

貧栄養条件下にある浄水処理プロセス内の微生物群集解析

北海道大学大学院 学生会員 ○志水豊晴 荏原製作所 非会員 山川岳志
北海道大学大学院 正会員 岡部 聡 フェロー 渡辺義公

1.はじめに

水道水中の異臭味や消毒副生成物、処理過程で塩素要求量を増大させるアンモニア性窒素、配水管内の細菌の二次増殖ポテンシャルを抑制する効果があるとして、近年、浄水システムにおける生物分解プロセスの重要性が再認識されてきており、生物活性炭や膜処理を併用した生物処理プロセスが試みられている。しかしながら、そのような生物処理プロセス内において実際に処理を担う微生物群集に関する知見は皆無である。これは、浄水処理プロセスが貧栄養条件下にあり、そのような環境中に生息する微生物に対しては、従来のような培養に基づく手法での解析が困難なためである。そこで本研究では16S rDNA クローン解析に基づいて分子生物学的手法を導入し、培養を介さずに浄水処理プロセス内の微生物群集を解析することを試みた。

具体的には、北海道のような寒冷地では冬期の水温の低下に伴い、アンモニア性窒素の処理性が低下する問題が指摘されている。そこで異なる水温条件下におけるアンモニア酸化細菌群の菌相を比較し、水温の変化とアンモニア酸化細菌の菌相との関係の把握を試みた。また、トリハロメタンの前駆物質であるフミン質や臭気物質などの分解能を持つ有用な細菌の探索を試みた。

2.実験方法

対象としたのは、江別市上江別浄水処理場内に設置したパイロットスケールの回転平膜装置 (Biofilm-Membrane Reactor: BMR) 及び生物活性炭塔 (Biological Activated Carbon: BAC) である。それぞれ前処理としてポリ塩化アルミニウムによる凝集沈殿処理を行っている。回転平膜装置の槽内には両面にポリスルホン製 UF 膜を貼り合わせた直径 750 mm、総面積 4.5 m² の数枚の円形ディスクが設置されており、この分離膜表面に微生物を固定することで、膜処理と生物処理とを単一反応槽内で同時に行っている。膜透過水フラックスを 0.5 m/d、膜回転数を 20 rpm に設定して運転を行った。生物活性炭塔は内径 500 mm の円筒状で、内部に有効径 0.7 mm の石炭系粒状活性炭を充填しており、ろ過速度 120 m/d、空筒接触時間 20 分に設定し、2 日に 1 回の頻度で逆流洗浄を行った。

サンプルには Fig. 1 と Fig. 2 に示すように、硝化が良好に行われていた水温が 10℃以上の時期 (高水温期) 及びアンモニア性窒素の処理性が低下していた水温が 10℃以下の時期 (低水温期) において、回転平膜装置の UF 膜表面に形成された生物膜及び生物活性炭塔の逆流排水をそれぞれ採取したものをを用いた。ただし、回転平膜装置においては低水温期にリン酸二水素カリウムをリン換算で 0.05 mg/L となるように

槽内に直接添加することによって、アンモニア性窒素の処理性の回復が見られたため、この時期に採取したものを低水温期のサンプルとした。

DNA 抽出用キット (BIO101) を用いて、採取したそれぞれのサンプルから全 DNA を抽出し、PCR によって目的とする領域のみを選択的に増幅した。PCR には、アンモニア酸化細菌の系統解析ではプロテオバクテリア β -サブクラスに属するアンモニア酸化細菌に特異的なプライマーセット CTO を、一般細菌の系統解析では真正細菌全般を対象とするプライマーセット 341F 及び 907R を用いた。大腸菌を用いて増幅産物をクローニングした後、約 500bp の塩基配列を決定し、近隣結合法を用いて系統樹を作成した。

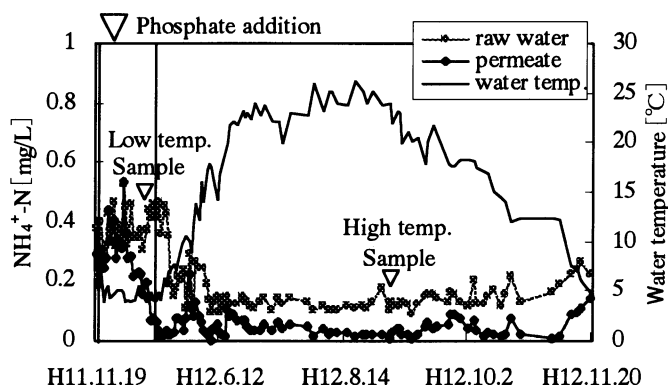


Fig. 1 Changes in $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentrations and water temperature in BMR permeate.

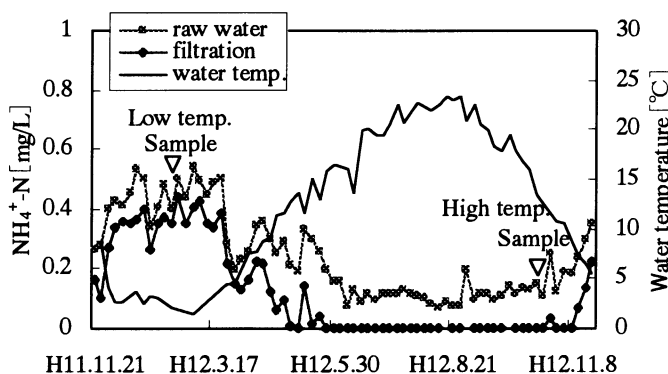


Fig. 2 Changes in $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentrations and water temperature in BAC effluent.

3.結果と考察

3.1 アンモニア酸化細菌の系統解析

Stephen ら¹⁾ (1996) の方法に基づき、系統解析によって得られたクローンを A-E の 5 つのグループに分類した。どちらの処理系においても、高水温期には下水中で一般に検出される *Nitrosomonas eutropha* と *Nitrosomonas europaea* に近縁なグ

Keywords: 貧栄養環境、浄水処理プロセス、16S rDNA クローン解析、アンモニア酸化細菌

連絡先: 北海道大学大学院工学研究科 都市環境工学専攻 環境衛生工学講座 水質変換工学分野

〒060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目 TEL: 011-706-6266

ループ D や、貧栄養条件下でよく検出される *Nitrosomonas ureae* に近縁なグループ B に属するクローンが比較的多く検出されたのに対し、低水温期には逆に *Nitrosomonas ureae* と同様に一般に貧栄養条件下で検出される *Nitrospira* sp. に近縁なグループ C に属するクローンが多く検出され、高水温期と低水温期とではアンモニア酸化細菌の菌相に違いが見られた。さらに、未同定のグループ A や E に属するクローンも数多く検出され、貧栄養環境中には未知のアンモニア酸化細菌が存在していることが示唆された。また、リンの添加の有無に拘わらず両処理系の低水温期の菌相が似ていたことから、この菌相の変化はリンの添加によって生じたのではなく、水温の変化に起因していることが示された (Table 1)。また、回転平膜装置ではリンの添加によりアンモニア酸化細菌の活性が維持され、アンモニア性窒素の処理性が回復したものと考えられる (Fig. 1)。

3.2 一般細菌の系統解析

様々な細菌と近縁なクローンが検出されたがその多くが未同定であり、貧栄養環境中にはその生理学的特性が把握されていない未知の細菌が数多く存在していることが示唆された。また、フミン質の分解能を持つと思われる *Humic substance enrichment clone* と比較的高い相同性 (96%) を示すクローンが検出された (Table 2)。さらに、回転平膜装置内では高水温期には溶解性のマンガンの良好な除去が行われており (除去率約 90%)、マンガンの酸化能を有する細菌も存在している可能性が考えられる。

3.3 浄水処理プロセス内の *Nitrospira*

一般細菌の系統解析において、亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira* に近縁なクローンが最も多く検出されたため、系統樹を作成した (Fig. 3)。これまで一般的な亜硝酸酸化細菌だと言われてきた *Nitrobacter* は検出されず、このプロセス内では *Nitrospira* が主に亜硝酸の酸化を担っていることが示唆された。また、本研究で検出されたクローンは、廃水処理プラントから検出された新種の *Nitrospira* だと思われる 20-8-31 とは異なるグループを形成しており、淡水の水族館で検出された *Nitrospira* sp. clone 710-9 により近縁であった。

4. 結論

浄水処理プロセス内のアンモニア酸化細菌の菌相は水温の変化に伴って変化することが示された。また、浄水処理プロセス内には多くの未知の細菌が生息しており、その中にはフミン質などの分解能を持つ浄水処理プロセスにおいて有用な細菌が数多く存在している可能性が示唆された。しかしながら、浄水処理プロセス内の細菌の多くは未同定であり、浄水処理プロセスを改善し、処理効率の向上を目指すためには、このような細菌を単離・同定し、生理学的特性を把握することが今後の課題として挙げられる。また、なぜリンの添加によってアンモニア酸化細菌の活性が維持されるのかを検討する必要がある。

参考文献

- 1) Stephen et al. 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62, 4147-4154

Table 1 Numbers and detection frequency of the clones recovered.

	Closest relative	BMR		BAC	
		High temp.	Low temp.	High temp.	Low temp.
A	<i>Unidentified beta proteobacterium clone Vm5</i>	4	20	9	4
		11%	50%	25%	15%
B	<i>Nitrosomonas ureae</i>	3	0	19	0
		8%	0%	53%	0%
C	<i>Nitrospira</i> sp.	0	15	1	6
		0%	38%	3%	23%
D	<i>Nitrosomonas eutropha</i> <i>Nitrosomonas europaea</i>	23	0	3	0
		64%	0%	8%	0%
E	<i>Uncultured freshwater bacterium LD28</i>	4	4	3	15
		11%	10%	8%	58%

Table 2 Phylogenetic affinities of the clones recovered.

Clone	16S rDNA identification (closest relative)	Sequence similarity
Gen-08	<i>Uncultured bacterium KF-JG30-B3</i>	91%
Gen-12	<i>uncultured bacterium SJA-62</i>	97%
Gen-16	<i>Humic substances enrichment clone (Proteobacteria; β-subdivision)</i>	96%
Gen-33	<i>Proteobacterium</i> sp.	93%
Gen-41	<i>Beta proteobacterium F1021 (Proteobacteria; β-subdivision)</i>	93%
Gen-42	<i>Unidentified eubacterium clone BSV03</i>	93%
Gen-43	<i>Metal-contaminated soil clone (Proteobacteria; α-subdivision)</i>	93%
Gen-47	<i>Agricultural soil bacterium</i>	93%
Gen-56	<i>Sphingomonas aromaticivorans (Proteobacteria; α-subdivision)</i>	97%

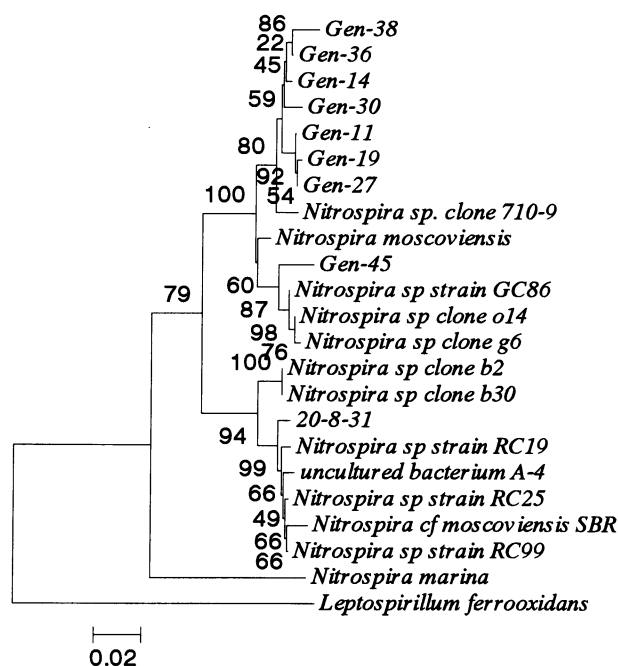


Fig. 3 Phylogenetic dendrogram among the phylum *Nitrospira* and the *Nitrospira*-like clones recovered by other research, showing the phylogenetic position of the clones recovered by our research.