

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710087

研究課題名（和文）糸状性微生物の制御による廃水処理施設における固液分離障害とリン除去悪化の解消

研究課題名（英文）Improvement of solid-liquid separation and nutrient removal in wastewater treatment plant by controlling filamentous bacteria

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

研究成果の概要（和文）：

固液分離特性が悪化した活性汚泥に共通して優占する *Chloroflexi* の糸状性微生物群を特定した。都市下水処理施設において、活性汚泥中の同糸状性微生物群の量は、活性汚泥の固液分離性と相関があることを明らかにした。また FISH 法で *Chloroflexi* の糸状性微生物群を正確に検出する際に有用な competitor プローブを提案した。また活性汚泥と処理水の固液分離に優れた親水性ポリテトラフルオロエチレン分離膜を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Filamentous bacteria belonging to the phylum *Chloroflexi* were frequently identified in activated sludge systems, where their presence seriously compromised liquid/solid phase separation in the secondary clarifiers. In municipal wastewater treatment plants, particularly in summer, levels of these filamentous *Chloroflexi* correlated with biomass sludge volume index. Also, a competitor probe was designed for the precise identification of filamentous *Chloroflexi* in FISH experiment. A hydrophilic polytetrafluoroethylene membrane was developed to allow effective liquid/solid phase separation of activated sludge.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：環境生物化学工学

科研費の分科・細目：環境学／環境技術・環境材料

キーワード：環境技術，微生物，土木環境システム，バイオリアクター，化学工学，国際情報交流 オーストラリア

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法はおよそ100年前に開発されて以来、種々の改良・改善、各種の変法の開発が行われ、現在では技術的に確立された廃水処理法とみなされ、世界的に広く普及している。しかし活性汚泥中に一定の限度を超えて糸状性微生物が増殖することによって生ずる、活性汚泥の固液分離障害は、未だ解決されていない。活性汚泥の固液分離障害は、放流水質の悪化、腐敗臭の発生など、維持管理

上の問題、また病原体微生物の飛散・蔓延等の公衆衛生上の問題をもたらす。そのため糸状性微生物の異常増殖を抑制するための知見が必要である。

糸状性微生物の増殖を抑制するため、これまでに2つの制御が行われてきた。1つは反応槽内に基質濃度勾配を設けることで増殖速度の遅い糸状性微生物を排除する kinetic selection であり、もう1つは反応槽に嫌気槽や無酸素槽を付加することにより、嫌気ある

いは無酸素条件で増殖できない糸状性微生物を排除する、より抑制効果の高い *metabolic selection* である。しかし *metabolic selection* でも制御できない糸状性微生物の存在が指摘されており、新たな制御方法の確立が求められている。

2. 研究の目的

本研究は糸状性微生物群の増殖制御方法を明らかにし、固液分離障害と栄養塩除去悪化を解消する廃水処理技術の研究基盤を確立することが目的であった。端的には以下の4点に集約される。(1)遺伝子プローブを用いた分子生物学的手法により、各種廃水処理施設における糸状性微生物群の存在量を調べる。また上記糸状性微生物群の存在量と廃水処理施設の固液分離、栄養塩除去性能との相関関係を明らかにする。(2)上記の糸状性微生物群を単離・培養し、種々の環境条件における増殖速度や生理活性を調べる。また活性汚泥中で他の微生物群と共存している状態の糸状性微生物群について、分子生物学的手法によりその複合微生物系における生理活性を調べる。(3)糸状性微生物の代謝情報をもとに、糸状性微生物の異常増殖を抑制する廃水処理反応槽の運転条件を明らかにする。また糸状性微生物の増殖制御により改善される固液分離、栄養塩除去への効果を明らかにする。(4)分離膜の開発により固液分離障害の解消を検討する。

3. 研究の方法

(1) 都市下水処理施設における糸状性微生物群の存在量と廃水処理施設の固液分離性能との関係

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて活性汚泥中での糸状性細菌の観察を行い、その結果からバルキング原因細菌と推測された Eikelboom morphotype 1851、0803 について real-time PCR による定量を行った。さらに、活性汚泥の沈降性と real-time PCR での定量結果との相関を調べ、同細菌のバルキングとの関連性を解析した。複数の処理方式を採用する都市下水処理施設より採取した活性汚泥に対して、17 種類の FISH probe を用いて FISH を行い、蛍光顕微鏡による観察を行った。次に FISH で優占を確認した糸状性細菌を real-time PCR で定量するため、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の ClustalW を用いて、該当細菌の 16S rRNA gene に特異的な PCR primer を作製した。上記の活性汚泥から抽出した DNA に対して、作製した primer を用いて様々な条件で real-time PCR を行い、最適な反応条件を検討した。その後、PCR 産物を組み込んだプラスミドを用いて、real-time PCR の検量線を作成し、real-time PCR を行い、活性汚泥中の標的糸状性細菌の遺伝子を定

量した。

(2) TM7-305 プローブを用いた FISH 観察の問題

活性汚泥のバルキングを誘引する糸状性細菌の一部は、FISH 法を用いた解析により、Candidate division TM7 の系統に属することが報告されてきた。しかし著者らが都市下水処理活性汚泥を FISH 法で調べたところ、TM7 に分類されてきた糸状性細菌の一部が、実は *Chloroflexi* に属す糸状性細菌であった可能性を示す結果を得た。

都市下水処理施設より採取した活性汚泥を固定し、表 1 に示す既往のプローブを用いて FISH 実験を行った。表 1 の TM7-305 プローブは、TM7 の subgroup 1 を標的にデザインされたものであり、糸状性細菌 Eikelboom morphotype 0041 (図 1a) の検出に用いられてきた。しかし著者らが TM7-305 プローブを用いて FISH 実験を行ったところ、小数の Type 0041 とともに、別の形態の糸状性細菌 Eikelboom morphotype 1851 (図 1b) が多数蛍光染色された。この Type 1851 は、*Chloroflexi* に属す糸状性細菌として報告されているものであった。そこで *Chloroflexi* を標的とした Cy5 標識のプローブ CFXmix (CFX1223 + GNSB941) (表 1) を Cy3 標識の TM7-305 と同時に用いて FISH を行ったところ、TM7-305 で染色される Type 0041 と 1851 のほぼ全てが CFXmix でも染色された。

表 1 FISH プローブとクローンの塩基配列

| Probe & clone | Sequence (5'-3') |
|--------------------|----------------------------|
| CFX1223 | CCA TTG TAG CGT GTG TGT MG |
| GNSB941 | AAA CCA CAC GCT CCG CT |
| TM7-305 | GTC CCA GTC TGG CTG ATC |
| B09 | CAG GGT CAG ACC GAC -AG |
| TM7-305 competitor | GTC CCA GTC TGG CTG -TC |

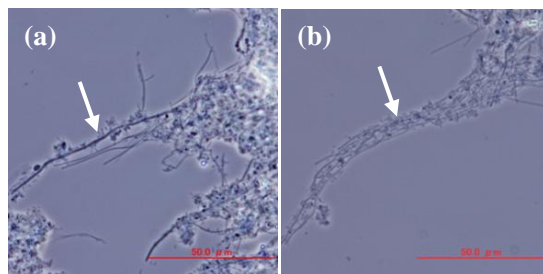


図 1 (a) Type 0041 と (b) Type 1851 の位相差顕微鏡写真

この結果は、二重に染色された Type 0041 と 1851 が、二つのプローブの相補配列を有するか、あるいはいずれかのプローブが同細菌に非特異的に結合していることを示すも

のであった。そこで TM7、*Chloroflexi* という異なる系統を標的とする TM7-305 と CFXmix の両プローブが、同一の糸状性細菌を蛍光染色した原因を調べた。

(3) 生物学的好気リン除去

栄養塩類であるリンを廃水から除去するには、嫌気・好気法と呼ばれるプロセスが利用されている。これは 2. で述べた糸状性微生物制御のための *metabolic selection* のプロセスと同じである。しかし先述のとおり、嫌気・好気法では制御できない糸状性微生物の存在が指摘されている。従って嫌気条件を伴わない好気条件のみのリン除去プロセスを考案し、同プロセスにおけるリン除去の性能と糸状性微生物の制御について研究を行った。

リン除去の実験は実験室規模の回分反応槽を連続運転することで行った。運転開始から 46 日間はリン除去細菌 (PAOs) を馴養する目的で、嫌気・好気運転 (RUN1) を行った。その後の 39 日間は好気のみ運転 (RUN2) に切り替え、好氣的リン除去が行える期間を検証した。回分反応槽はプログラブルコントローラで制御し、回分 1 サイクルは 6 時間 (排水 10 分、流入 10 分、嫌気 120 分、好気 190 分 (RUN2 では嫌気 0 分、好気 310 分)、沈殿 30 分) とした。その他の条件は、反応槽容量: 4 L、SRT: 8 days、HRT: 12 hours、pH: 7.0 ± 0.1、水温: 20 °C、DO: 0 mg-O₂/L (嫌気)、4 mg-O₂/L 以上 (好気) であった。各サイクルの流入工程ではプロピオン酸ナトリウムを主な炭素源とする炭素質およびリン酸二水素カリウムをリン源とするリン基質を添加した。その後、PAOs の代謝に関わるプロピオン酸イオン、リン酸イオンおよび PHA の各濃度を測定するため、3、4 日に 1 サイクルの頻度でリアクター内の活性汚泥懸濁液を分析した。

(4) 膜分離活性汚泥法用 PTFE 分離膜の開発
膜分離活性汚泥法 (MBR) とは、標準活性汚泥法において重力沈降により行われる活性汚泥と処理水の固液分離操作を精密ろ過膜 (MF 膜) あるいは限外ろ過膜 (UF 膜) を用いた膜分離により行う方法である。MBR では膜の汚染 (ファウリング) が進行すると処理能力が下がるため、膜には低ファウリング性が要求される。またファウリング進行時には薬剤による膜の洗浄が行われるため、膜はその化学的耐久性も必要である。そこで耐薬品性に優れた素材であるポリテトラフルオロエチレン (PTFE) の膜 (図 2) を作製し、ラボスケールの MBR 装置に適用して、膜の性能評価を行った。

有効容積 21 L の MBR 装置に、PTFE 素材の親水性膜と疎水性膜の 2 組 (いずれも公称孔

径 0.3 μm の精密濾過膜) を浸漬させ、グルコースを主な炭素源とする人工廃水の処理を行った。各膜の有効面積は 0.0288 m² で、処理水の引き抜きは間欠的に行い (8 分吸引 2 分停止)、引き抜き時の膜間差圧 (TMP) を経時的に測定した。また膜透過流束は運転開始時では 0.625 m³ m⁻² day⁻¹、13 日以降は 0.833 m³ m⁻² day⁻¹ に引き上げた。反応槽内の活性汚泥の濃度 (MLSS) は 6800-8300 mg L⁻¹、pH は 7.2-7.4 であった。TMP 20 kPa を目安に膜を MBR 装置から取り出し、表面をスポンジで拭き取る物理洗浄、2000 mg L⁻¹ の NaClO 溶液に 24 時間浸漬させる薬品洗浄を施した後、再度運転を行った。



図 2 PTFE 平膜モジュール (雑誌論文(2)より引用)

4. 研究成果

(1) 都市下水処理施設における糸状性微生物群の存在量と廃水処理施設の固液分離性能との関係

各種 probe を用いた FISH 法による顕微鏡観察の結果、Eikelboom morphotype 1851、0803 の形状を有する *Chloroflexi* の糸状性細菌 (図 1b、図 3) を確認した。これらの糸状性細菌を標的とする primer により同糸状性細菌の定量を行い、活性汚泥の沈降性指標 (SVI) と比較した結果、Eikelboom morphotype 1851 は特に夏季における活性汚泥の沈降性と相関がある事が示唆された (図 4)。一方 Eikelboom morphotype 0803 の量と汚泥沈降性には相関関係がみられなかった。しかし定量された 16S rRNA gene のコピー数は Eikelboom morphotype 1851 よりもおおよそ 10⁴ 倍多く、活性汚泥中で同細菌が多く増殖していることが示された。

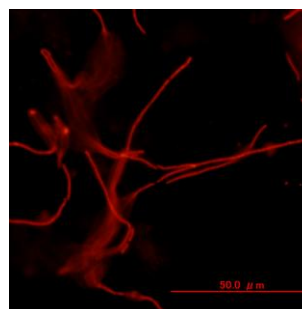


図 3 Type 0803 の蛍光顕微鏡写真

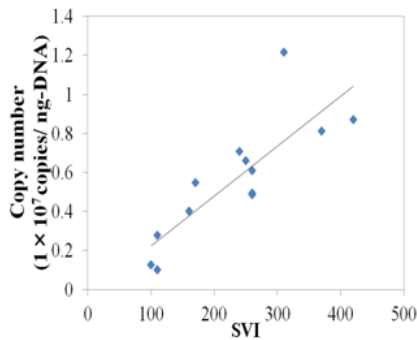


図4 Eikelboom morphotype 1851の量と活性汚泥の沈降性との関係

(2) TM7-305 プローブを用いた FISH 観察の問題

活性汚泥から DNA を抽出して 16SrRNA gene のクローンライブラリーを作製した。解析した 96 クローンの中に TM7-305 の相補配列を保有するものはなかった。しかし TM7-305 の相補配列を 1 塩基欠損した clone B9 が見つかった (表 1)。またその塩基配列 (約 600 bp) は、Type 1851 の形態を有する *Chloroflexi* 糸状性細菌 (*Koileothrix aurantiaca*) の 16SrRNA gene に近縁であった。そこで表 1 に示す clone B9 の TM7-305 部位に対応する配列 (17 bp) に相補的な、蛍光標識のない TM7-305 competitor プローブ (表 1) を作製し、Cy5 標識の CFXmix、Cy3 標識の TM7-305 と同時に用いて FISH を行った。実験の結果、CFXmix にのみ蛍光染色された Type 1851 を多数観察した。また Type 0041 の糸状性細菌の多くも、TM7-305 プローブを competitor プローブと併用することで、蛍光染色されなくなった。以上の結果は、TM7-305 で検出した Type 0041 と 1851 の多くが、clone B9 と同じ配列 (表 1) を有する *Chloroflexi* の糸状性細菌であり、TM7-305 プローブと非特異的に結合をしていたことを示すものであった。

(3) 生物学的な好気リン除去

図 5 にプロピオン酸基質で好気条件のみの運転に切り替えた RUN2-7 日目における回分 1 サイクルの水質の変化を示す。図 5 より、リアクター内では、プロピオン酸摂取に伴うリンおよび PHA 濃度の上昇および、その後の PHA の消費とリン酸の過剰摂取という PAOs の典型的な代謝が行われていたことが分かった。同様の代謝は、RUN2 開始から終了まで確認された。図 6 にはプロピオン酸基質と酢酸基質の運転の RUN2 におけるリン除去能力の経日変化を示す。リン除去能力 ΔP は、サイクル開始時 (0 分) のリンの濃度 (mgP/g-MLSS) と、310 分間の好気条件で観察された最も低いリン濃度 (mg-P/g-MLSS) との差である。図 6 より、11 日目まではプロピオン酸基質の時よりも、酢酸基質の時のほうが

ΔP の値が高かった。しかし 11 日目における 10.3 mg-P/g-MLSS を最大に、以後酢酸基質の ΔP は低下した。一方プロピオン酸基質では、1 日目を除き、経過日数とともに ΔP が上昇する傾向であった。この結果、酢酸基質よりも長い 39 日間、 ΔP の値が 0 mg-P/g-MLSS まで低下することなく、好氣的リン除去能力が維持された。しかしながらプロピオン酸基質の時には、運転の後半において糸状性微生物が増加し、固液分離が悪化していることを確認した (図 7)。これは酢酸基質のときには確認されなかったものであった。

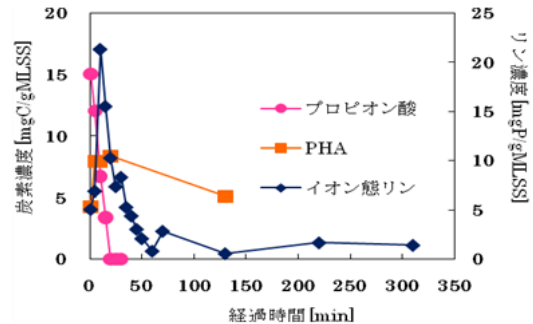


図 5 RUN2-7 日目の回分 1 サイクルにおけるリアクター内の水質変化

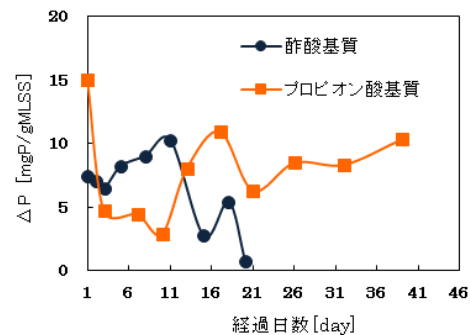


図 6 好氣的リン除去能力の経日変化

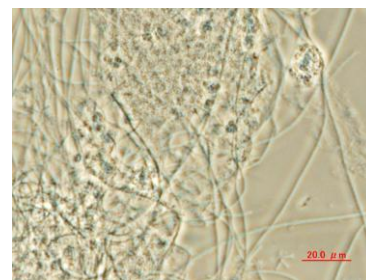


図 7 RUN2 の運転後半に確認された糸状性微生物の顕微鏡写真

(4) 膜分離活性汚泥法用 PTFE 分離膜の開発

MBR 運転期間 (58 日間) における膜の TMP の経時変化を図 8 に示す。Run 1 において、親水性膜は TMP の上昇が遅く、親水化処理の優位性が認められた。また膜を洗浄した後の Run 2 においても、TMP 上昇における親水性膜の優位性が保たれていた。

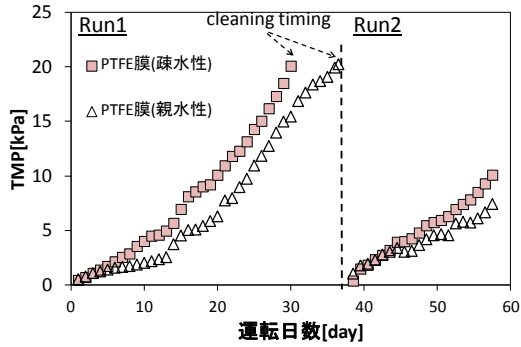


図 8 各膜の TMP の経時変化

(5) 総括

本研究の結果から、下水処理場における固液分離性能の悪化と関係のある糸状性微生物を *Chloroflexi* の糸状性微生物に見出し、またその関係を定量的に把握するに至った。しかしその代謝や増殖を制御するプロセスについては、本研究において知見を得ることができなかった。今後は *Chloroflexi* の糸状性微生物群の代謝を調べて増殖制御方法を検討し、下水処理場の固液分離障害を解決していく必要がある。

本研究ではまた FISH 法で *Chloroflexi* の糸状性微生物群を正確に検出する際に有用な competitor プローブを提案した。同プローブは、今後の糸状性微生物の FISH 観察において必須となる。さらに本研究では、活性汚泥の固液分離に適した膜の開発を目的として、PTFE 分離膜を作製した。膜表面の親水性を変えることにより、固液分離に伴う汚染の少ない膜を開発することができた。

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 4 件)

(1) Yuichiro Mikami, Tadashi Nittami, Futoshi Kurisu, Effect of endogenous carbon source on biological denitrification rate, JWET, 査読有, 11(1), 2013, 1-9
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jwet/11/1/11_1/_pdf

(2) Tadashi Nittami, Tetsuo Hitomi, Kanji Matsumoto, Kazuho Nakamura, Takaharu Ikeda, Yoshihiro Setoguchi, Manabu Motoori, Comparison of polytetrafluoroethylene flat-sheet membranes with different pore sizes in application to submerged membrane bioreactor, Membranes, 査読有, 2(2), 2012, 228-236
 DOI:10.3390/membranes2020228

(3) Tadashi Nittami, Hiroshi Oi, Kanji Matsumoto, Robert J. Seviour, Influence of temperature, pH and dissolved oxygen concentration on enhanced biological phosphorus removal under strictly aerobic conditions, New Biotechnol, 査読有, 29(1), 2011, 2-8
 DOI:10.1016/j.nbt.2011.06.012

(4) Tadashi Nittami, Hiroaki Ootake, Yuko Imai, Yuya Hosokai, Ayako Takada, Kanji Matsumoto, Partial nitrification in a continuous pre-denitrification submerged membrane bioreactor and its nitrifying bacterial activity and community dynamics, Biochem Eng J, 査読有, 55(2), 2011, 101-107
 DOI:10.1016/j.bej.2011.03.010

[学会発表] (計 7 件)

(1) 新田見 匡, 山田 拓也, 渡邊 昌俊, 下水処理活性汚泥に存在する TM7 と *Chloroflexi* の糸状性細菌, 第 47 回日本水環境学会年会, 2013. 3. 13, 大阪

(2) Nittami T., Mukai M., Uematsu K., Matsumoto K. and Fujita M., Effect of composition of intracellular polyhydroxyalkanoates on PAO metabolism change under strictly aerobic conditions, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2012.9.19, Daegu, Korea.

(3) Nittami T., Speirs L., Tucci J., Watanabe M. and Seviour R.J., False positive identification due to FISH probe hybridization to sites with single base deletions may overestimate the abundance of some filamentous Bacterial morphotypes, including those belonging to the candidate division TM7, The 14th International symposium on Microbial Ecology (ISME14), 2012.8.23, Copenhagen, Denmark.

(4) Speirs L., Nittami T., Tucci J. and Seviour R.J., The activated sludge bulking filamentous organism Eikelboom morphotype 0803 embraces two distinct phylotypes within the Chloroflexi. The 14th International symposium on Microbial Ecology (ISME14), 2012.8.21, Copenhagen, Denmark.

(5) Mikami Y., Nittami T. and Kurisu F., Effect of endogenous carbon source on biological denitrification rate. Water and Environment Technology Conference (WET2012), 2012.6.29, Tokyo, Japan.

(6) Nittami T., Hitomi T., Matsumoto K., Nakamura K., Ikeda T., Setoguchi Y., Motoori M., Comparison of PTFE flat-sheet membrane modules with different pore sizes in application to submerged membrane bioreactor, The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, 2011.10.4, Tokyo, Japan

(7) 向井 雅之, 新田見 匡, 上松啓介, 中村一穂, 松本 幹治, 炭素基質が好氣的リン除去に与える影響, 環境バイオテクノロジー学会 2011 年度大会, 2011. 6. 20, 東京

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし