

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14334

研究課題名(和文)排水処理リアクターの微生物生態系における食物連鎖の定量的評価

研究課題名(英文)Quantitative evaluation of microbial food chain in wastewater treatment reactor

研究代表者

小野寺 崇 (Onodera, Takashi)

国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員

研究者番号：30583356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、活性汚泥における微生物生態系を制御した実験を行うことで、微生物の食物連鎖の変化に対して、窒素安定同位体比の変化を調べた。具体的には、捕食-被食作用の影響のみを把握するため、活性汚泥を飢餓条件下(曝気のみ条件)において運転し、活性汚泥を連続的に採取して分析に供することで、窒素安定同位体比等の変化を把握した。その結果、36日後には活性汚泥濃度が半減するとともに、窒素安定同位体比が8.3%から10.8%に上昇する傾向が確認された。本研究により、窒素安定同位体の自然存在比に着目することで、微生物食物連鎖の機能(捕食効果)を定量的に評価できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Carbon and nitrogen stable isotope ratios (^{13}C and ^{15}N) were determined in activated sludge, which was exposed to endogenous conditions for 36 days and contained a wide diversity of organisms across several trophic levels. The aim of this study was to elucidate the fluctuation of ^{13}C and ^{15}N through trophic transfer in the microbial consortia. The results show that the activated sludge became more enriched with ^{15}N as degradation proceeded. Eventually, the sludge concentrations in the activated sludge decreased from 1610 to 710 mg/L and the ^{15}N of the sludge increased from 8.3% to 10.8%. In contrast, the ^{13}C values of the sludge were stable. These findings provide new insights into understanding trophic transfer during microbial community succession and the effects of the feeding process on sludge degradation.

研究分野：環境工学

キーワード：生物学的排水処理 活性汚泥 食物網 下水処理 炭素・窒素安定同位体比

1. 研究開始当初の背景

生物学的排水処理法は、微生物群集を活用したプロセスであり、生活排水や工場廃水の処理による汚濁負荷の低減によって水質汚濁の防止を担っている。排水処理法における処理性能の向上や安定化には、処理を担う微生物群集の機能を理解して、その機能を最大化することが重要である。

代表的な生物処理法である活性汚泥法では、細菌、原生動物、後生動物などの栄養段階の異なる多種多様な生物により食物網が形成されている。この活性汚泥における食物連鎖は、有機物分解のみならず、処理水の清澄性向上や余剰汚泥削減に寄与する重要な役割を担っている。同様に、散水ろ床型の生物排水処理法では、活性汚泥法に比べてより高次な生物が生息しており、生物生態系も複雑であると認識されている。そのため、微生物群集における摂餌関係（被食-捕食の関係）を理解し、食物連鎖の機能を最大限に活かすことは、処理性能の安定化・向上に寄与する重要な鍵であると考えられる。しかし、生物学的排水処理法における微生物群集の食物網に関しては、定量的な解析はほとんど行われておらず、食物連鎖による余剰汚泥削減効果なども未解明であった。これは、微生物の食物連鎖が極めて複雑であることに加え、食物連鎖を解析するツールも無いことが要因として挙げられる。

そこで本研究では、活性汚泥における食物連鎖を把握するため、炭素・窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$) に着目し、新たな解析方法を提案した。 $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ は生物生態系における摂餌関係（食物網）の解析ツールとして広く利用されている¹⁾。 $\delta^{13}\text{C}$ は食物源の指標、 $\delta^{15}\text{N}$ は栄養段階の指標となり、捕食者の $\delta^{15}\text{N}$ は、被食者の $\delta^{15}\text{N}$ と比較して約 3.4‰ 上昇する¹⁾。しかし、活性汚泥に生息する微生物を単独で分析することは現実困難なうえ、微生物の種類や数も膨大であり、その関係性も極めて複雑であることから、実際に $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ を適用した例は極めて少ない²⁾。また、多種多様な微生物を扱う生物学的排水処理の技術では、微生物群集（汚泥）での被食-捕食作用を総合的に評価することが肝要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、窒素安定同位体の自然存在比に着目し、捕食に伴う同位体分別効果を利用して、微生物食物連鎖の機能（捕食効果）を定量的に評価することを目的とする。具体的には、活性汚泥法および散水ろ床法における汚泥や微生物における $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ を把握し、処理特性との影響を比較や、摂餌関係の把握に向けた知見を得る。

3. 研究の方法

活性汚泥における微生物生態系を制御した実験を行うことで、微生物の食物連鎖の变

化に対して、窒素安定同位体比がどのように変化を調べた。具体的には、捕食-被食作用の影響のみを把握するため、活性汚泥を飢餓条件下において運転した。このとき、活性汚泥を連続的に採取して分析に供することで、窒素安定同位体比等の変化を把握した。同時に、水質、汚泥量、微生物相、高次生物を把握し、汚泥の食物連鎖における捕食作用を示すデータを取得した。

本実験では、容量 2L のリアクターを用いて、活性汚泥を飢餓条件（基質供給なし、曝気あり）で培養した。pH は約 7.0 に調整した。温度は 20°C とした。植種汚泥には下水処理場の曝気槽から採取した活性汚泥を用いた。植種汚泥は採取後、速やかに実験室に持ち帰り、DO が残存していることを確認後（4 mg/L 以上）、実験を開始した。実験は 3 連（A~C）で行った。なお、活性汚泥には pH 調整剤を添加して、pH を中性付近となるように調整した。

連続モニタリングでは、リアクターから活性汚泥を定量採取してサンプルに供した。汚泥濃度として MLSS, MLVSS, COD を測定した。また、顕微鏡観察により、微生物生態系の上位である高次生物の種類と存在数を把握した。同時に、遺伝子解析により、飢餓条件下における菌相の変化を把握した。また、温度、pH、DO に加えて、0.45 μm フィルターで濾過したサンプルの COD 及び無機態窒素を測定した。無機態窒素は HPLC を用いて分析した。活性汚泥の炭素・窒素安定同位体比は、元素分析計質量分析計システム（EA-300/-Delta XP system, Finnigan Mat）で測定した。 $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ は以下の式 (1) で算出した。

$$\delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = (\text{R sample} / \text{R standard} - 1) \times 1000 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$\text{R} = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \text{ or } {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \quad \dots \text{式(2)}$$

ここで、R standard は、国際標準物質として、炭素はベレムナイト化石（Pee Dee Belemnite）、窒素は大気中の窒素とした。ワーキングスタンダードとして、D-アラニンと L-ヒスチジンをを用いた。

また、本手法の実下水処理場への適用を目指して、実際の下水処理場における活性汚泥に関する窒素安定同位体比を比較した。流入下水と余剰汚泥の窒素安定同位体比の連続的な比較を行なった。また、処理プロセスが異なる条件において、窒素安定同位体比と活性汚泥法の基礎的データの比較を行う。

4. 研究成果

図-1 に活性汚泥における汚泥濃度の経日変化を示す。活性汚泥は飢餓条件下で運転することで食物連鎖による汚泥分解を促した。実験スタート時、リアクター内の活性汚泥の

MLSS, MLVSS, COD は、それぞれ 2170 mg/L, 1610 mg/L, 2340 mg/L であり、運転継続とともに減少していく傾向が確認された。運転の 5 週間後における平均汚泥濃度は、それぞれ 1150 mg/L, 730 mg/L, 1160 mg/L であり、初期濃度と比較して、概ね半減していることが確認された。このため、活性汚泥は飢餓条件下において、内生呼吸や捕食などの作用により、自己分解が進行していたといえる。

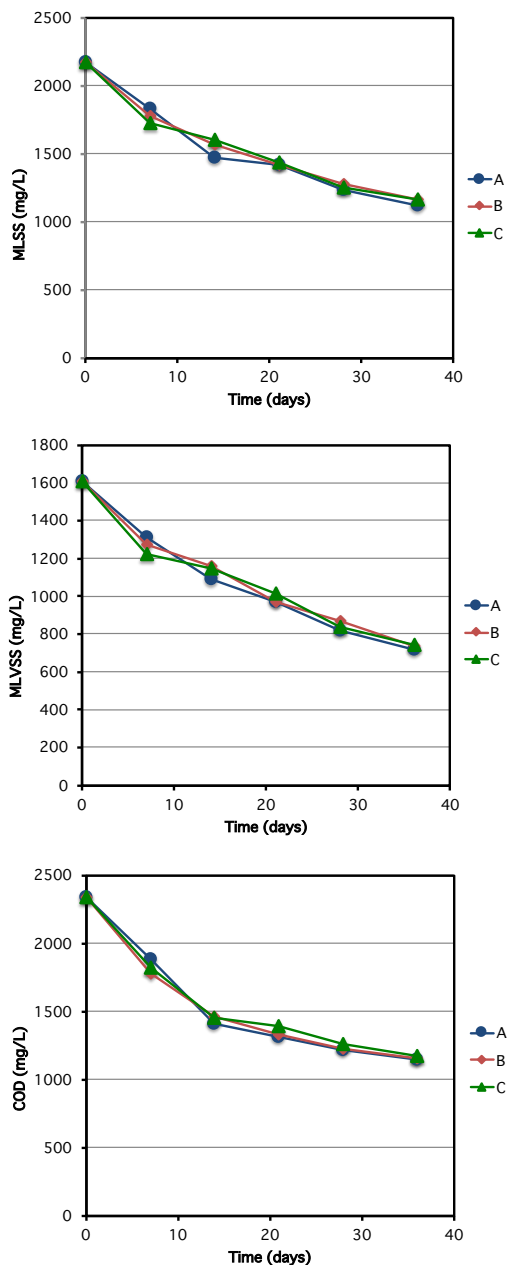


図-1 活性汚泥濃度の変化

図-2 に活性汚泥の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ の経時変化を示す。実験開始時、汚泥の $\delta^{13}\text{C}$ は -25.0% 、 $\delta^{15}\text{N}$ は 8.3% であった。運転継続に伴い $\delta^{13}\text{C}$ は概ね -25.0% となり、大きな変化は確認されなかった。これは、炭素安定同位体比は捕食に伴

う変化はほとんどないためであると考えられる。一方で、汚泥濃度の低下とともに、活性汚泥の $\delta^{15}\text{N}$ は増加する傾向があり、5 週間後には平均 10.8% となった。このため、汚泥の自己分解には、捕食作用の進行が寄与していると考えられた。

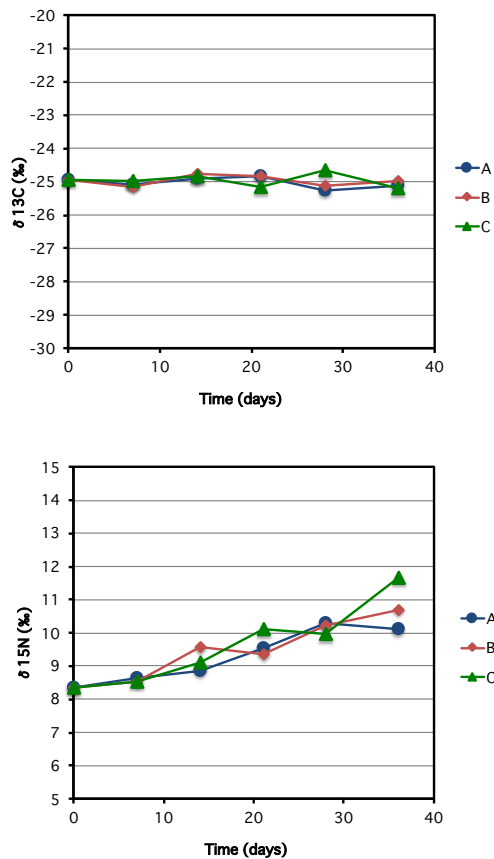


図-2 炭素・窒素安定同位体比の変化

図-3 に顕微鏡観察の結果を示す。本活性汚泥では、運転期間を通じて、原生動物や後生動物の存在が確認された。*Diffugia sp.* や *Arcella sp.* は実験期間を通じて確認された。これらは一次消費者の役割を果たしていること示唆された。また、Rotifers (ワムシ) は二次消費者であると考えられ、運転当初から 28 日目くらいまで優占して存在していた。また、*Tridigrada Macrobiotus ps.* (クマムシ) は 14 日目~28 日目において優占していた。また、*Annelida Aelosoma sp.* は 21 日目~28 日目において優占していた。これらの高次生物による捕食作用が汚泥の分解に寄与していたといえる。興味深いことに、これらの生物は運転経過とともに、存在数が経時的に変化していることが確認された。一方で、高次生物も小型の原生動物や細菌に捕食される様子が確認されたことから、高次生物が捕食者だけでなく被食者となることで、さらに汚泥分解が進行していることが示唆された。

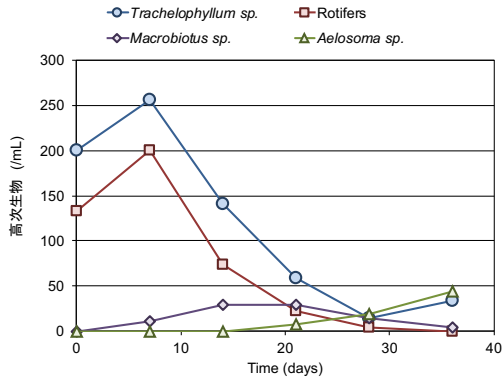


図-3 高次生物叢の変化

本研究では、飢餓条件下で活性汚泥を運転したところ、汚泥濃度の減少とともに、汚泥の $\delta^{15}\text{N}$ が増加する傾向がみられた。これは、食物連鎖を通じた ^{15}N の濃縮が関与していると考えられた。よって、 $\delta^{15}\text{N}$ は活性汚泥の食物連鎖における捕食作用の進行度を示す指標となる可能性が示唆された。

本研究では、世界で初めて活性汚泥における食物連鎖の進行を窒素安定同位体比によって把握することに成功した。本結果は、生物学的排水処理等の微生物群集を活用するプロセスにおいて、微生物の食物連鎖やその機能（捕食機能）の評価に向けて重要な知見である。

また、本研究課題では、散水ろ床法における微生物群集の解析や、実際の下水处理場における炭素・窒素安定同位体比の変化の把握、汚泥中に生息する原生動物の安定同位体比の測定なども行っており（データ省略）、現在解析を進めている。今後、これらの知見も含めて、総合的に解析を進めることで、生物学的排水処理法の捕食機能の活用等による処理機能の安定化や向上に向けて、知見を獲得していく予定である。

参考文献

- 1) Post E.M. (2002) Ecology 83, 703-718.
- 2) Onodera T. et al., (2015) Water Res. 68, 387-393.

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 桑原大輝, 荒木信夫, 押木守, 小野寺崇, 高津文人, 珠坪一晃, 山口隆司 (2018) 窒素安定同位体比を用いた嫌気性原生動物の食物環の解明. 第 52 回日本水環境学会年会, 同予稿集, 658

2. Takashi ONODERA, Kengo KUBOTA, Akinori IGUCHI, Akihiro NAGAMACHI, Tadashi TAGAWA, Gen KANAYA, Kazuaki SYUTSUBO, Changes in Carbon and Nitrogen Stable Isotope Ratio of Biomass and Macrofauna in Down-flow Hanging Sponge Reactor, 4B-15, WET2017.

3. T. Onodera, K. Kubota, A. Iguchi, A. Nagamachi, T. Tagawa, G. Kanaya and K. Syutsubo, Determination of Trophic Relationships Within Biotic Community In Down-flow Hanging Sponge Reactor For Sewage Treatment, 10th International Conference on Biofilm Reactors, H-9, Dublin, Ireland, 9-12 May 2017.

4. 小野寺崇, 珠坪一晃, 金谷弦, 水落元之, 幡本将史, 山口隆司, 窒素安定同位体比を用いた活性汚泥における捕食の進行度の把握, 土木学会第 71 回年次学術講演会, VII-098, 2016. (2016.9.9) (優秀講演者受賞)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.nies.go.jp/subjects/2017/24002_fy2017.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 崇 (ONODERA, Takashi)

国立研究開発法人・国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員

研究者番号：30583356