

1-3 下水処理水再利用のための残存物質の高度除去手法に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 14～平 17

担当チーム：材料地盤研究グループ(リサイクル)

研究担当者：尾崎正明，落修一，牧孝憲，庄司仁

【要旨】

下水処理水の再利用を推進するために、生物膜処理による残存有機物の除去について検討を行った。各種の微生物固定化資材に下水処理水を通水する実験を行ったところ、硝化反応はすべての固定化資材で確認されたが、有機物の低減は化成炭と活性炭のみで見られた。すなわち、固定化資材の表面形状は大きな影響を与えておらず、個々の資材を細かくすることで処理性能の向上が見られた。また、生物膜を構成する細菌は、有機物負荷の低い環境に特徴的な *Acidobacteria* 門や *Bacteroidetes* 門、硝化細菌の一種 (*Nitrospira* 属) であった。

キーワード：下水処理水，溶解性有機物，固定化資材，生物膜，細菌群集解析

1. はじめに

下水処理水中に残存する溶解性有機物は、放流先水域や処理水の再利用に悪影響を及ぼすことが指摘されている。このような残存有機物に対しては、現在のところ、オゾン処理や活性炭吸着などの物理化学的な処理手法が適用されている。下水処理水の再利用を積極的に推進するためには、より安価かつ省エネルギーな手法の開発が望まれる。

本課題では、有機物を除去する手法として生物膜処理に注目した。14年度および15年度に行った室内実験から、生物膜処理によって微生物の再増殖につながる残存有機物を低減させられることが示された¹⁾。そこで16年度より、各種の固定化資材に下水処理水を通水する実験を開始した。その目的は、各資材の特性と処理性能との関係を把握すること、ならびに、有機物除去機構を解明することである。本年度は、1) 資材表面に形成された生物膜の様子、2) 運転期間中（約500日間）の処理性能、3) 生物膜を形成する細菌群集、などの調査を行った。

2. 研究方法

2.1 実験装置の概要

2.1.1 装置の構成

円筒形（内径20cm×高さ100cm）の亚克力樹脂製カラムに資材を充填した（図-1）。カラムの上部から、二次処理および急速ろ過した高度処理水を毎分130mlの流量で通水した。カラム内部は散水濾床の形態であり、上部から流入した処理水は、内部に貯留されることなく開口部（直径30mm）から流出す

る。開口部は外気の流入も兼ねている。カラムおよび配水チューブの周囲は、アルミ箔で遮光した。

2.1.2 固定化資材

微生物の固定化資材は、表面積が大きいこと、安価であることといった条件が求められる。本研究では、安価な鉱物であるゼオライトと坑火石、また木質のリサイクル材である木炭（ダム流木原料）、化成炭（間伐材とCaCO₃の複合炭）、活性炭（市販品）を用いた。資材の詳細と充填量は表-1に示した。



図-1 固定化資材を充填した反応装置

表-1：使用した固定化資材

担体	性状概要	充填量
活性炭	粒状(10mm)	12.8kg
坑火石	原石(30~80mm篩)	3.8kg
ゼオライト	同上	18.5kg
木炭	原料：流木、大きさ：同上	19.2kg
化成炭	間伐材+CaCO ₃ 、数mm	6.1kg

2.1.3 植種

実験開始時における微生物の植種源は、複数の土壌（畑地、水田、山林、蓮田）、底泥（河川、湖沼）、活性汚泥の混合物である。カラム最上部に設置した容器にガーゼで包んだ混合物を入れて、高度処理水を通水した後、1週間で容器を取り外した。

2.2 水質測定項目

週1回の頻度で、装置の流入水（高度処理水）と処理水の水質分析を行った。試料は、ガラス繊維ろ紙（GF/B）でろ過した後、ろ液の TOC（TOC-5000、島津製作所）、 $\text{PO}_4\text{-P}$ ・ $\text{NH}_4\text{-N}$ ・ $\text{NO}_2\text{-N}$ （TRAACS オートアナライザー、Bran+Luebbe）を測定した。

2.3 固定化資材の観察

固定化資材の表面に形成された生物膜を、走査型電子顕微鏡（VE7800、キーエンス）によって観察した。生物膜を光学顕微鏡でも観察して、その性状および原生動物や微小後生動物の有無を確認した。

2.4 生物膜の細菌群集解析

化成炭の生物膜を超音波処理によって回収して、FastDNA Spin Kit for Soil（Q-BIOgene）でDNAを抽出した。抽出液をMonoFas（GLサイエンス）で精製してPCR反応に供した。増幅部位は、真正細菌の16S rRNA遺伝子のほぼ全長に相当する8fから1492rまでである。PCR産物を再精製した後、Blunting Kination Ligation Kit、*E. coli* JM109 コンピテントセル（タカラバイオ）によるライゲーション反応と形質転換を行った。反応液をLB培地に塗布して

37℃で一晩の培養後、白色のコロニーを無作為に選り、滅菌爪楊枝で少量を採取した。コロニーとPCR混合液、ベクター用のM13-M4、M13-Rvプライマーを用いてPCR反応を行った。得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動でインサートのサイズを確認して、約70個の適切なクローンを得た。

得られたクローンをMonoFasで精製して、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitでのシーケンシング反応、ABI377での塩基配列解読を行った（いずれもApplied Biosystems）。全クローンについて、341fを開始位置とする約600bpの塩基配列を得た。相違が数塩基対までのクローンを同一のOTU（operational taxonomic unit）とみなして、各OTUにM13-M4、M13-Rv、518r、1099fを開始位置とする解析も行い、対象部位の全塩基配列を解読した。得られた配列に対して、DNA Data Bank of Japanの提供する相同性検索（BLAST）を行った。

3. 研究結果と考察

3.1 顕微鏡による観察結果

3.1.1 走査型電子顕微鏡による観察結果

未使用の固定化資材を電子顕微鏡で観察したところ、図-2に示すような表面形状であることが明らかとなった。形状のみに注目すると、

- 粉末状の凹凸が見られる活性炭・ゼオライト
- 滑らかな坑火石
- 細胞の痕跡を残す木炭・化成炭

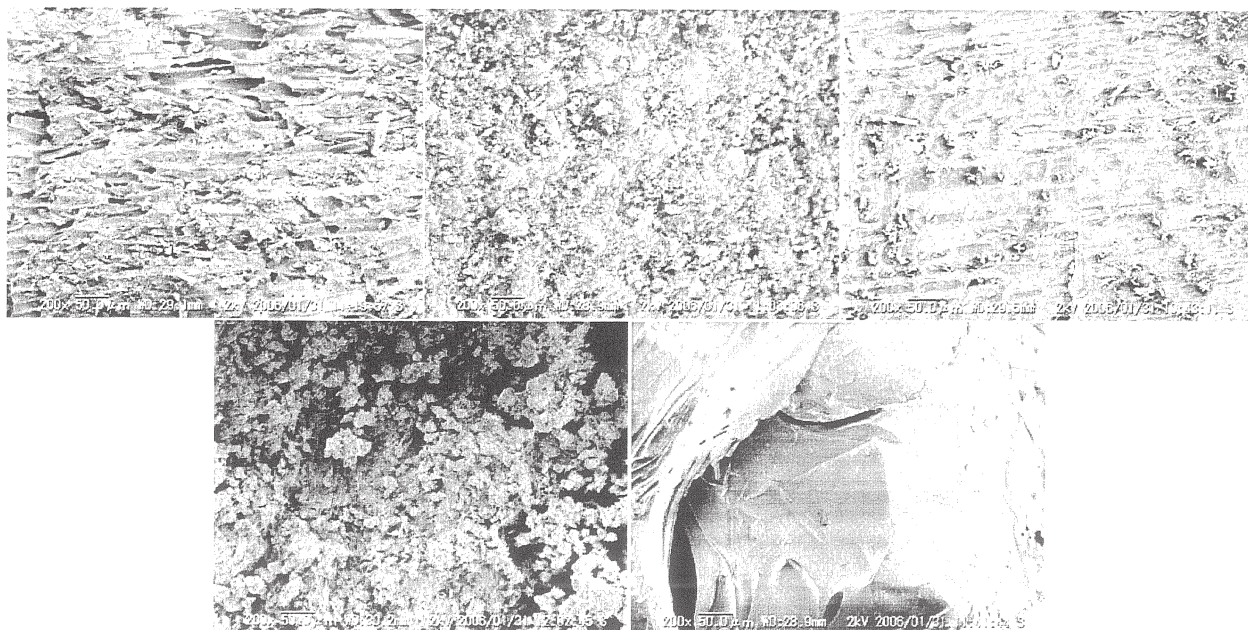


図-2 使用前の固定化資材表面（操作型電子顕微鏡・200倍）

上段左：化成炭，中：活性炭，右：木炭，下段左：ゼオライト，右：坑火石

の3種類に分けられる。ただし、固定化資材として重要な表面積は、個々の資材の大きさにも影響される。つまり、表-1に示した「大きさ」と表面形状を組み合わせる必要がある。

使用後（開始から17ヵ月）の表面は、図-3のように変化した。表面の全体を覆うような、何らかの堆積物が存在している。特に「粉末状の凹凸」の見た固定化資材では、凹凸の埋まっている様子が良く分かる。電子顕微鏡の画像からは、この堆積物が無機物のスケールなのか生物膜なのかを判断することができない。しかしながら、表面に堆積物が見られる傾向は、すべての資材で共通していた。

3.1.2 光学顕微鏡による観察結果

前述の堆積物を詳しく調べるため、圧搾したり（炭化物）、表面をかき取ったり（鉋物）して、光学顕微鏡による観察を行った。その結果、図-4のようなフロック状・茶褐色の物体や、その近傍に原生動物や微小後生動物が生息する様子などが数多く見られた。この結果と走査型電子顕微鏡での観察結果を合わせて、すべての固定化資材には、一定量の生物膜が形成されていたと考えられる。

なお、観察された原生動物は肉質虫類の *Arcella* 属、微小後生動物は線虫類の *Diplogaster* 属と推定された。前者は、硝化の進行を示す（硝化細菌を捕食する）微生物として知られている¹⁾。後者は、生物膜の更新が速い状態を示す微生物として知られている¹⁾。これらの情報も、固定化資材に生物膜が形成されていたことを支持するものである。

3.2 処理水質の推移

平均的な流入および処理水質は表-2のとおりである。また流入水・化成炭・木炭については、経時変化を図-5に示した。

処理の主目的である有機物は、化成炭と活性炭で

10%程度の低減が見られたものの、その他の資材ではほとんど変化が見られなかった。この数字は決して高いものではないが、通水するだけで一定の効果が得られたという意味では、処理技術としての可能性を示す結果である。



図-3 使用後の固定化資材表面
上：活性炭（湿潤），下：ゼオライト（風乾）

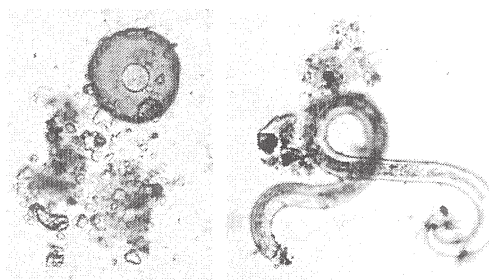


図-4 フロック状生物膜と原生動物（左）
微小後生動物（右）

表-2 流入水および処理水の水質測定結果

	流入水	化成炭	活性炭	木炭	ゼオライト	坑火石
TOC [mg/l]						
平均 (標準偏差)	5.47 (1.25)	4.78 (1.14)	4.92 (1.19)	5.42 (1.20)	5.39 (1.24)	5.41 (1.19)
対 流入水	-	13%減	10%減	1%減	2%減	1%減
NO ₃ -N [mg/l]						
平均 (標準偏差)	5.98 (1.53)	6.19 (1.51)	6.30 (1.56)	6.00 (1.49)	6.06 (1.52)	6.04 (1.52)
対 流入水	-	3%増	5%増	0%増	1%増	1%増
NH ₄ -N [mg/l]						
平均 (標準偏差)	0.10 (0.28)	0.03 (0.06)	0.04 (0.03)	0.05 (0.11)	0.04 (0.06)	0.04 (0.06)
対 流入水	-	70%減	61%減	50%減	64%減	62%減
PO ₄ -P [mg/l]						
平均 (標準偏差)	0.17 (0.20)	0.17 (0.19)	0.21 (0.22)	0.18 (0.21)	0.19 (0.21)	0.19 (0.21)
対 流入水	-	1%減	19%増	6%増	7%増	7%増

窒素に関しては、すべての資材でアンモニア性窒素の減少が観察されており、減少率も50%以上の高い値となった。図-5からは、流入水に見られる突発的なアンモニアのピークが、処理水では目立たなくなっていることが分かる。アンモニア性窒素の減少に対応するように、硝酸性窒素も増加傾向を示している。これらの結果は、本装置において硝化反応が活発であった一方、脱窒反応は活発でなかったことを示唆している。

リン酸は、化成炭を除いて増加した。個々の測定値も、実験開始当初から終盤に至るまで定常的にリン酸の増加傾向を示した。したがって、資材からの溶出も否定できないが、流入水からも、オルトリン酸以外の形で定常的に供給された可能性が高い。本装置でリンの収支を正確に評価する場合には、全リンの測定が必要であった。

3.3 細菌群集構造の解析結果

3.3.1 生物膜の細菌群集構造

解析に成功した68個のクローンを門/綱で分類したところ、図-6のようになった。主要な細菌としては、*Acidobacteria*と*Bacteroidetes*が20%程度、 β -および α -*proteobacteria*と*Nitrospira*が12~15%などであった。以下では、既存の知見を踏まえて、それぞれの特徴を整理する。

最も多く検出された*Acidobacteria*は、極めて難培養性の細菌であり、単離された菌株はほとんど存在しない。遺伝子の検出例は土壌を中心に豊富であり、土壌において多様な機能を担っていると推定されている³⁾。水圏での検出例も見られるが、活性汚泥からの検出例は稀である。

同様に高い比率で検出された*Bacteroidetes*は、土壌や水圏で広く見られる種類である。水処理との関係では、酢酸やアミノ酸といった低分子の有機物よりも、細菌の細胞構成成分のような高分子有機物を利用する傾向が報告されている⁴⁾。

β -および α -*proteobacteria*は、いずれも活性汚泥中で標準的に見られる細菌群である。多様な機能を持つ細菌で構成されているが、特に本実験と関連の深いものとして、硝化細菌(アンモニア酸化細菌)である*Nitrospira*属に近縁なクローン(1個)が検出された。

*Nitrospirae*に属しているものは、いずれも亜硝酸酸化細菌であると推定された。このことと、前述のアンモニア酸化細菌の存在から、硝化能力の高さが微生物学的にも確認できたと言える。

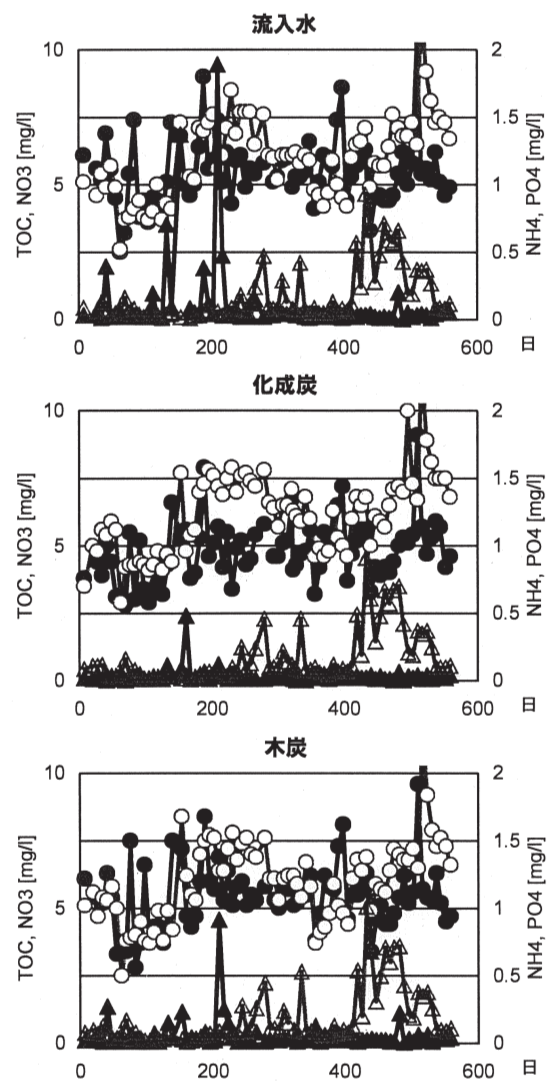


図-5 流入水質および処理水質の経時変化

● : TOC, ○ : NO₃-N (右軸)
▲ : NH₄-N, △ : PO₄-P (左軸)

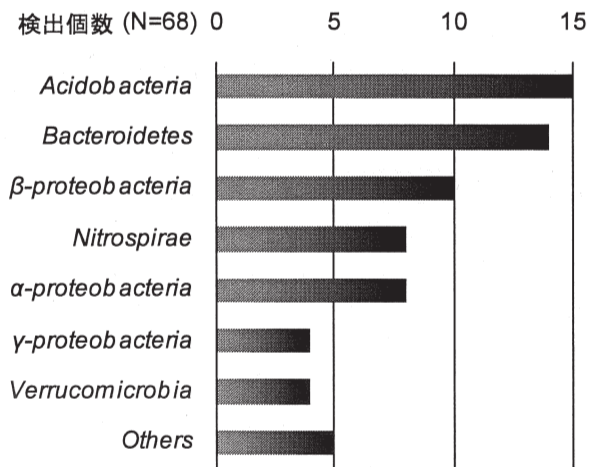


図-6 検出されたクローンの分類

なお、全体的な細菌群集構造が類似していた報告例として、Martinyらの解析結果⁵⁾がある。彼らは、浄水の配水管を模した実験装置に形成された生物膜から *Nitospira* 属 (25%) や *Acidobacteria* (14%) に近縁な遺伝子を多く検出している。

3.3.2 細菌群集構造と有機物の流れ

下水処理水 (二次処理水) の溶解性・残存有機物は、その由来によって以下のように分類できる。

- 流入下水に含まれる生分解性の低い有機物
- 基質利用や増殖にともなう代謝産物 (UAP : utilisation associated products⁶⁾)
- 死滅や溶菌にともなう有機物 (BAP : biomass associated products⁶⁾)

活性汚泥処理の後段である本研究の処理対象は、主に UAP と BAP になる。

前述のとおり、処理性能の比較的良好だった化成炭の生物膜では、*Acidobacteria* と *Bacteroidetes* が優占的な従属栄養細菌であった。Kindaichi ら⁴⁾ は、細胞壁の主要成分である N-アセチル D-グルコサミンを、*Bacteroidetes* に属する細菌が優先的に摂取すると述べている。また Martiny ら⁵⁾ は、有機物濃度の極めて低い環境で存在した *Acidobacteria* 門の細菌は、硝化細菌の代謝産物を利用している可能性が高いと述べている。これらの知見から、本研究においても、UAP や BAP を利用する細菌を多く含む生物膜が形成されたものと判断できる。

一方、生物膜を有機物の除去装置として考えた場合、硝化細菌の存在が機能の低下につながる可能性もある。たとえば Kindaichi らは、炭酸塩を唯一の炭素源とする生物膜において、培養開始から 3ヶ月が経過した後でも、硝化細菌と従属栄養細菌の存在比率が半々であったと報告している⁴⁾。これは、硝化細菌によって、多数の従属栄養細菌が生育できるほどのな有機物 (UAP や BAP) が供給されていたことを意味する。したがって、硝化細菌と見られるクローンが多数 (13%) を占めていた本実験でも、生物膜における有機物の挙動については、従属栄養細菌による分解だけでなく、硝化細菌や従属栄養細菌による UAP・BAP の生成も考慮する必要がある。

3.4 処理性能と固定化資材との関係

3.4.1 材質の影響

本実験に使用した固定化資材は、大きく分けて炭化物と鉱物である。特に木炭とゼオライト・坑火石は同程度の大きさであるため、材質の影響に特化した検討が可能である。これらの資材では、一定かつ

表-3 実験終了時におけるカラム内平均流下時間

ケース	流量 (mL/min)	平均流下時間 (min)
化成炭	142	4.00
活性炭	140	3.96
木炭	140	0.92
ゼオライト	145	1.05
坑火石	135	1.14

同程度の硝化能力は発揮されるものの、有機物濃度の低減は見られなかった。したがって、本実験で使用した資材については、処理性能への影響は小さいものと結論付けられる。

3.4.2 大きさ・表面形状の影響

3種類の炭化物は、それぞれ大きさと表面形状 (粉末状/細胞の痕跡) が異なっている。一方、処理水質については、有機物濃度が低下した化成炭・活性炭と、ほとんど低下しなかった木炭に分けられる。このことから、個々の資材が小さければ、表面形状によらず、ある程度の処理性能を発揮できると考えられる。

表-3は、実験終了時にトレーサ試験を行い、生物膜形成下におけるカラム内の流下時間を測定した結果である。本実験結果は全てこのような流下時間が極めて短いところでの現象であり、この結果は、例えば、水質的に大きな改善が見られなかったとしても、リアクターの流況、形式を工夫することにより、より大きな改善が望める可能性があることを示唆している。

したがって、本研究のように安価な生物膜処理法を目指す場合には、表面の加工を工夫したり特殊な材質を選んだりするよりも、適切な大きさ (砕き方) と、その適用、敷設方法を検討すべきである。

4. まとめ

本研究では、各種の微生物固定化資材に下水処理水を通水する実験から、資材の特性と処理性能との関係、ならびに有機物除去機構について検討を行った。その結果、以下のことが分かった。

- 1) 実験に用いた固定化資材の表面には、全体を覆う生物膜が形成されていた。その近傍には、生物膜や特定の細菌 (硝化細菌) を捕食する、原生動物や微小後生動物が観察された。
- 2) 化成炭と活性炭を用いた生物膜処理では、溶解性有機物濃度を約 10% 低減できた。一方、木炭やゼオライト、坑火石では、有機物の低減が見

られなかった。

- 3) このような相違は、主に資材の大きさに影響されており、表面形状の影響は小さいものと考えられた。
- 4) すべての固定化資材には、硝化能力を有する生物膜が形成されていた。
- 5) 化成炭に形成された生物膜は、*Acidobacteria* と *Bacteroidetes* (約 20%)、*Nitrospira* と β -および α -*proteobacteria* (12~15%) などの細菌で構成されていた。
- 6) 既存の知見との比較から、生物膜を構成する細菌は、硝化 (*Nitrospira*) や、代謝産物のような高分子系有機物を利用する (*Acidobacteria* と *Bacteroidetes*) といった特徴を有していた。これらは、活性汚泥法とは異なり、有機物負荷の低い環境で見られるものであった。

本研究の結果からも分かるように、現状の生物膜処理は、安価という利点の一方で、処理能力の上限という問題点も抱えている。この「上限」の理由を解明する、あるいは処理能力向上の可能性を見極めるためには、生物学的な観点から有機物の挙動を明らかにすることが重要だろう。すなわち、流入水に由来する有機物に加えて、独立栄養細菌(硝化細菌)が固定する有機物や、従属栄養細菌の産生/放出する有機物を対象に、化学的な組成と細菌群集との対応、細菌同士の有機物を介した相互作用といった機構の解明が、今後の課題として挙げられる。

謝辞

実験にあたって、霞ヶ浦流域下水道事務所(茨城県)の協力を得た。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 日本下水道協会：下水試験方法(上巻)，1997
- 2) 鈴木稔，金時浚：“下水処理水再利用のための残存物質の高度除去手法に関する研究”，平成14年度下水道関係調査研究年次報告書集，土木研究所資料 No.3917，pp.229-234，2003.
- 3) Barns S.M. *et al.*：“Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment”，*Applied and Environmental Microbiology*，65(4)，pp.1731-1737，1999.
- 4) Kindaichi T. *et al.*：“Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization”，*Applied and Environmental Microbiology*，70(3)，pp.1641-1650，2004.
- 5) Martiny A.C. *et al.*：“Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrite-oxidizing population associated with *Nitrospira* spp.”，*Applied and Environmental Microbiology*，71(12)，pp.8611-8617，2005.
- 6) Barker D.J. *et al.*：“A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems”，*Water Research*，33(13)，pp.3063-3082，1999.