

## 論文の内容の要旨

論文題目 嫌気好気回分式活性汚泥の微生物群集構造解析と生物学的リン除去活性の遷移過程のモデル評価

氏名 藤田昌史

単一反応槽で処理を完結できるコンパクトさに加え、一連の処理工程を時間的に制御できるフレキシブルさを有する回分式活性汚泥法は、近年、栄養塩類除去の必要性が高まっている小規模下水処理において、有望視されているプロセスのひとつである。しかしながら、時々刻々と水質が変動する流入下水に対して、安定した処理を行うための運転管理手法は十分には確立されていない。運転管理手法を検討するためには、IWA 活性汚泥モデルに代表されるように、再現性の高い処理プロセスモデルを用いることが、特に、高度技術者の不足する小規模下水処理においては、非常に有用であると考えられる。

これまで、活性汚泥処理モデルについての研究は、流入下水と処理水質のデータセットや汚泥濃度、汚泥リン含有率などの数値データを用いて、モデルの検定、検証が行われ、その有効性や限界点が検討されてきたが、一連の予測計算に直接寄与するバイオマス成分の再現性については、まったく検討されていない。さらに汎用性や精度の高い処理モデルを構築するためには、上述した従来の検討に加えて、活性汚泥微生物群集に着目してモデル開発を進める必要があると考えられる。

活性汚泥微生物群集についての研究は、化学分類学的手法や分子生物学的手法が利用されることにより、従来、ブラックボックス的に捉えられていた活性汚泥の微生物群集構造が次第に明らかになりつつある。そのようななかで、生物学的リン除去において、主要な役割を果たしていると考えられているポリリン酸蓄積細菌についても、その正体を明らかにすべく研究が進められているが、その大多数が人工下水を処理する汚泥を解析対象としており、実下水を処理する汚泥を解析した例は非常に限られている。また、ポリリン酸蓄積細菌についての知見が蓄積されつつあるが、統一した見解は得られておらず、モデル計算におけるポリリン酸蓄積細菌の挙動を検討できるレベルには至っていない。

そこで本研究では、微生物動態を再現可能な処理モデル開発を目指すために、特に、回分式活性汚泥法における生物学的リン除去に着目し、大きく2つの目的を設定した。

- 1) 実下水を処理する嫌気好気回分式活性汚泥の微生物群集構造を、キノプロファイル法およびPCR-DGGE法を組み合わせることで生物学的リン除去活性の遷移過程で解析するとともに、これらの微生物群集解析データと生物学的リン除去活性との関係を統計学的に解析することにより、ポリリン酸蓄積細菌の指標を検索する。
- 2) IWA ASM2dを基礎に開発した回分式活性汚泥処理モデルを、生物学的リン除去活性が遷移する過程を追跡した人工下水および実下水による処理実験結果に適用することにより、モデルの有効性や限界点を検討する。

第1章では、本論文の背景として、まず小規模下水処理の現状を述べ、活性汚泥処理モデルと活性汚泥微生物群集解析に関する研究をリンクさせることの重要性を指摘し、本論文の目的および構成を示した。

第2章では、回分式活性汚泥法やそのモデル化、生物学的リン除去についての既存の知見や、本論文で微生物群集解析手法として用いたキノプロファイル法およびPCR-DGGE法の原理や適用例について整理した。

第3章では、生物学的リン除去活性の評価方法やその結果をもとにポリリン酸蓄積細菌濃度を動力学的に推定する方法について述べた。また、本論文で用いた水質や汚泥分析の方法を整理するとともに、キノプロファイル法やPCR-DGGE法の分析方法についてまとめた。さらに、活性汚泥処理モデルによる計算で必要となる流入下水の有機物組成濃度を推定する方法として、酸素利用速度を用いる方法についてまとめた。

第4章では、PCR-DGGE法により得られたバンドデータの統計学的な取り扱い方について検討した。

まず、PCR-DGGE法によって検出されたすべてのピークのなかから、DGGEバンドとは無関係なピークを取り除くための閾値の設定方法について、統計学的な概念のひとつである非類似度を用いて検討した。その結果、可視バンド程度のバンド数を解析対象にすることが望ましいことが明らかとなった。

次に、必ずしも対応する微生物種の存在量を反映しているとは限らないDGGEバンドデータを、多次元尺度構成法やクラスター解析に適用する際、DGGEバンドデータを標準化することにより、DGGEバンド強度の大小によらず個々の変化に着目して、微生物群集構造を評価する方法を提案した。

さらに、DGGEバンドデータとキノプロファイルデータを統合することにより、DGGEバンドデータから対応する微生物種の存在量を統計学的に推定する方法についての理論的な検討を行った。

第5章では、嫌気好気回分式活性汚泥の微生物群集構造を評価するために、生物学的リン除去活性が遷移する過程を追跡した実下水による処理実験結果やキノプロファイル法およびPCR-DGGE法を用いて微生物群集構造を解析した結果をまとめた。

まず、種汚泥として標準活性汚泥を用いて、実下水に酢酸を添加することにより、生物学的リン除去活性が増加する過程を追跡した実験では、実験前の予想に反して種汚泥にリン除去能が認められたものの、実験開始後6日目から9日にかけて、生物学的リン除去活性が増加した。種汚泥のキノプロファイル調べたところ、ユビキノンの優占分子種はQ-8であり、これに次いでQ-10、Q-9が検出された。メナキノンについては、MK-8 (H4)が優占分子種であり、これに次いでMK-10、MK-7が検出された。この結果は、過去に報告されている都市下水を処理する標準活性汚泥のキノプロファイルと同様の結果を示した。実験期間を通じてユビキノンの優占順位は変わらなかったが、生物学的リン除去活性が増加した6日目から9日にかけて、MK-10とMK-7の順序が入れ替わり、メナキノンの優先順位は、MK-8 (H4)、MK-7、MK-10の順序になった。これらの変化を定量的に評価するために、実験期間におけるキノプロファイルデータから非類似度を算出した。その結果、実験期間におけるサンプル間の非類似度がすべて0.1以下だったことから、実質的な微生物群集構造の変化は起こらなかったと判断された。解析の分解能を高めるために、ユビキノンとメナキノンとを別に、同様に非類似度を算出したところ、ユビキノンを持つ微生物種の群集構造は、実験開始日から4日までに相対的に大きく変化しており、一方、メナキノンを持つ微生物種の群集構造は、6日目から9日目までに大きく変化していた。上述したように、生物学的リン除去活性が増加した6日目から9日にかけて、メナキノンを持つ微生物種の群集構造が相対的に大きく変化していたことから、生物学的リン除去に関係する細菌が有するキノン種は、メナキノンである可能性が考えられた。

PCR-DGGE法を適用したところ、各実験日のサンプルで20本程度の可視バンドが認められた。第4章で検討した方法によりノイズピークを削除した後、バンド強度を標準化してクラスター解析を行ったところ、実験開始日と2日目とがひとつのクラスターに連結され、4日目、6日目、9日目、17日目がもうひとつのクラスターに連結された。実験期間において最も低い生物学的リン除去活性を示した4日目とそのときの約2倍の生物学的リン除去活性を示した9日目における微生物群集構造が類似していたと判断された。

実下水に酢酸ナトリウムを添加して生物学的リン除去活性を安定させた状態から、酢酸ナトリウム添加量を段階的に削減することにより、生物学的リン除去活性が低下する過程を追跡した実験では、実験開始後2日目で既に処理水にリンが残存し、リン除去の悪化が認められた。実験期間にわたって行ったリン放出活性試験の結果から、ポリリン酸蓄積細菌の活性汚泥に占める存在割合を動力学的に推定したところ、実験開始日

では 15.6%と見積もられたが、実験の経過とともに減少しつづけ、実験終了 22 日目では 8.3%と見積もられた。実験開始日のキノプロファイルは、上述した生物学的リン除去活性の増加過程を追跡した実験において、リン除去が十分に安定した後のユビキノとメナキノの優占順序と一致していた。実験開始 4 日目から 20 日目のキノプロファイルデータから非類似度を算出したところ、4 日目から 20 日目の間には、微生物群集構造に小さな変化が起こっていたと判断された。また、クラスター解析を行ったところ、実験の経過とともにクラスターが連結されていたことから、微生物群集構造は実験の経過とともに次第に変化していったことが明らかとなった。

上述した 2 ケースの実験では、生物学的リン除去活性の有無が明確に区別されるような過程を追跡できていないことや対照系を設けていないことが課題として考えられた。

そこで、対照系を含めた 4 系列の処理実験を行った。種汚泥として、実下水に酢酸ナトリウムを添加して生物学的リン除去活性を安定させた嫌気好気回分式活性汚泥を用いた。その汚泥を 4 系列の処理装置に同時に接種した。ケース 1 では、流入下水への酢酸ナトリウム添加を継続し、さらにリン酸を添加した。ケース 2 では、酢酸ナトリウム添加をストップした。ケース 3 では、酢酸ナトリウム添加をストップして、流入下水に硝酸性窒素を添加した。ケース 4 は、酢酸ナトリウム添加を継続する対照系とした。

実験期間にわたってそれぞれのケースについてリン放出活性試験を行い、ポリリン酸蓄積細菌の活性汚泥に占める存在割合を動力学的に推定したところ、実験開始後 38 日目では、ケース 1 で約 40%と見積もられたのに対し、ケース 3 ではゼロと見積もられ、明確な違いが認められた。実験開始日から 33 日目までは、ポリリン酸蓄積細菌の存在割合の大きさは、ケース 1、ケース 2、ケース 4、ケース 3 の順に推定されたが、38 日目では、ケース 2 とケース 4 の順序が入れ替わり、ケース 1、ケース 4、ケース 2、ケース 3 の順序になった。酢酸ナトリウムを添加したことにより、嫌気工程におけるリン放出量がケース 2 よりも高かったケース 4 では、通常よりも高い有機物濃度の下水が頻繁に流入したことにより、さらにリン放出量が高くなり、それに続く曝気工程で放出したリンを回収し切れなかったために、実験結果に表れていたように汚泥リン含有率がケース 2 よりも低くなるとともに生物学的リン除去活性も低くなり、その結果から動力学的に推定されたポリリン酸蓄積細菌の存在割合も低く見積もられたものと考えられる。

実験期間にわたってそれぞれのケースのキノプロファイルを調べ、非類似度解析を行ったところ、いずれのケースでも実質的な微生物群集構造の変化は認められなかった。また、実験開始後 39 日目における各ケースのキノプロファイルデータから、各ケース間の非類似度を算出したところ、動力学的に推定したポリリン酸蓄積細菌の存在割合に明確な違いが認められたケース 1 とケース 3 でさえも、微生物群集構造に実質的な違いはないと判断された。

PCR-DGGE 法により得られた DGGE 泳動図には、いずれのケースでも、*Rhodocyclus* 属と予想されるバンドが認められた。生物学的リン除去活性の有無によらず、*Rhodocyclus* 属が存在したことを意味する。従来、ポリリン酸蓄積細菌は比増殖速度が比較的遅い微生物種であると考えられており、生物学的リン除去活性の低下過程では wash out するものと考えられていたが、酢酸ナトリウム添加をストップしたケース 2 やそれに加え硝酸性窒素を添加することにより嫌気状態が確保されず、無酸素好気運転となったケース 3 でも、このバンドが存在し続けたことから、従来考えられていたポリリン酸蓄積細菌像とは異なるタイプの微生物種であると考えられる。

DGGE バンドデータを、上述した方法により処理して、多次元尺度構成法を行ったところ、解析の制約上、変化の程度は明らかではないが、対象系でも実験の経過とともに微生物群集構造が遷移していることが明らかとなった。流入下水の影響を受けて微生物群集構造が変化していたものと予想される。ケース 2 に加え、生物学的リン除去活性に明らかな違いが見られたケース 1 とケース 3 も、この遷移過程とほぼ同様の傾向を示した。多次元尺度構成法による解析では、本来、異なるケース間における各サンプルの布置位置を直接比較することはできないが、大局的には、それぞれがほぼ同様の傾向を示したことから、各ケース間の微生物群集構造に大きな違いはない可能性が示唆された。今後の課題であるが、これを確認するためには、多次元尺度構成法によって得られた微生物群集構造の遷移傾向に、どのような DGGE バンドが関与しているかを、各ケースごとに調べる必要があると考えられる。もし、それぞれのケースの遷移過程で共通した DGGE バンドが存在すれば、上述した解釈は支持され得るものと考えられる。

以上まとめると、嫌気好気回分式活性汚泥の微生物群集構造は、生物学的リン除去活性の有無によらず、大きくは変わらない可能性が示唆された。

第6章では、ポリリン酸蓄積細菌の指標となり得るキノンバイオマーカーやDGGEバンドについて検索した。上述した処理実験における生物学的リン除去活性の変化と個々のキノン種やDGGEバンドとの関係を定量的に調べた。

生物学的リン除去活性の増加過程を追跡した実験では、生物学的リン除去活性が増加した6日目から9日目にかけて、MK-7およびMK-8 (H4)の存在比率も増加していたことから、生物学的リン除去活性の増加過程に何らかの関係のある細菌が有するキノン種である可能性が示された。

生物学的リン除去活性の低下過程を追跡した実験では、動力学的に推定したポリリン酸蓄積細菌の存在比率の変化と同様の傾向を示したキノン種は認められなかったが、他のキノン種に比べればMK-7およびMK-8 (H4)の変化が、相対的に似た傾向を示した。

4系列の処理実験では、いずれのケースでも、動力学的に推定したポリリン酸蓄積細菌の存在比率の変化と同様の傾向を示したキノン種は認められなかった。また、生物学的リン除去活性に明確な違いが見られたケース1とケース3でも、上述した検討で生物学的リン除去に関わると考えたMK-7やMK-8 (H4)の存在比率に、生物学的リン除去活性ほどの違いは認められなかった。

個々のDGGEバンドと動力学的に推定したポリリン酸蓄積細菌の存在比率を、第4章で述べた方法により標準化して、非類似度解析をすべてのケースについて行った。そして、ポリリン酸蓄積細菌を示し得るDGGEバンドを検索することを試みた。その結果、4本のDGGEバンドが選択された。ひとつは、上述した*Rhodocyclus*属と予想されるバンドである。このバンドは、酢酸ナトリウム添加を継続したケース1とケース4では、動力学的に推定したポリリン酸蓄積細菌の存在比率の変化と高い類似性を示したものの、酢酸ナトリウム添加をストップしたケース2とケース3では、低い類似性を示した。このような傾向を示したバンドはもうひとつ存在した。これらのバンドに対応する微生物種がポリリン酸蓄積細菌であるとするならば、活性汚泥に存在する通常の細菌と同じ程度の比増殖速度を有するため、生物学的リン除去機能を発揮できない環境条件でも、系内に存在し続けることができるものと考えられる。一方、嫌気状態で酢酸が存在する環境条件では、生物学的リン除去機能を発現することができるものと考えられる。つまり、生物学的リン除去機能の切り替えを行うことができる微生物種である可能性が考えられる。選択された4本のうち残る2本は、最も生物学的リン除去活性が高かったケース1だけで存在したバンドとすべてのケースで類似性の高かったバンドであった。後者については、比増殖速度の遅い、いわゆる従来から考えられていたポリリン酸蓄積細菌像と一致する微生物種であると考えられる。本論文では、これらのバンドの塩基配列を解説するまでには至らなかったが、視覚的にDGGEバンドパターンを評価するのではなく、統計学的に類似性を評価したことにより、ポリリン酸蓄積細菌の指標となり得る可能性の高いDGGEバンドが見出された。

第7章では、IWA ASM2dを基礎に開発した回分式活性汚泥処理モデルを、生物学的リン除去活性が遷移する人工下水と実下水による処理実験結果にそれぞれ適用し、その有効性や限界点を検討した。

いずれのケースの計算でも、標準値として提案されている動力学的定数では、汚泥濃度や嫌気工程におけるリン放出が実験値よりも過小評価される結果となった。IWA ASM2dでは、従属栄養微生物の細胞内貯蔵物質が考慮されていないため、自己分解プロセスや加水分解プロセスが本来の意味で表現されていないことが、生物学的リン除去プロセスを計算するうえで限界があることが明らかとなった。

第8章では、本論文によって得られた成果を総括し、今後の展望や課題について述べた。