

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13859

研究課題名(和文)浄化槽の真の微生物漏出リスクの解明

研究課題名(英文)Actual Risk of Microbial Leakage from Decentralized Wastewater Treatment Facility (Johkasou)

研究代表者

石黒 泰 (Ishiguro, Yasushi)

岐阜大学・流域圏科学研究センター・助教

研究者番号：10743891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：浄化槽から水環境に放出される微生物リスクを正確に評価するために、浄化槽処理水質に細菌が与える影響とVBNC状態(生きていても培養できない)の細菌も評価できる検出法を用いて細菌の漏出リスクの評価を行った。処理水の水質が良い浄化槽においては、剥離した生物膜が汚泥として沈殿する過程において、多くの細菌が除去されたと考えられ、細菌の流出も抑えられていたと考える。また、浄化槽の処理工程で検出された細菌の多くは死細菌であり、沈殿槽で検出される細菌の多くも死細菌であったものの、VBNC状態の細菌も含まれることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、直接的には浄化槽の維持管理の現場で直接役立つ知見となる。特に、剥離した生物膜が汚泥として沈殿する過程での細菌をより多く除去することにより、処理水質の向上だけでなく、微生物の流出リスクを減らすことができることは、浄化槽の維持管理の現場にとって重要な知見と考える。また、本研究は浄化槽や戸別汚水処理に関する学術研究、応用研究の基礎となる浄化槽内の細菌叢の変化における知見を多く提供しており、本研究の成果を礎として、さらなる研究の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to accurately evaluate the risk of microorganisms being released from the decentralized wastewater treatment facility (Johkasou) into the aquatic environment, the impact of bacteria on the quality of treated water, and the risk of bacterial leakage using a detection method that can evaluate VBNC (Viable but non culturable) bacteria were evaluated. In the Johkasou with good quality of treated water, it is considered that many bacteria are removed during the sedimentation process of detached biofilm as sludge, and the leakage of bacteria is suppressed. Although most of the bacteria detected in the treatment process of the Johkasou were dead bacteria, and most of the bacteria detected in the sedimentation tank were also dead bacteria, it was suggested that VBNC bacteria were also included.

研究分野：環境工学

キーワード：浄化槽 汚水処理 細菌群集 次世代シーケンス解析 リアルタイムPCR Propidium monoazide

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

浄化槽は、家庭から排出される汚水を処理するための小型汚水処理施設として下水道未整備地区で広く利用されており、生活排水処理において重要な役割を果たしている。いっぽうで、浄化槽の放流水に含まれる細菌が放流水質に影響を与えるとともに放流先の環境に影響を与えることが危惧される。これまでに、浄化槽において培養法で検証した報告はあるものの、VBNC 状態（生きてはいるけれども培養できない）の細菌に着目した研究は無い。浄化槽からの VBNC 状態の微生物も含めた真の微生物の漏出リスクを評価することで、浄化槽が環境へ与える影響をより正確に評価できると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 小型合併処理浄化槽の処理水質と細菌量および細菌群集構造の関係を明らかにするとともに、汚水処理工程における細菌の消長と発生源を明らかにする。

(2) 小型合併処理浄化槽の内水からの高精度の DNA 抽出法を検討するとともに、細胞膜不透過性で死細菌の DNA に結合し、PCR を阻害する Propidium monoazido (PMA) による処理と Real-time PCR 法を組み合わせた DNA 修飾 Real-time PCR 法による生細菌の検出法を開発し、培養法と組み合わせることで、VBNC 状態の細菌も含めた浄化槽の放流水による真の微生物漏出リスクを評価するとともに細菌群集構造との関係を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 一般家庭に設置されている小型合併処理浄化槽において、処理工程に沿って処理水および汚泥、生物膜を採取し、処理水の水質を調査するとともに、処理水および汚泥から DNA を採取し、16S rRNA 遺伝子のコピー数を基に細菌量を定量するとともに、16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンス解析を行い、細菌群集構造と処理水質の関係を検討した。

(2) 小型合併処理浄化槽の処理水からの高精度の DNA 抽出法を検討するために、5 種の市販の DNA 抽出キットを用いて、DNA の抽出量、16S rRNA 遺伝子のコピー数、次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造の比較を行い、最適な DNA 抽出キットの検討を行った。また、純粋培養した大腸菌を用いて PMA による処理の最適濃度を検討した。

その上で、一般家庭に設置されている小型合併処理浄化槽において、処理工程に沿って処理水を採取し、16S rRNA 遺伝子を対象としたリアルタイム PCR と PMA を用いた DNA 修飾 Real-time PCR 法を用いて生細菌、死細菌の定量を行うとともに、培養法で測定した細菌数と比較検討した。また、PMA 処理、PMA 未処理のサンプルから抽出した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンス解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 処理水槽内水の透視度が高く、BOD が低い場合は、嫌気槽（夾雑物除去槽、嫌気ろ床槽）、好気槽（接触ろ床槽内水、処理水槽）と処理が進むにつれ、16S rRNA 遺伝子のコピー数が減少する傾向がみられた。いっぽうで、処理水槽の透視度が低く、BOD が高い浄化槽においては、処理水槽内水の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は BOD が低い浄化槽に比べて多く、好気槽（接触ろ床槽内水、処理水槽）において細菌数の増加がみられるものもあった。

処理水槽内水における 16S rRNA 遺伝子のコピー数と BOD の関係を見てみると（図 1）、1%の危険率で両者に有意な相関がみられたことから、処理水槽内水の残存有機物量に細菌数が影響を及ぼしていることが示唆された。

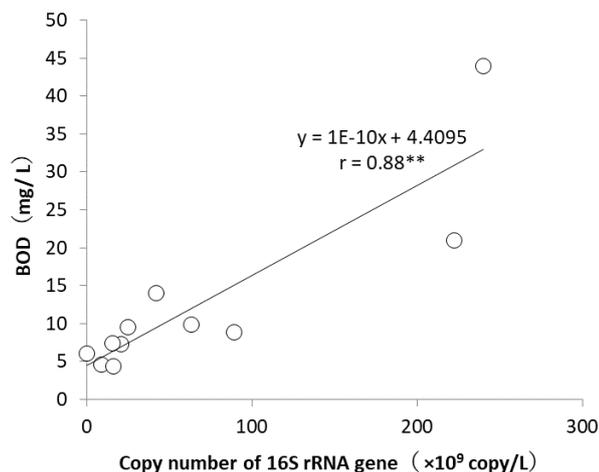


図 1 処理水槽内水における 16S rRNA 遺伝子のコピー数と BOD の関係

(2) 上記のサンプルのうち、処理水槽内水の透視度が高く、BOD が低い浄化槽と透視度が低く、BOD が高い浄化槽の抽出 DNA を用いて次世代シーケンサーを用いた 16S メタゲノム解析を行った。多様性指数 (Shanon index) を比較すると、嫌気槽（夾雑物除去槽、嫌気ろ床槽）、好気槽より（接触ろ床槽内水、処理水槽）のほうが細菌の多様性が大きくなっていることが明らかとなった。また、嫌気槽では嫌気性の細菌が、好気槽では好気性の細菌が優占種となり、嫌気槽と好気槽で細菌群集が大きく異なることが明らかとなった。

主座標分析 (PCoA) (図 2) において、嫌気槽のサンプルは、両者ともに近くに位置していたものの、好気槽においては、BOD の高い浄化槽と低い浄化槽で異なる位置に分布していた。このことから、処理水に含まれる細菌は流入水や嫌気処理からの流入ではなく好気処理の段階で増えたものと考えられる。好気槽において、接触材付着生物膜、堆積好気汚泥、接触ろ床槽内水、処理水槽内水の細菌群集を PCoA により比較したところ、BOD の高い浄化槽において微生物群集構造は類似していた。いっぽうで、BOD の低い浄化槽においては、接触材付着生物膜と堆積好気汚泥の細菌群集構造は類似していたものの、処理水槽内水中の細菌群集構造は異なっており、生物膜から剥離した生物膜が汚泥として沈殿する過程において、多くの細菌が除去されたと考えられ、それが BOD の低さすなわち処理水質の良さにつながっており、細菌の流出も抑えられていたと考える。

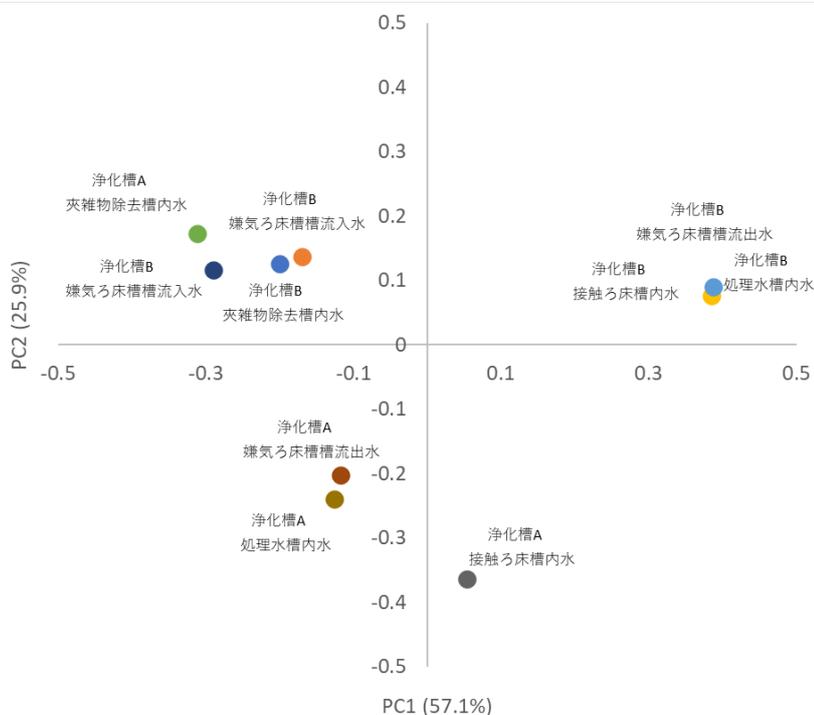


図 2 処理水槽内水における微生物群集の主座標分析 (PCoA)

(3) 5 種類の市販の DNA 抽出キットによる DNA の抽出効率を比較するために純粋培養で作成した大腸菌 (*Escherichia coli*) 懸濁液から希釈により濃度の異なる大腸菌懸濁液を作成し、そこから各 DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、全細菌 (16S r RNA 遺伝子) をターゲットとしたリアルタイム PCR 法を用いて DNA 濃度を比較した。

高濃度の希釈なしの大腸菌懸濁液において 1 キット DNA 濃度が低い結果となった。低濃度である 1000 倍希釈においては、5 キットそれぞれ 0.20 ng/μL、0.11 ng/μL、0.09 ng/μL、0.05 ng/μL、0.04 ng/μL の順で測定された DNA 濃度が高かった。

さらに実現場の浄化槽処理水 5 mL をろ紙でろ過し、処理水中の細菌を捕捉したろ紙から DNA の抽出を行い比較した。その結果、用いた 4 サンプルのうち 3 サンプルで同一のキットが高い DNA 濃度であった。また、残りの 1 サンプルで最も高い DNA 濃度であったキットは他の 3 サンプルにおいても 2 番目に高い DNA 濃度であった。低濃度の大腸菌懸濁液 (1000 倍希釈) で抽出 DNA の濃度が高かった 1 キットは浄化槽処理水においては低かった。このことから、このキットは浄化槽処理水に含まれる夾雑物の影響を大きく受けたことが考えられる。

次世代シーケンス解析における検出結果の比較を行ったところ、細菌量の多いサンプルでは Kit 間に大きな違いは見られなかった。細菌量の少ないサンプルにおいては Read 数および OTU 数において差が見られたものの、多様性指数 (Shanon index) については差が少なかった。これらのことから、定量解析においてはキットの種類が影響するものの、微生物群集構造は反映されると考える。

(4) PCR 法での微生物の検出は遺伝子検出法には死菌由来 DNA も検出するという課題がある。しかし、選択的膜透過性色素である Propidium monoazide (PMA) を前処理に組み合わせることにより生きていた菌のみの定量が可能となる。ここでは浄化槽の処理水から生菌のみを検出するための最適な前処理法の検討を行った。処理試薬として従来の PMA™よりも死細胞を効率的に排除できるといわれる PMAxx™ (Biotium 社) を用い、その最適な処理方法を検討した。

細菌濃度の低いサンプルの場合は PMAxx™を処理する際に試料水中の細菌を集菌し、処理を行う必要がある。そこで、3 種類の異なるフィルターを用いて集菌し、フィルター上で PMAxx™処理を行う方法および遠心分離を用いて集菌し、高濃度の細菌懸濁液に PMAxx™処理を行う方法を比較した結果、遠心分離を用いた集菌法が適していることが明らかとなった。また、PMAxx™の最適な処理濃度は 12.5 mM もしくは 25 mM であることが明らかとなった。この方法と従来の培養法を組み合わせることで VBNC 細菌も検出できると考える。

(5) 合併処理浄化槽処理工程における残存有機物に関連する生細菌および死細菌の量的変化

を明らかにするために一般家庭に設置されている実稼働中の6基の浄化槽からサンプル（水）を採水し、前段で検討したPMAを用いたDNA修飾Real-time PCR法と従来のReal-time PCR法を併用し、各処理工程における生細菌、死細菌の定量を行った。同時に、培養法による大腸菌群数と細菌数の定量も行った。

その結果、浄化槽の処理工程の多くで、死細菌が高い割合を占めていた。処理水槽内水においては6基の浄化槽のうち4基の浄化槽で生細菌の割合は30%以下であった（図3）。

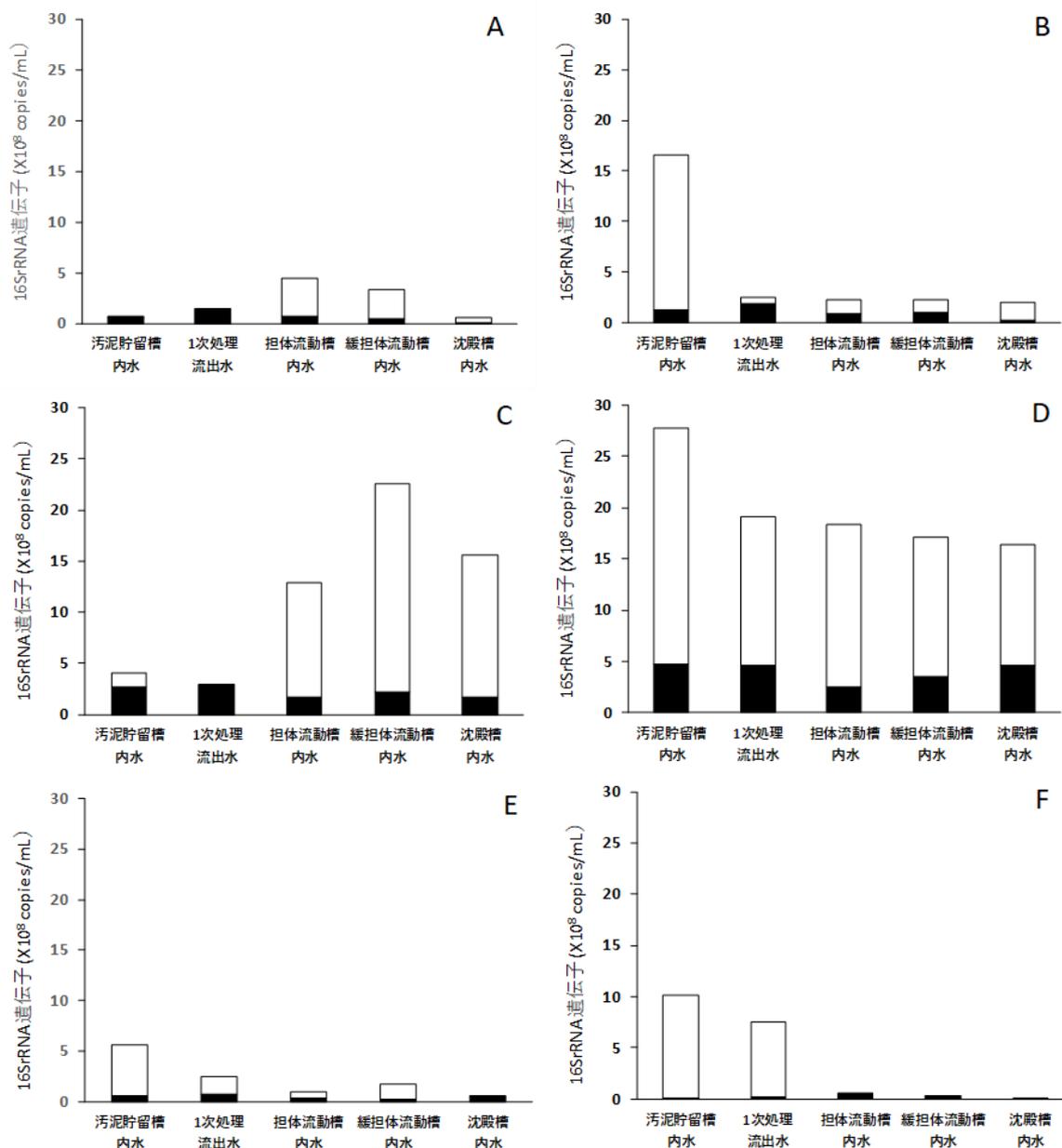


図3 各浄化槽の処理工程における生細菌および死細菌の変化

■:生細菌、□:死細菌

処理水槽内水のC-BODが最も高かった浄化槽においては全細菌に占める生細菌の割合は最も低く11%であり、処理水槽内水中の細菌の多くが死細菌であった。

浄化槽の処理工程で検出された細菌の多くは死細菌であり、沈殿槽で検出される細菌の多くも死細菌であった。いっぽうで、培養法による細菌の検出結果と比較したところ、消毒後の放流水に含まれる大腸菌群数が基準の3000個/mL以下を満たしている浄化槽においても一定数の生細菌が含まれており、VBNC（生きてはいるけれども培養できない）状態の細菌も含まれることが示唆された。

PMA未処理のサンプルにおける細菌群集構造においては、処理工程におけるすべての槽でプロテオバクテリア門の細菌の割合が最も多く、次いでバクテロイデス門の細菌であった。嫌気処理工程においてはフィルミクテス門の細菌も一定割合存在した。PMA処理での生細菌における細菌群集構造をPMA未処理の微生物群集構造と比較すると、バクテロイデス門の細菌の割合が減少しており、相対的にプロテオバクテリア門の細菌の割合が増加しており、浄化槽中の細菌の生死の割合は種などによって異なることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石黒 泰, 崔 广宇, 藤澤 智成, 安福 克人, 奥村 信哉, 玉川 貴文, Joni Aldilla FAJRI, 李 富生	4. 巻 74
2. 論文標題 合併処理浄化槽における微粒子および細菌の変動と処理水槽内水中の残存有機物	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 土木学会論文集G (環境)	6. 最初と最後の頁 III_415 ~ III_422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2208/jscej.74.III_415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 石黒 泰, 李 富生
2. 発表標題 合併処理浄化槽内水からの効率的な細菌DNAの抽出方法の検討 - 5種の市販DNA抽出キットの比較 -
3. 学会等名 令和元年度日本水環境学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasushi Ishiguro, Katsuhito Yasufuku, Fusheng Li
2. 発表標題 Relationship between Residual Organic Matter and 16S rRNA Gene in the Treated Water of Household Wastewater Treatment Facility (Johkasou)
3. 学会等名 The 10th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in Asian Mega-cities (EPAM 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haoning Su, Jingyue Wei, Wenjiao Li, Zaw Min Han, Shinya Okumura, Yuzo Nozawa, Yu Fujieda, Yasushi Ishiguro, Toshiro Yamada, Fusheng Li
2. 発表標題 Characterization of Sludge in Johkasou: Investigation Based on Settleability and Activity
3. 学会等名 The 10th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in Asian Mega-cities (EPAM 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石黒 泰, Haoning Su, Jingyue Wei, 奥村信哉, 野沢佑造, 藤枝 祐, 李 富生
2. 発表標題 PMA-qPCR法による合併処理浄化槽処理工程における細菌の定量
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasushi Ishiguro, Katsuhito Yasufuku, Fusheng Li
2. 発表標題 Household wastewater treatment by Johkasou: Impacts of operational conditions
3. 学会等名 The 1st Joint International Seminar and Field Studies of South China University of Technology and Gifu University on Water Treatment and Waste Management (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤枝祐, 奥村信哉, 野澤佑造, 大河内允基, 蘇浩寧, 石黒泰, 李富生
2. 発表標題 沈降性と微生物の活性に基づく小型合併浄化槽の堆積汚泥の評価
3. 学会等名 第57回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haoning Su, Wenjiao Li, Zaw Min Han, Shinya Okumura, Yuzo Nozawa, Yu Fujieda, Yasushi Ishiguro, Fusheng Li
2. 発表標題 Activity of bacteria affects the settleability of sludge in Johkasou
3. 学会等名 UGSAS-GU & BWEL Joint Poster Session on Agricultural and Basin Water Environmental Sciences 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------