

(46) 同じ下水を処理する運転方式の異なる反応槽に 保持する活性汚泥細菌叢の研究

山崎 廉予^{1*}・高島 薫²・出口 浩¹・村上 孝雄³

¹東京理科大学大学院理工学研究科土木工学専攻 (〒278-8510千葉県野田市山崎2641)

²茨城県霞ヶ浦流域下水道事務所 (〒300-0032 茨城県土浦市湖北2丁目8番地1号)

³日本下水道事業団(〒160-0004 東京都新宿区四谷3丁目3番地1号)

*E-mail: j7609702@ed.noda.tus.ac.jp

本研究では、同一処理場内の処理方式が異なる活性汚泥内細菌叢の比較を試みた。調査対象は、茨城県霞ヶ浦浄化センターにおいて、4種の高度処理法を適用している反応槽内の汚泥であり、1年間毎月1回サンプリングを行った。解析は、33種類の属レベルのプロープを用いたFISH法により行った。その結果、亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira* 属の占有率が最も高かった。その他の占有率が高い細菌には、硝化、脱窒細菌等が多く含まれていたが、処理方式によってその占有率は異なっていた。Shannon index (H')により、細菌叢の多様性指数を求め、水質との比較を行った。その結果、BOD除去率と33種類の細菌群のH'、硝酸性窒素と硝化細菌H'に一部関係性が見られた。

Key Words : FISH analysis, The bacterial community, A2O process, Modified Bardenpho process, Pre-denitrification process

1. はじめに

標準法または、それに準じた運転方式を採用している下水処理場の運転管理はMLSS, SRT, MLDO, BOD-SS負荷など様々な指標によって行われている。その中で、活性汚泥の微生物量を測定しているのは、活性汚泥(MLSS)濃度のみである。

活性汚泥は多種多様な微生物群で構成されている。各種有機物を分解する細菌、リン・窒素除去細菌、あるいはこれらを捕食する微生物など、様々な複雑に絡み合う働きの結果、活性汚泥による処理が成り立っている。そのため、活性汚泥中に存在する細菌、原生動物、後生動物といった微生物を調べることは処理能力の把握には重要であると考えられる。顕微鏡観察や、プレートカウント法などの手法を用いて、原生動物の情報や、特定の細菌に対しての管理が、しばしば行われている。

1990年代以降、分子生物学的手法が進歩し、活性

汚泥中の細菌の群集構造を調査する研究が盛んに行われてきた。細菌種を検出する手法の一つとして、FISH法がある。ドイツのWangerらはFISH法により、活性汚泥中の優占種は *Proteobacteria* 門であり、中でも β -*proteobacteria* 綱が優占種であることを明らかにした¹⁾。また、秋山らは、FISH法を用いて日本の活性汚泥中の優占種は、*Proteobacteria* 門であり、特に α -*proteobacteria* 綱、 β -*proteobacteria* 綱が優占種であると示した²⁾。Yunら³⁾、黒澤ら⁴⁾は網レベルの解析により、リン除去細菌叢の良好パターンを見出した。硝化細菌や脱窒細菌等の特異的な細菌の挙動を調べるのにも、FISH法は有効である^{5,6)}。本研究室では、処理能力を決定する細菌の群集構造の全体像を把握するため、属レベルで個々の細菌に焦点を当て、解析を行うことを試みている。

これまで、細菌種を解析するためにPCR-DGGE法、シーケンシングを行い、細菌量を解析するために

FISH 法に着目し、汚泥内の細菌叢を調査することを試みてきた。江副は、PCR-DGGE 法を用いて、T 県 M 処理場、N 処理場の汚泥中に存在する細菌の種類を調査した。その結果を用いて、30 種類の属レベルの FISH プローブを作成した⁷⁾。脱窒細菌である *Pseudomonas* 属、*Azoarcus* 属のプロープ¹¹⁾を加え、32 種類の細菌種を基準として、細菌叢の把握を行った。また、FISH 法で得られる顕微鏡写真は、画像解析を用いることで細菌量を計測する手法を提案した⁶⁾。

これらの手法を用いて筆者らは、種々の実下水処理場の反応槽に存在する細菌叢の定量を数年前から行っている。江副は、T 県の 2 処理場において 2 年間、毎月 1 回、汚泥を解析することにより、2 つの知見を得ることができた。第一に、汚泥内の細菌叢は毎月変遷していることである。第二に、1 年間分、12 個の細菌叢を平均することにより、細菌叢に処理場の特徴が現われることである⁷⁾。また、小松は、K 県の 2 処理場において 1 年間、毎月 1 回、汚泥を解析することにより、以下の 2 つの知見を得た⁹⁾。第一に、処理場の立地場所によって細菌叢は異なることである。第二に、調査した処理場においては、流入する細菌種が活性汚泥に影響を与えることである。

霞ヶ浦浄化センターの処理水は、日本で 2 番目に大きい湖であり、閉鎖性水域である霞ヶ浦に放流している。そのため、4 種の高度処理法が、霞ヶ浦の富栄養化防止の目的で、処理場内に維持されている。その 4 種の高度処理法は、標準活性汚泥法に凝集剤を添加した方法、嫌気無酸素好気法、担体投入型修正バーデンフォ法、循環式硝化脱窒法に凝集剤を添加した方法である。これらは、同じ処理場内に設置されているため、流入下水は原則同じである。

本研究では、本処理場において、処理方式による汚泥内細菌叢の相違などを、属レベルで調査することを目的とした。処理方式が異なる反応槽に保持されている活性汚泥の細菌叢を、筆者らがすでに保有している

主に実下水処理場の活性汚泥から検出した細菌の情報に基づいて設計した 33 種類の属レベルのプロープを用いた FISH 法により調査した。また、水質と細菌叢を比較することで、両者の間に関連性がみられるか解析を試みた。

2. 実験方法

(1) 試料採取

茨城県、霞ヶ浦浄化センターにおいて、試料採取を行った。標準活性汚泥法に凝集剤を添加した方法(AS)、嫌気無酸素好気法(A2O)、担体投入型修正バーデンフォ法(MB)、循環式硝化脱窒法に凝集剤を添加した方法(Pd)の 4 方式、及び最初沈殿池末端 2 系列(IN1, IN2)、計 6 か所より、試料をそれぞれ 1 L 採取した。

各反応槽の諸元を表 1 に示す。AS, A2O, Pd においては、好気槽末端から汚泥を採取し、MB においては、再曝気槽末端から汚泥採取を行った。なお MB に投入されている担体は、一辺が約 3 mm のポリエチレングリコールの包括固定化担体である。この担体は、第 3 槽の好気槽にのみ投入されており、再曝気槽には投入されていない。霞ヶ浦浄化センターは、構造の異なる 2 種類の最初沈殿池を有している。IN1 は、固液分離を促し、反応槽への負荷を軽減させるため、最初沈殿池の容積は 1,736 m³に設計しており、構造は同一の矩形一方常流式である。AS, A2O, MB は IN1 から流入する。IN2 が流入するのは、Pd である。Pd は、生物学的脱窒で脱窒用水素供与体として流入 BOD を利用するため、その容積は 576 m³と IN1 の約 1/3 の大きさに設計されている。IN1, IN2 の沈殿時間はそれぞれ 3-6 時間、2.1 時間である。調査期間は、2009 年 4 月から 2010 年 3 月の 1 年間であり、毎月 1 回、計 12 回の採水を行った。試料は直ちに氷箱に入れ、2 ml チューブに分注後、-20℃で分析時まで保存した。

表-1 各反応槽の諸元

表記名	処理方式	最初沈殿池	反応槽の構成					最終沈殿池
			第 1 槽	第 2 槽	第 3 槽	第 4 槽	第 5 槽	
AS	凝集剤添加 活性汚泥法	矩形一方常流式 (1736m ³)(IN1)	好気	好気	好気	好気	/	矩形一方常 流式(1787m ³)
A2O	嫌気無酸素好気法	同上	嫌気	無酸素	好気	好気		同上
MB	担体投入型 修正 Bardenpho 法	同上	嫌気	無酸素	好気 (担体*)	無酸素	再曝気	同上
Pd	凝集剤併用型 循環式硝化脱窒法	正方形放射流式 (576m ³)(IN2)	無酸素	無酸素	好気	好気	好気	矩形一方常 流式(1561m ³)

*ポリエチレングリコール担体(一辺 3mm の立方体)

(2)水質測定

水質データは、霞ヶ浦浄化センターの水質管理課で分析を行った結果である。最初沈殿池(IN1,IN2)において、BOD、COD、T-N、T-P、SS等の測定を行っている。最終沈殿池(AS,A2O,MB,Pd)において、BOD、COD、T-N、T-P、MLSS等の測定を行っている。また、水質測定方法は、以下の通りである。BODは、工場排水試験方法 JIS K 0102 21、生物化学的酸素要求量、CODは、工場排水試験方法 JIS K 0102 17、100℃における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量(COD_{Mn})、T-Nは、工場排水試験方法 JIS K 0102 45.4、銅・カドミウムカラム還元法、T-Pは、工場排水試験方法 JIS K 0102 46.3.1 ペルオキシ二硫酸カリウム分解法、MLSSは、下水試験方法 第2編 第3章 第6節、活性汚泥浮遊物質である。調査期間中、水質測定は、1回/週行われた。CODにおいては、最初沈殿池流出水は1回/週、最終沈殿池流出水については3回/週行われた。IN1、AS、A2O、MB、Pdにおいては、スポットで採水が行われ、IN2においては、24時間のコンポジットにより採水が行われた。また、FISH法解析に用いた試料は、水質測定と同じ反応槽から得たが、採水の時期は異なっている。

(3)FISH法による細菌叢解析

a)ハイブリダイゼーション

サンプルはSaline-EDTAとPBS(Phosphate-buffered saline)で洗浄後、パラホルムアルデヒド溶液(4%パラホルムアルデヒド in PBS, pH 7.2)を用いて4℃、12時間静置し、細胞固定を行った。細胞固定したサンプルはPBSで洗浄後、汚泥の自家蛍光等の特異的蛍光を低減させるため、ダーラム管内でダイヤモンドペッセルにより分散処理(0.5 N HCl)を行った⁸⁾。この分散処理を施したサンプルをPBSで懸濁させ、スライドガラスに2 µl 滴下し、乾燥後にエタノール脱水(30%, 50%, 80%, 99.5%, 各5分間)を行った。その後の操作は、Amannらの方法に準じて行った¹⁰⁾。ハイブリダイゼーションは、Hybridization Buffer 8 µl (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.01 % SDS, ホルムアミド)をサンプル上に滴下し、さらに1 µlのプロープ溶液を加えて46℃、90分間で行った。使用したプロープは表-2に示す。EUBプロープについては、EUB338, EUB338II, EUB338IIIを混合し、EUBmixとしたものを使用した。本研究室にて作成したプロープについては、Ribosomal Database Project II (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>)のProbe Matchにより、プロープの検出範囲(Specificity)を検索(2010年8月現在)した結果を示す。得られたプロープの標的細菌に対する、検出割合(標的とする属の中で、検

出される細菌種数/標的とする属の全細菌種数)を示した。解析に用いたプロープにより、活性汚泥を構成する全細菌を表わし得ていないことには、留意する必要がある。なお、全てのプロープにおいて、蛍光標識は、Cy3を使用した。Hybridization Bufferのホルムアミド濃度は、プロープ毎に最適な濃度を使用した。反応終了後、未交雑プロープを1 mlのHybridization Bufferで洗い流し、35 mlのWashing Buffer (20 mM Tris-HCl, 0.01 % SDS, NaCl, pH 7.2)を用いて48℃で20分間の洗浄を行った。Washing BufferのNaCl濃度は、Hybridization Bufferのホルムアミド濃度に合わせた。洗浄後、ミリQ水によりWashing Bufferを洗い流し、乾燥後、カバーガラスをかけた。

b)顕微鏡観察と画像処理

FISH後、蛍光顕微鏡ECLIPSE E600(株式会社ニコン)を用いて観察した。デジタルカメラDS-Ri1(株式会社ニコン)により、スライドガラス上で無作為に選んだ5箇所を撮影した。このときの接眼レンズは10倍、対物レンズは40倍とした。得られた画像はAdobe Photoshop 6.0(アドビシステムズ株式会社)により二値化処理を施し、細菌の蛍光領域を白、それ以外の部分を黒に変換し、白の部分のピクセル数を算出し、5視野の平均値求めた。閾値は、EUBmixプロープにおいて、細菌が全て検出できる値に設定した。この閾値は、試料毎に個々に設定した。33種類の属レベルのプロープ、6種類の網レベルのプロープ、EUBmixプロープでのFISHにおいて、細菌の蛍光以外にも、活性汚泥のフロックにプロープが絡まる等の理由により、非特異的な蛍光を検出してしまうことがある。Non-EUBプロープによるFISHにより、非特異的な蛍光のピクセル数を求めることができるため、各細菌のプロープのピクセル数からNon-EUBプロープのピクセル数を差し引き、それぞれのプロープで検出される細菌群のピクセル数を求めた。

また、蛍光標識の統一を図るため、一つの試料に対して41種類全てのプロープのFISHを、別々のスライド上で行った。これは、同じ試料であれば、各々のスライドにおいて、同じ程度の非特異的な蛍光としてのピクセル数が得られるものと仮定しているためである。

EUBmixより検出された値を、全細菌のピクセル数とした。各細菌群のピクセル数を、全細菌のピクセル数で割ることで、それぞれの占有率を算出した。

(4) Shannon index による細菌叢解析

FISH法で得られた細菌叢について、Shannon index (H')による数値化を行った。Shannon indexは、種の多様性の指数として用いられている。式は、(1)により定義されている。

表-2 FISH 法に用いるプローブ

プローブ名	配列(5'-3')	Specificity (hits/total)* ¹	Formamide (%)	Reference
EUB338I* ²	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Domain Bacteria	20	(10)
EUB338II* ²	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Planctomycetes 門	20	(11)
EUB338III* ²	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Verrucomicrobia 門	20	(11)
Non-EUB	ACTCCTACGGGAGGCAGC	No Bacteria	20	(10)
		β -Proteobacteria 綱		
ACD	GCTATACAGTCACAAATGCAGT	Part of <i>Acidovorax</i> (3274/5451)	25	(7)
AZO	CCGTGCAGTCACAAGCGCAG	Part of <i>Azoarcus</i> (194/393)	15	(8)
AQU	CCTTGCAGTCACAAGTGCAGTTC	Part of <i>Aquabacterium</i> (63/7452)	15	(7)
AZV	CATACAGGGTATTAGCCTGCAC	Part of <i>Azovibrio</i> (34/59)	35	(7)
DEC	TGCATGAGCGTCAGTATCGA	Part of <i>Dechloromonas</i> (266/1048)	15	(7)
Ni2	CCTTAATTGATCCGACAAC	Part of <i>Nitrosomonas</i>	20	(12)
NSS	TTTCGTTCCGGCTGAAAG	Part of <i>Nitrospira</i> (1978/2599)	30	(7)
PPV	ATGCGATTTCTTCCCGCCGAA	Part of <i>Propionivibrio</i> (19/305)	15	(7)
THA	TAGCCTTGAGTCACAAACGCAG	Part of <i>Thauera</i> (525/874)	25	(7)
THB	TCACTCCCCAACCAACAGT	Part of <i>Thiobacillus</i> (475/889)	20	(7)
		γ -proteobacteria 綱		
ACB	GAATGCAATTCCTAAGTTA	Part of <i>Acinetobacter</i> (2984/10974)	20	(7)
AER	GCTTTCACATCTAACTTATC	Part of <i>Aeromonas</i> (2942/4035)	25	(7)
PSE	TTTTGGATGCAGTTCACGAG	Part of <i>Pseudomonas</i> (10892/31587)	15	(8)
TAV	ACTCTAGCCCTGCAGTATCGGA	Part of <i>Thioalcalivibrio</i> (6/93)	25	(7)
		δ -proteobacteria 綱		
DSV	CTCCCCGACATCTAG	Part of <i>Desulfovibrio</i> (2/2127)	20	(7)
		Flavobacteria 綱		
CHR	CACCACTGACTTATCAGTCCG	Part of <i>Elizabethkingia</i> (101/167)	25	(7)
FLV	GCTTTCACCACTGACTTACCA	Part of <i>Flavobacterium</i> (346/6921)	30	(7)
WKS	GATTAATCCGCTACGGACC	Part of <i>Wautersiella</i> (78/80)	20	(7)
unFLV	AATGGCAATTCCGACAGTTAA	unclassified <i>Flavobacteriaceae</i> (2/6921)	15	(7)
		Sphingobacteria 綱		
ARC	TACCTCAATCCCACTCAAGTCT	Part of <i>Arcicella</i> (56/896)	15	(7)
CHI	GTGAATCCGATAACGCTTGCA	Part of family Chitinophagaceae (4367/8294)	30	(7)
FIL	GCGTCAATGAAGCCCAGCAA	Part of <i>Haliscomenobacter</i> (1/1251)	35	(7)
HCB	TACATGTCACATTCCGCCTA	Part of <i>Haliscomenobacter</i> (78/1251)	20	(7)
LWN	CGCTACATGCCACATTCCGC	Part of <i>Lewinella</i> (61/94)	15	(7)
SSP	GTGCTTATTGATAGGTACCGT	unclassified <i>Cytophagaceae</i> (3/357)	35	(7)
unFLE1	GGCTGTGTATCGCCAACATC	unclassified <i>Sphingobacteriales</i> (167/2551)	15	(7)
unFLE2	TCAATGCCACCCTCCCGGTT	unclassified <i>Sphingobacteriales</i> (88/2551)	15	(7)
unFLE3	ACTCCTTAGTAAGCTGCCTTCG	unclassified <i>Sphingobacteriales</i> (61/2551)	30	(7)
unFLE4	CGCTACATGCTACATTCCGC	unclassified <i>Bacteroidetes</i> (444/10487)	30	(7)
		Nitrospira 綱		
NSP	CAACGCTTGCCACCTTCGTA	Part of <i>Nitrospira</i> (688/1760)	25	(7)
		Spirochaetes 綱		
LSP	GCGGTCTACTTAATCCGTTA	Part of <i>Leptospira</i> (415/521)	30	(7)
		Clostridia 綱		
ACE	CGCCCCGCTGCGCACCTTTA	Part of <i>Ethanoligenens</i> (31/123)	10	(7)
		Bacilli 綱		
GEM	TACACAACCTTTCTTCCCTAA	Part of <i>Gemella</i> (9/3495)	20	(7)
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	α -proteobacteria 綱	35	(13)
BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	β -Proteobacteria 綱	35	(14)
GAM42a	GCCTTCCACATCGTTT	γ -proteobacteria 綱	35	(14)
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	Cytophaga-Flavobacteria	35	(15)
HGC	AACAAGCTGATAGGCCGC	Actinobacteria 綱	30	(16)
LGC354a,b,c	YSGAAGATTCCCTACTGC	Bacilli 綱	35	(17)

*¹RDPII による検索結果(標的とする属の中で、検出される細菌種数/標的とする属の全細菌種数)(2010 年 8 月現在)*²EUB プローブは、EUB338I, EUB338II, EUB338III を混合し(EUBmix), 解析を行った。

様性の指数として用いられている。式は、(1)により定義されている。

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \log p_i \quad (1)$$

S; 総種類数

p_i ; i 種の相対的占有率

この式で、 p_i は i 種の占有率であるので、全ての個体と同じ占有率の場合、最大の値をとる。また、占有率の偏りが大きいほど、値は無限に 0 に近づく性質を持つ。この式には通常、昆虫の個体数や、細菌の検出数¹⁸⁾において、用いられている。本研究ではこの式に、細菌種の占有率を適用することを試みた。33 種類のプローブにおける H' と、硝化細菌である NSP, NSS, Ni2 における H' の解析を行った。占有率は、全細菌量に対する、個々の細菌量を、相対的占有率(p_i)とした。また、33 種類のプローブにおける H' については、S は 33 個となる。 H' の最大値は、全細菌種の占有率が同じ時であり、この時 p_i は 0.03、 H' は 1.5 になる。

3. 結果とその考察

(1)水質測定

表-3、図-1 に IN1, AS, A2O, MB, IN2, Pd における水質測定(BOD, COD, T-N, T-P)結果を示した。表 3 の値は、2009 年 4 月から 2010 年 3 月までの平均値である。図-1 は、1 年間の処理水質の変化を示している。

COD において、凝集剤を添加した AS, Pd が生物反応のみの A2O, MB より優れた処理能力を示した。硝化脱窒を促進する処理方式における T-N は、MB が最も低い値を示し、A2O の 1/3, Pd の 1/2 程度であった。T-P は、A2O において、8 月から 11 月にかけて、高い値を示していた。この原因の一つとして、降雨による流入水の増加が考えられるが、原因が分からない時期もあった。

(2)細菌叢解析

a)全細菌量と MLSS, SS の比較

図-2 に IN1, AS, A2O, MB, IN2, Pd において、全細菌量と、それぞれの MLSS, SS を比較する。結果はそれぞれ 1 年分の解析データである。統計的な差は、スチューデントの t 検定(両側検定)によって確認した。 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。最初沈殿池の流出水では、IN1 において、SS が、21~27mg/L の範囲(平均 23mg/L)であった。IN2 においては、SS が 49~

表-3 各処理法による処理前後の水質

(2009 年 4 月~2010 年 3 月平均)

項目(単位)	IN1	AS	A2O	MB	IN2	Pd
BOD (mg/L)	65.2	1.5	1.1	1.2	88.1	0.9
COD (mg/L)	36.7	5.9	6.6	6.5	51.1	5.6
T-N (mg/L)	18.8	9.0	5.8	2.0	22.9	4.5
T-P (mg/L)	2.3	0.1	0.3	0.1	2.7	0.1

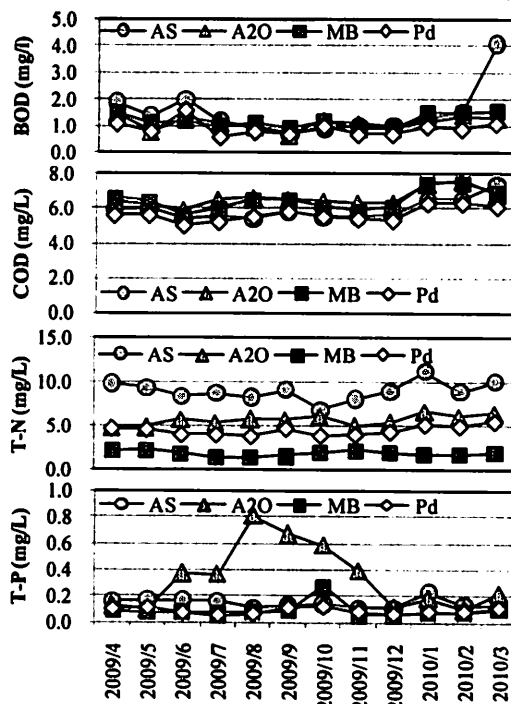


図-1 各処理法による処理水質

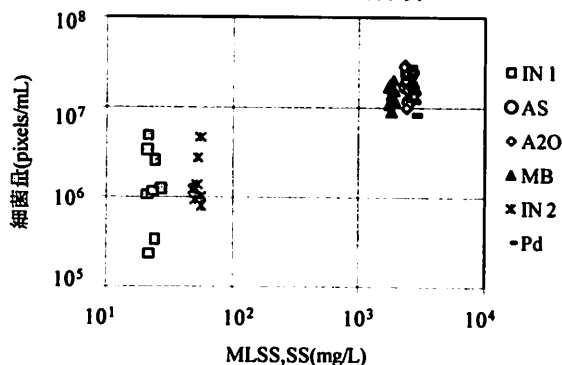


図-2 各槽の全細菌量と MLSS, SS の比較

56mg/L の範囲 (平均 53mg/L) であった。IN2 の SS は IN1 の約 2.3 倍であり、有意に異なる結果であった。全細菌量は IN1, IN2 それぞれ 2.1×10^6 pixels/mL, 2.0×10^6 pixels/mL であり、有意な差はみられなかった。反応槽の結果では、AS の MLSS が 2380~2650mg/L (平均 2460mg/L), A2O の MLSS が 2310~2670mg

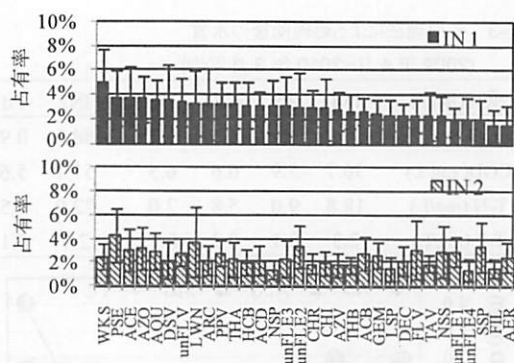


図-3 最初沈殿池の細菌叢解析

1/L(平均 2460mg/L), Pd の MLSS が 2340~2730mg/L (平均 2540mg/L)であり, MLSS に有意な差はみられなかった。一方, MB の MLSS は 1710~1930mg/L(平均 1810mg/L)であり, 他の処理方式と比較して, 有意に低値であった。全細菌量は, t 検定においては有意な差がないと判断された。しかし図-2 からわかるように, MB は, AS, A2O, Pd よりも全細菌量が低い傾向が見られた。また, 最初沈殿池内と反応槽内の SS, MLSS と, 全細菌量を比較した。MLSS は SS の 50~100 倍の値であるのに対し, 反応槽内の全細菌量は, 最初沈殿池内の全細菌量の 14~25 倍であった。この差の原因の一つに, 下水中に含まれる無機物等の SS 成分が活性汚泥フロックに取り込まれたことが挙げられると考えられる。

b) 最初沈殿池内の細菌叢の比較

図-3 において, 最初沈殿池 IN1, IN2 の細菌叢を比較した。縦軸は, 各細菌種の量を全細菌量(EUB プローブ)で除した, 占有率である。細菌種の並びは統一しており IN1 において, 占有率が高い順に左から配列した。図-3 より, 高い占有率を示すプローブの種類は異なっており, 同じ流入水であっても, 細菌叢が異なると考えられる。最初沈殿池の容積が, IN2 は IN1 の 1/3 しかなく, この構造の違いが, 細菌叢の相違の原因ではないかと考えられる。

c) 各反応槽内の細菌叢比較

図-4, 5, 表-4 より, 各処理方式において, 占有率が高いプローブを比較した。図-4 では, 4 種の高度処理方式(AS, A2O, MB, Pd)における, 反応槽内の細菌叢を比較した。縦軸は占有率である。横軸は統一しており, AS において, 占有率の高い順に左から配列した。NSP は, 他の細菌と比べて占有率が高い(10%を超えている)ため, 別途図-5 に示す。値はすべて, 1 年分, 12 個の細菌叢の平均値で示している。表-4 では, 図-4, 5 に示した各処理方式における占有率が高いプローブを 1 位から 5 位まで抽出し, 整理した。

全ての処理方式において NSP が最も多く存在し, 他

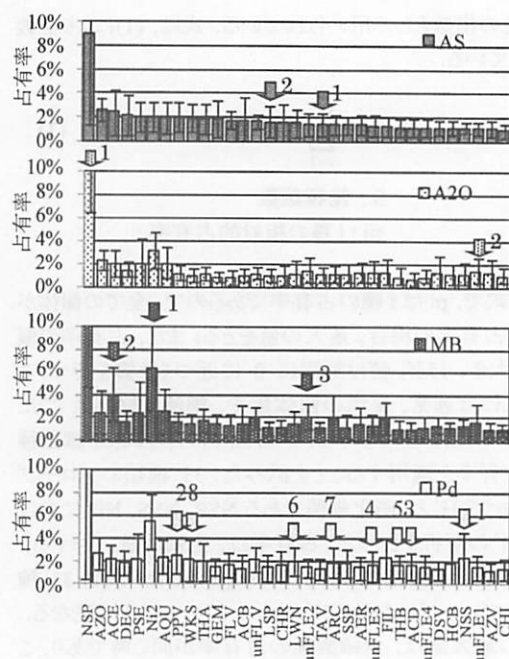


図-4 各槽の細菌叢

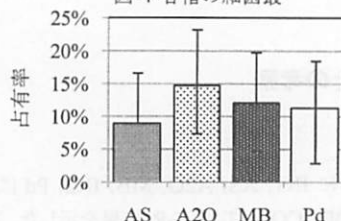


図-5 NSPプローブの占有率

表-4 各処理方式における占有率上位5つの属レベルのプローブ

順位	AS	A2O	MB	Pd
1	NSP (9.0%)*	NSP (14.8%)	NSP (12.3%)	NSP (13.5%)
2	AZO (2.6%)	Ni2 (3.2%)	Ni2 (6.4%)	Ni2 (5.4%)
3	ACE (2.4%)	AZO (1.8%)	ACE (4.1%)	AZO (2.7%)
4	DEC (2.1%)	PSE (2.1%)	AQU (2.6%)	PPV (2.5%)
5	PSE (2.0%)	ACE (2.1%)	PSE (2.5%)	AQU (2.4%)

*()内は, 占有率(%)を示す

の細菌種よりも, 3.3-5.7 倍多かった。また, 最初沈殿池内の NSP と比較すると, 70~180 倍多く検出された。それ以外の細菌種では, Ni2, AZO, PSE, ACE が, 4 処理方式中 3 処理方式において上位 5 位以内の占有率を占めていた。NSP は亜硝酸酸化細菌であり, Ni2 はアンモニア酸化細菌, AZO, PSE は脱窒細菌として知られている。また, その他の上位 5 位にはいるプローブの中

で、DEC、AQU には脱窒細菌が含まれており、全ての処理方式において、硝化脱窒細菌の占有率が上位を示すことが示唆された。

次に、処理方式毎で、各プローブの占有率を比較した。各処理方式間において、属レベルの各プローブの占有率をそれぞれ除し、他の処理方式に対して、占有率が何倍であるか算出した。以下に、占有率が特定の1処理方式において1.5倍以上の占有率で検出されたプローブを処理方式毎に列挙した。このようにして抽出したプローブは、図4において、 $\square$ を付し、占有率の差が著しい順に番号を付して表わした。

図-4より、ASにおいては、TAV($\square$ 1)が1.6-2.1倍、ACB($\square$ 2)が他の処理方式の1.5-1.9倍多く存在していた。A2Oでは、NSP($\square$ 1)が2.2-3.0倍、unFLE1($\square$ 2)が1.5-1.6倍、他の処理方式に比べ、多く存在した。MBではNi2($\square$ 1)が他の処理方式の1.5-6.2倍多く存在し、ACE($\square$ 2)が他の処理方式の2.3-2.7倍存在し、unFLE2($\square$ 3)が1.7-1.9倍存在した。Pdでは、他の処理方式と比較して、1.5倍以上多く検出されるプローブが8種類存在した。NSS($\square$ 1)は1.5-2.4倍多く存在し、PPV($\square$ 2)は、2.1-2.2倍、ACD($\square$ 3)、unFLE3($\square$ 4)がそれぞれ2.0-3.2倍、1.8-2.8倍、THB($\square$ 5)、LWN($\square$ 6)、ARC($\square$ 7)、WKS($\square$ 8)はそれぞれ1.6-1.8倍、1.6-1.7倍、1.6倍、1.5-1.9倍多く存在した。

以上のように、各処理方式を相互に比較すると、占有率が高いプローブが異なっていた。また、Pdは他の処理方式と比較して占有率が高いプローブが多かった。Pdは最初沈殿池がAS、A2O、MBと比べ1/2の大きさであり、反応槽内の窒素-MLSS 負荷は0.07 kg-N/(kg-MLSS $\cdot$ d)であった。また、AS、A2O、MBの窒素-MLSS 負荷は0.02~0.03 kg-N/(kg-MLSS $\cdot$ d)であった。Pdでは、他の処理方式と比較して、窒素負荷が高いといえる。

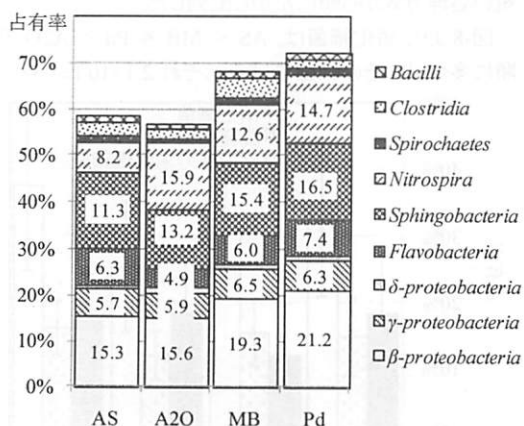


図-6 網レベルの細菌叢解析
(属レベルのプローブ)

よって、最初沈殿池の構造が異なること、及び窒素-MLSS 負荷が高いことが、反応槽内の細菌叢の相違の原因の一つであると考えられる。

窒素除去細菌、リン除去細菌に焦点を当て、処理方式毎に占有率の相違を比較した。A2Oでは、亜硝酸酸化細菌であるNSP、MBではアンモニア酸化細菌であるNi2、Pdでは、アンモニア酸化細菌であるNSS、脱窒細菌が含まれるACD、THBの占有率が高くなる結果が得られた。ASにおいては、他の処理方式より占有率が高いものに、硝化脱窒に関わる細菌群が含まれていなかった。以上より、窒素除去を促進する高度処理方式において、その処理方式にあった細菌群の占有率が高くなる傾向が見られた。

また、リン除去細菌に関して今村らによって *Azohydromonas* 属、*Aeromonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Flavobacterium* 属の細菌が候補として含まれることが報告されている¹⁹⁾。この中で、本研究において用いられているプローブである、*Aeromonas* 属(AER)、*Chryseobacterium* 属(CHR)、*Flavobacterium* 属(FLV)について、生物学的リン除去を促進する処理方式である、A2O、MBと、それ以外のAS、Pdにおいて、占有率を比較した。その結果、AERにおいて、A2OはAS、Pdの1.4倍、2.6倍、MBは1.8倍、1.4倍の占有率であった。また、CHRにおいて、MBはAS、Pdの1.5倍の占有率であった。FLVについては、この属に分類される細菌に脱窒細菌が含まれることもあり、PdがA2O、MBの2.2倍、1.8倍の占有率であった。以上より、リン除去を促進する処理方式において、その処理方式に合った細菌群の占有率が高くなる傾向が見られた。以上より、処理方式によって占有率が高い細菌の種類や、その占有率は異なる可能性が示された。

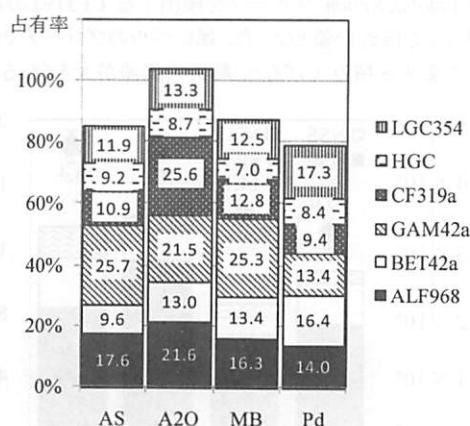


図-7 網レベルの細菌叢解析
(網レベルのプローブ)

(3) 網レベルでの細菌叢比較

処理方式毎の細菌数を、網レベルに分類し、比較を行った。33種類のプローブで検出される細菌群は、以下の9種類の網に分類される。その内訳は、*Proteobacteria* 門に属する β -*proteobacteria* 網、 γ -*proteobacteria* 網、 δ -*proteobacteria* 網、*Bacteroides* 門に属する *Sphingobacteria* 網、*Flavobacteria* 網、*Nitrospirae* 門に属する *Nitrospira* 網、*Firmicutes* 門に *Clostridia* 網、*Bacilli* 網、*Spirochaetes* 門に属する *Spirochaetes* 網である。これを整理して、図-6 に示した。また、網レベルのプローブにより検出を試みたグループは、活性汚泥の細菌叢解析において、しばしば用いられている、 α -*proteobacteria* 網、 β -*proteobacteria* 網、 γ -*proteobacteria* 網、*Cytophaga-Flavobacterium* グループ、*Actinobacteria* 網、*Bacilli* 網である²⁾¹⁹⁾。これを整理して、図-7 に示す。また、それぞれのプローブの占有率は、その統計的な相違を、スチューデントの *t* 検定により確認した。

その結果、図-6 の AS において、*Nitrospira* 網の占有率が他の処理方式と比べ有意に小さく、MB, Pd において、 β -*proteobacteria* 網の占有率が他の処理方式と比べ、有意に大きいことが確認された。また、図-7 の A2O において、CF319a の占有率が、他の処理方式と比べ、有意に大きく、Pd においては、GAM42a が他の処理方式と比べ、少ない結果となった。以上のグループについては、処理方式間で占有率の違いが見られたが、その他の網については、有意な差は見られなかった。

属レベルの解析を集約したものと、網レベルでの解析結果を比較すると、 β -*proteobacteria* 網の占有率が、網レベルで解析した時、属レベルを集約した値より低い占有率となった。また、図-6 において、*Cytophaga-Flavobacterium* グループに含まれる、*Sphingobacteria* 網、*Flavobacteria* 網を合計した占有率が、図-7 の *Cytophaga-Flavobacterium* グループを検出する CF319a の占有率の、2 倍近い値となった。属レベルのプローブで解析した結果を積み上げると、解析の誤差が大きくなる場

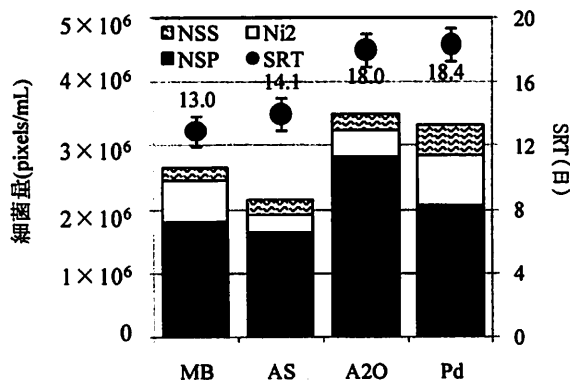


図-8 各槽の硝化細菌量とSRTの比較

合があるので、その点には留意が必要である。

また、33種類の属レベルには存在していなかった、 α -*proteobacteria* 網(ALF968)、*Actinobacteria* 網(HGC)のプローブにおいて、検出が確認された。33種類の属レベルのプローブでは、EUB で検出される全細菌量の 50 %~70 %程度しか検出できず、未知の細菌種には、 α -*proteobacteria* 網や、HGC グループ、LGC グループが含まれていたことになる。現在までのところ、新たな細菌種の特定には至っていないが、それぞれの汚泥において PCR-DGGE 法、シーケンシングを行い、細菌種を特定し、これらの細菌群の量を属レベルで把握することで、より詳細な反応槽間の細菌叢の相違が見えてくると考えられる。

秋山ら²⁾が、日本の下水処理場内の活性汚泥について、網レベルのプローブを用いて調査した FISH 法の結果、*Proteobacteria* 門の細菌種が優占種であり、 α -*proteobacteria* 網、 β -*proteobacteria* 網、 γ -*proteobacteria* 網がそれぞれ 20 %、22 %、9.5 % 存在していた。同時に、CF (*Cytophaga-Flavobacterium*) グループは 3-10 % 程度存在していた。本研究で調査した霞ヶ浦浄化センターの反応槽内の細菌叢においては、*Proteobacteria* 門が優占的に存在し、 α -*proteobacteria* 網、 β -*proteobacteria* 網、 γ -*proteobacteria* 網はそれぞれ 17 %、13 %、22 % (4 処理方式の平均) であった。また、CF グループは、15 % であった。

(4) 硝化脱窒細菌の比較

図-8 において、各槽の硝化細菌量を比較した。33種類のプローブ中、硝化細菌としたのは、NSP, NSS, Ni2 のプローブで検出される細菌群である。また、SRT の時間と硝化細菌の関係性も報告されているため、本研究においても比較検討を行った²⁰⁾。横軸は、SRT の短い処理方式から順に左から配列した。

図-8 より、硝化細菌は、AS < MB < Pd < A2O の順に多くなり、その細菌量はそれぞれ $2.1 \times 10^6 (\pm 1.3 \times$

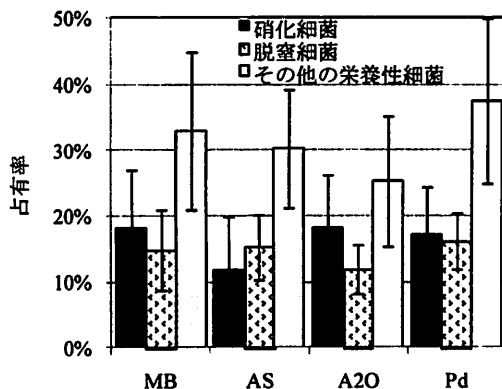


図-9 各槽の硝化脱窒細菌の比較

表-5 スチューデントのt検定(両側検定)による各処理方式における硝化細菌数とSRTの相違

	AS	A2O	MB	Pd
AS	-	$P < 0.05^{*1,2}$ $P < 0.05^{*1}$	n.s. ^{*2} n.s.	$P < 0.05$ $P < 0.05$
A2O	-	-	n.s. $P < 0.05$	n.s. n.s.
MB	-	-	-	$P < 0.05$ $P < 0.05$
Pd	-	-	-	-

*¹ 上段:硝化細菌量, 下段:SRT

*² $P < 0.05$; 有意な差がある, n.s.: 有意な差がない

10^6), $2.4 \times 10^6 (\pm 1.2 \times 10^6)$, $3.3 \times 10^6 (\pm 1.6 \times 10^6)$, $3.5 \times 10^6 (\pm 2.2 \times 10^6)$ であった。そのうち, NSP が 60-70 %を占めていた。

SRT は, 調査期間中, MB < AS < A2O < Pd の順に長く, (図-8 ●), 13.0 日, 14.1 日, 18.0 日, 18.4 日であった。スチューデントのt検定($P < 0.05$)により, 各処理方式における硝化細菌数とSRTの統計的な差異を確認した(表-5)。その結果, ASとMBの間には, 硝化細菌の量とSRTの有意な差は見られなかった。また, A2OとPd間には, 硝化細菌数とSRTの有意な差は見られなかった。そして, ASとA2O, Pdには, 硝化細菌数, SRTともに有意に異なっていた。また, MBとPdにおいても, 同様で, 有意に異なっていた。A2OとMBに関しては, SRTのみ有意に異なっていた。以上より, SRTの時間が長いと, 硝化細菌の量が多く, SRTが短いと, 硝化細菌量が少なくなる傾向が見られた。

図-9において, 硝化細菌, 脱窒能を有する従属栄養細菌(以下, 脱窒細菌), その他の従属栄養性細菌に分類し, 処理方式別による比較を行った。脱窒細菌と

したのは, PSE, AZO, AQU, THA, THB, FLV, DEC, ACDの細菌種である。なお, 上記の細菌種が反応槽内で脱窒反応を行っているかは定かではないが, 脱窒の機能を持つ種が属する可能性があるものについて分類を行った²¹⁾。上記以外の細菌種をその他の従属栄養性

細菌として分類した。図-9より, 占有率を比較すると, 硝化細菌は AS < Pd < A2O=MB の順に高く, それぞれ 11.8 %, 17.0 %, 18.1 %, 18.1 %であった。脱窒細菌は, それぞれ, 15.2 %, 16.1 %, 12.0 %, 14.9 %存在した。MBは, SRTが13日と短く, 硝化細菌量は, $2.4 \times 10^6 (\pm 1.2 \times 10^6)$ とASに次いで少なかった。占有率をみると, AS, Pdと比較して高く, A2Oと同程度であった。MBは, 好気槽に担体が投入されており, 硝化細菌がポリエチレングリコールを基材として包括固定されている。そのため, 担体から剥離等の理由で浮遊微生物に加わる硝化細菌も存在すると考えられる。この硝化細菌が, 汚泥とともに循環し, 反応槽全体の硝化細菌の占有率を高めていることが考えられる。本研究では, 担体の投入されていない再曝気槽において採水を行っているが, 上記の考察より, 硝化細菌の占有率が他の担体を投入しない処理方式に比べ, 高くなったと考えられる。担体に固定している硝化細菌に関しては, 基材(ポリエチレングリコール)の発光のため, FISH法による解析が十分にできていない。解析方法を別途検討する必要がある。

(5)細菌叢と水質の関係性

2009年4月-2010年3月までの12個の細菌叢において, それぞれ H' を算出し, 時系列による細菌叢の変化を追跡した。また, 水質と H' を比較し, 関係性を見出すことを試みた。

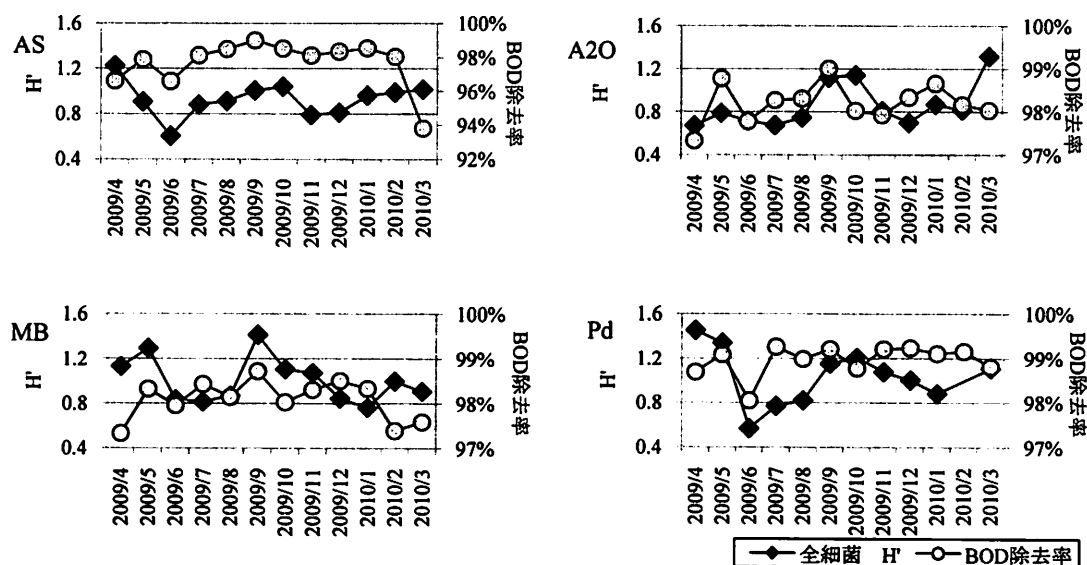


図-11 全細菌 H' とBOD除去率の比較

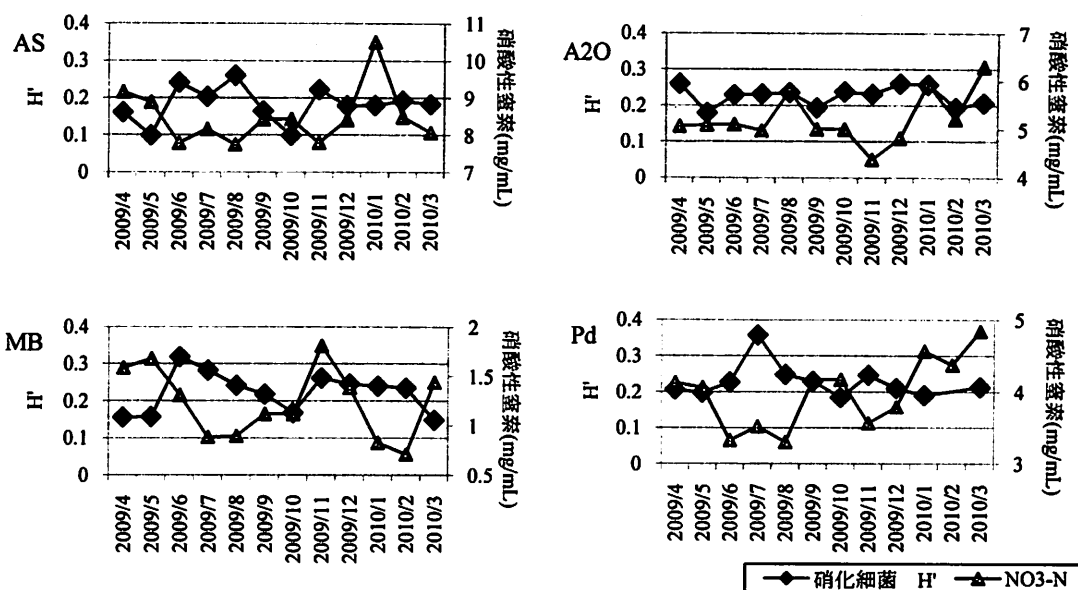


図-12 硝化細菌 H' と硝酸性窒素の比較

図-11 に、各処理方式における、調査期間中の H', BOD 除去率の経時変化を示す。全ての処理方式において、5 月と比較して 6 月に BOD 除去率が一度下がり、その後 9 月にかけて BOD 除去率が 1-2 % 上昇するという傾向が見られた。なお、BOD 除去率の変動について統計的に有意な差があることは、スチューデントの *t* 検定(両側検定)によって確認した($P < 0.05$)。同様に、H' についても、6 月に一度値が低くなり、9 月にかけて 0.2-0.4 上昇するという結果が得られた。4 月から 8 月にかけて、20℃から 27℃まで温度の上昇がみられたが、6 月に一度 BOD 除去率が落ち込んだ箇所については、関連性は見られなかった。このことを考慮すると、H' で表わされる細菌叢の多様性指数と BOD 除去率に関係性があるのではないかと考える。

図-12 では、硝化細菌(NSP, NSS, Ni2)の H' と硝酸性窒素の経時変化を比較した。その結果、全ての処理方式において、硝化細菌 H' が高い時、硝酸性窒素が低くなり、硝化細菌 H' が低い時、硝酸性窒素が高くなるという、挙動が相反する時期が一部見られた。このことから、硝化細菌の多様性指数と反応槽内の硝酸性窒素に関係性が認められるケースはあるものの、これらの点に関しては、データ蓄積が今後必要だと考えられる。

4. 結論

本研究では、霞ヶ浦浄化センター内にある、凝集剤

併用型活性汚泥法(AS)、嫌気無酸素好気法(A2O)、担体投入型修正バーデンフォ法(MB)、凝集剤併用型循環式硝化脱窒法(Pd)の 4 種類の処理方式の反応槽内に存在する細菌種について、33 種類の属レベルのプロープを用いた FISH 法による解析を行った。流入水が同じで処理方式が異なる時、細菌叢にどのような影響があるのか調査した。

その結果、全ての処理方式において、亜硝酸酸化細菌である NSP のプロープが最も高い占有率を占め、他のプロープの 3-6 倍多く検出された。また、アンモニア酸化細菌である Ni2 や、脱窒細菌が含まれる AZO, PSE 等のプロープが、上位の占有率を占めた。硝化や脱窒の機能を有する細菌群が反応槽内において占有率が高いことが示唆された。しかし、処理方式によってその占有率の順位や占有率自体は異なっていた。また、AS 以外の窒素除去を促進する処理方式では、硝化脱窒細菌の占有率が高く、生物学的リン除去を促進する処理方式(A2O, MB)ではリン除去候補細菌の占有率が高くなる傾向が見られた。処理方式による SRT の相違と、硝化細菌量を比較すると、SRT が長い処理方式の方が、硝化細菌量が多く検出される傾向を示した。以上より、同じ流入水でも処理方式によって、細菌叢は異なる可能性が示唆された。

FISH 法により得られた細菌叢を、Shannon index (H')により数値化し、水質との比較解析を行った。その結果、全ての処理方式において、H' の増減の変化と BOD 除去率の変化が連動する時期があり、関係性が示

唆された。また全ての処理方式において、硝化細菌 H⁺ の増減の変化と硝酸性窒素は逆の挙動を示し、関係性が示唆された。以上より、細菌叢の H⁺ と水質との間に、一部相関が見られた。

参考文献

- 1)Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D. and Schleifer K.H.: Development of an rRNA-Targeted Oligonucleotide Probe Specific for the Genus *Acinetobacter* and Its Application for In Situ Monitoring in Activated Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 60, pp. 792-800, 1994.
- 2)秋山隆志, 佐藤弘泰, 味埜俊, 松尾友矩: FISH 法を用いた下水処理活性汚泥中の細菌群集構造解析, 水環境学会誌, Vol. 23, No.5, pp. 271-278, 2000.
- 3)Yun H. Kong, Grain N. Rees and Rovert J. Seviour: Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios, *Microbiology*, Vol. 148, pp. 2299-2307, 2002.
- 4)黒澤一央, 水上徹, 出口浩: 嫌気好気-活性汚泥の細菌群集構造解析, 下水道研究発表会講演集, Vol. 45, pp. 740-742, 2008.
- 5)岡部聡, 乗松直生子, 内藤初夏, 渡辺義公: FISH 法を用いた都市下水生物膜内における硝化細菌の動態解析, 水環境学会誌, Vol. 22, No.8, 683-691. 1999.
- 6)大迫孝輔, 出口浩: 結合固定化担体に固定した脱窒細菌群の菌叢解析, 下水道研究発表会講演集, Vol. 41, pp. 347-358, 2004.
- 7)江副拓良, 出口浩: 活性汚泥の細菌叢解析, 下水道協会誌, vol. 47, No. 577, 2010 印刷中
- 8)流石達也, 大迫孝輔, 鈴木智順, 出口浩: 脱窒反応槽に投入した多孔質固定化担体の細菌群集構造解析, 下水道協会誌, Vol. 43, No. 522, pp. 86-101, 2006.
- 9)Komatsu K., Yamasaki Y., Deguchi H. and Watanabe Y.: The Difference of Microorganisms in Activated Sludge Process Due to Its Location and Treatment Procedure, The 3rd IWA-ASPIRE, oral-W4-0-4, 2009.
- 10)Amann R I.: In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, In *Molecular microbial ecology manual*, pp. 1-15. 1995.
- 11)Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K. H. and Wagner M.: The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set, *Syst Appl Microbiol.*, Vol. 22, No. 3, pp. 434-444, 1999.
- 12)Demaneche S., Sanguin H., Pote J., Navarro E., Bernillon D., Mavingui P., Wildi W., Vogel TM. and Simonet P.: Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 105, pp. 3957-3962, 2008.
- 13)Weisse T.: Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems, *Adv. Microb. Ecol.*, Vol. 13, pp. 327-370, 1993.
- 14)Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.-H.: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions, *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 15, pp. 593-600, 1992.
- 15)Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M. and Schleifer K. H.: Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment, *Microbiology*, Vol. 142, pp. 1097-1106, 1996.
- 16)Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W. and Schleifer K. H.: In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides, *Microbiology*, Vol. 140, pp. 2849-2858, 1994.
- 17)Meier H., Amann R., Ludwig W. and Schleifer K. H.: Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content, *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 22, pp. 186-196, 1999.
- 18)Brons J. K. and van Elsas J. D.: Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 47, No. 9, pp. 2717-2727, 2008.
- 19)今村裕一, 山崎麻子, 出口浩, 渡辺義公: 生物学的リン除去プロセスにおける PAOs の可視化による検出, 環境工学論文集, vol. 26, pp. 653-658, 2009.
- 20)Manz W., Wagner M. and Amann R.: In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants, *Water Research*, Vol. 28, pp. 1715-1723, 1994.
- 21)関根孝夫, 松永旭, 新井喜明, 稲森悠平, 砂原広志: 活性汚泥法の SRT 制御下における硝化特性と細菌相, 下水道協会誌, Vol. 25, No. 289, pp. 29-37, 1988.
- 22)Garrity, G. M., et al., eds.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edn., Vol. 2, Springer, 2005.

(2010.5.21 受付)

The affection of Sewage Treatment method on Bacterial Communities in the
Reactors at Kasumigaura Wastewater Treatment Center

Yukiyo YAMASAKI¹, Kaoru TAKASHIMA², Hiroshi DEGUCHI¹
and Takao MURAKAMI³

¹Department of civil engineering, Tokyo University of Science

²Kasumigaura Wastewater treatment Center

³Japan Sewage Works Agency

In Kasumigaura Wastewater Treatment Center, four kinds of treatment process have been operated. The same sewage was supplied to each treatment process. These four processes were modified activated sludge process that enables to remove nutrients. The bacterial communities in these processes were analyzed monthly for one year by using FISH method with 33 kinds of genus specific FISH probe. In the results, it was found that genus *Nitrospira* was the most predominant bacterium in four kinds of process. The other predominant bacteria were nitrifying bacteria or denitrifying bacteria, but the occupation ratios of these bacteria were different from each process. In Shannon index (H'), the diversity indexes of the bacterial communities in 4 kinds of processes were analyzed. These results were compared with the result of water quality. It was found that there were correlation between BOD removal rate and H' of bacterial community, and between nitrate-N and H' of nitrifying bacteria.