

令和元年6月24日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02838

研究課題名(和文) 糸状性コウレオスリックス属細菌の制御による下水処理活性汚泥の固液分離向上化

研究課題名(英文) Improvement of solid-liquid phase separation of activated sludge in municipal wastewater treatment plant by controlling the filamentous bacteria Kouleothrix

研究代表者

新田見 匡 (NITTAMI, Tadashi)

横浜国立大学・大学院工学研究院・特別研究教員

研究者番号：20377089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：国内各地の下水処理施設の調査において、活性汚泥中に糸状性コウレオスリックス属細菌が優占する施設では、最終沈殿池において活性汚泥の固液分離性が悪化することを明らかにした。また糸状性コウレオスリックス属細菌の増殖を抑制する手段として、処理系列への窒素除去プロセスの導入が有望である結果を示した。さらに糸状性コウレオスリックス属細菌と処理施設の運転条件との統計解析により、同細菌の増殖制御に有効な因子の候補を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性汚泥法は技術的に確立された廃水処理法として世界で広く普及している。しかし活性汚泥中の糸状性細菌の過剰な増殖によって生じる活性汚泥の固液分離障害は、未だ解決されない最大の運転障害の一つである。本研究では国内の多くの施設における同障害の一因が、糸状性コウレオスリックス属細菌の優占である可能性を示した。また国内各地の下水処理施設の調査結果に基づき、同細菌の増殖の制御に有効な処理方式や環境因子の候補について提示した。

研究成果の概要(英文)：In the survey of several municipal wastewater treatment plants in Japan, the authors found that the abundance of filamentous bacteria Kouleothrix spp. in activated sludge biomass often caused the problem of bulking, where the solid and liquid phases of mixed liquor fail to separate rapidly and effectively in secondary settling tanks. The survey also indicated that the introduction of nitrogen removal process inhibited the growth of Kouleothrix spp. Moreover, the statistical analysis of possible relationships between Kouleothrix high abundance and operational parameters of a wastewater treatment plant revealed possible clues as to how its growth might be controlled in treatment plants.

研究分野：環境生物化学工学

キーワード：環境技術 水質汚濁・土壌汚染防止・浄化 反応・分離工学 糸状性細菌 バイオリクター

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法は技術的に確立された廃水処理法として世界で広く普及している。しかし活性汚泥中の糸状性細菌の過剰な増殖によって生じる活性汚泥の固液分離障害は、未だ解決されない最大の運転障害の一つである。活性汚泥の固液分離障害は、放流水質の悪化や腐敗臭の発生などの維持管理上の問題、また病原性微生物の飛散・蔓延等の公衆衛生上の問題をもたらす。さらには反応槽内の活性汚泥濃度の低下とそれに伴う廃水処理性能の悪化、汚泥循環量の増大を招き、廃水処理施設のエネルギー消費を増大させる要因となっている。

糸状性細菌の増殖を抑制するため、これまで活性汚泥反応槽をブラックボックスとして扱う経験的な制御が行われてきた。しかし鍵となる糸状性細菌を把握せず、細菌群集全体を制御する非特異的な方法では、得られる効果に限界があった。廃水処理施設の固液分離障害を解決するには、障害を誘引する細菌種の把握とその特異的な制御方法の確立が必要である。

近年、分子生物学的手法の導入により、固液分離障害の施設で優占する糸状性細菌の多様な形態と系統が正確に理解され始めた。しかしこれまでのところ、優占種の量と汚泥の固液分離特性との定量的な関係や、優占種の生態に関する情報は乏しく、特定の微生物を制御して固液分離障害を解消するための有用な知見を得るには至っていない。

### 2. 研究の目的

代表者らは先行研究において、都市下水活性汚泥の固液分離特性と活性汚泥中のコウレオスリックス属の糸状性細菌（以下 *Kouleothrix*）（図1）量との間に、正の相関があったことを報告した。この結果は *Kouleothrix* の過剰な増殖が対象施設の活性汚泥の固液分離障害の原因であった可能性を示すとともに、*Kouleothrix* の増殖を抑制することで、固液分離障害が解消されることを示唆する結果であった。本研究では調査対象とする都市下水処理施設の数を増やし、*Kouleothrix* と活性汚泥の固液分離特性と定量的な関係を検証するとともに、*Kouleothrix* の増殖を抑制する環境因子を探索することを主な目的とした。

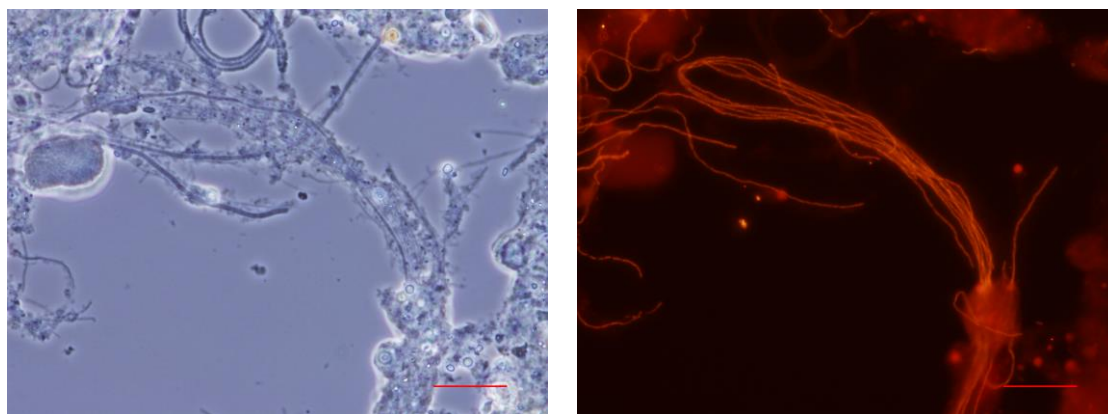


図1 活性汚泥中の *Kouleothrix* の顕微鏡画像：a) 位相差観察画像、b) FISH 観察画像。a) と b) は同一視野で撮影した画像であり、b) の FISH 観察画像で赤く染まっている糸状体が *Kouleothrix* を示す。スケールバーのサイズは 20  $\mu\text{m}$ 。

### 3. 研究の方法

#### (1) 国内各地の下水処理施設における *Kouleothrix* の実態調査

##### ① 活性汚泥試料と DNA 抽出

国内各地の都市下水処理施設（12 施設 48 系列）より計 64 の活性汚泥試料を採取した。各活性汚泥試料は Tris-EDTA buffer ( $\text{T}_{10}\text{E}_1$ , pH 8.0) で洗浄した後、DNA の抽出に供するまで  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。DNA の抽出は土壌等から DNA を抽出するためのキット（ISOIL for Beads Beating, ニッポンジーン, 東京）を用いて行った。また分光光度計（NanoVue Plus, GE ヘルスケア・ジャパン, 東京）により、抽出した DNA の濃度を測定した。

##### ② 定量 PCR

活性汚泥より抽出した各 DNA 試料に対し、*Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子を標的とした定量 PCR を既報（Nittami *et al.* 2017（雑誌論文②））に従って行った。定量 PCR により各試料中に含まれる *Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数を測定した。同コピー数の値により、各試料における *Kouleothrix* の多少を判断した。

##### ③ 活性汚泥の固液分離特性

活性汚泥の固液分離特性の指標として汚泥容量指標（SVI）を使用した。SVI の値が高いほど活性汚泥の固液分離性が低いことを示す。一般に固液分離性が良好とされる活性汚泥の SVI は  $150\text{--}200 \text{ mL g-sludge}^{-1}$  以下とされる。

#### (2) 都市下水処理施設における *Kouleothrix* の動態調査

##### ① 定量 PCR

都市下水処理場の同一系列の反応槽より、1 年間継続的に活性汚泥試料を採取した。(1)-①と

同様に各試料より DNA を抽出し、既報 (Nittami *et al.* 2017 (雑誌論文②)) に従って *Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子に特異的な定量 PCR を行った。

## ② 重回帰分析

処理施設で測定している SVI および表 1 に示す水質・運転管理項目のデータを入力し、表 1 の各項目を説明変数、定量 PCR で得られた遺伝子コピー数を目的変数とした重回帰分析を行い、*Kouleothrix* の増殖に影響を与える環境因子を探索した。

表 1 重回帰分析に使用した水質・運転管理項目

最初沈殿池越流水質項目	BOD, SS, T-N, T-P
反応タンク運転管理項目	水温, pH, MLSS, DO, 汚泥返送率, HRT, SRT, 返送汚泥 SS

BOD: 生物化学的酸素要求量、SS: 浮遊物質、T-N: 全窒素、T-P: 全りん、MLSS: 活性汚泥浮遊物質、DO: 溶存酸素、HRT: 水理学的滞留時間、SRT: 固形物滞留時間

## 4. 研究成果

### (1) 国内各地の下水処理施設における *Kouleothrix* の実態

国内各地の下水処理施設より採取した活性汚泥試料の SVI 値と *Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子コピー数との関係を図 2 に示す。コピー数が  $10^5$  copies ng-DNA<sup>-1</sup> 以上の試料では、SVI 値が概ね 200 mL g-sludge<sup>-1</sup> を超えていた。これは *Kouleothrix* が多く存在する活性汚泥では、SVI が高く固液分離性が低いことを示す結果であった。しかし SVI 値が 300 mL g-sludge<sup>-1</sup> を超える試料であっても、コピー数が  $10^4$  copies ng-DNA<sup>-1</sup> 未満となるものも複数あった。施設によっては *Kouleothrix* 以外のバルキングの原因を探索する必要があることも分かった (Nittami *et al.* 2019 (雑誌論文①))。

次に活性汚泥試料を採取した処理系列で採用するプロセスを 4 つに分類し、プロセスごとの *Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子コピー数の平均値を比較した結果を図 3 に示す。図 3 よりプロセス N (窒素除去プロセス) では、他の 3 つのプロセス (C: 標準活性汚泥法、P: リン除去プロセス、N&P: リン・窒素同時除去プロセス) に比べ、*Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子コピー数が低かった。この結果は窒素除去プロセスを採用することで、*Kouleothrix* の増殖を抑制し、活性汚泥の固液分離特性が向上する可能性を示すものであった (Nittami *et al.* 2019 (雑誌論文①))。

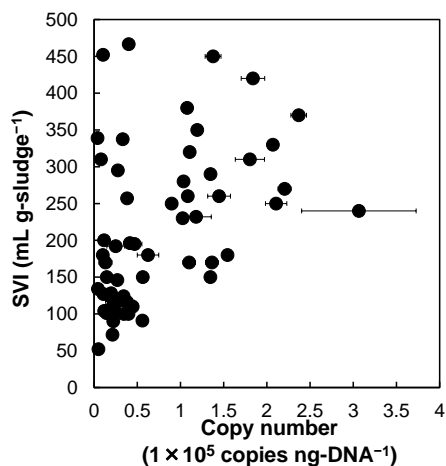


図 2 *Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子コピー数と SVI との関係 (新田見ら, 2017 (学会発表③)の講演要旨) より転載。

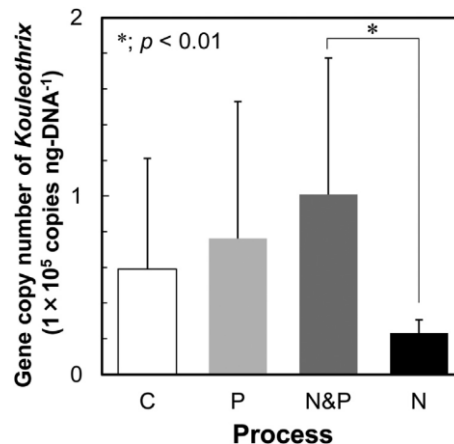


図 3 各プロセスにおける *Kouleothrix* の 16S rRNA 遺伝子コピー数の平均値。(Nittami *et al.* 2019 (雑誌論文①) より転載)。

### (2) 都市下水処理施設における *Kouleothrix* の動態とその影響因子

本調査ではリン・窒素同時除去プロセスを採用する都市下水処理場の 1 系列を対象とした。活性汚泥の SVI と *Kouleothrix* の遺伝子コピー数の経時的な変化を図 4 に示す。両者の増減の挙動は年間を通して似た傾向を示した。特に 6-8 月 (夏季) の期間は顕著であった。本調査系列では *Kouleothrix* の増減が年間を通して活性汚泥の沈降性に影響を与えていた可能性が高く、*Kouleothrix* の増殖制御により固液分離性の向上が期待できるものとする。

*Kouleothrix* の遺伝子コピー数と水質・運転管理項目とを因子とした重回帰分析の結果、*Kouleothrix* の遺伝子コピー数と最初沈殿池越流水の SS、反応タンクの SRT、および返送汚泥 SS との間にそれぞれ有意な正の相関を得た。この結果は同因子群の操作により *Kouleothrix* の増減を制御できる可能性を示すものであった。

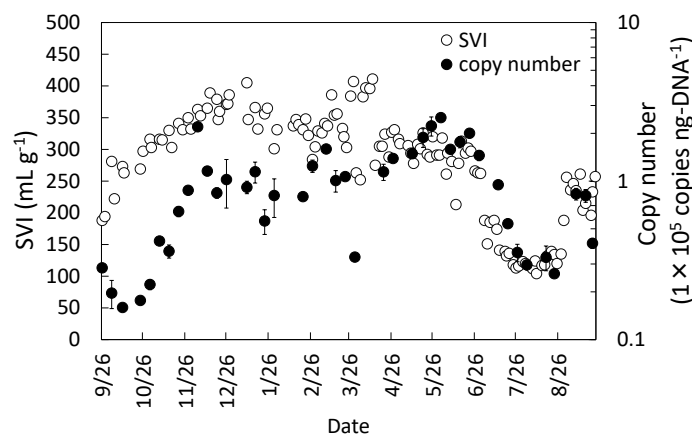


図4 リン・窒素同時除去プロセスを採用する処理系列における SVI と *Kouleothrix* の遺伝子コピー数の 1 年間の変化 (新田見ら, 2018 (学会発表②の講演要旨) より転載)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nittami T., Shoji T., Koshiba Y., Noguchi M., Oshiki M., Kuroda M., Kindaichi T., Fukuda J., Kurisu F. (2019) Investigation of prospective factors that control *Kouleothrix* (Type 1851) filamentous bacterial abundance and their correlation with sludge settleability in full-scale wastewater treatment plants. *Process Saf Environ*, 査読有, 124: 137-142. DOI: 10.1016/j.psep.2019.02.003
- ② Nittami T., Speirs L.B.M., Yamada T., Suzuki I., Fukuda J., Kurisu F., Seviour R.J. (2017) Quantification of *Chloroflexi* Eikelboom morphotype 1851 for prediction and control of bulking events in municipal activated sludge plants in Japan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 査読有, 101(9): 3861–3869. DOI: 10.1007/s00253-016-8077-4

[学会発表] (計 9 件)

- ① 鈴木 康太、新田見 匡、小林 稔真、笠倉 理紗、武田 穰、小柴 佑介、福田 淳二、鈴木 市郎、飛野 智宏、下水処理施設におけるバルキング関連糸状性細菌 *Kouleothrix* の季節変動とその影響因子、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ② 新田見 匡、小柴 佑介、福田 淳二、庄司 仁、飛野 智宏、栗栖 太、バルキング関連糸状性細菌 *Kouleothrix* の増減に影響を与える因子の探索、第 52 回日本水環境学会年会、2018
- ③ 新田見 匡、小柴 佑介、福田 淳二、野口 愛、押木 守、黒田 真史、金田一 智規、栗栖 太、国内下水処理場におけるバルキング関連糸状性 *Kouleothrix* 属細菌の調査、第 54 回下水道研究発表会、2017
- ④ 新田見 匡、庄司 仁、野口 愛、押木 守、黒田 真史、金田一 智規、福田 淳二、栗栖 太 FISH 法と定量 PCR 法による国内下水処理施設におけるバルキング関連糸状性細菌の探索、第 68 回日本生物工学会大会、2016
- ⑤ Nittami T., Shoji T., Speirs L.M.B., Noguchi M., Oshiki M., Kuroda M., Kindaichi T., Fukuda J., Kurisu F., Seviour R.J., Identification and quantification of *Chloroflexi* Eikelboom type 1851 filamentous bacteria associated with sludge settleability in municipal wastewater treatment plants in Japan, The 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME16), 2016
- ⑥ 新田見 匡、押木 守、福田 淳二、栗栖 太、Real-time PCR 法によるバルキング関連 *Kouleothrix* 属糸状性細菌の定量、第 50 回日本水環境学会年会、2016
- ⑦ 庄司 仁、新田見 匡、金田一 智規、黒田 真史、野口 愛、押木 守、活性汚泥の沈降性に対する *Kouleothrix* 属糸状性細菌の影響—日本各地の下水処理施設における実態調査—、第 50 回日本水環境学会年会、2016
- ⑧ 新田見 匡、福田 淳二、栗栖 太、都市下水処理施設における活性汚泥バルキング指標と *Kouleothrix* 属糸状性細菌量との関係、化学工学会第 81 年会、2016
- ⑨ Nittami T., Studies of filamentous bacteria in activated sludge wastewater treatment systems, Mini Symposium on Wastewater Treatment & Reclamation, 2016

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：栗栖 太

ローマ字氏名：(KURISU, futoshi)

所属研究機関名：東京大学

部局名：工学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30312979

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。