

下水処理プロセスにおける微生物群集構造と溶存有機物組成の関係性の解明

東北大学大学院 学生会員 ○高橋 真 正会員 久保田 健吾、李 玉友 非会員 佐藤 幹子
東京大学大学院 正会員 栗栖 太 非会員 石井 淑大

1. はじめに

下水処理において生物処理は重要な位置づけにある。微生物の代謝によって有機物を除去する下水処理方法は最も一般的であり、広く普及している。しかし、その除去機構については未だに明らかになっていない。溶存有機物（Dissolved Organic Matter, DOM）と微生物の関係性については、主に湖沼での研究がなされており、湖沼中の DOM は原生動物やバクテリアの代謝産物であることが報告されている¹⁾。このことから、下水処理においても終沈越流水の DOM は、反応槽内の微生物の代謝産物であることが考えられ、反応槽内の微生物群集構造が終沈越流水の DOM 組成に影響を与えていることが予想される。また、溶解成分以外の影響も無視できないが、初沈越流水の DOM 組成も反応槽内の微生物群集構造の形成に影響を与えていると推察され、そこから得られる知見は生物処理による有機物の除去機構解明に繋がると考えられる。しかし、これまでの下水処理における有機物の評価方法は、化学的酸素要求量(COD)、生物学的酸素要求量(BOD)、全有機炭素(TOC)で評価することが主であり、分子レベルで有機物の評価を行っている研究は少ない²⁾。そこで本研究では、国内 19 カ所の下水処理場の初沈越流水と終沈越流水を対象とし、Orbitrap 質量分析計を用いて DOM の組成を分子レベルで評価した。同時に、反応槽内の活性汚泥の微生物群集構造についても次世代シーケンサーを用いて解析を行い、DOM 組成と微生物群集構造の関係性を明らかにすることを試みた。

2. 実験方法

(1)試料の採取

国内 19 カ所の下水処理場、計 22 系列を対象として調査を行った。処理方式の内訳は、標準活性汚泥法(CAS) 12 カ所、硝化脱窒法 (ND) 5 カ所、オキシデーションディッチ法 (OD) 3 カ所、嫌気無酸素好気法 (A₂O) 2 カ所、酸素活性汚泥法 (OXAS) 1 カ所である。2018 年 6 月に各系列における初沈越流水と終沈越流水、反応槽内の活性汚泥を採取した。

(2)Orbitrap 質量分析

初沈越流水と終沈越流水の試料について、脱塩と濃縮のために前処理として固相抽出を行った。初めに、550℃で 6 時間燃焼した 0.3 μm のガラス繊維ろ紙を用いて試料をろ過した後、試料に高純度の塩酸を添加して pH 2 とした。Bond Elut PPL カラムに LC/MS 用のメタノールと超純水をそれぞれ 10 mL ずつ通水してカラムに内在する有機物を除去した後、pH 2 の超純水 1 mL を通水することで、カラム内を酸性にし、固相に有機物が吸着しやすい状態にした。その後、pH 2 に調整済みの試料をカラムに通液した。カラムを pH 2 の超純水 1 mL で洗浄した後、メタノール 1.5 mL で有機物の溶出を行った。溶出液 1.5 mL 中の 1 mL について、Orbitrap 質量分析計 Exactive を用いて分析を行った（ネガティブイオンモード、 $m/z = 100-1000$ ）。その結果について、解析ソフトウェア SIEVE を用いて解析を行った。また、溶出液の残りの 0.5 mL については、有機物の回収率を計算するため、窒素ガスを用いてメタノールを揮発させた後に超純水で再溶解して TOC を測定した。

(3)微生物群集構造解析

活性汚泥サンプルについては、DNA 抽出キット (ISOIL for Beads Beating) を用いて DNA 抽出を行った。その後、PCR を行って DNA を増幅した後、次世代シーケンサー Illumina MiSeq を用いてシーケンスを行った。微生物群集構造解析は、QIIME を用いて行った（データベース silva128）。

キーワード：微生物群集構造 溶存有機物 Orbitrap 質量分析計

連絡先：〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻
環境保全工学研究室 TEL：022-795-7463 FAX：022-795-7465

3. 実験結果及び考察

固相抽出を行った際の DOM の回収率は、初沈越流水が約 35 %、終沈越流水が約 70 %を示した。初沈越流水は含有する有機物質の種類が豊富であるため、固相に吸着されない有機物質が多いことが原因で回収率が低くなっていると考えられる。Orbitrap 質量分析を行った結果、初沈越流水と終沈越流水、それぞれに特有のマススペクトルを得ることができた。初沈越流水では主に $m/z=199.0434$ 、 171.0119 、 311.1693 、終沈越流水では主に $m/z=271.0651$ 、 257.0493 、 285.0807 の分子イオンが検出された。今のところ、検出された分子イオンから化合物の特定はできていないが、今後、分子式と構造式の推定を行って化合物を特定する予定である。マススペクトル全体の形状については処理場ごとに異なっており、DOM 組成には地域特性や処理方式の違いが影響していると考えられる。初沈越流水中 DOM の主成分分析の結果、処理場の地理的な距離関係との相関が見られる部分があった（図 1）。また、流入下水に温泉排水が含まれている処理場の DOM は、特異な性質を示した。これは、温泉排水に硫黄が多く含まれており、DOM 組成に影響を与えていることが原因の一つと考えられる。終沈越流水中の DOM 組成については、主成分分析の結果から、地域特性よりも処理方式の違いが DOM 組成に影響を与えている可能性が示唆された（図 2）。標準活性汚泥法の処理水の DOM についてはばらつきがあったが、オキシデーションディッチ法と嫌気無酸素好気法の処理水の DOM は類似性を示し、硝化脱窒法の処理水の DOM もまとまりを示した。しかし、温泉排水が流入する処理場では、初沈越流水と同様に終沈越流水の DOM も特異な性質を持つことが明らかになった。微生物群集構造解析を行った結果、22 の系列のうち 21 の系列で *Proteobacteria* 門と *Bacteroidetes* 門が優占していた。I 処理場の微生物群集構造は特異な性質を示したが、これは処理方式としてオキシデーションディッチ法を採用していることが原因であると考えられる。微生物群集構造についても主座標分析によりその類似性をみたところ、地域特性と処理方式による影響がある可能性が示唆された。

4. 結論

Orbitrap 質量分析計による分析の結果から、初沈越流水の DOM 組成は地域特性による影響を受けている可能性が示唆された。また、終沈越流水の DOM 組成は処理方式による影響を受けている可能性が示唆された。微生物群集構造については、地域特性による影響と処理方式による影響をともに受けている可能性が示唆された。今後、DOM 分析の結果と微生物群集構造解析の結果について、各処理場の処理方式の違いと地域特性の観点から評価し、比較を行うことで DOM 組成と微生物群集構造の関係性を解明していく。

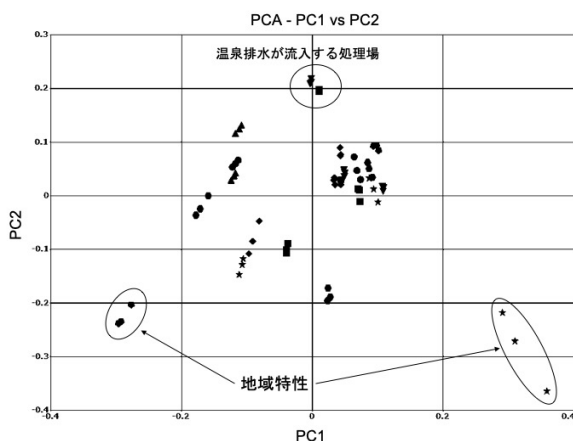


図 1 初沈越流水中 DOM の主成分分析結果

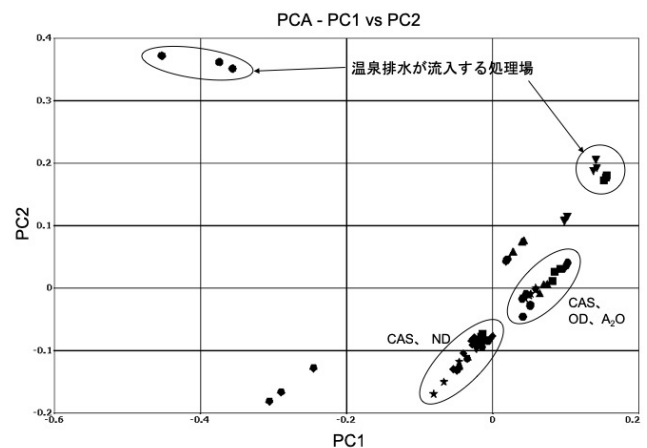


図 2 終沈越流水中 DOM の主成分分析結果

参考文献

- 1) 今井ら, 湖沼における有機物の循環と微生物生態系との相互作用に関する研究, 2012.
- 2) 中許ら, 第 46 回日本水環境学会年会講演集, P180, 2012.