

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22246069

研究課題名(和文) 微生物の生態を利用した持続可能な下水処理技術の開発と統合的モデル化

研究課題名(英文) Development of sustainable sewage treatment technologies utilizing microbial ecology and its integral modeling

研究代表者

味埜 俊(MINO, Takashi)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60166098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,800,000円、(間接経費) 11,040,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では微生物の生態に着目し、エネルギー効率のよい下水処理技術を開発することを目的とした。活性汚泥を高負荷で下水と接触させることでわずかな酸素消費量で効果的に有機物除去をできること、微生物細胞内に蓄積された一時貯蔵物質は汚泥濃縮工程では分解せず一方嫌気性消化槽では容易にメタン化されることを確認し、以上に基づいて新たな活性汚泥変法を提案した。また、エネルギー需要のピークカットに資する活性汚泥プロセスの運転法を検討した。また、活性汚泥微生物生態系についての基礎的知見として、バクテリオファージの挙動の解析と溶菌された宿主を同定する試み、および、化学物質を介した微生物間相互作用について検討した。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to develop novel sewage treatment technologies with improved energy efficiencies by utilizing microbial ecology. Based on the finding 1) activated sludge can remove organic pollutants with less oxygen consumption under overloaded condition, and 2) temporal carbon storage materials accumulated inside microbial cells are stable during sludge thickening but are readily be degraded to methane in anaerobic digester, a new modified activated sludge was proposed. In addition, a new operational strategy to contribute to peak-cut of electrical power demand was proposed. As the basic aspect on activated sludge microbial ecosystems, the release timing of bacteriophages was studied, an attempt to get a clue on the lysed host species was made, and microbial interactions mediated by chemicals was conducted.

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：有機物一時貯蔵 下水処理 活性汚泥 省エネルギー 高速シークエンシング 微生物群集構造 生物学的リン除去 栄養塩循環

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥による有機物除去のメカニズムは一般的には微生物による異化作用と同化作用によるものと説明される。しかし、微生物により摂取された有機物は即座に異化・同化作用を受けるとは限らず、いったん貯蔵物質として蓄積され、その後異化、同化される場合がある。そのような貯蔵有機物の代表的なものとして、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) がある。微生物による有機物の摂取・貯蔵は、原理的には水処理の立場から見れば酸素の消費をほとんど必要とせず有機性汚濁物質を除去することができることを意味する。すなわち、活性汚泥に有機性汚濁物質が吸着的に除去されるようなものである。これまでもこうした現象を活用したプロセスが存在しており、例えば嫌気好気式活性汚泥法やコンタクトスタビライゼーション法があげられる。

一方、今日下水処理の方法として広く用いられている活性汚泥法は、微生物に十分な量の酸素を供給するために少なからぬエネルギーを投入しており、その量は日本については国内の全電力消費の0.3%程度におよぶ。活性汚泥微生物の持つ有機物一時貯蔵能力、あるいは見かけ上は活性汚泥による有機性汚濁物質の吸着的な除去を活用すれば、下水処理のために用いられるエネルギーを削減できる可能性がある。

例えば次のような利用法が考えられる。余剰汚泥を汚泥処理系に送る際、下廃水と短時間接触させ有機物貯蔵を行わせ、その後汚泥処理に送る方法である。以下、Final AeRation of Excess sludge With an Excess LoadingよりFAREWEL反応と呼ぶ(図1)。FAREWEL反応では余剰汚泥の有する有機物吸着能力を用いて下水中の有機物を除去するので、通常の活性汚泥法による処理よりも少ない酸素消費量で棲ませることが出来ると期待される。また、一時貯蔵により除去された有機物をバイオマスエネルギー源として回収できる可能性もある。

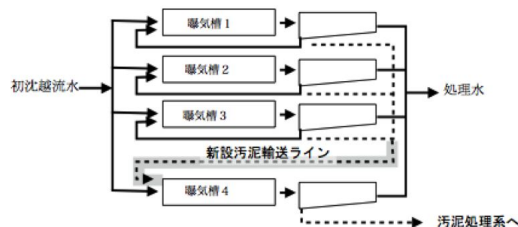


図1 FAREWEL 反応を活用した処理プロセス

2. 研究の目的

本研究では FAREWEL 反応を中心として、活性汚泥中の微生物が有する有機物貯蔵能力を利用するために、次にあげる目的を掲げて検討した。

- 1) FAREWEL 反応そのものについては、適切な反応条件を明らかにすること
- 2) FAREWEL 反応で微生物細胞内に生成された蓄積物質の安定性を評価すること
- 3) FAREWEL 反応で微生物細胞内に生成された蓄積物質のメタンへの変換特性を評価すること
- 4) 蓄積されたポリヒドロキシアルカン酸の分解のメカニズムを明らかにすること
- 5) 下水処理場全体のエネルギー収支から、FAREWEL 反応導入の効果を評価すること

また、有機物一時貯蔵現象は、省エネルギーだけでなくエネルギー使用量を変化させる目的でも利用することが出来る。例えば日中の下水処理はもっぱら活性汚泥微生物の有機物一時貯蔵能力を活用して最小限の曝気で行い、そして、夜間、汚泥内に蓄積された一時貯蔵物質の酸化分解を促すために十分に曝気すれば、日中の電力需要のピークを削減するために有効である。こうした運転法は時間差で曝気をすることから時間差曝気法と呼ぶことが出来る。特に2011年3月11日の東日本大震災以降、電力ピークカットの需要は強い。

時間差曝気法について、以下の目的を掲げた。

- 6) 実験室活性汚泥リアクターを持ちいて時間差曝気法の有効性をモデル的に示すこと

また、活性汚泥中微生物叢に影響を及ぼす因子として、運転条件・環境条件の他、バクテリオファージや活性汚泥内の微生物が生産する二次代謝産物が考えられるが、それらについては知見が非常に不足している。そこで、本研究では以下の2点も目的とした。

- 7) 下水処理のどの過程でバクテリオファージが増えるのか明らかにすること、また、活性汚泥上清中に出現する細胞外 16S rRNA から、バクテリオファージにより溶菌された宿主についての手がかりを得る可能性について検討すること
- 8) 活性汚泥中の微生物生態系について、二次代謝産物のような化学物質を紹介

て相互作用しないか検討すること

なお、7)は、ファージによる溶菌時に宿主のタンパク質合成器官であるリボソームおよびそこに含まれる rRNA が細胞外に放出されるだろうとの予想に基づく。

3. 研究の方法

「2. 研究の目的」に掲げたそれぞれの項目について、方法を述べる。方括弧付きの番号は前項と対応する。

- 1) 実下水処理場の返送汚泥と下水（初沈越流水）を様々な比で混合し、反応時間と処理水に残る濁度や有機物濃度との関係を明らかにする。また、その間に消費された酸素量を呼吸量計にて評価する。
- 2) 活性汚泥に酢酸・プロピオン酸を摂取蓄積させ、その後、20、30 または 37 で数日～一週間程度培養（放置）し、その間の蓄積有機物（PHA）の残存量や上清中の有機物濃度を測定する。
- 3) 2) と同様の検討だが、中温嫌気性消化汚泥を混合して実施する。
- 4) 特に2)に関連して行った実験において上清中に放出される有機酸の濃度および組成と分解された PHA の組成との関連、および、既知の PHA 関連の代謝経路から、PHA の分解経路について検討する。また、分解中に増殖する微生物種を特定し、どのような微生物群が関与しているのか検討する。
- 5) 主として COD の持つ熱量および曝気のために必要なエネルギー量から、水処理・汚泥処理（嫌気性消化）に関わるエネルギー収支を計算した。
- 6) 実験室回分式活性汚泥リアクターを運転し、一部のサイクルの曝気を一時的に削減あるいは省略し、処理水質への影響を検討する。
- 7) まず、細胞外 rRNA を対象として逆転写 PCR 反応を行う手法を開発した。その後、6)と同様実験室回分式活性汚泥リアクターを運転し、上清中のウイルス性 DNA（DNase により分解されない DNA）濃度の変化及びパルスフィールドゲル電気泳動法によるウイルス性 DNA の分子量分布の変化を追跡するとともに、細胞外 rRNA を逆転写 PCR 法にかけ、その増幅産物を次世代シーケンサーを用いて解析した。
- 8) 実験室で馴致した活性汚泥を凍結乾燥し、エタノールを用いて抽出液を得た。所定量の抽出液をマイクロプレートのウェルに添加し、風乾ののち、活性汚泥及び基質を添加しさらに培養した。また、対象として、エタノール抽出液ではなくエタノールのみを添加したウェルも用意し、同様の培養操作をした。培養前および所定時間培養後のウェル内の活性汚泥の細菌群集構造を制限酵素消化断片長多型（REFLP 法）により解析した。特に低基質濃度で 1 日程度の短い培養時間で変化

を捉えることが出来ないか検討した。

4. 研究成果

「2. 研究の目的」に掲げたそれぞれの項目について結果を述べる。また、最後に総括を記す。

1) FAREWEL 反応の条件と処理水質

FAREWEL 反応は余剰汚泥を用いて高負荷で行うことを想定している。そこで、通常は汚泥返送比 25%程度で運転している活性汚泥を、返送汚泥:下水=1:15または1:39とし、1時間から数時間反応させた。その結果、1:39とした時でも4時間で半分以上のCODを除去することが出来た。消費された酸素は除去されたCODに対して、4時間処理した場合は20%程度、また、1時間処理した場合は10%程度に過ぎず、少ない酸素消費で効率よくCODを除去することが出来た。しかし、通常の活性汚泥処理と比べると、濁度・残存有機物濃度・残存栄養塩濃度いずれもやや劣っていた。（発表準備中）

2) FAREWEL 反応で汚泥内に蓄積された貯蔵有機物の安定性

多くの場合余剰汚泥は2日間程度重力濃縮され、その後汚泥処理に供される。また、小さな下水処理場では余剰汚泥を数日間保管せざるを得ない場合がある。そうした状況を想定し、活性汚泥内に蓄積されたPHAの安定性について評価した。20では一週間以上PHAはほとんど分解せず、30でも3日程度は分解しなかったが、30の場合はその後急速に分解した。また、37の場合はPHAが安定していたのは一日足らずだった。実験結果の例を図2に示す。

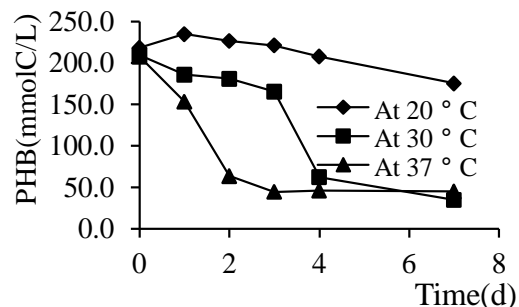


図2 活性汚泥中に貯蔵された PHB の分解 (Huda et al., 2013b)

3) FAREWEL 反応で汚泥内に蓄積された PHA の分解性

活性汚泥中に一時的に蓄積された有機物のメタンへの変換特性を検討した。結果の一例を図3に示す。この実験では嫌気性消化汚泥のみの系、嫌気性消化汚泥（中温消化）に余剰汚泥を添加した系、および嫌気性消化汚泥に酢酸を摂取させPHB（ポリヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ酪酸のみからなるPHA）を蓄積させた余剰汚泥を添加した系を用意し、37で培養した。また、3つの系について、嫌気性

汚泥の量は同一とし、また、余剰汚泥を添加した二つの系は、PHBも含めてVSとして同じ量の余剰汚泥を添加した。余剰汚泥中のPHBは速やかに分解され、また、生成したメタンガスの量は、ほぼPHBに相当する量だけ、PHBを蓄積した余剰汚泥を用いた系の方が多かった。また、図には示していないが、PHBを蓄積させた余剰汚泥を用いた系では一時的に上清中の酢酸濃度の上昇が見られた。

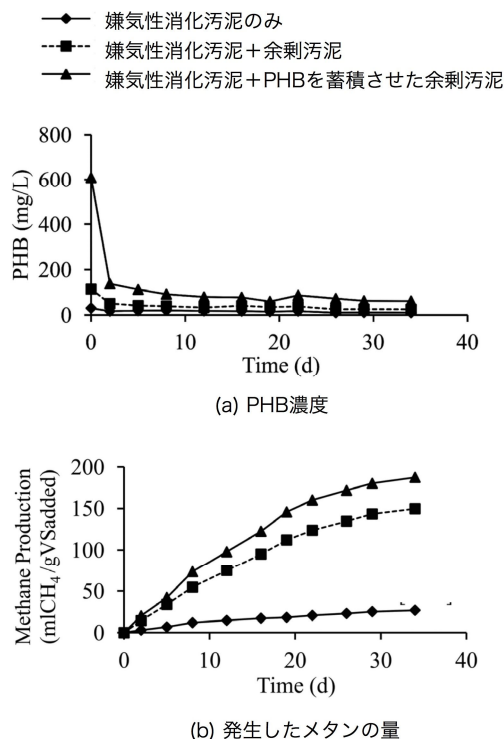


図3 PHBを蓄積した活性汚泥の嫌気性消化汚泥との培養 (Huda et al., 2013)

4) 汚泥内に蓄積されたPHAの分解機構

汚泥内に蓄積された有機物は嫌気性消化汚泥と混合しない場合でも37℃では速やかに分解された。また、30℃では数日間安定に推移し、その後急速に分解された。こうしたことは、PHAの分解はそのPHAを蓄積した細胞内でその細胞の持つ酵素により行われている可能性を示唆しているものと考えられる。実際、PHAが酢酸やプロピオン酸にまで変換される一連の代謝反応をみると、全体としてATPの生成をとまなう嫌気性発酵となりうることがわかる。また、嫌気性汚泥を加えずに余剰汚泥中の分解を行った実験において、汚泥中の微生物群集構造の変化を次世代シーケンサーを用いて調べたところ、微生物群集構造の変化に先立ってPHAが分解されていた。(発表準備中)

5) FAREWEL反応を導入した場合の下水処理のエネルギー収支の改善効果

人口30万人の都市の下水処理場にFAREWEL反応を導入した場合の下水処理におけるエネルギー収支の改善効果について検討した。図4にその結果を示す。

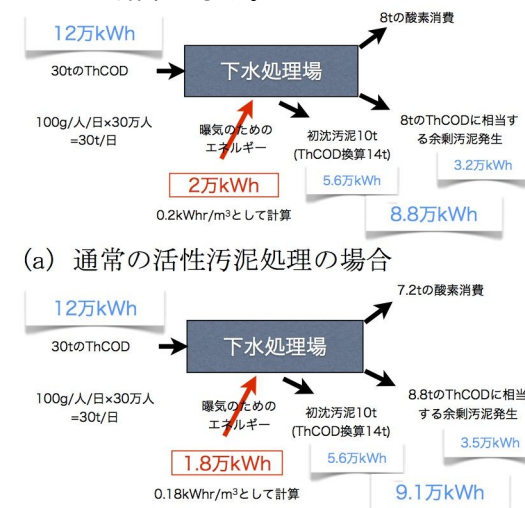


図4 FAREWEL反応の導入によるエネルギー収支試算の例 (佐藤ら, 2013)

エネルギーの回収分まで考えると、通常の活性汚泥処理と比べて25%程度エネルギー効率を改善できる。

6) 時間差曝気法についての検討結果

回分式活性汚泥プロセスを6サイクル/日で運転し、そのうち一つのサイクルについてのみ好気時間を短縮する運転を行った。その結果、短期的に(1日だけ)好気時間を短縮した場合も、また、そのような運転を1ヶ月程度継続した場合も、有機物除去にはほとんど影響を与えなかった (Shi et al., 2013)。

7) バクテリオファージ

回分式活性汚泥プロセスの人工下水の流入、嫌気反応、好気反応、沈殿、放流からなる1サイクル内でのウイルス性DNA (メンブレンフィルターを通しDNase処理による分解を受けないDNA) 濃度の変化を調べたところ、図5に示すように好気条件のはじめに増加する場合の他、沈殿工程中や嫌気反応中に増加する事例、また、まったく増加しない事例も見られた。また、基質投与直後に増加するケースや、一旦増加し、その後減少するケースもあった。用いた検出手法はバクテリオファージとその他のウイルスとの区別をすることは出来ないが、しかし、活性汚泥中の構成生物を考えればバクテリオファージが主体であり、また、ウイルス性DNAの増減はバクテリオファージ

ジの放出や分解または汚泥への再吸着を表している」と解釈できる。

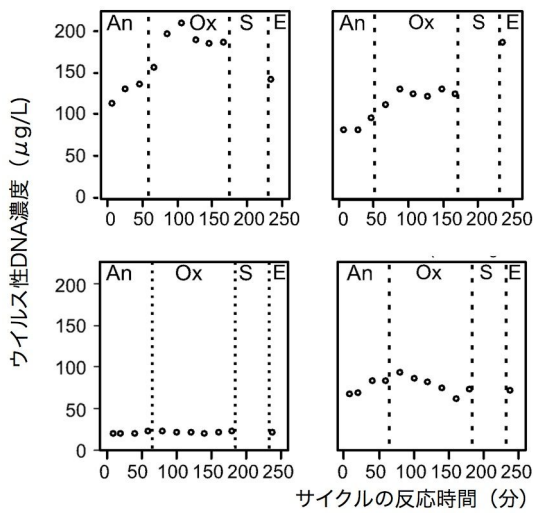


図5 上清中のウイルス性DNAの挙動 (Yang et al., 2014)

また、上清中の細胞外rRNAを分析する手法として、メンブレンフィルターでろ過した上清液を直接逆転写PCR反応に供することで、rRNA由来と見られる増幅産物を得ることが出来た。さらに、逆転写反応を行う場合と行わない場合の産物量を比較すること、また、RNase処理をした場合としない場合の産物量を検討することで、その産物の大半がDNA由来ではなくrRNA由来であることを確認した。回分式活性汚泥1サイクル内の上清中rRNAに検出された種構成は、時間の進行とともに変化した(図6)。ファージによる溶菌との直接的な因果関係を示すにはいたらなかったが、ファージによる溶菌との宿主との関係を調べるための新しいアプローチを提案することが出来た。

8) 化学物質を介した相互作用

2009年に我々は活性汚泥からのエタノール抽出物中に微生物群集構造を変化させる作用を持つ成分が存在することを報告した。ここでは当初その物質の特定を試みるつもりであったが、エタノール抽出物を添加して活性汚泥を培養しても、添加せずに培養した場合とほとんど微生物群集構造が変わらないという結果が続いた。ようやく2013年12月に当時運転していた活性汚泥から、微生物群集構造を強く変化させる作用を持つ物質を含む抽出液を得ることが出来た。PCR/RFLP法による解析の結果、同抽出液中の成分は、特定の微生物の増殖を促すだけでなく、既存の微生物群を死滅させる作用があると考えられ、汚泥中の微生物量が

わずか20%程度しか増加していない場合でも、PCR産物の制限酵素消化断片多型が大きく変化した。(発表準備中)

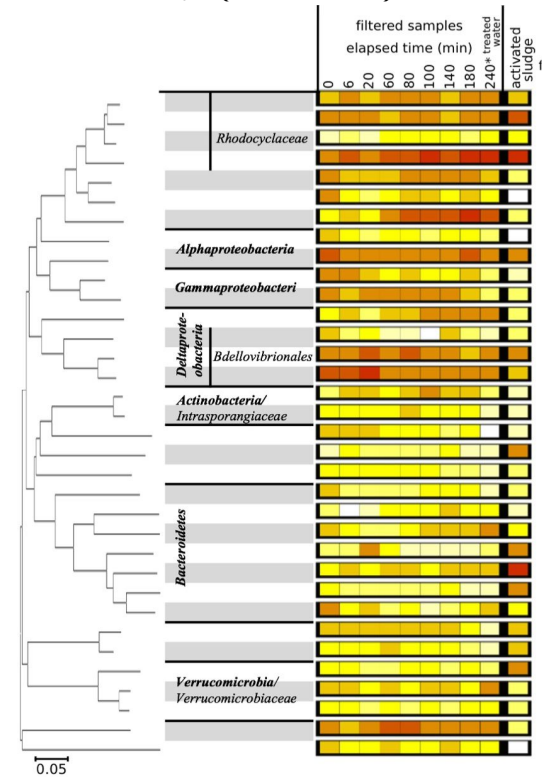


図6 1サイクル内の上清中rRNAに検出された種構成 (Yang et al., 2013)

(総括)

以上の結果から、活性汚泥微生物生態系に関して応用面および基礎面の知見を得ることが出来た。

応用面として、FAREWEL反応を用いてある程度のレベル(中級処理レベル)の処理水を得ることが出来ること、汚泥内に蓄積された有機物は濃縮工程においては安定であり、嫌気性消化槽では速やかに分解されてメタンガスに変換されるであろうこと、また、物質・エネルギー収支モデル的な解析を行うことにより、下水処理にかかるエネルギー効率を現在よりも25%程度改善できる可能性があることをしめした。また、有機物一時貯蔵能力のもう一つの活用の方向として時間差曝気法を示すことが出来た。

基礎面としては、細胞内に貯蔵された有機物の嫌気性条件下での分解過程について、外来の酵素ではなく細胞内の酵素が関与している可能性を示すことが出来た。また、バクテリオファージや化学物質をかいした相互作用といった、活性汚泥そのものに内在し微生物群集構造に影響を及ぼしうる因子について、新しい知見を得ることが出来た。上清中に検出されるファージ粒子は嫌気工程、好気工程、基質投与直後、沈殿工

程等、さまざまな場面で増加した。また、ファージによる溶菌との関連を明確に示すにはいたらなかったが、上清中のrRNAを調査することでファージにより溶菌された宿主を探る方法を提案した。化学物質を介した相互作用については、そうした化学物質は汚泥中に常に一定量存在するのではなく、増減があることを見いだすことが出来た。

我々は、活性汚泥中の微生物生態系について詳しく知ることにより、下水処理技術を社会の持続可能性を高める方向に変えていくことが可能であると考えている。本研究では特に応用面では有機物一時貯蔵現象に重点をおいて検討したが、活性汚泥微生物生態系についても新たな知見を得ることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

1. Yang H., Satoh H., Mino T. (2014) Dynamics of dsDNA viruses hosted by indigenous microorganisms in activated sludge in the treatment of synthetic wastewater. *J. Water Env. Technol.*, 13(3), 223-232. (doi: 10.2965/jwet.2014.223) (査読あり)
2. Gunawardana E.G.W., Satoh H., Mino T. (2014) Analysis of bacterial communities in treated water and activated sludge and evaluation of an easy methodology for preparing PCR-compatible DNA extracts. *J. Water Env. Technol.*, 12(1), 1-12. (doi: dx.doi.org/10.2965/jwet.2014.1) (査読あり)
3. Huda S.M.S., Satoh H., Mino T. (2013) Anaerobic Digestion of Polyhydroxybutyrate accumulated in excess activated sludge. *J. Water Env. Technol.*, 11(5), 429-438. (doi: org/10.2965/jwet.2013.429) (査読あり)
4. Yang H., Suda W., Oshima K., Hattori M., Satoh H., Mino T. (2013) Monitoring of ribosomal RNA in the supernatant of activated sludge. *土木学会論文集G*, 69(7), III_231-III_240. (査読あり)
5. Shi W., Satoh H., Mino T. (2013) The effect of reduction of aeration period on organic pollutants removal in sequencing batch activated sludge reactors. *土木学会論文集G*, 69, III_427-III_434. (査読あり)
6. Li N., Satoh H., Mino T.

(2012) Dynamics of dewaterability and bacterial populations in activated sludge. *Water Sci. Technol.*, 66, 1634-1640. (doi:10.2166/wst.2012.360) (査読あり)

7. Oshiki M., Onuki M., Satoh H., Mino T. (2013) Microbial community composition of polyhydroxyalkanoate-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment plants operated in fully aerobic mode. *Microbes and Environments*, 28(1), 96-104, 2013. (doi:org/10.1264/jsme2.ME12141) (査読あり)
8. Oshiki M., Satoh H., Mino T. (2011) Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the fluorescent dye Nile blue A. *Water Sci. Technol.*, 64, 747-753. (doi:10.2166/wst.2011.707) (査読あり)

〔学会発表〕(計33件)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻 味埜佐藤研究室ホームページ

<http://www.mwm.k.u-tokyo.ac.jp:8080/Plone/outcome>

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 (SATOH 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