

氏名	宮里 直樹
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第773号
学位授与の日付	平成17年9月30日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	活性汚泥における糸状性硫黄酸化細菌と硫酸塩還元細菌の変動特性
論文審査委員(主査)	池本 良子(自然科学研究科・助教授)
論文審査委員(副査)	関 平和(自然科学研究科・教授), 北浦 勝(自然科学研究科・教授), 古内 正美(自然科学研究科・助教授), 松井 三郎(京都大学・教授)

It was reported that sulfate reduction was a main trigger of filamentous bulking due to sulfur bacteria type 021N. It is need to clear the changes of filamentous bacteria and SRB community in the activated sludge. At first, Sulfur oxidation-reduction activities in the activated sludges of six municipal wastewater treatment plants were investigated. Second, Effects of inoculation, sulfate concentration, DO and anaerobic shock on filamentous bulking due to growth of type 021N were examined using the laboratory scale activated sludge reactors. Third, The growth of sulfate reducing bacteria (SRB) and filamentous sulfur bacteria was monitored by FISH method in the laboratory activated sludge reactors scale under the same conditions. The results were summarized as follows, A high correlations were recognized between sulfate reduction and sulfur oxidation activities. When the concentrations of acetate and propionate in influent of aeration tank in the WWTP and reactors were high, both activities of sulfate reduction and sulfur oxidation were high. It was a tendency that when *Desulfonema* spp. grew, the filament length of *Thiothrix eikelboomii* increased. And inoculation of filamentous bacteria and sulfate reducing bacteria did not affect the occurrence of bulking. The high sulfate concentration of the wastewater is one of the courses of filamentous bulking. However, when the sulfate concentration was low, filamentous bulking occurred. Low DO and anaerobic shock were important factors of filamentous bulking. The number and the activities of sulfate reducing bacteria in the bulking sludge was higher than those in the non-bulking sludge.

1. はじめに

活性汚泥法における運転管理上の問題で最も報告されている処理障害は、糸状性細菌の増殖によるバルキング現象である。また、バルキング現象の発生要因と報告されている硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌 type 021N は、様々な方法による微生物を用いた水処理において、有機物の分解におけるその役割と存在形態について注目されている。本研究では、都市下水処理場の運転管理上最も重要である糸状性バルキングの発生要因を明らかにし、その解決策を検討する糸口として、わが国において、最も出現頻度の高い糸状性細菌 type021N の増殖と硫酸塩還元細菌の増殖との関連性に着目し、これらの群集の変動について、実処理場と室内実験の両者から検討した。

2. 実下水処理場活性汚泥の硫黄酸化還元活性と関連微生物の変動特性

6ヶ所の下水処理場を対象として、活性汚泥中の硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌の現存量と活性を調べるとともに、それぞれの活性汚泥中の硫酸塩還元細菌と糸状性硫黄酸化細菌の群集について FISH 法を用いた調査を行った。その結果、オキシデーションディッチや低負荷の下水処理場では、糸状性硫黄酸化細菌の増殖は認められないが、標準活性汚泥法、嫌気好気活性汚泥法を採用している2箇所の処理場において糸状性硫黄酸化細菌 type021N の増殖が認められた。

表-1.1 FISH法に使用したプローブの概要

プローブ	標的微生物	プローブのシーケンス (5'→3')	16S rRNAの標的サイト	ホルムアミド濃度 ^a (%)	参考文献No.
SRB385	δ-プロテオバクテリアに属するSRBとグラム陽性細菌の一部に特	CGGCCTCGCTCGCTCAGG	385-402	30	6
SRB687	<i>Desulfovibrio</i> 属と <i>Geobacter</i> , <i>Desulfomonas</i> , <i>Desulfuromonas</i> , <i>Desulfomicrobium</i> , <i>Bilophila</i> および <i>Pelobacter</i> 属の一部に特異的	TACGGATTCACCTCCT	687-702	10	7
660	<i>Desulfobulbus</i> spp.	GAATTCGACTTCCCTCT	660-679	30	7
221	<i>Desulfobacterium</i> spp.	TGCGGGACTGATCTTGA	221-240	10	7
129	<i>Desulfobacter</i> spp.	CAGGCTTGAAGGCAGATT	129-148	20	7
DNMA657	<i>Desulfonema</i> spp.	TTCCGCTTCCCTCTCCCA	657-676	20	8
G1B	<i>Thiothrix disciformis</i>	TGTGTTGATTCCTTGC	1029-1048	30	9,10
G2M	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	GCAGCAGCGACCCCTTAG	842-859	35	9,10
G3M	<i>Thiothrix flexilis</i>	CTCAGGGATTCTGTCCAT	996-1013	30	9,10
G123T	<i>Thiothrix nivea</i> group, <i>Thiothrix disciformis</i> , <i>Thiothrix eikelboomii</i> and <i>Thiothrix flexilis</i>	CCTTCCGATCTCTATGCA	897-714	40	9,10

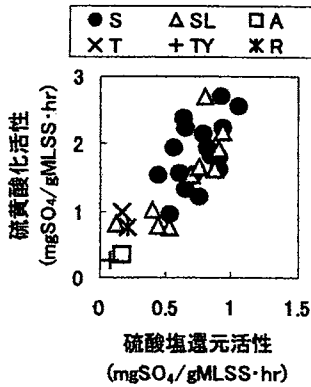


図-1.1 硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性の関係

a: ハイブリダイゼーションバッファのホルムアミド濃度

Type021Nを検出できる16S rRNAをターゲットとしたオリゴヌクレオチドプローブを用いたFISH法により、出現したtyoe021Nは*Thiothrix eikelboomii*であると判断された。また、硫酸塩還元細菌をターゲットとしたFISH法による解析の結果、硫酸塩還元細菌がどの活性汚泥中にも検出されることがわかった。

表-1.2 活性汚泥中にFISH法により観察された硫黄の酸化還元微生物

プローブ	標的微生物種	処理場名					
		S	SL	A	R	T	TY
SRB385	SRB	+++	++	++	++	++	++
660	<i>Desulfobulbus</i> spp.	+	+	+	+	+	+
687	<i>Desulfovibrio</i> spp.	+	-	-	-	-	-
221	<i>Desulfobacterium</i> spp.	-	+	-	-	-	-
129	<i>Desulfobacter</i> spp.	-	-	-	-	-	-
DMNA657	<i>Desulfonema</i> spp.	++	++	+	-	-	+
G1B	<i>Thiothrix disciformis</i>	-	-	-	-	-	-
G2M	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	+++	++	+	-	-	-
G3M	<i>Thiothrix flexilis</i>	-	-	-	-	-	-
G123T	<i>Thiothrix nivea</i> group, <i>Thiothrix disciformis</i> , <i>Thiothrix eikelboomii</i> and <i>Thiothrix flexilis</i>	+++	++	+	-	-	-

+++ = 2%以上, ++ = 0.1~2%, + = 0.1%以下, -= No detected

次に、*Thiothrix eikelboomii*が存在していた2箇所の処理場に関して、1年半にわたり継続調査を行った。その結果、硫酸塩還元活性の高い活性汚泥は硫黄酸化活性が高い傾向が認められたことから、活性汚泥ブロック内で、硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌の間に硫黄の酸化還元サイクルの形成されて、硫酸塩還元細菌の活性化が糸状性硫黄酸化細菌 type 021Nの増殖の一因となっていると推定した。

また、処理槽流入水の水質分析の結果より、有機酸濃度が高いときに硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性が高い傾向が認められたことから、酢酸の流入が硫黄の酸化還元細菌の活性化に何らかの影響を与えているものと推定した。

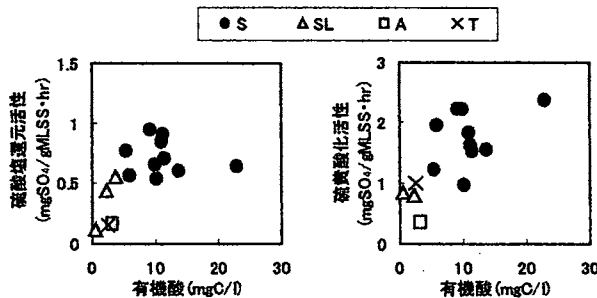
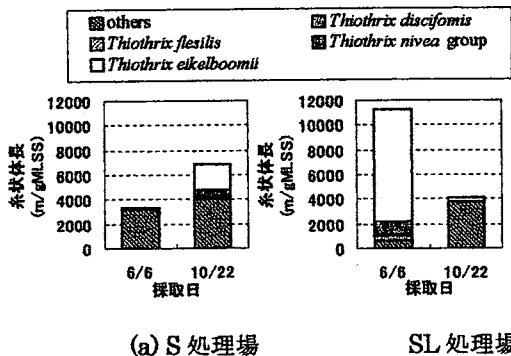
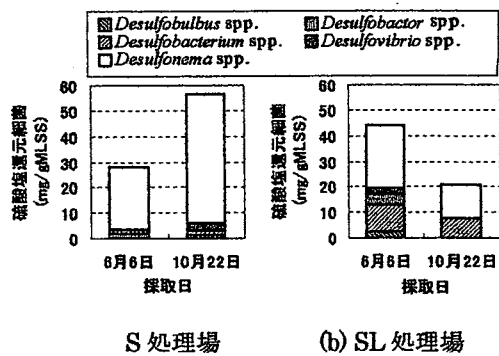


図-1.2 硫酸塩還元活性、硫黄酸化活性と有機酸濃度

さらに、硫酸塩還元細菌と糸状性細菌 type 021N の FISH 法による群集解析を行った結果、*Thiothrix eikelboomii* の現存量の増大と *Desulfonema* spp. の現存量の増大した時期が一致していることを示し、*Desulfonema* spp. のモニタリングおよび増殖抑制が、糸状性バルキングの抑制に重要であることを指摘した。



(a) S 処理場 SL 処理場
図-1.4 硫酸塩還元細菌の現存量の変化



S 処理場 (b) SL 処理場
図-1.5 糸状性細菌の現存量の変化

3. 糸状性細菌と硫酸塩還元細菌の増殖因子

ペプトンと酢酸を主成分とした人工排水を用いて、実験室内でさまざまな条件で連続処理装置の運転を行い、糸状性硫黄酸化細菌と硫酸塩還元細菌の増殖によるバルキング発生因子について検討を行った。

表-1.3 室内連続処理装置の運転条件

	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7	Run 8	Run 9	Run 10	Run 11
馴養期間	95.6.29-95.9.23	95.9.24-95.11.28	96.5.15-96.8.7	96.8.8-96.10.1	97.5.26-97.7.28	97.8.6-97.9.30	97.8.6-97.9.18	98.9.2-98.10.15	00.9.7-01.1.12	02.6.11-02.8.30	02.10.9-02.12.30
種汚泥											
SVI	78	424	127	144	258	100	180	116	201	150	210
運転条件											
硫酸塩濃度 (mgSO ₄ /l)	33	33	33	33	33	33	33	33→66	60	60	60
汚泥日令 (日)	20	20	20	20	20	12	12	20	20	20	20
曝気空気量 (l/min)	-	-	18	4.5	3	18-3	3-2	4	4-3	4	4
曝気ストレス	無	無	無	無	無	無	無	1回	無	1回	無
SRBの植種	無	無	無	無	無	1回	無	無	無	無	無

その結果、①種汚泥中に糸状性硫黄酸化細菌と硫酸塩還元細菌が多く含まれている場合には、バルキング発生までの期間が短くなること、②途中でこれらの細菌を植種しても急激なバルキングには至らないこと、③曝気空気量を制限し処理槽 DO 濃度を低下させるとバルキングが発生しやすいこと、④運転途中の曝気の停止や空気量の削減などの嫌気ストレスにより急激なバルキング発生が認められること、⑤硫酸塩濃度の高い方でバルキングが発生しやすいこと、および⑥有機物負荷が高い方でバルキングが発生しやすいことを示した。これらの結果から、本基質条件では、種汚泥の組成によってバルキング発生時期は異なるが、糸状性細菌の増殖が起こりやすい条件であること、硫酸塩濃度が高く負荷が高い条件ではもっともバルキング状態に至りやすいことを推定した。また、生成した活性汚泥の硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性を測定した結果、実処理場と硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性には正の相関が認められたが、その傾きが実下水処理場とは異なることを明らかにした。さらに、嫌気ストレス後に発生した糸状性バルキング汚泥に FISH 法を適用し、硫酸塩還元細菌と糸状性硫黄酸化細菌の群集解析を行った結果、処理槽に増殖した糸状性硫黄酸化細菌 type 021N は実下水処理場で認められたものと同様の *Thiothrix eikelboomii* であること、バルキング発生時期にはブロック内に大量の硫酸塩還元細菌の増大が認められることを明らかにした。

表-1.4 標準活性汚泥連続室内実験装置

	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7	Run 8	Run 9	Run 10	Run 11
馴養された活性汚泥											
SVIC (ml/g)	357	2200	268	4800	941	100	220	480	1043	4200	780
糸状体長 (m/gMLSS)	11500	86950	8580	138710	22670	3200	36000	72900	57520	109120	60580
バルキング発生時期	30日	15日	X	13日	30日	X	30日	66日	32日	15日	30日
硫酸塩還元細菌数 (MPN/gMLSS)	2.0×10^7	9.3×10^7	2.8×10^8	4.3×10^7	5.9×10^7	-	-	2.1×10^7	10.9×10^7	4.0×10^7	3.0×10^7
硫酸塩還元活性 (mgSO ₄ /gMLSS·hr)	0.21	0.41	0.15	0.70	0.42	0.18	0.35	0.51	0.49	-	0.47
硫黄酸化活性 (mgSO ₄ /gMLSS·hr)	2.3	-	2.4	9.5	4.3	2.2	6.4	-	5.0	-	4.9

4. 酢酸とペプトンで馴養した活性汚泥中における硫黄の酸化還元微生物の群集解析

上記でもっともバルキングが起りやすかった条件で室内処理装置の運転を行い、種汚泥中の糸状性細菌の現存量がバルキング発生時期に大きく影響すること、硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性に正の相関係が認められることを確認するとともに、実下水処理場と同様に酢酸の流入がバルキング発生を促進することを明らかにした。さらに、バルキング発生前後の硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌の群集変化について FISH 法と DAPI 染色を併用した画像解析により評価した。その結果、SRB385 および DNMA657 プローブで検出される *Desulfonema* spp. と推定される微生物が増殖したとき、糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix eikelboomii* が増加した。このことより、SRB385 および DNMA657 プローブで検出される硫酸塩還元細菌が、糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix eikelboomii* の増加に何らかの影響を与えていることが示唆された。

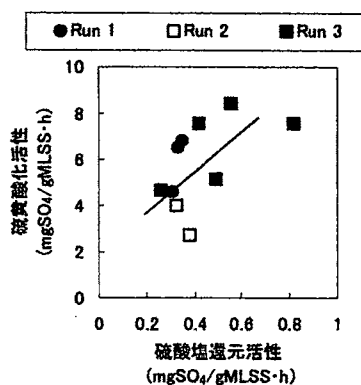


図-1.6 硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性の関係

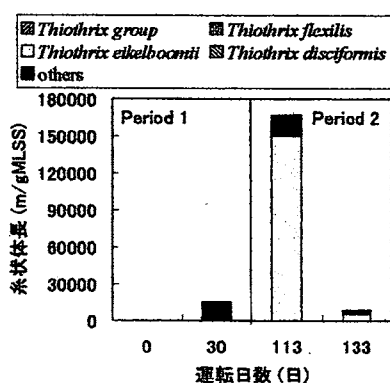


図-1.7 糸状性細菌の現存量の変化 (Run 3)

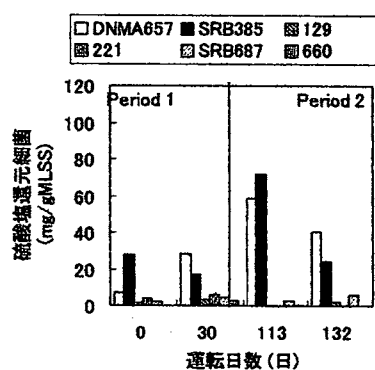


図-1.8 硫酸塩還元細菌の現存量の変化 (Run 3)

5. おわりに

2～3 で得られたの結果から、実下水処理場および室内実験装置の両者において、硫酸塩還元細菌 *Desulfonema* spp の増殖と糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix eikelboomii* の増加が確認された。*Desulfonema* spp のモニタリングと増殖抑制が重要であると考えられる。

しかし、第 1 章で示したように、硫酸塩還元細菌は系統学的には様々な位置に存在していることから、今回用いたプローブですべての硫酸塩還元細菌を検出できるわけではないので、今後、PCR を用いたクローン解析や、MerFISH 法、硫酸塩還元機能遺伝子を用いた定量などを行い、活性汚泥内での硫酸塩還元細菌の役割と挙動を明らかにしていく必要がある。

学位論文審査結果の要旨

提出された学位論文に関し、平成 17 年 8 月 1 日に第 1 回審査会を、8 月 2 日の口頭発表後に第 2 回審査会を開催し、協議の結果、以下のように判断した。

本論文は、都市下水及び産業排水処理で最も一般的に用いられている活性汚泥法の最大の問題点である沈降性悪化の原因となる糸状性硫黄酸化細菌と、共存する硫酸塩還元細菌について、微生物群集の変動を調査するとともに、室内実験によって、それらの増殖の要因について検討したものである。その結果、実下水処理場、室内実験ともに、硫黄酸化細菌と硫酸塩還元細菌が共存すること、糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix eikelboomii* と硫酸塩還元細菌 *Desulfonema* spp. の増殖が連動する事を明らかにし、これらの増殖抑制がバルキングの制御に重要であることを指摘した。さらに、バルキングの発生はこれらの細菌の連続的な流入によるものではなく、処理槽内の環境条件により増殖するためであること、その増殖には酢酸の流入が大きな影響を及ぼしていることを示した。

以上のように、本論文は、生物学的排水処理法を制御するために、問題となる微生物の群集を分子生物学的手法を用いて解析することにより、その解決方法を探ったものであり今後の活性汚泥処理の制御に重要な知見を与えており、高く評価できるものであることから博士（工学）の学位に値すると判断した。