

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22922

研究課題名（和文）微生物による有機物代謝の集成としての生物学的廃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 as aggregation of microbial metabolisms of organic matters

研究代表者

栗栖 太（KURISU, FUTOSHI）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：30312979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：下水処理場から流入下水と処理水、および活性汚泥を採取し、溶存有機物を高分解能精密質量分析計により化合物種レベルで分析するとともに、有機物分解反応を担う微生物群集について解析した。その結果、微生物群集構造は、流入水組成とは関連性が見いだせなかったのに対し、処理水との関連性が示されたことから、微生物代謝産物としての処理水と微生物組成との関連を示すことができた。また、下水処理水中の有機物のうち、微生物が利用する物質の推定を行う方法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物学的廃水処理プロセスは、包括的な有機物指標を用いた性能評価を中心とした経験的な運転管理に頼っている。本研究結果により、廃水中の個々の有機物が、処理プロセスにおける個々の微生物により分解され、処理水中の有機物を構成しているという本質的な現象の理解を進めることができた。さらに、複雑な有機物組成の中で、ある微生物が利用する特定の有機物について解析する手法を確立できたことから、今後「誰が、何を分解して何が処理水として残るのか」という問いを明らかにする道筋をつけることができた。

研究成果の概要（英文）：Influent wastewater, treated water and activated sludge were collected from domestic wastewater treatment plants, to analyze dissolved organic matter at the compound species level using high-resolution mass spectrometry and the microbial community responsible for the organic matter degradation. The results showed that the microbial community structure was not found to be related to the influent composition, whereas it was related to the treated water, indicating a relationship between the treated water and microbial composition as a product of microbial metabolism. In addition, we were able to establish a method for estimating the organic matter in treated wastewater that is utilized by the microorganisms.

研究分野：都市環境工学

キーワード：未知スクリーニング分析 ノンターゲット分析 精密質量分析 活性汚泥 微生物群集構造解析 大腸菌

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の我が国における廃水処理の主流は、生物学的廃水処理である。その代表例である標準活性汚泥法はイギリスを発祥とし 100 年以上に渡り運用されている。しかし、反応槽内の微生物による有機物除去の詳細は未だに解明されておらず、経験則に基づいて設計、運用されている面が強い。そのため、反応槽内の微生物群集による有機物除去をより詳しく理解することが、処理性能向上や放流先の環境保全に繋がる重要な知見になり得る。溶存有機物(Dissolved Organic Matter, DOM)と微生物の関係性については、主に湖沼や海洋において研究がなされており、微生物の代謝産物が湖沼中で漸増する DOM の原因であるとされている。このことから、下水処理において反応槽内の微生物群集が最終沈殿池(終沈)越流水の DOM 組成に与える影響は大きいと考えられる。また、溶解成分以外の影響も無視できないが、最初沈殿池(初沈)越流水の DOM 組成は反応槽内の微生物群集構造の形成に関与していると推察され、そこから得られる知見は生物処理による有機物除去の詳細解明に繋がると考えられる。

近年、DOM を化合物レベルで理解するためのアプローチとして、質量分析計を用いた方法が報告されている。特に、Orbitrap 型質量分析計はきわめて精密な質量分析を行うことができるため、精密質量から分子式推定を行うことができる。試料の前処理として固相抽出を行う必要があるため試料中の全ての溶存有機物質を分析できるわけではないが、数百から数千の溶存有機物質を一度に検出することができる。一方で、活性汚泥中の微生物群集を理解するためのアプローチとしては、次世代シーケンサーが開発され、様々な廃水処理汚泥を対象として微生物群集構造のハイスループットな解析が行われている。近年の分析化学と分子生物学の発展から生まれた精密質量分析計と次世代シーケンサーを組み合わせることで、どの有機物がどの微生物群集の形成に関与しているのか、どの微生物群集がどの有機物を生産しているのか、分子レベルで把握できる可能性がある。本研究の究極の目的は、廃水中の有機物が、反応槽内の微生物により分解され、処理水を構成しているという現象そのものを理解することである。

2. 研究の目的

本研究では国内各地の下水処理場の反応槽流入水と終沈越流水について、Orbitrap 型質量分析計を用いて分析を行い、分子レベルで DOM の動態解明を試みた。同時に、反応槽内の活性汚泥の微生物群集構造についても次世代シーケンサーを用いて解析を行い、微生物群集が DOM の動態に与えている影響についても評価した。

3. 研究の方法

3.1 下水処理場試料の採取と試料前処理

国内 14 カ所の下水処理場、計 17 系列を対象として調査を行なった。処理方式の内訳は、標準活性汚泥法(CAS)9ヶ所、嫌気好気法(ND)4ヶ所、オキシデーションディッチ法(OD)2ヶ所、嫌気無酸素好気法(A2O)2ヶ所である。各系列における反応槽流入水と終沈越流水、反応槽内の活性汚泥を採取した。試料を保存するポリエチレンボトルについては、0.1 N 塩酸に一晩漬け込み酸洗浄を行った後、超純水ですすぎ、乾燥機で十分に乾燥させてから使用した。

反応槽流入水と終沈越流水について、550°C で 6 時間熱処理を行ったガラス繊維ろ紙(保持粒子径 0.3 μm)を用いてろ過を行い、2M HCl を適量加えて pH 2 に調整した。その後、調整を行った試料について脱塩と濃縮のために前処理として固相抽出を行なった。固相抽出カートリッジにはスチレンジビニルベンゼンポリマーの Bond Elut PPL カラム(Agilent Technologies)を採用した。初めに、PPL カラムにメタノール 10 mL、超純水 10 mL を通水して洗浄した。次に、pH 2 の超純水を 1 mL 流してカラム内のコンディショニングを行った。その後、試料(反応槽流入水 10 mL、終沈越流水 25 mL)をカラムに通液した。酸性の超純水 1 mL を通水してカラムを洗浄した後、メタノール 1.5 mL で有機物を溶出した。溶出液のうちの 0.5 mL は固相抽出における DOM の回収率を算出するために利用した。溶出液 0.5 mL に窒素ガスを吹き付けメタノールを蒸発乾固させたのち、超純水 10 mL に再溶解し、TOC 測定を行なった。

3.2 大腸菌増殖試験に用いた試料と試料前処理

大腸菌増殖基質の特定試験においては、下水放流水の影響を強く受けた都市河川水として、神田川(東京都新宿区)、新河岸川(東京都板橋区)、福川(埼玉県深谷市)にて採水した。試料は孔径 0.1 μm Anopore 膜(Whatman)で 2 回濾過してから低温殺菌(75°C, 1h)した後、*E. coli* K-12 株を 10^2 - 10^3 CFU/ml となるよう植種し 25 暗所にて培養した。また、対照系として大腸菌を植種しない系、無機液体培地に大腸菌を植種した系をそれぞれ 3 連用意し、同条件下で培養した。培養期間中の大腸菌数及び全菌数を計数した。培養後の河川水試料は Syncore Analyst(Buchi)を用いて減圧下で蒸発させて 75 倍濃縮した。

3.3 Orbitrap 質量分析

下水流入水、下水処理水中の有機物分析については、LC/MS によるフローインジェクション分析を行った。質量分析計には Orbitrap 型質量分析計 Exactive (Thermo Fisher Scientific)を用い、イオン化はエレクトロスプレーイオン化法であり、測定はネガティブイオンモードで行った。ポ

ジティブイオンモードではアダクトイオンの生成が顕著で分子式推定が困難であることがその主な理由である。測定範囲は $m/z = 100 - 1000$ を対象とし、質量分解能 100,000 で分析した。得られたピークについて、SIEVE (Thermo Fisher Scientific) を用いて、同位体やアダクトイオンごとにまとめる解析を行なった。SIEVE で行なった解析により得られた精密質量数について MATLAB_R2019a を用いて分子式推定を行なった。さらに、SIEVE から得られたピークのエリア値を入力データとして、クラスター分析 (Bray-Curtis 非類似度、Ward 法) を行い、サンプル間のマススペクトルの類似性を評価した。

また、有機物の構造推定においては、HPLC-MS/MS 分析を行った。HPLC システムには UltiMate 3000 シリーズ SD (Thermo Fisher Scientific) を、LC カラムには Inert Sustain AQ-C18 (1.9 μm , 2.1 \times 50 mm, GL science) を、質量分析計には Orbitrap 質量分析計 (Q Exactive Focus, Thermo Fisher Scientific) を使用した。移動相にはそれぞれ 0.01% (v/v) のギ酸を添加した超純水とメタノールを用いた。移動相の組成は、水/メタノール比 95/5 を 3 分間維持した後、メタノールの比率を 10 [%/min] で上昇させ、水/メタノール比 5/95 到達後これを 5 分間維持した。その後、1 分で比率を 95/5 に戻し、8 分間維持して次の分析に向け平衡化した。移動相の流量は 0.3 ml/min とし、カラムオープンの温度は 40 を維持した。質量分析時のイオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray ionization, ESI) にて、ネガティブモード、ポジティブモードそれぞれで行った。質量分析により得られたマススペクトルは Compound Discoverer 3.2 (Thermo Fisher Scientific) により処理し、許容保持時間誤差 ± 0.2 分以内かつ許容質量誤差 ± 5.0 ppm 以内を基準として、同一 DOM から生成されたと推定されるアダクトイオンピークと同位体イオンピークを統合 (コンポーネント化) した。コンポーネントの検出強度を算出し、分子式を推定した。分子式の推定には C, H, O, N, P, S, Cl, Br を用いた。

3.4 微生物群集構造解析

活性汚泥サンプルからの DNA の抽出は、ISOIL for Beads Beading Kit (NIPPON GENE) を用いて行った。その後、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的として PCR 増幅を行ない、次世代シーケンサー Miseq を用いてシーケンシングした。得られたシーケンスについては、QIIME により解析を行なった。その代表シーケンスを silva128 データベースを用いてアサインメントした。また、得られた結果について、各サンプルの全 OTU を入力データとしてクラスター分析 (Bray-Curtis 非類似度、Ward 法) を行い、サンプル間の微生物群集構造の類似性を評価した。

4. 研究成果

4.1 固相抽出における DOM の回収率

反応槽流入水の平均回収率は $39 \pm 14\%$ 、終沈越流水の平均回収率は $66 \pm 7\%$ であった。反応槽流入水の回収率の方が低くなったことから、反応槽流入水は固相に吸着する画分の DOM が少ない、あるいはメタノールで溶出される画分の DOM が少ないことが考えられる。反応槽流入水の DOM の吸着率が高い固相も存在すると考えられるが、本研究では終沈越流水との比較をするために、反応槽流入水と終沈越流水で同じ固相のカートリッジを使用している。また、反応槽流入水の方が処理場間で回収率のばらつきが大きいという結果から、反応槽流入水は処理場間で DOM 組成の違いが大きいということが考えられた。

4.2 反応槽流入水の DOM

反応槽流入水の代表的なピークとして $m/z = 171.0119$ と 199.0434 が顕著に検出された。分子式推定を行なったところ、分子式は、それぞれ $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ 、 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}$ であった。構造式の推定は確かではないが、推定された分子式から、 $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ は *p*-トルエンスルホン酸、 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}$ はメシチレンスルホン酸であると予想した。*p*-トルエンスルホン酸は、有機合成における酸触媒として頻繁に利用されている化合物である。産業廃水の流入がこれらのピークの検出に参与している可能性が考えられる。また、 $m/z = 311.1693$ 、 325.1847 、 339.2002 のピークも強く検出されている。分子式は、それぞれ $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{S}$ 、 $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{S}$ 、 $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{S}$ であると推定され、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) に由来するピークであると考えられる。LAS は、界面活性剤としての用途が多く洗濯や食器洗い洗剤として広く家庭において使用されている。その排水が下水道に流入したことで、反応槽流入水の DOM として顕著に検出されたと考えられる。

次に反応槽流入水のマススペクトルについてクラスター分析を行い処理場間の類似性を評価した。クラスター全体の特徴として、反応槽流入水のマススペクトルは、同じ処理場であっても、採取した月が異なると別のクラスターに分類される傾向が示された。このことから、反応槽流入水の DOM 組成はサンプリング時の流入下水の性状による影響を受けて、種々雑多な組成で存在していることが示された。

4.3 終沈越流水の DOM

終沈越流水の代表的なピークとして $m/z = 257.0493$ 、 271.0651 、 285.0807 が挙げられた。これらのピークについて分子式推定を行なったところ、それぞれ $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$ 、 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{S}$ 、 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$ であると推定された。これらの物質はスルホフェニルカルボン酸 (SPC) であると予想され、反応槽流入水で検出された LAS の生分解生成物であると考えられた。

次に、終沈越流水のマススペクトルについてもクラスター分析を行い処理場間の類似性を評価した。特徴として、試料を採取した月が異なった場合でも、同じ処理場の試料であれば同じク

ラスターに分類される傾向が示された。反応槽内で処理が施されることにより、処理場ごとにマススペクトルが類似してくることが示された。このことから、類似した組成の DOM が流入していた場合でも、反応槽内の微生物群集、あるいは他の何らかの因子の働きによって、その組成が変化し、終沈越流水では類似性を示さない可能性もあるということが明らかになった。

4.4 微生物群集構造と DOM の関係性

全 34 サンプルのうち、32 のサンプルで、*Proteobacteria* 門と *Bacteroidetes* 門が優占していた。各サンプルの OTU についてクラスター分析を行いサンプル間の類似性を評価したところ、微生物群集は、試料を採取した月が異なった場合でも、同じ処理場の試料であれば同じクラスターに分類される傾向が示された。また、クラスターを大きく二つに分けて考えると、標準活性汚泥法の処理場も含んではいるが、高度処理を採用した処理場が一つのクラスターに分類されていた。以上の結果から、微生物群集の大部分は処理場の地域性に応じた流入下水の性状によって決定されるが、アンモニア酸化細菌など窒素除去を行う一部の微生物群集の形成は処理方式によって特徴付けられていることが明らかになった。

DOM の動態を解明するため、反応槽流入水の DOM 組成、反応槽内の微生物群集構造、終沈越流水の DOM 組成の各クラスター分析結果を比較した。反応槽流入水の DOM と微生物群集の関係性について、微生物群集は処理場ごとにクラスターを形成していることから、微生物群集構造を決定する因子としては、流入下水の性状による影響が大きいと考えられる。しかし、反応槽流入水の DOM 組成は処理場ごとに類似しておらず、比較的ばらばらに分類されていた。したがって、本研究においては反応槽流入水の DOM と微生物群集の間に関連性は見出せなかった。反応槽流入水では固相抽出における DOM の回収率が低いため、反応槽内の微生物群集構造の形成に与える影響を見つけれなかった可能性が考えられる。また今回の解析では SS 成分を無視していることも要因の一つとして考えられ、DOM 以外の流入成分が微生物群集の形成に関与している可能性が考えられる。次に、微生物群集と終沈越流水の DOM の関係性について見ると、微生物群集と終沈越流水の DOM は、それぞれ処理場ごとにクラスターを形成していた。終沈越流水の DOM は微生物の代謝産物である、あるいは反応槽内の微生物によって分解されなかった DOM であるといったことが考えられるため、処理場特有の微生物群集構造が、処理場特有の終沈越流水の DOM 組成を形成した因子であると考えられた。

4.5 微生物が利用する有機物の物質推定

処理により減少した有機物成分の物質推定を行うため、モデル微生物として大腸菌を用い、下水処理水の影響を強く受けた河川水中において利用された有機物のスクリーニングを行った。その結果、3 地点で合計 27859 の DOM が検出され、うち 1439 について大腸菌が利用した物質の候補としてスクリーニングされた。大腸菌の増殖が顕著であった新河岸川試料について、大腸菌利用基質の候補を LC/MS/MS 分析した。その結果、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)の類縁体と推定された物質や、中級脂肪酸の誘導体と推定された物質があった。これらの物質のプリカーサイオン、プロダクトイオンのマススペクトルから、異性体の候補を絞り込み、候補物質の 1 つについて標準試薬を入手した。HPLC によるコクロマトグラムを確認したところ、保持時間が純品試料と一致したことから、物質名の推定を行うことができた。

この物質の標準物質を用いて無機培地に加え、大腸菌の増殖試験を実施したところ、大腸菌の増殖が確認された。当該物質が大腸菌の増殖基質として利用されることが明らかになった。培養前後で減少した成分のうち、大腸菌の増殖基質として新たに特定された物質について、標準試薬を用いて処理水中の濃度を測定した。また、培養前後での減少量を推定した。その結果、大腸菌の全増殖量に比べると当該物質の減少量の寄与は 1% 未満であり、処理水中での大腸菌増殖に対しては主たる増殖基質とは言えないことがわかった。しかしながら環境水中で事前の情報なく特定の微生物の増殖基質の特定を行うことができたことは極めて新規な研究結果であり、今後環境水中での様々な微生物への応用が可能であることを実証できた。

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishii Y., Kurisu F., Kasuga I., Furumai H.	4. 巻 72
2. 論文標題 Competition for growth substrates in river water between Escherichia coli and indigenous bacteria illustrated by high resolution mass spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/lam.13343	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上原悠太郎、栗栖太、春日郁朗、古米弘明
2. 発表標題 高分解能LC/MSによる都市河川水中溶存有機物のノンターゲット分析に適した濃縮・脱塩方法の検討
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会講演集
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 真、久保田 健吾、佐藤 幹子、石井 淑大、栗栖 太、李 玉友
2. 発表標題 精密質量分析を用いた下水処理における溶存有機物の動態解明
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会講演集
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 真、石井 淑大、栗栖 太、佐藤 幹子、李 玉友、久保田 健吾
2. 発表標題 日本各地の下水処理場を対象とした溶存有機物と微生物群集の関係性の評価
3. 学会等名 第56回環境工学研究フォーラム講演集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原悠太郎、石井淑大、栗栖太、春日郁朗、古米弘明
2. 発表標題 入間川の溶存有機物による大腸菌の増殖ポテンシャルと増殖基質のノンターゲット分析
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会講演集
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
研究分担者	久保田 健吾 (KUBOTA KENGO) (80455807)	東北大学・工学研究科・准教授 (11301)	

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
---------	---------