

論文の内容の要旨

論文題目

Quantification of ammonia-oxidizing bacteria populations in activated sludge processes of sewage treatment plants and assessment of process variables affecting their performance
(下水処理場における活性汚泥中のアンモニア酸化細菌群の定量化と酸化活性に及ぼす変動要因の解析)

氏名 リンピヤコン タワン

廃水処理におけるアンモニア酸化細菌(AOB)の生態学および微生物学について、これまで多くの研究が行われてきたにも関わらず、下水処理場における AOB については未だ不明な点が多い。従って、本研究では、各種の下水処理場の活性汚泥中における AOB の群集構造と AOB 細菌数の検討を行なった。現時点で利用可能な技術では下水活性汚泥中の AOB の定量的解析は不可能であるため、AOB を対象とした real-time PCR 定量法を予め確立し、AOB 細菌数の分析を行なった。本研究では、流入水の成分、処理工程、運転条件、そして季節による AOB 群集構造と AOB 細菌数への影響に焦点を当て研究を行なった。

本研究では、実下水処理場から採取した12系列の活性汚泥中の AOB 群集構造と、優占している AOB 種の細菌数を分析した。また、運転条件と処理工程の影響を見るために、嫌気/無酸素/好気法(A2O)、嫌気/好気法(AO)、標準法(AS)のように処理工程の異なる処理場、およびアンモニア除去率の異なる処理場を選んだ。さらに、全ての処理場で夏(2001年8月)、秋(2001年11月)、冬(2002年2月)の3つの異なる季節に活性汚泥を採取し、季節変化の影響を調べた。そして、本研究の最後では、実験室規模の連続培養装置を用いて、アンモニアと亜硝酸イオンが下水活性汚泥中の AOB 群集構造と AOB 細菌数に及ぼす影響を明らかにした。

まず、下水活性汚泥中の AOB を分析するために、16SrDNA の遺伝子配列を PCR 法によって増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)、クローニング、そして塩基配列の解読(PCR-DGGE-クローニング-シーケンス)を行ない、予め AOB 群集構造を構成する AOB 種の解析をした。その結果、AOB 群集構造は *Nitrosomonas oligotropha* クラスターの 6a-2 型配列と 6a-5 型配列の細菌、*N. communis* クラスターの細菌、そして *N. europaea* - *Nitrosococcus mobilis* クラスターの細菌によって構成されていることが明らかとなった。さらに、同定されたこれらの AOB 細菌種を定量するために real-time PCR による定量法を開発した。16SrDNA 遺伝子の断片には 6a-5 のみに特異性を示す部位がないことから、6a-3 と 6a-5 に特異的な real-time PCR プライマーセットを開発した。その後、今回開発された 4 つの新しいプライマーセットと他の研究で既に開発されていた 2 つのプライマーセットを用いて、下水活性汚泥中の AOB 細菌数の定量を行なった。なお、用いた既存の 2 つのプライマーセットはそれぞれが β -Proteobacteria に属する全 AOB を標的とするものと、全細菌の 16SrDNA 遺伝子を標的とするものである。

DGGE で単離した AOB および非 AOB の多様な DNA を用いて実験を行なったところ、新し

く開発された 4 つのプライマーセットの全てが優れた選択性と再現性を示した。結果によると、鋳型 DNA 溶液に全 AOB が 10^5 copies/ μ l 含まれる場合、特定種の AOB の検出限界は、プライマーセットによって異なるものの 10^2 もしくは 10^3 copies/ μ l であった。さらに、プライマーセットの高い再現性と選択性は、連続培養装置の活性汚泥から抽出された様々な混合 DNA サンプルにおいても同様に確認した。その結果、プライマーセットの標的 DNA が存在したサンプルのみで、PCR による定量が可能であった。

Real-time PCR で定量を行なった結果、12 系列のエアレーションタンク中では 10^{12} – 10^{14} cells/L の細菌のうち、AOB は 10^9 – 10^{11} cells/L の範囲で存在した。PCR-DGGE-クローニング-シーケンス分析法による結果では、AOB 群集構造は 1 年を通して変化が見られなかったものの、AOB およびその他の細菌数を定量したところ季節的变化の影響を受けていることが確認された。AOB1 細胞当たりのアンモニア酸化量と好気性従属栄養細菌 1 細胞当たりの BOD 酸化量を計算した結果、好気性従属栄養細菌よりも AOB の方が温度変化に敏感であることがわかった。本研究における季節ごとの温度範囲は、 25 – 30°C 、 19 – 25°C 、 14 – 19°C であり、この温度範囲で AOB のアンモニア酸化活性に違いが見られたことになる。

さらに、AOB1 細胞当たりのアンモニア酸化量を算出し運転条件の影響を調べたところ、SRT と DO はそれぞれが AOB 細菌数および AOB アンモニア酸化活性に影響を与えていることがわかった。SRT は AOB 細菌数に著しい影響を及ぼし、DO は直接アンモニア酸化活性に作用していた。しかし、どちらの要因も AOB の群集構造には影響していなかった。

Real-time PCR による定量的解析の結果、下水処理場の流入水の成分、処理工程、運転条件が異なるにも関わらず、全ての系列で 6a-3 型と 6a-5 型の一方もしくは両方の細菌が AOB 群集構造の大部分を占めていた。その数は全 AOB 数 (10^9 – 10^{11} cells/L) とほぼ同じであった。この結果より、6a-3 型と 6a-5 型の細菌は下水処理場における幅広い条件下において増殖可能であることがわかった。

1 系列を除き、硝化が行なわれていた全ての系列で 6a-2 型の細菌が検出されたものの、2 倍の塩化物濃度の汚水が流れ込み、完全に硝化が行われている 1 系列では 6a-2 型の細菌は存在しなかった。従って、6a-2 型細菌の検出は、エアレーションタンクのバルク濃度の特徴と関連していると考えられた。つまり、6a-2 型の配列は塩分に影響を受けやすく、バルク中のアンモニア濃度がかなり低い時に増殖し機能するのではないかと考えられた。反対に、5mg N/L 以上のアンモニア濃度では 6a-2 型の細菌は増殖を抑制されるのかもしれない。従って、6a-2 型の細菌は下水処理場における窒素除去に大きくは関与していないことが考えられた。他の AOB 種により完全な硝化を行なわれていた時に、6a-2 型の細菌が出現したと見られる。さらに、6a-2 型細菌の細菌数は季節の影響を受け、冬にはおよそ 10^9 – 10^{10} cells/L に増加した。

すべての A2O、AO システムおよび、BOD 除去率の低いいくつかの AS システムにおいて、*N. communis* クラスタが検出された。Real-time PCR による定量的解析の結果、いくつかの系列では *N. communis* クラスタが AOB 中の優占種であり、細菌数は 10^8 – 10^{10} cells/L であった。*N. communis* クラスタの存在は、エアレーションタンク内での好気性従属栄養細菌との

酸素の獲得競争で生き残った結果ではないかと考えられた。その証拠に、DO 濃度が極端に低い系列においては、*N. communis* 属は存在しないか、もしくは低濃度で存在していた。また、*N. communis* クラスター細菌数の 10^8 - 10^{10} cells/L の季節変動は、エアレーションタンク流入水における NH_4^+ -N の BOD に対する比率が増加した結果であると考えられた。なぜなら、この条件下では好気性従属栄養細菌の増殖速度より、AOB の増殖速度が上回るためである。

1 つの A2O 系列では他の系列とは異なる AOB 種が AOB 群集構造内に存在した。この系列における流入水は 2 倍の塩化物濃度を含んでいた。この系列の AOB 群集構造は *N. europaea* - *Nitrosococcus mobilis* クラスター細菌と、*N. cryotolerans* クラスター細菌、そして未知の *Nitrosomonas* sp. クラスターにより構成されていた。Real-time PCR による定量的解析の結果、*N. europaea* - *Nc. mobilis* クラスター細菌は 10^8 - 10^9 cells/L と少数であることがわかった。*N. europaea* - *Nc. mobilis* クラスターはアンモニアに低親和性の AOB と考えられているにも関わらず、低アンモニア濃度の流入水を受けるこの系列で検出された。

連続培養装置の活性汚泥において、アンモニアと亜硝酸イオンが AOB の群集構造と細菌数に与える影響を調べた。この装置には、様々な濃度のアンモニアと亜硝酸イオンを含む無機塩培地を流入させた。PCR-DGGE-クローニング-シーケンス分析法と、real-time PCR 法を用い、AOB の群集構造と AOB 細菌数を運転期間に従って解析した。その結果、バルク内のアンモニア濃度よりもアンモニア負荷が AOB 種の決定に大きく関与していることが明らかとなった。50mg N/d 以下の低アンモニア負荷の装置全てにおいて、*N. oligotropha* クラスターが優占種となっていた。*N. oligotropha* クラスターの中でも 6a-3 型と 6a-5 型細菌の一方もしくは両方が、幅広い低アンモニア負荷 (10、25、50mg N/d) において優占種であった。そして、6a-2 型の配列は特に低いアンモニア負荷 (25mg N/d 以下) において少数存在した。*N. oligotropha* クラスターとは対照的に、*N. europaea* - *Nc. mobilis* クラスターは 150mg N/d の高アンモニア負荷の装置で優占種となっていた。一方で、*N. oligotropha* クラスターと *N. europaea* - *Nc. mobilis* クラスターは 50mg N/d のアンモニア負荷の装置では共存していた。これらの結果は、下水処理活性汚泥の解析結果を十分に説明するものであった。本研究では、50-150mg N/d の間のアンモニア負荷については実験を行っていないが、この負荷範囲では *N. europaea* - *Nc. mobilis* クラスターが極めて重要な AOB 種であると推定できる。

本研究での real-time PCR 定量法の確立により、下水処理場における活性汚泥中の AOB の細菌数が初めて明らかとなった。また、下水活性汚泥における AOB は種間で異なり、様々な要因により影響を受けていることがわかった。