

平成23年5月26日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19206057

研究課題名（和文） 微生物群集解析に基づく生物学的排水処理プロセスのモデル化

研究課題名（英文） Modeling of Biological Wastewater Treatment Processes Based on Microbial Population Analyses

研究代表者

味埜 俊 (MINO TAKASHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60166098

研究成果の概要（和文）：

活性汚泥中に出現するポリリン酸蓄積細菌や PHA 蓄積細菌を中心とする微生物群集を解析する手法を開発した。PHA 蓄積細菌は α -および β -プロテオバクテリア綱に属するものが中心である事を明らかにし、また、PHA 蓄積細菌を利用し、下水処理プロセスのエネルギー消費を削減する方法を考案した。また、活性汚泥中の微生物間の化学物質を介した相互作用を解析する手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Methods to analyze microbial communities in activated sludge were developed especially to clarify the behaviors of polyphosphate accumulating bacteria and PHA accumulating bacteria. It was found that PHA accumulating organisms mostly belong to α - and β -Proteobacteria. A new method to reduce energy consumption in wastewater treatment was proposed, which utilize PHA accumulating microorganisms. Further, a novel methodology to investigate microbial interactions mediated by chemicals was invented.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	26,100,000	7,830,000	33,930,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	34,300,000	10,290,000	44,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：生物学的廃水処理、活性汚泥法、リン除去、窒素除去、PHA（ポリヒドロキシアルカン酸）

1. 研究開始当初の背景

分子生物学が発展し、排水処理に関わる微生物生態系の中に存在する個々の微生物についての情報を遺伝子レベルで得られるようになった。今後、排水処理の分野で微生物群集解析の手法を利用してゆく上で最も重要な視点は、こうした分子生物学的な手法を用いて得られる結果を総括した上で、まず、工学的に意味のある微生物を見極めそれらの微生物の挙動を解析する手法を確立することであり、さらに、実排水処理プロセスの現実の環境条件や栄養条件あるいは運転条件と、そこに存在する微生物群集の構造・機能との関係を記述するという作業を、いくつかの重要な処理プロセスに対しておこなうことで、より適切で効率的な制御につなげるための知見を得ることである。

一方、水環境を巡る社会の状況はこの10年で大きく変わった。排水処理プロセスは単に汚濁物質を除去するためだけの技術ではなく、エネルギー消費を押さえ資源を有効利用し、循環利用できる資源は循環利用してゆくという、いわゆる循環型社会のなかの基盤技術の一つととらえられるようになった。新しい制御技術の導入による省エネ・省資源の実現や、りんや窒素を回収・循環するためのプロセスの最適化(りん・窒素の回収形態や使用目的に応じて、除去だけを考慮していたときは目的関数が異なる)などを考慮した上で、さらに今後は、環境ホルモンなどを含む様々な微量化学物質の分解や制御も処理目的に加えられる可能性が高い。コスト縮減や土地難などの外的制約も受けることになる。そのような多様で相反する要素を持つ要請に対処してゆくには、プロセス内の現象にできるだけ即したモデルを介した処理状況のモニタリングとその結果を用いたこまめなプロセス制御が重要になる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、端的には以下の3点に集約される。1)飛躍的に発展してきた分子生物学を、排水処理をになう微生物群集の構造と機能の解析に応用することでさまざまなノーハウが蓄積されてきた。これらを、循環型社会を構築してゆくなかで鍵となる排水処理技術である生物学的栄養塩除去プロセス(具体的な対象プロセスは2で詳述)において機能する微生物群集の挙動を記述するために適用する手法を確立すること、2)確立した手法を用いて、除去をになう微生物群集の構造・機能と環境条件・運転条件の関係を整理すること、および、3)省エネ・省スペースやりん・窒素の回収(循環利用を可能にする)などの多

様な社会的要請に応えられるようなプロセス制御技術の開発が求められており、そのような制御を可能にする栄養塩除去プロセスのより精緻なモデル化をおこなうこと。

本研究では、排水処理プロセスの中でも、A.生物学的りん除去、B.亜硝酸型硝化脱窒プロセス/コークス炉排水処理、C.PHA蓄積細菌群集の挙動、の3つの系を主たる対象とした。なおPHA(ポリヒドロキシアルカン酸)とは多くの原核生物が貯蔵する炭素化合物であり、活性汚泥中では微生物が有機物を摂取した際に一時的に貯蔵することがある。

3. 研究の方法

(1) 生物学的りん除去プロセスにおける主要細菌の挙動

実験室において生物学的りん除去プロセスを構築し、運転した。りん除去に関連する微生物群集を解析するために、定量PCR法を導入した。対象としたのは、代表的なポリリン酸蓄積細菌である *Accumulibacter phosphatis*、および、Actinobacteriaに属するポリリン酸蓄積細菌、代表的なグリコーゲン蓄積細菌である *Competibacter phosphatis* である。特に低pHがりん除去に悪影響を及ぼすとの知見が報告されていたため、汚泥を植種後4週間はpH8程度で運転し、その後、pHを6.5に下げた。また、はじめからpHを6.5として運転する実験も行った。また、さらに実験結果に基づいて、ポリリン酸蓄積細菌の増減およびりん除去性能を数値シミュレーションする事を試みた。シミュレーションにおいてはIWA活性汚泥モデルVer2を用いた。

(2) 亜硝酸型硝化脱窒プロセス

鉄鋼廃水の処理を想定しアンモニア含有排水を処理する実験室活性汚泥プロセスを構築した。有機性の成分としては酢酸を主体とするものを用いた。pH(7.2または8.0)、チオ硫酸(210mg/L)の添加の有無、脱窒反応の有無、高濃度の亜硝酸の添加、および送気量が、硝化反応に及ぼす影響について検討した。

また、亜硝酸酸化細菌をFISH法および定量PCR法により追跡した。

(3) PHA蓄積細菌の分布と分類

さまざまな下水処理場において、実際にPHA蓄積が起きているのかどうか確認する調査実験を行った。生物反応装置の上流端から下流端までの数点において活性汚泥混合液を採取し、上清中の有機物濃度および活性汚泥中に蓄積されたPHAを定量した。また、流入下水および返送汚泥についてもPHAの含有量を定量した。

さらに、各下水処理場の PHA 蓄積細菌の存在量および種構成を NileBlueA による染色および同染色法と蛍光遺伝子プローブ法を組み合わせた方法で検討した。また、PHA 蓄積細菌群の種構成を効率よく調べるための方法として、PHA 顆粒を含む細菌細胞は浮遊密度がやや大きくなる事に着目し、さまざまな密度の Percol 溶液を用いて遠心分離による PHA 蓄積細菌の選択的回収を試みた。

(4) 活性汚泥中の生理活性物質の検出方法の開発

活性汚泥中の微生物群集は、化学物質を介して相互作用している可能性が示唆されている。しかし、そうした生理活性物質を検出することができ、かつ、繰り返し再現性を確認しうる簡便な方法が、これまで存在していなかった。

ここでは、マイクロプレートのウェルを小さな活性汚泥リアクターと見立て、活性汚泥抽出液に含まれる微生物活性に影響を及ぼす因子（化学物質）を効率よく探索する方法を開発した。活性汚泥からのエタノール抽出液（または対照実験としてただのエタノール）をウェルに滴下・乾燥した。それらウェルに活性汚泥混合液を加え、毎日1回基質を添加し、5日間培養した。培養後の微生物群集構造を、PCR/T-RFLP 法により比較した。実験の繰り返し再現性を確認するために、実験系・対象系とも3回ずつの繰り返しで検討した。

4. 研究成果

(1) 生物学的りん除去プロセスにおける主要細菌の挙動

検討結果の一例を図1に示す。

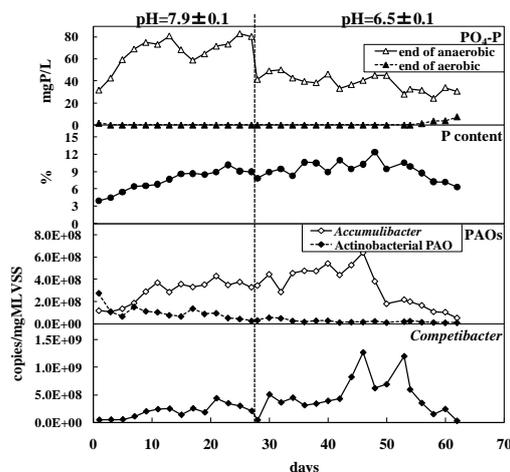


図1 馴致開始後のリン除去性能、*A. phosphatis*, Actinobacterial PAO, および *C. phosphatis* の挙動

運転開始から4週間後に pH を低下させ、さらにその約4週間後にリン除去が悪化し始めた。pH を低下させた後も *A. phosphatis* は減少せず、むしろ増加した。また、*C. phosphatis* は pH 低下後10日ほどしてから急激に増加した。ちょうどこのころ（50日目前後）では *A. phosphatis* は急速に減少しており、*C. phosphatis* との競合に破れたかのように見える。しかし、この時期、リン除去は悪化してはいない。リン除去が悪化したのは55日目以降であり、その時期においては *A. phosphatis*, *C. phosphatis* いずれも減少していた。

培養開始直後の *A. phosphatis* の増加は ASM2 を用いて説明することができた。また、50日目前後の *C. phosphatis* の増加と *A. phosphatis* の減少は、pH の低下によって *C. phosphatis* に有利な環境となったためであると説明できなくもないが、それにしても *C. phosphatis* の急激な増加が見られたのは pH 低下のしばらく後であり、基質摂取速度・増殖速度の変化だけでは説明しにくい。

また、はじめから pH を 6.5 で運転した場合には、運転開始直後から *A. phosphatis* も *C. phosphatis* もほぼ同様の速度で増加し pH 6.5 の条件が両者の活性に大きな影響を及ぼすとは考えられない結果となった。

以上のように、運転開始直後の *A. phosphatis* の増加は ASM2 を用いて説明することができるが、*A. phosphatis* と *C. phosphatis* の競合関係や、*A. phosphatis* の減少とリン除去の悪化との関係をうまく説明できない結果となった。

(2) 亜硝酸型硝化脱窒プロセス

プロセスの運転結果を図2に示す。RunA の a と b ではチオ硫酸の有無（a ではチオ硫酸あり）のみが異なる。チオ硫酸が存在すると亜硝酸型になりやすいとの報告があるが、本研究ではチオ硫酸の有無にかかわらず亜硝酸型硝化であった。一方、c において pH を 8.0 から 7.2 に低下させ、また、脱窒工程を好気工程に置き換えたところ、硝酸型硝化に変化した。さらに、d においても同様に硝化脱窒に戻したところ、亜硝酸型硝化に戻った。RunB では常に硝化脱窒法で運転した。b においての pH を低下させたところ、やや硝酸の生成が増加した。c において亜硝酸を好気工程において加えたところ、硝酸の生成量はやや減少した。高濃度の亜硝酸によって硝化反応が阻害された可能性がある。RunC では、a では脱窒あり、b では脱窒無し（正確には好気運転に置き換えた）、c では a と同じ条件に戻すという運転をした。以上より、脱窒工程の有無、または硝化時間が亜硝酸型酸化に大きな影響を与えるとの結果であった。

様々な亜硝酸酸化細菌群を対象とする蛍光遺伝子プローブを用いた結果、Nitrobacter 属の亜硝酸酸化細菌が主体であることがわかった。Nitrobacter 属の16SrDNA コピー数をモニターした結果も図2に示した。Nitrobacter 属遺伝子コピー数は概ね完全硝化の時期に増加したものの、亜硝酸型の時期にもそれほど減少するわけではなく、RunCのdの時期のようにむしろ亜硝酸型であるにもかかわらず増加した時期もあった。プライマーの特異性について検討し、定量性の改善を図る必要がある。

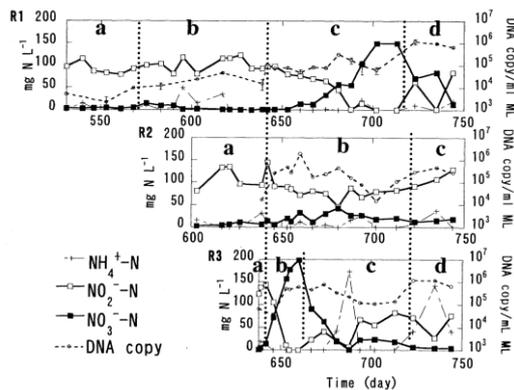


図2 装置の運転経過と Nitrobacter 属遺伝子のコピー数

(3) PHA 蓄積細菌の分布と分類

7つの下水処理場の活性汚泥について PHA をへて除去される COD の割合を調査した。その結果、表1に示すように、B 処理場や C 処理場では除去された COD の 1/3 以上が PHA を経由している事がわかった。また、NileBlue A による PHA 顆粒染色と DAPI による核酸染色を組み合わせることで観察した結果、PHA 蓄積細菌の割合は全細菌の 10~15% であり、また、それに加えて核酸を持っていない PHA だけの顆粒（恐らく細胞外に出てしまった PHA 顆粒）が全細菌数の 10~15% 程度存在していた。

FISH 法と NileBlueA 染色を組み合わせる事で、PHA 蓄積細菌はほとんど α -およ

表1 PHA 蓄積の寄与率

	Δ COD	Δ PHA	寄与率
A処理場	135.8 mgO/L	6.2 mgO/L	5%
B処理場	83.0 mgO/L	31.6 mgO/L	38%
C処理場	64.2 mgO/L	28.8 mgO/L	45%
D処理場	135.0 mgO/L	-5.9 mgO/L	-4%
E処理場	141.0 mgO/L	4.2 mgO/L	3%
F処理場	160.9 mgO/L	15.1 mgO/L	9%
G処理場	83.9 mgO/L	2.9 mgO/L	3%

び β -Proteobacteria 綱に属することがわかった。NileBlueA で検出される全粒子に対して α -proteobacteria または β -proteobacteria に属する PHA 蓄積細菌が占める割合はそれぞれ 7~15%、20~44% であった。また、残りのほとんどは、前述の、核酸を持たない PHA 粒子であった。

また、Percol を用いた密度遠心分離を用いる事で、PHA 蓄積細菌を濃縮する技術を開発した。図3に溶液の密度と遠心管底部に集菌されたバイオマス中の PHA 蓄積細菌等の割合を示す。

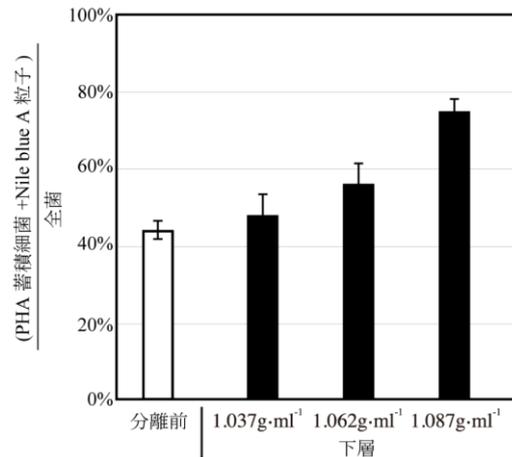


図3 Percol 溶液の密度と回収された各分の PHA 蓄積細菌等の割合

(4) 活性汚泥中の生理活性物質の検出方法の開発

活性汚泥からエタノールを用いて抽出した液をマイクロプレートのウェル3つに添加し、乾燥させた。また、同様にエタノールのみをウェルに添加し、乾燥させた。5日後のそれぞれのウェル内の最近群集構造を PCR/T-RFLP 法を用いて解析した。その結果、図4に示すように、3つの繰り返しで共通する変化を捉えることができた。すなわち、211bp, 243bp, 372bp のピークは抽出物の添加により増加し、逆に、139bp のピークは小さくなった。

なお、抽出物を得る際に用いる溶剤として、エタノール、アセトン、酢酸エチルを検討したが、エタノール抽出物の影響が最も大きかった。また、影響の大きさは、抽出物の添加量にほぼ比例していた。(1)の結果とあわせ、活性汚泥中の微生物群集を数値モデル化するにあたり、こうした結果から、活性汚泥中の微生物群集の挙動をモデル化するにあたって解明が十分出ない要因が存在している事は自明であろう。そうした要因の一つとして、ここでは活性汚泥からの抽出物に活性汚泥中の微生物群集構造に影響を与える未知の因子が含まれている事を明らかにすることができた。

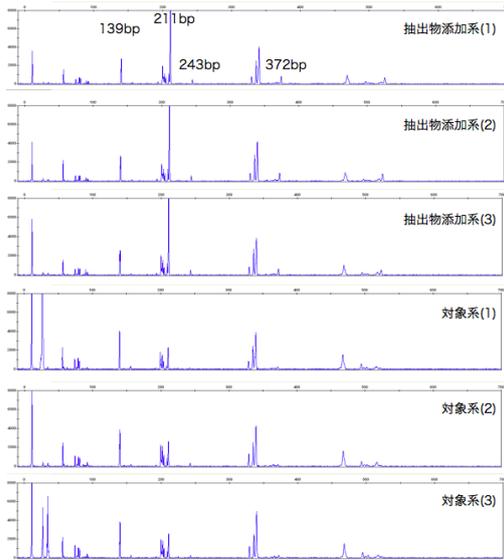


図4 活性汚泥抽出物添加の有無による活性汚泥微生物群集構造の変化

ここで開発したマイクロプレートを用いた活性汚泥培養法は、再現性をとりやすく、そうした生理活性物質を絞り込んでいくために非常に有用であると期待できる。

(5) PHA蓄積細菌を利用した省エネルギー型下水処理プロセスの提案

活性汚泥中の多くの細菌はPHAのような形態で有機物を一時貯蔵することができる。こうしたことを考慮すると、下水処理における有機物除去の過程は図5のように模式化できる。通常の下水処理では一時貯蔵物質のレベルが元に戻るまで(図5ではBまで)好気性の生物反応を行うが、下水処理そのものだけを見れば、図5のAまでの時点で処理は大部分終わっている。下水処理をAの時点までで済ませる事ができれば、下水処理において消費される曝気のための電力を削減する事が可能であるし、また、汚泥の発生量がやや増加することになるが、バイオマスエネルギー源であると考えればエネルギー回収にもつながる。

本研究では、図6のようなプロセスを考案した。すなわち、余剰汚泥を汚泥処理系に送る前に、下水と図5OAにあたる時間だけ反応させようという考えである。

図6のようなプロセスを導入する事による効果を試算したところ、省エネルギー効果は10%程度、バイオマス回収量の増加は20%程度と見積りとなった。

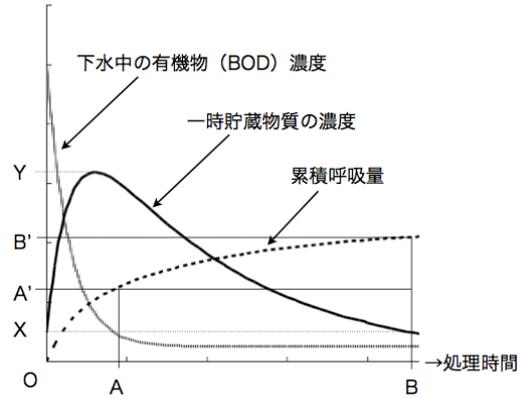


図5 下水処理における有機物除去過程の模式図

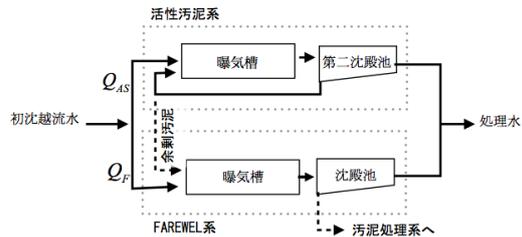


図6 有機物の一時貯蔵を利用した省エネルギー型下水処理システム

(6) 総括

本研究の結果から、部分的にはこれまで開発されてきた分子生物学的な手法により、数値モデル化ができる面もあるものの、定量PCR法の定量性の改善の必要性が示唆され、また、そもそもこれまでのモデルにのせて説明する事の困難な減少にもつきあつた。そうした現象の一つとして、化学物質を介した相互作用が存在する事を、はっきりと示すことができた。

また、物質収支を再検討する事で、PHAのような一時貯蔵物質の生成を利用して、下水処理プロセスのエネルギー効率を改善する方法を提案することができた。

以上をもって本研究の成果とする。

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11件)

1. Zengin, G.E., Artan, N., Orhon, D., Chua, A.S.M., Satoh, H., Mino, T. (2010) Population dynamics in a sequencing batch reactor fed with glucose and operated for enhanced biological phosphorus removal. *Biores. Technol.*, 11, 4000-4005. (査読有)
2. Oshiki, M., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T. (2010) Separation of PHA-Accumulating

- Cells in Activated Sludge Based on Differences in Buoyant Density, J. Gen. Appl. Microbiol., In press. (掲載確定) (査読有)
3. 押木守, 小貫元治, 佐藤弘泰, 味埜俊 (2009) 活性汚泥プロセスにおける有機性一時貯蔵物質の蓄積, 下水道協会誌. 46(566). 126-137. (査読有)
 4. 佐藤弘泰, 小川旦, 味埜俊 (2009) 活性汚泥中の成分が細菌群集構造に及ぼす影響のマイクロプレート培養法を用いた検討. 環境工学研究論文集. 46. 503-510. (査読有)
 5. 押木 守, 佐藤 弘泰, 味埜 俊 (2009) 微生物の持つ有機物貯蔵能力を利用した省エネルギー型廃水処理法の提案, 用水と廃水 51(9): 41-49. (査読有)
 6. 佐藤弘泰 (2009) リン資源の効率的回収に向けて -頼れる生物学的リン除去活性汚泥法を目指して-. 再生と利用. No.124, 11-18. (査読無)
 7. Sueoka, K., Satoh, H., Onuki, M., Mino, T (2009) Microorganisms involved in anaerobic phenol degradation in the treatment of synthetic coke-oven wastewater detected by RNA stable-isotope probing. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS. 291. 169-174 (査読有)
 8. Mamoru Oshiki, You Yang, Motoharu Onuki, Hiroyasu Satoh, Yong-Zhen Peng and Takashi Mino (2008) Occurrence of Polyhydroxyalkanoate as Temporal Carbon Storage Material in Activated Sludge during The Removal of Organic Pollutants. Journal of Water Environment Technology, 6, 77-83. (査読有)
 9. 佐藤弘泰, 小貫元治, 味埜俊 (2008) 活性汚泥中微生物群集構造解析のための超音波破砕と希釈による新規DNA抽出手法の開発. 環境工学研究論文集. 45, 225-232. (査読有)
 10. Oshiki, M., Onuki, M., Satoh, H., Mino, T (2008) PHA-accumulating microorganisms in full-scale wastewater treatment plants. WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY. 58. 13-20 (査読有)
 11. Fukushima, T., Uda, N., Okamoto, M., Onuki, M., Satoh, H., Mino, T (2007) Abundance of *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis' in enhanced biological phosphorus removal activated sludge acclimatized with different carbon sources. MICROBES AND ENVIRONMENTS. 22. 346-354 (査読有)
- [学会発表] (計 32 件)
1. 押木守, 佐藤弘泰, 味埜俊 (2010) 余剰汚泥消化プロセスにおけるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の分解挙動. 第44回日本水環境学会講演集. P72. (2010.3.15-17 福岡市)
 2. 佐藤 弘泰, 押木 守, 小貫 元治, 味埜 俊 (2009) 微生物の持つ有機物貯蔵能力の有機物回収への利用, 第12回水環境学会シンポジウム講演集, 164-165 (2009年9/14~15, 東京).
 3. 押木 守, 佐藤 弘泰, 味埜 俊, 小貫 元治 (2009) 活性汚泥中細菌による生分解性プラスチックPHAの生産-菌体外に見いだされたPHA顆粒-. 第12回水環境学会シンポジウム講演集, pp166-167 (2009年9/14~15, 東京)
 4. Tadashi Shoji, Motoharu Onuki, Hiroyasu Satoh, Takashi Mino (2008) Simultaneous thiocyanate and nitrogen removal by anoxic-aerobic activated sludge process under high salinity conditions. IWA Chemical Industries 2008, Nov. 9-11, 2008, Beijing, China.
 5. Toshikazu FUKUSHIMA, Motoharu ONUKI, Hiroyasu SATOH and Takashi MINO, 2008. Development of Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR for *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis' and Its Application to Activated Sludge, 12th International Symposium on Microbial Ecology -ISME-12, Cairns, Australia. Aug. 17-23, 2008
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
味埜 俊 (MINO TAKASHI)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号 : 60166098
 - (2) 研究分担者
佐藤 弘泰 (SATO HIROYASU)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授
研究者番号 : 90251347
 - (3) 連携研究者
なし