

B-42 活性汚泥法による実下水の処理過程での 水質および細菌群集構造の変化

○佐藤弘泰^{*}、味埜俊

東京大学大学院新領域創成科学研究科 (〒277-8563 千葉県柏市柏の葉 5-1-5)

^{*}E-mail: hiroyasu@k.u-tokyo.ac.jp

1 はじめに

著者らは活性汚泥中微生物のもつ有機物一時貯蔵能力を活用することで、下水処理のために必要なエネルギー消費を削減することができる可能性があると考えている。下水中の有機物がポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 等の一時貯蔵物質として活性汚泥中微生物細胞内に蓄積される際、酸素の消費はごくわずかにとどまると予想されるからである。有機物一時貯蔵能力を把握するための実験は人工下水については多くの研究がなされてきたが、実下水については著者らの知る限りごく限られた研究事例しかない。また、実際には溶存有機物だけでなく微生物細胞を含め懸濁有機物もある程度除去できることが期待される。

本研究では活性汚泥と実下水とを混合し、その後の水質変化および活性汚泥中の蓄積有機物の時間変動を追うとともに上清及び活性汚泥中の細菌群集構造の変化を追跡した。

2. 方法

活性汚泥 (返送汚泥) 及び最初沈殿池越流水 (以下下水と呼ぶ) は東北地方の K 下水処理場において採取し、その後速やかに処理場内の実験室にて以下のような回分実験に供した。

回分実験の装置は図 1 に示すようなものである。反応槽としては 1L のトルビーカーを用い、pH 計測・記録、溶存酸素 (DO) 計測・制御および酸素利用速度の測定を行うことができる。混合液はマグネチックスターラーを用いて攪拌し、また、表面からの再曝気量を低減するため水面にはポリエチレンビーズを浮かべた。計測制御ソフトウェアは National Instruments 社の LabView を用いて自作した。

返送汚泥 200mL (MLSS 4900mg/L、MLVSS 4000mg/L) および下水 600mL を混合し、混合直後から 4 時間にわたり好気条件 (DO 濃度範囲 1.8mg/L ~ 2.0mg/L) にて反応させ、混合直後から 1 時間毎に水質分析及び細菌群集構造分析用の試料を採取した。水温は実験開始時は 18℃、終了時は 20℃だった。

試料採取及び処理フローを図 2 に示す。通常こうした実験では上清を得るための固液分離は遠心分離

法を用いることが多いが、本実験では採取した混合液を比色管内で 1 時間静置し、その上清を用いた。微生物叢分析用の試料は汚泥混合液と沈殿後の上清の双方について採取し、採取直後に当量のエタノールと混合して固定した。また、CODCr は大学実験室に輸送し翌日分析したが、その際沈殿が試験管底に生成しているのを確認した。CODCr 測定時、その沈殿は混合せず、上清部のみを採取して分析した。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) および MLSS 測定用の試料は採取後生物反応を止めるために速やかにメタノールを加えて固定した。

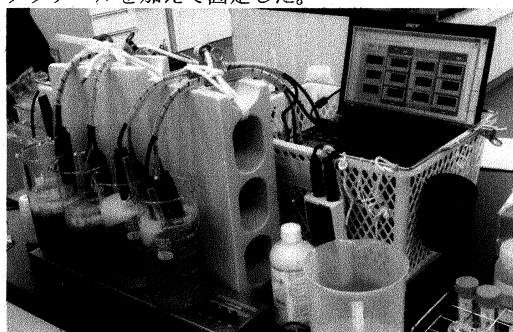


図 1 実験装置

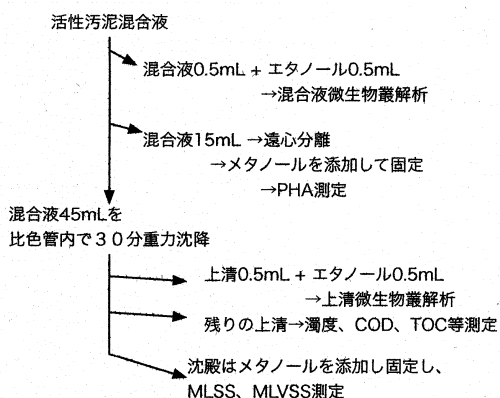


図 2 試料の処理フロー

水質分析法は次のとおりである。pH: 電極法、DO: 電極法、CODCr: Hach 社低濃度域用、濁度: Hach 社 2100Q 濁度計、MLSS、MLVSS: 下水試験

方法、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) : メチル化分解-ガスクロマトグラフ・質量分析法、イオン類 : イオンクロマトグラフ法。なお、MLSS/MLVSS 測定用および PHA 測定用の試料は現地でメタノール固定し東京大学の実験室に持ちかえて分析した。

微生物叢の分析は次のように行った。DNA を超音波破碎により抽出し、希釈してそのまま PCR 反応のテンプレートとした。また、試料中の DNA 濃度を PicoGreen (Invitrogen) を用いて測定した。また、16SrRNA 遺伝子の V1~V3 領域を対象として PCR 反応を行い、得られた産物を制限酵素 *HhaI* を用いて消化し、断片長をキャピラリーゲル電気泳動 (Agilent 2100 Bioanalyzer) することで、制限酵素切断断片多型 (RFLP) を得た。また、超音波破碎後の上清試料中の DNA 濃度を PicoGreen を用いて測定した。また、PCR 反応産物にアダプタ配列およびバーコード配列を付加し、塩基配列の解読は東京大学新領域創成科学研究科附属オーミクス情報センターに委託し、GS Junior (Roche) により PCR 反応産物の塩基配列を各試料 270~543 本解析した。得られたデータは QIIME¹⁾ および OTUMAMI²⁾ により解析した。主成分分析 (PCA) は Marker View (ABSciex) を用いて重みづけなし、Pareto scaling により行った。

3. 結果

図 3 に上清中の COD、細胞内に蓄積された PHA 量、呼吸により消費された酸素量を示す。なお T=0 計算値は、混合前の下水の COD (全 COD)、返送汚泥上清の COD、および返送汚泥の PHA 濃度と混合比から計算したものである。混合直後でも COD 値が T=0 計算値の約 4 割程度となっているのは、下水中の懸濁物質に由来する COD が 1 時間の沈殿による固液分離操作によって沈殿除去されたためであると考えられる。図 4 に濁度の変化を示すが、混合直後でも大きく濁度が減少していた。

図 3 および図 4 から、有機物除去・濁度除去は最初の 1、2 時間で行われたと見ることができる。最初の 1 時間での酸素収支を見ると、除去された COD は 73mgO/L なのに対して消費された酸素の量は 20mgO/L であった。一方その後の 3 時間では 35mgO/L もの酸素が活性汚泥によって消費されたにもかかわらず、上清から除去された COD の量はわずか 4mgO/L にすぎなかった。図 3 から濁度の除去も最初の 2 時間でほぼ完了したように見える。

最初の 1 時間で除去された有機物は、ほとんど酸化分解されることなく汚泥中に蓄積されたと考えられる。実際最初の 1 時間で PHA の量が増加し、そして、その後 PHA は減少した。しかし最初の 1 時間で

汚泥中に蓄積されたであろう有機物量は酸素当量として $73-20=53\text{mgO/L}$ なのに対して、蓄積された PHA の酸素当量は 7mgO/L (除去 COD の 13%程度) にすぎなかった。他の化学的形態での蓄積が無視できないであろうし、また、本実験の場合は恐らく物理的に沈殿して除去された有機物も相当量あったであろうと想像できる。

図 5 に上清中の DNA 濃度の変化を示す。下水中の DNA 濃度は $86\mu\text{g/L}$ だったが、混合直後の試料の DNA 濃度はそれよりも高いものとなった。また、上清中の DNA 濃度はその後 1 時間で急速に減少し、2 時間以降はほとんど変化しなくなった。濁度の除去とともに下水中の微生物の除去も進んだと考えられる。

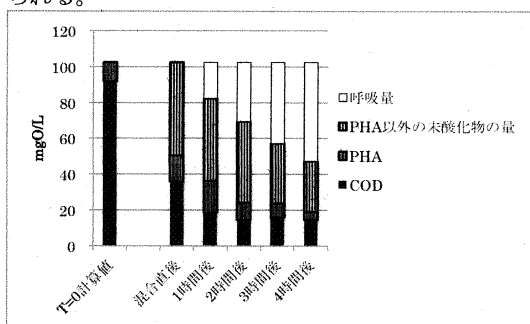


図 3 酸素の収支

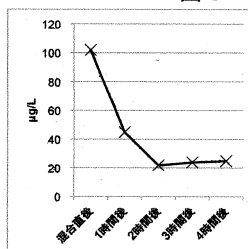


図 4 濁度の変化

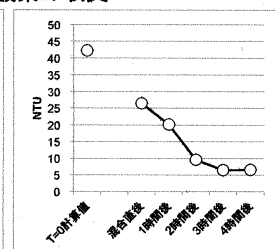


図 5 上清中の全 DNA 濃度の変化

上清中及び活性汚泥中の細菌群集構造の変化を RFLP 法で分析した結果を図 6 に示す。下水には 400bp 程度の位置に強いバンドが見られ、一方返送汚泥にはその位置にはごく弱いバンドしか見られず、むしろ 500bp 強の位置のバンドが目立っていた。一方下水と返送汚泥を混合した直後の上清試料にはそれらいずれの位置にも強いバンドが見られ、そして、時間の経過とともに 400bp の位置のバンドは弱くなっていった。また、より短いバンドが徐々に増加していた。こうしたことは、処理が進むとともに上清中の細菌群集構造が変化することを反映していると考えられる。一方、活性汚泥混合液についても 1 時間後の試料では 400bp 程度の位置にバンドが強く見えており、時間の経過とともにそれが弱まっていつ

た。下水由来の微生物が活性汚泥微生物によって除去されたことに対応すると考えられる。

図7に実験に用いた下水と活性汚泥、および、各上清中の細菌群集構造のシーケンス解析の結果を示した。下水では *Campylobacteraceae* 科が約40%を占めていたが、反応の進行とともに減少し、4時間後にはその割合は約5%になっていた。一方、*Sphingomonadaceae* 科が顕著に増加し、4時間後のその割合は25%程度であった。また、下水には検出されなかった *Thiotrichaceae* 科の割合が処理にともなって増加し、最終的には活性汚泥とほぼ同等（約13%）になっていた。なお、大腸菌を含む *Enterobacteriaceae* 科は下水において0.6%程度を占めたに過ぎず、4時間後の上清には検出されなかった。また、活性汚泥中では0.4%程度を占めていた。

さらに属レベルでの同定・群集構造解析結果についてPCA解析を行ったところ、図8のような結果となった。処理にともないPC1の値が活性汚泥のそれに近づいたが、PC2値は上昇していった。また、変化は処理はじめの2時間程度は大きかったが、3時間目以降は小さかったこともわかる。こうした印象はRFLPの結果とも共通する。

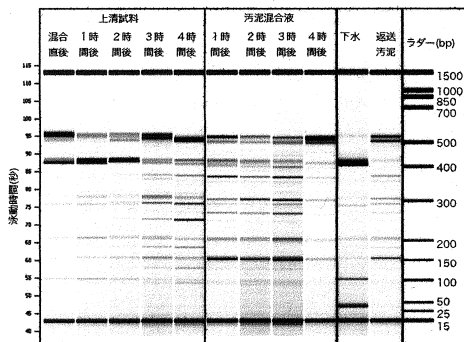


図6 16S rRNA 遺伝子組成 RFLP 解析の結果

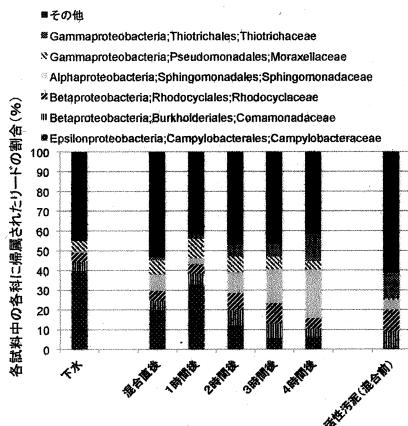


図7 上清中 16S rRNA 遺伝子組成の変化 (科レベルで同定)

4. 考察

混合後 MLVSS 約 1,000mg/L、COD 約 100mg/L となるような条件で実験した。COD は通常の下水よりやや薄めである。

有機物除去に関しては、混合直後に投入 COD の約半分が除去され、最初の1時間の反応でほぼ除去は完了したように見える。固液分離のため重力沈殿により固液分離していることに注意されたい。単に最初沈殿池で沈殿しきらなかった SS 分が固液分離のための再度の沈殿操作によって除去されたと見ることもできる。しかし、もしそうであれば、初沈越流水に含まれる有機物は、生物処理を省略してもう一度沈殿操作をするだけでも半分くらい除去できるということになる。また、濁度の除去は2時間程度で完了した。

また、下水中の微生物は上清中の DNA 濃度の減少から特に最初の2時間で速やかに進行したものと見られる。シーケンス解析結果からは、3時間目以降は上清中の細菌群集構造の変化は小さかった。

以上より、上清の処理は有機物除去については1時間程度、また、下水中の微生物の除去は2、3時間程度でおおむね完了したと判断できる。

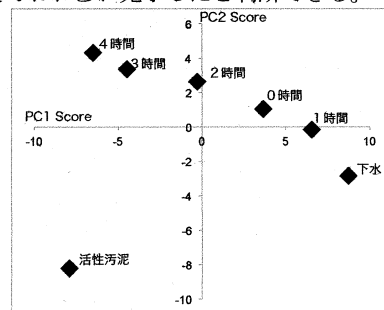


図8 上清中 16S rRNA 遺伝子組成の PCA 解析

5. 結論

本研究では実下水（初沈越流水）を活性汚泥処理し、COD や濁度の除去過程を調べるとともに、下水由来の細菌群の活性汚泥処理中の消長を追跡した。汚泥返送率33%に相当する条件で実験した。大半のCODは1時間程度でほぼ除去され、その約13%程度に相当する量が活性汚泥にPHAとして蓄積された。濁度の除去は最初の2時間ではほぼ完了し、下水中の細菌群の除去も2～3時間程度でほぼ完了した。

謝辞

本研究の一部は科学研究費補助金(22246069)により補助された。シーケンシングをして下さった東京大学服部正平研究室、また、現場実験にご協力下さった下水処理場・関係者の皆様に謝意を表す。

引用文献 1) Caporaso *et al.* (2010) *Nature Methods*, doi:10.1038/nmeth.f.303)、2) Satoh *et al.* (2013) *Microbes and Environments*, 28, 65-70.