

活性汚泥へのフェノール添加による 汚泥沈降性の改善と細菌群集の解析

Improvement of Activated Sludge Settability by Phenol Addition and the Analysis of Bacterial Community



(技)研究開発部第5研究室 昭
赤 司
Akira Akashi

活性汚泥にフェノールを添加することによる汚泥沈降性の改善と細菌群集の変化を解析した。曝気槽へ低濃度のフェノール（50 mg/L）を添加することにより、汚泥の沈降性が改善されるとともに、処理水の水質も向上した。汚泥の沈降性は、フェノールの添加を停止した後約2週間維持された。活性汚泥の沈降性の向上に関与するとされる *Zoogloea ramigera* はフェノール等の芳香族化合物で増殖が促進されることが知られているが、フェノール添加後の活性汚泥からPCR（Polymerase Chain Reaction）によって本細菌を検出することはできなかった。変性剤濃度勾配電気泳動（DGGE）解析および制限酵素断片多型（RFLP）解析の結果、フェノール添加前後で活性汚泥の細菌群集が大きく変化していることが明らかになった。したがって、フェノール添加による汚泥沈降性の改善は、*Z. ramigera* の増殖（優先化）によるものではなく、これら細菌群が関与していると推察された。

The effect of phenol on the settability of activated sludge was analysed. Phenol was added to aeration tank to provide an initial concentration of 50 μ g/ml for monitoring SVI and the quality of effluent. SVI of activated sludge began to decrease from one week after and reached the minimum two weeks after addition of phenol. With the improvement of sludge settability, the quality of effluent also improved. Settability of activated sludge was maintained satisfactorily for two weeks after stopping phenol addition. *Zoogloea ramigera* is known to propagate with the help of aromatic compounds such as phenol and has the ability to settle bulking sludge. But the bacteria were not detected by PCR in phenol-treated activated sludge. This result indicates that the improvement of activated sludge settability was not due to the growth of *Z. ramigera*.

Key Words :

活性汚泥法	Activated sludge process
汚泥沈降性	Sludge settability
細菌群集	Bacterial community
ポリメラーゼ連鎖反応	Polymerase chain reaction
変性剤濃度勾配電気泳動	Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)
制限酵素断片多型	Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

まえがき

活性汚泥法は、設備や運転費用が安価で、かつ、良好な処理水がえられることから、有機性廃水の処理方法として広く採用されている。しかし、汚泥管理、とくに、沈殿槽での固液分離を常に良好に保持することはしばしば困難をとまなう。汚泥の沈降性が悪化すると、SSが処理水中に流出し、処理水質が悪化して放流基準を満足できなくなるばかりでなく、曝気槽のMLSS濃度の維持が困難になり活性汚泥の運転そのものが維持できなくなることにものかねない。つまり、活性汚泥法の運転管理者にとって、汚泥管理は活性汚泥運転上もっとも重要な管理項目であり、簡単かつ安価に汚泥の沈降性を改善する方法が提供できれば、この問題の解決に大きく貢献できるものと考ええる。

活性汚泥が良好な沈降性を発揮するためには安定なフロックを形成することが重要であり、その役割は、*Zoogloea* 属細菌に代表される凝集性細菌、すなわち、フロック形成細菌が果たしているといわれている。¹⁾ われわれは、活性汚泥に少量のフェノールを添加することにより、汚泥の沈降性が著しく改善されることを見いだした。本稿では、フェノールが汚泥の沈降性におよぼす影響とフェノール添加前後の細菌群集の解析結果について報告する。

1. 材料・方法

1.1 活性汚泥の運転

下水処理場から採取した活性汚泥を種汚泥とした。また、合成廃水（グルコース1.6 g/L、ペプトン1 g/L、酵母エキス0.5 g/L）を原水として表1に示す条件で運転した。

1.2 フェノールの添加と汚泥沈降性の評価

上記条件で約2年間運転された活性汚泥に最終濃度50 mg/Lとなるようにフェノールを断続的に供給した。汚泥沈降性はSVIにより、²⁾ また、処理水質はSSおよびTOCにより評価した。

1.3 PCRによる *Zoogloea ramigera* の検出

フェノール添加2週間前とフェノール添加開始後2週間目（汚泥沈降性が最良であった）の活性汚泥から精製したDNAを鋳型にしてLuら³⁾のプライ

マーセットをもちいて検出した。

1.4 細菌群集の解析

フェノール添加前後の細菌群集の変化は、PCR-DGGE法⁴⁾ならびに、RFLP⁵⁾により解析した。

1.4.1 PCR-DGGE法

フェノール添加前後の活性汚泥を定期的にサンプリングし、Zhuらの方法⁶⁾によりDNAを精製した。このDNAを鋳型として、真性細菌に特異的なプライマーセット（PRBA338fとPRUN519r）⁷⁾をもちいたPCRにより、16SrRNA遺伝子のV3領域を増幅した。PCR産物は、35～50%の変性剤濃度勾配の8.0%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した。

1.4.2 RFLP

1.4.1のDNAを鋳型として、真性細菌に特異的なプライマーセット（27fと1492r）⁸⁾をもちいたPCRにより、16SrRNA遺伝子のほぼ全領域を増幅した。PCR産物をMinElute PCR Purification Kit（Qiagen, Tokyo）をもちいて精製後、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit（Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA）をもちいてクローニングし、大腸菌を形質転換した。任意に選出した形質転換体64ヶからQIAprep Spin Miniprep Kit（Qiagen, Tokyo）をもちいてプラスミドを精製した後、このプラスミドを鋳型として上記プライマーセットをもちいて16SrRNA遺伝子を増幅した。PCR産物は上記精製キットをもちいて精製した。このPCR産物を制限酵素HaeIII、HhaI、および、HpaIIで別々に切断した後、その一部をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、制限酵素切断パターンを比較した。

1.4.3 BLAST 相溶性検索

RFLP解析で、フェノール添加前後で個体数に変化が見られたクローンについては、16SrRNA遺伝子の塩基配列を決定し、データベース上でBLASTホモロジー検索（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）をおこない、既知の細菌との相溶性を比較した。

2. 結果と考察

2.1 フェノール添加による活性汚泥の沈降性と処理水質の改善

曝気槽に50 mg/Lになるようにフェノールを添加し、フェノール添加による活性汚泥の沈降性、および、処理水質におよぼす影響を調べた。図1にフェノール添加前後のSVIと処理水のSS濃度、および、TOC濃度の経時変化を示す。フェノール添加前の活性汚泥のSVIは150～180の範囲で推移したが、フェノール添加開始7日目からSVI値の有意な減

表 1 活性汚泥の運転条件

Table1 Operational condition of activated sludge process

MLSS (mg/L)	5 000
TOC-SS Loading (kg/kgSS・d)	0.1
HRT (d)	2
Temperature (°C)	25±1

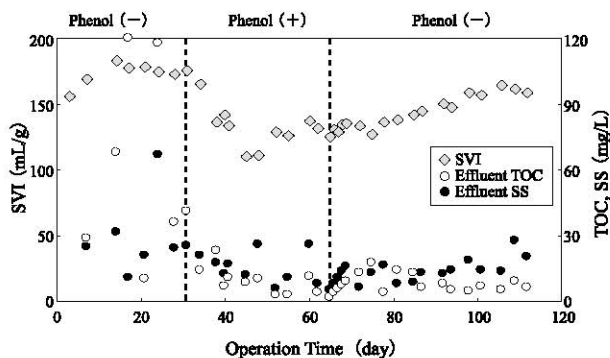


図 1 活性汚泥の SVI と処理水質の経時変化
Fig.1 Changes of SVI of activated sludge and quality of effluent

少が認められ、2週間後に最小の110まで低下した。その後も130前後で推移し、良好な汚泥沈降性が維持された。また、汚泥沈降性の改善に伴い処理水質 (SS, TOC) も改善された。とくに、フェノール添加による処理水 SS 改善効果は著しく、フェノール添加前は沈殿槽からの汚泥の流出がしばしば観察されたが、フェノール添加後は汚泥の流出は認められず、低濃度で安定に維持された。

次に、フェノール添加を停止し、SVI と処理水質の変化を観察した。フェノール添加停止後約2週間 SVI は約130で沈降性は良好に保持されたが、その後徐々に増加し、1ヶ月後にはフェノール添加前の150~180の範囲に戻った。

以上のように、活性汚泥に低濃度のフェノールを添加することで簡単に汚泥沈降性と処理水質を改善することができた。また、フェノール添加停止後も少なくとも2週間は良好な汚泥沈降性と処理水質が維持できることが確認された。

2.2 *Zoogloea ramigera* の検出

活性汚泥の沈降性が良好であるためには、活性汚泥がフロックを形成する必要がある。フロック形成には、*Zoogloea* 属細菌等のフロック形成細菌が関与していることが知られている。¹⁾ また、*Zoogloea* 属細菌はフェノールによりその増殖が促進されることが知られている。³⁾ そこで、活性汚泥にフェノールを添加することによる活性汚泥の沈降性の改善が、*Zoogloea* 属細菌の増殖 (優先化) によるものか否かを解析するため、フェノール添加前後の活性汚泥中の *Z. ramigera* を PCR により検出した (図2)。

下水処理場活性汚泥 (レーン4) とフェノール添加2週前 (レーン2) の活性汚泥には、*Z. ramigera* の16SrRNA 遺伝子に相当する約600 bp の明確なバンドが検出されたが、フェノール添加2週

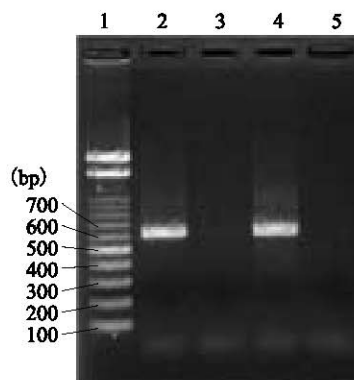


図 2 PCR による *Zoogloea ramigera* の検出
Fig.2 Detection of *Zoogloea ramigera* by PCR

Lane1:100bp ladder size marker
2:DNA-activated sludge before addition of phenol
3:DNA-activated sludge after addition of phenol
4:DNA-municipal wastewater treatment plant
5:Negative control.

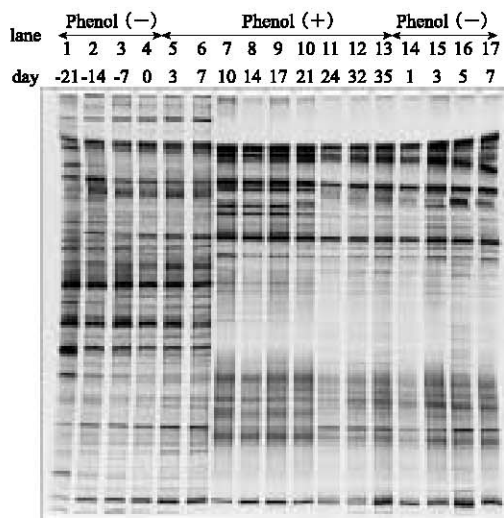


図 3 フェノール添加前後の活性汚泥の PCR-DGGE 解析
Fig.3 PCR-DGGE analysis of eubacterial communities before and after phenol addition

後 (レーン3) の活性汚泥からは、本菌は検出されなかった。したがって、フェノール添加による汚泥沈降性の向上は、*Z. ramigera* の増殖によるものではなく、別の要因によると推察された。

2.3 フェノール添加前後の細菌群集の解析

2.2の実験により、フェノール添加による汚泥沈降性の向上は、フロック形成細菌である *Z. ramigera* の増殖 (優先化) によるものではなく、別の要因によることが推定された。そこで、フェノール添加前後の細菌群集を解析することによりその要因を考察した。

2. 3. 1 PCR-DGGE 法による解析

図3にフェノール添加前、添加中、および、添加停止後の細菌群集の経時変化を解析した結果を示す。フェノール添加前（レーン1～4）は、各サンプル共約25本の主要なバンド（細菌種）が見られた。また、そのパターンはほとんど変化せず、細菌群集はほぼ一定に保持されていた。レーン5～13にフェノール添加中の群集変化を示す。フェノール添加開始後7日間は細菌群集に明確な変化は観察されなかったが、10日目以降大きな変化が認められ、細菌種によって消失（個体数の減少）するもの、あるいは、増加する種が認められた。また、フェノールの添加を停止した後少なくとも1週間はフェノール添加中の汚泥と同じパターンを示し、細菌群集に変化は認められなかった。

2. 3. 2 RFLP による解析

DGGE 解析により、フェノール添加前の活性汚泥とフェノール添加により汚泥の沈降性が改善された活性汚泥では細菌群集が大きく異なることがわかった。そこで、各細菌の菌数の比較をより定量的におこなうため、RFLP 解析を実施した。RFLP 解析は、フェノール添加2週間前の活性汚泥ともっとも沈降性が良好であったフェノール添加開始2週間後の汚泥で比較した。

制限酵素 HaeIII, HhaI, および, HpaI の切断パターンにより分類した結果を図4に示す。フェノール添加前の汚泥中の細菌は25グループ（ribotype）に分類された。それらの中で、ribotype1に属するクローンは、解析した64クローン中18クローン（全体の28.1%）、また、ribotype2に属するクローンは、

全体の12.5%を占め、フェノール添加前の活性汚泥ではこれらのクローンに相当する細菌が優先していることが示唆された。一方、フェノール添加開始2週間後の汚泥からは16グループ（ribotype）の細菌が検出され、フェノール添加前にくらべ、ribotype数（細菌の種類数）が減少していた。これは、フェノール（50 mg/L）によりそれらの増殖が抑制されたためと推察される。フェノール添加後の汚泥の細菌群集は、添加前のそれにくらべ大きく変化していた。フェノール添加前に優占種であった ribotype1 に属する細菌は減少し、代わって ribotype2 に属する細菌が優占種になり全体の42.2%を占めた。同様に、ribotype10, 26～33に属する細菌がフェノール添加前にくらべ増加した。一方、ribotype3, 4, 7, 8, 9, 11～13, および、15～25に属する細菌はフェノール添加前にくらべ減少した。

2. 3. 3 16SrRNA 遺伝子の相同性解析と細菌の同定

RFLP 解析の結果フェノール添加前後で個体数に差異が認められた ribotype に属する細菌が活性汚泥の沈降性に関与している可能性がある。そこで、これらの細菌の16SrRNA 遺伝子の配列を決定し、データベース上で既存の細菌の16SrRNA 遺伝子との相同性解析（BLAST 検索）を実施し、細菌の同定をおこなった。表2に相同性解析結果を示す。

フェノール添加前の活性汚泥で優占種であったが、フェノール添加後に減少した ribotype1 に属する細菌は、uncultured γ -proteobacterium と96%の相同性を示した。同様に、フェノール添加により劣勢になった ribotype3, 7, 8 および 9 に属する細菌は、それ

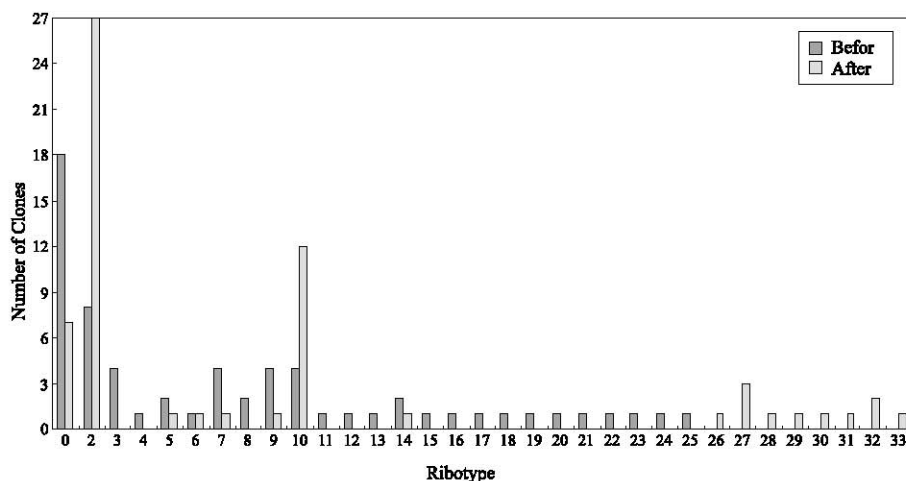


図 4 フェノール添加前後の活性汚泥中の真性細菌群集の RFLP の比較

Fig.4 Comparison of RFLP of eubacterial communities before and after phenol addition

表 2 フェノール添加前後の活性汚泥の主要細菌の BLAST 検索

Table2 BLAST homology analysis of eubacteria in activated sludge before and after phenol addition

Ribotype	Most Closely Related Bacterial Seq.	% Identity
1	Uncultured Gamma Proteobacterium	96
2	Uncultured Gamma Proteobacterium	94
3	Uncultured Bacteria Clone F2-30	97
7	Uncultured Bacterium Clone KD5-58	93
8	Uncultured Bacteria Clone F2-38	96
9	<i>Methylocystis</i> sp. KS7	98
10	Uncultured Bacterium Clone RB13C10	97
27	<i>Lysobacter Enzymogenes</i>	95
32	Uncultured Eubacterium WD243	94

ぞれ uncultured bacteria clone F2-30, uncultured bacteria clone KD5-58, uncultured bacteria clone F2-38および *Methylocystis* sp. KS7と97, 93, 96, 98 %の相同性を示した。一方, フェノール添加により最優占種になった ribotype2に属する細菌は, uncultured γ -proteobacteriumと94 %の相同性を示した。同様に, 第2優占種である ribotype10に属する細菌は, uncultured bacterium clone RB13C10と97 %の相同性を示した。

前述のように活性汚泥の沈降性は, 汚泥のフロック形成能と密接に関連している。汚泥のフロックは, フロックを形成する細菌とフロック形成細菌のフロック形成を阻害する細菌の相互作用により形成される

といわれている。相同性検索では, フェノール添加前後で個体数に変化が見られた細菌がフロック形成にどのような役割を果たしているかまでは推定できなかった。

む す び

少量のフェノールを曝気槽に直接投入することにより短期間で効率よく汚泥の沈降性を向上させ, かつ, 処理水質を改善させることに成功した。前述のように, 活性汚泥法にとって沈殿槽での固液分離を良好に維持することはきわめて重要な運転管理項目である。本法はきわめて簡単な方法で実施可能であるため, 汚泥沈降性の悪化した活性汚泥処理設備の改善に貢献しうるものと確信する。

[参考文献]

- 1) Bitton, G. : In Wastewater Microbiology (1994) p.192, Wiley-Liss, New York
- 2) 下水道試験方法 上巻 1997年版, p.272, 日本下水道協会
- 3) Lu, F., et al. : Wat. Res., 35, p.4 011
- 4) Muyzer, G., et al : Appl. Environ. Microbiol., 59 (1993) p.695
- 5) Moyer, C. L. : Appl. Environ. Microbiol., 60 (1994) p.871
- 6) Zhu, H., et al. : Nucleic Acids Res., 21 (1993) p.5 279
- 7) Φvreas, L., et al. : Appl. Environ. Microbiol., 64 (1997) p.367
- 8) 有馬 啓, 田村学造 (編) : 生物による環境浄化 (1980) p.21, 東京大学出版会

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 - 6504
E-mail a.akashi@pantec.co.jp