

3. 高水温に適した下水高度処理技術に関する研究

下水処理研究室 室長 山下 洋正
主任研究官 重村 浩之
研究官 道中 敦子

1. はじめに

発展途上国では、経済的な理由から COD 排出基準値のみを満たす経済的負担が少ない下水処理方法が開発・導入されてきた。しかしながら近年、タイやマレーシアのような都市化が進む地域では富栄養化が問題視されるようになってきたことから、窒素・リン規制の導入等、排水基準項目が見直される傾向がある。このことから、途上国へ導入する下水処理方式においても、今後の経済発展に伴い、リンや窒素の除去を視野に入れなければならない。現在先進国で導入されている下水高度処理技術では、リン除去細菌や硝化細菌、脱窒細菌など、微生物の持つ特徴を活用し、有機物だけでなく栄養塩（リン・窒素）を除去しているが、水温条件は 25℃未満が一般的である。このことから、熱帯地域に位置する発展途上国へ生物学的な下水高度処理技術の導入を検討するにあたり、高水温条件（25～40℃）が系内微生物群集に与える影響を調べることが不可欠である。そこで、本研究では高水温条件が下水高度処理に関与する微生物群集に与える影響を調べるとともに、良好な栄養塩除去が保持可能な高水温条件について明らかにするものである。特に、高水温時に影響を受けると考えられる生物学的リン除去に着目し、水温条件がリン除去及び系内微生物群集に与える影響を調べた。

2. 調査方法

生物学的リン除去 Enhanced biological phosphorus removal（以下、EBPR）はポリリン酸蓄積細菌 Polyphosphate accumulating organisms（以下、PAOs）の特徴的な代謝を活用し、嫌気好気運転を行うことで下水からリンを除去する。本研究では、実験室リアクター（写真 1）を用いて 22℃から 32℃まで順次水温条件を変更し、高水温条件が生物学的リン除去に及ぼす影響を調べた。



写真 1 実験室規模 EBPR リアクター

(1) 実験室 EBPR リアクター運転条件

実験室規模 EBPR リアクターは容量 2L の連続回分式リアクターを用いて運転した。運転サイクルは、放流 9 分、流入 11 分、嫌気工程 60 分、好気工程 120 分、沈殿 40 分を 1 サイクルとし、1 サイクル（4 時間）を 1 日に 6 サイクル繰り返すシーケンスを自動管理（LabVIEW システム、ナショナルインスツルメンツ社）して運転した（図 1）。実下水処理場の好気槽末端より採取した活性汚泥を種汚泥として用いた。HRT は 10 時間、SRT は約 10 日になるように運転した。酢酸を主とした炭素源で馴致することによりリアクター内で主要な PAOs が優占するという知見

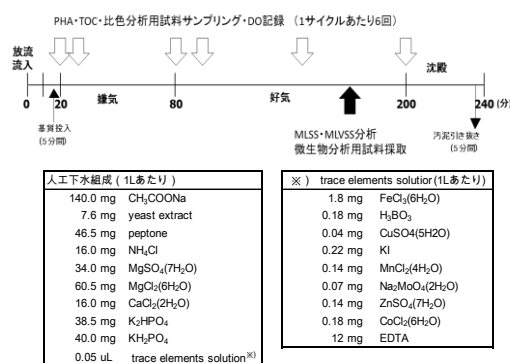


図 1 リアクター運転サイクルおよび人工下水（基質）組成

がある。このことから、本実験では酢酸を主たる炭素源とした濃縮濃縮基質を人工下水として、流入サイクル時に投入した。人工下水は、50mgC/L の炭素源が 1 サイクルに流入するように設定し C:P 比は 3:1（質量

比)にて運転した(図1)。嫌気における窒素パージは行わず、沈殿・放流時以外はスターラーによる攪拌を行った。水温以外同条件のリアクターを2台用意し、水温条件を変更せず一定に運転したものを対照系、水温条件を22℃~32℃まで変化させて運転したものを実験系とする。下水試験方法(2012)²⁾に従いMLSS濃度を測定、全リンはペルオキソ二硫酸カリウム分解法により分解後、自動比色分析機(ブラン・ルーベ社製TRAACS2000)により測定した。採水後速やかに遠心分離(3000rpm, 10分)し、上澄みを0.45μmのシリンジフィルターでろ過したろ液を用いて、溶存態窒素およびリンは上述の自動比色分析機を用いて、溶存態有機物はTOC-5000(島津製作所製)を用いて測定した。

(2) 遺伝子解析

活性汚泥懸濁試料に同量のエタノール(99.5%分子生物学用DNase, RNase Free, Wako)を添加し-20℃にて保存したものをDNA抽出に用いた。DNA抽出はMagtration System 12GC and GC series Magtration-MagaZorb DNA Common Kit 200N(Precision System Science社)³⁾にて行い、得られたDNA試料を用いて、標的遺伝子を定量PCR法によって定量した。定量PCRはSYBR® Premix Ex Taq™ IIおよびMightyAmp® for Real Time(SYBR® Plus)(タカラバイオ社)を用いて、Rotor-

Gene™ Q(QIAGEN社)にて行った。PCR条件およびプライマーは表1に示す文献に従い実施した。次世代シーケンスによる系内細菌群集解析は、16sRNA遺伝子(V3-V4領域)を用いて、MiSeq™(Illumina社)により配列を決定し、RDP MultiClassifier ver.2.10.1による同源性検索をRibosomal Database Projectのデータベースを用いて行った。

表1 使用プライマー一覧

標的遺伝子	F primer	R primer	Reference
全細菌 16S rRNA	Bact519f	Bact907r	4
<i>Candidatus</i> Accumulibacter 16S rRNA	518f	PAO846r	5
<i>Candidatus</i> Competibacter 16S rRNA	GBf	GBr	6
clade I	Acc-ppk1-763f	Acc-ppk1-1170r	5
clade IIA	Acc-ppk1-893f	Acc-ppk1-997r	5
clade IIB	Acc-ppk1-870f	Acc-ppk1-1002r	5
clade IIC	Acc-ppk1-254f	Acc-ppk1-460r	5
clade IID	Acc-ppk1-375f	Acc-ppk1-522r	5
clade IIF	Acc-ppk1-355f	Acc-ppk1-600r	7

3. 結果及び考察

対照系は水温条件を変更せず22℃にて同じ運転を行い、実験系は、22℃にて馴致運転を開始した後、22℃、25℃、28℃、30℃と順次水温を変更した。それぞれの水温条件にて70日間以上のリン除去能力が保持されることを確認した後、水温を上昇させた。運転期間を通じてMLSSは約2500~3000mg/Lだった。また、pHについて自動制御は行っていないが、1日2回確認し、約7.8(7.1~8.1)にて運転されるように調整した。以下に、リン除去能力及び微生物相の推移について整理した。

(1) リン除去能力の推移

リン除去率についてそれぞれの温度条件における期間平均を運転日数と処理水質とともに表2に示す。対照系は馴致期間を除く356日間を通して、期間平均で86.3%のリン除去率が確認された。実験系については、22℃から28℃まで、温度を上昇しても除去率は7割以上を保持しており、いずれも良好なリン除去を行っていた。実験系におけるリン除去率の推移を図2に示す。22℃、25℃、28℃において運転条件等を変更した際に一時的にリン除去率が低下する現象が見られたがその後復帰している。一方、30℃に条件変更後約1か月間、60%程度のリン除去率を保持していたが、その後回復は見られず減少した。引き続き32℃にて運転を行ったが全くリン除去は観察されず、復帰する見込みがないと判断し運転期間23日間で停止した。

表2 各温度条件運転時リン除去率および処理水質

	運転条件	運転日数	処理水リン濃度	リン除去率
			(mg/L)	(%)
実験系	22℃	83	3.5	78.3%
	25℃	75	3.5	77.9%
	28℃	84	2.4	85.0%
	30℃	81	10.2	38.3%
	32℃	23	22.6	9.1%
対照系	22℃	356	2.2	86.3%

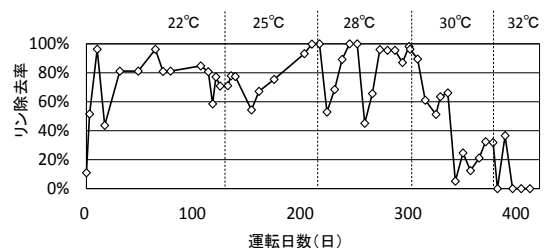


図2 実験系におけるリン除去率の推移

PAOs は、嫌気工程にてポリリン酸を分解することで生じるエネルギーにより有機物を摂取し体内に蓄積し、その後好気工程へ移行すると体内に蓄積した有機物を分解することで得たエネルギーより増殖及びポリリン酸の再合成を行う。従って嫌気工程ではリンをはき出すが、好気工程ではリンを取り込み、取り込み量が吐き出し量を上回ることから、結果的に

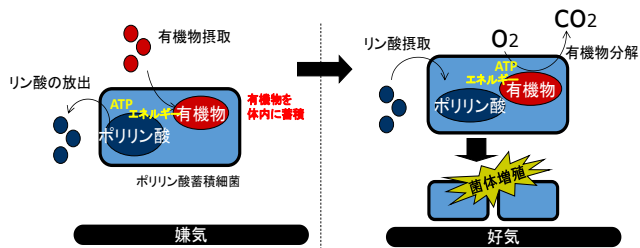


図3 PAOsの代謝

に処理水の溶存態リン濃度は流入水より低くなり、流入下水からリンを除去することができる(図3)。そこで、1サイクルにおける溶存態リン濃度プロファイルをを調べることで PAOs の代謝を確認することができる。対照系および実験系 28℃、30℃運転時について、溶存態リン濃度の1サイクルモニタリング結果を図4に示す。対照系および実験系 28℃運転時では、好気工程で完全にリンを摂取しており、良好な EBPR の代謝が確認された。一方、実験系 30℃運転時では、嫌気工程終了時のリン濃度が低下し、好気工程終了時においてもリンの取り残しが観察されるようになり、良好なリン除去と同様な代謝が保持出来ていなかった。このことから、リン除去率が低下したのは、PAOsによるリン除去能力が低下したためと示唆された。

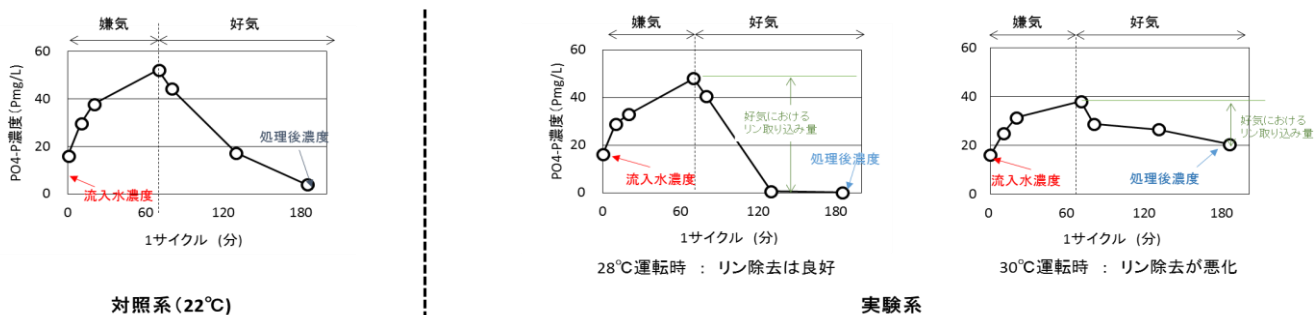


図4 溶存態 PO₄-P 濃度の1サイクルモニタリング結果

(2) 微生物群集解析

1) 次世代シーケンスによる系内微生物群集解析

厳密には「嫌気条件下でポリリン酸を加水分解して得たエネルギーで短鎖脂肪酸を摂取してポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を蓄積し、好気条件下で PHA を酸化分解して増殖、ポリリン酸合成をおこなうポリリン酸蓄積微生物」を総称し PAOs を示すが、ポリリン酸を蓄積しリン除去に貢献すると考えられる細菌は他にも存在することが報告されている(炭素源摂取等に関する代謝については上述に限らない)。そこで、系内に存在する微生物を網羅的に調べるため次世代シーケンスによる群集構造解析結果を図5に示す。

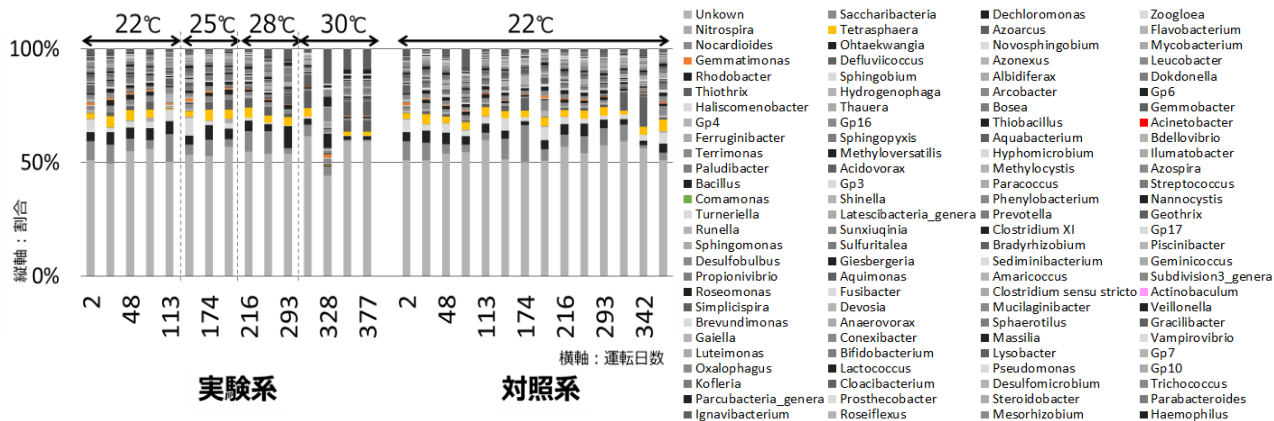


図5 系内微生物群集構造の経日変化(属レベル)

門レベルでは約 15~40%の割合で Betaproteobacteria が優占していたが、属レベルでの解析では Unknown が約半分を占めており分類ができなかった。リン除去に貢献しうる細菌として Tetrasphaera 属、Comamonas 属、Gemmatimonas 属、Acinetobacter 属、Actinobaculum 属が検出されたがいずれも低い値であり、どのサンプルにおいても 5 種類の総和で 5%未満だったため優占種ではなかった。対照系では運転期間を通して大きな群集構造に変化は見られなかった。一方で、実験系では 30℃を超えてから変化が確認され、温度の影響を受けていることが示唆された。

実下水処理場において存在および EBPR 能を有していることが確認され、主要な PAOs であると報告されている Candidatus ‘Accumulibacter phosphatis’ (以下、Accumulibacter) ⁸⁾は、次世代シーケンスの結果からは確認できなかった。また、今回の結果では、Accumulibacter 近縁種として科レベルでは Rhodocyclaceae 科は存在が確認できたが Rhodocyclus 属は検出されなかった。

2) PAOs および競合細菌の定量

そこで、16sRNA 遺伝子を対象とした定量 PCR 法により Accumulibacter の遺伝子について定量を行った。その結果、全細菌 (16sRNA 遺伝子を対象に定量) に対する Accumulibacter 比は 0.9~12.3%だった。これまでに FISH 法により EBPR リアクターの Accumulibacter 存在比を調べた結果、4~18%で存在することが報告されており ⁹⁾、同様の結果が得られた。また、図 6 に示すとおり、リン除去率の低下と Accumulibacter 存在比の低下が同時期に観察されており、系内でリン除去に寄与していたと考えられる。

高温条件で良好なリン除去が維持できない原因の 1 つとして、Erdal ら ¹⁰⁾は競合細菌 (グリコーゲン蓄積細菌: 以下、GB) の嫌気における酢酸摂取速度が 25℃を超えると PAOs より速いことから、高温条件下では競合細菌が系を支配するためと考察している。このように、嫌気におけるリン放出量と酢酸摂取量から示唆される化学量論から議論された結果、PAOs は温度に依存しないと考察されており、温度上昇によるリン除去の悪化は競合細菌である GB の増殖速度が速くなったことに起因すると推測されてきた ¹¹⁾。そこで、本実験では、競合細菌 (GB として Candidatus ‘Competibacter phosphatis’ を対象とする) の存在量を実際に定量 PCR により測定した。図 7 に Accumulibacter (PAOs) と Competibacter (GB) の存在量の変化を、対象遺伝子コピー数の経日変化にて示す。良好な EBPR が確認された、対照系および実験系 22~28℃ 運転時では Accumulibacter と Competibacter の存在量に差が見られなかった。しかしながら、リン除去能力が低下した実験系 30℃ 運転時に Accumulibacter の急激な減少が確

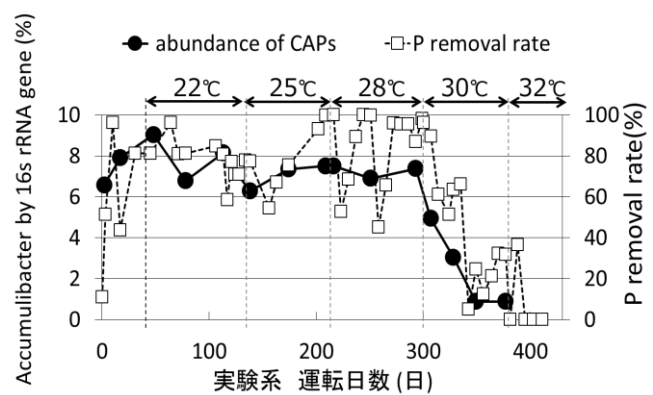


図 6 実験系におけるリン除去率と Accumulibacter (CAPs) 比の推移

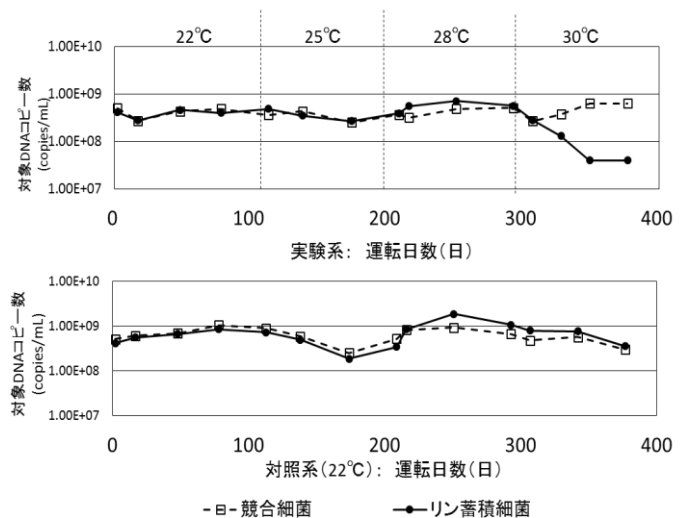


図 7 PAOs と GB の対象遺伝子コピー数 経日変化

認められた。一方、Competibacter は 30°Cを超えても維持されていた。しかしながら、増加傾向は見られなかった。このことから、Competibacter は高温に対する影響をほぼ受けないが Accumulibacter が高温により減少することから、このとき Competibacter の系内における見かけ上の存在比率は増加する。しかしながら、リン除去悪化の要因は Competibacter の増殖速度が温度の上昇に伴って速くなるのではなく、Accumulibacter の温度感受性によるものと考えられ、これまでの知見とは異なる結果となった。

3) ppk 遺伝子を対象とした Accumulibacter 群集構造の解析

近年、polyphosphate kinase (ppk) 遺伝子を対象にした遺伝子解析より、16S rRNA による解析では明確にできなかった新たな知見として Accumulibacter は複数のグループに分類されることが報告された⁵⁾。そこで、系を構成している Accumulibacter の種類を調べるため Clade I, IIA, IIB, IIC, IID, IIF に分類されるグループについて定量 PCR により調べた。その結果、いずれの種類も存在しており、I と IIF は比較的存在量が低く、対照系、実験系いずれも系内では IIA, IIC, IID が優占していた。これは接種した種汚泥の性質を引き継いでいる。日本の実下水処理場活性汚泥では IIA, IIC が優占していたという報告¹²⁾があり、同様の傾向が確認された。I は脱窒性 PAOs であり、EBPR サンプルだけでなく底泥などの環境サンプルから検出されたものが多く含まれる。今回運転したリアクターでは脱窒は観察されておらず、優占していなかったことは妥当と考えられる。リアクター運転期間における各グループの遺伝子コピー数の経時変化を図 8 に示す。

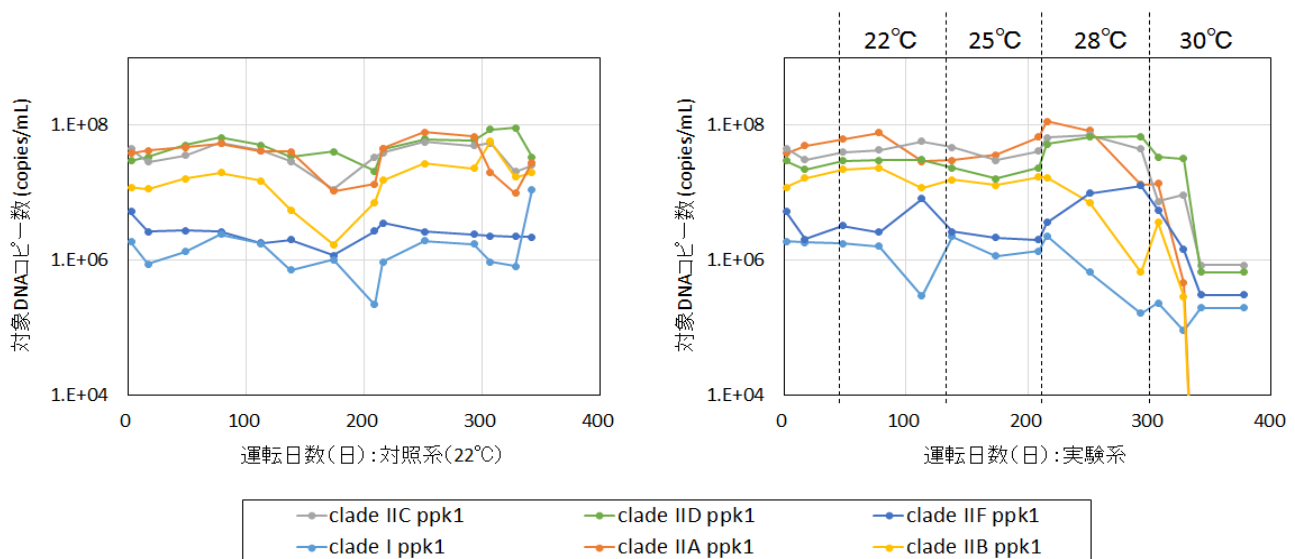


図 8 ppk 遺伝子を対象に分類した各 Accumulibacter グループの推移

22°C一定で運転した対照系では、ppk 遺伝子の群集構造に大きな変化はみられなかった。また、実験系においても 22°C~25°Cの条件下では群集構造に大きな変化はみられなかった。しかしながら、実験系 28°C運転条件下では、各グループにてその挙動が異なっていた。IIA, IIB は 25°Cを超えると減少傾向が観察され、30°C運転時に著しく減少し、検出限界値以下となった。同様に I についても 25°Cを超えると減少した。IIC と IID は 28°C運転時でもほぼ変化はみられず維持されていた。一方、IIF については 25°Cを超えると増加することが確認された。22°Cで運転していた対照系では、ほぼ一定で維持されており、これと比較しても増加していることがわかる。増加が確認されたグループは IIF だけであり、高温条件での競合に優位である可能性が示唆された。いずれのグループも 30°Cを超えると減少した。実験系では、28°C運転時まで良好な EBPR 能が確認されたことから、25°Cまでは IIA が優占しリン除去に寄与したと考えられるが、28°Cでは IID が維持に貢献したと推測される。

今回の結果より、系内には複数の *Accumulibacter* グループが存在しており、ppk 遺伝子の群集構造が温度によって変化することが明らかとなった。また、各グループによって温度に対する感受性が異なることが明確に示された。これまでに北アメリカで集積に成功し全長 DNA 配列を公開されているモデル種は strain UW-1¹³⁾ であり、IIA に分類されている。今回の結果からも、IIA は 25°C を超えた条件では維持することが難しいことがわかった。これまでの「高温条件で良好なリン除去が維持できない」という知見は、定温 (20°C) で集積されたリアクターを主に研究が進められてきたため、IIA や IIB のような種が優占していたものによる知見である可能性が推測される。近年、IIF の集積に成功したリアクターが報告され、32°C でも良好な EBPR が確認された¹⁴⁾。今回の結果からも、IIF は高温条件での競合に優位となる可能性が示唆されており、裏付ける結果となった。

このように、一概に下水温度が高い熱帯地域に生物学的リン除去を適応できないとはいえない。しかしながら、微生物構造が大きく影響することは明白であり、熱帯地域への適用時には細菌群集相の情報を踏まえて、構成している細菌の種類に適した技術を導入検討する必要があることが示された。

4. まとめ

活性汚泥の種類によっては高水温条件により影響を受けることが明らかとなり、生物学的な下水高度処理を熱帯地域へ導入する際には土着活性汚泥の種類を踏まえて検討する必要がある。また、長期的に 30°C を連続的に超える熱帯と同等な水温となるような気候変化が起った場合には、温帯～亜寒帯の先進国の活性汚泥が温度上昇による影響を受ける可能性が示されるが、先進国も含めて実下水処理場における ppk 遺伝子の群集構造の実態に関する情報は乏しく、データベースを充実させることが今後の課題である。今回、得られた成果は地球温暖化に起因する水温上昇時や熱帯への下水処理における高度処理導入時の技術的評価に関する基礎資料等として活用されることを期待する。

参考文献

- 1) Crocetti et al. (2000) *Microbiology*, vol.148, p3353-3364.
- 2) 下水試験方法 上巻 2012年, 公益社団法人日本下水道協会
- 3) Takahashi et al. (2014) *PLoS One*, vol.9, e105592.
- 4) Stubner et al. (2002) *Journal of Microbiology Methods*, vol.50, p155-164.
- 5) He et al. (2007) *Applied and Environmental Microbiology*, vol.73, p5865-5874.
- 6) Fukushima et al. (2010) *Water Science and Technology*, vol.62, p1432-1439.
- 7) Ong et al. (2014) *Water Research*, vol.64, p102-112.
- 8) Beer et al. (2006) *Journal of Applied Microbiology*, vol.100, p233-243.
- 9) Fukushima et al. (2007) *Microbes and Environments*, vol. 22. p.346-354.
- 10) Erdal et al. (2003) *Water Science and Technology*, p.1-8.
- 11) Panswad et al. (2003) *Water Research*, vol.37, p409-415.
- 12) Mao et al. (2015) *Nature, Scientific Reports*, vol.5:11857, p1-10
- 13) Martin et al. (2006) *Nature Biotechnology*, vol.24, p.1263-1269
- 14) Ong et al. (2014) *Water Research*, vol.64, p102-112.