d)	—	0	0.1	1.2	4.5	6.7	10	9.5	10	11
IP Elimination (g/d)	—	0	0.1	0.8	1.4	2.9	2.8	2.7	5.9	6.1

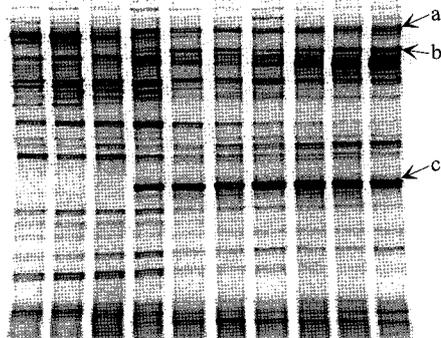


図3 Run1における細菌群集の変化  
Fig.3 Changes of bacterial communities in Run1

※The arrows indicate the DNA bands which were observed in the granular sludge which had phthalate-degrading activity.

(レーン2と3)では存在する微生物群集に差は見られなかった。しかし、フタル酸分解活性の発現とともに、新しい3本のバンド (図3レーン4—10, 矢印 a, b, c), すなわち、細菌が出現した。これらのバンド (細菌) は、種汚泥や分解活性のない汚泥には見られず、分解活性のある汚泥に特異的に見られ、かつ、長期に渡り安定に観察されたことから、これら3種の細菌がテレフタル酸とイソフタル酸の分解に密接に関与しているものと考えられる。

### 2.2.2 廃水組成の変化にともなう微生物群集の変化

テレフタル酸とイソフタル酸の両成分を含有する廃水から、テレフタル酸だけ含有する廃水、次いで、イソフタル酸含有廃水、さらに、テレフタル酸含有廃水と廃水の組成を変え、それともなう微生物群集の変化を RT-PCR-DGGE 法により解析した (図4)。テレフタル酸だけ含む廃水で約1ヶ月処理したが、バンドパターンに変化は見られなかった (レーン3—5)。次いで、イソフタル酸含有廃水に換えたところ (レーン6—8)、aとcのバンドに変化

表2 廃水組成とフタル酸分解菌の出現

Table2 Influence of influent composition on the presence of phthalate-degrading bacteria

Band	Composition of Influent		
	TP+IP	TP	IP
a	+	+	+
b	+	+	—
c	+	+	+

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Influent	T,I	T,I	T	T	T	I	I	I	T	T	T

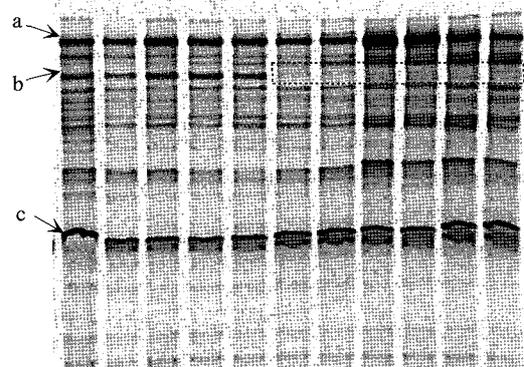


図4 原水組成の変化にともなう細菌群集の変化  
Fig.4 Changes of bacterial communities following the changes of influent composition

は見られなかったが、7日目にバンドbが消失した(レーン6)。また、一度消失したバンドbは、廃水組成をテレフタル酸に戻しても復活しなかった(図4レーン9—11, 表2)。

今回の実験は、フタル酸を唯一の炭素源とする廃水でUASB反応器を立ち上げた。したがって、種汚泥やフタル酸分解活性のない汚泥には見られず、分解活性を有する汚泥に特異的に出現するバンド(細菌)がフタル酸の資化、すなわち、分解に関与しているものと考えられる。

今回の結果から、テレフタル酸とイソフタル酸の分解には、少なくとも3種類の細菌が関与しており、その内2種(aとc)は、両物質の分解に関与しており、残り1種(b)はテレフタル酸だけの分解に関与していることが示唆された。

## むすび

最新の分子生物学的手法であるRT-PCR-DGGEをもちいることにより、今まで未知であったフタル

酸処理UASB装置内のフタル酸分解菌を特定することができた。今回えられた情報は、従来の運転管理方法に加え、微生物学的側面からの運転管理指標を提供するものであり、フタル酸処理装置のより適切で安定な運転管理が可能になるものと期待される。

## [参考文献]

- 1) R. I. Amman et al., Microbiol. Rev., 59 (1995), p.143
- 2) R. R. Colwell et al., Bio/Technol., 3 (1985), p.817
- 3) R. K. Saiki et al., Science, 230 (1985)
- 4) R. I. Amann et al., Microbiol. Rev., 59 (1995), p.143
- 5) G. Muyzer et al., Appl. Environ. Microbiol., (1993), p.695
- 6) M-Y. Tur et al., J. Environ. Engin., 123 (1997), p.1 093
- 7) R. Kleerebezem et al., Appl. Environ. Microbiol., 65 (1999), p.1 161
- 8) J-H. Wu et al., Microbiology, 147 (2001), p.373
- 9) L.Φvreas et al., Appl. Environ. Microbiol., 64 (1997), p.3 367

## 連絡先

---

赤 司 昭 技術開発本部  
(医学博士) 研究開発部  
第5研究室  
主任研究員  
T E L 078 - 992 - 6525  
F A X 078 - 992 - 6510  
E-mail a.akashi@pantec.co.jp