



Title	系統学的構造と炭素源資化能に基づいた都市下水処理場活性汚泥中の細菌群集の解析
Author(s)	橋本, くるみ
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34496
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

系統学的構造と炭素源資化能に基づいた
都市下水処理場活性汚泥中の細菌群集の解析

橋本 くるみ

2014年1月

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻
生物圏環境工学領域

<目次>

略語対応表	1
緒論	4
第1章 実験方法	7
1.1 水質調査	7
1.2 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法	7
1.3 Biolog	8
1.4 統計解析	10
1.4.1 多様性指数の算出	10
1.4.2 クラスター解析・主成分分析	10
第2章 活性汚泥法各種プロセスの微生物群集の解析	12
2.1 はじめに	12
2.2 対象とした処理プロセスと水質調査	12
2.3 結果	12
2.3.1 運転状況と廃水処理成績	12
2.3.2 微生物群集の系統学的構造解析	12
2.3.3 炭素源資化能の解析	22
2.4 考察	22
2.5 要約	25
第3章 標準活性汚泥法における微生物群集の動態解析	26
3.1 はじめに	26
3.2 対象とした処理プロセスと水質調査	26
3.3 結果	26
3.3.1 運転状況と処理成績	26
3.3.2 微生物群集の系統学的構造解析	28
3.3.3 炭素源資化能の解析	34
3.4 考察	38
3.5 要約	41

第4章 膜分離活性汚泥法の微生物群集の動態解析	42
4.1 はじめに	42
4.2 対象とした処理プロセスと水質調査	42
4.3 結果	44
4.3.1 運転状況と処理成績	44
4.3.2 微生物群集の系統学的構造解析	47
4.3.3 炭素源資化能の解析	55
4.4 考察	60
4.5 要約	62
総括並びに結論	63
参考文献	66
 補遺 活性汚泥細菌の保有するプラスミドの検索とその特徴づけ	71
5.1 はじめに	71
5.2 実験方法	71
5.2.1 細菌の単離および計数	71
5.2.2 プラスミドの検索およびサイズの調査	72
5.2.3 Tc 耐性遺伝子および Hg 耐性遺伝子の検出	72
5.2.4 IncP-1 および IncQ プラスミドの検索	73
5.2.5 複数のプラスミドを有する活性汚泥細菌の特徴づけ	73
5.3 結果	73
5.3.1 活性汚泥中の従属栄養細菌数および抗生物質・重金属耐性細菌数	73
5.3.2 活性汚泥細菌からのプラスミド検索	73
5.3.3 活性汚泥細菌のプラスミドのサイズ	77
5.3.4 プラスミド上に存在する Tc 耐性遺伝子および Hg 耐性遺伝子の検索	80
5.3.5 IncP-1 および IncQ プラスミドの調査	80
5.3.6 複数のプラスミドを有する細菌の特徴づけ	80
5.4 考察	81
5.5 要約	83
参考文献	84
 本論文に関する報告	88
謝辞	91

略語対応表

本論文に登場する略語について一覧にまとめた。

【A】

A2O	;	Anaerobic-anoxic-oxic, 嫌気-無酸素-好気プロセス
AO	;	Anaerobic-oxic, 嫌気-好気プロセス
Ap	;	Ampicillin, アンピシリン
AS	;	Activated sludge, 活性汚泥
AWCD	;	Average well color development

【B】

BOD	;	Biochemical oxygen demand, 生物化学的酸素要求量
-----	---	---------------------------------------

【C】

CAS	;	Conventional activated sludge, 沈殿池を有する従来型活性汚泥法 (本論文における定義)
CFU	;	Colony forming unit
Cm	;	Chloramphenicol, クロラムフェニコール

【D】

DO	;	Dissolved oxygen, 溶存酸素
DOC	;	Dissolved organic carbon, 溶存態有機炭素

【E】

Eff	;	Effluent, 処理水=最終沈殿池越流水
-----	---	------------------------

【F】

6-FAM	;	6- Carboxyfluorescein
-------	---	-----------------------

【H】

H'	;	Shannon-Weaver index
HRT	;	Hydraulic retention time, 水理学的滞留時間

【I】

Inc	;	Incompatibility, 不和合性
Inf	;	Influent, 流入水=最初沈殿池越流水

[M]

MBR	;	Membrane bio-reactor, 膜分離活性汚泥法
MLSS	;	Mixed liquor suspended solids, 活性汚泥浮遊物質
MLVSS	;	Mixed liquor volatile suspended solids, 活性汚泥揮発性浮遊物質

[N]

NH ₄ -N	;	Ammonia nitrogen, アンモニア態窒素
NO ₂ -N	;	Nitrite nitrogen, 亜硝酸態窒素
NO ₃ -N	;	Nitrate nitrogen, 硝酸態窒素

[P]

PC	;	Principal component, 主成分
PCA	;	Principal component analysis, 主成分分析
PCR	;	Polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
PCR-DGGE	;	PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE 法
P_i	;	T-RFLP プロファイルにおける各ピーク面積を全ピーク面積の総和で除した値
PO	;	Polyolefin, ポリオレфин
PO ₄ -P	;	Phosphate-phosphorus, リン酸態リン
PVDF	;	Polyvinylidene difluoride, フッ化ポリビニリデン

[R]

R_i	;	炭素源資化プロファイルにおける各ウェルの吸光度を全ウェルの吸光度の総和で除した値
RS	;	Return sludge, 収送汚泥

[S]

SA	;	Step aeration, ステップエアレーション法
S _D	;	Dice 係数
Sm	;	Streptomycin, ストレプトマイシン
SRT	;	Sludge retention time, 汚泥滞留時間
SS	;	Suspended solids, 浮遊物質

【T】

Tc	;	Tetracycline, テトラサイクリン
TKN	;	Total Kjeldahl nitrogen, ケルダール窒素
T-N	;	Total nitrogen, 全窒素
T-P	;	Total phosphorus, 全リン
T-RF	;	Terminal restriction fragment
T-RFLP	;	Terminal restriction fragment length polymorphism
TSS	;	Total suspended solids, 全浮遊物質

【V】

VSS	;	Volatile suspended solids, 挥発性浮遊物質
-----	---	------------------------------------

【○】

標準法	;	標準活性汚泥法
-----	---	---------

緒論

「水」はあらゆる生命にとって欠くことのできない要素であり、我々人間の社会も「水」を利用することで発展してきた。我々の生活を支える様々な社会システムは、水を基盤として成り立っており、同時に膨大な量の廃水を環境中に放出している。環境の健全性保持のためには、人間活動によって排出される負荷を低減することが必須であり、廃水についても適切な処理が重要である。

現在用いられている廃水処理技術は、物理化学的処理法と化学的処理法、生物学的処理法に大別される。膜処理のような物理化学的処理や促進酸化法のような化学的処理は、処理効率に優れているが、一般的に多くのエネルギーを必要とし、高コストになるといった問題点を有している。一方、生物学的処理法は、自然界における物質循環を担っている微生物の物質代謝能を活用して汚染物質の除去を行う方法であり、一般的に省エネルギー、低コストといった長所を有している。

生物学的廃水処理の基礎となる活性汚泥法は 1914 年に開発されて以降、都市下水や産業廃水の 2 次処理プロセスとして世界的に広く普及した (Seviour & Nielsen, 2010)。これは、本法が有機性廃水の処理に広い適応力を示し、操作を適正に行えばきわめて高い浄化率を得ることが可能であるからである。活性汚泥法の基本的なフローを図 0-1 に示す。流入水の性状によっては、土砂、粗大な浮遊物質、油分などを除去するために、1 次処理として沈砂池やグリストラップなどが設置される。その後、調整槽で水量や水質の平均化を経た廃水は生物処理槽へ導かれ、通気攪拌下で活性汚泥と接触する。ここで廃水中の汚染物質が分解・除去され、得られた処理水は後段の沈殿槽で重力沈降により活性汚泥と固液分離され、塩素滅菌後、放流される。さらに、生物処理槽の嫌気・好気条件を調整することによって、有機物のみならず、窒素やリンなどの栄養塩を除去することも可能になる。そこで、これまでに、連続式、回分式を問わず、廃水の性状、処理目的に応じた特徴ある諸変法が開発され（表 0-1）、様々な下廃水の処理に適用されている。

生物学的廃水処理法の処理性能は、微生物の代謝能や微生物間の相互作用に大きく依存しており、中でも細菌が重要な役割を担っている。これまでに、運転条件やデザインの最適化によって、生物化学的酸素要求量 (Biochemical oxygen demand; BOD) や浮遊物質 (Suspended solids; SS) の除去のみならず、窒素、リン、難分解性物質等の除去をも行って

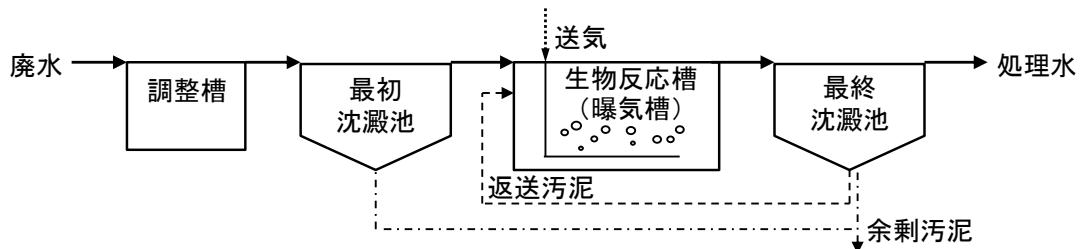


図 0-1 生物学的廃水処理法の基本的な処理フロー

きた。しかし、活性汚泥法には、フロックを形成しない浮遊性細菌や糸状性細菌の発生による汚泥の膨化や発泡現象の発生によって生じる汚泥の沈降性の悪化 (de los Reyes & Raskin, 2002; Wagner *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Jones & Schuler, 2010) や、処理を担う主要な細菌群集の不活化や死滅による廃水処理性能の悪化 (Yu & Mohn, 2001; Graham & Smith, 2004) のような深刻な問題が未だに存在する。こうした問題の解決や、処理性能の向上、運転の効率化のための戦略を立てるためには、細菌群集のモニタリングや理解が必要である。

活性汚泥の細菌群集の多様性や変動を明らかにするための試みは行われているが、ラボスケールやパイロットスケールでの調査がほとんどである。しかし、反応槽内の細菌群集の多様性は反応槽の体積に依存することが知られている (van der Gast *et al.*, 2006) 他、実処理場の微生物は人工的な環境下のラボスケールリアクターよりも複雑な細菌群集構造を形成する (Wong *et al.*, 2005) ことが知られている。このことは、ラボスケールやパイロットスケールのリアクターで理論上の微生物群集の動態を明らかにしたとしても、実条件下における微生物の動態を直接的に知ることは不可能であることを意味している (Saikaly *et al.*, 2005; Jenkins, 2008)。すなわち、実規模の微生物群集の動態を知るためにには、実規模の処理施設において更なる調査を行うことが必要である。

本研究では、処理プロセス、季節性、運転条件等の環境因子が活性汚泥細菌群集へ与える影響を調査するとともに、活性汚泥細菌群集と廃水処理機能の関係を明らかとすることを目的とした。処理プロセスは、二次処理プロセスの中で最も広く使用されている標準活性汚泥法 (標準法) (Graham & Smith, 2004) に代表される従来型の活性汚泥法 (本論文では、これらの従来型活性汚泥法を総称して CAS (Conventional activated sludge) と表記する) と、最終沈殿池の代わりに膜ろ過により汚泥の固液分離を行う革新的な手法である膜分離活性汚泥法 (Membrane bio-reactor; MBR) を選定した。MBR は、1967 年に米国で最初の適用が始まった活性汚泥法で、日本においては 1988 年にし尿処理場において初めて使用され、2005 年に下水処理場への適用が開始された (山本ら, 2010)。

第 1 章では、本研究で用いた実験方法について述べた。第 2 章では、ある時期の様々な処理方式の下水処理場の微生物群集構造ならびに炭素源資化能を比較し、CAS および MBR の微生物群集の違いを明らかにした。第 3 章では、経時的に標準活性汚泥法を採用する下水処理場において微生物群集ならびに炭素源資化能の変化を調査した。第 4 章では、膜分離活性汚泥法において微生物群集ならびに炭素源資化能の変化を調査した。総括並びに結論では、これらの知見を体系的にまとめるとともに、微生物群集の制御による次世代型活性汚泥法の展望について述べた。また、補遺として構成細菌の遺伝学的なポテンシャルを明らかにするために、活性汚泥細菌の保持するプラスミドを検索し、その特徴づけを行った。

表 0-1 活性汚泥法の種々の変法とその特徴

プロセス	プロセスの説明	一般的な処理水質 (mg/L)		
		BOD	T-N*	T-P*
標準活性汚泥法(標準法)	有機物の除去を曝気槽により行う活性汚泥法	10-15	-	-
嫌気-無酸素-好気法 (A2O)	嫌気槽、無酸素槽、好気槽の3槽を反応槽とした活性汚泥法	10-15	< 20	< 3
嫌気-好気法 (AO)	嫌気槽および好気槽の2槽を反応槽とした活性汚泥法	10-15	-	< 3
長時間エアレーション法	最初沈殿池を設けず、曝気槽で長時間の処理を行う活性汚泥法	10-15	-	-
オキシデーションディッチ法	最初沈殿池を設けず、機械式エアレーション装置を有する無終端水路を反応槽とした活性汚泥法	10-15	< 20	-
ステップエアレーション法 (SA)	反応槽内にDO*濃度勾配を設けるために複数箇所より曝気を行う活性汚泥法	10-15	-	-
ステップフィード法	押し出し流れに沿って反応槽の複数箇所より流入水を導入し、処理を行う活性汚泥法	10-15	-	-
膜分離活性汚泥法 (MBR)	最終沈殿池を設けず、膜ろ過により汚泥の分離を行う活性汚泥法	-	-	-

* T-N; 全窒素 (Total nitrogen), T-P; 全リン (Total phosphorus), DO; 溶存酸素 (Dissolved oxygen)

第1章 実験方法

本章では、第2章～第4章に共通する、水質分析方法、微生物群集構造解析手法、炭素源資化能の解析手法、また、それらの統計解析方法について記載した。

1.1 水質調査

試料採取日のpH、水温、溶存酸素（Dissolved oxygen; DO）濃度についてはポータブル多項目水質チェックWQC-24 (TOA DKK) で測定した。溶存態有機炭素（Dissolved organic carbon; DOC）、アンモニア態窒素(NH₄-N)、亜硝酸態窒素(NO₂-N)、硝酸態窒素(NO₃-N)、リン酸態リン(PO₄-P)の測定には、No.2定性ろ紙(ADVANTEC)によりSSを除去したろ液を用いた。T-N、NO₂-N、NO₃-N、PO₄-P、T-Pは下水試験方法(日本下水道協会, 2012)、NH₄-Nは上水試験方法(日本水道協会, 1993)に準じて行った。DOCは、ろ液に2N HClを終濃度5%になるように添加して生物反応を停止させたものを用い、TOC-5000A (Shimadzu)またはTOC-V_{CSH} (Shimadzu)により測定した。全浮遊物質(Total suspended solids; TSS)または活性汚泥浮遊物質(Mixed liquor suspended solids; MLSS)、揮発性浮遊物質(Volatile suspended solids; VSS)または活性汚泥揮発性浮遊物質(Mixed liquor volatile suspended solids; MLVSS)は、ろ過処理を行っていない試料を用い、下水試験方法(日本下水道協会, 2012)に準じて測定した。従属栄養細菌数は10倍ずつ段階希釀を行った未濾過の水試料および超音波処理を行った汚泥試料を用いた。試料をCGY寒天培地(Pike et al., 1972)に塗布し、培養後、形成されたコロニーを計数して生菌数として求めた。

1.2 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法

試料からのDNAの抽出は、ISOIL for Beads Beating (Nippon gene)を用いて、添付のプロトコルに従って行い、また、夾雑物を除去するために、MagExtractorTM-PCR&Gel Clean up-(Toyobo)を用いて精製し、これを微生物解析用のDNAテンプレートとして用いた。

T-RFLP解析に供する真正細菌の16S rDNAの增幅は、フォワードプライマーの5'末端を6-FAM(6-Carboxyfluorescein)で蛍光標識したプライマーセット[27F-FAM, 1392R]を用いて行った。ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase chain reaction; PCR)は、反応系を50 μL(TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 1.5 U, 10×Ex Taq buffer (TaKaRa) 5 μL, dNTP各200 μM, フォワードプライマー1 μM, リバースプライマー1 μM, DNAテンプレート5 μL)とし、サーマルサイクランサーMastercycler standard (Eppendorf)を用いて行った。反応は、熱変性95°C(10 min)の後、熱変性95°C(1 min)、アニーリング57°C(1 min)、伸長72°C(3 min)を1サイクルとして16～24サイクル、最後に伸長72°C(10 min)行った。サイクル数は、各試料について16～24サイクルの間で検討を行い、対数増幅の初期となるものを用いた。

増幅産物の100 μLは、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa)により添付のプロトコルに従って精製し、制限酵素HhaIによる消化を37°Cで5時間以上行った。消化物の1 μLを12 μLのHi-Di Formamide (Applied Biosystems)および0.5 μLのGeneScan 2500 ROXサイ

ズスタンダード (Applied Biosystems) と混合し、92°C (3 min) の変成後、4°C に急冷し、Genetic Analyzer ABI Prism 310 (Applied Biosystems) によるレーザー蛍光検出キャピラリ電気泳動に供し、蛍光末端制限断片 (T-RFs) パターンを得るとともに、付属の断片長解析ソフトウェア GeneScan ver. 3.7 (Applied Biosystems) により断片長解析を行った。電気泳動は、60°C で、POP-4 (Applied Biosystems) を充填した 47 cm×50 μm のキャピラリカラムを用いて行った。検出された T-RFs は、Microbial Community Analysis (MiCA) III の web サイト (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) より取得したデータベース (RDP Release 9.60, 160, 583 Good Quality (>1200 bp) 16S rRNA) を用い、該当する微生物種を門・網レベルで推定した (Shyu *et al.*, 2007)。推定にあたっては、*HhaI* による切断で検出された各 T-RFs について、推定される微生物としてリストに記載されている微生物種を門レベルで数え、全体の半数以上を占めている門があれば、その T-RF はその門の微生物に由来するものであるとした。半数以上を占めている門がない場合は、上位 2 門の合計数が全体の 3 分の 2 を越えていればその 2 門に由来するものであるとし、そうでなければ上位 3 門に由来すると判断した。全体のうち特に多くを占めた門については、網レベルでもこれに準じた推定方法でその構成を調べた。

1.3 Biolog

MBR および CAS の汚泥試料に対して、BIOLOG GN2 マイクロプレート (Biolog) を用いた炭素源資化能の評価を行った。GN2 マイクロプレートは、各ウェルにそれぞれ異なる炭素源 (糖類 24 種、界面活性剤 2 種、糖アルコール 10 種、カルボン酸 28 種、アミノ酸 23 種、ヌクレオチド 3 種、リン酸化合物 3 種、アミン 3 種) (表 1-1) と色素 (テトラゾリウムバイオレット) が添加されている 96 穴マイクロプレートである。微生物が炭素源を代謝することにより呼吸を行った場合、呼吸活性に応じて紫に発色するため、吸光度を測定することにより、主として従属栄養細菌の炭素源ごとの代謝量を評価することができる (Al-Mutairi, 2009)。

超音波ホモジナイザーVCX-130 (Sonics & Materials, Inc.) により 50 W (Amplification 38%)、10min の超音波処理を行った汚泥試料について、まず、1 mL (5 mg/L 減菌トリポリリン酸水溶液により希釈し、MLSS=200 mg/L としたもの) を減菌生理食塩水 (NaCl 0.85% (w/v)) 9 mL に添加し、ボルテックスで 10 秒程度攪拌した。そのうちの 2 mL を新たな減菌生理食塩水 38 mL に添加し、MLSS を 1 mg/L に調整した。この汚泥試料を GN2 マイクロプレートの各ウェルに 150 μl ずつ分注した後、暗所、28°C で静置培養した。培養開始後、経時に各ウェルの吸光度 (A_{595}) を測定し、24 時間、48 時間および 72 時間後における吸光度に基づいて活性汚泥微生物群集の代謝能を評価した。ただし、試験は 2 連で行い、解析には各ウェルの吸光度から炭素源の入っていないウェルの吸光度を差し引いた値 (net- A_{595}) を用いた。net- $A_{595} > 0.25$ となった炭素源を資化能ありと判定し、資化が認められた炭素源数

表 1-1 Biolog GN2 プレートに添加されている炭素源一覧

• 单糖類		
D-Fructose	Citric acid	Glycyl-L-glutamic acid
L-Fucose	Formic acid	L-Histidine
D-Galactose	D-Galactonic acid lactone	Hydroxy-L-proline
α -D-Glucose	D-Galacturonic acid	L-Leucine
D-Mannose	D-Gluconic acid	L-Ornithine
β -Methyl-D-glucoside	D-Glucosaminic acid	L-Phenylalanine
D-Psicose	D-Glucuronic acid	L-Proline
L-Rhamnose	α -Hydroxybutyric acid	L-Pyroglutamic acid
L-Arabinose	β -Hydroxybutyric acid	D-Serine
• 二糖類	γ -Hydroxybutyric acid	L-Serine
D-Cellobiose	<i>p</i> -Hydroxy phenylacetic acid	L-Threonine
Gentiobiose	Itaconic acid	D,L-Carnitine
α -D-Lactose	α -Keto butyric acid	γ -Amino butyric acid
Lactulose	α -Keto glutaric acid	Urocanic acid
Maltose	α -Keto valeric acid	Phenyethyl-amine
D-Melibiose	D,L-Lactic acid	Putrescine
Sucrose	Malonic acid	• アルコール
D-Trehalose	Propionic acid	Adonitol
Turanose	Quinic acid	D-Arabitol
• 三糖類	D-Saccharic acid	<i>i</i> -Erythritol
D-Raffinose	Sebacic acid	<i>m</i> -Inositol
• 多糖類	Succinic acid	D-Mannitol
α -Cyclodextrin	Bromosuccinic acid	D-Sorbitol
Dextrin	Succinamic acid	Xylitol
Glycogen	• アミノ酸	2-Aminoethanol
N-Acetyl-D-galactosamine	Glucuronamide	2,3-Butanediol
N-Acetyl-D-glucosamine	L-Alaninamide	Glycerol
• 界面活性剤	D-Alanine	• リン酸化合物
Tween 40	L-Alanine	D,L- α -Glycerol phosphate
Tween 80	L-Alanyl-glycine	α -D-Glucose-1-phosphate
• カルボン酸	L-Asparagine	D-Glucose-6-phosphate
Pyruvic acid methyl ester	L-Aspartic acid	• ヌクレオシド
Succinic acid mono-methyl ester	L-Glutamic acid	Inosine
Acetic acid	Glycyl-L-aspartic acid	Uridine
		Thymidine

を求めた。また、95個のウェルにおける net-A₅₉₅の平均値（Average well color development; AWCD）を求め、別の指標として用いた（Garland & Mills, 1991）。

1.4 統計解析

1.4.1 多様性指数の算出

微生物群集とその炭素源資化能のα多様性を表す指標として Shannon-Weaver index (H') を算出した。T-RFLP 解析によって得られた T-RFLP プロファイルをもとに H' (T-RFLP) (Blackwood *et al.*, 2007)、Biolog 解析によって得られた吸光度プロファイルを基に H' (Biolog) (Al-Mutairi *et al.*, 2007) を下式により算出した。

$$H' \text{ (T-RFLP)} = -\sum (P_i \times \ln P_i)$$

$$H' \text{ (Biolog)} = -\sum (R_i \times \ln R_i)$$

ここで、 P_i は T-RFLP プロファイルにおける各ピーク面積を全ピーク面積の総和で除した値、 R_i は炭素源資化プロファイルにおける各ウェルの吸光度を全ウェルの吸光度の総和で除した値である。なお、相対存在量 0.01 以下の P_i は解析から除外した。

また、 H' (T-RFLP)、 H' (Biolog) の分散を β多様性の指標として用いた。

1.4.2 クラスター解析・主成分分析

活性汚泥微生物群集の構造と機能から見た活性汚泥微生物群集の分類、序列化手法として、それぞれクラスター解析、主成分分析 (Principal component analysis; PCA) を用いた。クラスター解析では、試料間の類似度を算出し、その結果に基づいて試料を分類する。一方、PCA は膨大な変数の中から、主成分 (Principal components; PCs) を抽出し、より低次元にて試料を序列化する手法である。

両解析では、T-RFLP プロファイルの各 T-RF 断片長の P_i 値マトリックス、および炭素源資化プロファイルの各炭素源に対する A₅₉₅ 値マトリックスをデータセットとして用いた。クラスター解析は、各試料間の類似度もしくは距離を総当たりで算出した後、非加重結合法によって系統樹を作成した。なお、類似度には Dice 係数 (S_D) を用い以下の式によって算出した。

$$S_D = \frac{2x \cdot y}{\sum(w_{xi}) + \sum(w_{yi})}$$

$$x = (w_{x1}, w_{x2}, \dots, w_{xn}), y = (w_{y1}, w_{y2}, \dots, w_{yn})$$

ここで、 $x \cdot y$ は、 x 、 y の内積、 w_{xi} 、 w_{yi} は P_i 、あるいは、 R_i である。

距離には、ユークリッド距離を用い以下の式によって算出した。

$$d_{jk} = \sqrt{\sum_i (x_{ji} - x_{ki})^2}$$

PCA およびクラスター解析には PAST ver. 1.3.4 ソフトウェア

(<http://folk.unio.no/ohammer/past/>) を用いた。

第2章 活性汚泥法各種プロセスの微生物群集の解析

2.1 はじめに

流入水組成や採用する処理方式、運転制御方法の違いによって生物反応槽内の環境条件は異なっており、活性汚泥微生物群集の構造や機能にも差があることが考えられる。しかし、様々な処理場の活性汚泥微生物群集の比較や長期に亘る継続的な検討をした事例は非常に少ない。そこで本研究では、調査の対象として革新的な活性汚泥法の代表である MBR を複数調査し、CAS と比較することで、各種の活性汚泥法の特徴を明らかとした。

2.2 対象とした処理プロセスと水質調査

2012年7月および8月に無酸素—好気プロセスで運転されている、日本の12カ所の実規模下水処理場（表2-1）のMBRの好気槽から汚泥試料を採取した。また、2008年6月および7月に、大阪府下の8カ所の下水処理場の標準法6プロセス、ステップエアレーション（Step-aeration; SA）法1プロセス、嫌気—好気（Anaerobic-oxic; AO）法2プロセス、嫌気—無酸素—好気（Anaerobic-anoxic-oxic; A2O）法2プロセスを調査対象に選定した。簡易フロー図と活性汚泥試料及び水試料の採取箇所を図2-1に示した。

2.3 結果

2.3.1 運転状況と廃水処理成績

対象としたMBRおよびCASの処理場の情報と共に、DOCおよびT-N除去率を表2-2に示した。また、MBRの水温とpHの月平均値についても同様に表2-2に示した。水温、pHはCASとほぼ変わらず、水温はMBR-fを除いて25°C付近(25±2°C)であった。pHは中性付近(6.5±0.3)に保たれていた。MBRの流入水中のDOCおよびT-N濃度はそれぞれ12.6~67.5 mg/L、17.0~48.4 mg-N/Lであった。MBRのMLSS濃度はCASよりもはるかに高い7.2~13.8 g/Lに維持されていた。MBRのDOCおよびT-N処理性能はMBR-iにおいてわずかに低かったものの、良好な性能を示していた。廃水処理成績は全体的にCASよりも高かった。CASにおいてはDOC除去率が77±9%、T-N除去率が68±23%を示した。

2.3.2 微生物群集の系統学的構造解析

MBRのT-RFLPプロファイルを図2-2に示す。MBR-gおよびMBR-iを除くと、全ての汚泥試料において92 bpのTRFの優占($P_i > 0.05$)が確認された。371 bpのTRFもMBR-c、d、f、h、j、kにおいて優占していた。他のTRFは汚泥試料の半分以下でしか共通して検出されなかった。ほとんどすべてのTRFsが各サンプルに特異的に検出され、それぞれの汚泥試料の優占細菌がMBR間でそれぞれ異なっていた。特にMBR-bおよびMBR-iは、一つのみ優占度の高いピークが検出されるという他とは異なる特徴を示していた。MBR-bにおいては、765 bpのTRFが優占していた($P_i = 0.42$)。MBR-iにおいては、83 bpのTRFが優占して検出された($P_i = 0.36$)。

表 2-1 12 カ所の MBR の特徴

処理場	処理容量 [m ³ /d]	系列 [-]	槽容積			膜			
			無酸素槽 [m ³]	好気槽 [m ³]	HRT [hr]	タイプ	材質	総表面積 [m ²]	孔径 [μm]
a	580	2	39	39	2.4	中空糸膜	PVDF	300	0.1
b	1,400	2	91	91	8.5	中空糸膜	PVDF	1,500	0.1
c	2,200	1	140	140	12.7	平膜	PO	1,600	0.4
d	1,600	1	130	130	9.0	平膜	PO	1,400	0.4
e	4,200	2	140	140	4.0	平膜	PO	1,600	0.4
f	130	1	20	56	3.6	平膜	PO	180	0.4
g	60,000	9	320	470	6.3	平膜	PO	11,000	0.4
h	2,100	2	420	420	23.6	平膜	PVDF	1,400	0.1
i	240	2	6	11	1.2	平膜	PO	240	0.4
j	230	1	32	32	6.3	中空糸膜	PO	630	0.4
k	5,500	4	210	210	6.1	平膜	PO	2,200	0.4
l	720	2	58	58	6.0	平膜	PO	640	0.4

HRT, 水理学的滞留時間

PVDF, フッ化ポリビニリデン; PO, ポリオレフィン

表 2-2 下水処理場の運転条件と曝気槽の水質

処理場	曝気槽			除去率		処理場	処理方式	曝気槽			除去率			
	水温	pH	MLSS	DO	DOC			水温	pH	MLSS	DO	DOC	T-N	
	[°C]	[-]	[g/L]	[mg/L]	[%]			[°C]	[-]	[g/L]	[mg/L]	[%]	[%]	
MBR-a	24.7	6.8	10.3	1.5	89	81	CAS-A1	標準法	24.0	6.8	1.8	1.1	85	86
MBR-b	25.2	7.2	8.8	1.8	81	92	CAS-A2	A2O	23.6	6.2	0.7	0.7	86	93
MBR-c	26.2	7.2	10.7	1.4	82	93	CAS-A3	SA	23.5	6.2	1.5	1.5	88	89
MBR-d	25.3	7.0	12.1	2.3	94	89	CAS-B	標準法	23.7	6.6	1.3	2.1	85	81
MBR-e	25.6	6.4	10.9	2.8	90	76	CAS-C1	標準法	24.0	6.3	1.2	1.2	62	74
MBR-f	17.6	6.6	7.3	2.1	86	77	CAS-C2	A2O	24.7	6.5	1.3	1.1	65	81
MBR-g	27.1	7.1	13.8	6.1	92	88	CAS-D	標準法	26.0	6.2	1.7	1.8	79	73
MBR-h	ND	ND	8.6	3.1	94	90	CAS-E	標準法	25.2	6.4	1.2	0.3	76	44
MBR-i	24.3	6.0	7.2	4.0	94	67	CAS-F	AO	28.1	7.3	1.4	0.8	75	69
MBR-j	ND	ND	11.8	5.6	94	87	CAS-G	AO	25.8	6.7	1.3	3.2	71	30
MBR-k	26.6	6.9	9.8	1.6	93	84	CAS-H	標準法	26.9	6.8	1.2	2.6	71	30
MBR-l	27.1	6.9	10	1.5	94	94								

AO : 嫌気－好気、A2O : 嫌気－無酸素－好気、標準法 : 標準活性汚泥法、 SA : ステップエアレーション、 ND : データ無し

全ての MBR は無酸素－好気方式で運転されており、 MBR-a 以外は、硝化液を無酸素槽に送り、循環させていた。

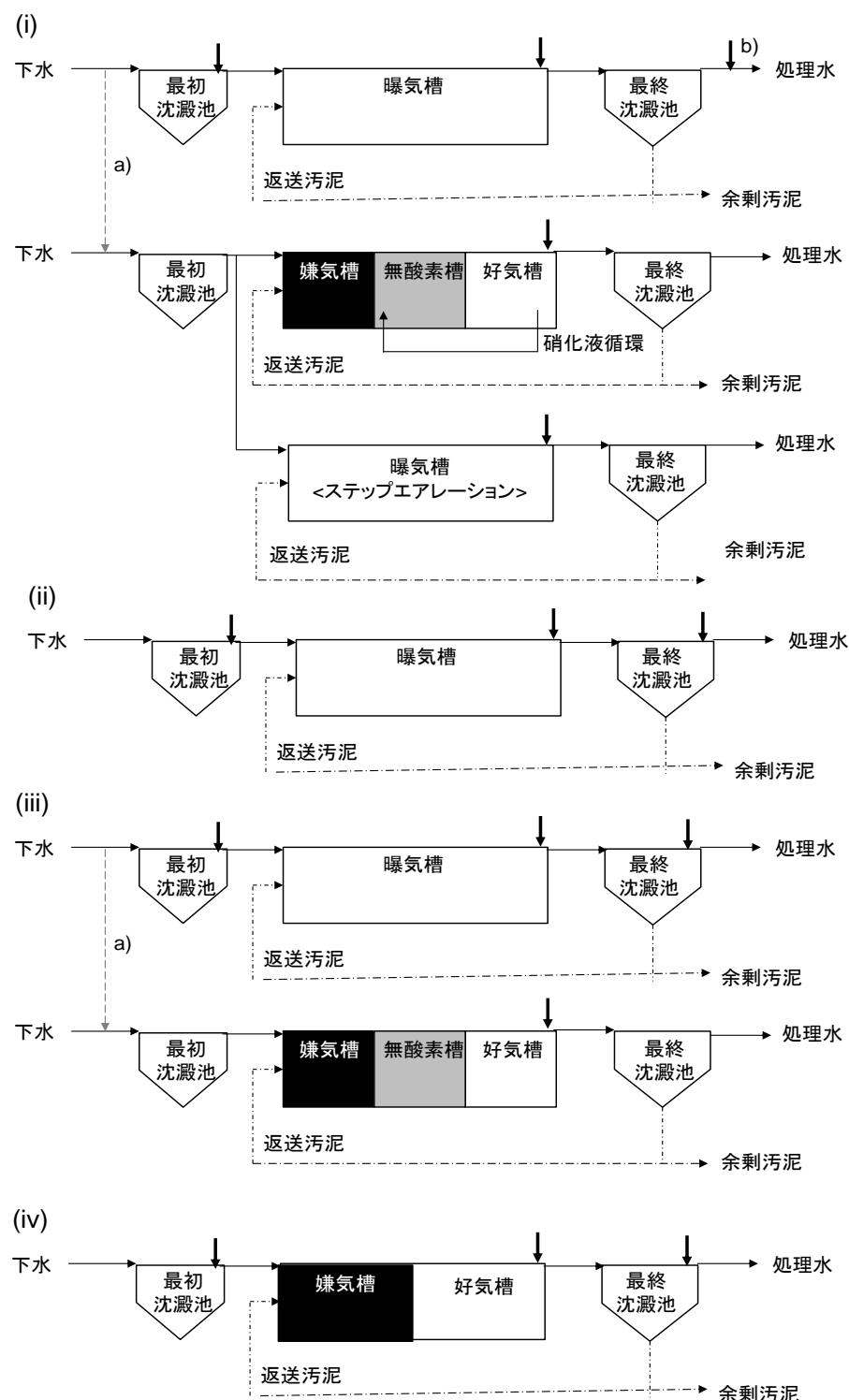


図2-1 簡易フロー図と活性汚泥試料および水試料の採取箇所

(i) CAS-A; (ii) CAS-B, D, E, H; (iii) CAS-C; (iv) CAS-F, G;

活性汚泥試料および水試料の採取箇所を矢印 (↓) で示した。

a) Inf の一部は他のシステムに流入していた。

b) CAS-Aにおいては、塩素処理された処理水を採取した。

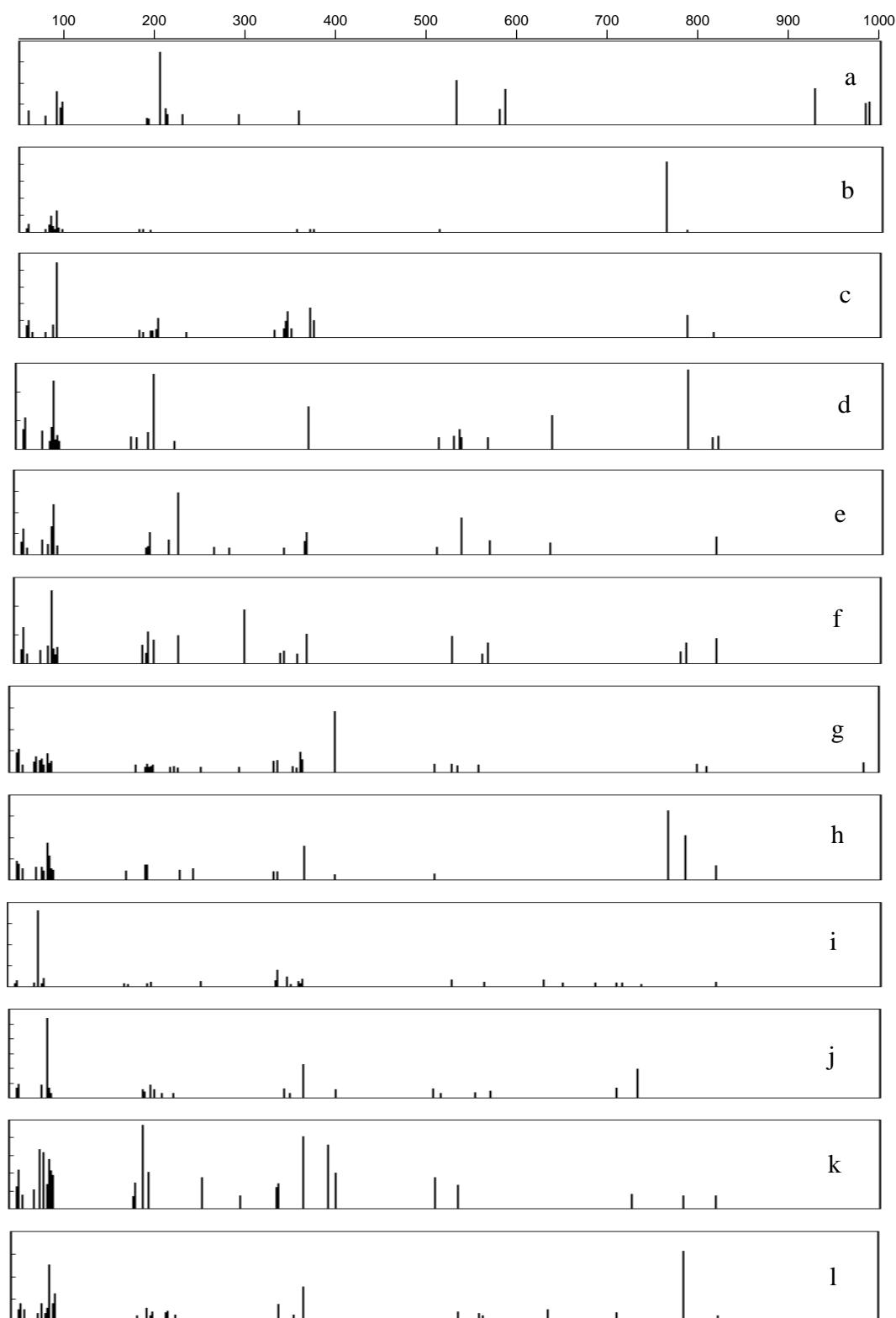


図 2-2 MBR a-l の活性汚泥試料の *HhaI* 消化による T-RFLP プロファイル
x 軸は T-RFs の長さ (bp) を表す

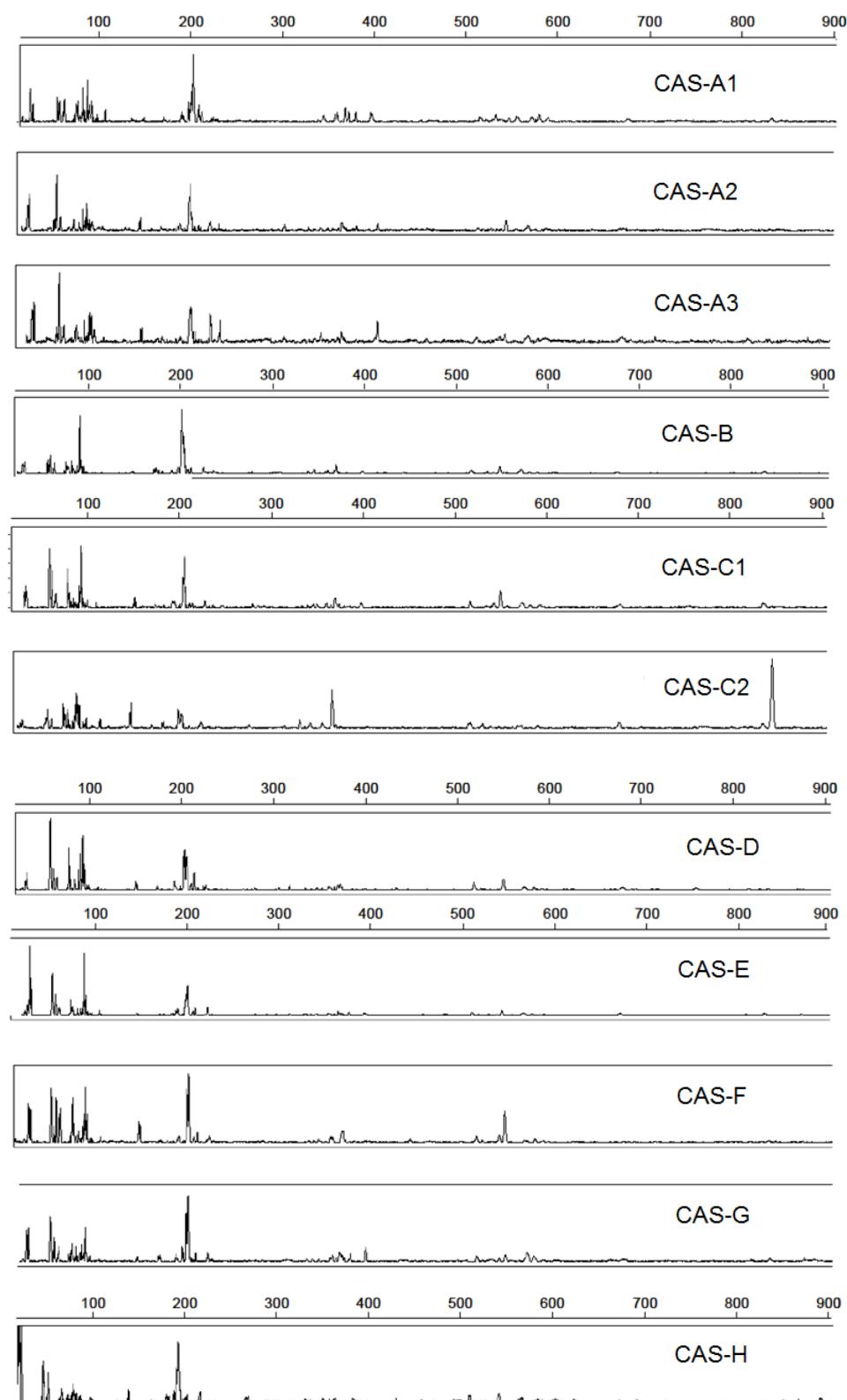


図 2-3 CAS の活性汚泥試料の *Hha*I 消化による T-RFLP プロファイル
x 軸は T-RFs の長さ (bp) を表す

CAS の T-RFLP プロファイルにおいては、203 bp の T-RFs が、全ての試料に存在し、17 試料中 14 試料において主要なピークであった ($P_i = 0.084 \sim 0.21$) (図 2-3)。データベース上の微生物種と照合したところ、203 bp の T-RFs は、主に β -Proteobacteria 由来であることが確認された。また、複数の試料に共通して、 β -Proteobacteria、Chloroflexi 由来と推定される T-RFs (148~150 bp) の存在が確認された。これらの T-RFs は、検出強度は低いものの、嫌気槽を含む連続槽 (CAS-A2、CAS-C2、CAS-F) に存在し、CAS 法では検出されなかった。

三種類の制限酵素 (*HhaI*、*HaeIII*、*MspI*) により得られた T-RF プロファイルをそれぞれ PCA に供したところ、試料はいずれの酵素を使用した場合でも概ね類似した傾向を示し (図 2-4)、T-RFLP 法は制限酵素の種類によらずある程度細菌群集構造の特徴を表すことができることが示唆された。しかしながら、三種類の制限酵素により得られた T-RFLP プロファイルのいくつかは他の試料からは著しく異なっていた。MBR および CAS の活性汚泥試料の T-RFLP プロファイルに基づく PCA の第一主成分 (PC1) および第二主成分 (PC2) を図 2-5 (A) に示す。PC1において、MBR と CAS の細菌群集構造が全く異なっていることが示された (図 2-5 (A))。PC1に対して、202~203 bp の主成分負荷量が最も低い値 (-0.48) を示し、CAS に特徴的な微生物を表していた。実際に、202~203 bp の T-RF は、MBR-d ($P_i = 0.13$) を除いて MBR では優占していなかった ($P_i < 0.04$) が (図 2-2)、CAS-C2 ($P_i = 0.03$) を除いて CAS において高い優占度 ($P_i = 0.08 \sim 0.22$) を示した (図 2-3)。また、PC2 は MBR-b および MBR-i のようないくつかの MBR の持つ特有の細菌群集構造を示した。83 bp および 765 bp の T-RF は PC2 に対してそれぞれ -0.30、-0.84 と低い主成分負荷量を示し、MBR-b および MBR-i で優占していた。また、本研究の PCA の範囲においては、MBR の細菌群集構造と Inf の性状 (DOC 濃度、T-N 濃度、水温、pH) や運転条件 (MLSS 濃度、DO 値、曝気槽の水温、pH) に関して明確な関連性は見いだせなかった。PC1 および PC2 の寄与率の合計は 40%以下ではあるが、クラスター解析においても試料間の類似性について同様の傾向が示された (図 2-6)。MBR 試料と CAS 試料のクラスターは明確に異なっており、MBR-b や MBR-i と他の試料との間の距離は 0.4 以上であった。 H' (T-RFLP) によって表される α 多様性は MBR で 2.2~3.5 であったが、CAS では 2.4~3.1 であった。細菌群集構造のばらつき (β 多様性) を表していると考えられる H' (T-RFLP) のばらつきは CAS より MBR において高かった (それぞれ 0.06、0.1)。これらの値は図 2-5 (A) において MBR のプロットが CAS よりも広い範囲に分散していることと符合していた。

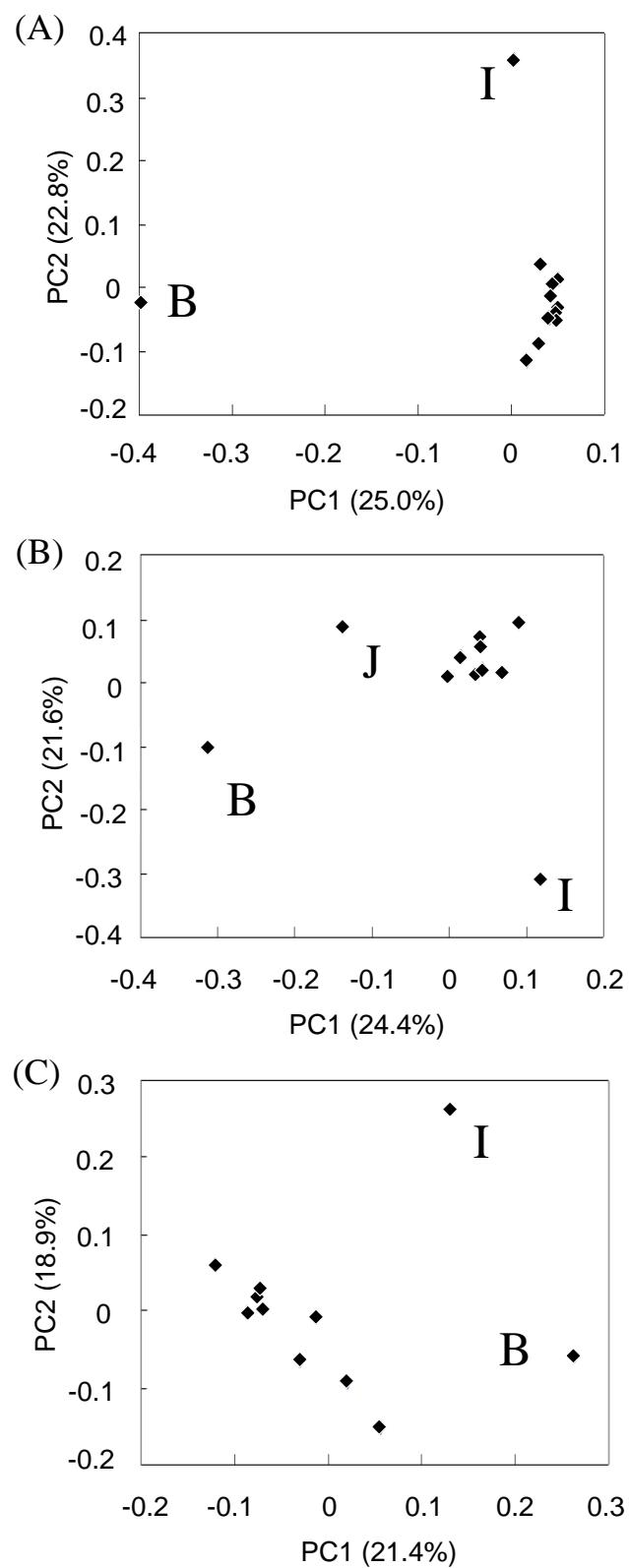


図 2-4 MBR の活性汚泥試料の(A)*HhaI*, (B)*HaeIII*, (C)*MspI* 消化による T-RF に基づく PCA
(図中の括弧内の数字は寄与率を示す)

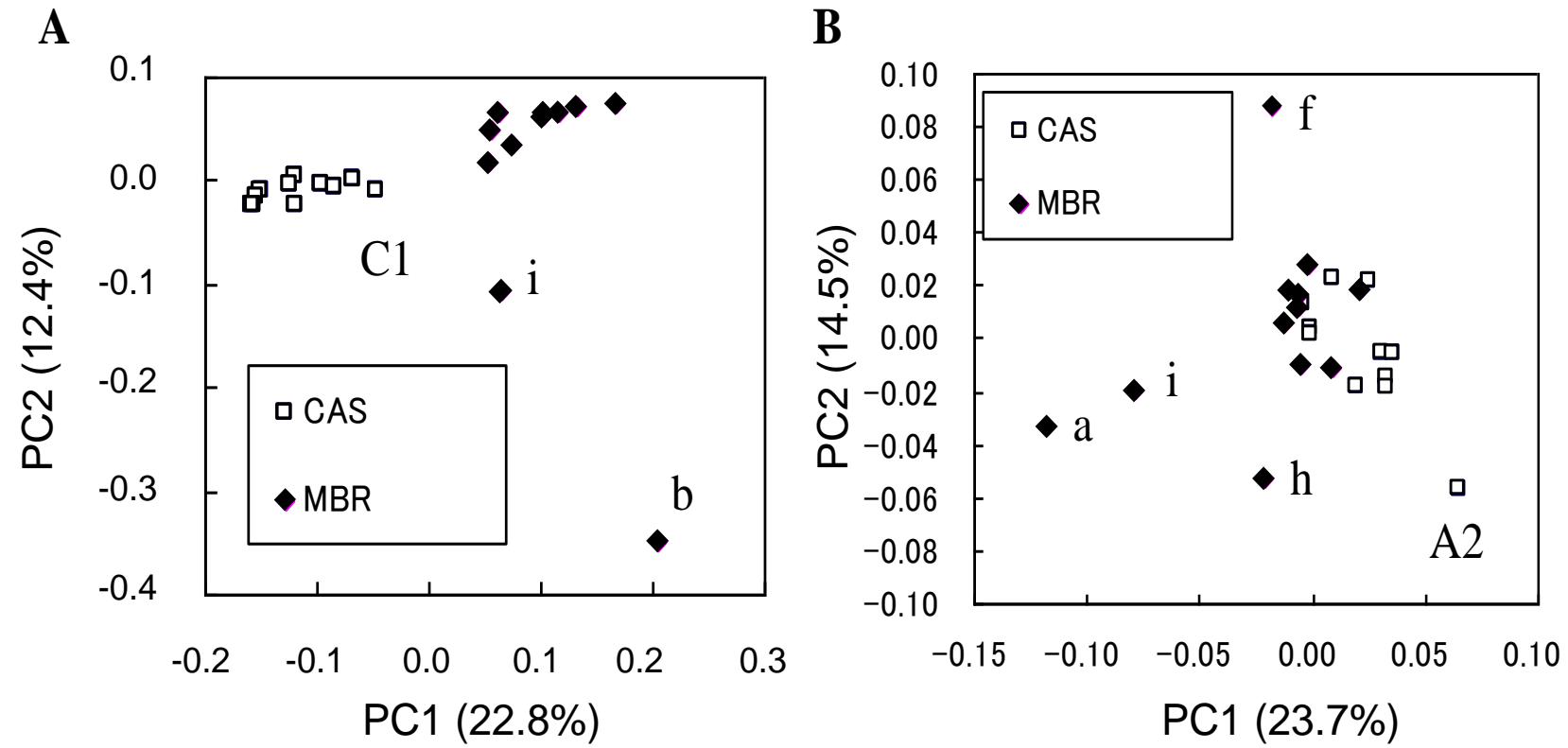
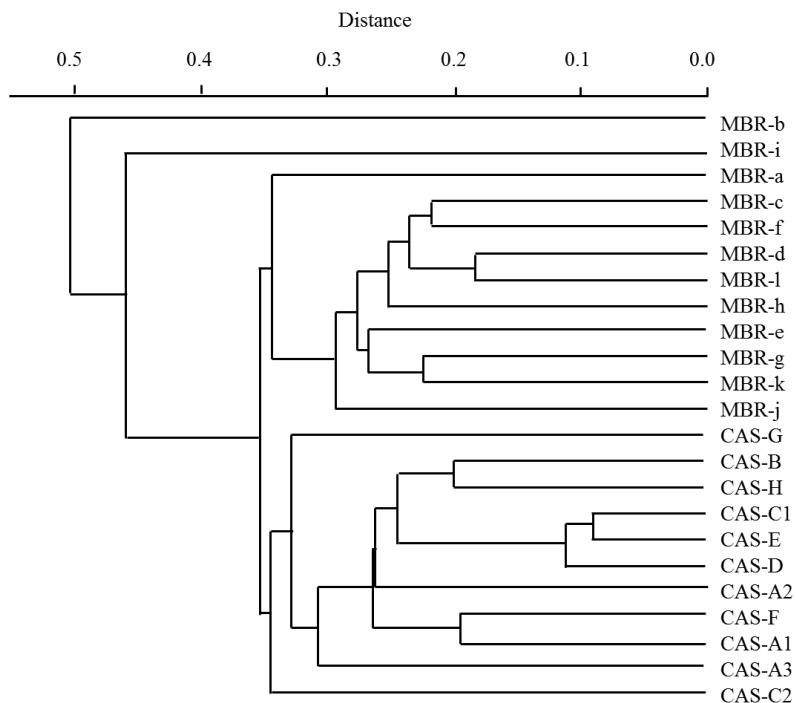


図 2-5 MBR と CAS の活性汚泥試料の (A) *HhaI* 消化による T-RF および (B) 24 時間培養後の炭素源資化プロファイルに基づく PCA (図中の括弧内の数字は寄与率を示す)

(A)



(B)

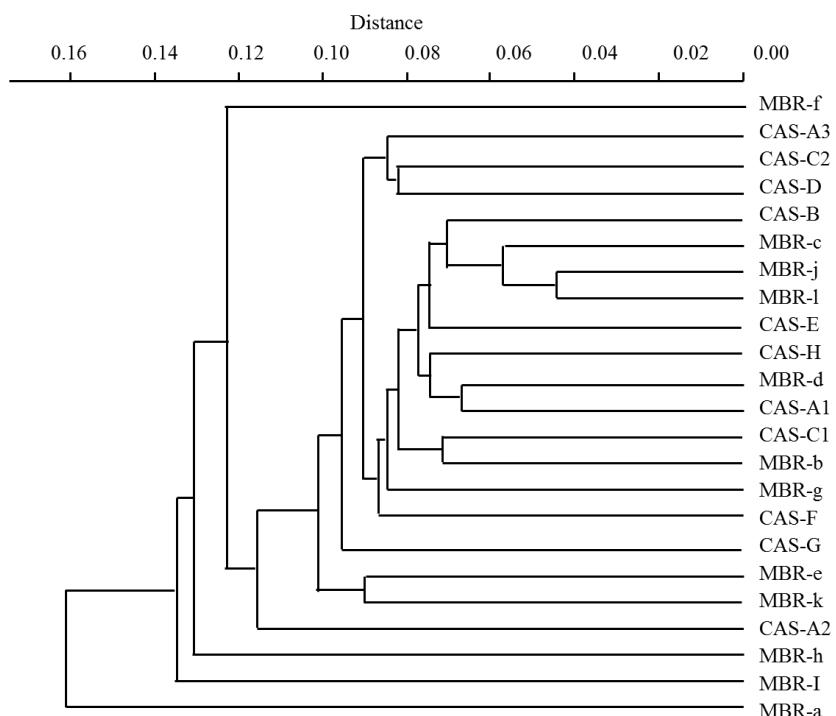


図 2-6 MBR および CAS の活性汚泥試料の (A) *HhaI* 消化による T-RF および (B) 24 時間後の炭素源資化プロファイルに基づくユークリッド距離を用いたクラスター解析結果

2.3.3 炭素源資化能の解析

Biolog の結果、本研究においては 72 時間培養後に MBR の活性汚泥試料は 95 種類の炭素源のうち 45~87 種類の炭素源の資化を示した。一方、CAS は 72 時間後に 55~81 種類の炭素源の資化性を示した。MBR-a の活性汚泥は 45 種類の炭素源しか資化することができず、これは他の MBR や CAS よりはるかに少なかった。MBR-a と他の試料の違いは、生分解性ポテンシャルの指標となる AWCD の経時変化によっても観察された（図 2-7）。MBR-a は、他の試料が 72 時間後も増加を続けているのに対して、72 時間後において全試料の中で最も低い値で定常期に達した。MBR-a は他の MBR よりも著しく資化ポテンシャルが低かった。MBR-a は他の MBR と異なり、硝化液の無酸素槽への循環を行っていないという特徴があつた。しかしながら、MBR-a の処理性能は他の MBR と大きくは違わなかつた（表 2-2）。

MBR と CAS の炭素源資化能に基づく PCA を図 2-5 (B) に示した。PCA の散布図において、MBR と CAS の大部分のプロットが密集し、類似した炭素源資化ポテンシャルを有していることが示唆された。一方で、MBR-a、MBR-f、MBR-h、MBR-i のプロットが他の試料と離れてプロットされたことは、MBR の特殊な代謝能を表しているかもしれない。クラスター解析（図 2-6 (B)）も PCA（図 2-5 (B)）と同様の傾向を示し、MBR-a、f、h、i が他のサンプルとは離れた。

2.4 考察

本研究は、沈殿池において固液分離を重力沈降で行う従来型の CAS と、固液分離を膜分離によって行う革新的な生物学的廃水処理法の代表である MBR の細菌群集の系統学的構造と有機物代謝能の比較を行うため、T-RFLP 法および Biolog 法により解析を行つた。

MBR と CAS の細菌群集の比較を行つたところ、CAS は、プロセスによらず同様の T-RFLP プロファイルを示したが、MBR は処理場によって異なるプロファイルを示していた。PCA の結果からも、MBR と CAS の細菌群集は全く異なっていることが示されたが（図 2-4(A)）、Zhang ら（2012）は、16S rRNA 遺伝子を対象としたパイロシーケンシングによってアジアと北アメリカの下水処理場の MBR および CAS の細菌群集構造を調査し、PCA に供したところ、日本の下水処理場を調査した我々の結果と対照的に、MBR は CAS と近い位置にプロットされ、類似していることを報告している。しかしながら、Wan ら（2011）は 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 解析を行い、実規模の MBR の細菌群集は CAS とは大きく異なっていることを報告しており、我々の結果と一致していた。CAS と MBR の活性汚泥の細菌群集の系統学的構造の違いが生じる原因として、CAS では、最終沈殿池の存在が、活性汚泥の細菌群集構造を決定する大きな選択圧となっていることが予想された。すなわち、最終沈殿池では、活性汚泥が沈降分離されるが、この際、活性汚泥中の沈降性の高い細菌は沈殿し生物反応槽へ返送されるのに対し、沈降性の低い細菌は、上澄み中に浮遊するため、処理水とともに河川に放流され、処理系外へ排出される。このことにより、生物反応槽内には、沈降性の高い細菌が選択的に集積されることになる。一方、MBR では、最終沈

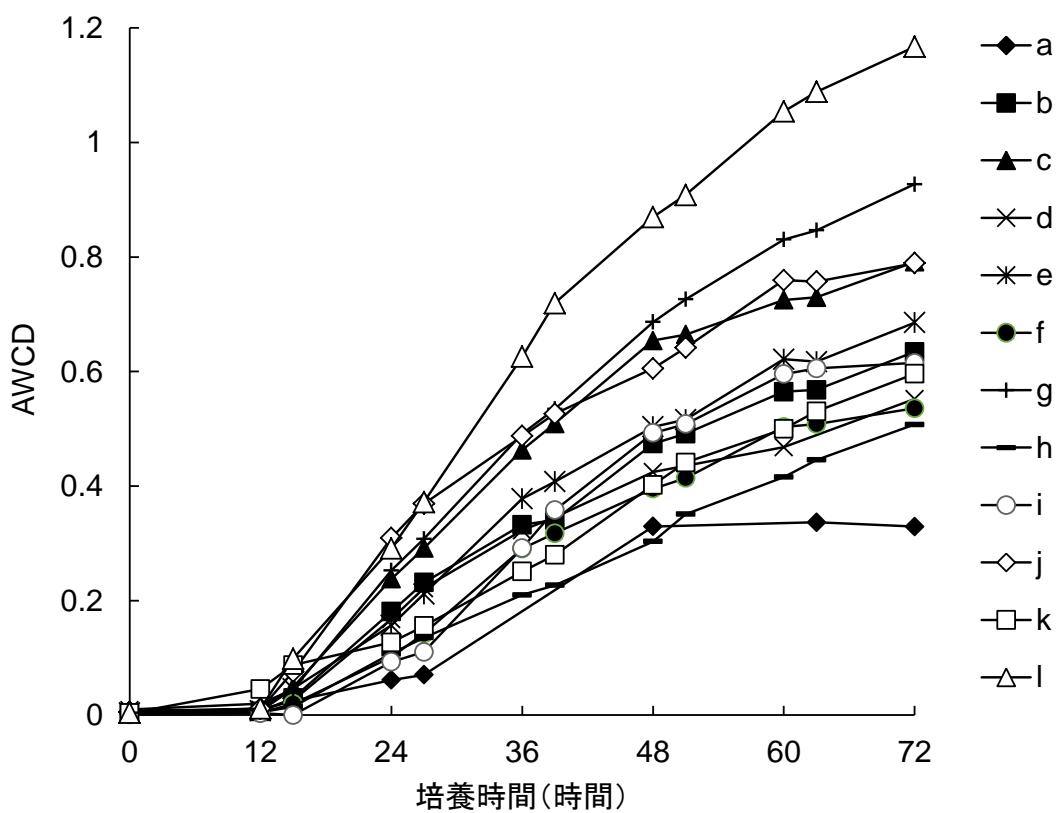


図 2-7 MBR a-l の活性汚泥試料の AWCD の経時変化

沈殿池が無く、膜により固液分離を行っているため、細菌はその沈降性によらず、全てが系内に留まることになるため、CASにおいて最終沈殿池で作用している選択圧が働くかないのである。また、MBRでは、CASと比較して高いMLSS濃度が維持され、SRTが相当長く設定されているほか、膜の目詰まり防止のために過曝気運転を行っているなど、曝気槽内の環境、つまり細菌の培養条件がCASとは大きく異なっているため、独特の細菌群集構造が形成されたものとも考えられた。

CASでは、いずれの処理場でも202~203 bpのT-RFの優占が確認された（図2-2）が、MBRにおいてはほとんどの処理場においてこのT-RFは優占していなかった（図2-1）。202~203 bpのT-RFは、 β -、 γ -Proteobacteria、Actinobacteria、Bacilliに由来するものと推測された。 β -Proteobacteriaは、Inf組成や処理プロセスによらず、多くの活性汚泥中で優占的に存在することが報告されている（Snaidr et al., 1997、Liu et al., 2001、Juretschko et al., 2002）。また、Marshら（2000）も、同じくプライマー27F、1392Rを用いたT-RFLP法により活性汚泥試料の細菌群集の解析を行っているが、この研究においても203 bpのT-RFが優占菌の一つとして検出されており、LeptothrixまたはEubacteriumであることが報告されている。203 bpのT-RFsは、CAS法などSRTの比較的短い処理システムの活性汚泥において特に優占的に存在する傾向が確認された。本研究と同一のフォワードプライマーを用いた研究では、下水処理場の活性汚泥中において202 bp付近のT-RFの検出強度が汚泥滞留時間（Sludge retention time; SRT）と負の相関を示すことが確認されている（橋本ら, 2004）。複数の処理場に共通して存在し、SRTが短いシステムにおいて優占化することから、このT-RFを示す微生物の幅広い基質に対する資化性と高い増殖速度が示唆され、この微生物が廃水処理系内における有機物分解に寄与する部分が大きいことが推測された。また、複数の試料に共通して、 β -Proteobacteria、Chloroflexi由来と推定されるT-RFs（148~150 bp）の存在が確認された。これらのT-RFsは、検出強度は低いものの、嫌気槽を含む連続槽（CAS-A2、CAS-C2、CAS-F）に存在し、標準法では検出されなかった。このことから、148~150 bp付近のT-RFsは、嫌気条件で特徴的に存在する微生物由来のT-RFsであることが示唆され、環境条件が活性汚泥中のマイナーポピュレーションに影響を及ぼすことが示唆された。

また、MBRおよびCASの炭素源資化能を比較したところ、PCAにおいて、CASとMBRの大部分が同様の位置にプロットされ（図2-4（A））、CASとMBRの大部分が類似した炭素源資化ポテンシャルを有していたことが示唆された。一方で、いくつかのMBRは他の試料とは異なる特殊な代謝能を有していることが示唆された。また、MBR-aについては他の試料と異なり著しく資化ポテンシャルが低かったが（図2-6）、MBR-aは硝化液循環を行っていないことから、この運転条件の違いが炭素源の資化性の違いに影響を与えた可能性がある。また、炭素源資化性が低いときにも、処理性能は他のMBRと大きな違いが無かったことは、MBRは高いMLSS濃度で運転されているため、炭素源資化性の低さに関わらず、処理槽全体では高い処理性能を示したものと示唆された。

以上の結果より、活性汚泥細菌群集は、細菌群集の系統学的構造が大きく異なっていて

も、類似した炭素源資化能を有していることが示された。また、MBR はいくつかの場合に特殊な代謝能を持つ細菌群集が豊富であることも示唆された。これらのことから、CAS よりも、沈澱池による選択圧の働くない MBRにおいて、細菌群集は柔軟性を有しており、運転条件等の操作により、特殊な代謝能を持つ細菌の保持等の新しい機能を付加し得る可能性が示された。

2.5 要約

第2章では、従来型の、沈澱池により固液分離を行う複数の活性汚泥法と、MBR の細菌群集構造と有機物代謝能の比較を行うため、T-RFLP 法および Biolog 法により解析を行った。

MBR の優占細菌の構成は従来型の活性汚泥法とは大きく異なっていた。さらに優占細菌は MBR 間でも異なっていた。しかしながら、炭素源資化プロファイルにおいては、MBR の大多数が従来型の活性汚泥法と類似していた。いくつかの MBR 試料は、他の試料とは著しく異なる特殊な炭素源資化プロファイルを示した。MBR の微生物群集構造の多様性と炭素源資化ポテンシャルの高さは MBR の微生物群集が柔軟性を持つことを示唆している。MBR の廃水処理性能の高さと併せると、MBR の多様で柔軟な微生物群集を適切に制御することができれば、新しい機能を保持可能な、より有望なシステムとなることが予想できる。

第3章 標準活性汚泥法における微生物群集の動態解析

3.1 はじめに

第2章より、沈殿池を有する活性汚泥法とMBRの細菌群集は大きく異なっていることが明らかになった。本章では、沈殿池を有する活性汚泥法の代表として標準活性汚泥法の細菌群集の系統学的構造と炭素源代謝能を長期にわたって経時に調査し、細菌群集の挙動を明らかとすることと、流入水、処理水と活性汚泥の細菌群集構造の関係を明らかとする目的とした。

3.2 対象とした処理プロセスと水質調査

標準法を採用している合流式のM処理場(処理対象人口;115,100人、処理能力;約82,400m³/日)において、真正細菌の群集構造の変化を調査した。流入下水の90%以上が家庭下水で、一部工業排水が含まれている。2008年7月、8月、2009年1月、および4月に流入水=最初沈殿池越流水(Inf)、曝気槽=生物反応槽内活性汚泥(AS)、最終沈殿池越流水=処理水(Eff)、および返送汚泥(RS)試料を採取して、微生物解析に供した。M処理場のフローと試料の採取地点を、図3-1に示している。

3.3 結果

3.3.1 運転状況と処理成績

調査した処理場の運転条件と廃水処理成績を表3-1にまとめた。調査期間の運転条件は、HRTが8.6~10.3時間、SRTは5.2~7.2日で一般的な標準法の運転条件と同程度であった。曝気槽のMLSS濃度は $1.0 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^3$ mg/Lの範囲で変動し、夏期(7、8月)に著しく低下した。Inf中のSS濃度は35.0~83.0mg/L、DOC濃度は54.3~84.7mg/L、T-N濃度は12.9~29.0mg-N/L、NH₄-N濃度は12.6~31.8mg-N/Lであった。SSは83%以上除去された。Eff中のSS濃度は13mg/L以下だったが、11月と1月には他の月よりも高い値を示した。

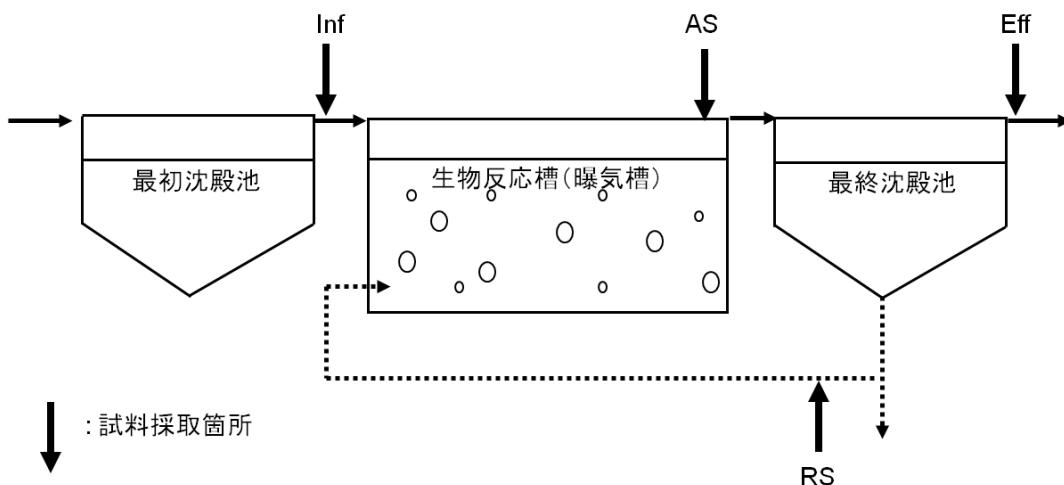


図3-1 M下水処理場のフローと試料採取地点

表3-1 本研究で調査した下水処理場の運転条件および廃水処理成績^a

試料採取 月	試料名	SRT (日)	HRT (時 間)	水温 (°C)	pH	従属栄養細菌 (CFU/ml)	濃度 (mg/L)						除去率 (%)					
							DO	MLSS /SS	DOC	T-N	NH ₄ -N	NO ₂ -N	NO ₃ -N	PO ₄ -P	SS	DOC	T-N	NH ₄ -N
2008年 7月	Inf-7			26.8	7.6	2.4×10^6	0.06	55.2	54.3	14.7	16.5	0.2	0.2	1.5				
	AS-7	6.7	8.8	26.9	6.8	9.7×10^6	2.6	1212	15.7	10.3	3.6	0.3	6.6	0.02	95.1	77.7	23.8	89.1
	Eff-7			26.9	6.6	1.7×10^5	0.05	2.7	12.1	11.2	1.8	1.1	4.7	0.04				
2008年 8月	Inf-8			29.9	7.4	1.3×10^7	0.5	35.0	59.2	12.9	12.6	0.03	0.2	3.0				
	AS-8	7.2	8.8	30.4	6.7	9.8×10^6	3.0	1013	22.1	10.4	3.3	0.2	8.4	0.1	94.9	66.0	20.9	83.3
	Eff-8			30.4	6.6	2.7×10^5	0.5	1.8	20.1	10.2	2.1	0.3	8.3	1.2				
2008年 11月	Inf-11			23.7	7.6	7.1×10^7	0.4	74.5	84.2	29.0	23.0	0.1	0.3	3.0				
	AS-11	5.2	9.2	25.1	6.9	3.5×10^7	2.5	1332	16.8	12.2	4.9	0.7	6.0	0.05	82.6	69.5	45.2	90.4
	Eff-11			24.7	6.7	4.1×10^4	0.8	13.0	25.7	15.9	2.2	0.1	10.5	0.9				
2009年 1月	Inf-1			19.5	7.6	5.7×10^6	0	74.5	NA	NA	31.8	0.2	0.5	1.3				
	AS-1	5.5	8.6	20.7	7.0	6.5×10^7	2.4	1617	13.7	NA	14.4	0.6	0.2	0.01	89.4	NA	NA	87.1
	Eff-1			20.3	6.5	1.0×10^5	0.2	7.9	5.8	NA	4.1	4.9	3.4	0.03				
2009年 4月	Inf-4			23.1	7.1	1.6×10^6	0	83.0	56.6	26.3	23.5	0.03	0.1	3.1				
	AS-4	6.8	10.3	23.6	7.1	1.4×10^7	3.0	1239	13.1	13.1	8.9	0.3	0.6	0.4	100	83.9	32.3	64.3
	Eff-4			23.2	7.0	2.1×10^4	0	ND	9.1	17.8	8.4	1.6	3.9	0.1				

^a NA, 解析不能; ND, データ無し.

DOC 除去率は 66~84% の範囲であった。しかしながら、処理場から提供されたデータによると、我々の調査期間には BOD 除去率 98.9~99.4% を示していた（データ不掲載）。窒素は、NH₄-N の 64~91% が除去されており、NO₃-N は処理水中から 3.4~10.5 mg/L 検出された。完全な好気プロセスであるために、T-N の除去率は 21~45% と低かった。これらの結果は、調査対象の処理場において SS、易分解性有機物質、窒素の効率的な除去が安定的に行われていたことを示している。

3.3.2 微生物群集の系統学的構造解析

図 3-2 は Inf、AS、Eff、RS の全サンプルの 10 ヶ月間における T-RFLP 解析結果を示している。表 3-2 に示した通り、Inf、AS、Eff、RS で検出された T-RF の数はそれぞれ 18~30、28~37、23~30、17~26 であった。活性汚泥試料（AS および RS）では、水試料（Inf および Eff）よりも高い多様性を示した。さらに、沈降分離を行う前の AS サンプルの方が、沈降分離後の RS 試料よりも多様性が高かった。

10 ヶ月間において、全ての Inf サンプルは、98 bp、186 bp、209 bp、571~572 bp（図 3-2）が共通して優占する類似した T-RFLP プロファイルを示した。T-RFs の相対存在量はそれぞれ、0.15~0.33、0.040~0.073、0.047~0.078、0.069~0.095 であった。MiCA データベースによると、98 bp と 571~572 bp はそれぞれ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) group と大腸菌群であることが推定された。

AS と RS の T-RFLP プロファイルは類似しており（図 3-2）、Inf サンプルのそれらとは大きく異なっていた（図 3-2、図 3-3）。59~60 bp、78 bp、198 bp、203 bp の T-RFs は AS と RS の全試料に共通して検出された。中でも、203 bp の相対存在量は 0.054~0.18 を占め、常に優占していた。また、201 bp の T-RF は RS-4 以外の全ての汚泥試料において 0.078~0.21 と優占していた。対照的に、Inf 試料の優占 T-RFs (98 bp、186 bp、209 bp、571~572 bp) は AS および RS 試料において不検出か、マイナーであった。

5 つの Eff 試料は Eff-7 と Eff-4 で構成されるグループと、Eff-8、Eff-11、Eff-1 で構成されるグループの 2 つに分かれた（図 3-3）。Eff-7 および Eff-4 は、98 bp の T-RF (P_i : 0.16 および 0.11)、186 bp の T-RF (P_i : 0.025 および 0.027)、209 bp (P_i : 0.15 および 0.13)、571~572 bp (P_i : 0.11 および 0.076) が優占し、Inf 試料と類似した T-RFLP プロファイルを示した。対照的に、Eff-8、Eff-11 および Eff-1 は独自の T-RFLP プロファイルを示し、検出された T-RFs の大半が他のサンプルでは検出されなかった。特に、Eff-8、Eff-11、Eff-1 で優占していた (P_i > 0.05) 117 bp、118 bp、122 bp、123 bp は他のサンプルでは検出されなかった。

T-RFLP 解析結果のクラスター解析を行ったところ、本研究で解析した 20 試料が 3 つのクラスターに分かれることが明らかとなった。第 1 グループは、Eff-8、Eff-11、Eff-1、第 2 グループは、全ての Inf 試料と 2 つの Eff 試料 (Eff-7 と Eff-4) を含み、第 3 グループは、5 ヶ月間の AS と RS 試料を含んでいた（図 3-4）。第 1、第 2、第 3 グループの類似性はそれぞれ、0.62~0.85、0.41~0.73、0.52~0.74 であった。クラスター解析を行ったのと同一のデー

タセットを用いて PCA も行われた。PC1、PC2 はそれぞれ 41.5%、25.6% の寄与率を示した。PC1 と PC2 の主成分得点の散布図を見ると、クラスター解析と同様に 20 試料が 3 つのコアグループに分類された。両解析結果は、調査期間における、Inf、AS、RS の安定性と、Eff 試料のばらつきを確認するものとなった。

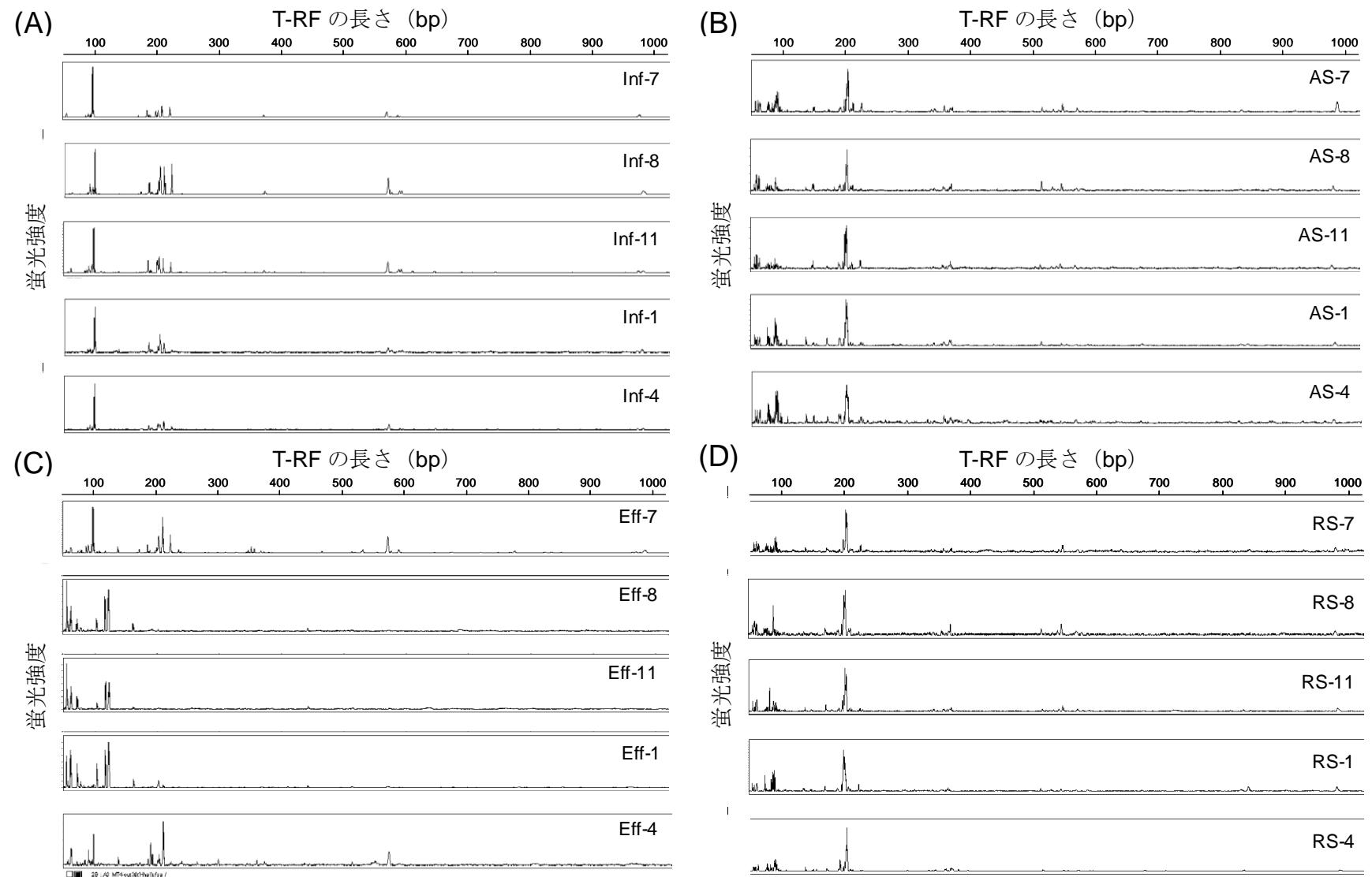


図 3-2 T-RFLP プロファイル (A) Inf、(B) AS、(C) Eff、(D) RS

表 3-2 T-RFLP 解析により得られた T-RF 数および Shannon-Weaver 指数 H' (T-RFLP)

試料採取月	試料	T-RF 数	H' (T-RFLP)
2008年7月	Inf-7	22	2.6
	AS-7	37	3.4
	Eff-7	23	2.7
	RS-7	22	2.8
2008年8月	Inf-8	27	2.8
	AS-8	33	3.2
	Eff-8	30	2.7
	RS-8	20	3.1
2008年11月	Inf-11	30	2.9
	AS-11	28	3.0
	Eff-11	30	2.5
	RS-11	17	3.0
2009年1月	Inf-1	18	2.4
	AS-1	30	3.1
	Eff-1	27	2.6
	RS-1	17	2.9
2009年4月	Inf-4	20	2.5
	AS-4	35	3.4
	Eff-4	28	2.9
	RS-4	26	2.9

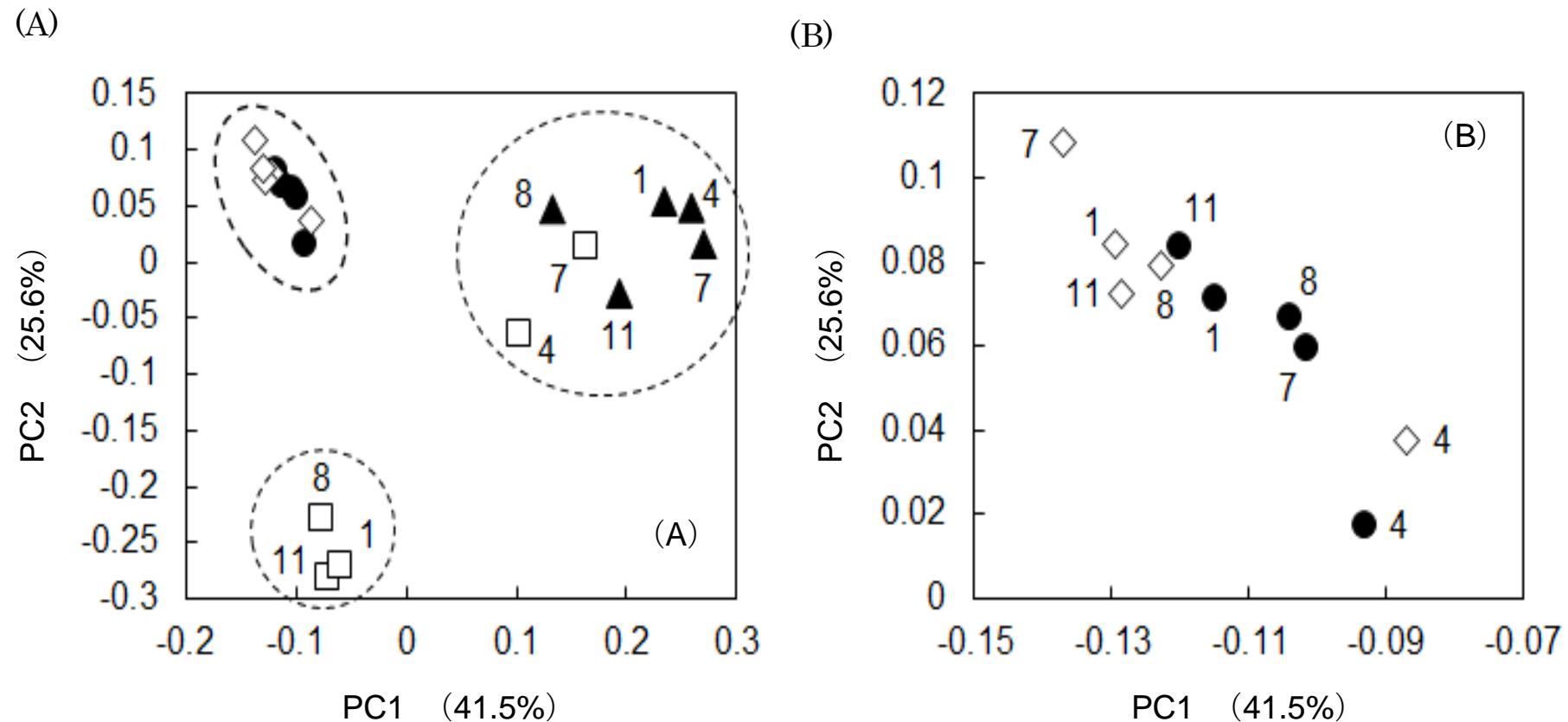


図 3-3 T-RFLP プロファイルに基づく主成分分析結果 (A) 流入水、活性汚泥、処理水、返送汚泥の全試料、(B) 活性汚泥および返送汚泥試料のプロットの拡大図 ▲ : Inf、● : AS、□ : Eff、◇ : RS、グラフ中のプロットに近接する数字は試料採取月を示す

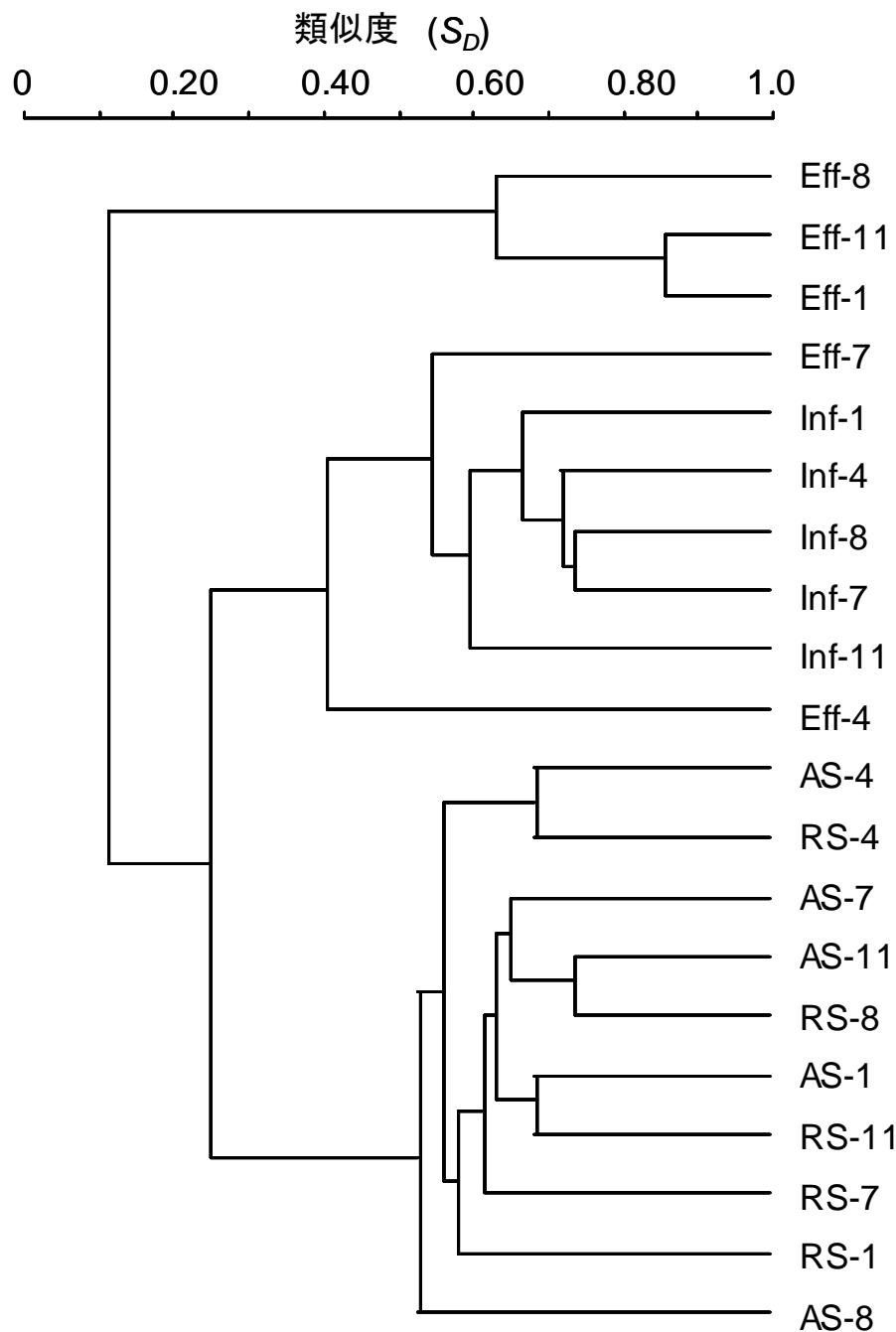


図 3-4 T-RFLP プロファイルに基づくクラスター解析

3.3.3 炭素源資化能の解析

図3-5はBiolog法におけるAWCDの経時変化を表している。AWCDはサンプリングを行った時期によらず、15時間のラグ期の後、増加し始めた。その後、AWCDは培養時間の経過とともに増加し、72時間後には0.68～0.80に達した。資化可能な炭素源の数および H' (Biolog)も時間とともに増加し、72時間後にはそれぞれ70～78、4.3となった(表3-3)。Biologに基づくクラスター解析の結果、全てのAS試料の S_D 値は24、48、72時間後においてそれぞれ0.93、0.95、0.96と、極めて類似した炭素源資化ポテンシャルを示した(データ不掲載)。

全てのAS試料において、多糖類は速やかに資化された。また、AS-7、AS-11においては界面活性剤の速やかな資化が観察された(図3-6)。加えて、単糖類は、試験を行ったAS試料で共通して良好な資化性を示した。一方、二糖類、三糖類はサンプリングの時期によってばらついた。カルボン酸、アミノ酸、アルコール、核酸は本研究の培養条件下では、AS試料による資化性は良くなかった。

Biologプレート中の炭素源の資化に関与する微生物を推定するために、2010年4月に採取したAS試料を使用して追加実験を行った。元となるAS試料と、Biologプレートの中でも72時間培養後に炭素源を良く資化していたいくつかのウェル内の培養液からDNAを抽出してT-RFLP解析に供した。AS試料で共通して優占していた203bpのT-RFは、調査したウェルの大半で優占していた(図3-7)。また、元の活性汚泥試料内でマイナーだった細菌や検出されなかったT-RFsが、全ての炭素源において優占していた。このことは、活性汚泥中のマイナーな細菌群が廃水中の種々の有機物やその代謝物の分解に貢献している可能性を示唆している。

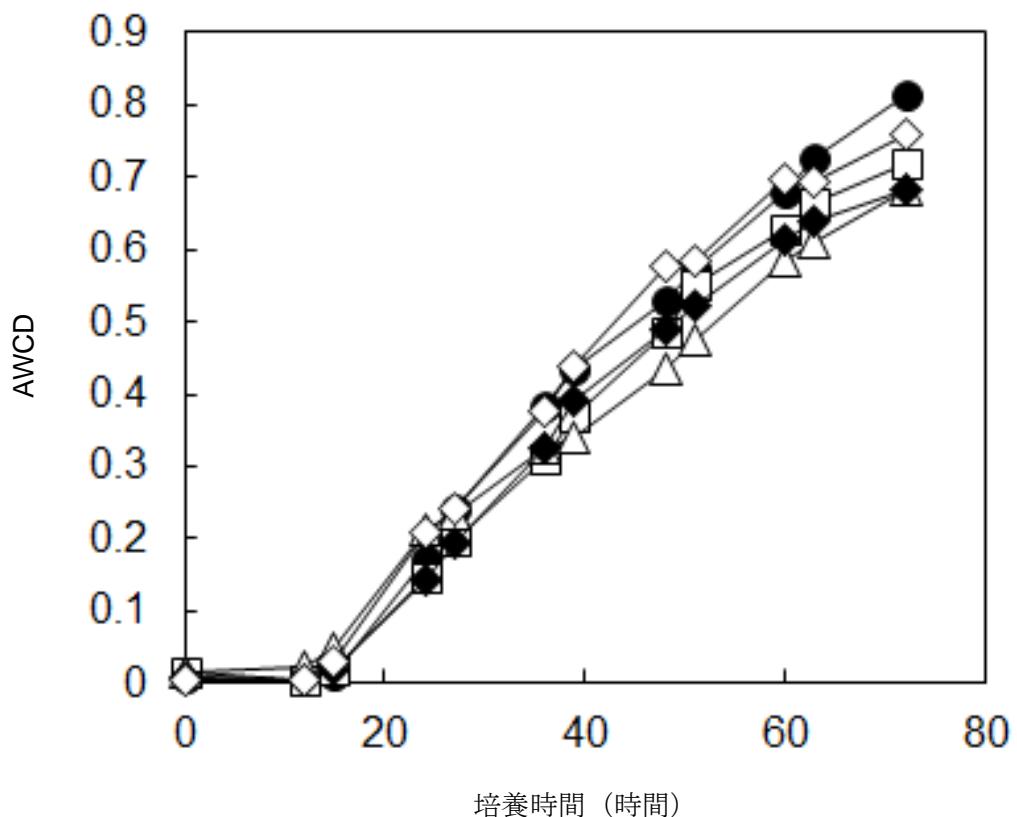


図 3-5 Biolog における AWCD の経時変化 ● : AS-7、□ : AS-8、△ : AS-11、◆ : AS-1、
◇ : AS-4

表 3-3 活性汚泥試料の Biolog により得られた資化可能な炭素源の数、AWCD、Shannon-Weaver 指数 (H' (Biolog))

試料名	72 時間後の資化可能 な炭素源の数	AWCD			H' (Biolog)		
		24 時間	48 時間	72 時間	24 時間	48 時間	72 時間
7-AS	77	0.17	0.52	0.80	3.8	4.2	4.3
8-AS	74	0.15	0.48	0.71	3.9	4.2	4.3
11-AS	70	0.21	0.43	0.68	3.9	4.2	4.3
1-AS	78	0.14	0.49	0.68	3.9	4.3	4.3
4-AS	73	0.21	0.57	0.75	4.1	4.2	4.3

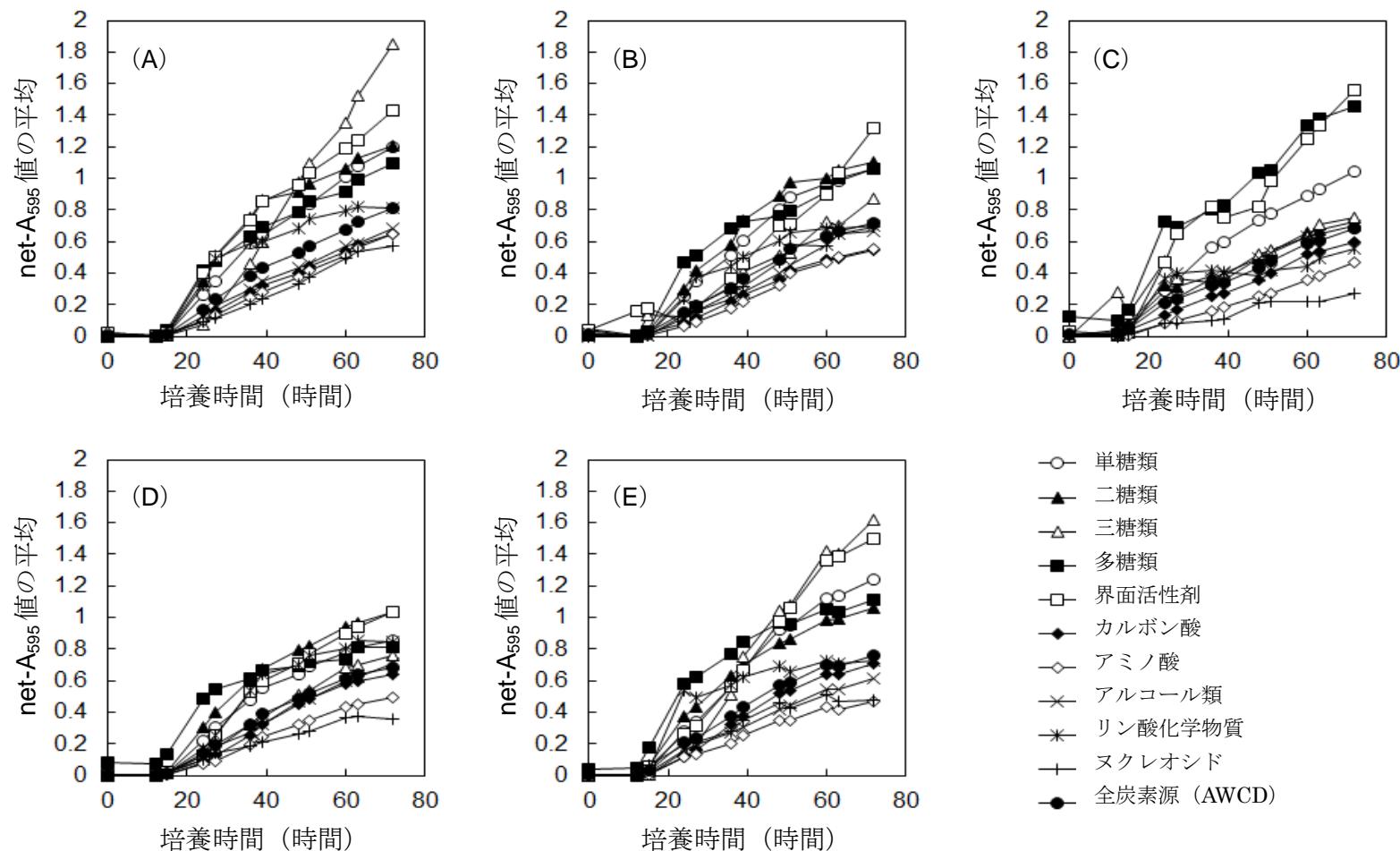


図 3-6 Biolog の AWCD 値および炭素源の種類ごとの吸光度の平均値の経時変化 (A) AS-7、(B) AS-8、(C) AS-11、(D) AS-1、(E) AS-4

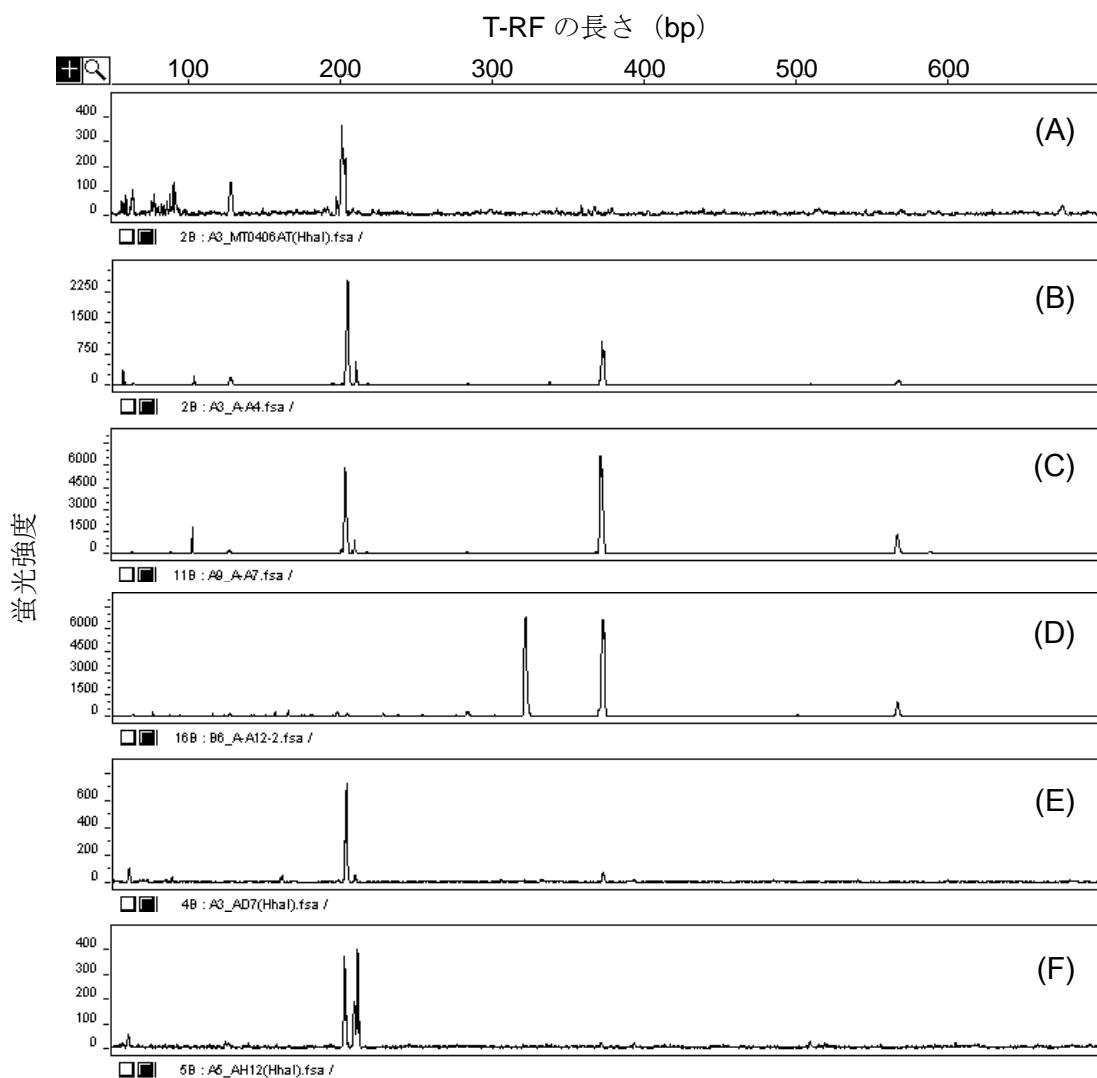


図 3-7 2010 年 4 月に採取された活性汚泥試料 (A) および Biolog で検出されたグリコーゲン資化細菌 (B)、*N*-アセチル-D-ガラクトサミン資化細菌 (C)、D-セロビオース資化細菌 (D)、D-グルコン酸資化細菌 (E)、D-グルコース-6-リン酸資化細菌 (F) の T-RFLP プロファイル

3.4 考察

本研究は下水の二次処理に最も広く使われている標準法を採用している実規模の下水処理場の各部における細菌群集を調査するためにT-RFLP法を用いた。我々の知るところでは、本調査が、下水処理場の活性汚泥および返送汚泥、流入下水および処理水の細菌群集を継続的に調査し比較した初の研究である。

Infは、我々の調査した10ヶ月間において、わずかな違いはあるものの、いずれの試料も類似したT-RFLPプロファイルを示した(図3-2)。このことは流入下水の細菌群集が季節変化に対して概ね安定していたことを示唆している。調査した下水処理場は主に都市下水を受け入れているため、下水中の細菌は主に人の排泄物由来であると考えられる。パイロシケンシングを使用した既往研究によると、人の排泄物中には*Bacteroidetes*門、*Firmicutes*門(主に*Clostridia*属)、*Actinobacteria*門が大多数を占めており、*Proteobacteria*門が検出されることは稀である(Lauber *et al.*, 2010; McLellan *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2012)。対照的に、McLellanら(2010)はミルウォーキー(アメリカ合衆国)の2つの下水処理場から未処理の下水試料を採取し、細菌群集構造を解析し、人の排泄物の群集構造と比較を行った。結果として、人の排泄物中にはほとんど存在しなかった*Proteobacteria*(主にβ-およびγ-*Proteobacteria*)が生下水中で優占していた。本研究では、T-RFLP解析において一つの制限酵素による処理しか行っていないため、検出されたT-RFsの示す細菌を全て推定することはできなかったが、共通に優占している細菌のいくつかはCFBグループと大腸菌群であることが推測された。従って、我々の結果はMcLellanら(2010)の結果と部分的に一致するものとなった。排泄物と下水処理場の流入水(生下水/廃水)の細菌群集の構成が似ていないことは、下水道によって特に*Proteobacteria*の一部のような、特異的な微生物群集の選択的な増殖(McLellan *et al.*, 2010)や排泄物で優占している細菌群等のような下水道において生残困難な細菌群集の死滅によって引き起こされたものと考えられる。本研究では最初沈殿池越流水を採取したため、重力沈降の過程でSS成分に吸着しているいくつかの細菌群が選択的に除去されることもまた細菌群集の構成の変化に少なからず影響を与えていると考えられる。本研究で観察された流入水中の細菌群集の安定性は人由来の排泄物の時期的(季節的な)普遍性と下水道の一般的に安定した環境によるものと示唆された。

流入下水と異なって、最終沈殿池から排出される処理水のT-RFLPプロファイルは、2つのグループに分かれた(図3-3、図3-4)。一つ目のグループは、流入水と同様のプロファイルを示しているEff-7およびEff-4を含んでいた。もう一つのグループはEff-8、Eff-11、Eff-1を含んでおり、流入水や汚泥試料とも異なる処理水特有の群集構造を有していた。グループングは季節にも依存せず、時間と共に徐々に移行しているわけでもなかった。先のグループは処理水中のSS濃度が低かったが、後のグループは比較的高かった(表3-1)。処理水中のSS濃度の高さは、最終沈殿池において活性汚泥の固液分離能が低下したことを示していることから、2つのグループ間での微生物群集の類似性の低さは、活性汚泥微生物群集の沈降性の違いを反映したものとも考えられた。つまり、本研究において2008年7月と2009

年4月に観察されたように、全ての活性汚泥が安定なフロックを形成し、速やかに沈降する場合に処理水の細菌群集は流入水の細菌群集と類似していたものと考えられる。一方、2008年8月、11月および2009年1月のように、活性汚泥の沈降性が悪化した場合には、処理水中の細菌群集が流入水の細菌群集構造とは異なっていた可能性がある。処理水の細菌群集が流入水の細菌群集と類似していた場合に、DOC除去率はサンプリング期間中を通じて良好であったので（表3-1）、流入水と処理水の細菌群集の比較や処理水に特異的ないくつかの細菌種（T-RFs）の検出が廃水処理性能の予想や活性汚泥の健康状態に使用できるかもしれない。処理水の調査は主として病原性細菌を対象としているが（Sahlström et al., 2004; Wen et al., 2009）、我々の結果は、Langenbachら（2009）によって既に指摘されている通り、処理水質の改善のためには処理水の細菌群集について理解する必要性があることを示唆した。

ASとRS試料のT-RFLPプロファイルはサンプリング日によらずお互いに比較的類似していた（図3-2）。このことは調査した下水処理場の汚泥の細菌群集はわずかに変動しているが概ね安定していたことを示唆した。既往研究においても、パルプ工場廃水（Smith et al., 2003; Gilbride et al., 2006）や都市下水（Wells et al., 2011; Cui et al., 2012; Yi et al., 2012）を処理する下水処理場の活性汚泥細菌群集が流入水組成や運転条件の変化に伴って連続的にわずかな変動が生じたが、季節によらず安定していたことが報告されている。例外的に、Yiら（2012）はリン脂質脂肪酸プロファイルに基づく活性汚泥の細菌群集構造は、バルキンゲ問題（汚泥の膨化による固液分離性の悪化）に関連する *Flexibacter* sp.の発生によって著しく変化することを報告した。それゆえに、実規模の下水処理場の活性汚泥細菌群集は流入水組成や運転条件と共に連続的に変化するが、その季節変化は微弱であり、全体的な細菌群集構造の類似性は下水処理場の選択圧によって維持されていると説明できる。

優占細菌種の推定を行ったところ、対象とした下水処理場の活性汚泥において、 β -ProteobacteriaやFirmicutes、Actinobacteriaに属する細菌種が共通に優占しているかもしれないことが明らかになった。 β -Proteobacteriaの優占は標準法を含む様々な活性汚泥法を採用する多くの実規模下水処理場において観察されている（Wagner et al., 2002; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2012）。 β -Proteobacteriaは有機物やリン化合物の除去や汚泥のフロック形成に関連する様々な細菌を含んでいる。したがって、 β -Proteobacteriaに属する細菌種は良好な廃水処理の達成に重要な役割を果たしているものと考えられる。

流入水、活性／返送汚泥、処理水の細菌群集の比較は汚泥の細菌群集が流入水の細菌群集とは全く異なることを明らかにした。これは下水処理場の活性汚泥細菌群集に対して流入水中の細菌群集の与える影響が小さいことを示唆している。複数回の調査は行っていないものの、Liuら（2007）もまた、流入水と活性汚泥の細菌群集が北京（中国）の2つの下水処理場においてお互いに異なっていることを明らかにした。活性汚泥細菌群集に対して流入細菌群集の与える影響が無視できるほどのものであるということは、流入水中の細菌の数が活性汚泥細菌のそれよりも小さく、また、流入水中の細菌が下水処理場の活

性汚泥槽の環境条件に適応できず生残できないせいであると考えられる。

対照的に、処理水中の細菌群集は活性汚泥細菌とは大きく異なっていた。これは沈澱池での重力沈降による細菌の選択が細菌群集構造の変化に大きく影響することを示している。Liu ら (2007) は汚泥の沈降性が悪化（わずかに泡が形成）した時に活性汚泥の微生物群集構造が処理水のそれらと類似していたことを明らかにした。我々の結果と Liu ら (2007) の結果を併せると、処理水の細菌群集（特に、本研究の Eff-8、Eff-11、Eff-1 で特異的に検出されたいくつかの優占 T-RFs）の季節変化と活性汚泥と処理水の細菌群集間の類似性は汚泥の沈降性の指標や、沈降性悪化の発生予測として使用できる可能性がある。

Al-Mutairi (2009) によると、クウェートの 3 つの下水処理場から採取した活性汚泥の炭素源資化ポテンシャルは季節によって異なっていた（冬期より夏期に良好な資化性を示した）。しかしながら、驚くべきことに、我々の行った Biolog アッセイによると AS 試料の全てにおいて、資化可能な炭素源の数、AWCD、 H' (*Biolog*)、速やかに資化可能な炭素源、資化が困難な／資化不可能な炭素源に関して極めて類似していた（図 3-5、表 3-3）。この結果は有機物（BOD、DOC）の除去性能とも一致していた（表 3-1）。ここで観察された長期に亘る炭素源資化能の安定性の維持は、活性汚泥細菌群集の機能の冗長性によりもたらされたかもしれない。幾つかの特徴的な炭素源の資化に関連する微生物群集を明らかにしようとした我々の試みはその存在／非存在が細菌群集構造全体にほとんど影響を与えないようなマイナーな細菌群集が炭素源の資化能において重要な役割を担っていることを明らかにした（図 3-7）。従って、活性汚泥細菌群集は運転条件や環境条件の変化に伴ってマイナーな細菌群集が時間的に変動することによって、期間を通じて同等の炭素源分解ポテンシャル（炭素源資化ポテンシャル）を維持することができたものと考えられる。さらには、我々の調査した下水処理場の活性汚泥槽は水温の変化が小さかった（表 3-1）ことから寒冷な季節においても活性汚泥細菌群集の代謝能が高いまま維持されることに貢献していた可能性がある。

3.5 要約

本研究は標準法として運転されている実規模の下水処理場において10ヶ月間に亘って細菌の系統学的構造と有機物質の代謝能を調べることで、細菌群集の挙動を調査した。

流入水の細菌群集構造は季節変化に対して概ね安定していた。また、処理水中の細菌群集構造は季節によって異なっており、おそらく活性汚泥細菌群集の沈降性に依存しているものと考えられた。処理水中の細菌群集構造の季節変化、特に処理水に特徴的ないいくつかの優占細菌は活性汚泥の沈降性や廃水処理性能の推測に役立つ可能性がある。活性汚泥細菌群集構造は運転条件や流入水組成の変化に伴って僅かに変化したもの、季節によらず概ね安定していた。また、活性汚泥の細菌群集構造は流入水のそれとは全く異なっていたことから、下水処理場の活性汚泥槽の細菌群集に対して流入水中の細菌群集が与える影響は無視できるほどのものであることが示唆された。T-RFLP 解析によって検出された全体の細菌群集構造にほとんど影響を与えないようなマイナーな細菌群集が活性汚泥による炭素源の資化性に大きく貢献していた。マイナーな細菌群集に少なくとも一部起因する機能的な冗長性は、活性汚泥細菌群集構造の時間的な変動とは別に、同程度の有機物分解能力を維持した活性汚泥の形成に貢献していると考えられる。

第4章 膜分離活性汚泥法の微生物群集の動態解析

4.1 はじめに

第2章では、MBRとCASの微生物群集は大きく異なっていることを明らかとした。ただし、MBRとCASが地理的に異なる地点で採取されている他、ある時期のスナップショットであるため、MBRとCASの微生物群集の差異がプロセスの差によるものであることを明確にするには、同一のInfを処理するMBRとCASにおいて調査を行うとともに、経時的な調査を行う必要がある。そこで、本章ではMBRの微生物群集に着目し、約2年間にわたり継続的に系統学的構造と炭素源代謝能について調査を行い、その挙動を明らかとすることを目的とした。

4.2 対象とした処理プロセスと水質調査

三宝下水処理場は合流式下水道であり、流入水は主に家庭排水であるが、一部工場廃水も含まれている。三宝下水処理場では7系列のCASが運転されていたが、図4-1に示す通り、No.1~5をMBRへ改修することで省スペース化を図り、高速道路およびスーパー堤防を建設するためにNo.6、7を廃止することにした。そのため、No.1~5がMBRとして順次供用され始めた2011年3月から、No.6、7のCASが完全に廃止された7月20日までの間、共通のInfがCASとMBRで並列に処理された（図4-1）。MBRにおいても最終沈殿池が存在しているが、固液分離の目的ではなく、CASをMBRに改修した名残である。MBRは、最終的に9ユニット（No.1-1、1-2、2-1、2-2、3、4-1、4-2、5-1、5-2）が設置された。試料を採取したNo.2-1のMBRは、全槽容積1,595 m³であり、無酸素槽（323 m³）、好気槽（472 m³）、膜分離槽（800 m³）で構成されている。また、膜分離槽から無酸素槽への硝化液循環比は4±1倍であった。膜分離は浸漬型有機平膜（Kubota、塩素化ポリエチレン、平均膜孔径0.2 μm）によって行われた。No.2-1には0.5 m²の膜が300枚搭載された膜ユニットが46基設置され、有効膜面積は11,040 m²であった。試料を採取したNo.6のCASの曝気槽容積は3,200 m³、最終沈殿池の容積は1,719 m³である。

MBRの運転は2011年3月6日（0日目）に開始され、その日から20日にかけて、主にCASの余剰汚泥が投入された。また、同下水処理場の標準法施設および高度処理施設（担体投入ステップ流入式硝化脱窒法+急速ろ過）から発生する生活汚泥と余剰汚泥の混合汚泥（約10 t/系列）も投入され、3月21日より定常運転（実処理への適用）が開始された。その後、4月1日から19日にかけて、No.2-1に最初沈殿池の生活汚泥（約3 t/系列）が追加投入され、以降は外部からの汚泥投入なしに運転が継続された。そして、No.1~5全てがMBRに改修され、処理水量が十分に確保できるようになった7月20日にMBRと並列運転されていたCAS No.6、7の運転が停止した。

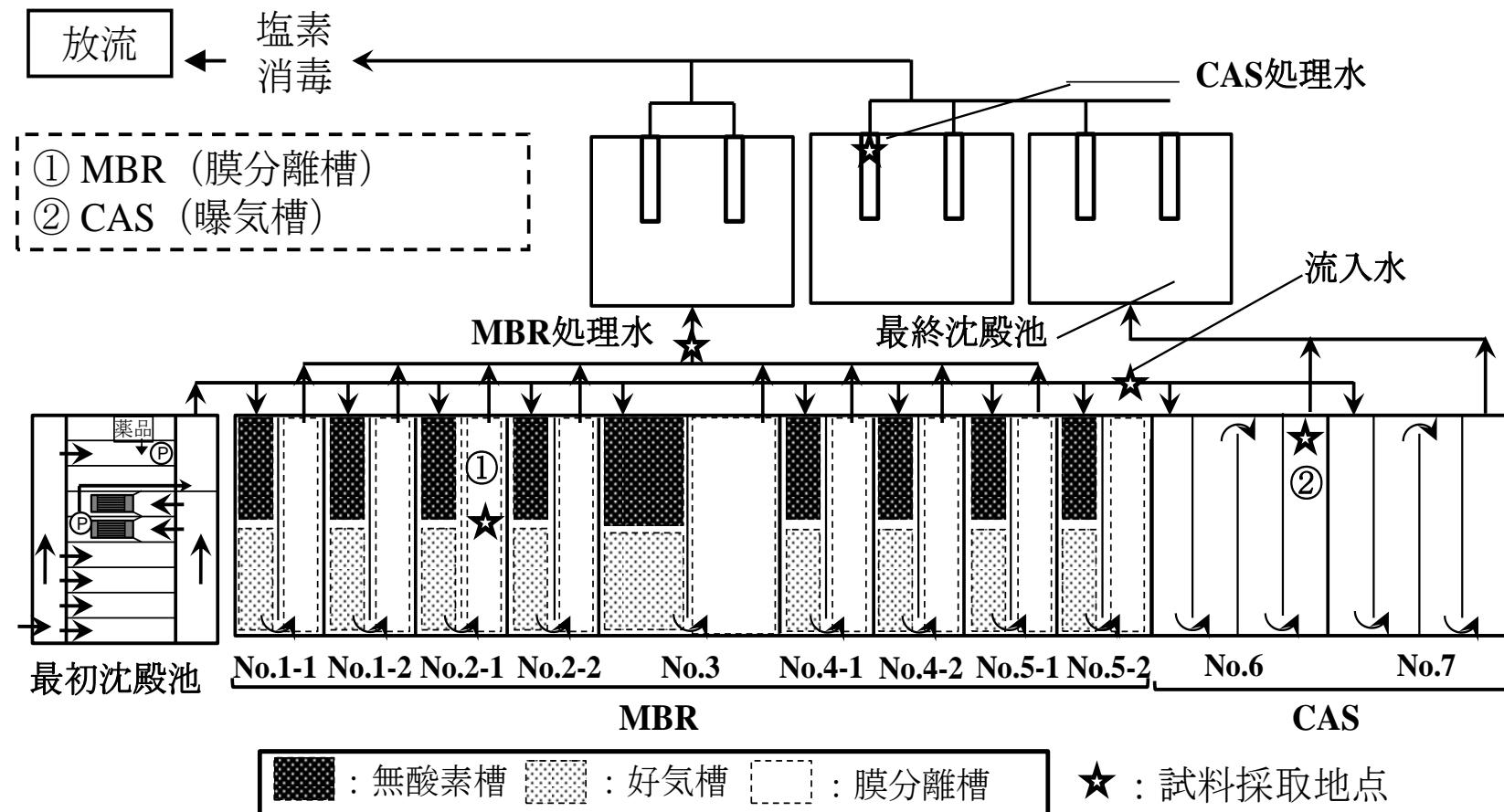


図 4-1 三宝下水処理場の概要

4.3 結果

4.3.1 運転状況と処理成績

MBR および CAS の運転条件および処理成績を表 4-1 および表 4-2 に示した。また、調査期間中における MLSS 濃度および DOC、T-N、ケルダール窒素 (Total Kjeldahl Nitrogen; TKN)、T-P 除去率の変化を図 4-2 に示した。MLSS 濃度から判断して 0~73 日目までの間を立上げ期間と見なし、表 4-1、表 4-2 における MBR の運転条件、処理成績はそれ以降の、定常期の値のみで示している。

CAS の MLSS 濃度と SRT はそれぞれ 0.7~1.5 g/L、約 20 日間であったが、MBR では、それぞれ 8~10 g/L、約 250 日間となり、MBR の特徴を反映した高い値に保たれていた。HRT は CAS が平均 7 時間、MBR が平均 8 時間と同程度であり、結果として、有機物負荷量と同義である DOC 負荷量は、CAS の 0.22 kg-DOC/kg-MLSS/day に対し、MBR では約 10 倍低い 0.015 kg-DOC/kg-MLSS/day で運転された。また、MBR の DO 濃度は膜の閉塞防止のために高い値 (1.9~9.9 mg/L) に保たれたが、CAS の DO 濃度は糸状性細菌によるバルキング防止のために使用される一般的な DO 濃度 (Guo *et al.*, 2010) と比較してもやや低い値 (1.5~3.0 mg/L) で運転されていた。MBR の TMP は 1.3~21.4 kPa であり、次亜塩素酸ナトリウムによる逆洗は 700 日間で 27 回行われた。

流入水の DOC と T-N 濃度 (TKN 濃度に等しい) はそれぞれ 20.0~57.8 mg/L および 18.0~38.5 mg-N/L であったが、定常期の MBR の DOC、T-N、TKN 除去率は、192 日目の DOC 除去率と、416 日目の T-N および TKN 除去率を除くと、それぞれ 80%以上、65%以上、90%以上と概ね高い値に維持された。一方、CAS においては、DOC 除去率 68~82%、T-N 除去率 48~69%、TKN 除去率 53~84% と、MBR と比較して低い値を示した。また、CAS 処理水の SS 濃度は 0.6~5.1 mg/L と、処理水中の SS 濃度は低い値に保たれており、最終沈殿池における固液分離は良好であった。

表 4-1 MBR および CAS の運転条件

	HRT (時間)	SRT (日)	pH	DO (mg/L)	DOC 負荷量 (kg-DOC/kg-MLSS/day)
MBR	4-13 (7)	9-22,660 (248)	6.4-7.9 (7.0)	1.9-9.9 (5.8)	0.008-0.024 (0.015)
	CAS (8)	6-14 (19)	5-24 (6.9)	6.6-7.2 (6.9)	1.5-3.0 (2.4)

*表中の数字は、最小値-最大値（平均値）を示す

表 4-2 流入水および処理水の水質分析結果

	DOC (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)
Inf	20.0-57.8 (35.5)	10.5-24.0 (16.8)	18.0-38.5 (24.9)	1.5-11.7 (3.6)
	MBR (5.9)	4.0-12.3 (3.7)	0.7-9.2 (4.3)	0.2-1.7 (1.1)
処理水	CAS (8.0)	6.5-10.0 (3.8)	0.8-8.2 (11.8)	9.6-13.7 (1.4)
				0.2-5.5

*表中の数字は、最小値-最大値（平均値）を示す

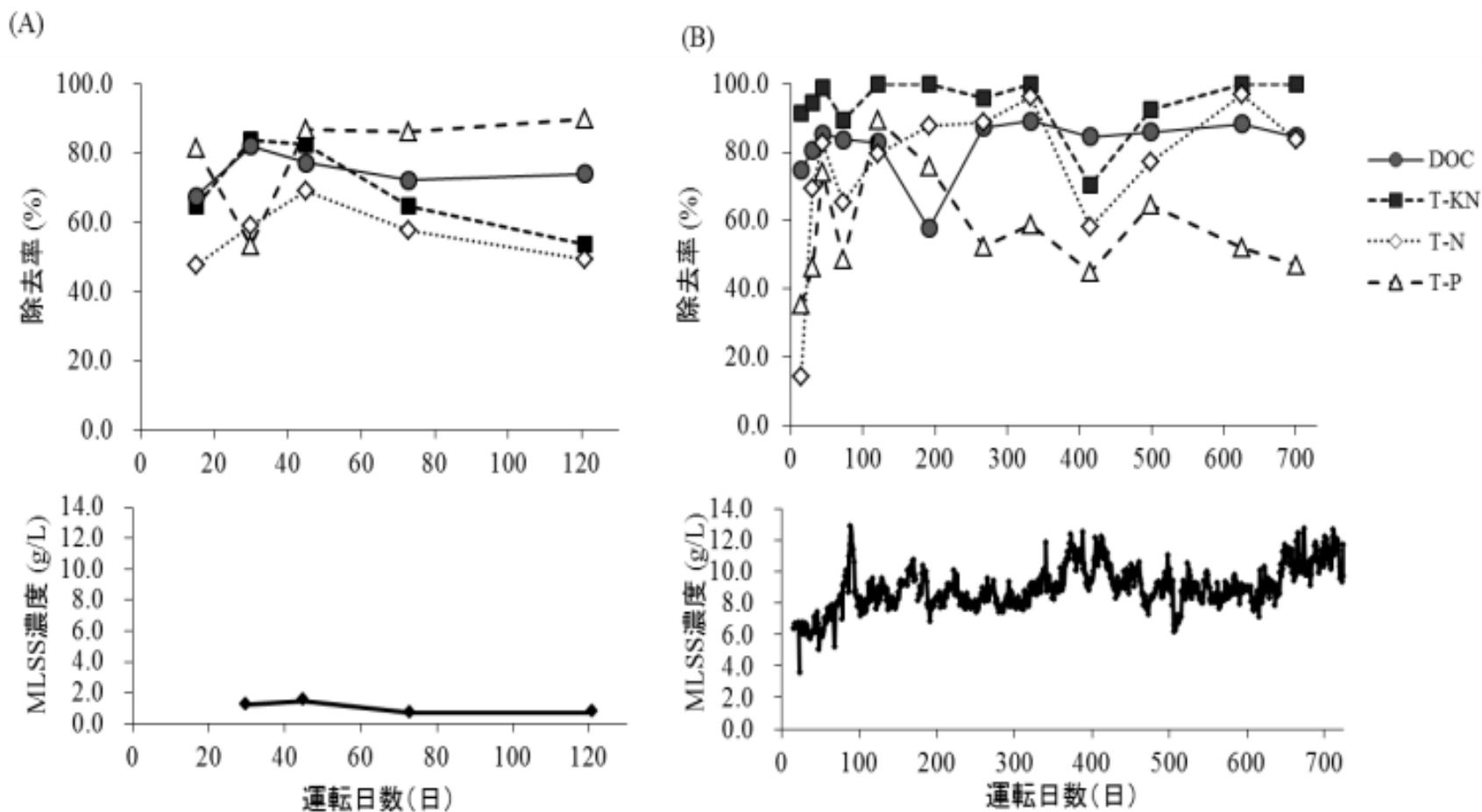


図 4-2 CAS (A) および MBR (B) における廃水処理成績と MLSS 濃度の変化

TKN は、T-N 濃度から $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度および $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を減じることにより算出した

4.3.2 微生物群集の系統学的構造解析

図4-3は流入水、MBR、CASの全試料におけるT-RFLP解析結果を示している。表4-3に示した通り、流入水、MBR、CASで検出されたT-RFの数はそれぞれ7~21、17~49、18~34であった。 α 多様性を示す H' (T-RFLP)は、流入水、MBR、CASでそれぞれ、1.6~2.7、2.7~3.6、2.7~3.2であり、活性汚泥試料(MBRおよびCAS)では、流入水よりも高い多様性を示した。MBRとCASでは、同時期においてはMBRがわずかに高い、または同等の値を示した。

流入水試料のほとんどにおいて、99~100 bp、201 bp、204~205 bp、211 bp、223~224 bp、571~573 bpが優占しており、中でも99~100 bpおよび204~205 bpのT-RFsが高い優占度を示す、比較的類似したプロファイルを示した。これらのT-RFsの相対存在量はそれぞれ、0.040~0.43、0.020~0.14、0.14~0.33、0.030~0.15、0.011~0.14、0.037~0.14であった。ただし、333日目および626日目については99~100 bpおよび204~205 bpのT-RFは検出されず、594 bpのT-RFの相対存在量がそれぞれ0.34および0.35と最も優占となった。MiCAデータベースによると、99~100 bpは(γ/δ)-Proteobacteria、Bacteroidetes、Verrucomicrobia、204~205 bpは(β/γ)-Proteobacteria、Bacteroidetesであることが推定され、594 bpのT-RFはFirmicutesもしくはBacteroidetesであることが推定された(表4-4)。

一方、MBRおよびCASのT-RFLPプロファイルは、流入水試料のそれらとは大きく異なっており、また、立上げ初期(0~45日目)のMBRはCASと類似したプロファイルを示していたが、それ以降はCASとは大きく異なる微生物群集構造を示した(図4-3)。立ち上げ初期のMBRおよびCASの試料においては、64 bpおよび202~203 bpのT-RFがそれぞれ0.03~0.06、0.08~0.19と優占した。MiCAデータベースによると、64 bpはFirmicutesまたはAcidobacteriaに属し、202~203 bpのT-RFは(β/γ)-ProteobacteriaまたはBacteroidetesに属することが推定された(表4-5)。一方で、定常期のMBRにおいては、58 bp、202~203 bp、406~407 bpのT-RFがそれぞれ0.03~0.11、0.01~0.08、0.04~0.17と優占し、MiCAデータベースによると、58 bpは(α/γ)-ProteobacteriaもしくはPlanctomycetes、406~407 bpはFirmicutesであることが推定された(表4-6)。

流入水、MBRおよびCASの活性汚泥の細菌群集のプロファイルの比較から、MBRとCASの活性汚泥のプロファイルは流入水とは大きく異なっていることが明らかとなった(図4-3)が、これらの傾向はクラスター解析の結果からも確認された(図4-4)。すなわち、流入水と活性汚泥試料の大きく2つのクラスターに分かれ、さらに、汚泥試料のうち定常期のMBRの試料は、CASおよび立上げ初期のMBRの試料で構成されるサブクラスターとは異なるサブクラスターに分類された。

MBRとCAS間の細菌群集の違いをより明確にするために、MBRとCASの活性汚泥試料に対してPCAを実行した。第一主成分(PC1:寄与率30.5%)および第二主成分(PC2:寄与率14.5%)の主成分得点を散布図にプロットしたところ(図4-5)、MBRおよびCASの16試料は、CAS試料と立上げ初期(0~45日目)の3つのMBR試料を含むグループと、残

る定常期の全 MBR 試料を含むグループの 2 つのグループに分かれた。ここで、PC1においては、202、406～407 bp の T-RFs がそれぞれ負 (<-0.6) および正 (>0.4) の因子負荷量を示したのに対し、PC2においては、406～407 bp の T-RF が正 (>0.4) の因子負荷量を示した。図 4-3 から、202～203 bp の T-RF は CAS と立上げ初期の MBR において優占していたが、定常期の MBR では、優占しておらず、499 日目以降、406～407 bp の T-RF が優占していたことが確認される。

さらに、主成分得点と運転条件や廃水処理成績の関係を明らかにするために単回帰分析を行ったところ、PC1 は MLSS 濃度 ($r=0.93$)、NH₄-N 除去率 ($r=0.66$)、T-N 除去率 ($r=0.64$)、処理水中の NO₂-N 濃度 ($r=-0.71$) と相関を示した。ただし、NH₄-N および T-N 除去率については、MLSS 濃度とも相関を示していた（それぞれ $r=0.77$ 、 0.64 ）。一方、PC2 はいずれの因子とも相関が確認されなかった。

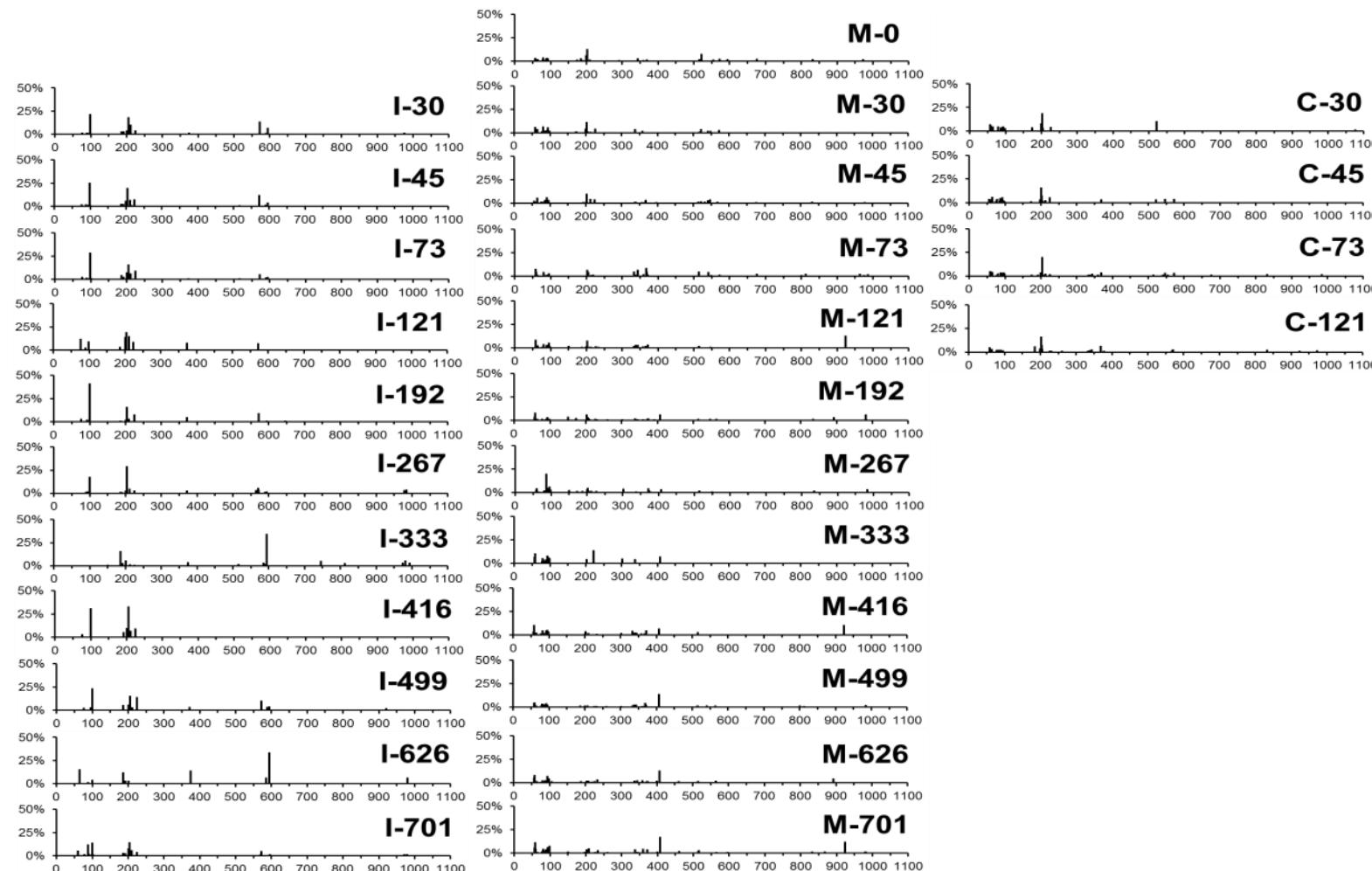


図 4-3 流入水 (I)、MBR (M) および CAS (C) の活性汚泥試料の T-RFLP プロファイル

縦軸：相対存在量（%）、横軸：T-RF (bp)（ハイフンの後ろの数字は運転日数を示す）

表4-3 T-RFLPの結果に基づく多様性指数

(日)	流入水	T-RF の数		H' (<i>T-RFLP</i>)		
		MBR	CAS	流入水	MBR	CAS
0		36			3.4	
30	19	30	18	2.4	3.2	2.7
45	17	38	28	2.3	3.4	3.1
73	19	29	34	2.4	3.2	3.2
121	10	35	31	2.2	3.3	3.2
192	16	38		2.0	3.5	
267	21	30		2.5	3.1	
333	18	17		2.3	2.7	
416	7	27		1.6	3.1	
499	14	41		2.3	3.5	
626	10	35		2.0	3.3	
701	21	49		2.7	3.6	

表4-4 流入水において特徴的なT-RFのMiCAデータベースに基づいた推定

T-RF (bp)	検出された試料	推定される門	推定される綱
99～100	333日目以外の全試料	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>
			<i>Flavobacteria</i>
			<i>Cytophagia</i>
		<i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>
			δ - <i>Proteobacteria</i>
		<i>Verrucomicrobia</i>	-
201	45日目を除く全試料	<i>Actinobacteria</i>	
		<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>
		<i>Chloroflexi</i>	
204～205	333、626日目を除く全試料	<i>Proteobacteria</i>	β - <i>Proteobacteria</i>
			γ - <i>Proteobacteria</i>
		<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteria</i>
211	192、333、626、701日目を除く全試料	<i>Proteobacteria</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>
223～224	全試料	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>
		<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>
571～573	333、416、626日目を除く全試料	<i>Proteobacteria</i>	β - <i>Proteobacteria</i>
			γ - <i>Proteobacteria</i>
594	45、121、416、701日目を除く全試料	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>
			<i>Negativicutes</i>
		<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>

表 4-5 CAS および立ち上げ初期の MBR 試料において特徴的な T-RF の MiCA データベースに基づいた推定

T-RF (bp)	検出された試料	推定される門	推定される綱
64	0 日目の MBR を除く全試料	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>
		<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>
202～203	45 日目を除く全試料	<i>Proteobacteria</i>	<i>β-Proteobacteria</i>
			<i>γ-Proteobacteria</i>
		<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteria</i>

表 4-6 定常期の MBR 試料において特徴的な T-RF の MiCA データベースに基づいた推定

T-RF (bp)	検出された試料	推定される門	推定される綱
58	626 および 701 日目を除く全試料	<i>Proteobacteria</i>	<i>α-Proteobacteria</i>
			<i>γ-Proteobacteria</i>
202～203	626 日目を除く全試料	<i>Planctomyces</i>	<i>Planctomycetia</i>
		<i>Proteobacteria</i>	<i>β-Proteobacteria</i>
			<i>γ-Proteobacteria</i>
406～407	192-701 日目の全試料	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteria</i>
		<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>

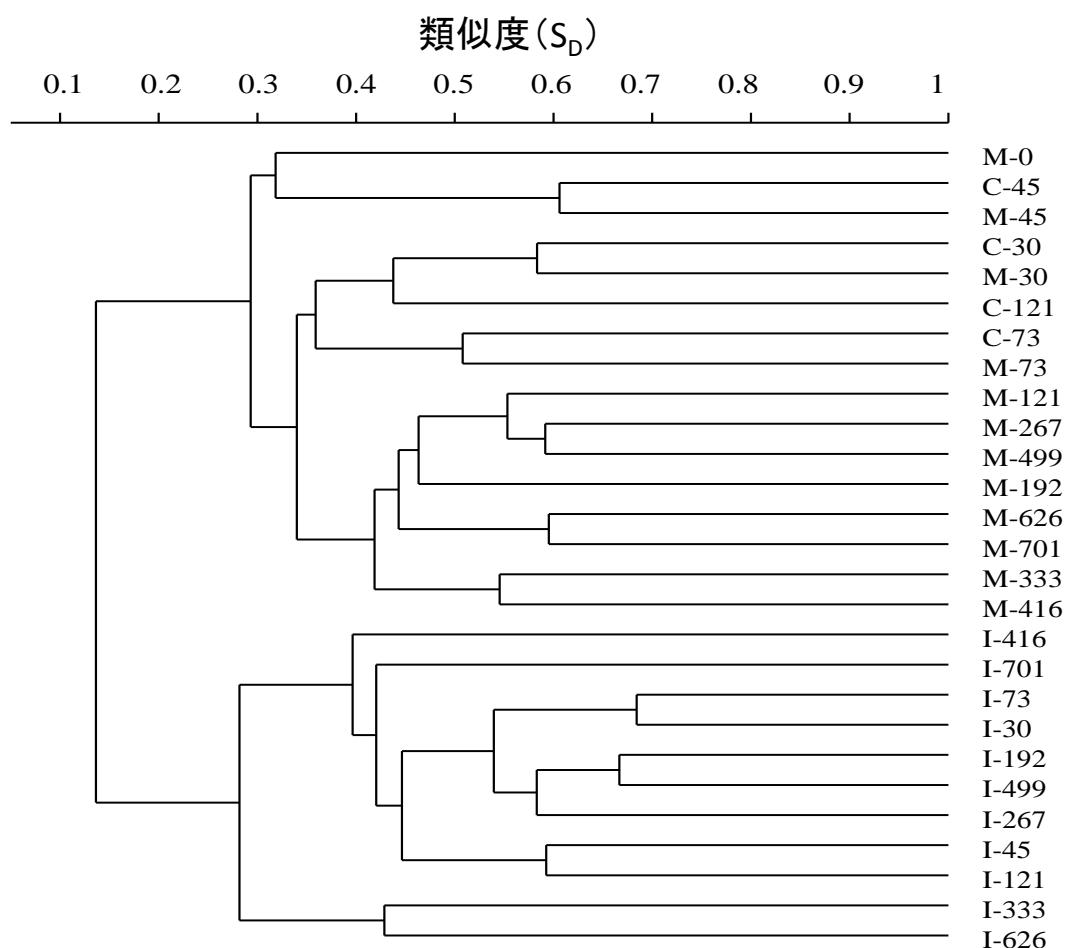


図 4-4 流入水 (I)、MBR (M) および CAS (C) の活性汚泥の T-RFLP 解析に基づくクラスター解析の結果 (ハイフンの後ろの数字は運転日数を示す)

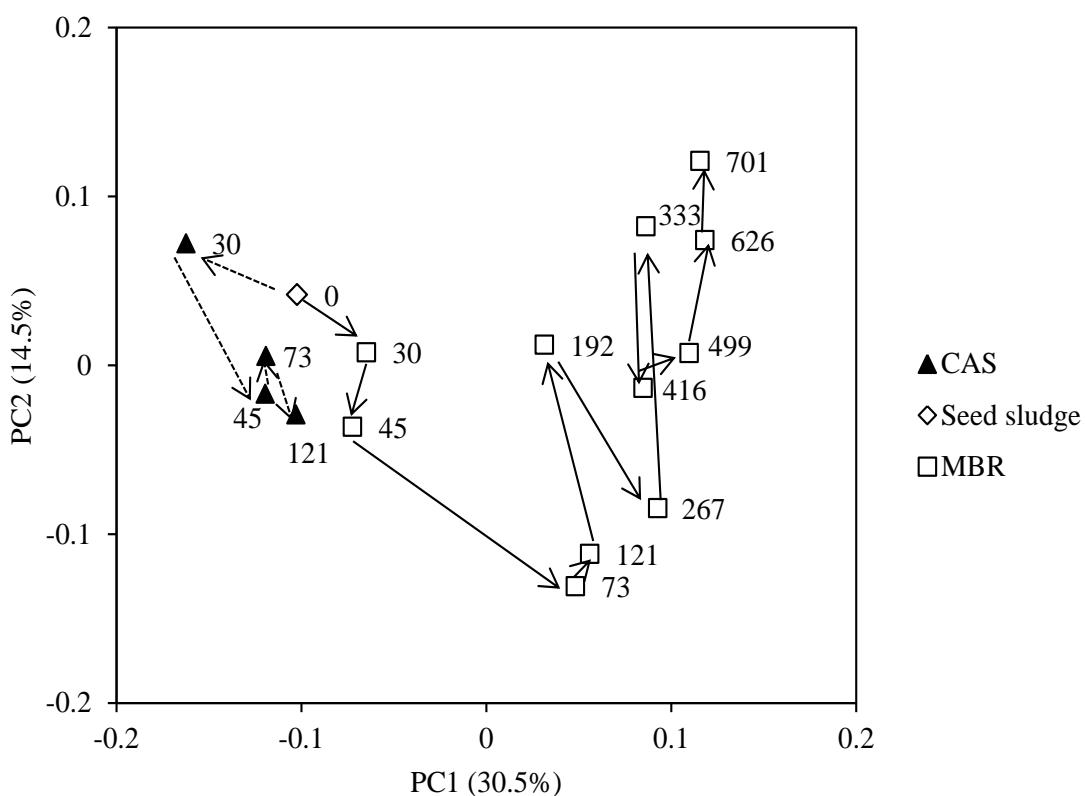


図 4-5 MBR および CAS の活性汚泥に対する T-RFLP 解析結果に基づく PCA
(図中の数字は運転日数を示す)

4.3.3 炭素源資化能の解析

図4-6は、Biolog法による汚泥試料の炭素源資化性試験におけるAWCDの経時変化を示している。MBRとCASの汚泥のAWCDは培養時間と共に増加し、72時間後にはそれぞれ0.44～1.05および0.57～0.99に達し、資化可能な炭素源の数およびH' (Biolog)について CAS、MBR それぞれ 72 時間後に 4.2 および 3.9～4.4 の値を示した(表4-7)。CASにおいてはいずれの試料採取日においても同様のAWCDが示されたが、MBRにおいては試料採取日によって大きく異なる値が示された。特に、121日目については72時間後においてもAWCDが0.44と極めて炭素源資化性が低かった。また、図4-7に、炭素源別に、各試料採取日におけるA₅₉₅値の経時変化を示した。AWCD値と同様に、試料採取日によって、炭素源ごとの資化性も異なっており、AWCD値の極めて低かった121日目の試料については、いずれの炭素源に対しても資化が遅く、資化性も他の試料採取日と比較して低かった。また、333日目および416日目においては三糖類の速やかな資化が観察された。加えて、単糖類および二糖類は、MBRで共通して良好な資化性を示した。一方、多糖類および界面活性剤はサンプリングの時期によってばらついた。カルボン酸、アミノ酸、アルコール、核酸の資化性は高くなかった。

Biologの結果をPCA解析に供し、PC1(寄与率30.8%)およびPC2(寄与率12.1%)の主成分得点を散布図にプロットしたところ(図4-8)、T-RFLP解析の結果とは異なり、いくつかのMBR試料を除くと、MBRとCASの試料は一つのグループにまとまった。MBRとCASの汚泥試料は、細菌群集構造の結果とは異なり、比較的類似した炭素源資化パターンを有しているものと言える。しかし、MBRの121、192日目については、他の試料と離れた位置にプロットされた。ここで、121日目に採取したMBR汚泥は総合的な炭素源資化能の指標であるAWCDが低い値を示していた。また、192日目はDOC除去率が高い日の試料であり、これらの試料は全体的に炭素源の資化性が他の試料とは大きく異なるものと考えられた。

この解析において、PC1はBiolog法で調査した95種類全ての炭素源に対して因子負荷量が<|0.2|と一様に低い値を示し、さらに、PC1とAWCDは非常に高い正の相関($r=0.99$)を示したことから、PC1は特定の炭素源ではなく、総合的な炭素源資化能を示す変数であることが示唆された。一方で、PC2の因子負荷量はD-melibiose(二糖類)、D-raffinose(多糖類)、L-arabinose(单糖類)においてそれぞれ0.42、0.41、0.31と比較的高い値を示し、L-glutamic acid(カルボン酸)では-0.29と低い値を示した。192日目の試料においては、D-melibiose、D-raffinose、L-arabinoseの資化性が低く、一方で、L-glutamic acidの資化能が高かった。

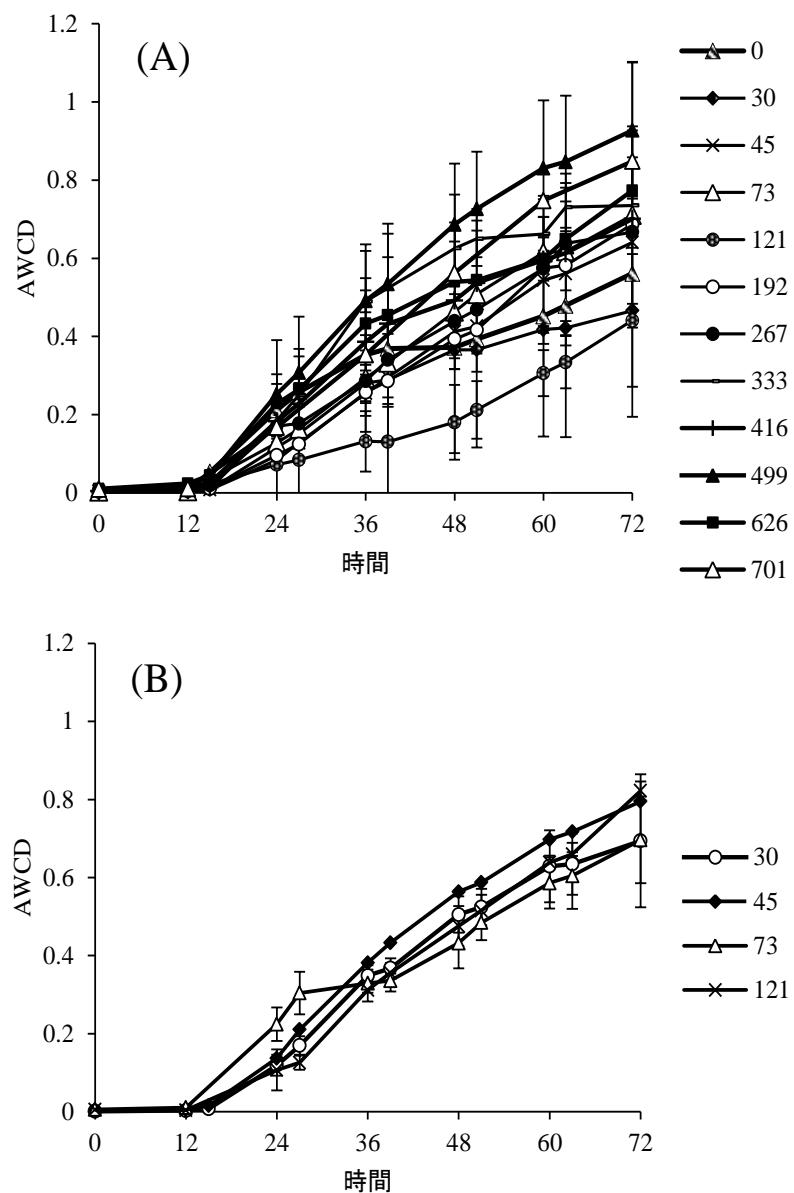


図 4-6 MBR (A) および CAS (B) における AWCD の経時変化（図中の数字は運転日数を示す）

表4-7 Biologの結果に基づく多様性指数

試料採取日	資化可能な炭素源の数			H' (Biolog)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
MBR	0	30	57	69	3.3	3.9
	30	17	55	62	2.7	3.9
	45	17	65	74	2.7	4.0
	73	31	72	74	3.3	4.1
	121	13	35	59	2.5	3.4
	192	19	59	82	2.8	3.9
	267	22	65	76	3.0	4.1
	333	32	77	76	3.4	4.2
	416	27	66	79	3.2	4.1
	499	41	81	84	3.6	4.2
CAS	626	36	74	84	3.4	4.2
	701	26	71	89	3.2	4.1
	30	16	65	72	2.7	4.0
	45	19	74	80	2.9	4.2
	73	54	62	71	3.9	4.0
	121	18	63	76	2.8	4.0

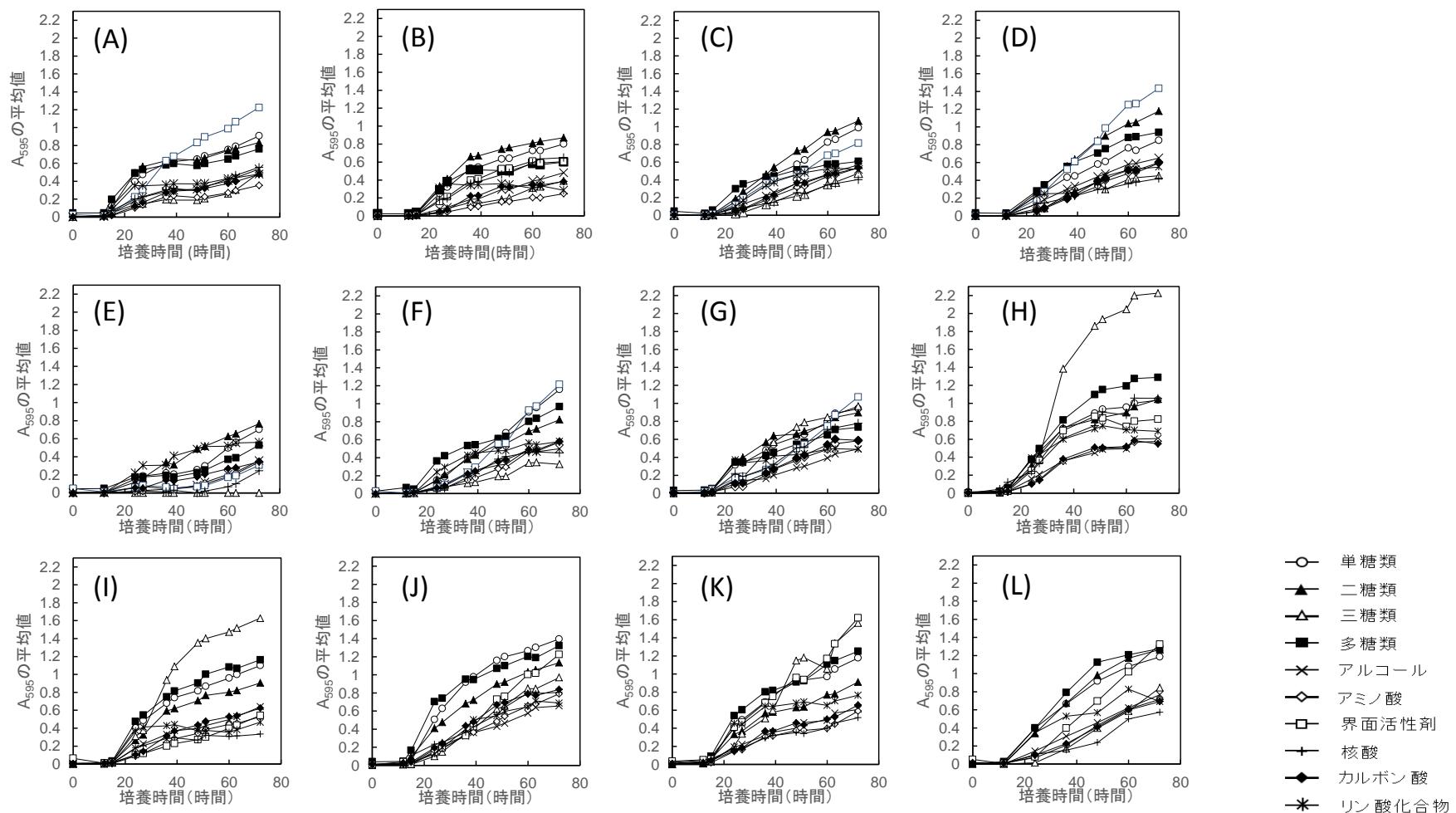


図 4-7 MBR 試料に対する Biolog 法における各炭素源の A_{595} 値の経時変化 (A) 0 日目、(B) 30 日目、(C) 45 日目、(D) 73 日目、(E) 121 日目、(F) 192 日目、(G) 267 日目、(H) 333 日目、(I) 416 日目、(J) 499 日目、(K) 626 日目、(L) 701 日目

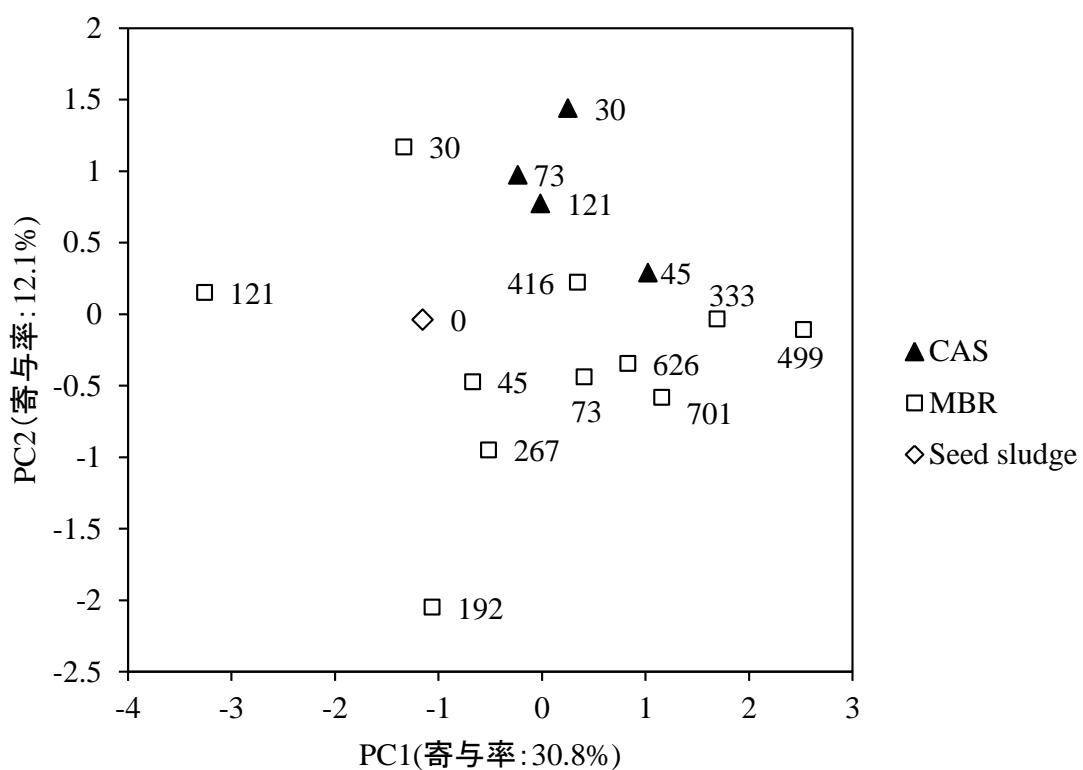


図4-8 48時間培養後におけるMBRおよびCASの活性汚泥の炭素源資化パターンに基づいたPCA結果（図中の数字は運転日数を示す）

4.4 考察

本研究で調査した MBR は CAS と同一の流入水を受け入れ、HRT も同等であったにも関わらず、MBR の廃水処理性能を調査したところ CAS よりも有機物と窒素に対して安定した処理能力を示した（図 4-2）。特に窒素の除去効率は CAS よりも MBR において高かった。MBR の高い T-N 除去率は CAS に無酸素槽が設置されていないのに対して、MBR は硝化液循環型プロセスとして運転されたことを反映している。

また、流入水および MBR と CAS の汚泥の細菌群集構造を調査したところ、流入水と汚泥試料では細菌群集構造が大きく異なっていた（図 4-3、図 4-4）。MBR に流入した下水由来の細菌は膜分離により全てが槽内に留まるものと考えられるが、流入水、MBR および CAS の活性汚泥の細菌群集を比較した結果、実際には流入水の微生物は MBR の好気槽内では優占しておらず、槽内で十分に生育することができないことを示している。このことから、MBR 槽内の細菌群集の構成は、流入水由来の細菌の影響はほとんど受けておらず、主に槽内での各細菌の増殖と死滅のダイナミズムによって決定づけられるものと考えられる。MBR は、MLSS 濃度が 8,000～10,000 mg/L と極めて高かったにもかかわらず、その中で 10～20% もの割合を占める優占細菌が数か月程度で入れ替わっていることが本研究により明らかとなったものといえるが、この遷移が生じる際には、当初の優占細菌が死滅するとともに、別の細菌が急激に増殖し、優占化していくという激しい変化が生じていたものと考えられた。

一連の T-RFLP 解析において、CASにおいては 202～203 bp の T-RF が優占することが共通した特徴であったが、この T-RF は第 2 章においても述べたように、様々な CAS の活性汚泥中に 16～20% の高い相対存在量で検出されている。また、CAS の細菌群集構造は、その運転条件や環境条件が変化しても時期によらず安定しているという結果が得られた。対照的に MBR では、立上げ期を除いて 202～203 bp の T-RF は相対存在量が 10% 以下であり、499 日目以降には 406～407 bp の T-RF が最も優占した。この 406～407 bp の T-RF は *Firmicutes* によるものと推定されている。活性汚泥試料においては *Proteobacteria* が 36～65% と最も優占しており (Zhang et al., 2012; Wells et al., 2011; Xia et al., 2010)、*Firmicutes* の存在割合は 1.4～18% で、MBR においても同様の割合であったことが報告されている (Zhang et al., 2012; Xia et al., 2010) が、本研究においては定常期以降の MBR では *Firmicutes* が最も優占することが明らかとなった。MBR の細菌群集構造の変遷は、MLSS 濃度や廃水処理成績から定常期と判断された 73 日目以後 20 ヶ月以上経過しても継続していた。MBR は CAS 由来の種汚泥を使用したにも関わらず、時間と共に CAS とは異なる細菌群集構造を形成することが明らかとなった。この変化は、SRT、有機物負荷量、DO 濃度などの運転条件が大きく異なるため、元々 CAS の環境に適応していた微生物群集が、MBR の環境において淘汰され、逆に新たな環境に適応した細菌群集が増殖することにより、生じたものと考えられた。

こうした細菌群集の大きな変化は、処理性能へも影響を及ぼすことが考えられたため、細菌群集構造の変化と運転条件や廃水処理成績の関係を調査したところ、T-RFLP 解析結果

の PCA における PC1 は、MLSS 濃度と強い相関を示し、また窒素除去とも相関を示した。ここで、MBR の汚泥は CAS に比べて高値の PC1 で特徴づけられており、MLSS 濃度が高く、硝化や脱窒に関わる細菌の量が多かったことにより、高い窒素除去性能に結びついたとも考えられるが、MBR においては CAS に比べて窒素除去に優れた微生物が選択されていた可能性もある。実規模の MBR のスタートアップに際し、硝化菌の変遷を調査した Yu ら (2011) の調査においても、スタートアップ直後には、CAS 汚泥からしばしば検出される *Nitrosomonas* sp. の類縁種が優占しており、その存在比率は全細菌の 2% 程度であったが、MLSS 濃度が増加し定常運転状態となった約 100 日後には、その比率は 4.5% 程度にまで向上したことが報告されている。この過程において、*Nitrosomonas* sp. の多様性が増加し、当初には検出されていなかった *Nitrosomonas oligotropha* や *Nitrosomonas ureae* の近縁種が確認されたが、これらは低濃度での窒素除去に寄与することが知られている。本研究では窒素除去に関連する細菌に着目した調査は行っていないが、本処理場でも MLSS 濃度の増加とともに、硝化や脱窒に関わる細菌が増加し、あるいは多様化することによって良好な窒素除去が達成された可能性も考えられる。

また、Biolog 法による炭素源資化性試験において、AWCD 値は、CAS はいずれの試料も同様であったのに対し、MBR は試料採取日によって大きく異なった (図 4-6)。また、ほとんどの MBR と CAS では、細菌群集構造が異なっているにも関わらず、比較的類似した炭素源資化パターンを有していることが明らかとなった (図 4-8)。この原因としては、細菌の機能の冗長性が挙げられる。すなわち、第 3 章の図 3-7 でも示されているように、ある炭素源の資化能は特定の細菌のみが保有しているのではなく、複数の細菌が同様の機能を保持しているため、細菌群集構造が変化して特定の機能を持つ細菌が減少してしまっても、同様の機能を有する別の細菌が存在することによって機能が保証されたとする解釈である。また、時期によって、一部の MBR 試料は CAS や他の MBR とは大きく異なる資化パターンを示すことが明らかとなり、MBR では炭素源資化能も変化しやすい可能性が示唆された。ただし、単位汚泥当たりの炭素源資化能の指標である AWCD 値が最も低下した試料採取日においても廃水処理性能への影響は確認されず、このことは、MBR の MLSS 濃度が高く維持されていたために、汚泥全体としての排水処理性能には影響を及ぼさなかつたものと考えられた。

本研究を除くと、MBR の細菌群集の全体像を調べた報告は、現状では Wan ら (2011) が中国にて行った調査が唯一と言ってもよい。この研究では、併行して同じ下水の処理を行っている CAS と MBR が 13 ヶ月間に亘り比較されている。この調査では、細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 解析により、同じ組成の下水を処理していても、MBR と CAS では大きく異なる細菌群集が形成されていること、および CAS の優占細菌の方が多様であり、環境や操作条件に応じて変化しやすい一方、MBR の細菌群集構造は安定であることが示されている。同様の傾向は、パイロット規模のリン除去プロセスにおいて、MBR と CAS の細菌群集を比較した研究でも報告されて

いる (Falk *et al.*, 2009)。一方、パイロット規模の実験装置で CAS と MBR の細菌群集を比較した Miura ら (2007) は、MBR でより多様な細菌群集構造が形成されており、ダイナミックに変動することで、下水の組成の変化や環境条件にも対応した高度な処理性能を維持する“柔軟性”を有しているという、対照的な結果を報告している。また、パイロット規模の MBR リアクターにおいて運転条件が変わった際の細菌群集構造と水質の関係を調査した Molina-Muñoz ら (2009) も、細菌群集構造や汚泥の無機化の度合いはその時々の運転条件に著しく影響を受けるものの、そうした違いは MBR の廃水処理性能には影響を与えていないことを示した。このことは、細菌群集構造が”柔軟性”を有していることと、”柔軟性”が環境の変化への適応と、MBR の処理性能の安定性に重要な役割を果たしていることを示している。Wan ら (2011) の調査でも、脱窒炭素源を酢酸から酪酸に切り変えた後、MBR の細菌群集構造は大きく変化したと報告していることから、やはり MBR の細菌群集にはある種の柔軟性が存在しているものと考えられる。本研究においても、MBRにおいては、運転が安定しても細菌群集構造が変遷を続けるとともに、炭素源資化能に変化が生じたことから、MBR の細菌群集の柔軟性があらためて示されたものと言え、Miura ら (2007) の報告を支持するものとなった。

4.5 要約

新規に立ち上げられた実規模の MBRにおいて、細菌群集を 2 年間に亘って調査した。併行して同じ下水の処理を行っている CASとの比較も行った。MBR は CASよりも、有機物や窒素の処理に対して高い能力を有していた。また、T-RFLP 解析の結果から、MBR では CAS とは大きく異なる細菌群集構造が形成されており、運転が安定してからも 20 ヶ月以上に亘って大きく変化し続けることが明らかになった。一方、MBR の炭素源資化能は CAS のものと概ね類似していたものの、時期によって変化しやすいことが示された。これらのことより、第 2 章と同様に、MBR の細菌群集は系統学的構造および代謝活性に関して、ある種の”柔軟性”を有することが改めて示唆された。

総括並びに結論

下水や産業排水の処理に広く用いられている生物学的廃水処理法の廃水処理性能は、微生物の代謝能や微生物間の相互作用に大きく依存しており、中でも細菌が重要な役割を担っている。これまででは、運転条件やデザインの最適化によって、BOD や SS の除去のみならず、窒素、リン、難分解性物質等の除去を行ってきた。しかし、活性汚泥法は、汚泥の沈降性の悪化や、主要な細菌群集の不活化や死滅による処理性能の悪化のような問題を未だに抱えている。こうした問題の解決や、処理性能向上、運転の効率化のための戦略を立案するには、細菌群集のモニタリングや理解が必要である。特に、実規模の条件下における微生物の動態を知るために、実規模の処理施設において更なる調査を行うことが必要である。

本研究では、処理プロセス、季節性、運転条件等の環境因子が活性汚泥細菌群集へ与える影響を調査するとともに、活性汚泥細菌群集と廃水処理機能の関係を明らかとすることを目的とし、各種の活性汚泥について微生物群集構造ならびに炭素源資化能の観点から明らかにした。

第 1 章では、第 2 章～第 4 章に共通する、水質分析方法、微生物群集構造解析手法、炭素源資化能の解析手法、また、それらの統計解析方法について記載した。

第 2 章では、従来型の、沈澱池により固液分離を行う複数の活性汚泥法と、MBR の細菌群集構造と有機物代謝能の比較を行うため、T-RFLP 法および Biolog 法により解析を行った。

MBR の優占細菌の構成は従来型の活性汚泥法とは大きく異なっていた。さらに優占細菌は MBR 間でも異なっていた。しかしながら、炭素源資化プロファイルにおいては、MBR の大多数が従来型の活性汚泥法と類似していた。いくつかの MBR 試料は、他の試料とは著しく異なる特殊な炭素源資化プロファイルを示した。MBR の微生物群集構造の多様性と炭素源資化ポテンシャルの高さは MBR の微生物群集が柔軟性を持つことを示唆している。MBR の廃水処理性能の高さに加えて、MBR の多様で柔軟な微生物群集を適切に制御することができれば、新しい機能を保持可能な、より有望なシステムとなることが予想できる。

第 3 章では、CAS として運転されている実規模の下水処理場において 10 ヶ月間に亘って細菌の系統学的構造と有機物質の代謝能を調べることで、細菌群集の挙動を調査した。

流入水の細菌群集構造は季節変化に対して概ね安定していた。また、処理水中の細菌群集構造は季節によって異なっており、おそらく活性汚泥細菌群集の沈降性に依存しているものと考えられた。処理水中の細菌群集構造の季節変化、特に処理水に特徴的ないいくつかの優占細菌は活性汚泥の沈降性や廃水処理性能の推測に役立つ可能性がある。活性汚泥細菌群集構造は運転条件や流入水組成の変化に伴って僅かに変化したものの、季節によらず概ね安定していた。また、活性汚泥の細菌群集構造は流入水のそれとは全く異なっていた

ことから、下水処理場の活性汚泥槽の細菌群集に対して流入水中の細菌群集が与える影響は無視できるほどのものであることが示唆された。T-RFLP 解析によって検出された全体の細菌群集構造にほとんど影響を与えないようなマイナーな細菌群集が活性汚泥による炭素源の資化性に大きく貢献していた。マイナーな細菌群集に少なくとも一部起因する機能的な冗長性は、活性汚泥細菌群集構造の時間的な変動とは別に、同程度の有機物分解能力を維持した活性汚泥の形成に貢献していると考えられる。

第 4 章では、新規に立ち上げられた実規模の MBR において、細菌群集を 2 年間に亘って調査した。併行して同じ下水の処理を行っている CAS との比較も行った。

MBR は CAS よりも、有機物や窒素の処理に対して高い能力を有していた。また、T-RFLP 解析の結果から、MBR では CAS とは大きく異なる細菌群集構造が形成されており、運転が安定してからも 20 ヶ月以上に亘って大きく変化し続けることが明らかになった。一方、MBR の炭素源資化能は CAS のものと概ね類似していたものの、時期によって変化しやすいことが示された。これらのことより、第 2 章と同様に、MBR の細菌群集は系統学的構造および代謝活性に関して、ある種の"柔軟性"を有することが改めて示唆された。

以上のように、本研究では、実規模の MBR および CAS の下水処理場における運転状況ならびに微生物群集の系統学的な構造と炭素源資化能を調査し、MBR および CAS における微生物の挙動や MBR と CAS の微生物群集の差異について重要な知見を得ることができた。CAS では、最終沈殿池によって沈降性の高い細菌が選択され、曝気槽内に蓄積されることで安定した細菌群集構造が形成されていることが示唆され、最終沈殿池の強い選択圧のせいで運転条件などの外部操作によって細菌群集構造を意のままに操作することは困難であることが考えられた。このことから、CAS において、活性汚泥細菌群集の浄化機能向上を図るうえでは、有用な能力を有する外来細菌を導入したり、それらの細菌が曝気槽内で優占化できるような環境条件の維持を行うといった戦略よりも、普遍的に優占している 202 ~203 bp の T-RFs で示される細菌自体を遺伝子操作等の方法で機能増強させる戦略の方が有効であるとも考えられた。

一方、沈殿池による選択圧の働くかない MBR においては、細菌群集は柔軟性を有しており、運転条件の操作により、部分的に細菌群集を制御できる可能性が示唆されたことは大変興味深いことと言える。本研究では、微生物群集の系統学的な構造に影響を及ぼす因子の特定には至っていないが、さらに研究を進め、特定の細菌群集構造を MBR で安定的に維持する要因を特定することができれば、MBR において特殊な代謝能等の新しい機能を持つ細菌を高濃度に保持可能な、より有用なシステムを構築できる可能性がある。

また、本研究で用いた T-RFLP 解析では、同じ長さの T-RF を生成する微生物種が複数存在し、解析条件によっては T-RF の断片長が理論値とのずれを生じる可能性もあることから、各下水処理場に特徴的な微生物を種レベルで特定するには至らなかった。クローニング解

析など、他の解析手法の併用によってこの微生物を特定し、生理特性を把握することにより、さらに有用な知見につながるものと考えられる。このような研究が更に進み、特定の有用機能を有する微生物や、障害を引き起こす微生物の挙動を、処理の運転操作や処理性能と明確に関連付けることができるようになれば、活性汚泥の機能を飛躍的に高めることのできる新たなデザインや論理的な操作指針の構築につながるものと考えられる。

参考文献

- Al-Mutairi, N.Z. (2007) Functional biodiversity of microbial communities in aerobic selector slaughterhouse wastewater. *Water Environ. Res.* 79, 660–666.
- Al-Mutairi, N.Z. (2009) Variable distributional characteristics of substrate utilization patterns in activated sludge plants in Kuwait. *Bioresour. Technol.* 100, 1524–1532.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Blackwood, C.B., Hudleston, D., Zak, D.R. and Buyer, J.S. (2007) Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5276–5283.
- Chiemchaisri, C., Wong, Y.K., Urase, T. and Yamamoto, K. (1992) Organic stabilization and nitrogen removal in membrane separation bioreactor for domestic wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 25, 231–240.
- Cicek, N., Macomber, J., Davel, J., Suidan, M.T., Audic, J. and Genestet, P. (2001) Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bioreactor. *Water Sci. Technol.* 43, 43–50.
- Cui, D., Li, A., Zhang, S., Pang, C., Yang, J., Guo, J., Ma, F., Wang, J. and Ren, N. (2012) Microbial community analysis of three municipal wastewater treatment plants in winter and spring using culture-dependent and culture-independent methods. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2341–2353.
- de los Reyes, F.L. and Raskin, L. (2002) The role of filaments in activated sludge foaming relationship of mycolata levels to foaming initiation and stability. *Water Res.* 36, 445–459.
- Falk, M.W., Song, K-G., Matiasek, M.G. and Wuertz, S. (2009) Microbial community dynamics in replicate membrane bioreactors – Natural reproducible fluctuations, *Water Res.* 43, 842–852.
- Garland, J.L. and Mills, A.L. (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359.
- Gilbride, K.A., Frigon, D., Gesnik, A., Gawat, J. and Fulthorpe, R.R. (2006) Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community. *Water Res.* 40, 775–787.
- Graham, D.W. and Smith, V.H. (2004) Designed ecosystem services: application of ecological principles in wastewater treatment engineering. *Front. Ecol. Environ.* 2,

- 199–206.
- Guo, J-H., Peng, Y-Z., Peng, C-Y., Wang, S-Y., Chen, Y., Huang, H-J. and Sun, Z-R. (2010) Energy saving achieved by limited filamentous bulking sludge under low dissolved oxygen, *Bioresour. Technol.* 101, 1120–1126.
- Hall, E.R., Monti, A. and Mohn, W.W. (2010) A comparison of bacterial populations in enhanced biological phosphorus removal processes using membrane filtration or gravity sedimentation for solids-liquid separation, *Water Res.* 44, 2703–2714.
- Hammer, Ø. and Harper, D.A.T. (2011) PAST, Version 2.1.0, <http://folk.uio.no/ohammer/past/> (2013年7月時点).
- Jenkins, D. (2008) From total suspended solids to molecular biology tools- a personal view of biological wastewater treatment process population dynamics. *Water Environ. Res.* 80, 677–687.
- Jones, P.A. and Schuler, A.J. (2010) Seasonal variability of biomass density and activated sludge settleability in full-scale wastewater treatment systems. *Chem. Eng. J.* 164, 16–22.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A. and Wagner, M. (2002) The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 84–99.
- Kitts, C.L. (2001) Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2, 17–25.
- Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 485–529.
- Lauber, C.L., Zhou, N., Gordon, J.I., Knight, R. and Fierer, N. (2010) Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 307, 80–86.
- Langenbach, K., Kuschk, P., Horn, H. and Kästner, M. (2009) Slow sand filtration of secondary clarifier effluent for wastewater reuse. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5896–5901.
- Lei, F., Yin, Y., Wang, Y., Deng, B., Yu, H.D., Li, L., Xlang, C., Wang, S., Zhu, B. and Wang, X. (2012) Higher-level production of volatile fatty acids in vitro by chicken gut microbiotas than by human gut microbiotas as determined by functional analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5763–5772.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of

- genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522.
- Marsh, T.L., Saxman, P., Cole, J. and Tiedje, J. (2000) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3616–3620.
- Martins, A.M.P., Pagilla, K., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Res.* 38, 793–817.
- McLellan, S.L., Huse, S.M., Mueller-Spitz, S.R., Andreishcheva, E.N. and Sogin, M.L. (2010) Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ. Microbiol.* 12, 378–392.
- Miura, Y., Hiraiwa, M.N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, W. and Okabe, S. (2007) Bacterial community structure in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. *Water Res.* 41, 627–637.
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J.M., Sánchez-Peinado, M., Hontoria, E., González-López, J. and Rodelas, B. (2009) Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. *Sci. Tot. Environ.* 407, 3994–4003.
- Muller, E.B., Stouthamer, A.H., Verseveld, H.W. and Eikelboom, D.H. (1995) Aerobic domestic waste water treatment in a pilot plant with complete sludge retention by cross-flow filtration. *Water Res.* 29, 1179–1189.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B. and Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2, 39–50.
- Pike, E.B., Carrington, E.G. and Ashburner, P.A. (1972) An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge. *J. Appl. Bacteriol.* 35, 309–321.
- Rosenberger, S., Laabs, C., Lesjean, B., Gniress, R., Amy, G., Jekel, M. and Schrotter, J-C. (2006) Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment, *Water Res.* 40, 710–720.
- Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Danielsson-Tham, M.L. and Albihn, A. (2004) Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* 38, 1989–1994.
- Saikaly P.E., Stroot, P.G., Oerther, D.B. (2005) Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5814–5822.
- Seviour, R., Nielsen, P.H. (2010) Microbial ecology of activated sludge. London: IWA

- Publishing Company. 688.
- Shyu, C., Soule, T., Bent, S.J., Foster, J.A. and Forney, L.J. (2007) MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microb. Ecol.* 53, 562–570.
- Silva, A.F., Carvalho, G., Oehmen, A., Lousada-Ferreira, M., van Nieuwenhuijzen, A., Reis, M.A. and Crespo, M.T. (2012) Microbial population analysis of nutrient removal-related organisms in membrane bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2171–2180.
- Smith, N.R., Yu, Z. and Mohn, W.W. (2003) Stability of the bacterial community in a pulp mill effluent treatment system during normal operation and a system shutdown. *Water Res.* 37, 4873–4884.
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1997) Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884–2896.
- van der Gast, C.J., Jefferson, B., Reid, E., Robinson, T., Bailey, M.J., Judd, S.J. and Thompson, I.P. (2006) Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. *Environ. Microbiol.* 8, 1048–1055.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. and Daims, H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 665–680.
- Wan, C.Y., De Wever, H., Diels, L., Thoeye, C., Liang, J.B. and Huang, L.N. (2011) Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Res.* 45, 1129–1138.
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X. and Ding, K. (2012) Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7042–7047.
- Wang, X., Wen, X., Yan, H., Ding, K., Zhao, F. and Hu, M. (2011) Bacterial community dynamics in a functionally stable pilot-scale wastewater treatment plant. *Bioresour. Technol.* 102, 2352–2357.
- Wells, G.F., Park, H.-D., Eggleston, B., Francis, C.A. and Criddle, C.S. (2011) Fine-scale bacterial community dynamics and the taxa-time relationship within a full-scale activated sludge bioreactor. *Water Res.* 45, 5476–5488.9
- Wen, Q., Tutuka, C., Keegan, A. and Jin B. (2009) Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants. *J. Environ. Manage.* 90, 1442–1447.

- Witzig R., Manz W., Rosenberger S., Kruger U., Kraume M. and Szewzyk U. (2002) Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Res.* 36, 394–402.
- Wong, M.-T., Mino, T., Seviour, R.J., Onuki, M. and Liu, W.-T. (2005) In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorus removal plants in Japan. *Water Res.* 39, 2901–2914.
- Yang, C., Zhang, W., Liu, R., Li, Q., Li, B., Wang, S., Song, C., Qiao, C. and Mulchandani, A. (2011) Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7408–7415.
- Yang W., Cicek N. and Ilg J. (2006) State-of-the-art of membrane bioreactors: Worldwide research and commercial applications in North America. *J. Membrane Sci.* 270, 201–211.
- Yi, T., Lee, E.H., Kang, S., Shin, J. and Cho, K.S. (2012) Structure and dynamics of microbial community in full-scale activated sludge reactors. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 19–25.
- Yu, Z. and Mohn, W. (2001) Bioaugmentation with resin-acid-degrading bacteria enhances resin acid removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents. *Water Res.* 35, 883–890.
- Yu T., Li D., Qi R., Li S., Xu S. W. and Yang M. (2011) Structure and dynamics of nitrifier populations in full-scale submerged membrane bioreactor during start-up. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 369–376.
- Zhang, T., Shao, M.-F. and Ye, L. (2012) 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* 6, 1137–1147.
- 橋本敏一, 三品文雄, 小倉智, 高岡一栄, 松本公寿, 今岡睦明. (2004) T-RFLP 法を用いた活性汚泥の微生物群集構造解析. 下水道研究発表会講演集. 41, 1164–1166.
- 山本和夫監修. (2010) MBR(膜分離活性汚泥法)による水活用技術. サイエンス & テクノロジー. 259–260.
- 公益社団法人日本下水道協会. (2012) 下水試験方法上巻-2012 年版-.

補遺 活性汚泥細菌の保有するプラスミドの検索とその特徴づけ

5.1 はじめに

活性汚泥法における有機物除去過程では細菌が主要な役割を果たしており、排水処理の性能は、基本的には構成細菌の遺伝学的なポテンシャルに依存するものといえるが、その詳細については十分に理解されていない。

細菌の遺伝情報は、染色体上だけでなく、染色体外遺伝子であるプラスミド上にも存在する。性繊毛の形成や可動能をコードする接合プラスミドは、自身が他の細菌へと接合伝達されるだけでなく、受容菌に共存する可動性プラスミドをも伝達可能である。プラスミド上には、抗生物質や重金属への耐性や難分解性物質分解等特殊環境下での生存に関わる遺伝子が保持されていることも知られており (Top *et al.*, 2002; Bahl *et al.*, 2009)、環境の変化に対する適応性を宿主に与える働きを有している。また、染色体やトランスポゾンとの間で相同組換えを起こし、生物の進化にも重要な役割を果たしているとされている (Top *et al.*, 2002)。従って、活性汚泥細菌の保有するプラスミドは、活性汚泥の処理機能に大きな影響を与えていた可能性がある。例えば、重金属耐性や難分解性物質の分解能等をコードするプラスミド (Don & Pemberton, 1981) は、下水処理において細菌に特殊な機能を付与し、浄化上有用な役割を果たしている可能性もある。ところが、活性汚泥内の細菌が保有するプラスミドの分布や挙動については未だ不明な点が多い。現状では、産業廃水 (Trevors, 1987) や都市下水 (Fujita *et al.*, 1993; Bauda *et al.* 1995) を処理する活性汚泥中のプラスミドの検索が行われている他、下水処理場における R-プラスミドの抗生物質耐性遺伝子伝播への寄与 (Mach & Grimes, 1982) や、活性汚泥からの不和合性群 (Inc) P に属する接合プラスミドの単離が報告されている程度である (Top *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 2007)。従って、活性汚泥細菌の有するプラスミドに関しては、さらに研究を進められることが求められている。

本研究では、都市下水を処理する活性汚泥中のプラスミド保持細菌を検索した。都市下水は産業排水と異なり、通常、抗生物質や重金属等が強い選択圧となっていない環境である。しかし、検索の確実性を高めるため、その選択の指標には、抗生物質および重金属への耐性を用いた。まず、抗生物質であるストレプトマイシン (Sm)、アンピシリン (Ap)、クロラムフェニコール (Cm)、テトラサイクリン (Tc)、重金属として、概して毒性が強く、排出基準が設定されている、水銀 (Hg)、ヒ素 (As)、セレン (Se)、鉛 (Pb)、カドミウム (Cd) の耐性細菌を活性汚泥より単離し、これらの耐性細菌よりプラスミドを検索した。検索されたプラスミドのサイズや本数の分布の調査を行うとともに、その不和合性や機能の一部を調べ、特徴の一端を明らかにした。

5.2 実験方法

5.2.1 細菌の単離および計数

2009年7月に大阪府下のM下水処理場から活性汚泥を採取した。M下水処理場は、ステップエアレーション処理を採用しており、平均処理水量は50,000 m³/日である。活性汚泥

は 50 mM リン酸カリウム緩衝液で 2 回洗浄後、5 mg/L トリポリリン酸ナトリウム水溶液に懸濁し MLSS=2,000 mg/L とした。汚泥懸濁液は、超音波破碎機 UD-201 ((株)トミー精工) により OUTPUT 4、DUTY 50 の条件で氷冷下にて 2.5 分間分散処理を行った。この試料を段階希釈し、寒天培地に 3 枚ずつ塗抹培養 (28°C、7 日間、暗所) した。従属栄養細菌の計数には、R2A 寒天培地 (メルク (株)) を使用した。抗生物質耐性細菌と重金属耐性細菌の計数と単離には、R2A 寒天培地に選択圧として、抗生物質の Sm、Ap、Cm、Tc を 20、100、30、40 mg/L、および重金属として、HgCl₂、Na₂AsO₃、Na₂SeO₄、Pb(NO₃)₂、CdCl₂ 2.5H₂O を 5、144、189、331、233 mg/L でそれぞれ添加して用いた。これらの濃度は、既往研究 (Fujita *et al.*, 1993; Stepanauskas *et al.*, 2005) の濃度範囲と同程度に設定した。平板 1 枚当たり 20~200 個のコロニーが出現した希釈段階の平板について、生菌数を計数した。

また、抗生物質および重金属耐性細菌の計数に用いた各平板培地に出現した全コロニーを新たな培地にレプリカし、耐性を確認したものをプラスミド検索の対象とした。また、できる限り多様な細菌を分離するため、それらとは形状の異なるコロニーも他の希釈段階の培地から釣菌した。

5.2.2 プラスミドの検索およびサイズの調査

先に単離した各コロニーを、抗生物質あるいは重金属を適宜添加した 10 倍濃度の R2A 液体培地で 2~7 日間、28°C にて振盪培養し、増殖が見られたものから、Birnboim & Doly 法 (Birnboim & Doly, 1979) の修正法により、プラスミド抽出を行った。抽出したサンプルは 0.6% (w/v) UltraPure Agarose (Invitrogen) を 1×TAE (Tris 40mM, 酢酸 40mM, エチレンジアミン四酢酸 1mM (pH=8.0)) に溶解して作製した 0.6% (w/v) ゲルにより 100V にて 20 分間電気泳動を行った後、エチジウムプロマイド染色を行い、紫外線照射により可視化した。また、直鎖状 DNA である λ HindIII 断片のラダーと、閉環状プラスミド DNA である RP4 (56.4 kb) (Datta *et al.*, 1971)、pKT230 (11.9 kb) (Bagdasarian *et al.*, 1981)、pUC19 (2.7 kb) (Yannisch-Perron *et al.*, 1985) の泳動距離の相関を別途求めておき、試験したプラスミドの泳動距離を λ HindIII 断片ラダーとの比較から直鎖状 DNA サイズで便宜的に表現した後、閉環状プラスミドのサイズに換算した。

5.2.3 Tc 耐性遺伝子および Hg 耐性遺伝子の検出

Tc の耐性機構は、Tc の細胞外への汲み出し、リボソームの保護、および Tc 不活化酵素の产生の大きく 3 つに分けられる。それぞれの代表となる遺伝子として *tetA*、*tetM*、*tetX* をターゲットとし、Ng ら (2001) の方法により、Tc 耐性細菌から得られた粗プラスミド抽出液に対して PCR 増幅を行い、Tc 耐性遺伝子がプラスミド上にコードされているか否かの確認を行った。また、Hg 耐性細菌のプラスミドに対しては、Liebert ら (1997) の方法に従い、Hg リダクターゼをコードする *merA* 遺伝子を対象とした PCR 増幅を行い、同様にその存在を確認した。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR 産物の大きさは 100 bp DNA

Ladder (タカラバイオ (株)) との比較により推定した。

5.2.4 IncP-1 および IncQ プラスミドの検索

プラスミド保持細菌から得られた粗プラスミド抽出液に対してIncP-1プラスミドの複製制御遺伝子 $trfA$ をターゲットとしたPCR増幅 (Bahl *et al.*, 2009) を行った。IncP-1は自己伝達性を有する広宿主域のプラスミド群であり、抗生物質や重金属耐性、農薬等の人工化学物質分解能等が頻繁に見つかっている (Top *et al.*, 2000)。同様にIncQプラスミドの複製起源となる遺伝子 $oriV$ (Götz *et al.*, 1996) の有無も試験した。IncQは自己伝達性を有していないが可動性を持つ広宿主域のプラスミド群として知られている。PCR産物は1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行った。IncP-1プラスミドでは281 bp、IncQプラスミドでは436 bpの特異的な増幅DNA断片長が予想され、ポジティブコントロールとしてそれぞれRP4およびpKT230を使用した。

5.2.5 複数のプラスミドを有する活性汚泥細菌の特徴づけ

プラスミドを複数持つグラム陰性細菌およびグラム陽性細菌を選定し、16S rDNA 塩基配列に基づく同定を行った。各細菌株から、プロテアーゼ K 法 (Sei *et al.*, 2000) または ISOIL for Beads Beating ((株)ニッポンジーン) を用いて全 DNA を抽出し、プライマー27F、1392R (Amann *et al.*, 1995) を用いて 16S rDNA を増幅した。PCR 産物は、タカラバイオ (株) に委託し塩基配列を決定した。得られた 16S rDNA 塩基配列に対し BLAST プログラムを用いて GenBank 上に登録されている塩基配列との相同性を検索した。また、近縁種の典型株の塩基配列を GenBank から取得し、CLUSTAL W (Eddy, 1995) による多重配列解析を行った。本研究で決定された 16S rDNA 塩基配列は Accession Number AB639115～AB639119 として DDBJ/EMBL/GenBank に登録した。

5.3 結果

5.3.1 活性汚泥中の従属栄養細菌数および抗生物質・重金属耐性細菌数

表 5-1 に示した通り、活性汚泥中の従属栄養細菌数は 5.3×10^8 CFU/mL と計数されたのに対して、抗生物質・重金属耐性細菌は $10^4 \sim 10^8$ CFU/mL のオーダーで検出された。ほとんどの耐性細菌は従属栄養細菌数の 0.65～7.8% の範囲で検出され、類似の存在割合を示したが、Tc 耐性細菌は、0.0069% と極めて低い存在率であった。一方、Se 耐性細菌は従属栄養細菌の 28% と相当高い割合で存在していることが明らかとなった。

5.3.2 活性汚泥細菌からのプラスミド検索

表 5-2 に示した通り、分離した 418 コロニーのうち、液体培地で培養可能であった 389 株をプラスミドの検索対象とした。一部の細菌コロニーから、プラスミドを示す明確なバンドが示され、これをプラスミド保持株とした。ここで検索されたプラスミド保持株数と、

表 5-1 抗生物質および重金属耐性細菌数および割合

	生菌数 (CFU/mL) *	従属栄養細菌に対する割合 (%)
従属栄養細菌数	(5.3±1.5) ×10 ⁸ (n=2)	100
Sm 耐性細菌	(8.4±2.5) ×10 ⁶ (n=3)	1.6
Ap 耐性細菌	(3.5±0.5) ×10 ⁶ (n=2)	0.65
Cm 耐性細菌	4.2×10 ⁷ (n=1)	7.8
Tc 耐性細菌	(3.7±0.2) ×10 ⁴ (n=2)	0.0069
Hg 耐性細菌	(3.0±1.1) ×10 ⁷ (n=3)	5.7
As 耐性細菌	(1.7±0.1) ×10 ⁶ (n=2)	3.1
Se 耐性細菌	(1.5±0.4) ×10 ⁸ (n=3)	28
Pb 耐性細菌	(3.7±2.6) ×10 ⁷ (n=6)	7.0
Cd 耐性細菌	(2.8±0.1) ×10 ⁷ (n=3)	5.2

*平均±標準偏差

表 5-2 活性汚泥から分離したコロニー数とプラスミド抽出試験に供した数

	抗生物質耐性菌					重金属耐性菌					計
	Sm	Ap	Cm	Tc	Hg	As	Se	Pb	Cd		
分離数	29	23	56	29	78	76	49	27	51*	418	
液体培地で培養不能 となった数	0	0	17	0	1	7	4	0	0	29	
プラスミド抽出に供 した数	29	23	39	29	77	69	45	27	51	389	

*一平板上に 200 コロニー以上の形成が見られたため、ランダムに約 50 コロニー分離した。

保有されていたプラスミドの総数を表5-3にまとめた。試験に供したコロニーのうち、21%がプラスミドを保持していることが明らかとなった。抗生物質耐性細菌のプラスミド保持割合は22~46%と何れも高かった。一方、重金属耐性細菌のうち、As耐性細菌およびSe耐性細菌は抗生物質と同様約30%がプラスミドを保持していたが、Hg耐性細菌、Pb耐性細菌、Cd耐性細菌は3.9~11%と低いプラスミド保持率を示した。

先に示した抗生物質・重金属耐性細菌の生菌数（表5-1）と、ここで求めた各抗生物質・重金属の耐性菌におけるプラスミド保持細菌の割合（表5-3）を基にして、活性汚泥で各抗生物質・重金属に耐性を示すプラスミド保持細菌数とその従属栄養細菌数に対する割合を推算した。表5-4に示すように、プラスミドを保持するSe耐性細菌は従属栄養細菌数の9.5%と最も高く、一方、プラスミド保持Tc耐性細菌は0.0019%と極めて低いことが推定された。その他の抗生物質・重金属に耐性を示すプラスミド保持細菌は全従属栄養細菌に対して0.1~3.6%の範囲で存在するものと推定された。

図5-1に各細菌から検出されたプラスミドバンドの本数の分布を示す。図に示したように、本試験では単一のプラスミドバンドが観察されたものが83株中72株(88%)と多数を占めた。プラスミドは抽出時の物理的剪断により閉環状や直鎖状の形態をとるため、同一プラスミドが異なるプラスミドバンドとして検出される場合があり得るが、単一のバンドを示すものが多数を占めたことは、この剪断の影響は無く、適正に抽出が行われたことを裏付けるものといえる。一方、プラスミドの分離能は泳動条件に依存することが知られており、本試験で用いたゲル濃度0.6%（1×TAE）においては、1~23 kbのプラスミドが明確に分離される。従って、1 kb以下および23 kb以下のプラスミド数について、バンドの数のみから推定することは、過小評価につながっている可能性があるものの、ここで検出されたバンドは全てシャープなものであり、複合バンドである可能性は低いものと考えている。また、2~8本の複数のプラスミドバンドを示したものも少数ながら確認された、すなわち複数種のプラスミドを持つものも存在した。

表 5-3 活性汚泥細菌からのプラスミド検索結果

	保持株数 (プラスミド数 [*])	[% ^{**}]	非保持株数	供試菌株数
Sm 耐性細菌	8 (8)	[28%]	21	29
Ap 耐性細菌	5 (10)	[22%]	18	23
Cm 耐性細菌	18 (22)	[46%]	21	39
Tc 耐性細菌	8 (18)	[28%]	21	29
Hg 耐性細菌	6 (11)	[7.8%]	71	77
As 耐性細菌	18 (20)	[26%]	51	69
Se 耐性細菌	15 (17)	[33%]	30	45
Pb 耐性細菌	3 (3)	[11%]	24	27
Cd 耐性細菌	2 (3)	[3.9%]	49	51
計	83 (112)	[21%]	306	389

*各プラスミド保持株の有するプラスミド数の合計、**供試菌株数に対するプラスミド保持株数の割合

表 5-4 活性汚泥中のプラスミド保持細菌数および従属栄養細菌数に対するその割合の推定

	活性汚泥中のプラスミド 保持細菌数の 推定値 (CFU/mL) *	従属栄養細菌に に対するプラスミド 保持細菌の割合の 推定値 (%) **	
Sm 耐性細菌	2.3×10^6	0.43	
Ap 耐性細菌	7.5×10^5	0.14	
Cm 耐性細菌	1.9×10^7	3.6	
Tc 耐性細菌	1.0×10^4	0.0019	
Hg 耐性細菌	2.4×10^6	0.44	
As 耐性細菌	4.4×10^6	0.82	
Se 耐性細菌	5.1×10^7	9.5	
Pb 耐性細菌	4.1×10^6	0.77	
Cd 耐性細菌	1.1×10^6	0.20	

* (耐性細菌数 (表-1)) × (プラスミド保持株の割合 (表-2))

**100 × (プラスミド保持細菌数) / (従属栄養細菌数)

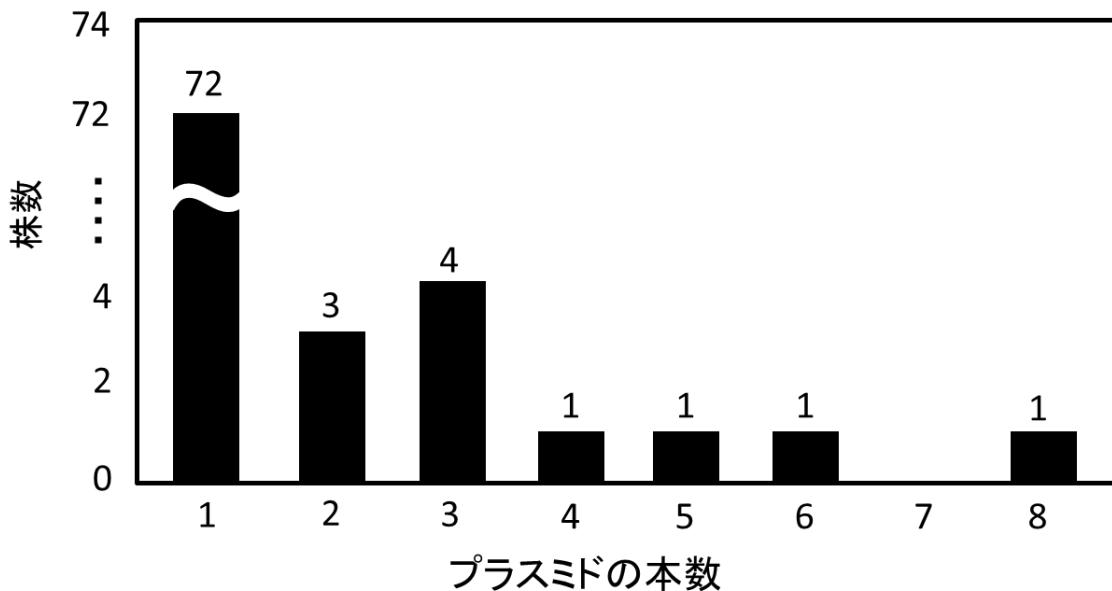


図 5-1 活性汚泥から分離された細菌株の保持するプラスミドの本数の分布

5.3.3 活性汚泥細菌のプラスミドのサイズ

検索された 111 本のプラスミドのサイズ分布を図 5-2 に示した。111 本の内 77% が 30 kb 以上のサイズを有していた。また、Tc 耐性細菌、Hg 耐性細菌、Cd 耐性細菌の保持しているプラスミドは、他より小さいものが多かった。中でも Cd 耐性細菌からは 30~100 kb のプラスミドが全く検出されなかった。Tc 耐性細菌と Hg 耐性細菌は、複数のプラスミドを有する割合が比較的高く、中には 6 種あるいは 8 種のプラスミドを保持する細菌も存在していたが、それらのプラスミドは 10 kb 以下の小さなものが多かった。興味深いことに 30 kb 以下のプラスミドは複数のプラスミドを保持する細菌のみで検出された（図 5-3）。このプラスミドのサイズ分布をグラム陽性細菌と陰性細菌に分けて図 5-4 に示した。プラスミドを保持していた全 83 株中、グラム陰性細菌は 60 株、グラム陽性細菌はわずか 9 株であり、グラム染色性が不明なものが 7 株、試験不能なものが 7 株存在した。ただし、グラム染色が不明な株および試験不能なものは図に含めていない。数少ない菌株からのデータではあるが、グラム陽性細菌からは 10 kb 以下の小さなプラスミドは検出されず、グラム陰性菌とは異なる傾向が示された。

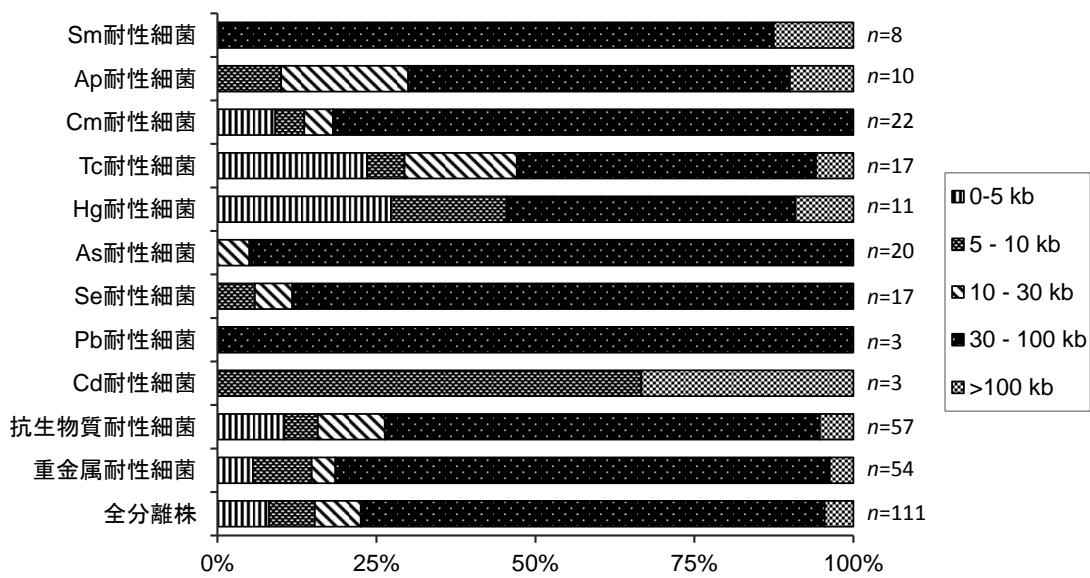


図 5-2 活性汚泥から分離された細菌の保持するプラスミドのサイズ分布 (n : プラスミドの本数)

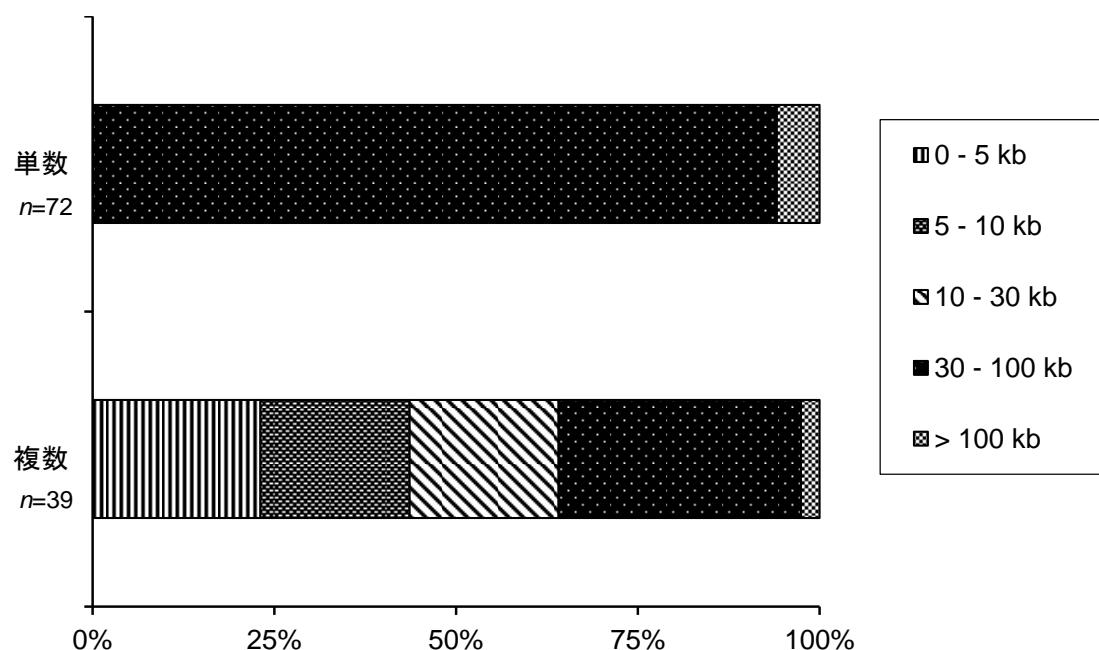


図 5-3 複数および単数のプラスミドを擁する細菌のプラスミドサイズ分布 (n : プラスミドの本数)

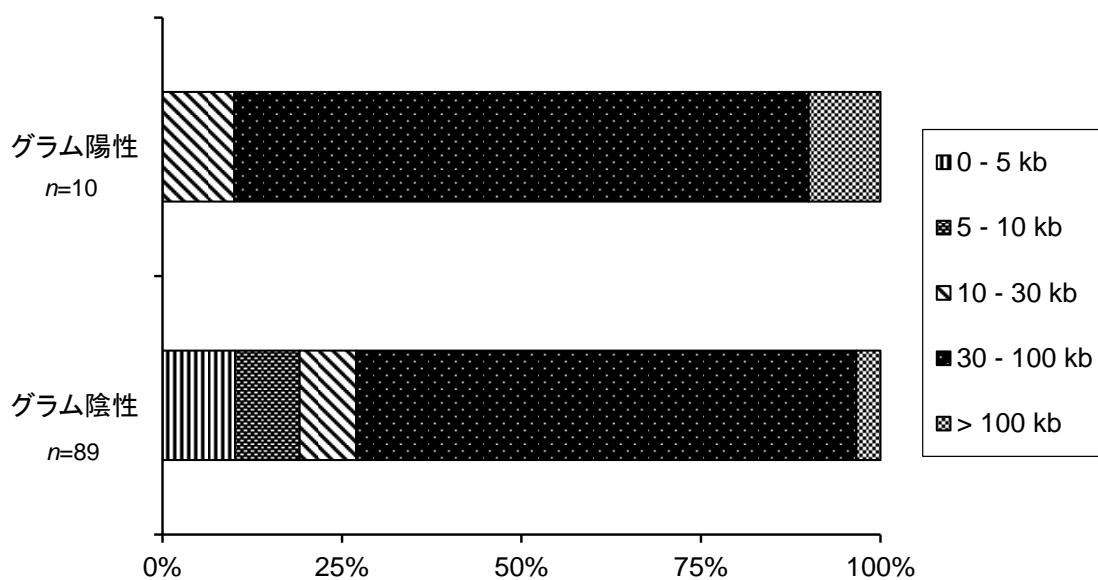


図 5-4 グラム陰性およびグラム陽性細菌の有するプラスミドのサイズ分布 (n : プラスミドの本数)

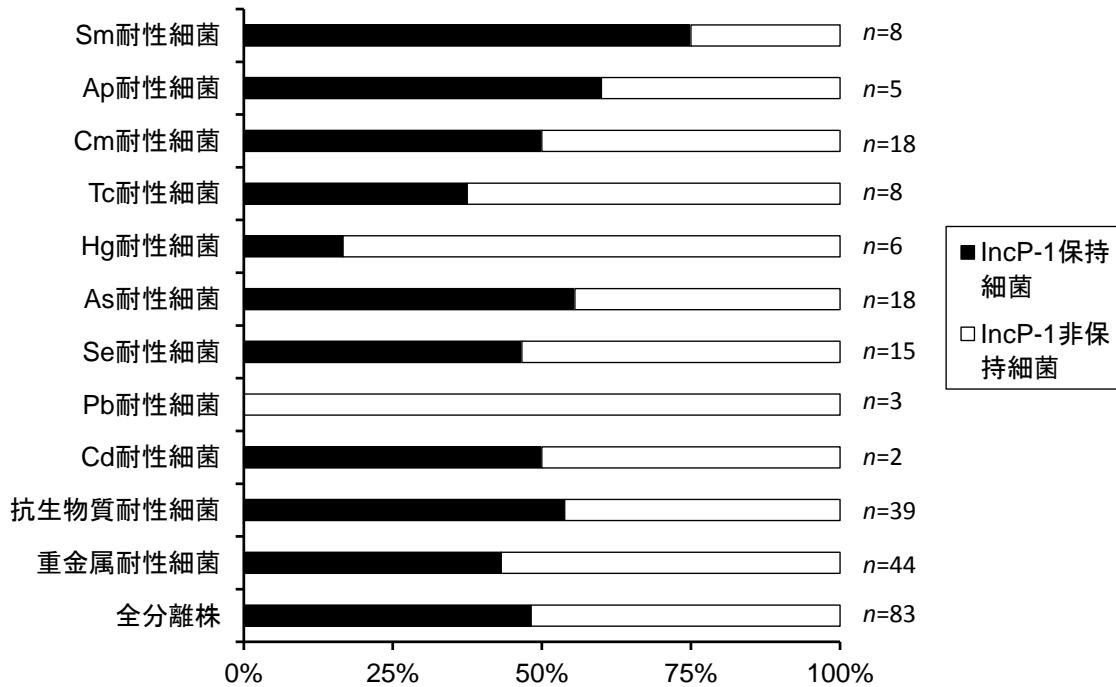


図 5-5 活性汚泥細菌の IncP-1 プラスミド保持率 (n : プラスミド保持細菌数)

5.3.4 プラスミド上に存在する Tc 耐性遺伝子および Hg 耐性遺伝子の検索

プラスミド上に今回マーカーとした抗生物質や重金属への耐性遺伝子がコードされているか確認するため、Tc および Hg を対象として調査した。

Tc耐性細菌である6株中の2株のプラスミドからtetA遺伝子が検出されたが、他の遺伝子は検出されなかった。また、Hg耐性細菌6株のうち、5株のプラスミドからmerA遺伝子が検出された。

5.3.5 IncP-1 および IncQ プラスミドの調査

図 5-5 に示すように、全 83 株のうち、48%に相当する 40 株の粗プラスミド抽出液から IncP-1 プラスミドに特有の trfA 遺伝子が検出され、IncP-1 プラスミドの保持が確認された。プラスミドを有する抗生物質耐性細菌の約 40～75%が IncP-1 プラスミドを保有していた。trfA 遺伝子は、プラスミドを保持する As 耐性細菌、Se 耐性細菌および Cd 耐性細菌の 50～60%から検出されたが、Hg 耐性細菌からの検出率は約 20%と低く、Pb 耐性細菌からは全く検出されなかった。

また、trfA 遺伝子が検出された 40 株は、大半がグラム陰性細菌であるが、5 株のグラム陽性細菌も含まれていた。

IncQ プラスミドに特有の遺伝子の検出も試みたところ、ポジティブコントロールでは目的の PCR 産物の位置にのみ、鮮明なバンドが確認されたが、活性汚泥細菌では、非特異的な増幅バンドが見られた。83 株中 22 株は、目的の増幅産物の位置にバンドが見られたが、このうち 10 株は前述の IncP-1 でも陽性反応を示し、かつ、1 本のプラスミドしか検出されていない株であり、偽陽性であることが疑われた。すなわち、IncQ プラスミドの確認は、本研究の検討の範囲では明確にはできなかつたと考えられる。

5.3.6 複数のプラスミドを有する細菌の特徴づけ

4 種以上のプラスミドを持つグラム陰性細菌として、Tc 耐性細菌 Tc2-1 株、Cm 耐性細菌 Cm2-13 株、Ap 耐性細菌 Ap1-10 株、Hg 耐性細菌 Hg1-2 株、また、グラム陽性細菌として Se 耐性細菌である Se1-1-22 株の特徴を調べ表 5-5 にまとめた。16S rDNA の配列は、Tc2-1 株は *Shigella* 属、Cm2-13 株は *Afipia* 属、Ap1-10 株は *Acidovorax* 属、Hg1-2 株は *Acidovorax* 属、Se1-1-22 株は *Leucobacter* 属と高い相同意を示した。これらのうち、trfA 遺伝子が検出されたのは、Ap1-10 株だけであった。また、Tc2-1 株および Hg1-2 株のプラスミド抽出液からは、それぞれ tetA 遺伝子および merA 遺伝子が検出された。先に述べたように、これらの細菌の保持するプラスミドは 30 kb 以下のものが多かつた。

表 5-5 複数のプラスミドを保持する活性汚泥細菌の特徴

菌株名	16S rDNA 塩基配列に基づく近縁種		相同性 (%)	プラスミド数 (大きさ, kb)	他の特徴
Tc2-1	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC29903 ^T (X96963)	96.0	8 (2, 3, 4, 5, 7, 11, 14, 63)	<i>tetA</i>
Cm2-13	<i>Afipia clevelandensis</i>	ATCC 49720 ^T (M69186)	99.5	5 (3, 5, 9, 19, 78)	
Ap1-10	<i>Acidovorax caeni</i>	R-24608 ^T (AM084006)	97.5	4 (10, 13, 31, 98)	<i>trfA</i>
Hg1-2	<i>Acidovorax temperans</i>	CCUG 11779 ^T (AF078766)	99.7	6 (3, 4, 4, 7, 10, 95)	<i>merA</i>
Se1-1-22	<i>Leucobacter aridicollis</i>	L-9 ^T (AJ781047)	95.8	2 (10, 47)	

5.4 考察

本試験で用いた活性汚泥は、主に家庭排水を処理する都市下水処理場から採取したものである。家庭排水は抗生物質の主要な排出源の一つであるが、下水中の抗生物質濃度は高くても数百 ng/L 程度である（鈴木, 2006）。また、M 下水処理場周辺には重金属の明確な点排出源は存在していない。すなわち、抗生物質や重金属は活性汚泥中の細菌にとって強い選択圧とはなっていないと考えられた。それにも関わらず、今回試験した数十～数百 mg/L という濃度において抗生物質・重金属耐性細菌が従属栄養細菌数の数～数 10% の割合で存在することが明らかとなった（表 5-1）。

抗生物質・重金属耐性細菌は高頻度でプラスミドを有していると予想していたが、むしろプラスミドを保持していない細菌が比較的高い比率で存在していた（表 5-3）。ここで、当該の選択圧に対する耐性能の保持がプラスミドの保持と明確には関係していなかったことから、これらの耐性能が多くの場合にプラスミドではなく、染色体 DNA にコードされた耐性遺伝子に依存している可能性が考えられた。このことは、Tc 耐性を示すプラスミド保持菌の 6 株中 2 株からしか *tetA* 遺伝子が検出されなかったことからも裏付けられる。Hg 耐性細菌として分離されたプラスミド保持菌では、6 株中 5 株で *merA* 遺伝子が検出されたが、それでも例外が 1 株認められた。

本研究では抗生物質・重金属耐性細菌に焦点を当ててプラスミド検索を行ったが、全細菌に対するプラスミド保持細菌の割合を試算してみた。この試算において、Se 耐性を示した細菌株のデータから試算した場合には、活性汚泥中の全細菌の 1 割以上がプラスミドを有するものと推測された。プラスミド検索の対象となった細菌の選択方法等が異なるものの、活性汚泥だけでなく、海底泥・海水等様々な環境中においても、20～40% と高い割合でプラスミド保持細菌が存在していることが報告されている（Bauda *et al.*, 1995; Sobecky *et al.*,

1997; Kobori *et al.*, 1984)。

大きいプラスミドほど多くの遺伝子をコードできるため、そのサイズからどのような機能を擁しているかを推測し得る。プラスミドの複製制御に関わる基本的な遺伝子は 2~3 kb であり (Couturier *et al.*, 1988)、伝達性に関する遺伝子群は、最低 30 kb 以上を占めると言われている (Rochelle *et al.*, 1989)。それより大きなプラスミドは、基本的な遺伝子以外に何らかの有用な機能を有しているものと言える。本研究で単離されたプラスミドの 77% は 30 kb 以上の大きさを有していたことから (図 5-2)、これらのプラスミドは、伝達性や何らかの機能を有しているといえる。このことから、活性汚泥内においてはプラスミドが普遍的に伝達され、細菌の新規機能の獲得・定着に関わっていることが示唆された。一方、10 kb 以下の小さなプラスミドも 15% 存在していたが、これらは基本的な複製制御遺伝子の他には、ほとんど他の機能を有していないものと考えられる。プラスミドの中には、最低限の複製制御に関わる遺伝子以外、伝達性や宿主にとって有利に働くような機能が何ら見つかっていないプラスミド (cryptic plasmids) も存在することが知られている (Spratt & Rowbury, 1973)。これらの小さなプラスミドの多くは、複数のプラスミドを保持するグラム陰性細菌が保有しており (図 5-3、図 5-4)、他の大きなプラスミドの再編成の結果、一部の遺伝子が脱落して生じた可能性も考えられた。こうしたプラスミドは、他のプラスミドや染色体と相同組換えを起こしたり、トランスポゾンや挿入配列によって新規機能を獲得し、他細菌へと遺伝子を拡散させる可能性も考えられる。

また、不和合性群 IncP-1 プラスミドを活性汚泥内のプラスミド保持細菌の約半数が保持しており (図 5-5)、活性汚泥内で優占していることが示唆された。

複数のプラスミドを持つグラム陰性細菌の代表株はいずれも *Proteobacteria* 級に属していたが (表 5-5)、このグループは活性汚泥内に優占しており (Snaird *et al.*, 1997)、活性汚泥内の遺伝子の挙動に多大な影響を及ぼしている可能性がある。複数のプラスミドを保持している株であっても、優占していた IncP-1 プラスミドを含んでいないものもあり、活性汚泥細菌が多様な不和合性群のプラスミドを有していることが示唆された。また、グラム陽性細菌のプラスミドは活性汚泥からの検出例が少なく、広宿主域では pUB110 (Lacey & Chopra, 1974) 等がわずかに知られているだけであることから、*Actinobacteria* 級に属する Se1-1-22 株の保持するプラスミドは興味深い研究材料である。

近年、廃水処理系においてバイオオーゲメンテーション手法の一つであるプラスミドオーゲメンテーションの活用が提唱されている (Top *et al.*, 2002)。バイオオーゲメンテーションは、汚染物質の除去の促進を目的として、特殊な能力を有する細菌を反応槽に導入する手法である。しかし、導入細菌は、土着細菌との競合や、環境変化によるストレス、系外への流出等により、生き残ることは容易ではないことから、有用機能をコードした伝達性のプラスミドを有する細菌を導入するバイオオーゲメンテーションが、プラスミドオーゲメンテーションである。本法では、導入菌のプラスミド上にコードされている処理に有用な遺伝子が活性汚泥中の他の細菌へと伝達されれば、必ずしも導入細菌が生残する必要性

はないというメリットを有している。廃水処理系は流入水量や組成、水温が変化する環境であるため、その時々に応じて優占する細菌種が変化することから、特定微生物の能力に依存せず、プラスミドを活用し、複合的な微生物群集の中で常に変遷する優占種へと有用遺伝子を伝達させることのできるプラスミドオーゲメンテーションは、安定した廃水処理性能向上を期待できる有望なオーゲメンテーション法である。

本研究では、土着細菌の多くがもともと IncP-1 プラスミドを保有していることが示唆されたため、プラスミドオーゲメンテーションにおいて IncP-1 プラスミドを導入した場合、不和合性により、目的のプラスミドが安定に活性汚泥内に定着しないことが懸念される。そのため、他の不和合性群のプラスミドをオーゲメンテーションに利用した方が効果的である可能性が示唆されたものといえる。一方、先に行った我々の研究においては、本研究で用いた M 処理場の活性汚泥細菌に対し、IncP-1 プラスミドの伝達が実証されている (Soda *et al.*, 2008; Tsutsui *et al.*, 2010) ことから、現実にはプラスミドオーゲメンテーションの成否には直接的に影響を与えないとも考えられる。今回の結果は一例であり、他の時期や異なる処理場で調査を行い、知見を集積していく必要があろう。

5.5 要約

本研究では、都市下水を処理する活性汚泥中のプラスミド保持細菌を検索した。まず、4種の抗生物質と、5種の重金属に対する耐性細菌を活性汚泥より単離し、これらの耐性細菌よりプラスミドを検索し、それらのプラスミドのサイズや本数の分布の調査を行うとともに、その不和合性や機能の一部を調べ、特徴の一端を明らかにした。

参考文献

- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J. and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16, 237–247.
- Bahl, M.I., Burmølle, M., Meisner, A., Hansen, L.H. and Sørensen, S.J. (2009) All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel ε subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid* 62, 134–139.
- Bauda, P., Lallement, C. and Manem, J. (1995) Plasmid content evaluation of activated sludge. *Water Res.* 29, 371–374.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7, 1513–1523.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L. and Maas, W.K. (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Am. Soc. Microbiol.* 52, 375–395
- Datta, N., Hedges, R.W., Shaw, E.J., Sykes, R.B. and Richmond, M.H. (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 108, 1244–1249.
- de los Reyes, F.L., Raskin, L. (2002) The role of filaments in activated sludge foaming relationship of mycolata levels to foaming initiation and stability. *Water Res.* 36, 445–459.
- Don, R.H. and Pemberton, J.M. (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145, 681–686.
- Eddy, S.R. (1995) Multiple alignment using hidden Markov models. In Proceedings of the Third International Conference of Intelligent Systems for Molecular Biology, Rawlings, C. et al. (Eds.), La Jolla, C.A., pp. 114–120.
- Fujita, M., Ike, M. and Suzuki, H. (1993) Screening of plasmids from wastewater bacteria. *Water Res.* 27, 949–953.
- Götz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., Van Elsas, J.D. and Smalla, K. (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2621–2628.
- Graham, D.W. and Smith, V.H. (2004) Designed ecosystem services: application of ecological principles in wastewater treatment engineering. *Front. Ecol. Environ.* 2,

- 199–206.
- Inoue, D., Murashige, K., Sei, K., Soda, S., Ike, M. and Fujita, M. (2007) Distribution and characteristics of plasmid mobilizers in aquatic and soil environments and activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53, 67–70.
- Jones, P.A. and Schuler, A.J. (2010) Seasonal variability of biomass density and activated sludge settleability in full-scale wastewater treatment systems. *Chem. Eng. J.* 164, 16–22.
- Kobori, H., Sullivan, C.W. and Shizuya, H. (1984) Bacterial plasmids in Antarctic natural microbial assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 515–518.
- Lacey, R.W. and Chopra, J. (1974) Genetic studies of a multi-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 7, 285–297.
- Liebert, C.A., Wireman, J., Smith, T. and Summers, A.O. (1997) Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of Primates. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1066–1076.
- Mach, P.A. and Grimes, D.J. (1982) R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1395–1403.
- Martins, A.M.P., Pagilla, K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Research* 38, 793–817.
- Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M. and Mulvey, M. (2001) Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes* 15, 209–215.
- Rochelle, P.A., Fry, J.C. and Day, M.J. (1989) Factors affecting conjugal transfer of plasmids encoding mercury resistance from pure cultures and mixed natural suspensions of epilithic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 135, 409–424.
- Saikaly, P. E., Stroot, P. G. and Oerther, D. B. (2005) Use of 16 S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5814–5822.
- Sei, K., Asano, K., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M., Kohno, T. and Fujita, M. (2000) Development of simple methods of DNA extraction from environmental samples for monitoring microbial community based on PCR. *Jpn. J. Water Treat. Biol.* 36, 193–204.
- Seviour, R. and Nielsen, P.H. (Ed.), *Microbial Ecology of Activated Sludge*, IWA Publishing, 2010.
- Snaidr, J., Amann, R. Huber, I., Ludwig, W. and Schleifer, K-H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884–2896.
- Sobecky, P.A., Mincer, T.J., Chang, M.C. and Helinski, D.R. (1997) Plasmids isolated

- from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 888–895.
- Soda, S., Otsuki, H., Inoue, D., Tsutsui, H., Sei, K. and Ike, M. (2008) Transfer of antibiotic multiresistant plasmid RP4 from *Escherichia coli* to activated sludge bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 292–296.
- Spratt, B.G. and Rowbury, R.J. (1973) The plasmid of *Salmonella typhimurium* LT2. *Mol. Gen. Genet.* 121, 347–353.
- Stepanauskas, R., Glenn, T.C., Jagoe, C.H., Tuckfield, R.C., Lindell, A.H. and McArthur, J.V. (2005) Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3671–3678.
- Top, E., Smet, I.D., Verstraete, W., Dijkmans, R. and Mergeay, M. (1994) Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 831–839.
- Top, E.M., Moënne-Loccoz, Y., Pembroke, T. and Thomas, C.M. (2000) Phenotypic traits conferred by plasmids, 249–285. In: Thomas, C.M. (ed.), *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Top, E.M., Springael, D. and Boon, N. (2002) Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 199–208.
- Trevors, J.T. (1987) Identification of plasmid containing bacteria in an activated sludge reactor. *Toxic. Assess.* 2, 283–291.
- Tsutsui, H., Anami, Y., Matsuda, M., Inoue, D., Sei, K., Soda, S. and Ike, M. (2010) Transfer of plasmid pJP4 from *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* to bacteria in activated sludge developed under different sludge retention times. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 684–689.
- van der Gast, C. J., Jefferson, B., Reid, E., Robinson, T., Bailey, M.J., Judd, S.J. and Thompson, I.P. (2006) Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. *Environ. Microbiol.* 8, 1048–1055.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. and Daims, H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81: 665–680.
- Wong, M.-T., Mino, T., Seviour, R.J., Onuki, M. and Liu, W.-T., (2005) In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorus removal plants in Japan. *Water Research* 39,

- 2901–2914.
- Yannisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.
- Yu, Z., Mohn, W. (2001) Bioaugmentation with resin-acid-degrading bacteria enhances resin acid removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents. *Water Research*. 35, 883–890.
- 鈴木譲. (2006) 下水処理過程における医薬品類の挙動. 水環境学会誌. 29, 12–15.

本論文に関する報告

学術論文

1. K. Takada, K. Hashimoto, S. Soda, M. Ike, K. Yamashita and T. Hashimoto. Characterization of microbial community in membrane bioreactors treating domestic wastewater. *Journal of Water and Environment Technology*. [in press]

表 2-1 was cited from Table 1 in this research paper.

表 2-2 was modified from Table 2 in this research paper.

図 2-2 was adopted from Fig. 1 in this research paper.

図 2-5 was adopted from Fig. 2 in this research paper.

図 2-6 was adopted from Fig. 3 in this research paper.

図 2-7 was adopted from Fig. 4 in this research paper.

2. K. Hashimoto, M. Matsuda, D. Inoue and M. Ike. Bacterial community dynamics in a full-scale municipal wastewater treatment plant employing conventional activated sludge process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. [published online]

表 1-1 was cited from Table S1 in this research paper.

表 3-1 was cited from Table 1 in this research paper.

図 3-2 was adopted from Fig. 1 in this research paper.

表 3-2 was cited from Table 2 in this research paper.

図 3-3 was adopted from Fig. 3 in this research paper.

図 3-4 was adopted from Fig. 2 in this research paper.

図 3-5 was adopted from Fig. 4 in this research paper.

表 3-3 was cited from Table 3 in this research paper.

図 3-6 was adopted from Fig. S1 in this research paper.

図 3-7 was adopted from Fig. 5 in this research paper.

3. 橋本くるみ、井上大介、惣田訓、池道彦：「活性汚泥内の抗生物質耐性細菌および重金属耐性細菌の保有するプラスミドの特徴づけ」、『下水道協会誌』、日本下水道協会、第49巻第594号、pp104–111、2012

表5-1は、本学術論文の表一 1 を引用した。

表5-2は、本学術論文の表一 2 を引用した。

表5-3は、本学術論文の表一 3 を引用した。

表5-4は、本学術論文の表一4を引用した。

図5-1は、本学術論文の図一1を引用した。

図5-2は、本学術論文の図一2を引用した。

図5-3は、本学術論文の図一3を引用した。

図5-4は、本学術論文の図一4を引用した。

図5-5は、本学術論文の図一5を引用した。

表5-5は、本学術論文の表一5を引用した。

その他の業績

学術論文

1. H. Tsutsui, Y. Anami, M. Matsuda, K. Hashimoto, D. Inoue, K. Sei, S. Soda, and M. Ike. Plasmid-mediated bioaugmentation of sequencing batch reactors for enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid removal in wastewater using plasmid pJP4. *Biodegradation*. 2012.
2. 惣田訓、穴見泰崇、筒井裕文、橋本くるみ、松田真佐美、井上大介、清和成、池道彦：『ジーンバイオオーグメンテーションによる活性汚泥リアクターの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸の除去能の向上』、『土木学会論文集G（環境）』第68巻第7号、III_369－III_377、2012

総説

1. 池道彦、橋本くるみ、高田一輝：「膜分離活性汚泥法の微生物学的特徴」、『環境技術』、環境技術学会、第42巻第8号、pp459–464、2013

国際会議録

1. K. Hashimoto, H. Tsutsui, H. Hamada, K. Sakai, D. Inoue, K. Sei, S. Soda, K. Yamashita, K. Tsuji, T. Hashimoto and M. Ike. : Changes of bacterial community structure in a full-scale membrane bioreactor in Sambo wastewater treatment plant, Proc. of the 5th IWA-ASPIRE Conference, 10F3-3.pdf, (2013) (Sep.8–12, Daejeon, Korea)

図 4-1 was adopted from Fig. 1 in this research paper.

表 4-1, 表4-2 were cited Table 1 in this research paper.

図 4-2 was adopted from Fig. 2 in this research paper.

図 4-3 was adopted from Fig. 3 in this research paper.

図 4-4 was adopted from Fig. 4 in this research paper.

図 4-5 was adopted from Fig. 5 in this research paper.

図 4-6 was adopted from Fig. 6 in this research paper.

図 4-8 was adopted from Fig. 7 in this research paper.

2. K. Takada, K. Hashimoto, S. Soda, M. Ike, K. Yamashita and T. Hashimoto. : Characterization of Microbial Community in Membrane Bioreactors Treating Domestic Wastewater. Abstracts of Water and Environment Technology Conference (WET2013), p.5, (Jun. 15–16, Tokyo, Japan)
3. K. Hashimoto, H. Hamada, K. Sakai, H. Tsutsui, D. Inoue, S. Soda, K. Tsuji, T. Hashimoto and M. Ike. : Bacterial community dynamics during start-up in a full-scale membrane bioreactor in Sambo wastewater treatment plant, The 5th joint workshop among Dalian University of Technology, Osaka University and Pusan National University “Advanced Engineering Technology for Environment and Energy” (2012)(Aug. 1, Dalian, China)
4. K. Hashimoto, H. Tsutsui, D. Inoue, K. Sei, S. Soda and M. Ike. : Isolation and characterization of plasmids harbored by antibiotic and metal resistant bacteria in activated sludge, Proc. of the 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibision., ¥iwa¥pdf¥sr119H00161DIS.pdf, (2011) (Oct. 2–6, Tokyo, Japan)
5. H. Tsutsui, Y. Anami, M. Matsuda, K. Hashimoto, D. Inoue, K. Sei, S. Soda and M. Ike. : Plasmid-mediated bioaugmentation of sequencing batch reactors for enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid removal in wastewater using plasmid pJP4, Proc. of The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition., ¥iwa¥pdf¥sr119H01084DIS.pdf., (Oct. 2–6, Tokyo, Japan)

謝辞

本研究の遂行および本論文作成にあたり、終始懇切丁寧かつ適切なご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻教授池道彦博士に心から感謝の意を表します。

また、本論文の査読にあたり、多くの貴重なご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻教授近藤明博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行、本論文の査読にあたり、絶えず有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻准教授惣田訓博士に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、貴重なご助言、ご協力を賜りました北里大学医療衛生学部健康科学科教授清和成博士（旧所属：大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻助教）に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始懇切なるご指導、ご助言を賜りました北里大学医療衛生学部健康科学科講師井上大介博士（旧所属：大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻特任研究員）に心より御礼申し上げます。

本論文の発表に当たって、多数のご支援を賜りました、大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻助教黒田真史博士に深く感謝致します。

本研究を遂行していく中で、数々のご支援を頂きました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻山岡ゆり子技官に、心より感謝致します。

共同研究者として適切なご助言や多大なるご協力を頂きました、日本下水道事業団橋本敏一博士、辻幸志博士、山下喬子博士に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行に当たり、試料の採取や立会い、情報提供にご協力くださいました下水処理場の皆様に深く感謝いたします。

また、共同研究者として数々のご助言、ご支援を頂きました筒井裕文博士、松田真佐美氏、高田一輝氏、濱田浩志氏、酒井孝輔氏に深く感謝致します。

研究室生活を支え、常に暖かい激励を下さいました池研究室の諸兄・諸姉に深く感謝いたします。

最後に、研究生活に理解を示し、終始多大なるご支援を賜りました家族に心から感謝いたします。