

インドで稼働中の実証規模下水処理 DHS リアクターの微生物群集構造解析

東北大学工学部建築社会環境工学科 学生会員 ○立花真
東北大学大学院工学研究科 正会員 井口晃徳、久保田健吾、原田秀樹
木更津工業高等専門学校 正会員 大久保努
インド工科大学ルーキー校土木工学科 非会員 Absar A. Kazmi

1. はじめに

DHS (Down-flow Hanging Sponge) 技術は、汚泥保持担体としてスポンジを用いた好気性排水処理技術である。本技術は人為的な曝気操作を必要としないため、活性汚泥法と比較して省エネルギーであり、途上国に適用可能な下水処理プロセスとして注目されている。国内で実施した研究の結果、本技術を UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) 法の後段処理として用いることで、活性汚泥法と同程度の有機物・アンモニア除去能を示すことが明らかになっている。また、本研究グループは、インドの下水処理場に DHS リアクターを建造し、現地のプラクティカルな条件の下で実証試験を行っている¹⁾。結果、本技術の優れた処理性能は実証試験においても示され、今後途上国での本格的な適用（実規模レベルでの適用）が計画されている。本研究では、インドに設置された実証規模 DHS リアクターの生物学的処理メカニズムを明らかにすることを目的に、実証規模 DHS リアクターの保持汚泥内微生物群集構造を 16S rRNA 遺伝子クローン解析により明らかにした。

2. 実験方法

2.1 実証規模 DHS リアクター

本研究で使用した DHS リアクターの概要図と DHS 担体を図 1 に示す。本 DHS リアクターは、インド・カルナール市下水処理場内に設置されており、DHS 反応部は直径 5.5 m、高さ 5.31 m、有効容積 126 m³ の円筒型コンクリート製で下部には沈殿池が設置されている。DHS 反応部は高さ方向 6 段で構成されており、中央の仕切りを隔てて第 3 世代型 (G3) と第 6 世代型 (G6) の DHS スポンジ担体が半分ずつ充填されている。当該下水処理場の UASB 処理水の一部を DHS リアクターに流入させ、処理水量 1000 m³/d (スポンジ容積基準の HRT 1 時間) で運転が行われている。現在までに運転 468 日が経過しており、運転開始からの本リアクターの平均 BOD 除去率は 95% で、平均アンモニア除去率は 82% であった。DHS リアクターの運転条件と DHS 流入水の水质特性を表 1 に示す。

2.2 DHS 汚泥のサンプリング

DHS 保持汚泥は、リアクターの最上段（一段目）から最下段（六段目）までのスポンジ担体を採取し、これらのスポンジから搾取した汚泥を使用した。サンプリングは G3 型担体・G6 型担体それぞれについて、運転開始 118 日目（冬期）と 227 日目（夏期）の 2 回に分けて行った。

2.3 クローン解析

DHS リアクター高さ方向及び季節による微生物群集構造の変化を調べるため、一段目、三段目、五段目の G3 型・G6 型担体汚泥計 12 サンプルの試料についてクローン解析を行った。汚泥からの DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating (ニッポン・ジーン) を用いて行った。PCR 法は、バクテリアの 16S rRNA 遺伝子に特異的な Eub338mixf-Univ1500r プライマーセットを用い、反応

試薬には AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied biosystems) を用いた²⁾。PCR 反応は既報に基づいて行った²⁾。増幅させた PCR 産物を MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した後、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いてクローニングを行った。12 種類の汚泥に対し、バクテリア 100 クローン程度を採取し、クローンライブラリを作成、シーケンスプライマーに Univ907r を用いて、各クローンの 500 塩基ほどの遺伝子配列を解読した。得られた遺伝子配列情報は系統解析ソフト ARB を用いて、近縁種の推定を行った。

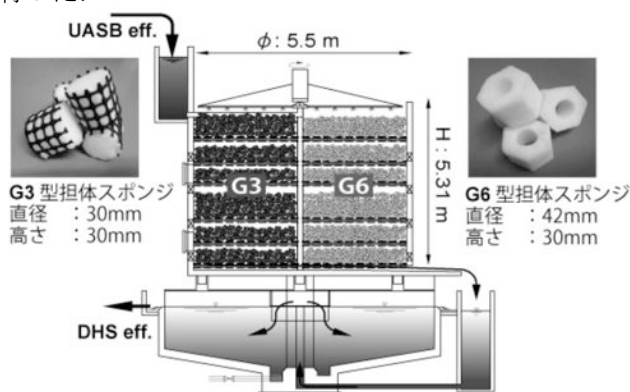


図 1 DHS リアクターの概要図と汚泥保持担体

表 1 DHS リアクターの運転条件と DHS 流入水特性

DHSリアクターの運転条件 (処理水量:1000m ³ /d)				
想定される季節	夏期 ^{a)}		冬期 ^{a)}	
スポンジ担体型式	G3型	G6型	G3型	G6型
DHS流入水平均温度	31.1	31.1	18.5	18.5
平均COD容積負荷 (kgCOD/m ³ ・day)	3.77	4.04	2.62	2.81
平均COD汚泥負荷 (gCOD/gVSS・day)	0.618	0.662	0.595	0.540
COD平均除去率 (%)	90.0	89.5	94.5	93.6
平均BOD容積負荷 (kgBOD/m ³ ・day)	1.43	1.53	0.86	0.92
平均BOD汚泥負荷 (gBOD/gVSS・day)	0.234	0.251	0.154	0.177
BOD平均除去率 (%)	94.5	94.6	96.4	96.1
SS平均除去率 (%)	97.3	97.4	97.0	96.5
TN平均除去率 (%)	11.9	10.1	43.5	30.4
DHS流入水特性				
平均COD濃度 (mg/L)	159		187	
平均BOD濃度 (mg/L)	59		63	
SS (mg/L)	55		69	
VSS (mg/L)	44		50	
pH	7		7	
SO ₄ -S (mg/L)	1~7		1~8	
NH ₄ -N (mg/L)	23		35	
TN (mg/L)	35		41	

a) 夏期:DHS流入水温が30.0℃以上である期間
冬期:DHS流入水温が20.0℃以下となる期間

キーワード 下水処理, Down-flow Hanging Sponge (DHS), 微生物群集構造解析

連絡先 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06 東北大学工学部建築社会環境工学科 環境保全工学研究室

3. 実験結果

3.1 バクテリア門レベルでの分類による比較

12 種類の汚泥に対し、バクテリア 100 クローン程度をそれぞれのサンプルについて解析した（図 2. 本原稿では 10 サンプルについて報告）。図中のサンプル名は、リアクターの最上段（一段目）から採取した G3 型担体を「G3-1」と示す。実験の結果、DHS 汚泥からは、門レベルで多岐に渡る多様なクローンが数多く検出された。季節による比較をした場合、夏期の汚泥試料は冬期と比較して多様性に富み、 α -*proteobacteria* 綱、 β -*proteobacteria* 綱、 γ -*proteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門に属するクローンが比較的高い頻度で検出された。一方、冬期の汚泥試料は夏期と比較して多様性に乏しく、 γ -*proteobacteria* 綱、*Firmicutes* 門に属するクローンが優占的に検出された。DHS リアクターの高さ方向で比較をした場合、処理が進むにつれて γ -*proteobacteria* 綱に属するクローンの検出頻度が減少し、一方で α -*proteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門に属するクローンの検出頻度が増加する傾向が得られた。アンモニア酸化に参与する *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* に近縁なクローンは両保持汚泥の最上段（一段目）から検出されており、亜硝酸酸化に参与する *Nitrospirae* 門に属するクローンは、G3 型担体の保持汚泥全てから検出された。またスポンジ担体別で比較した場合、微生物コミュニティの違いはほとんど見られなかった。

3.2 ファイロタイプでの分類による比較

ファイロタイプとは遺伝子配列のタイプによって生物群を分類・同定する概念である。遺伝子配列の相同性 97%以上のものを同一のファイロタイプとして分類したところ（表 2）、本実験の汚泥試料から検出されたファイロタイプの数は 25-73 ファイロタイプであった。Chao1 や ACE による統計解析を行った結果、検出される推定ファイロタイプ数は 71-327 ファイロタイプであり、季節・高さ方向によって大きな差が生じた。解析したクローン数が汚泥内に存在する全てのファイロタイプをどれくらい網羅できているのかを示す Coverage を算出した結果、冬期汚泥試料は全てのファイロタイプの 7-8 割を網羅していたのに対して、夏期汚泥試料は半分以上未検出のファイロタイプがあった。また、種の均等性を示す Evenness index から、冬期汚泥試料は特定のファイロタイプが優占して存在し、夏期汚泥試料は多様なファイロタイプが均等に存在している事が

分かった。検出されたファイロタイプの中でも *Pseudomonas* 属の検出頻度が特に高く、その割合が冬期汚泥試料で高い事から、冬期 DHS リアクターの排水処理メカニズムにおいて *Pseudomonas* 属が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

4. まとめと今後の予定

実証規模 DHS リアクターの微生物群集構造を、季節・リアクター高さ方向・担体の種類別に明らかにした。今後は DHS リアクターの基軸方向における水質プロファイルとの比較を行い、本 DHS リアクターの生物学的微生物処理メカニズムを明らかにする。

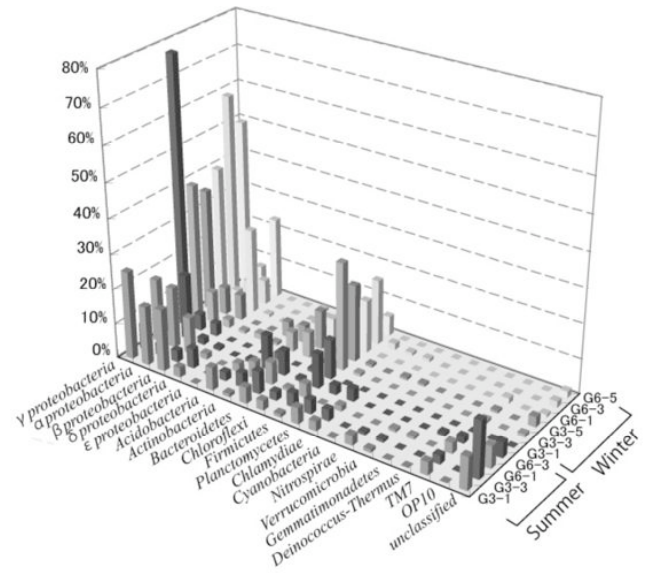


図 2 汚泥内微生物の門による分類と G3, G6 型スポンジ担体各段における検出頻度

謝辞

本研究は、JST 科学技術振興調整費の支援を受けた。ここに記して感謝します。

参考文献

1) 大久保ら, 土木学会論文集 G, vol. 64, p187-195
2) 久保田ら, 土木学会論文集 G, vol. 66, p56-64

表 2 クローン統計解析の結果

汚泥採取日	運転227日目 (夏期)				運転118日目 (冬期)					
汚泥採取日のDHS流入水温	31.1				20.0					
スポンジ担体型式	G3型		G6型		G3型		G6型			
汚泥採取段数	1段目	3段目	1段目	3段目	1段目	3段目	5段目	1段目	3段目	5段目
クローン解析数 A	110	82	100	79	107	123	136	126	112	107
Phylotype数 ^{a)}	73	71	70	56	25	45	62	42	38	29
1つのクローンにより構成されるphylotype数 B	56	62	56	42	19	28	45	25	25	19
2つのクローンにより構成されるphylotype数	9	7	10	8	2	8	7	8	8	3
Coverage ^{b)}	0.49	0.24	0.44	0.47	0.82	0.77	0.67	0.80	0.78	0.82
推定phylotype数 (Chao1)	227	307	210	152	82	87	186	75	71	72
推定phylotype数 (ACE)	227	327	250	155	80	101	199	99	77	86
Evenness index	0.86	0.95	0.87	0.89	0.33	0.63	0.71	0.61	0.83	0.54

a) 塩基配列相対性 97%以上を同一の phylotype とした
b) Coverage=1-(B/A) A: 解析クローンの総数, B:1 クローンにより構成される phylotype の総数