

# 衛生リスク低減を見据えた病原細菌の消長の評価と 適地型排水処理技術の開発と実装支援

(所内公募型提案研究)

Evaluation of the fate of pathogenic bacteria with a view to reducing hygiene risk and development and implementation of appropriate wastewater treatment technology

令和3～令和5年度  
FY2021～2023

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所  
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES  
<https://www.nies.go.jp/>

**衛生リスク低減を見据えた病原細菌の消長の評価と  
適地型排水処理技術の開発と実装支援**  
(所内公募型提案研究)

Evaluation of the fate of pathogenic bacteria with a view to reducing hygiene risk and  
development and implementation of appropriate wastewater treatment technology

令和3～令和5年度  
FY2021～2023

所内公募型提案研究

「衛生リスク低減を見据えた病原細菌の消長の評価と適地型排水処理技術の開発と実装支援」

(期間：令和3～5年度)

課題代表者：珠坪一晃

執筆者：珠坪一晃、青木仁孝、竹村泰幸、富岡典子、松浦哲久

編者：珠坪一晃

## 序

本報告書は、令和3年度～5年度の3年間にわたって実施した所内公募型提案研究「衛生リスク低減を見据えた病原細菌の消長の評価と適地型排水処理技術の開発と実装支援」の研究成果をとりまとめたものです。

世界の生活排水の約8割が未処理で環境中に排出され、深刻な環境汚染を引き起こし、特に途上国では衛生リスクの主要因となっています。また、東南アジアの都市部では水資源が不足しており、排水処理設備の普及に伴って、処理水の循環利用が重要な課題となっています。例えばバンコク（タイ）では、排水処理後の処理水を道路洗浄や樹木への散水の目的で利用していますが、処理水質の管理が不十分なため、水系感染症のみならず病原性細菌の大気飛散による健康被害も懸念されています。

こうした状況の中、本研究では、東南アジア途上国などでの水質管理、安全な水利用への貢献を目指し、国内外の研究機関と連携して、生活排水に含まれる病原性細菌の排水処理施設における消長の評価、適切な排水処理・再利用技術の開発と実証、排水処理技術の社会実装に必要な技術認証取得と実装の3つの課題に取り組みました。

本研究を通じて、排水処理施設において大腸菌を指標とする事で主要な病原性細菌の除去特性を把握できること、一方大腸菌とは挙動が異なり、今後モニタリングが必要な病原性細菌も存在することを明らかにしました。また、バンコクの一部の排水処理施設の処理水に比較的多くの病原細菌が残存することが明らかになり、処理水の再利用時における安全性確保行動のための情報提供に繋がりました。さらに、消費エネルギーが少なく維持管理が容易なスポンジ担体を用いる好気性ろ床が、既存排水処理施設の後処理、衛生管理技術として有効である事を通年での排水処理試験を通じて実証しました。最終的に、開発を行った好気性ろ床の技術認証を取得し、タイの日系民間企業の社宅排水処理設備の後処理施設として実規模導入される事で、東南アジアにおける水質管理、衛生環境の確保、安全な処理水の再利用に貢献することが出来ました。これらの成果が今後、東南アジア、日本の地方都市における環境管理の参考となりますことを願っております。

最後に、本研究を進めるにあたり、研究所内外の多くの方々にご協力とご支援を頂きました。ここに深く感謝いたします。

令和6年10月

国立研究開発法人 国立環境研究所

理事長 木本昌秀

# 目 次

1. 研究の概要	1
1.1 研究の目的	1
1.2 研究の構成	2
2. 研究の成果	4
サブテーマ1: 病原性細菌の検出手法の開発と消長解析	
2.1 病原性細菌の検出・定量のための技術開発	4
2.1.1 目的と経緯	4
2.1.2 方法	4
2.1.3 結果と考察	7
2.1.4 まとめ	11
2.2 排水処理施設、環境水における病原性細菌の消長評価	14
2.2.1 目的と経緯	14
2.2.2 方法	14
2.2.3 結果と考察	16
2.2.4 まとめ	22
2.3 大腸菌の衛生指標としての有用性評価	24
2.3.1 目的と経緯	24
2.3.2 方法	24
2.3.3 結果と考察	25
2.3.4 まとめ	27
サブテーマ2: 処理水質の確保と再利用を見据えた処理技術の開発と実証	
2.4 スポンジ担体を用いる好気性ろ床法 DHS による生活排水処理水の後処理試験	28
2.4.1 目的と経緯	28
2.4.2 方法	28
2.4.3 結果と考察	29
2.4.4 まとめ	32
2.5 DHS のラボ試験装置による窒素除去特性、HRT 統一、短・長 DHS での違い	33
2.5.1 目的と経緯	33
2.5.2 方法	33
2.5.3 結果と考察	34
2.5.4 まとめ	36
2.6 DHS のラボ試験装置による病原菌除去機構の解析	37
2.6.1 目的と経緯	37
2.6.2 方法	37

2.6.3	結果と考察	38
2.6.4	まとめ	41
2.7	DHSの浄水分野への適用可能性評価	42
2.7.1	マレーシアにおける水源河川の窒素汚染の把握	42
2.7.1.1	目的と経緯	42
2.7.1.2	方法	42
2.7.1.3	結果と考察	42
2.7.1.4	まとめ	44
2.7.2	ラボスケールDHSによるアンモニア性窒素除去性能の検討、浄水技術への応用の可能性評価	44
2.7.2.1	目的と経緯	44
2.7.2.2	方法	44
2.7.2.3	結果と考察	45
2.7.2.4	まとめ	47
サブテーマ3：適切排水処理技術の実装支援		
2.8	DHSの技術確認申請とタイでの実機導入	48
2.8.1	目的と経緯	48
2.8.2	方法	48
2.8.3	結果と考察	49
2.8.4	まとめ	51
3.	まとめと今後の展望	52
[資料]		
1	研究の組織と研究課題の構成	55
1.1	研究の組織	55
1.2	研究課題と担当者	55
2	研究成果発表一覧	56
2.1	誌上発表	56
2.2	口頭発表	57

# 1 研究の概要

## 1.1 研究の目的

世界で排出される生活排水の8割が未処理で環境中に排出され、深刻な水質汚染を引き起こし、特に途上国においては衛生リスクの主要因となっている。途上国では社会経済的な制約から衛生設備である生活排水処理インフラの導入、維持が困難であることが主な原因である。また、既存の排水処理施設でも装置構成上の問題や、運転方法が不適切なため処理水質は十分でなく、処理水の再利用が進む現状を鑑みても適切な処理技術の導入が急務である。例えば、タイ、バンコクの下水処理場では、6～9% (v/v) の処理水が道路洗浄や樹木への散水の目的で利用されているが、処理水質が不十分で大腸菌 ( $10^4$  cells/ml, 実測値) などが高濃度に残存しており、水系感染症のみならず病原性細菌の大気飛散(エアロゾル摂取による肺炎等)による健康被害も懸念されている。また、マレーシア、クアラルンプール近郊などでは、乾期に水源の河川水の窒素濃度(アンモニア性窒素 [ふん便汚染指標]、硝酸性窒素 [メトヘモグロビン血症の要因])が基準値を超過し、水道水の供給が停止する事例も多く報告されている。



図1 東南アジア地域での水質汚染と衛生リスク。未処理生活排水の流入や水質が不十分な処理水の再利用による健康リスクの高まり

水域にふん便汚染がある場合には、同時に赤痢菌等の病原性細菌が存在する可能性があり、公衆衛生上の問題となる。これまで、温血動物の腸管内に常在する通性嫌気性細菌の中で最も数の多い大腸菌(群)が生活環境項目環境基準および一律排水基準として選択されてきた。しかし、大腸菌とその他の病原性細菌(*Arcobacter*属細菌、*Campylobacter*属細菌など)の水環境での生残性は必ずしも一致しないという報告もあり、排水や汚染環境の水試料に含まれる病原性細菌を網羅的に調査し、大腸菌の衛生指標としての有効性評価と、衛生学的なリスクの低減に必要な技術の選定を行う必要がある。

このように、生活排水に起因する水質・衛生リスクが顕在化する中で、汚染水に由来する衛生学的な安全性を確保するためには、窒素や病原性細菌の排出抑制と再増殖を防ぐための適切な基準(排水基準、水質基準)の設定や、それらの管理に有効な適切な排水処理技術(維持管理が容易[安価]かつ処理水質に優れる)の実証と、社会実装を進めるための技術・制度面からの支援(技術確認の取得など)が必要である。

研究代表者らは、前中期計画「安全確保研究プログラム(PJ7, 地域の水環境保全に向けた水質改善・評価手法の開発プロジェクト)」において、生活排水の分散処理に対応可能な適地型の排水処理技術(スポンジ担体を用いる好気性ろ床法、(Down-flow Hanging Sponge:DHS, 排水量 50～1,500 m<sup>3</sup>/日[200～6,000 人]程度の中規模処理に対応)の開発と性能実証をバンコク都との連

携により実施してきた。その結果、安定した処理水質を少ない消費エネルギー(=低コスト)で得ることが出来、途上国における生活排水処理技術としての導入ポテンシャルが立証された。一方、バンコクにおける既存の排水処理設備の現状調査から、処理水質が十分でない施設も散見されたため、処理水の水質や衛生学的な安全性を確保し再利用を進めるため、また浄水分野などへの技術の適用範囲拡大のため、当該 DHS 法の後処理技術および低濃度窒素汚染河川水の浄化技術としての技術開発と性能実証を実施する必要がある。

以上の様な背景から本研究では、①生活排水に由来する病原性細菌の排水処理施設や水環境における消長と窒素などの水質項目との関係性の評価、②水質汚染に起因する衛生リスクを管理・低減していくための適切な排水処理・再利用技術の開発と実証、③排水基準の検討に資するデータ収集、社会実装を進めるための技術確認取得など制度面からの支援、を行うことで、東南アジア途上国などでの水質管理、安全な処理水利用に貢献する事を目的とした。

## 1.2 研究の構成

本課題の目標を実現するために、以下の3つのサブテーマに関する研究を実施した。また図2には、研究のフローチャートを示した。

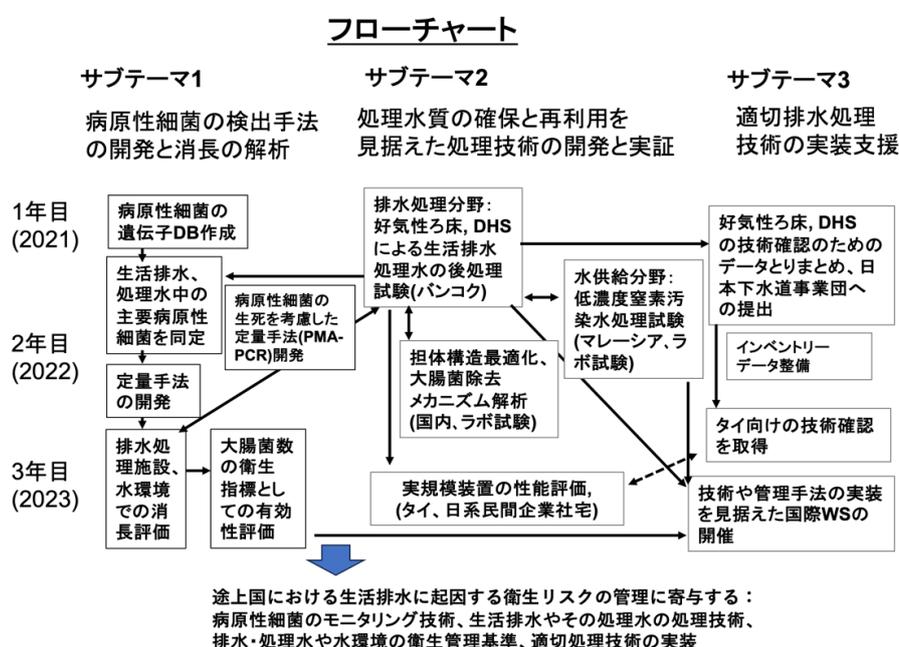


図2 研究のフローチャート、各サブテーマの年度ごとの実施内容とその関係性

### 【サブテーマ1】病原性細菌の検出手法の開発と消長の解析

その1：病原性細菌を網羅的に検出するためのデータベース作成

生活排水や汚染環境水に含まれる病原性細菌を網羅的かつ効率的に同定・検出するために、新たに病原性細菌の遺伝子データベースを作成する。構築した病原性細菌遺伝子データベースと超並列 DNA シーケンス技術を利用した解析法を国内外の排水処理施設の流入排水、処理水および汚染環境水に適用し、生活排水などに普遍的かつ優占的に存在する主要な病原性細菌グループを把握する。

その2：病原性細菌の定量手法の開発と水環境、排水処理施設での消長評価

その1で特定した病原性細菌群の代表的グループのモニタリング手法の開発を目的として、定量PCR(リアルタイムPCRおよびデジタルPCR)による高精度定量系の構築(プライマー設計、増幅条件最適化)を行う。構築した定量手法を用いて国内外の排水処理施設での主要な病原性細菌の消長を衛生指標細菌である大腸菌(*E.coli*)と共に評価する。

また、バンコク都内の汚染水路における水質と病原性細菌の存在量との関係性評価を行い、水質管理目標設定のための知見を得る。

さらに、開発した病原性細菌の定量手法を用いてサブ 2 で実施した（スポンジ担体を用いる好気性ろ床, Down-flow Hanging Sponge (DHS)）排水処理試験において病原性細菌の除去特性の評価を行う。その他、病原性細菌グループの生死（細胞の損傷, 増殖能 = 感染能）を判別し、定量する手法（Propidium Monoazide (PMA) -PCR 法）についての有効性検証、栄養塩であるアンモニアの濃度と特定の病原性細菌グループの生残に関する評価を実施する。

#### 【サブテーマ 2】 処理水質の確保と再利用を見据えた処理技術の開発と実証

##### その 1: スポンジ担体を用いる好気性ろ床法, DHS による生活排水処理水の後処理試験

処理水質が不十分（窒素、病原性細菌が残存）な処理水の後処理技術の開発と性能実証を目的とし、集合住宅排水の処理施設、Bongai 処理場（バンコク）に実証規模 DHS 装置を設置する。本装置により、活性汚泥処理水と生活排水を混合させた水質が不十分な模擬処理水の DHS による仕上げ処理を行う。

また、DHS による病原菌除去機構の解析のため、排水流下長の異なるラボ試験装置を 2 系統作成し、大腸菌を添加した合成下水の処理実験を行って、装置形状最適化に資する知見を収集する。

##### その 2: DHS の浄水分野への適用可能性評価

マレーシア、クアラルンプール近郊における水源河川の窒素汚染の状況を整理してとりまとめる。また、複数の浄水施設を訪問し、現状の処理施設構成や運用状況に関する情報を収集する。さらに、浄水プロセスへの技術適用を考慮した低濃度アンモニア性窒素汚染水のラボでの DHS による処理試験を実施する。

#### 【サブテーマ 3】 適切排水処理技術の実装支援

DHS のタイでの生活排水処理技術としての展開を図るため、タイにおける実証試験データを取りまとめ、日本下水道事業団 (JS) へ技術確認申請を行う。その他、タイの民間企業の社宅排水処理設備（既存の浄化槽の後処理施設）としての導入支援を行うと共に、実規模での性能評価を行う。

以下に各サブテーマにおける達成目標を示す。

#### 【サブテーマ 1】 病原性細菌の検出手法の開発と消長の解析

衛生リスクを有する細菌群（病原菌）の中から代表的なグループ（群）を選定し、その検出・定量法を確立する。大腸菌と共に挙動解析を行い、衛生指標としての大腸菌の有用性についての見解を示す。これにより環境基準、排水基準の検討や水環境管理技術（排水処理施設）の検討、導入に貢献する。

#### 【サブテーマ 2】 処理水質の確保と再利用を見据えた処理技術の開発と実証

生活排水処理水の衛生的な水質の確保に資するため、分散型生活排水処理システム（スポンジ担体を用いる好気性ろ床, DHS）による後処理技術の基礎を確立し、処理水の放流や、再利用における安全性確保のための設計条件を提示する。

#### 【サブテーマ 3】 適切排水処理技術の実装支援

民間企業や自治体などと連携し、DHS の海外実装を支援するためのタイを対象とした技術確認の取得を行うと共に、後処理技術としての導入を目指す。

## 2. 研究の成果

### サブテーマ1：病原性細菌の検出手法の開発と消長解析

#### 2.1 病原性細菌の検出・定量のための技術開発

##### 2.1.1 目的と経緯

生活排水に起因する衛生学的リスクを評価し、さらにはそのリスクを低減するための適切な対策を講じる上で、生活排水や環境水から病原性細菌を網羅的かつ迅速に検出できる技術は有用である。生活排水や環境水には病原性細菌に限らず多種多様な細菌が存在するが、超並列 DNA シーケンサーを用いて、原核生物が共通して保有する系統学的分類マーカー「16S rRNA 遺伝子」の塩基配列情報を大量取得し、これを一括に解析する「16S rRNA アンプリコン解析」を利用すれば、試料中の優占的な細菌のみならず希少な細菌も一括して検出することが可能である。しかし、病原性に関する情報が利用できない一般的な 16S rRNA 遺伝子データベース（例：SILVA）（Quast et al. 2013）を解析に用いる場合、取得した大量の 16S rRNA 遺伝子配列（数万配列/試料）から多種多様な病原性細菌由来の遺伝子配列を網羅的に特定するには多大な労力を有する。このため、病原性細菌由来の遺伝子配列のみを迅速に検出するための遺伝子データベースがいくつか開発されている（Miao et al. 2017; Bal Krishna et al. 2021）。しかし、既存のデータベースは、1) 特定の病原性細菌に特化しており、多種多様な病原性細菌の網羅的検出には向かない、2) バイオセーフティーレベル（biosafety level: BSL）などの個々の病原性細菌のリスクレベルとの紐づけがなされていない、などの欠点がある。

そこで本研究では、病原性細菌の BSL 情報も取得可能な網羅的な病原性細菌遺伝子データベースの構築を行った。次に、国内およびタイ・バンコク都で稼働しているさまざまな排水処理施設から取得した試料対して本遺伝子データベースを利用した 16S rRNA アンプリコン解析を適用し、生活排水に普遍的かつ優占的に存在する主要な病原性細菌グループの把握を行った。さらに、主要な病原性細菌群として検出された細菌グループの内、それらの一部については、それらの排水処理施設や環境水中での消長を高精度で評価するためのリアルタイムおよびデジタル PCR 検出・定量系を構築した。最後に、生菌由来の遺伝子の特異的検出に有用とされる DNA 修飾色素「プロピジウムモノアジド（propidium monoazide: PMA）」（Zheng et al. 2016）を用いた前処理方法について、その有効性を評価した。

##### 2.1.2 方法

###### 病原性細菌遺伝子データベース構築

本研究では、日本細菌学会が公開している「病原細菌の BSL」 ([http://jsbac.org/infectious\\_disease/index.html](http://jsbac.org/infectious_disease/index.html)) に基づき、16S rRNA 遺伝子配列を対象とした病原性細菌遺伝子データベースを構築した。病原性細菌の BSL は、リスクの低い BSL 1 からリスクの高い BSL 3 までの 3 段階で定義されているが、本データベース作成の基となった菌種数は、BSL1 細菌で 693 種、BSL2 細菌で 381 種、BSL3 細菌で 46 種である。まず、16S rRNA 遺伝子の包括的なデータベースの 1 つである SILVA release 132（Quast et al. 2013）より、これらの病原性細菌種が保有する 16S rRNA 遺伝子配列の抽出を行った。次に、高品質な配列データの選定（潜在的なキメラ配列の除去）、株ごとに異なる配列や完全に同一な遺伝子配列の整理などを行った。本作業により、BSL1 細菌については 718 配列、BSL2 細菌については 682 配列、BSL3 細菌については 56 配列で構成される遺伝子データベースの構築に至った。なお、本データベースは、病原性細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を整理した FASTA 形式ファイルとその遺伝子配列を有する病原性細菌種名を整理したテキストファイルで構成される（図 3）、BSL ごとに合計 3 セットのファイル構成となっている。FASTA 形式ファイルは相同性検索ソフトウェア BLAST（Altschul et al. 1997）を利用した相同性検索における参照が可能である。また、SILVA データベースで定義された固有 ID により、FASTA 形式ファイルに整理された遺伝子配列とテキストファイルに整理されたその遺伝子配列を保有する病原性細菌種名を紐づけられている。本データベースは、成果論文である Galagoda et al. (2023) の Supporting Information の一部として公開されている (<https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00349>)。



図3 構築した病原性細菌遺伝子データベース。本データベースは、(a) 病原性細菌の16S rRNA 遺伝子配列のリスト (FASTA ファイル形式)、(b) 病原性細菌種名のリスト (テキストファイル形式) で構成。

### 研究対象とした生活排水処理施設

生活排水に普遍的かつ優占的に存在する主要な病原性細菌グループを把握するため、日本国内およびタイ・バンコク都で稼働している合計 18 の生活排水処理施設を対象とし、その流入排水およびその処理水を採取した。日本国内で対象とした生活排水処理施設は、A 県のコミュニティ・プラント 3 施設と農業集落排水施設 1 施設、B 県および C 県の公共下水道施設 2 施設、D 県の流域下水道施設 1 施設、ならびに A 県および D 県に設置された小型浄化槽 4 施設 (A 県または D 県に設置され、このうち D 県の 2 施設は生活排水処理試験を行うラボ試験機) とした。日本国内の施設では、塩素消毒前後で試料採取が可能な場合、その両方の試料を採取した。バンコク都で対象とした排水処理施設は、腐敗槽 2 施設、分散型処理施設 2 施設、ならびに集約型処理施設 3 施設とした。腐敗槽に関しては、試料採取の制約から、それらの反応槽内から回収した試料を解析に用いた。

### 病原性細菌遺伝子データベースを用いた 16S rRNA アンプリコン解析

取得した流入排水および処理水試料に含まれる細菌細胞は、原則として孔径 0.2 μm の Omnipore PTFE メンブレンフィルター (Merck) を用いてろ過濃縮し、その後、Extrap Soil DNA Kit Plus ver. 2 (株式会社バイオダイナミクス研究所) を用いたビーズ破砕法により、濃縮細胞から DNA 抽出を行った。続いて、16S rRNA アンプリコンシーケンス解析の試料調製は、Aoki et al. (2022) の方法に従って行った。解析対象である 16S rRNA 遺伝子の網羅的な増幅は、全原核生物の 16S rRNA 遺伝子を網羅的に増幅可能な 515F と 806R プライマーセット (Caporaso et al. 2011) を用いた polymerase chain reaction (PCR) により行った。超並列 DNA シーケンサー MiSeq (Illumina 社) による DNA シーケンシングで得られた生リードに含まれるプライマー配列は、配列トリミングソフトウェア cutadapt version 3.5 (Martin 2011) を用いて取り除いた。その後、微生物群集構造解析用ソフトウェア mothur version 1.44.1 (Schloss et al., 2009) によるデータ解析を標準的操作手順 ([https://mothur.org/wiki/miseq\\_sop/](https://mothur.org/wiki/miseq_sop/)) に従って実施した。mothur 解析においては、DNA シーケンシングにおける一般的なエラー率 (読み間違い率) を考慮し、2 塩基ミスマッチ以内の配列同士を同一配列として取り扱い、それらの代表配列を以降の解析に使用した。最終的に得られた 16S rRNA 遺伝子配列を問い合わせ配列とし、上述の病原性細菌遺伝子データベースを塩基配列データベースとして、BLAST+ アルゴリズム 2.6.0 (Altschul et al. 1997) による同源性検索を実施した。この同源性検索では、まずは、BSL3 の遺伝子データベースを使用し、問い合わせ配列と 99.5% 以上の同源性を示す配列が存在するかどうかを調べた。BSL3 のデータベースに 99.5% 以上の同源性を示す配列が存在しない場合は、順次 BSL2、BSL1 のデータベースを利用して同様の同源性検索を実施した。本検索で 99.5% 以上の配列同源性がある遺伝子配列がデータベースに存在する場合、その同源性検索においてトップヒットとなった遺伝子配列を有する細菌種名に基づき、検出された 16S rRNA 遺伝子配列を属レベルで特定の病原性細菌グループに割り当てた。

## リアルタイム PCR

*Aeromonas*、*Arcobacter*、*Klebsiella pneumoniae* species complex (KpSC) および *Mycobacterium* を対象としたリアルタイム PCR による特異的検出・定量系の構築を行った。本研究で使用したリアルタイム PCR 用のプライマーとプローブ配列を表1に示した。*Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* については 16S rRNA 遺伝子、KpSC については非コード DNA 領域配列を標的とした検出・定量系を採用した。*Aeromonas* と *Arcobacter* に関しては、新たに設計した PCR プライマーを用いてリアルタイム PCR 条件の最適化を行った。KpSC および *Mycobacterium* に関しては、既報のプライマーおよびプローブ配列情報を利用し (Barbier et al. 2020; Garcia-Quintanilla et al. 2002; Radomski et al. 2010)、本研究で使用したリアルタイム PCR 装置 LightCycler96 システム (ロシュ・ダイアグノスティックス) と専用 PCR 酵素の組み合わせにおける最適なリアルタイム PCR 条件を検討した。*Aeromonas*、*Arcobacter*、および KpSC を対象としたリアルタイム PCR は、蛍光物質である「サイバークリーン I」を用いて PCR 増幅量をリアルタイムモニタリングすることで標的 DNA (遺伝子) を検出・定量するインターカラーター法を採用した。インターカラーター法では、PCR 酵素として FastStart Essential DNA Green Master (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用し、PCR 反応後には融解曲線分析により特異的な PCR 増幅が生じていたかを確認した。*Mycobacterium* に関しては、蛍光物質とそのクエンチャー (消光物質) を標識した DNA プローブを利用し、PCR 増幅時の DNA プローブの加水分解に伴う蛍光をリアルタイムモニタリングすることで、標的 DNA を検出・定量する加水分解プローブ法を採用した。使用したプローブの 5'末端は蛍光物質「6-カルボキシフルオレセイン」、3'末端は消光物質「ブラックホールクエンチャー 1」で標識し、PCR 酵素には FastStart Essential DNA Probes Master (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用した。陽性コントロールならびにリアルタイム PCR 定量で必須となる標準 DNA には、それぞれのプライマーとプローブの結合配列を有する人工合成フラグメント DNA (ユーロフィンジェノミクス) を使用した。最適な PCR 条件における検出限界値は、異なる濃度の標準 DNA の PCR 増幅結果に基づき決定した (Price et al. 2012)。16S rRNA 遺伝子コピー数の細胞数への換算は、遺伝子コピー数を対象細菌グループにおける 1 ゲノム DNA あたりの 16S rRNA 遺伝子コピー数の中央値 (*Aeromonas* : 10 コピー/ゲノム DNA、*Arcobacter* : 5 コピー/ゲノム DNA、*Mycobacterium* : 1 コピー/ゲノム DNA) (Stoddard et al. 2015) で割ることにより行った。KpSC に関しては、DNA 1 コピーを 1 細胞に換算した。各リアルタイム PCR の PCR 増幅効率  $E$  (%) は、以下の式 (1) により求めた。

$$E (\%) = (10^{-1/S} - 1) \times 100 \dots (1)$$

ここで、 $S$  は標準 DNA の 10 倍希釈系列の PCR 増幅結果に基づく検量線の傾きである。

表1 リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブ配列

対象細菌グループ	プライマー/プローブ	配列 (5' to 3')	参考文献
<i>Aeromonas</i>	フォワードプライマー	GCAGGCGGTTGGATAAGTTAG	Aoki et al. (2023) (本研究)
	リバースプライマー	GTCTCAAGGACACAGCCTC	Aoki et al. (2023) (本研究)
<i>Arcobacter</i>	フォワードプライマー	GAAGTGAAATCCTATAGCTTAAC	Tomioka et al. (2021) (本研究)
	リバースプライマー	CGCAATCGGTATTCCTTCTGAT	Tomioka et al. (2021) (本研究)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> species complex (KpSC)	フォワードプライマー	CTAAAACCGCCATGTCCGATTTAA	Barbier et al. (2020)
	リバースプライマー	TTCCGAAAATGAGACACTTCAGA	Barbier et al. (2020)
<i>Mycobacterium</i>	フォワードプライマー	CCTGGGAAACTGGGTCTAAT	García-Quintanilla et al. (2002) Radomski et al. (2010)
	リバースプライマー	CGCACGCTCACAGTTA	García-Quintanilla et al. (2002) Radomski et al. (2010)
	プローブ	TTTCACGAACAACGCGACAAAC	García-Quintanilla et al. (2002) Radomski et al. (2010)

## デジタル PCR

*Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* を対象としたデジタル PCR 検出・定量系の構築を行った。デジタル PCR で利用した 16S rRNA 遺伝子を標的とする PCR プライマーとプローブ配列は表 2 に示した (García-Quintanilla et al. 2002; Mühling et al. 2008; Radomski et al. 2010; González et al. 2014; Ghaju Shrestha et al. 2018)。 *Aeromonas* と *Arcobacter* に関しては、本研究で新たに開発したプライマーおよびプローブ配列も利用してデジタル PCR 検出・定量系を構築した。デジタル PCR 装置には QuantStudio Absolute Q デジタル PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、PCR 酵素には Absolute Q DNA Digital PCR Master Mix (同社) を使用した。デジタル PCR で使用した全てのプローブの 5'末端と 3'末端は、リアルタイム PCR と同様に、蛍光物質「6-カルボキシフルオレセイン」と消光物質「ブラックホールクエンチャー 1」で標識した。PCR 条件は 96 °C で 10 分間の初期変性の後、96 °C で 5 秒間 (熱変性) と 60 °C で 30 秒間 (アニーリングおよび伸長) の 40 サイクルで構成され、すべてのデジタル PCR 検出・定量系で共通とした。検出限界値は、異なる濃度の標準 DNA の PCR 増幅結果に基づき決定した (Hyden et al. 2012)。16S RNA 遺伝子のコピー数は、リアルタイム PCR と同じ計算方法で細胞数に換算した。

表 2 デジタル PCR に用いたプライマーおよびプローブ配列

対象細菌グループ	プライマー/プローブ	配列 (5' to 3')	参考文献
<i>Aeromonas</i>	フォワードプライマー	CCATGCCGCGTGTGTGAA	Mühling et al. (2008)
	リバースプライマー	GTCTCAAGGACACAGCCTC	Aoki et al. (2023) (本研究)
	プローブ	GCAGGCGGTTGGATAAGTTAG	Aoki et al. (2023) (本研究)
<i>Arcobacter</i>	フォワードプライマー	AGCTTGCTWWADYTGTCAGCTA	Ghaju Shrestha et al. (2018)
	リバースプライマー	CGCAATCGGTATTCCTTCTGAT	Tomioka et al. (2021) (本研究)
	プローブ	GAGGATGACACATTTCCGGTGC	González et al. (2014)
<i>Mycobacterium</i>	フォワードプライマー	CCTGGGAAACTGGGTCTAAT	García-Quintanilla et al. (2002)
			Radomski et al. (2010)
	リバースプライマー	CGCACGCTCACAGTTA	García-Quintanilla et al. (2002)
			Radomski et al. (2010)
	プローブ	TTTCACGAACAACGCGACAAAC	García-Quintanilla et al. (2002)
			Radomski et al. (2010)

## PMA 処理

*Aeromonas*、*Arcobacter*、ならびに *Mycobacterium* の PCR 検出・定量における PMA 処理の有効性の検証は、以下の手順で行った。まず、農業集落排水施設に由来する生活排水 1.2 mL を透明な DNA 低吸着 1.5 mL マイクロチューブ (トレフ) に移し、チューブ内で 20 mM PMAxx 溶液 (Biotium 社) 1.5  $\mu$ L と混合した (最終 PMAxx 濃度 : 25  $\mu$ M)。その後、PMA-Lite LED 光分解装置 (Biotium 社) を使用して青色 LED 光を 1.5 mL チューブに合計 15 分間照射した。均一な処理を行うため、LED 光の照射中、5 分ごとにサンプルを混合した。また、PMA 処理前に熱処理 (95°C、5 分間) による殺菌操作を行った生活排水も用意し、同様の PMA 処理を行った。また、比較系として PMA 処理を行わない試料も用意した。これらの操作で調整した試料 (1.2 mL  $\times$  2 セットで合計 2.4 mL) のろ過濃縮と DNA 抽出は、前述の方法に従って行った。最終的に得られた DNA 抽出物を鋳型としてデジタル PCR を実施し、その検出・定量結果を比較することで、PMA 処理の有効性を検証した。

### 2.1.3 結果と考察

#### 主要な病原性細菌グループの把握

新たに構築した病原性細菌遺伝子データベースを利用した 16S rRNA アンプリコン解析により、生活排水における主要な病原性細菌グループの把握を行った。本解析により生活排水に普遍的かつ優占的に存在することが把握された主要病原性細菌グループとその試料中の相対存在量 (%) を図 4 に示した。本研究で把握された主要な病原性細菌グループ

は、*Acinetobacter* (BSL 1)、*Alistipes* (BSL 1)、*Aeromonas* (BSL 2)、*Arcobacter* (BSL 1)、*Bacteroides* (BSL 1 および BSL 2)、*Clostridium* (BSL 1 および BSL 2)、*Collinsella* (BSL 1)、*Comamonas* (BSL 1)、*Eggerthella* (BSL 1)、*Escherichia* (BSL 2)、*Klebsiella* (BSL 2)、*Lactococcus* (BSL 1)、*Mycobacterium* (BSL 2)、*Parabacteroides* (BSL 1)、*Pseudomonas* (BSL 1)、*Streptococcus* (BSL 1) の 16 属であり、リスクレベルを考慮した場合には 18 グループとなった。本研究では生活排水処理水も解析対象としたが、殺菌処理（塩素消毒）を適用していない処理水のみならず、適用された処理水からもこれらの病原性細菌グループの多くが検出される結果となった。なお、塩素消毒による不活化後においても DNA が試料中に残存している可能性は排除できないが、この結果は消毒条件によっては主要な病原性細菌の完全な不活化が達成できない可能性を示している。特に、*Mycobacterium* (BSL 2) は、唯一全ての流入排水と処理水試料から検出されており、普遍的な存在性や生活排水処理施設における高い生残性が示唆された。検出された病原性細菌グループのうち、*Aeromonas*、*Arcobacter*、*Klebsiella*、および *Mycobacterium* については、先行研究においても、生活排水やその処理水からの検出報告も多い病原性細菌グループである（Cai and Zhang 2013; Nnadozie et al. 2017; Numberger et al. 2019; Kristensen et al. 2020）。また、それらの水環境中における消長については十分に理解されていない状況であった。このため、*Aeromonas*、*Arcobacter*、*Klebsiella*、および *Mycobacterium* の排水処理施設や水環境中での消長を高精度に把握するための PCR 検出・定量系を本研究で構築することとした。表 3 にこれらの細菌グループが病原体として引き起こす代表的な病気をまとめた。

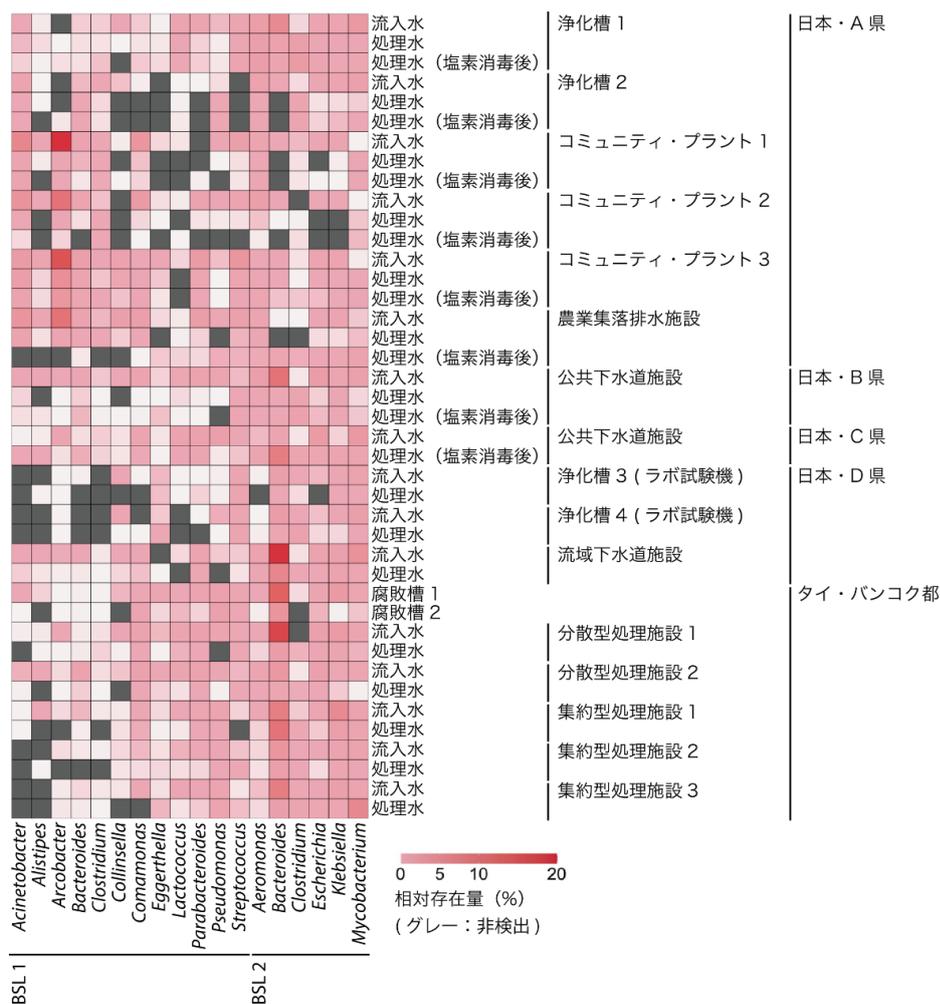


図 4 生活排水処理施設のから検出された主要な病原性細菌グループと各解析試料におけるその相対存在比 (%)

表 3 PCR 検出・定量系の構築の対象とした病原性細菌グループ

細菌属名	引き起こす代表的な病気
<i>Aeromonas</i>	胃腸炎（下痢症含む）、敗血症、皮膚感染症
<i>Arcobacter</i>	胃腸炎（下痢症含む）、敗血症
<i>Klebsiella</i>	胃腸炎（下痢症含む）、肺炎、尿路感染症、敗血症、菌血症、創傷感染
<i>Mycobacterium</i>	肺感染症、皮膚感染症

### リアルタイム PCR 検出・定量系の構築

リアルタイム PCR は、PCR を行う上で必須となるサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した機器を使用することで、PCR 増幅産物量をリアルタイムにモニタリングし、その増幅挙動を解析することが可能な手法である。この解析で得られた増幅曲線に基づくことで、微量な DNA でも正確な検出やその定量分析を行うことが可能である。そこで本研究では、生活排水における主要な病原性細菌グループとして特定された *Aeromonas*、*Arcobacter*、*Klebsiella*、ならびに *Mycobacterium* を対象としたリアルタイム PCR 検出・定量系の構築を行った。なお、*Klebsiella* に関しては前述の 16S rRNA アンプリコン解析で検出された 16S rRNA 遺伝子配列の多くが、*Klebsiella* 属の代表的な病原性細菌 *Klebsiella pneumoniae* と高い配列相同性を示したことに加えて、*K. pneumoniae* を主要なメンバーとする *Klebsiella* 種群「KpSC」に特異的なプライマー配列が既に報告されていたことから、KpSC を対象としたリアルタイム PCR 検出・定量条件の検討を行った。リアルタイム PCR 条件の検討においては、異なるプライマーおよびプローブ濃度やアニーリングおよび伸長反応条件での陽性コントロール（標準 DNA）の増幅挙動を評価し、表 4 に示す最適リアルタイム PCR 条件を決定した。陽性コントロールの 10 倍希釈系列の PCR 増幅挙動を解析し、その解析結果に基づいて作成した検量線の傾きから求めた各リアルタイム PCR 検出・定量系の PCR 増幅効率  $E$  を表 5 に示した。リアルタイム PCR における PCR 増幅効率  $E$  の適正範囲は、一般的に 80~120%（標的配列が指数関数的に増幅する理想的な PCR 条件の場合、 $E = 100\%$ ）とされている。本研究では、すべてのリアルタイム PCR 検出・定量系においてその増幅効率基準を満たしており、設定条件下で良好な PCR 増幅が進行すること明らかとなった。また、すべてのリアルタイム PCR 検出・定量系の検出限界値は、数細胞/反応以下であった（表 5）。さらに *Aeromonas*、*Arcobacter*、*Klebsiella*、*Mycobacterium* に分類されない 15 の純粋培養細菌株から抽出されたゲノム DNA を等量混合した DNA カクテル「DNA-Mock-001」（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター [NBRC]）を陰性コントロールとしたリアルタイム PCR を行ったが、全てのリアルタイム PCR 検出・定量系において非特異的な PCR 増幅は確認されなかった。以上の結果から、本研究で構築・最適化したリアルタイム PCR 検出・定量系を用いることで、生活排水や環境水中の *Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、ならびに *Mycobacterium* を高精度に検出・定量可能であると判断した。

### デジタル PCR 検出・定量系の構築

*Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* に関しては、上述のリアルタイム PCR 検出・定量系に加えて、デジタル PCR 検出・定量系の構築も行った。デジタル PCR は、解析試料に含まれる DNA を多数の微小反応区画に分配し、各区画で独立した PCR 反応と増幅結果（PCR 増幅の有無）を解析することで、DNA 分子の絶対定量を正確に行う技術である。リアルタイム PCR とデジタル PCR の比較研究からは、デジタル PCR は多くの場合、リアルタイム PCR よりも高感度、高精度、高再現性な検出・定量系の構築が可能とされている（Cao et al. 2020）。なお、デジタル PCR は、その検出原理上、インターカレーター法よりも特異性の高い加水分解プローブ法の採用が推奨されている。このため、デジタル PCR に関しては細かな条件検討は行わず、すべての検出・定量系で同一の PCR 条件を採用し、その PCR 条件における検出限界値と特異的な検出・定量の可否について評価した。その結果、表 5 に示したように、検討したすべてのデジタル PCR の検出限界値は数細胞/反応程度であり、高い検出感度が確認された。加えて、デジタル PCR についても前述の DNA カクテル「DNA-Mock-001」（NBRC）からの非特異的な PCR 増幅は確認されなかったため、高い特異性があると

判断した。なお、デジタル PCR は、増幅量ではなく、分配された DNA の PCR 増幅の有無から絶対定量を行う技術である。したがって、PCR 阻害物質の存在により PCR 増幅効率が損なわれる試料の解析においても、デジタル PCR はその影響を受けにくいとされる。このため、PCR 阻害物質が含まれる生活排水や環境水中の *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* を検出・定量する場合、PCR 阻害の影響が大きく反映されてしまうリアルタイム PCR よりも高精度な検出・定量手法として本デジタル PCR 検出・定量系は有効な手法であると考えられる。

表 4 リアルタイム PCR における PCR 条件

対象細菌グループ	<i>Aeromonas</i>	<i>Arcobacter</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> species complex	<i>Mycobacterium</i>
反応液量 (μL)	20	20	20	20
各プライマー濃度 (μM)	0.20	0.40	0.20	0.30
プローブ濃度 (μM)	非該当	非該当	非該当	0.10
初期変性	95°C, 5 分	95°C, 5 分	95°C, 5 分	95°C, 5 分
PCR サイクル数	40	40	40	40
変性	95°C, 10 秒	95°C, 10 秒	95°C, 10 秒	95°C, 10 秒
アニーリング	64°C, 10 秒	59°C, 10 秒	95°C, 10 秒	60°C, 60 秒
伸長	72°C, 30 秒	72°C, 15 秒	72°C, 10 秒	

表 5 リアルタイム PCR の PCR 増幅効率とリアルタイム PCR およびデジタル PCR 法の検出限界

定量対象グループ	リアルタイム PCR の増幅効率 $E$	検出限界値 (細胞/反応)	
		リアルタイム PCR 法	デジタル PCR 法
<i>Aeromonas</i>	83–93%	0.100	1.02
<i>Arcobacter</i>	88–95%	0.200	1.03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> species complex	83–89%	1.00	未構築
<i>Mycobacterium</i>	92–98%	1.00	6.14

#### PMA 処理が PCR 検出・定量結果に与える影響

生活排水や汚染環境水において、死菌の病原性細菌が存在する可能性を排除できない。したがって、生活排水に起因するリスクを正確に評価するためには、試料中に存在する生菌由来の DNA (遺伝子) を特異的に検出・定量可能な手法を適用することが望ましい。一方、通常のリアルタイム PCR やデジタル PCR では、死菌由来の DNA も増幅の対象となり、これらに由来する DNA 量も検出・定量結果に反映されてしまう。この問題を解決する方法として、DNA 修飾色素 PMA を用いた前処理法が有効な手法の 1 つとして挙げられる (Zheng et al. 2016)。PMA は細胞膜が損傷した死菌の細胞内のみ浸透し、強い可視光下で DNA と共有結合を形成する。この PMA で化学修飾された DNA に関しては、PCR では増幅できなくなる。したがって、PMA 処理を環境試料に適用することで、生菌由来の DNA を特異的に検出・定量することが理論的に可能となる。そこで本研究では、PMA 処理が *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の PCR 検出に与える影響について、農業集落排水施設に由来する未処理の生活排水を用いて評価した (図 5)。まず、加熱処理 (殺菌操作) を行わなかった生活排水においては、PMA 処理の有無に関わらず、*Aeromonas* と *Arcobacter* のデジタル PCR により測定した細菌数は同程度であった。一方、PMA 処理を施さなかった試料における *Mycobacterium* 細菌数は、PMA 処理を施した試料のそれと比較して 1.51 倍の細菌数を示した。この結果から、今回対象とした生活排水に含まれる *Mycobacterium* に関しては、PMA 処理を行うことが、そのリスク評価上は適切である可能性が示された。また、PMA 処理前に加熱処理 (95°C、5 分) による殺菌操作を行った場合、評価対象とした 3 グループ全てで PMA 処理の有無がデジタル PCR による定量結果に大きな差を与えた。具体的には、PMA 処理を行わなかった生活排水の *Aeromonas* 細菌数、*Arcobacter* 細菌数、および *Mycobacterium* 細菌数は、それぞれ PMA 処理を行った生活排水の 3,260 倍、2,140 倍、および 19.1 倍であった。このことから、死菌と生菌を判別するのに本手法が有効であることが明らかとなった。衛生学

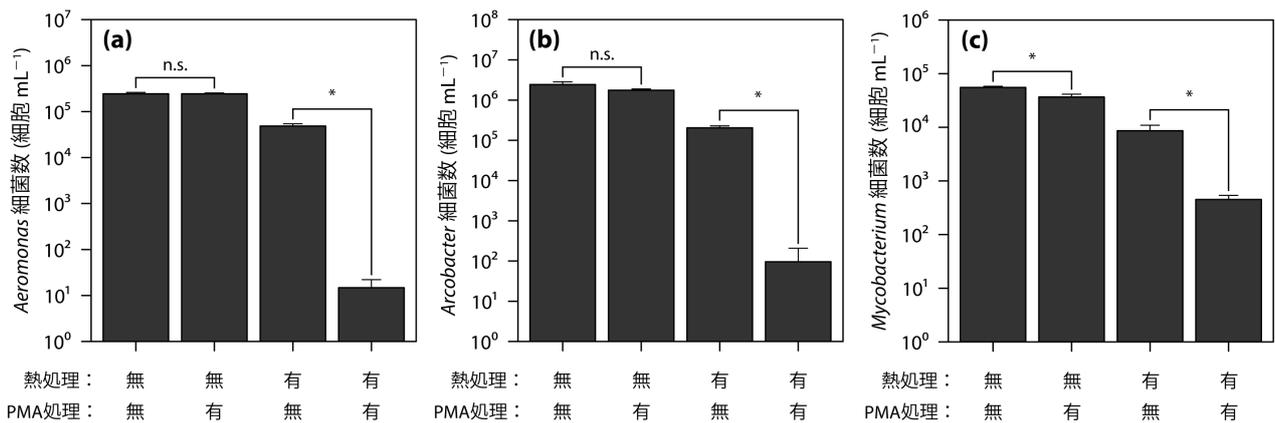


図5 生活排水中の (a) *Aeromonas*、(b) *Arcobacter*、ならびに (c) *Mycobacterium* を対象としたデジタルPCR 検出・定量結果にPMA処理が与える影響。図中のアスタリスクは統計的な有意差があること (Studentの *t* 検定における  $p$  値  $< 0.01$ )、n.s. は有意差がないことを示す。

的リスクをよりの確に評価する手法開発やその簡易化を今後さらに進める上で、本 PMA 処理法の適用で明らかにされる様々な生活排水や環境水における各病原性細菌グループの生菌比率に関する情報は、重要な知見となるであろう。

#### 2.1.4 まとめ

16S rRNA アンプリコン解析を用いて生活排水や汚染環境水中に存在する多種多様な病原性細菌グループを網羅的かつ迅速に検出するための病原性細菌遺伝子データベースを構築した。本データベースの特徴は、総計 1,120 種の病原性細菌由来の高品質 16S rRNA 遺伝子配列情報を整理し、さらには BSL に基づいたリスクレベル情報との紐づけが行われている点にある。続いて、本データベースを利用した 16S rRNA アンプリコン解析により、リスクレベルを考慮した上で、生活排水生活排水や処理水中で普遍的に存在する主要な病原性細菌 18 グループを把握した。そして、主要な病原性細菌グループとして特定された細菌グループのうち、*Aeromonas*、*Arcobacter*、*Klebsiella* (KpSC)、および *Mycobacterium* に関しては、それらの排水処理施設や水環境中での消長を高精度に評価するためのリアルタイム PCR およびデジタル PCR 検出・定量系の構築を行った。また、PMA 処理が *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の PCR 検出・定量に与える影響を評価し、死菌が含まれる可能性のある生活排水や環境試料を対象とした検出・定量における有用性を明らかにした。

#### 引用文献

- 1) Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25 (17), 3389-3402
- 2) Aoki, M., Okubo, K., Kusuoka, R., Watari, T., Syutsubo, K., Yamaguchi, T. (2022) Hexavalent chromium removal and prokaryotic community analysis in glass column reactor packed with aspen wood as solid organic substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 194 (4), 1425-1441
- 3) Aoki, M., Takemura, Y., Kawakami, S., Yoochatchaval, W., Tran P., T., Tomioka, N., et al. (2023) Quantitative detection and reduction of potentially pathogenic bacterial groups of *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Klebsiella pneumoniae* species complex, and *Mycobacterium* in wastewater treatment facilities. *PLoS One*, 18 (9), e0291742
- 4) Bal Krishna, K.C., Sathasivan, A., Ginige, M.P. (2021) An assessment of the persistence of putative pathogenic bacteria in chloraminated water distribution systems. *Water Res.*, 190, 116677

- 5) Barbier, E., Rodrigues, C., Depret, G., Passet, V., Gal, L., Piveteau, P., Brisse, S. (2020) The ZKIR assay, a real-time PCR method for the detection of *Klebsiella pneumoniae* and closely related species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 86 (7) , e02711-19
- 6) Cai, L., Zhang, T. (2013) Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environ. Sci. Technol.*, 47 (10) , 5433-5441
- 7) Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B., Zhang, B. (2020) Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation. *Molecules*, 25 (3) , 706
- 8) Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108 Suppl 1 (Suppl 1) , 4516-4522
- 9) Galagoda, R., Chanto, M., Takemura, Y., Tomioka, N., Syutsubo, K., Honda, R., et al. (2023) Quantitative 16S rRNA gene amplicon sequencing for comprehensive pathogenic bacterial tracking in a municipal wastewater treatment plant. *ACS ES&T Water*, 3 (4) , 923-933
- 10) Ghaju Shrestha, R., Tanaka, Y., Malla, B., Tandukar, S., Bhandari, D., Inoue, D., et al. (2018) Development of a quantitative PCR assay for *Arcobacter* spp. and its application to environmental water samples. *Microbes Environ.*, 33 (3) , 309-316
- 11) García-Quintanilla, A., González-Martín, J., Tudó, G., Espasa, M., Jiménez de Anta, M.T. (2002) Simultaneous identification of *Mycobacterium* genus and *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40 (12) , 4646-4651
- 12) Hayden, R.T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., Caliendo, A.M. (2013) Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 51 (2) , 540-546
- 13) Kristensen, J.M., Nierychlo, M., Albertsen, M., Nielsen, P.H. (2020) Bacteria from the genus *Arcobacter* are abundant in effluent from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 86 (9) , e03044-19
- 14) Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal*, 17 (1) , 10-12
- 15) Miao, J., Han, N., Qiang, Y., Zhang, T., Li, X., Zhang, W. (2017) 16SPIP: a comprehensive analysis pipeline for rapid pathogen detection in clinical samples based on 16S metagenomic sequencing. *BMC Bioinformatics*, 18 (Suppl 16) , 568
- 16) Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J.C., Joint, I. (2008) Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.*, 2 (4) , 379-392
- 17) Nnadozie, C.F., Kumari, S., Bux, F. (2017) Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 16, 491-515
- 18) Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H-P., Greenwood, A.D. (2019) Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Sci. Rep.*, 9, 9673
- 19) Price, E.P., Dale, J.L., Cook, J.M., Sarovich, D.S., Seymour, M.L., Ginther, J.L., et al. (2012) Development and validation of *Burkholderia pseudomallei*-specific real-time PCR assays for clinical, environmental or forensic detection applications. *PLoS One*, 7 (5) , e37723
- 20) Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.*, 41 (Database issue) , D590-596
- 21) Radomski, N., Lucas, F.S., Moilleron, R., Cambau, E., Haenn, S., Moulin, L. (2010) Development of a real-time qPCR method for detection and enumeration of *Mycobacterium* spp. in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (21) , 7348-7351
- 22) Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (23) , 7537-7541
- 23) Stoddard, S.F., Smith, B.J., Hein, R., Roller, B.R., Schmidt, T.M. (2015) *rrmDB*: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.*, 43 (Database issue) , D593-598

- 24) Tomioka, N., Yoochatchaval, W., Takemura, Y., Matsuura, N., Danshita, T., Srisang, P., et al. (2021) Detection of potentially pathogenic *Arcobacter* spp. in Bangkok canals and the Chao Phraya River. *J. Water Health*, 19 (4) , 657-670
- 25) Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F., Li, B. (2016) Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. *Front. Microbiol.*, 7, 1833.

## 2.2 排水処理施設、環境水における病原性細菌の消長評価

### 2.2.1 目的と経緯

生活排水処理施設や環境水における病原性細菌群の消長を理解することは、生活排水に起因するリスクを低減するための適切な対策を講じる上で、重要な情報となる。生活排水やその処理水、さらにはこれらにより汚染された環境水における病原性細菌の存在量と水質との関係性が明らかになれば、衛生リスクを効果的に低減できる排水処理装置の開発や運用、適切な排水・環境基準値の設定など、実効的なリスク低減策の提案が可能となる。しかし、多種多様な病原性細菌群に関しては、それらの個々の消長や水質との関係性評価は十分に行われていないのが現状である（Fang et al., 2022）。

そこで本研究では、2.1 で開発・構築した遺伝子データベースやPCR検出・定量系を利用し、生活排水の主要な病原性細菌グループの排水処理施設や環境水における消長や水質との関係性評価を行った。まず、日本国内ならびにタイ・バンコク都で稼働している生活排水処理施設における病原性細菌グループの消長について、リアルタイム PCR 検出・定量系を用いて解析した。続いて、バンコク都の水路とチャオプラヤー川における様々な病原性細菌グループの存在量（遺伝子量）について、16S rRNA アンプリコン解析を利用する方法により、網羅的な推定を行った。また、これらの生活排水処理施設や排水路における病原性細菌グループの存在と水質との関係性を評価し、生活排水に起因する衛生リスクを効果的に低減するための水質項目を把握した。さらに、NH<sub>4</sub>-N 濃度の異なる湖水マイクロゾムにおける病原性細菌グループの消長について、PMA 処理とデジタル PCR を組み合わせた「PMA-デジタル PCR 検出・定量系」により評価した。

### 2.2.2 方法

#### 生活排水処理施設における病原性細菌グループの消長解析

*Aeromonas*、*Arcobacter*、*Klebsiella* 種群 KpSC（以下 KpSC）、および *Mycobacterium* に関する消長を解析した生活排水処理施設は、A 県に設置された小型（家庭用）浄化槽 2 施設（施設 A、B）、農業集落排水施設 1 施設（施設 C）、コミュニティ・プラント 3 施設（施設 D、E、F）、ならびにタイ・バンコク都の集約型下水処理施設 3 施設（施設 G、H、I）の合計 9 施設とした（表 6）。本研究では、各施設の流入排水および未消毒処理水を解析対象とすることで、各処理施設における消長を評価した。試料は孔径 0.2 μm の Omnipore PTFE メンブレンフィルター（Merck）を用いてろ過濃縮し、その後、Extrap Soil DNA Kit Plus ver. 2（バイオダイナミクス研究所）を用いたビーズ破砕法により濃縮細胞から DNA 抽出を行った。解析対象とした試料については、化学的酸素要求量（COD<sub>G</sub>）、生物化学的酸素要求量（BOD）、全窒素（TN）、アンモニア性窒素（NH<sub>4</sub>-N）、亜硝酸性窒素（NO<sub>2</sub>-N）、硝酸性窒素（NO<sub>3</sub>-N）、浮遊物質量（SS）、

表 6 研究対象とした生活排水処理施設

施設	浄化槽 (A)	浄化槽 (B)	農業集落排水施設 (C)
処理方式	ピークカット流量調整型夾雑物除去担体流動生物ろ過方式	流量調整型嫌気濾床担体流動・生物ろ過循環方式	嫌気性ろ床および接触曝気を組み合わせた方式
処理能力 (m <sup>3</sup> day <sup>-1</sup> )	1.0	1.4	164.7
施設	コミュニティ・プラント (D)	コミュニティ・プラント (E)	コミュニティ・プラント (F)
処理方式	接触曝気方式	長時間曝気	長時間曝気
処理能力 (m <sup>3</sup> day <sup>-1</sup> )	266	400	850
施設	集約型下水処理施設 (G)	集約型下水処理施設 (H)	集約型下水処理施設 (I)
処理方式	接触安定化方式	循環式活性汚泥方式	活性汚泥と栄養塩除去を組み合わせた方式
処理能力 (m <sup>3</sup> day <sup>-1</sup> )	30,000	200,000	350,000

揮発性浮遊物質 (VSS)、pH、酸化還元電位 (ORP)、溶存酸素 (DO)、ならびに水温の測定も合わせて行った。*Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、ならびに *Mycobacterium* を対象とした検出・定量は、2.1に記載したリアルタイム PCR 検出・定量系により行った。各処理施設における各細菌群の log 除去率 (処理後に対する処理前の濃度の比率を常用対数表示として表したものは、式 (2) により求めた。

$$\log \text{除去率} = \log_{10} (C_{\text{inf}} / C_{\text{eff}}) \quad \dots (2)$$

ここで、 $C_{\text{inf}}$ : 流入排水における細菌数 (細胞/mL)、 $C_{\text{eff}}$ : 処理水における細菌数 (細胞/mL) である。log 除去率が 2 log の場合、処理水における細菌数が、流入排水の 1/100 になること (99%が除去されること) を意味する。

### タイ・バンコク都の水路とチャオプラヤー川における病原性細菌の網羅的解析

本研究で対象としたタイ・バンコク都の水路 (採水地点 272、612、および 611) およびチャオプラヤー川 (Chao) の採水地点を図 6 に示した。ここで、採水地点 272 は水量の多いプラカノン区の農業用水路、採水地点 612 はバンコク都行政区「クローントゥーイ」を流れる水路でクローントゥーイ市場付近、採水地点 611 は同水路の採水地点 612 から見て下流にあるスラム街近くの水門付近に位置していた。試料採取は、雨季 (2017年6月~8月) と乾季 (2017年12月~2018年2月) に月1回の頻度で採取し、ろ過濃縮後、後述の 16S rRNA アンプリコン解析およびリアルタイム PCR 解析まで冷凍保存した。試料のろ過濃縮および DNA 抽出は、2.1の方法に従って行った。様々な病原性細菌グループの各試料中の存在量は、16S rRNA アンプリコン解析データと全細菌の 16S rRNA 遺伝子コピー数の情報に基づいて網羅的に推定した。まず、全細菌の 16S rRNA 遺伝子を網羅的に増幅可能なプライマーセット 515F と 805R を利用した 16S rRNA アンプリコン解析を実施した (Caporaso et al. 2011; Herlemann et al. 2011)。超並列 DNA シーケンサー MiSeq (Illumina 社) により取得した生リードは、Trimmomatic version 0.32 (Bolger et al. 2014) による低品質リードの除去、USEARCH version 11.0.66 (Edgar 2010) による高品質のペアエンドリードの統合、および cutadapt version 1.8.3 (Martin 2011) によるプライマーの配列の除去を前処理として行った。これらの前処理で得られた高品質配列について、本研究で構築した病原性



図 6 研究対象の汚染水路およびチャオプラヤー川における採水地点。地図中の矢印は水流の方向を示す。地図データ ©2024 Google を加工して作成。

細菌の 16S rRNA 遺伝子データベースを用いた BLASTn (Altschul et al. 1997) による相同性検索を行い、病原性細菌由来の配列の割当てを行った(詳細な方法は 2.1 に記載)。続いて、対象試料に含まれる全細菌の 16S rRNA 遺伝子の総コピー数をリアルタイム PCR で定量した。リアルタイム PCR 装置には LightCycler 480、PCR 酵素には LightCycler 480 SYBR Green I Master を使用し、16S rRNA 遺伝子増幅用プライマーには前述の 515F と 805R のプライマーセット(各プライマー濃度: 0.5  $\mu$ M) を用いた。PCR 条件は 95  $^{\circ}$ C で 5 分間の初期変性の後、95  $^{\circ}$ C で 10 秒間(熱変性)、60  $^{\circ}$ C で 10 秒間(アニーリング)、72  $^{\circ}$ C で 10 秒間(伸長)の 40 サイクルとした。PCR 反応後は融解曲線分析を実施し、特異的な PCR 増幅が生じていたかを確認した。検量線の作成に用いた標準 DNA は、大腸菌 *Escherichia coli* NBRC 102203 株を用いて調整した。リアルタイム PCR で得られた定量値に 16S rRNA アンプリコン解析で明らかにした各病原性細菌グループの相対存在比を乗じることで、各試料における様々な病原性細菌グループの 16S rRNA 遺伝子コピー数を網羅的に推定した。対象試料については、COD<sub>C</sub>、BOD、TN、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、SS、全りん (TP)、りん酸態りん (PO<sub>4</sub><sup>-</sup>-P)、pH、DO および水温に関する水質分析も合わせて行った。

### 汚染湖水マイクロコズムにおける病原性細菌グループの消長解析

霞ヶ浦から採取した湖水と農村集落排水施設の流入排水を混合し、不適に処理された排水処理水による汚染を想定した汚染湖水マイクロコズムを構築した。具体的な作業としては、まず、生活排水 1 L と湖水 9 L を混合した模擬汚染湖水を 0.8 L ずつ 1 L ガラス瓶に分注した。NH<sub>4</sub>-N 濃度の違いが *Aeromonas*、*Arcobacter*、ならびに *Mycobacterium* の生残性に与える影響を評価するため、異なる NH<sub>4</sub>-N となるように、Milli-Q 超純水または NH<sub>4</sub>Cl 溶液を 40 mL ずつ模擬汚染湖水に添加した(目標 NH<sub>4</sub>-N 濃度: 2、5、または 15 mg N/L)。混合した時点の汚染湖水の水質(測定値)は、COD<sub>C</sub> が約 40 mg/L、T-N が約 3、5、または 15 mg N/L、TP が約 0.5 mg P/L であった。そして、本湖水マイクロコズムを、25 $^{\circ}$ C、暗所、150 rpm 攪拌の条件下で、7 日間インキュベーションした。ガラス瓶はガス透過性シリコーン栓 SILICOSEN T-66 (日電理硝子株式会社) で蓋をしており、これにより湖水の好氣的条件(DO 濃度:  $\geq$  8 mg/L) が維持された。試料は実験開始後 0、1、3、5、および 7 日目に回収した。試料のろ過濃縮および DNA 抽出は、前述の方法により行った。本マイクロコズムにおける *Aeromonas*、*Arcobacter*、ならびに *Mycobacterium* の消長解析は、2.1 に記載した PMA 処理とデジタル PCR 法を組み合わせた PMA-デジタル PCR により行った。

## 2.2.3 結果と考察

### 生活排水処理施設における *Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、ならびに *Mycobacterium* の消長

研究対象とした 9 つの生活排水処理施設 A~I の流入排水およびその処理水における *Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、および *Mycobacterium* の細菌数を図 7 に示した。図 8 には、流入排水と処理水の細菌数から求めた各処理施設における log 除去率を示した。流入排水における *Aeromonas*、*Arcobacter*、ならびに KpSC の幾何平均細菌数は、それぞれ  $1.2 \times 10^4 \sim 2.4 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^2 \sim 4.3 \times 10^4$  細胞/mL であり、解析した全ての流入排水で *Arcobacter* の細菌数が最も高い数値を示した。排水処理施設における *Aeromonas*、*Arcobacter*、および KpSC の log 除去率は、それぞれ 0.77~2.57、1.00~3.06、1.35~3.11 であり、処理方式や運用状況に関わらず、1 log (= 90%) 程度以上の除去が達成できる可能性が示された。しかし、流入排水において高い細菌数 ( $\geq 10^4$  細胞/mL) が確認された *Aeromonas* や *Arcobacter* に関しては、2~3 log (= 99%~99.9%) 以上の効果的な除去が確認された処理施設においても、その処理水においても多数の菌 ( $\geq 10^2 \sim 10^3$  細胞/mL) が残存していた。KpSC に関しては、*Aeromonas* や *Arcobacter* と同等またはそれ以上の除去が処理施設で達成されることに加えて、流入排水の細菌数も低いため、解析した処理水試料の半数において、Price et al. (2012) の方法に基づいて求めた検出限界値または定量下限値未満となった。*Arcobacter* および KpSC に関しては、一部の処理施設間で log 除去率に統計的に有意な差が確認された。この結果は、処理方式や施設の運用状況などが病原性細菌の消長に影響を与えている可能性を示している。なお、*Aeromonas* と *Arcobacter* の流入排水におけるそれらの細菌数とその log 除去率に関しては、先行研究のデータと概ね一致していた (Yang et al. 2015; Ghaju Shrestha et al., 2019; Martone-Rocha et al. 2010; Kristensen et al., 2020)。

*Mycobacterium* に関しては、*Aeromonas*、*Arcobacter*、および KpSC とは異なる消長挙動を示した。流入排水における *Mycobacterium* の幾何平均細菌数は、多くの施設で KpSC と同程度の  $6.9 \times 10^3 \sim 5.5 \times 10^4$  細胞/mL であった。一方、その log 除去率は  $-0.67 \sim 1.57$  と低い数値を示し、処理水において *Aeromonas* や *Arcobacter* と同程度以上の多数の細菌数 ( $\geq 10^3$  細胞/mL) が確認された。log 除去率がマイナスの数値を示した処理施設 B、D、E、G においては、*Mycobacterium* が施設内部で定常的に増殖している可能性が高く、多くの処理施設においてその除去が困難である可能性が示された。この

図7 生活排水処理施設 A~I の流入排水およびその処理水中の (a) *Aeromonas*、(b) *Arcobacter*、(c) *Klebsiella pneumoniae* species complex (KpSC)、ならびに (d) *Mycobacterium* の幾何平均存在量。エラーバーは最大値と最小値、破線は Price et al. (2012) の方法に基づいて求めた定量下限値を示す。アスタリスクで示した定量下限値未達の定量値は、定量下限値/2の数値で示した。

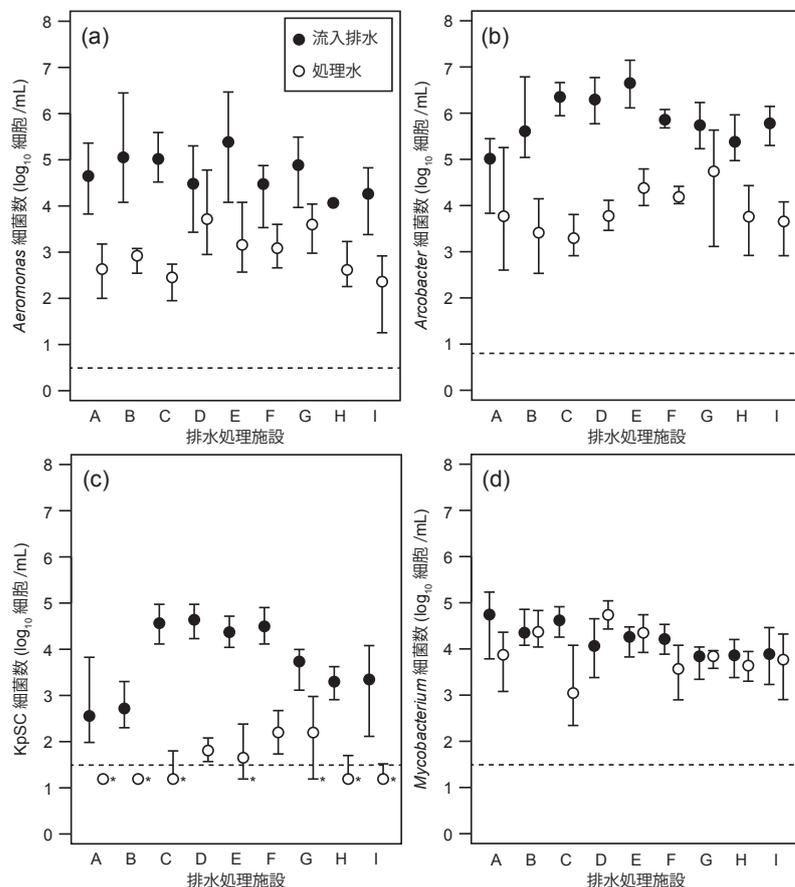
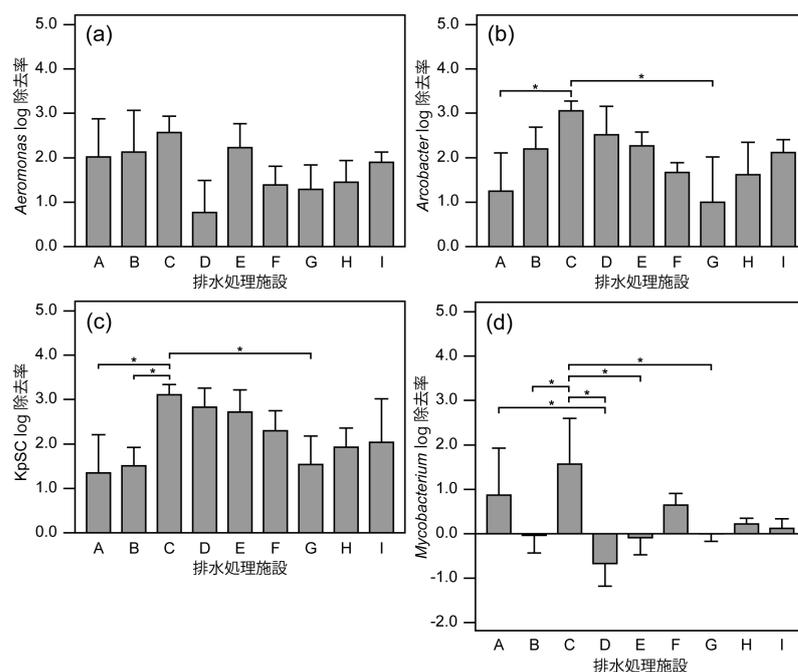


図8 生活排水処理施設 A~I における (a) *Aeromonas*、(b) *Arcobacter*、(c) *Klebsiella pneumoniae* species complex (KpSC)、ならびに (d) *Mycobacterium* の log 除去率。エラーバーは標準偏差、アスタリスクは統計的有意差があることを示す (Student の *t* 検定における Benjamini-Hochberg 法による補正 *p* 値 < 0.01)。



結果は、*Mycobacterium* が活性汚泥の主要構成細菌グループであることや (Zhang et al. 2012)、活性汚泥から分離された *Mycobacterium* が下水の主成分であるコレステロールを炭素源として利用した増殖能を示すこと (Guo et al. 2019) と整合性のある結果と考えられる。なお、*Aeromonas*、*Arcobacter*、および KpSC の最も高い log 除去率が確認された農業集落排水施設 C では、*Mycobacterium* に関しても、1.57 log (=97%) という比較的高い平均除去率が確認された。また、フランス・パリの生活排水処理施設においては、5.6 log という *Mycobacterium* の極めて高い除去率が確認されている (Radomski et al. 2011)。このように処理施設によって消長挙動が大きく異なる *Mycobacterium* に関しては、その詳細な消長メカニズム、処理施設構成との関係性を理解することが、重要な課題の1つと言える。

解析対象とした処理施設の中では、バンコク都で稼働している集約型下水処理施設 G の処理水において、他の処理施設の処理水と比較しても高い *Aeromonas*、*Arcobacter*、および KpSC の細菌数が確認された。集約型下水処理施設 G においては、接触安定化方式が採用されているが、衛生設備としては、その装置構成に問題がある可能性が示された。また、バンコク都の生活排水処理施設の処理水は、塩素消毒等の殺菌工程を経ることなく、環境放流もしくは再生水として道路洗浄や寺院清掃に利用されている。このため、特に排水処理施設 G に関しては、DHS 法などの適切な後処理技術や殺菌装置の導入による衛生リスクの低減や利用時の安全性確保行動 (散水利用時の住民通知など) の必要性が強く示唆された。

### 生活排水処理施設における *Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、ならびに *Mycobacterium* の細菌数と水質との関係性

生活排水処理施設由来の試料から得られた *Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、ならびに *Mycobacterium* の細菌数と水質データから求めたスピアマンの順位相関係数を図 9 に示す。得られたスピアマンの順位相関係数に基づくと、細菌数と特定

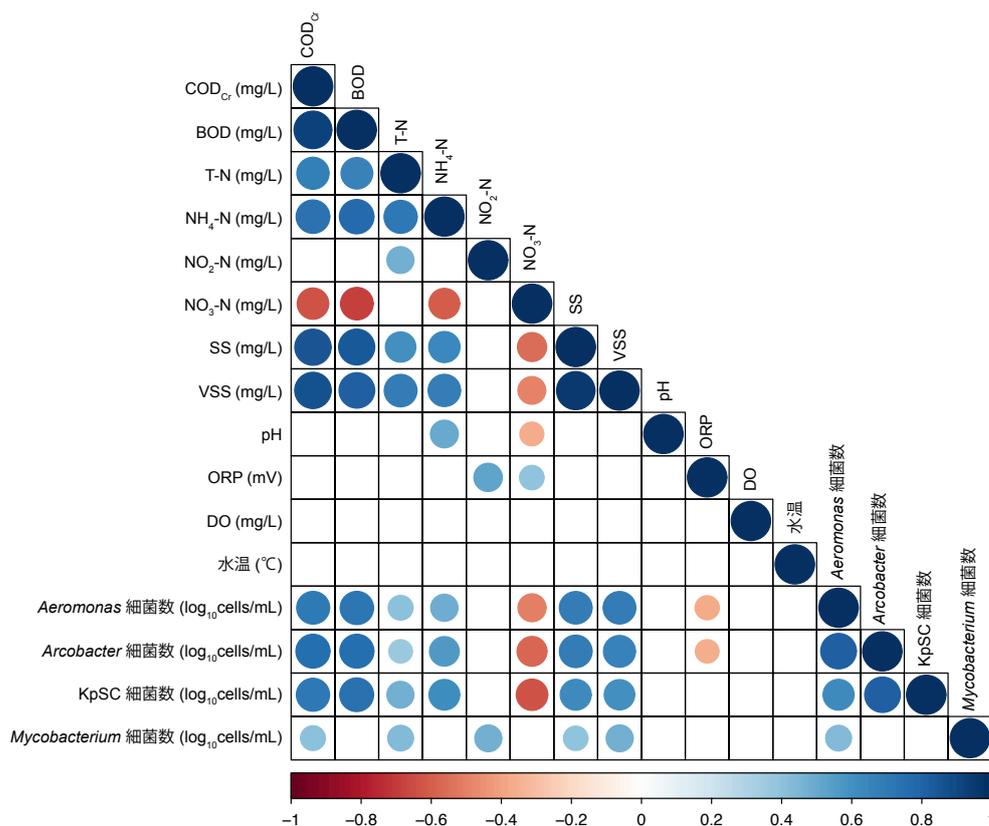


図 9 生活排水およびその処理水における病原性細菌群数および水質データから求めたスピアマンの順位相関係数。Benjamini-Hochberg 法による補正  $p$  値  $< 0.01$  の相関関係のみ青色または赤色の円で表示した。それぞれの円の色の濃さと大きさは相関係数に比例している。Aoki et al. (2023) のデータを利用して作成。

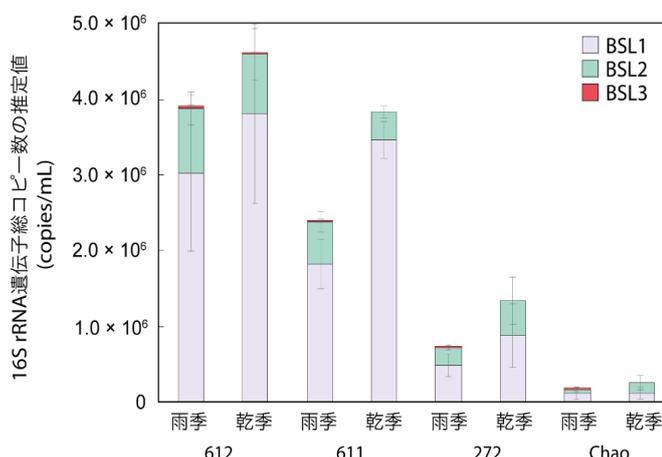
の水質項目との間に、正または負の相関があることが示された。具体的には、*Aeromonas* 細菌数および *Arcobacter* 細菌数に関しては、COD<sub>Cr</sub>、BOD、T-N、NH<sub>4</sub>-N、SS、および VSS 濃度と正の相関、NO<sub>3</sub>-N 濃度および ORP とは負の相関が確認された。KpSCの細菌数についても、*Aeromonas* および *Arcobacter* と同様に COD<sub>Cr</sub>、BOD、T-N、NH<sub>4</sub>-N、SS、および VSS 濃度と正の相関が確認されたが、負の相関は NO<sub>3</sub>-N 濃度とのみで確認された。*Mycobacterium* の細菌数に関しては、COD<sub>Cr</sub>、T-N、NO<sub>2</sub>-N、SS、および VSS と正の相関が確認された一方、測定した水質項目との間に負の相関は確認されなかった。これらの相関データに基づくと、有機物除去、窒素除去（硝化および脱窒）、浮遊物質除去の性能に優れた生活排水処理施設において、これらの細菌群を効果的に除去できる可能性が示された。実際、定量した 4 つの細菌グループの除去率が共通して最も高かった農村集落排水施設 C における COD<sub>Cr</sub>、BOD、T-N、SS、VSS の除去率は、それぞれ 93%、94%、77%、98%、ならびに 98% であり、他の排水処理施設と比較して優れていた。加えて、本研究で得られた相関データに基づくと、COD<sub>Cr</sub>、BOD、T-N、NH<sub>4</sub>-N、SS、および VSS に関する適切な排水基準値を設定が、処理水に起因する衛生リスクの低減において効果的な施策となる可能性が示された。

### バンコク都の水路における病原性細菌数の推定と水質との関係性

バンコク都の水路およびチャオプラヤー川における病原性細菌の 16S rRNA 遺伝子総コピー数の推定値を図 10 に示した。雨季と乾季における病原性細菌由来の総 16S rRNA 遺伝子のコピー数の推定値を比較すると、乾季においてやや高い 16S rRNA 遺伝子総コピー数が推定された。一方、その推定値の差は 2 倍以内であり、降雨による希釈効果が当該水環境に存在する病原性細菌の総量に与える影響は大きくないと考えられた。図 11 には、各地点で 16S rRNA 遺伝子コピー数の推定値が特に高かった病原性細菌グループのうち上位 15 グループを示した。雨季・乾季の両シーズンにおいて、3 つの水路および河川で共通して最も多かった細菌グループは、*Arcobacter* と *Comamonas*（どちらも BSL 1）で共通していた。さらに、すべての解析試料において、BSL 1 細菌グループでは *Acinetobacter* および BSL 2 細菌グループでは *Streptococcus*、*Aeromonas*、*Klebsiella*、*Mycobacterium*、および *Escherichia* の 16S rRNA 遺伝子が相対的に高いコピー数で推定された。これらの細菌グループのほとんどは、2.1 で言及したように生活排水やその処理水から普遍的に検出される病原性細菌グループである。したがって、病原性細菌群の総コピー数が特に高かったクローントゥイ水路の地点 612 および 611 は、特にし尿を含む排水による汚染の影響を強く受けている可能性があり、上流地点 612 と下流地点 611 の比較からは、本水路において病原性細菌は十分に減衰せずに生残している可能性が示された。

図 12 には、水路とチャオプラヤー川における各病原性細菌グループの 16S rRNA 遺伝子コピー数の推定値データと水質データから得られたピアソンの積率相関係数を示した。ピアソンの積率相関係数に基づくと、多くの病原性細菌グループの 16S rRNA 遺伝子コピー数の推定値と COD<sub>Cr</sub>、BOD、T-N、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> および TP との間に正の相関があることが示された。したがって、これらの水質項目に関する適切な水環境基準の設定や、その環境基準達成のための排水基準値の設定や適切な生活排水処理技術（または、後処理技術）の導入・運用が、衛生リスクを低減するための効果的な施策となる可能性が示された。

図 10 バンコク都の水路（地点 612、611、272）およびチャオプラヤー川（地点 Chao）における病原性細菌由来の 16S rRNA 遺伝子総コピー数の推定値。エラーバーは雨季・乾季それぞれ 3 ヶ月間における標準偏差。



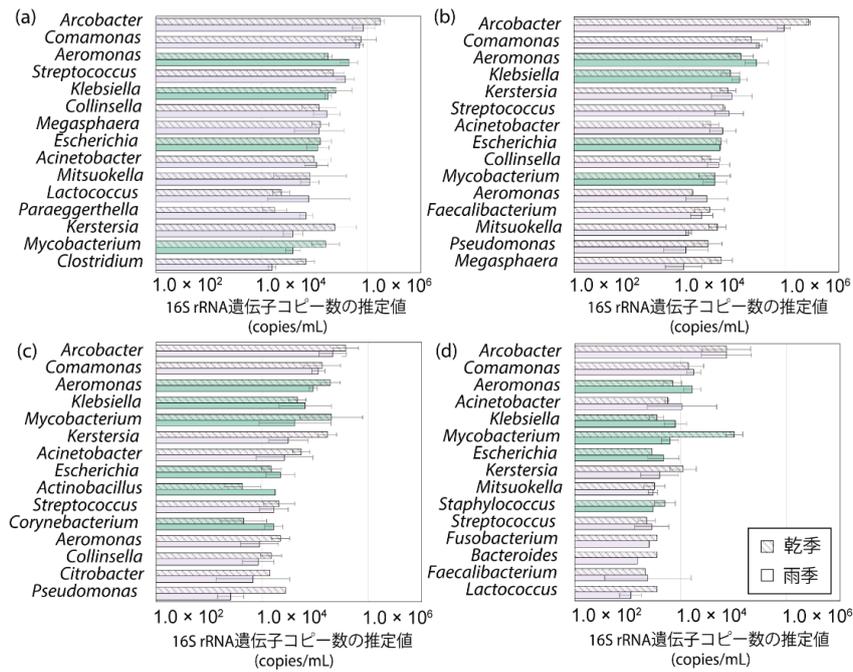
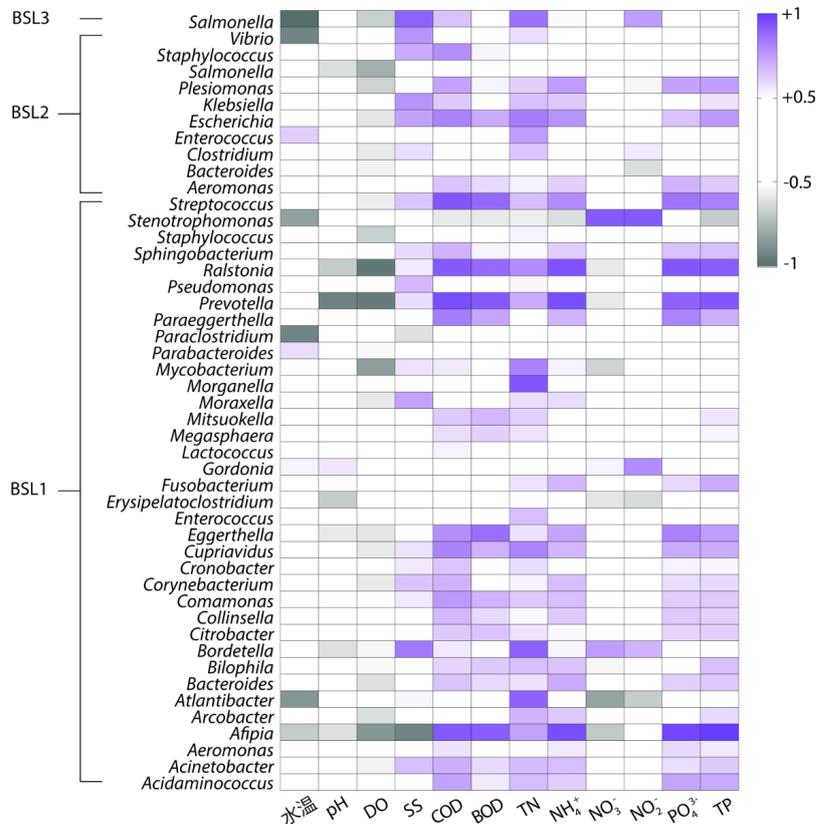


図 11 バンコク都の水路 [(a) 地点 612、(b) 地点 611、(c) 地点 272] ならびチャオプラヤー川 [(d) 地点 Chao] において高頻度に見出された病原性細菌グループ (上位 15 グループ) BSL1は紫色、BSL2は緑色の棒グラフでその 16S rRNA 遺伝子コピー数の推定値を示した。エラーバーは雨季・乾季それぞれ 3 ヶ月間における標準偏差を示す。

図 12 水路およびチャオプラヤー川における病原性細菌数の推定値と水質データに基づくそれらの相関関係をピアソンの積率相関係数が 0.5 より大きい正の相関および-0.5 より小さい負の相関のみをヒートマップで示した。



### NH<sub>4</sub>-N 濃度の異なる湖水マイクロコズムにおける *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の消長

前述のバンコク都の水路とチャオプラヤー川を対象とした調査により、栄養塩である NH<sub>4</sub>-N を含む様々な水質項目と多数の病原性細菌グループの 16S rRNA 遺伝子コピー数の推定値との間に相関関係が確認された。ここで、NH<sub>4</sub>-N は多くの微生物が効率的に利用可能な窒素源である (van Heeswijk et al. 2013)。加えて、既知の病原性細菌の多くは従属栄養性 (有機物をエネルギー源および炭素源として利用する生物) であるが、アンモニアの酸化反応によりエネルギー獲得を行うアンモニア酸化細菌との相利共生的な関係性を有する従属栄養性細菌の存在が報告されている (Keluskar et al. 2013)。したがって、NH<sub>4</sub>-N 濃度の高い水環境は、特定の病原性細菌グループにとって高い生残性をもたらす可能性が考えられた。一方、NH<sub>4</sub>-N 濃度の違いが病原性細菌グループの水環境における消長に与える影響は明らかではない。そこで本研究では、不適切に処理された生活排水処理水による汚染を想定した湖水マイクロコズムにおける NH<sub>4</sub>-N 濃度の違い (NH<sub>4</sub>-N 濃度: 2、5、または 15 mg N/L) が、*Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の消長に及ぼす影響を評価した。

図 13 にその湖水マイクロコズムにおける *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の消長解析の結果を示した。*Aeromonas* と *Arcobacter* については、実験開始直後から即座に死滅が始まり、実験期間を通して減少傾向が確認された。一方、*Mycobacterium* に関しては、定常的な増殖が確認された。本マイクロコズムで確認された *Aeromonas* および *Arcobacter* の死滅と *Mycobacterium* の増殖は一次反応で近似でき、それぞれの反応速度定数として 0.718~0.820、1.14~1.19、および -0.246~-0.183/day が得られた (プラスの数値は死滅、マイナスの数値は増殖を意味)。ここで、*Aeromonas* と *Arcobacter* については、それぞれの細菌グループに属する代表的な病原性細菌種 *Aeromonas hydrophila* や *Arcobacter butzleri* については、本研究と同様にマイクロコズムを用いた消長解析が行われている (Banhashemi et al. 2017; Fang et al. 2022)。それらの先行研究におけるマイクロコズムにおいても、*Aeromonas* および *Arcobacter* の増殖または高い生残性は確認されていない。これらの結果から、一定の環境水条件下では、*Aeromonas* および *Arcobacter* は増殖せず、

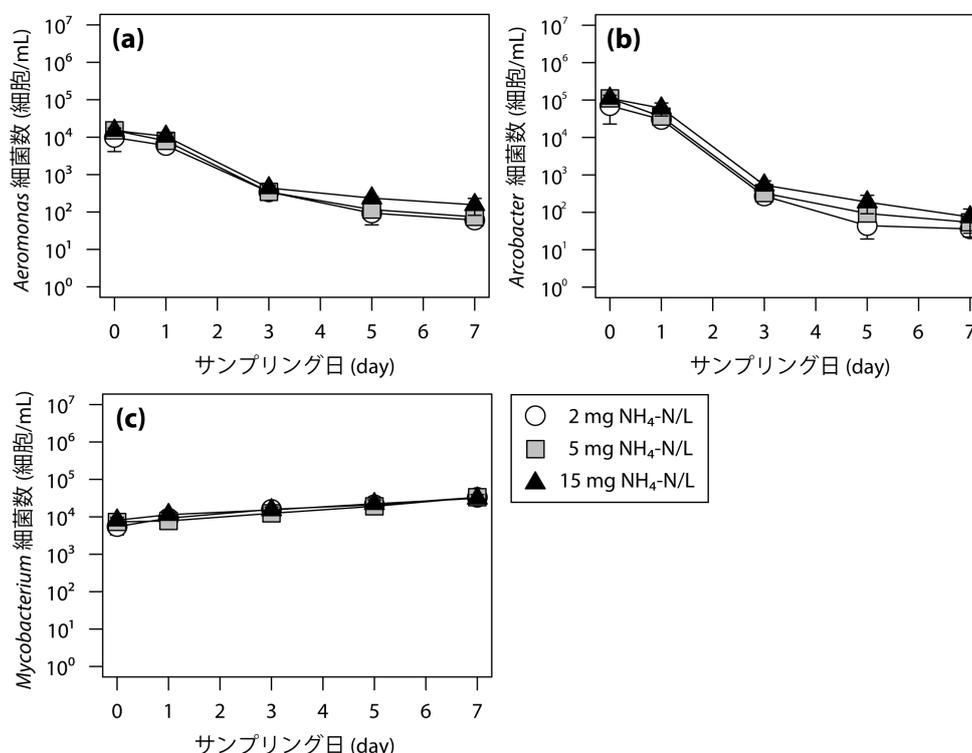


図 13 *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の汚染湖水マイクロコズムにおける消長。エラーバーは標準偏差を示す。

その死滅は比較的速やかに進行する可能性が考えられた。一方、定常的な増殖が確認された *Mycobacterium* については、この本細菌グループに起因するリスクの低減化に向け、その詳細な増殖メカニズムの解明が今後の重要な課題の1つと考えられる。

本研究の第一の目的は  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度の違いが *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の消長に与える影響を明らかにすることであったが、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度の異なる湖水マイクロコズムで確認された死滅または増殖に関する一次反応速度定数に有意な差は確認されなかった (Student の *t* 検定における Benjamini-Hochberg 法による補正 *p* 値  $> 0.01$ )。この結果から、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度のみの違いが *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の消長に与える影響は小さいと判断された。ここで、*Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* については、図 12 に示したように  $\text{NH}_4\text{-N}$  以外の水質項目との間にも正の相関関係が確認されている。したがって、今後の研究では、 $\text{NH}_4\text{-N}$  のみならず他の水質条件も変化させた様々な条件を設定したマイクロコズム実験を実施し、病原性細菌グループの生残性が高まるもしくは低くなる条件を特定する必要がある。そして、このマイクロコズム実験から明らかにされた生残性に関するデータに基づくことで、衛生リスクをより効果的に低減できる環境基準値の設定が可能になることが期待される。

#### 2.2.4 まとめ

日本国内ならびにタイ・バンコク都で稼働している生活排水処理施設における病原性細菌グループ (*Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、*Mycobacterium*) の消長解析を実施した。その結果、*Aeromonas*、*Arcobacter*、および KpSC は、排水処理方式やその運用状況に関わらず、1 log (=90%) 程度以上の除去が期待できる病原性細菌グループであることが判明した。一方、*Mycobacterium* に関しては処理施設内部において増殖している可能性もあり、殺菌工程を適用しない場合、その除去が特に難しい病原性細菌グループである可能性示された。また、処理水に比較的多くの病原細菌グループが残存するバンコク都の管理する施設 (接触安定化法、装置構成に問題を有する可能性有り) を特定し、処理水の再利用時 (散水による路面洗浄など) における安全性確保行動の必要性を示した。また、病原性細菌数と水質との関係性評価の結果、 $\text{COD}_\text{Cr}$ 、BOD、T-N、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、SS、および VSS に関する適切な排水基準値の設定が、処理水に起因する衛生リスクの低減において効果的な施策となる可能性を示した。

続いてバンコクの水路における病原性細菌由来の 16S rRNA 遺伝子コピー数の網羅的な推定を実施し、特にクーロントウイ水路においては、排水汚染が深刻であり、病原性細菌グループが比較的高濃度に存在することが明らかとなった。また、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度やその他の水質項目 ( $\text{COD}_\text{Cr}$ 、BOD、T-N、 $\text{PO}_4^{3-}$  および TP) と多種多様な病原性細菌由来の遺伝子コピー数の推定値との間に正の相関性がある事が明らかになった。このことは、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度等の水環境基準の設定や、その環境基準達成のための排水基準値の設定や適切な生活排水処理技術 (または、後処理技術) の導入・運用が、衛生リスクを低減するための効果的な施策となる可能性を示すものである。

最後に、不適に処理された生活排水処理水による汚染を想定した湖水マイクロコズムにおける *Aeromonas*、*Arcobacter*、ならびに *Mycobacterium* の消長解析を実施した。その結果、*Aeromonas* と *Arcobacter* に関しては、本マイクロコズムにおける増殖と高い生残性は確認されなかった。一方、*Mycobacterium* に関しては定常的な増殖が確認され、この細菌グループに起因するリスクの低減化に向け、その詳細な増殖メカニズムの解明が今後の重要な課題の1つと考えられた。また、病原性細菌グループと水質と関係性評価の結果に基づき、高い  $\text{NH}_4\text{-N}$  条件において病原性細菌グループの生残性が高まるという仮説を立て、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度の異なる湖水マイクロコズムにおける病原性細菌グループの死滅・増殖挙動を比較した。しかし、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度のみの変化はそれらの生残性または増殖に大きな影響を与えない可能性が示された。

## 引用文献

- 1) Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25 (17) , 3389-3402
- 2) Aoki, M., Takemura, Y., Kawakami, S., Yoochatchaval, W., Tran P., T., Tomioka, N., et al. (2023) Quantitative detection and reduction of potentially pathogenic bacterial groups of *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Klebsiella pneumoniae* species complex, and *Mycobacterium* in wastewater treatment facilities. *PLoS One*, 18 (9) , e0291742
- 3) Banihashemi, A., Van Dyke, M.I., Huck, P.M. (2017) Application of long amplicon propidium monoazide-PCR to assess the effects of temperature and background microbiota on pathogens in river water. *J. Water Health*, 15 (3) , 418-428
- 4) Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30 (15) , 2114-2120.
- 5) Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108 Suppl 1 (Suppl 1) , 4516-4522
- 6) Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26 (19) , 2460-2461
- 7) Ghaju Shrestha, R., Sherchan, S. P., Kitajima, M., Tanaka, Y., Gerba, C.P., Haramoto, E. (2019) Reduction of *Arcobacter* at two conventional wastewater treatment plants in Southern Arizona, USA. *Pathogens*, 8 (4) , 175
- 8) Fang, T., Zhang, Z., Wang, H., Rogers, M., Cui, Q (2022) Insights into effects of algae on decay and distribution of bacterial pathogens in recreational water: Implications for microbial risk management. *J. Environ. Sci.*, 113, 92-103
- 9) Guo, F., Zhang, T., Li, B., Wang, Z., Ju, F., Liang, Y.T. (2019) Mycobacterial species and their contribution to cholesterol degradation in wastewater treatment plants. *Sci. Rep.*, 9, 836
- 10) Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F. (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.*, 5 (10) , 1571-1579
- 11) Keluskar, R., Nerurkar, A., Desai, A. (2013) Mutualism between autotrophic ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and heterotrophs present in an ammonia-oxidizing colony. *Arch. Microbiol.*, 195 (10-11) , 737-747
- 12) Kristensen, J.M., Nierychlo, M., Albertsen, M., Nielsen, P.H. (2020) Bacteria from the genus *Arcobacter* are abundant in effluent from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 86 (9) , e03044-19
- 13) Martone-Rocha, S., Piveli, R.P., Matté, G.R., Dória, M.C., Dropa, M., Morita, M., et al. (2010) Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment system. *J. Water Health*, 8 (4) , 703-711
- 14) Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal*, 17 (1) , 10-12
- 15) Price, E.P., Dale, J.L., Cook, J.M., Sarovich, D.S., Seymour, M.L., Ginther, J.L., et al. (2012) Development and validation of *Burkholderia pseudomallei*-specific real-time PCR assays for clinical, environmental or forensic detection applications. *PLoS One*, 7 (5) , e37723
- 16) Radomski, N., Betelli, L., Moilleron, R., Haenn, S., Moulin, L., Cambau, E., et al. (2011) *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and Enterococci. *Environ. Sci. Technol.*, 45 (12) , 5380-5386
- 17) van Heeswijk, W.C., Westerhoff, H.V., Boogerd, F.C. (2013) Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77 (4) , 628-695
- 18) Yang, B., Kong, X., Cui, B., Jin, D., Deng, Y., Zhuang, X., et al. (2015) Impact of rural domestic wastewater irrigation on the physicochemical and microbiological properties of pakchoi and soil. *Water*, 7 (5) , 1825-1839
- 19) Zhang, T., Shao, M-F., Ye, L. (2012) 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.*, 6, 1137-1147

## 2.3. 大腸菌の衛生指標としての有用性評価

### 2.3.1 目的と経緯

ふん便汚染が生じている水域には、赤痢菌やチフス菌等の腸管系病原性細菌が存在する可能性があり、衛生的な観点で問題があると言える。ふん便汚染の指標としては、温血動物の腸管内に常在する通性嫌気性細菌の中でも最も数が多い大腸菌の採用について、環境基準設定当時にも検討がなされた。しかし、大腸菌の培養技術が未確立であったため、比較的容易に測定可能な「大腸菌群」が生活環境項目および一律排水基準として採用された。ここで大腸菌群とは、「一般にはグラム陰性の無芽胞性の短桿菌で、乳糖を分解してガスと酸を生成する好気性あるいは通性嫌気性菌の総称」（日本下水道協会 2012）である。しかし、その定義からも明らかのように、大腸菌群には大腸菌以外の多種多様な細菌も含まれるため（Elmund et al. 1999）、その衛生指標として確からしさに関する議論が長年の間行われてきた。このような状況の中、近年、簡便な大腸菌の培養技術が確立されたことにより、大腸菌群に代わって大腸菌が水道水質基準のふん便汚染の指標として利用されるようになった。このため、大腸菌群数に関する環境基準および排水基準の見直しも行われ、環境基準と排水基準に関しても大腸菌群数の項目が削除され、大腸菌数への見直しが行われた。しかし、ふん便汚染を大腸菌群よりも的確に反映しているとされる大腸菌についても、その一部は環境中で残存だけでなく増殖するという報告もあり（Jang et al. 2017）、衛生指標としての確からしさについては検証の余地がある。そこで、生活排水処理施設において主要な病原性細菌グループとして把握した細菌グループの細菌数と大腸菌数のデータ比較を行い、衛生指標としての大腸菌の確からしさについて検証した。

### 2.3.2 方法

#### 大腸菌数の測定と大腸菌数

大腸菌数は、乾式簡易培地であるコンパクトドライ EC [島津ダイアグノスティクス; 旧名: コンパクトドライ「ニッスイ」EC (日水製薬株式会社)] (Kodaka et al. 2006) を用いて測定した。本手法における大腸菌 (群) の培養は、2種類の発色酵素基質 (Magenta-Gal, X-Gluc) を含んだ乾燥簡易培地に試料液 1 mL を添加し、 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  で  $24 \pm 2$  時間インキュベーションすることで行われる。インキュベーション後、発色酵素基質の存在により大腸菌のコロニーは青～青紫色、大腸菌群のコロニーはピンク～赤紫色に着色する (図 14)。このため、青色または青紫色の大腸菌コロニー数を計測することで、試料 1 mL あたりの大腸菌数 [colony-forming unit (CFU) /mL] を求めた。

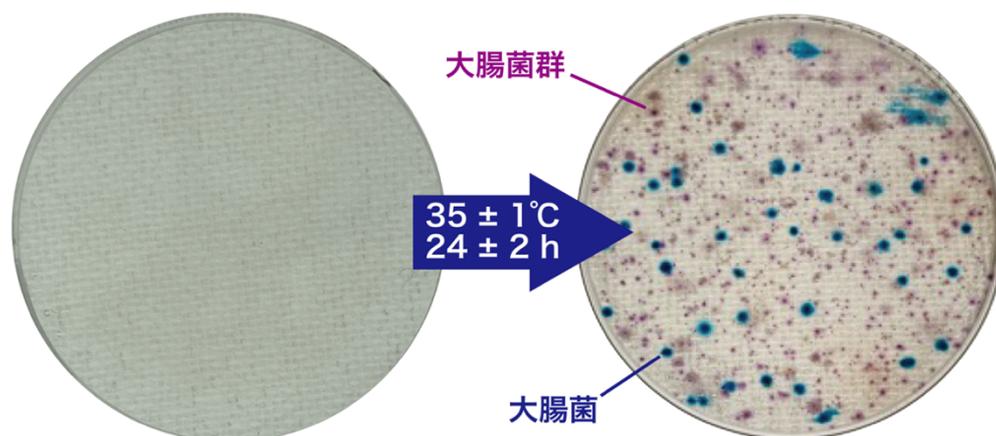


図 14 発色酵素基質を含む培地上に形成する大腸菌 (青～青紫色) および大腸菌群 (ピンク～赤紫色) のコロニー

### 2.3.3 結果と考察

#### 生活排水および汚染環境水における大腸菌の衛生指標としての有用性評価

2.2 において研究対象とした 9 つの生活排水処理施設の流入排水およびその処理水において確認された *Aeromonas*、*Arcobacter*、KpSC、ならびに *Mycobacterium* の細菌数（全てリアルタイム PCR で測定）と同一試料における大腸菌数との相関関係を図 15 に示した。その結果、大腸菌数と *Aeromonas*、*Arcobacter*、または KpSC の細菌数との間には直線的な正の相関が認められた（決定係数  $R^2$  : 0.526-0.695）。一方、大腸菌数と *Mycobacterium* 細菌数との間には相関関係は認められなかった。

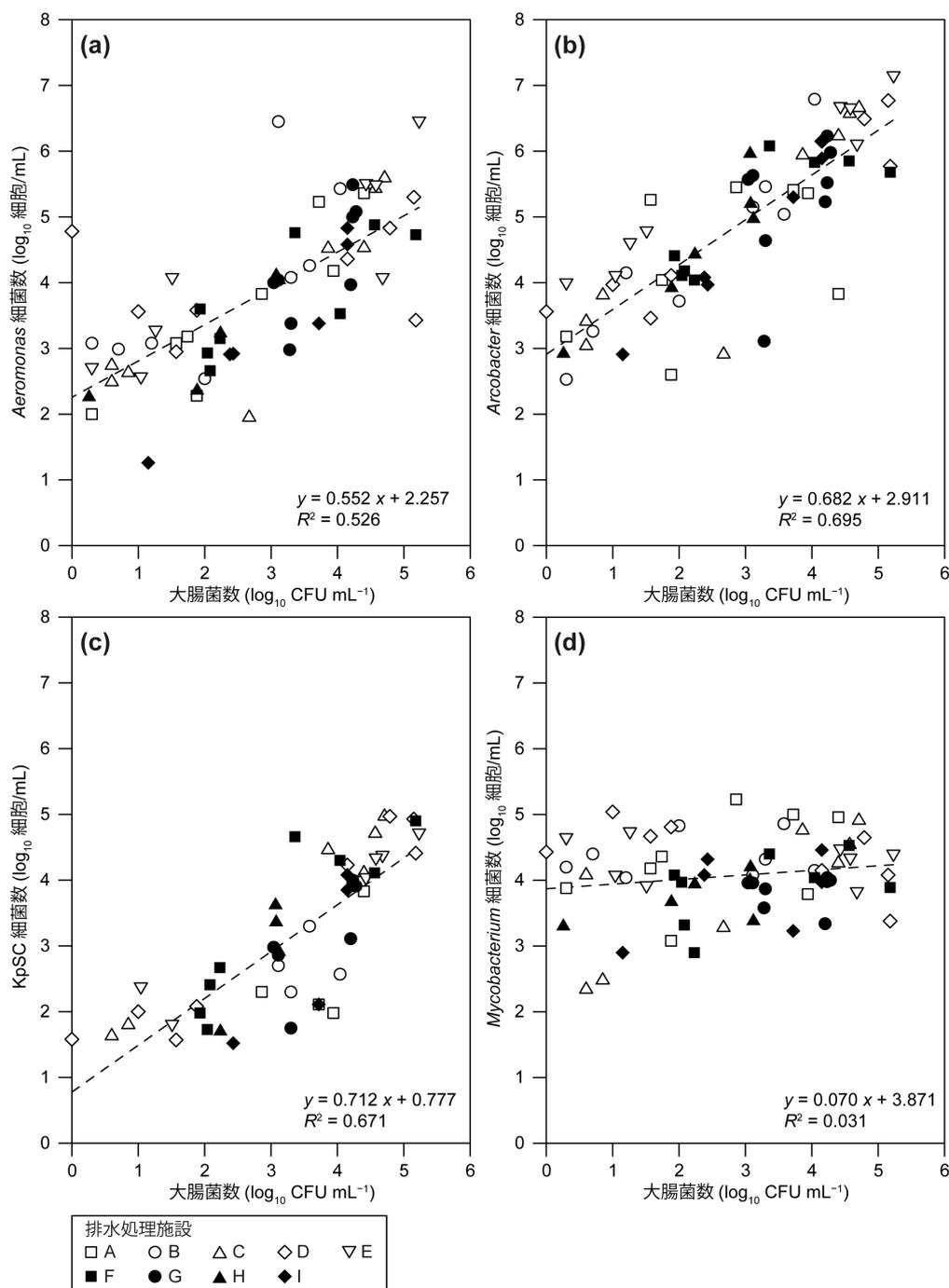
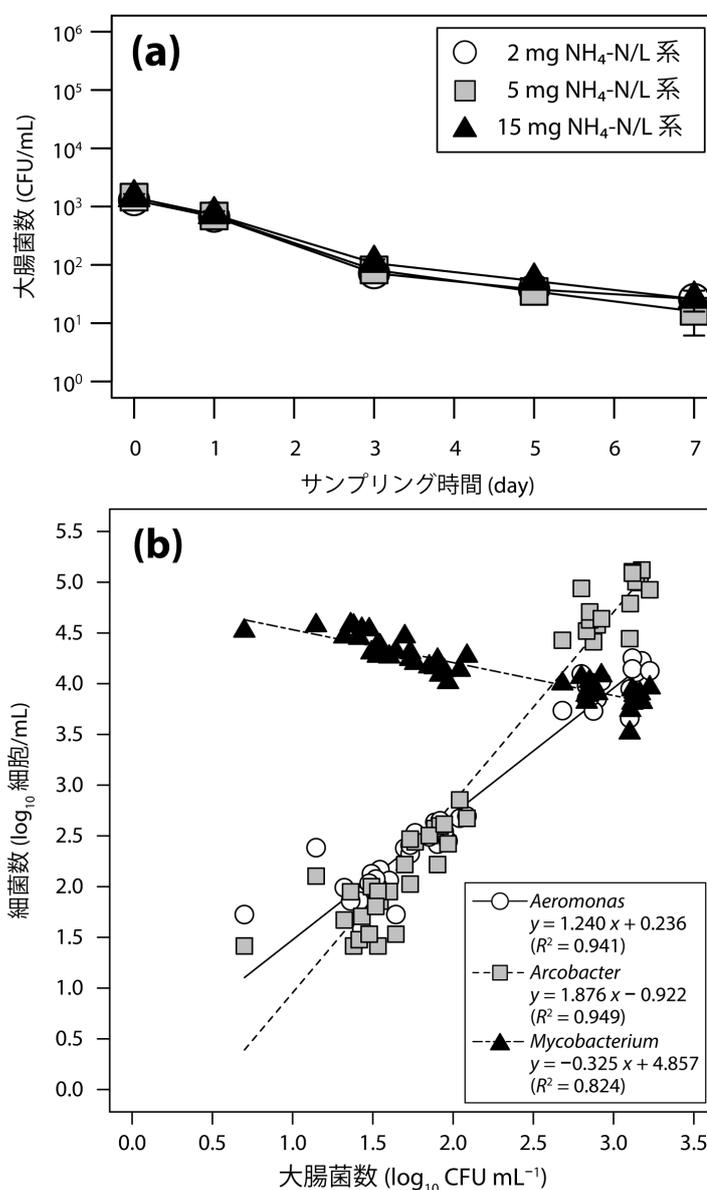


図 15 生活排水処理施設の流入水と処理水に関する大腸菌数と (a) *Aeromonas* 細菌数、(b) *Arcobacter* 細菌数、(c) *Klebsiella pneumoniae* species complex (KpSC) 細菌数、または (d) *Mycobacterium* 細菌数との相関関係

図 16a は 2.2 において *Aeromonas*、*Arcobacter* および *Mycobacterium* の消長を評価した湖水マイクロコズムにおける大腸菌の消長解析の結果である。本マイクロコズムにおける大腸菌の死滅は一次反応に従って進行し、その速度定数は 0.586–0.680 /day であった。この速度定数と *Aeromonas* 細菌 (反応速度定数 : 0.718~0.820 /day) と *Arcobacter* 細菌 (1.14~1.19/day) を比較すると、本マイクロコズムにおける大腸菌の死滅は、*Aeromonas* 細菌や *Arcobacter* 細菌と同等程度以下で進行していたと考えられる。そして、本マイクロコズムで確認された大腸菌数と同一試料における *Aeromonas*、*Arcobacter*、または *Mycobacterium* の細菌数 (全てデジタル PCR で測定) との相関関係について図 16b に示した。その結果、大腸菌数と *Aeromonas* または *Arcobacter* 細菌数との間には直線的な正の相関が確認された。

生活排水における主要な病原性細菌グループである *Aeromonas* または *Arcobacter* の存在 (量) と水域のふん便汚染レベルに関しては、先行の研究においても高い関連性が指摘されている。(Araujo et al., 1991; Marcel et al., 2002; Collado et al., 2008; Ghaju Shrestha et al., 2022)。本研究で得られたデータに加えて、これらの先行研究における指摘も踏まえると、大腸菌数は、衛生指標として高い信頼性があると言える。一方、一部の生活排水処理施設や湖水マイクロコズムにおいて増殖が確認された *Mycobacterium* については、大腸菌数とその細菌数との間に正の相関は認められなかった。このため、*Mycobacterium* に関しては、生活排水に由来するリスク管理やその低減化を達成する上で、遺伝子定量手法等による個別モニタリングの必要性が示された。

図 16 生活排水汚染湖水マイクロコズムにおける (a) 大腸菌の消長と (b) 同マイクロコズムで確認された大腸菌数と *Aeromonas*、*Arcobacter*、および *Mycobacterium* の細菌数との相関関係



### 2.3.4 まとめ

リアルタイム PCR およびデジタル PCR 検出・定量系を用いて取得した病原性細菌グループの細菌数データと同一試料に関する大腸菌数を比較し、大腸菌の衛生指標としての確からしさに関する知見を得た。その結果、*Aeromonas*、*Arcobacter*、ならびに KpSC といった主要な病原性細菌グループは、大腸菌数との間に正の相関関係が確認され、大腸菌の衛生指標としての確からしさを支持するデータが得られた。一方、*Mycobacterium*（肺感染症や皮膚感染症などの原因菌）の細菌数と大腸菌数に関しては正の相関は認められず、生活排水に起因する衛生リスクを評価し、その低減を行う上で、個別モニタリング実施の必要性が示唆された。

### 引用文献

- 1) Araujo, R.M., Arribas, R.M., Pares, R. (1991) Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. J. Appl. Bacteriol., 71 (2) , 182-186
- 2) Collado, L., Inza, I., Guarro, J., Figueras, M.J. (2008) Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. Environ. Microbiol., 10 (6) , 1635-1640
- 3) Elmund, G.K., Allen, M.J., Rice, E.W. (1999) Comparison of *Escherichia coli*, total coliform, and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency. Water Environ. Res., 71 (3) , 332-339
- 4) Ghaju Shrestha, R., Tanaka, Y., Haramoto, E. (2022) A review on the prevalence of *Arcobacter* in aquatic environments. Water, 14 (8) , 1266
- 5) Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., Ishii, S (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. J. Appl. Microbiol., 123 (3) , 570-581
- 6) Kodaka, H., Mizuochi, S., Teramura, H., Nirazuka, T., Goins, D., Odumeru, J., Kokubo, Y. (2006) Comparison of the compact dry EC with the most probable number method (AOAC official method 966.24) for enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in raw meats: Performance-tested method SM 110402. J. AOAC Int., 89 (1) , 100-114
- 7) Marcel, K.A., Antoinette, A.A., Mireille, D. (2002) Isolation and characterization of *Aeromonas* species from an eutrophic tropical estuary. Mar. Pollut. Bull., 44 (12) , 1341-1344
- 8) 日本下水道協会 (2012) 下水試験方法 下巻-2012年度版-

## サブテーマ 2 : 処理水質の確保と再利用を見据えた処理技術の開発と実証

### 2.4 スポンジ担体を用いる好気性ろ床法 DHS による生活排水処理水の後処理試験

#### 2.4.1 目的と経緯

バンコク（タイ）を始めとする東南アジアの都市部では、経済的な制約から生活排水処理設備の導入が遅れており、河川や用水路等の表層水の汚染が著しい。その原因として、現在バンコクにある 8 つの大規模集中型下水処理施設では、発生下水の 45%しか処理されていないことが挙げられる（2022 年 8 月時点）。社会経済的影響を考慮すると、大規模集中型処理施設よりも小規模分散型処理施設の方が、排水を収集するための配管設備、低い設置費用と維持費、処理された排水の現場での再利用の点などで有効であると考えられる（ISO 23056:2020）。また、バンコクでは水需要が逼迫しており、全処理水の平均 8%（v/v）が樹木の散水や道路洗浄に使われている（BMA, Annual Report 2020）。一方、ISO のガイドラインでは、安全な水の再利用のために消毒プロセスの設置が推奨されているが、バンコクの下水処理施設には消毒プロセス（塩素処理等）が設置されていない。そこで我々は、主要な処理設備の水質調査や、スポンジ担体散水ろ床法（Down-flow Hanging Sponge, DHS）による生活排水処理への適用性評価をバンコク都と連携して行ってきた。現地調査の結果、特に小規模処理施設や一部の集約型処理施設では、アンモニア性窒素（ $\text{NH}_4\text{-N}$ ）や大腸菌（*E. coli*）が処理水に高濃度に残存しており水質が不十分であった（Tomioaka et al. 2021）。したがって、公衆衛生の観点からも、生活排水処理水のさらなる水質改善、すなわちアンモニア性窒素や大腸菌の除去が必要である。我々の以前の研究では、バンコクの生活排水処理施設内にパイロット規模の DHS リアクターを導入して連続処理試験を実施し、分散型処理システムとして十分な能力を持つことを実証した（Danshita et al. 2020）。

本研究では、既存生活排水処理設備の後段処理技術としてのスポンジ担体散水ろ床法（DHS）の適用性を通年でのパイロット規模試験により評価した。バンコクのような人口密度の高い都市では、建設に必要な面積が限られているため、後段処理プロセスはコンパクト（すなわち、短時間での処理が可能）である必要がある。このため、本研究では処理時間（Hydraulic Retention Time, HRT）を徐々に短縮して処理性能を評価した。また、水の再利用を促進するためには、有機物や窒素のみならず衛生学的リスクも低減する必要がある。そこで、 $\text{NH}_4\text{-N}$ に加え、ふん便汚染の指標となる大腸菌数と、生活排水中に潜在的に多数存在する病原性細菌である *Arcobacter* 属細菌の数をモニタリングすることで、衛生学的に安全な水質の確保に資する知見を収集した。

#### 2.4.2 方法

##### DHS の運転概要

DHS はバンコク都の管理する Bongai 処理場内（活性汚泥法 [処理時間：24 h、沈殿槽を含めた処理時間：36h]）に設置した。DHS は縦方向に 4 槽構成の反応槽（各槽の高さ 88 cm、断面積 2,500  $\text{cm}^2$ ）を有し、反応槽にはスポンジ担体（円柱形：内径 29 mm、高さ 33 mm）を 1 槽あたり 4,000 個、計 16,000 個（スポンジ総容積：350 L）を充填した（図 17）。

Bongai 処理場（活性汚泥処理水）の処理水質は他の小規模処理場に比べ良好であったことから、生活排水（Raw Domestic Wastewater, RDW）と活性汚泥処理水（Activated Sludge effluent, AS eff）を混合したものを流入水として DHS に供給した。その混合比（RDW : AS eff）と処理時間（Hydraulic Retention Time, HRT）の設計値は、Phase 1 で 1:1 と 3 h、Phase 2 で 1:4 と 1.2 h、Phase 3 で 1:2 と 1 h に設定した。

その後、処理時間をさらに短縮して評価するため、反応槽を各槽の高さ 88 cm、断面積 1,250  $\text{cm}^2$  に改修し、1 槽あたり 2,000 個、計 8,000 個（スポンジ総容積：175 L）を充填した。流入水の混合比（RDW : AS eff）と処理時間の設計値は、Phase 4 で 1:2 と 1 h、Phase 5 で 1:5 と 0.5 h、Phase 6 で 1:3 と 0.4 h に設定して、評価を継続した。

流入水（Influent, Inf）と DHS 処理水（Effluent, Eff）の水質分析は週に 1~2 回の頻度で実施した。測定項目は、DO 濃度、全懸濁固形物濃度（Total Suspended Solids, TSS）、COD、BOD、硝化作用抑制剤 ATU を加えて測定した ATU-BOD、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度、 $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度、大腸菌数とした。

## 実滞留時間の評価

DHS の流入口に飽和食塩水をトレーサー剤として注入し、処理水の電気伝導度を経時的に記録した。HRT の 3~4 倍の時間計測を行った電気伝導度データの中央値を実滞留時間（実 HRT）とした。この時、DHS に流入させた混合排水の流量も測定し、流量とスポンジ総容積から理論滞留時間（理論 HRT）を算出した（Danshita et al. 2020）。

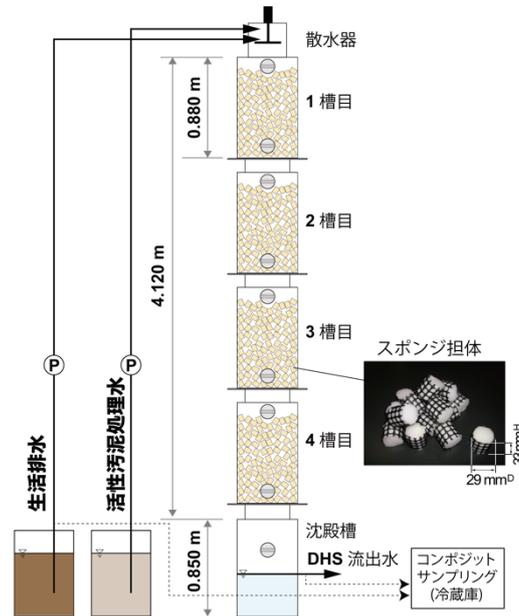


図 17 パイロット規模 DHS の概要図。スポンジ担体総容積は Phase 1~3 では 350 L、Phase 4~6 では 175 L。Takemura et al. (2022) を改変。

## 2.4.3 結果と考察

### 後処理における処理水質（HRT の短縮との関係性、実滞留時間との関係性）

パイロット規模 DHS における流入水と処理水の水質分析結果を表 7 (Phase 1~3)、表 8 (Phase 4~6) に示す。流入水の水質は、Total COD が 52~140 mg/L、NH<sub>4</sub>-N が 6~23 mgN/L、大腸菌数が 10<sup>4</sup> CFU/mL のオーダーであり、処理が不十分な下水処理場の処理水をおおよそ模倣することができた。DHS 処理水では全ての期間において、バンコク都が集約型処理場に対して課す基準 (TS < 30 mg/L、BOD < 20 mg/L、NH<sub>4</sub>-N < 5 mgN/L) を十分に満たすことができた。また、*E. coli* 除去率はいずれの Phase でも概ね 2 log<sub>10</sub> を達成し、HRT を 0.4 h (Phase 6) に短縮しても処理水の *E. coli* 濃度 1.7 × 10<sup>2</sup> CFU/mL を維持するなど、卓越した *E. coli* 除去能を示した。加えて、今後規制の対象となる可能性の高い NH<sub>4</sub>-N についても高い除去率を安定的に示し、その高い硝化能が実証された。

図 18 に各 Phase で測定した実 HRT/理論 HRT 比と理論 HRT をまとめた。理論 HRT を最も長くした Phase 1 (理論 HRT は 3 h) では、実 HRT/理論 HRT 比が 63%であった一方、理論 HRT を最も短くした Phase 6 (理論 HRT は 0.4 h) では実 HRT/理論 HRT 比が 97%まで増加した。また、同じ DHS リアクターを用いた我々の過去の研究 (Danshita et al. 2020) では、理論 HRT を 3~7 h で同様に評価したところ、実 HRT/理論 HRT 比は 41%~56%であった。理論 HRT を短くするにつれて実 HRT が理論 HRT に近づき、反応に寄与しないスポンジ担体の空隙部が減少した。これより、DHS では理論 HRT が短い方が、スポンジ担体の容積を効率よく利用できている事が示唆された。本研究で用いた DHS は、スポンジ担体をランダムに充填する構造 (ランダム充填型) であり、スポンジ担体を層状に並べた構造 (カーテン型など) に比べて、短絡流 (スポンジ担体を通過しない水の流れ) が発生しやすいと考えられる。しかしながら、ランダム充填型であっても、HRT が短い (担体を通過する流量が多い) ほど、スポンジ担体中の空隙が水で充填されることで、担体の有効容積が増え、短絡流の発生を抑制出来る可能性がある。これにより、設計処理時間を短くしてもなお良い処理水質

が得られたものと考えられた。短い HRT で高い処理性能を示す本パイロット試験の結果は、DHS リアクターが後段処理プロセスとして必要なコンパクト性という利点を有することを示している (Takemura et al. 2022)。

表 7 パイロット規模 DHS における流入水と処理水の水質分析結果 (Phase 1~3)。平均値±標準偏差。

HRT (混合比) RDW : AS eff		Phase 1		Phase 2		Phase 3	
		HRT = 3 h (1:1)		HRT = 1.2 h (1:4)		HRT = 1 h (1:2)	
		Inf	Eff	Inf	Eff	Inf	Eff
<b>BOD 負荷</b>	kgBOD/m <sup>3</sup> /day	0.38 ± 0.28		0.47 ± 0.25		0.45 ± 0.49	
<b>アンモニア負荷</b>	kgN/m <sup>3</sup> /day	0.19 ± 0.04		0.26 ± 0.14		0.21 ± 0.07	
<b>DO</b>	mg/L	1.6 ± 1.1	5.4 ± 0.8	3.7 ± 0.8	4.6 ± 0.9	3.1 ± 1.2	5.4 ± 0.7
<b>TSS</b>	mg/L	50 ± 50	2 ± 2	14 ± 9	2 ± 2	14 ± 3	1 ± 1
<b>Total COD</b>	mg/L	140 ± 39	32 ± 19	69 ± 30	22 ± 13	56 ± 17	22 ± 15
<b>Total ATU-BOD</b>	mg/L	55 ± 30	6 ± 6	25 ± 12	5 ± 4	22 ± 17	2 ± 1
<b>NH<sub>4</sub>-N</b>	mgN/L	23 ± 5	1 ± 1	13 ± 7	1 ± 1	10 ± 3	1 ± 0
<b>NO<sub>3</sub>-N</b>	mgN/L	0 ± 0	10 ± 3	1 ± 1	8 ± 4	1 ± 1	3 ± 2
<b>E.coli</b>	CFU/mL	7.8E+04	1.6E+02	1.3E+04	5.6E+01	7.5E+04	8.5E+02
<b>E.coli log 除去率</b>		2.7		2.4		1.9	

表 8 パイロット規模 DHS における流入水と処理水の水質分析結果 (Phase 4~6)。平均値±標準偏差。

HRT (混合比) RDW : AS eff		Phase 4		Phase 5		Phase 6	
		HRT = 1 h (1:2)		HRT = 0.5 h (1:5)		HRT = 0.4 h (1:3)	
		Inf	Eff	Inf	Eff	Inf	Eff
<b>BOD 負荷</b>	kgBOD/m <sup>3</sup> /day	0.83 ± 0.34		0.96 ± 0.26		1.4 ± 0.5	
<b>アンモニア負荷</b>	kgN/m <sup>3</sup> /day	0.36 ± 0.11		0.30 ± 0.08		0.50 ± 0.10	
<b>DO</b>	mg/L	2.5 ± 0.8	5.2 ± 0.5	3.2 ± 1.0	5.4 ± 0.4	5.0 ± 0.6	6.3 ± 0.7
<b>TSS</b>	mg/L	20 ± 5	3 ± 3	11 ± 4	1 ± 1	16 ± 8	4 ± 5
<b>Total COD</b>	mg/L	88 ± 23	22 ± 12	52 ± 18	13 ± 10	72 ± 27	16 ± 9
<b>Total ATU-BOD</b>	mg/L	34 ± 14	4 ± 2	20 ± 5	3 ± 1	25 ± 10	5 ± 2
<b>NH<sub>4</sub>-N</b>	mgN/L	15 ± 4	3 ± 2	6 ± 2	0 ± 0	9 ± 2	2 ± 3
<b>NO<sub>3</sub>-N</b>	mgN/L	1 ± 1	4 ± 2	1 ± 0	4 ± 1	2 ± 1	2 ± 1
<b>E.coli</b>	CFU/mL	4.5E+04	3.1E+02	1.7E+04	1.2E+02	3.4E+04	1.7E+02
<b>E.coli log 除去率</b>		2.2		2.2		2.3	

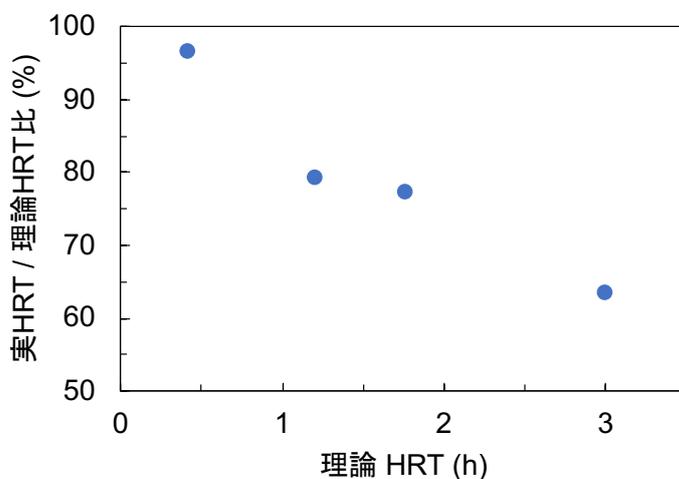


図 18 実 HRT/理論 HRT 比と理論 HRT の関係

## 仕上げ処理における大腸菌（および病原性細菌の）除去特性

Bongai 処理場に流入する生活排水について、全細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物相解析の結果、約 10%が *Arcobacter* 属細菌であることが明らかになった。*Arcobacter* 属細菌は下痢性疾患の病原菌であることが知られていることから、*Arcobacter* 属細菌が DHS でどの程度除去されるかを、衛生指標微生物である *E. coli* とともに評価した。

Phase 2 および Phase 3 の DHS リアクターの流入水および処理水について、16S rRNA 遺伝子を標的とした qPCR 法で *Arcobacter* 属菌数を測定した（各 Phase で n=5）。DHS 処理水の定量値が qPCR 法の定量限界値以下の場合、定量限界値を用いて安全性を考慮する平均値を算出した。流入水と流出水の平均値は、Phase 2 で  $1.8 \times 10^4$  cells/mL と  $2.1 \times 10^1$  cells/mL、Phase 3 で  $1.9 \times 10^5$  cells/mL と  $4.2 \times 10^2$  cells/mL であった。Phase 2 および Phase 3 における *Arcobacter* 属細菌の除去率は、それぞれ 3.0 log<sub>10</sub> および 2.7 log<sub>10</sub> であった。この除去効率は、大腸菌除去率と同程度であった（表 7 および表 8）。また、大腸菌の除去は、NH<sub>4</sub>-N 濃度の低下の様相（硝化の進行）と類似していた（Takemura et al. 2022）。

図 19 に Phase 2 および Phase 3 における DHS 流下方向（流入からの距離）での *E. coli* と *Arcobacter* 属細菌の濃度変化を示す。*E. coli* と *Arcobacter* 属細菌ともに排水の流下に伴い減少する傾向が見られ、処理水では 2 log<sub>10</sub> 以上の高い除去率を示した。このように、DHS において *Arcobacter* 属細菌はおおむね *E. coli* と同様に除去されたことから、*E. coli* 除去率を *Arcobacter* 属細菌除去率を推定する指標として用いる可能性が示唆された。

図 20 に DHS への *E. coli* 流入負荷に対する DHS 処理水の *E. coli* 濃度をまとめた。その結果、DHS 処理水の *E. coli* 濃度は、*E. coli* 流入負荷に依存することがわかった。これらの結果は、様々な下水処理施設の後段プロセスとして利用した際、DHS の規模をどの程度に設定すれば、DHS 処理水の *E. coli* 濃度がどの程度になるかを推定するのに有益な情報となる。例えば、タイの表層水における水環境基準 [200 most probable number (MPN) /mL] を達成するには *E. coli* の流入負荷を約 10<sup>9</sup> CFU/L-sponge/day 以下にすればよいことがわかる。このように、放流先の水質基準や灌漑用水基準などの再利用先の水質基準に合わせた DHS の負荷設定に必要な情報が得られた。

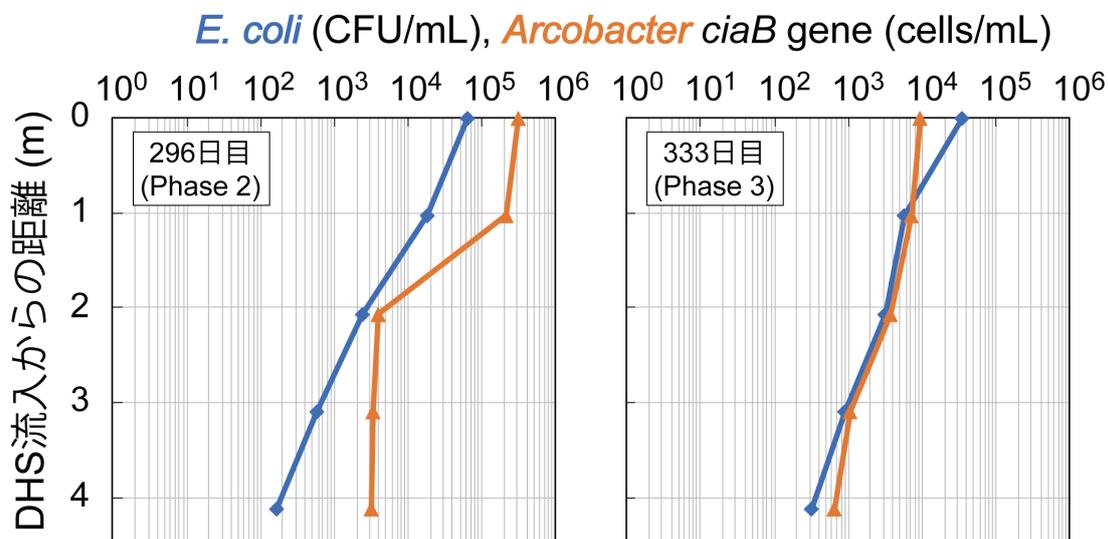


図 19 *E. coli* と *Arcobacter* 属細菌のプロファイル

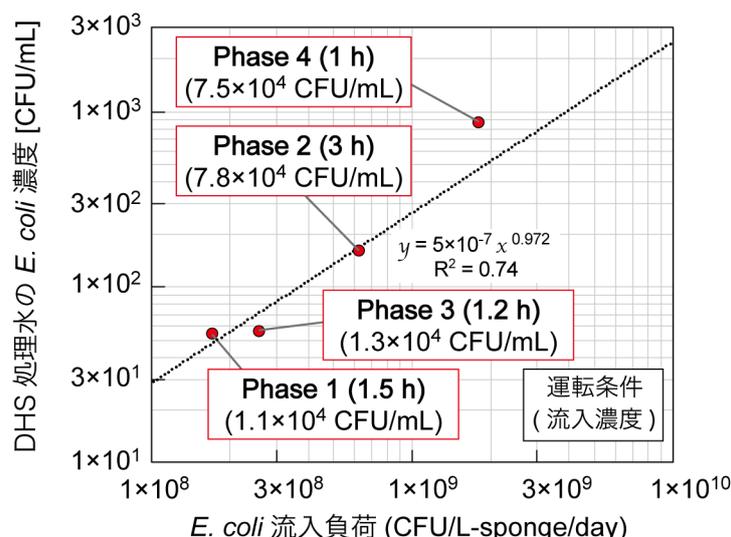


図 20 DHS への *E. coli* の流入負荷と処理水中の *E. coli* 濃度の関係

#### 2.4.4 まとめ

本研究では、パイロット規模のDHSによる既存処理設備の後処理技術としての性能評価を0.4～3hの処理時間条件において行った。その結果、全ての処理時間条件においてDHSは一貫して優れた水質（TSS < 10 mg/L、BOD < 10 mg/L、NH<sub>4</sub>-N < 5 mgN/L、*E. coli* < 10<sup>3</sup> CFU/mL）を安定的に示した。また、病原性細菌として生活排水中に多数存在する *Arcobacter* 属細菌についても 2 log<sub>10</sub> 以上の除去率を有していた。DHSは、HRT=0.4h（24分）の高速処理条件下においても、卓越したNH<sub>4</sub>-N除去能（硝化能）と*E. coli*除去能において優位性を示した。したがって、DHSを後処理技術として利用した際には、コンパクトな施設として導入可能であり、水質の改善により水の再利用を促進できる可能性が示された。また、装置のサイズが小さいため建設費が安く抑えられ、運転に係わる消費電力も少ないため、現在、バンコク都の下水処置場で用いられている後曝気装置の代替技術としての導入が期待できる。

#### 引用文献

- 1) Bangkok Metropolitan Administration, Annual Report 2020 Water Quality Management Office (in Thai language) .
- 2) Danshita T, Yoochatchaval W, Takemura Y, Miyaoka Y, Kada M, Tejju W, Thonglee S, Sonaka H, Yamaguchi T, Tomioka N, Banjongproo P, Okadera T, Ebie Y, Syutsubo K (2020) Performance evaluation of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor as a decentralized domestic wastewater treatment system in tropical regions. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 55 (7) , 847-857
- 3) International Organization for Standardization, ISO 23056:2020, Water Reuse in Urban Areas –Guidelines for Decentralized/onsite Water Reuse System– Design Principles of a Decentralized/onsite System.
- 4) Takemura Y, Yoochatchaval W, Danshita T, Miyaoka Y, Aoki M, Tran PT, Tomioka N, Syutsubo K. (2022) A pilot-scale study of a down-flow hanging sponge reactor as a post-treatment process of domestic wastewater treatment system at different hydraulic retention times, Journal of Water Process Engineering, 50, 103313
- 5) Tomioka N, Yoochatchaval W, Takemura Y, Matsuura N, Danshita T, Srisang P, Mungjomklang N, Syutsubo K (2021) Detection of potentially pathogenic *Arcobacter* spp. in Bangkok canals and the Chao Phraya river. Journal of Water and Health, 19 (4) , 657-670

## 2.5 DHS のラボ試験装置による窒素除去特性、HRT 統一、短・長 DHS での違い

### 2.5.1 目的と経緯

DHS リアクターは優れた有機物除去、アンモニア性窒素除去能力を有しており、かつ曝気のための外部動力が不要であるため、省エネルギー型排水処理システムとして注目され、技術実装が進みつつある。また、DHS リアクターは通常の下水処理方式である活性汚泥法と比べ、硝化能力および大腸菌数除去性能が高いことが報告されている (Okubo et al. 2015)。しかし、DHS リアクターが卓越した処理能力をもつ要因は明らかになっておらず、担体サイズや装置構造に改善の余地がある (Tyagi et al. 2021)。例えば、担体のサイズが大きくなると製造コストを低減できるが、酸素供給能の低下が懸念される。また装置の高さ (流下長) を抑制する事で、DHS の設置がより容易になると考えられるが、高さの抑制が酸素供給能などに影響を及ぼし、硝化能や大腸菌数除去性能が低下する可能性もある。そこで、本研究では DHS リアクターのスポンジ担体のサイズやリアクターの流下長を変化させ、水質浄化能力や大腸菌数除去能力に与える影響を評価するための実験を行った。

### 2.5.2 方法

#### スポンジ担体サイズが異なる場合の水質への影響評価

図 21 に本実験で用いた DHS リアクターの概略図を示す。リアクターは、寸法 2.2 cm×2.2 cm×2.2 cm のポリウレタン製スポンジ (以下、2.2 cm 角) を用いたリアクターおよび寸法 3.3 cm×3.3 cm×3.3 cm のポリウレタン製スポンジ担体 (以下、3.3 cm 角) を数珠繋ぎに連結した構造である。また、スポンジはプラスチック製の支持体で覆われ円柱状となっている。スポンジの個数は 2.2 cm 角を用いたリアクターは 47 個、3.3 cm 角を用いたリアクターは 35 個からなり、どちらも全高約 150 cm とし、これらのリアクターを 2 基ずつ用意した。なお、同実験ではサイズがより大きい担体 (5.5 cm 角) についても同様の評価を試みたが、短絡流の発生が著しかったため、水質分析結果は省略する。模擬下水の組成は、デキストリン 22.3 mg/L、酢酸ナトリウム 19.2 mg/L、炭酸水素ナトリウム 100 mg/L、酵母エキス 34.2 mg/L、ポリペプトン 34.2 mg/L、肉エキス 19 mg/L、尿素 10.7 mg/L、塩化アンモニウム 20.0 mg/L とし、pH が約 7 となるように調整した。模擬下水は、全スポンジ担体体積 (2.2 cm 角リアクター : 393 cm<sup>3</sup>、3.3 cm 角リアクター : 903 cm<sup>3</sup>) に基づいた HRT が 3 時間となるように供給した。また、本実験では、リアクターの処理高さ方向におけるプロファイルを測定するため、流入水と処理水に加え、中間に設置したスポンジ担体通過後についても採水し、水質分析を行なった。また、大腸菌は 2.2 cm 角リアクターの片方だけに供給し、大腸菌数除去性能を評価した。水質分析項目は、COD、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、T-N、大腸菌数とした。また、スポンジ内部の DO 濃度は、FireStingGO2 (PyroScience 社) のニードルタイプを用いて測定した。

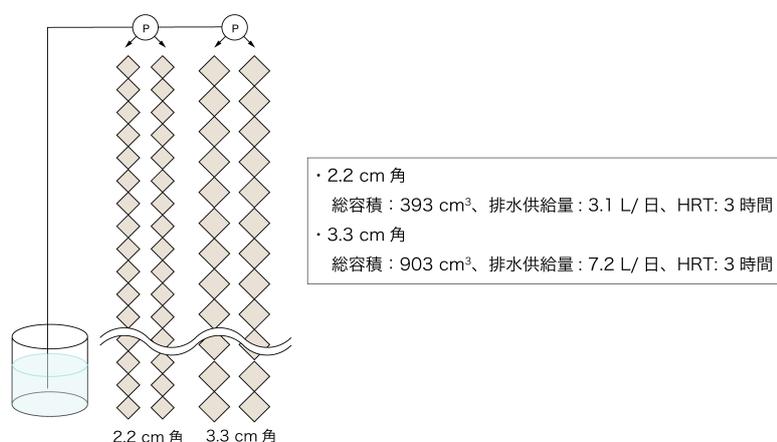


図 21 スポンジ担体サイズが異なる装置概要図

### 流下長が異なる場合の水質への影響評価

図 22 に本実験で用いた DHS リアクターの概略図を示す。3.3 cm 角スポンジ担体を 9 個連ねたリアクター（以下、短リアクター、全高約 40 cm）と 27 個連ねたリアクター（以下、長リアクター、全高約 120 cm）をそれぞれ 2 基ずつ用意した。模擬下水の組成は先の実験と同一とし、HRT が 2 時間となるように供給した。長リアクターにおける HRT は実規模 DHS における排水流下速度（0.6 m/hr）を想定して設定した（Watari et al. 2022）。本実験ではすべてのリアクターに大腸菌を供給し、流下長の違い（40 cm、120 cm）による大腸菌数の除去性能の比較を行った。本実験においても、リアクターの処理高さ方向におけるプロファイルを測定するため、流入水と処理水に加え、中間に設置したスポンジ担体通過後についても採水し、水質分析を行なった。水質分析項目は、先の実験と同様とした。

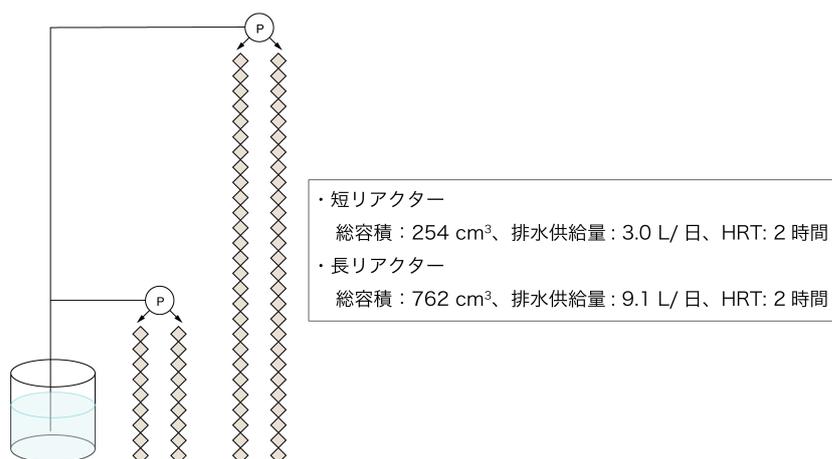


図 22 流下長が異なる装置概要図

### 2.5.3 結果と考察

#### スポンジ担体サイズが異なる場合の水質への影響評価

図 23 に 2.2 cm 角および 3.3 cm 角のスポンジ担体を用いたリアクターの流下方向水質分析（COD、窒素）の結果を示す。COD は、2.2 cm 角、3.3 cm 角ともにリアクターの上部で除去が進み、2.2 cm 角の方が早く進行することが確認された。一方、リアクター下端の 150 cm の地点では、いずれの担体でも COD 除去率は 90% 程度であり、良好な有機物除去が行われていることが確認された。窒素は、3.3 cm 角担体を用いたリアクターでは、2.2 cm 角と比較して硝化の遅れが見られ、流下方向 40 cm から下端にかけて硝化反応が進行した。担体サイズが大きくなることで内部の酸素濃度分布に影響を及ぼし（酸素濃度が低下）、硝化の進行が抑制された事が推測された。

図 24 にスポンジ内部の DO 測定結果を示す。いずれのリアクターについても流下長 100 cm の地点のスポンジ担体を対象として測定した。リアクターによって、スポンジ表面の DO 濃度に差があったものの、表面から内部に向かって 500~600 μm 地点までは直線的に DO が減少する様子が確認された。2.2 cm 角、3.3 cm 角、5.5 cm 角のいずれの担体でも、DO の減少度合いは、100 μm あたり 0.8 mg/L 程度であった。また、いずれの担体についても、スポンジ表面から 1000 μm 地点では、DO はほぼ検出されない程度まで低下していた。したがって、好気性処理を行う微生物が活発に活動できる範囲は、スポンジ担体のサイズに関わらず、表面から 1 mm 程度までの部分であることが明らかとなった。これにより、体積あたりの表面積（比表面積）が大きい形状を持つ構造、すなわち担体サイズが小さい方が、好気性処理にとって優位性が高いことが示唆された。

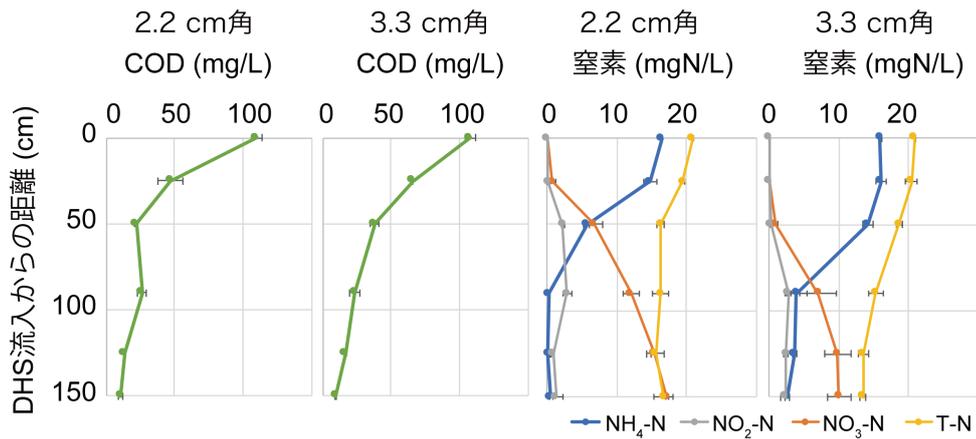
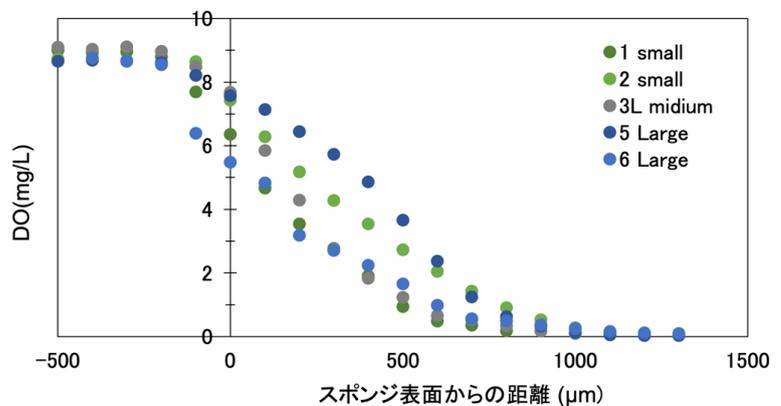


図 23 スポンジ担体サイズが異なる場合の水質への影響評価

図 24 スポンジ担体サイズが異なる場合の水質への影響評価。マイナス値は空气中、0地点はスポンジの表面、正值はスポンジ表面からの距離



流下長が異なる場合の水質への影響評価

図 25 に、短リアクター（全高 40 cm）および長リアクター（全高 120 cm）の水質分析結果（COD、窒素、*E. coli*）を示す。COD は、短リアクターと長リアクターのどちらもリアクター下端で十分な除去が確認された。窒素は、短リアクターでは NH<sub>4</sub>-N はほとんど除去されず、NO<sub>2</sub>-N がやや生成されており、硝化反応が十分に進行していなかったといえる。また、NH<sub>4</sub>-N が 20 cm 地点で微増しているが、これは大腸菌を含む有機態窒素からの放出が原因と考えられた。一方、長リアクターではリアクター下部（80 cm 以降）で NH<sub>4</sub>-N の減少と NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N の生成が確認され、短リアクターに比べ硝化反応が顕著に進行していた。*E. coli* 除去率は、短リアクターで 1.5 log 程度、長リアクターで 2.5 log 程度であった。本実験においては HRT を同一時間に設定して性能評価を行っており、硝化反応および *E. coli* 除去を進行させるには、流下長が長い方（縦長の構造）が有利であることが明らかとなった。

図 26 にスポンジ担体の表面と内部における大腸菌数の測定結果を示す。大腸菌数の測定は全ての実験を終了した後実施した。表面については、スパーテルを使用してスポンジ担体の表面に付着した汚泥を丁寧に剥がしとって水で洗い流し採取した。また、内部については、表面を取った後の担体をビニールバックの中に入れて適宜水を足しながら汚泥をほぼ完全に搾り取って採取した。採取した汚泥溶液について大腸菌数を測定し、汚泥溶液量から換算してスポンジ担体 1 つあたりの大腸菌付着数を求めた。担体によってばらつきは生じているものの、どの担体もおおむね内部の方が表面より大腸菌数が多かった。特に、大腸菌の減少割合が著しいリアクターの下部においては、内部と表面の差が大きかった。この傾向は、汚泥量あたり（Log<sub>10</sub>/gVSS）で換算しても同様であったことから、スポンジ担体の表面は大腸菌にとって生息しにくい環境であることが示唆された。したがって、同じ滞留時間である場合には、より多くの担体を排水が通過する長リアクターの方が、通過する表面部分が多いため、大腸菌除去率が高かったと考えられる。

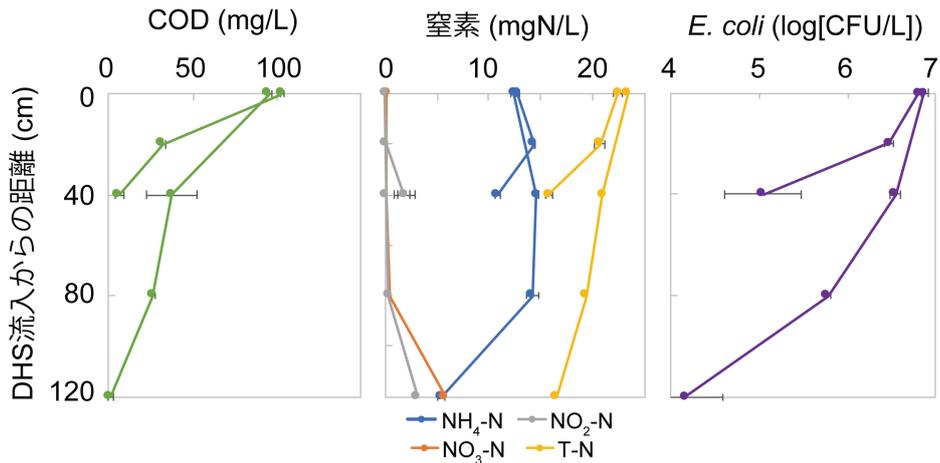


図 25 流下長が異なる場合の水質への影響評価

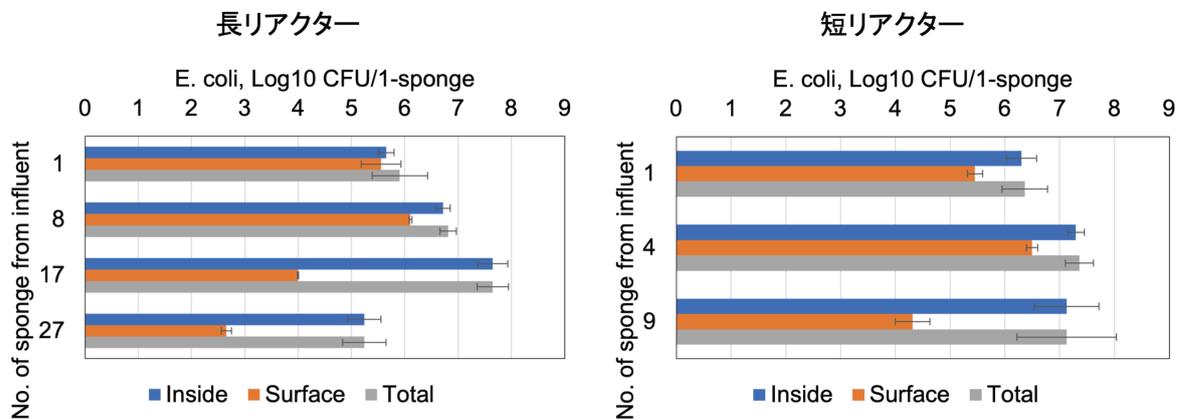


図 26 スポンジ担体の表面と内部における大腸菌数の比較。青色が内部、橙色が表面、灰色は内部と表面の合計値

#### 2.5.4 まとめ

本研究では、HRT を同一とし、担体サイズおよび流下長が異なる場合への水質への影響を評価した。担体サイズは小さい方が有機物除去と硝化の進行が早くなることが確認された。一方、同実験ではサイズがより大きい担体（5.5 cm 角）についても同様の評価を試みたが、短絡流の発生が著しく、実用には向かないことがわかった。担体サイズは大きいほどコスト低減になるが、実用性を考慮すると、担体サイズは 3.3 cm 角程度が望ましいと考えられた。また、硝化、*E. coli* 除去には流下長の影響が大きい、すなわち、DHS の躯体は幅広型よりも縦長型の方が望ましいことが明らかとなった。

#### 引用文献

- 1) Okubo, T., Onodera, T., Uemura, S., Yamaguchi, T., Ohashi, A., Harada, H. (2015) On-site evaluation of the performance of a full-scale down-flow hanging sponge reactor as a post-treatment process of an up-flow anaerobic sludge blanket reactor for treating sewage in India. *Bioresour. Technol.*, 194, 156-164
- 2) Tyagi, V.K., Ali, M., Tawfik, A., Maharjan, N., Kazmi, A.A., Okubo, T. (2021) Future perspectives of energy saving down-flow hanging sponge (DHS) technology for wastewater valorization—a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 20, 389-418
- 3) Watari, T., Kirishima, Y., Choiesai, P., Harada, H., Kotcharon, W., Matsueda, T., et al. (2022) Performance evaluation of quick and compact package-type down-flow hanging sponge system for domestic sewage treatment. *J. Water Process Eng.*, 47, 102798

## 2.6 DHSのラボ試験装置による病原菌除去機構の解析

### 2.6.1 目的と経緯

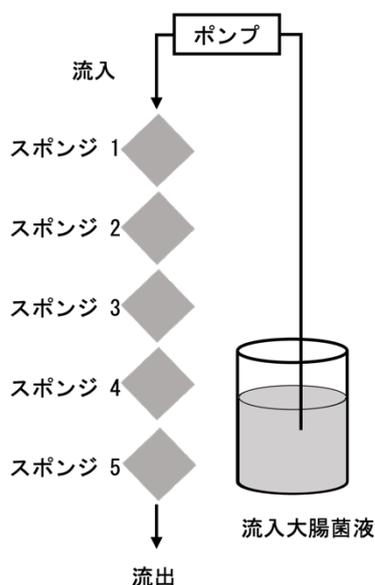
2.4でDHSが大腸菌や病原菌を除去する能力が高いことが示された。また、これまでもDHSによる大腸菌の除去機構について、捕食、自然死、酸素毒性などがあげられてきたが、その主なメカニズムは依然として不明であった。DHSのように担体に微生物が密集した状態で保持して処理を行うシステムでは細菌群集間の競合システムが大腸菌などの除去に有効である可能性が高い。細菌群集の競合メカニズムとして、接触依存性増殖阻害(CDI) (Aoki et al. 2005)、VI型分泌システム(T6SS) (Lennings et al. 2019)、バクテリオシン (Riley and Wertz 2002)、抗生物質などが考えられ、それぞれに作用機作が異なるため、本研究では細菌同士の競合システムに焦点をあて、微生物集積度が異なる担体(スポンジ)を用いてDHSにおける大腸菌及の減少機構の解明を試みた。

### 2.6.2 方法

#### 装置概要

スポンジ5個を、それぞれのスポンジ同士が接触しない距離で支持板に取り付けた釘状ピンに刺し、垂直に配置することで実験装置を作成した(図27)。大腸菌液は上部からポンプで供給し、室温条件で実験を行った。

図27 DHSスポンジ流下に伴う大腸菌濃度の変化を測定するための装置の概要



#### 17ヶ月および30ヶ月スポンジおよび新しいスポンジを用いた装置の作成

2.5と同様の手法で17ヶ月間および30ヶ月間通水したDHSの下部のスポンジをプラスチックガイドから取り外し、スポンジ表面に付着した後生動物を取り除いた後、実験装置に取り付け実験を行った。17ヶ月のスポンジは微生物(細菌群集)が付着して灰色を呈していた。30ヶ月のスポンジは微生物の付着がさらに進み、濃い灰色から黒色に着色していた。また、微生物の付着していない新しいスポンジと予め大腸菌(後述のSTF-8株)のみを付着させたスポンジに異なる株の大腸菌(ATCC 700891株)を流入する実験もコントロールとして準備した。

#### 人工下水の調整

スポンジ下部のCODの濃度を元に、実験および大腸菌の培養には2.5で使用した模擬下水を1/8に希釈した模擬下水(以下希釈下水)を利用した。17ヶ月および30ヶ月のスポンジに希釈下水を流入する実験である17ヶ月貧栄養および30ヶ月貧栄養、および、栄養状態が大腸菌の減少に与える影響を明らかにするために、30ヶ月実験時に、大腸菌の流入時に通常濃度の人工下水と混合することによって、人工下水の3/4濃度の栄養を含む流入水を流入する系である30ヶ月富栄養の3系列を作り比較を行った。

## 使用大腸菌と計測方法

排水に含まれる処理対象の大腸菌として生活排水より単離した STF-8 株（アンピシリン、ストレプトマイシン感受性）を使用した。STF-8 株は希釈下水で 90 時間培養後直接装置に流入させた。

また予め STF-8 株を付着させたスポンジにおける大腸菌の除去の様相を評価するため、別途、ATCC 700891（アンピシリン、ストレプトマイシン耐性）を用いた。ATCC 700891 株は抗生物質入りの大腸菌用培地で培養、希釈下水で洗浄後、希釈下水に懸濁して流入させた。

大腸菌の生菌数（CFU）の計測は流入および各スポンジの流出水 0.1ml を採取、10 倍希釈を繰り返した後、2.3.2 に記載した方法で測定した。なお ATCC 700891 株の計測時の試料の希釈水には抗生物質を添加した。

## スポンジ絞り液の作成と大腸菌への影響

実験終了後スポンジを絞り、スポンジ絞り液を作成し、細菌群集構造解析を行った。また、30 ヶ月通水した DHS の下部から採取したスポンジを絞り、スポンジ絞り液を取り出し大腸菌の生残性への絞り液の影響を検討した。取り出した絞り液は遠心分離により沈殿部と液相部に分離し、液相部は孔形 0.2 μm のフィルターを用いてろ過滅菌した。このスポンジ絞り液そのままろ過滅菌した液相部にそれぞれ大腸菌を添加して 7 時間後に大腸菌の生菌数を測定した。

## 細菌群集構造解析

細菌群集構造解析は 16S rRNA 遺伝子を 515F と 806R（Caporaso et al. 2011）のプライマーセットで PCR 増幅後、MiSeq Reagent Kit v3 を用いてシーケンスを取得し、SILVA reference database v.138.1 に基づいて解析を行った。

## 2.6.3 結果と考察

### 17 ヶ月と 30 ヶ月の貧栄養条件および 30 ヶ月富栄養条件下における大腸菌の挙動

17 ヶ月と 30 ヶ月の貧栄養条件のスポンジ（細菌群付着）に大腸菌（STF-8 株）を流入させ、24 時間経過後に流下方向での大腸菌数の変化を調査した。その結果、排水の流下に伴い大腸菌数は減少し、流入水と流出水の大腸菌の濃度の差はそれぞれ 2.1 log（17 ヶ月貧栄養）および 1.6 log（30 ヶ月貧栄養）に達し、17 ヶ月の方が大腸菌の減少が大きかった。

30 ヶ月スポンジには栄養状態が大腸菌の減少に与える影響を明らかにするために、有機物、栄養塩濃度の高い排水（人工下水の 3/4 濃度の栄養を含む）と混合し供給した。その結果、流入水と流出水の大腸菌の濃度の差は 0.5 log（30 ヶ月富栄養）となり大腸菌の減少は抑制された（図 28）。

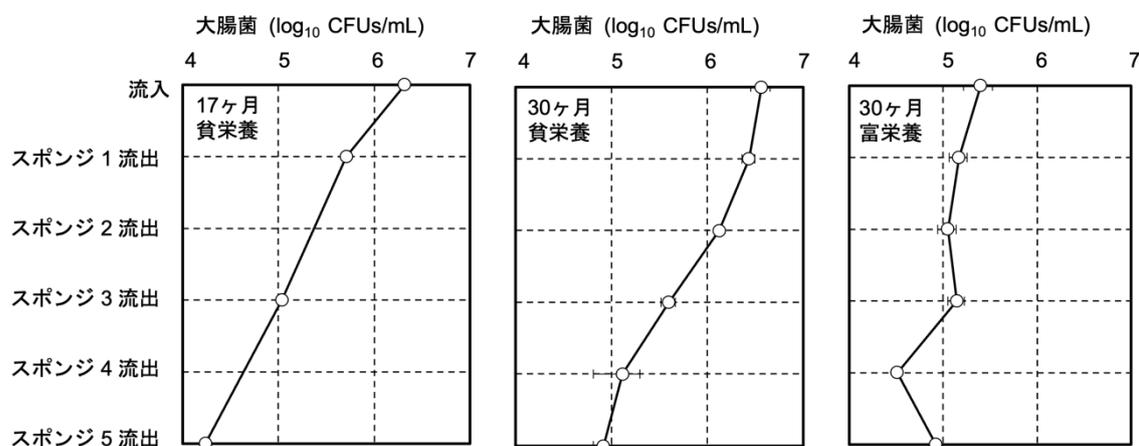


図 28 17 ヶ月貧栄養、30 ヶ月貧栄養および 30 ヶ月富栄養条件下における 24 時間後の大腸菌の挙動

### 新しいスポンジと大腸菌のみが付着したスポンジにおける大腸菌の挙動

スポンジ担体に付着した細菌群集による大腸菌の除去作用を確認するため、細菌が付着していない新しいスポンジおよび、予め大腸菌（STF-8）のみを付着させたスポンジによる大腸菌除去の様相を評価した。なお新しいスポンジには STF-8 を含む排水を、大腸菌のみを付着させたスポンジには ATCC 700891 株を含む排水を流入させた。

新しいスポンジや予め大腸菌（STF-8）のみを付着させたスポンジに大腸菌を流入した場合、流入から流出にかけて大腸菌濃度は全く減少せず、人工下水の処理に係わる細菌群集が付着したスポンジのみが大腸菌を減少させる効果があることが明らかとなった（図 29）。

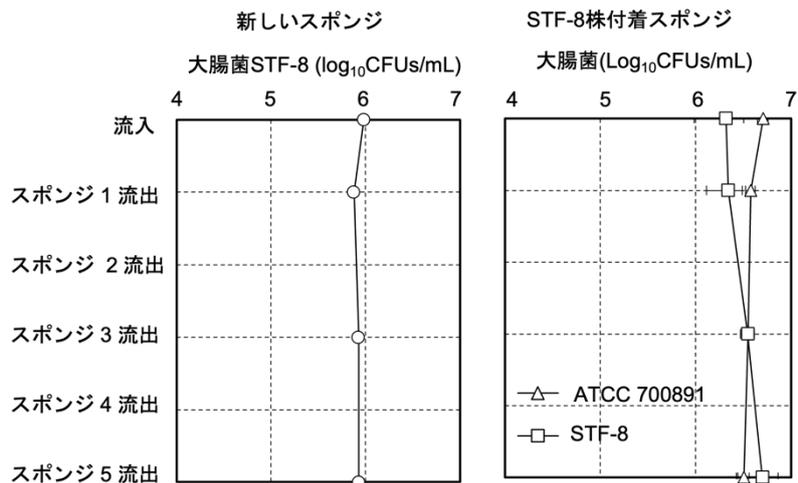


図 29 新しいスポンジと大腸菌を付着させたスポンジでの大腸菌の挙動

### スポンジ絞り液による大腸菌の減少効果

スポンジ絞り液、スポンジ絞り液のろ液および蒸留水に大腸菌（STF-8 株）を添加し、7 時間後に大腸菌 CFU を測定した。その結果、ろ液、蒸留水では添加時からの減少率が 0.33、0.39 log と小さく、一方スポンジ絞り液による減少率は、1.2 log と極めて高い値を示した（図 30）。このことから、スポンジ絞り液に存在している細菌群集が大腸菌の減衰に大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、ろ液に大きな影響がなかったことから、細菌から放出される抗生物質やバクテリオシンによる効果は認められず、細菌同士の接触を必要とするシステムである CDI や T6SS が大腸菌の減少に大きな役割を担っていると考えられた。

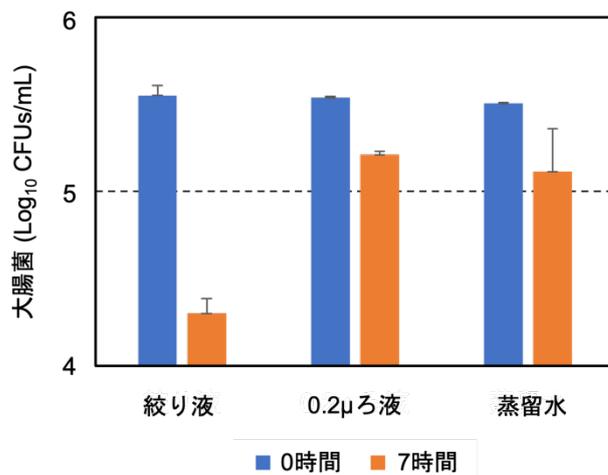


図 30 スポンジ絞り液による大腸菌の減少

スポンジに付着した細菌の群集構造

スポンジに付着した細菌で最も多くを占めたのはプロテオバクテリアで、17ヶ月、30ヶ月貧栄養、30ヶ月富栄養それぞれ、41%、42%、62%を占めた（図31）。

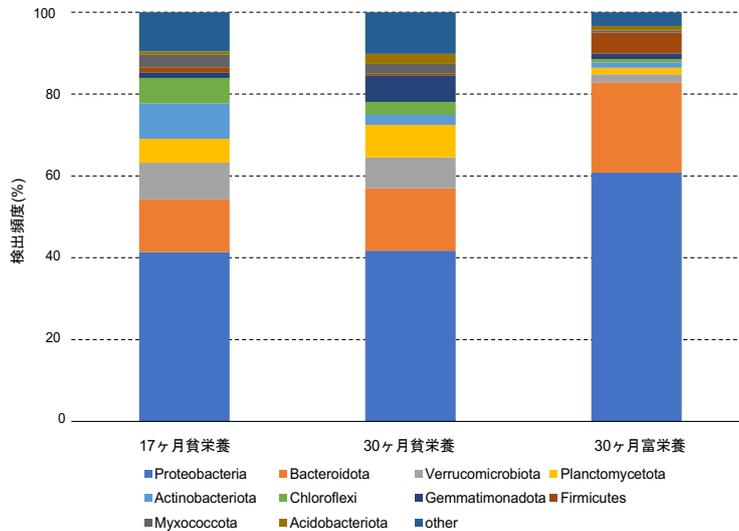


図31 門レベルでの細菌の相対的検出頻度（3%未満はその他）

DHS スポンジにおいて大腸菌の減少に影響を及ぼしている細菌とその機構

DHS スポンジの細菌群集ではバークホルデリア（Burkholderiales）目がプロテオバクテリアの中で最も高頻度に検出される（図32）。Burkholderiales 目には T6SS 機構を用いて他の細菌を抑制する種が含まれている（Lennings et al. 2019）。また、Xanthomonadales 目も細菌間競争に T6SS 機構を使用することが報告されている種が含まれている（Liyanapathiranaage et al. 2022）。30ヶ月富栄養のスポンジにおいても Burkholderiales 目が優占しているが、大腸菌の減少率は低かった。T6SS の発現には栄養飢餓が必要であると報告されており（Song et al. 2015; Knittel et al. 2020; Yang et al. 2019）、17ヶ月貧栄養や30ヶ月貧栄養がより栄養飢餓状態になっていたため、大腸菌減少率が高かったと考えられる。DHS は高い細菌保持能を有し、下方に向かって有機物が分解していくシステムであることから、その下部において、栄養が枯渇し、且つ T6SS を有する細菌が優占することにより、大腸菌が効率よく減少していると考えられた。

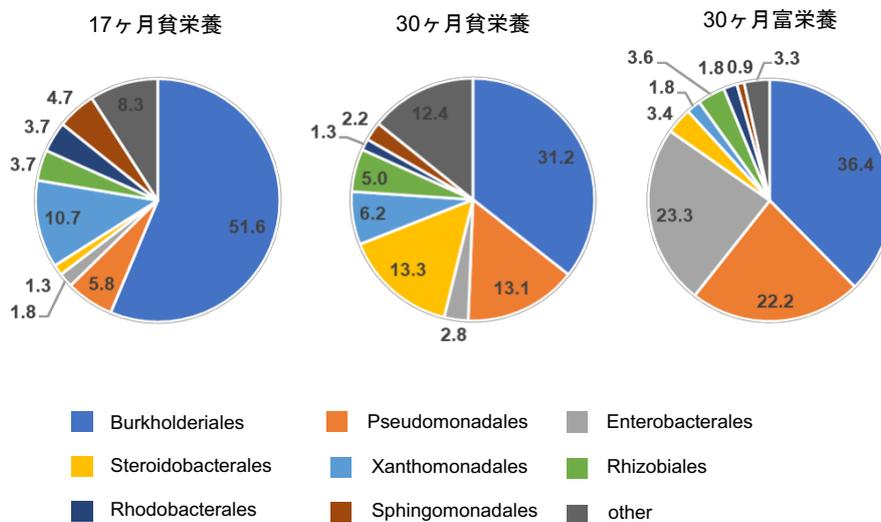


図32 スポンジ絞り液中のプロテオバクテリア細菌群集構造（1%未満はその他）

## 2.6.4 まとめ

本研究では、栄養制限され、下水処理に係わる細菌群集が付着した DHS スポンジを通過後、大腸菌濃度が2 log 以上減少することが確認した。一方、細菌付着の無い新しいスポンジでは、大腸菌濃度が減少することはなかった。また、富栄養状態の条件下では、大腸菌減少は0.5 log 程度に抑制され、効果的な除去を達成する上で栄養制限が重要な役割を果たすことが示された。さらに、大腸菌の減少にはスポンジの細菌群集との直接的な接触が必要なが示され、細菌群集の中には細菌間の競合システムであるタイプ VI 分泌システム (T6SS) を保有するものが多数含まれている可能性が明らかとなった。これらのデータは、DHS スポンジにより作り出される貧栄養状態と、高密度に集積されたタイプ VI 分泌システム (T6SS) 保有菌が、大腸菌の減少に大きな役割を担っている可能性を示している。

## 引用文献

- 1) Aoki, S.K., Pamma, R., Hernday, A.D., Bickham, J.E., Braaten, B.A., Low, D.A. (2005) Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, 309 (5738) , 1245-1248
- 2) Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108 Suppl 1 (Suppl 1) , 4516-4522
- 3) Knittel, V., Sadana, P., Seekircher, S., Stolle, A. S., Komer, B., Volk, M., et al. (2020) RovC - a novel type of hexameric transcriptional activator promoting type VI secretion gene expression. *PLoS Path.*, 2020, 16 (9) , e1008552
- 4) Lennings, J., Makhoulf, M., Olejnik, P., Mayer, C., Brötz-Oesterhelt, H., Schwarz, S. (2019) Environmental and cellular factors affecting the localization of T6SS proteins in *Burkholderia thailandensis*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 309 (6) , 151335
- 5) Liyanapathirana, P., Wagner, N., Avram, O., Pupko, T., Potnis, N. (2022) Phylogenetic distribution and evolution of type VI secretion system in the genus *Xanthomonas*. *Front. Microbiol.*, 13, 840308
- 6) Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 117-137
- 7) Song, Y.H., Xiao, X., Li, C.F., Wang, T.T., Zhao, R.X., Zhang, W.P., et al. (2015) The dual transcriptional regulator RovM regulates the expression of AR3- and T6SS4-dependent acid survival systems in response to nutritional status in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Environ. Microbiol.*, 17 (11) , 4631-4645
- 8) Yang, X.B., Song, Y.H., Dai, Q.Y., Zhang, H.Y., Song, L., Wang, Z., et al. (2019) The stringent response factor, RelA, positively regulates T6SS4 expression through the RovM/RovA pathway in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiol. Res.*, 220, 32-41

## 2.7 DHSの浄水分野への適用可能性評価

### 2.7.1 マレーシアにおける水源河川の窒素汚染の把握

#### 2.7.1.1 目的と経緯

未処理生活排水の流入や農地からの面源負荷は、表層水質汚染の原因となっている。特に排水処理設備の普及が遅れている東南アジア地域では水質汚染が深刻であり、浄水設備や給水にも影響を及ぼしている。東南アジアの典型的な都市であるクアラルンプール（マレーシア）では、降雨量の減少する乾季において、水源河川の水質が悪化する傾向にあり、アンモニア性窒素の濃度が基準値（NH<sub>4</sub>-N, 1.5 mgN/L, NO<sub>3</sub>-N, 10 mgN/L）（Ministry of Health, Malaysia, 2016）を超過することで、しばしば給水の停止が生じている。

そこで、本研究では、クアラルンプール近郊河川の水質データをとりまとめ、窒素汚染の特徴を把握して、適切な浄水技術選定のための基礎情報を収集することを目的とした。

### 2.7.1.2 方法

クアラルンプール近郊の3つの主要な水源河川、Selangor river、Klang river、Langat river (図 33) を調査対象として選定した。マレーシア政府、灌漑・排水局から河川水質のデータを数年分取得し、主成分/因子分析などを実施し、水供給の中断につながる水質パラメータを特定した。

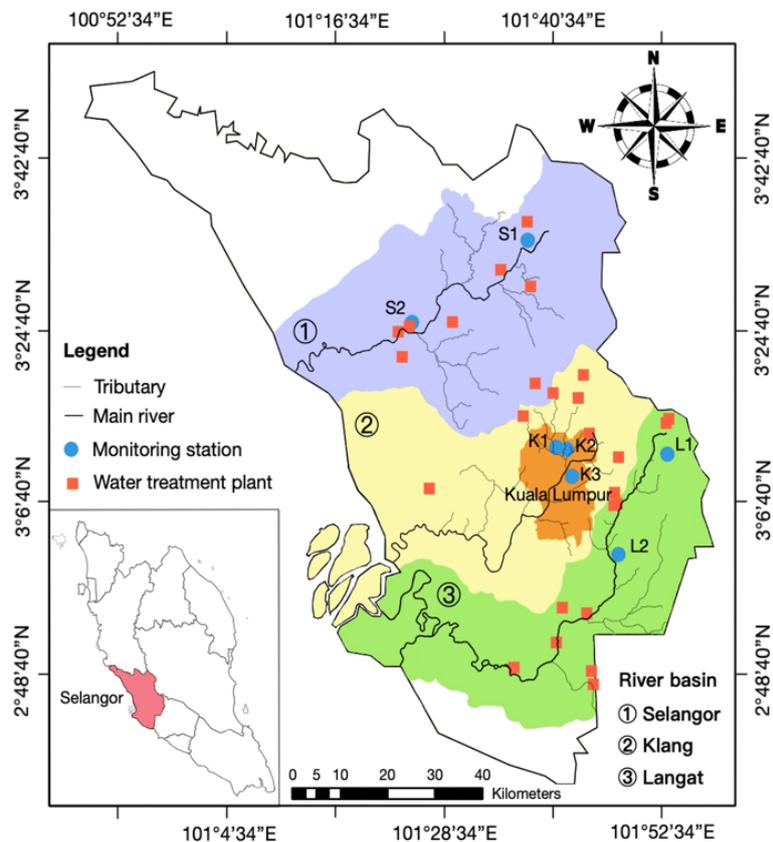


図 33 水質の調査・解析を行ったクアラルンプール近郊の主要3河川

### 2.7.1.3 結果と考察

図 34 に、Langat river の上流、中流、下流域における 2012 年から、2017 年のアンモニア性窒素濃度の変化を示した。図 33 に示すとおり、Langat river では、中流域に数多くの浄水設備 (図中の赤四角) が存在している。

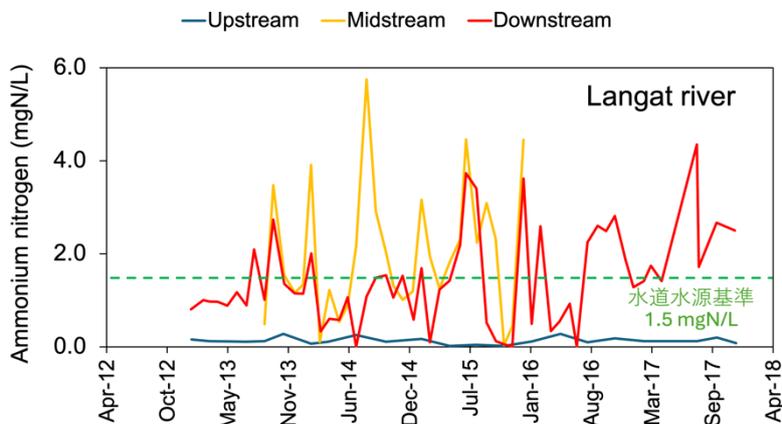


図 34 Langat river の上流域、中流域、下流域におけるアンモニア性窒素濃度の変化

Langat river 上流域 (L1) では、アンモニア性窒素濃度が低く保たれているが、人間活動、農業・産業活動が活発化する中流域 (L2)、下流域では、水道水源基準である 1.5 mgN/L をしばしば超過している事が明らかになった (図 34)。加えて、Langat river では、アンモニア性窒素濃度が年々増加する傾向が見られた。またアンモニア性窒素による汚染傾向は、Selangor river の中流域 (S2) でも見られた。

一方、Klang river では、水道水源としての基準値 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ , 10 mgN/L) を頻繁に超過しないものの、硝酸性窒素の濃度が高く、その他の 2 河川とは異なる傾向であった。Klang river 上流域のモニタリングポイント K1, K2, K3 における水質の主成分/因子分析を行った結果、河川水質に最も影響を与える汚染要因は、硝酸性窒素、全浮遊物質 (SS) であった。河川上流という事もあり、農地からの面源が硝酸性窒素汚染の原因と推測された (Loi, J. X. et al., 2022)。

図 35 には、マレーシアの典型的な浄水設備のフロー図を示した。マレーシアの水源河川は、濁質の濃度が高く、主にポリ塩化アルミニウム (PAC) や高分子ポリマーを添加する凝集沈殿と、後処理として急速砂ろ過、塩素消毒を組み合わせた設備構成となっている。

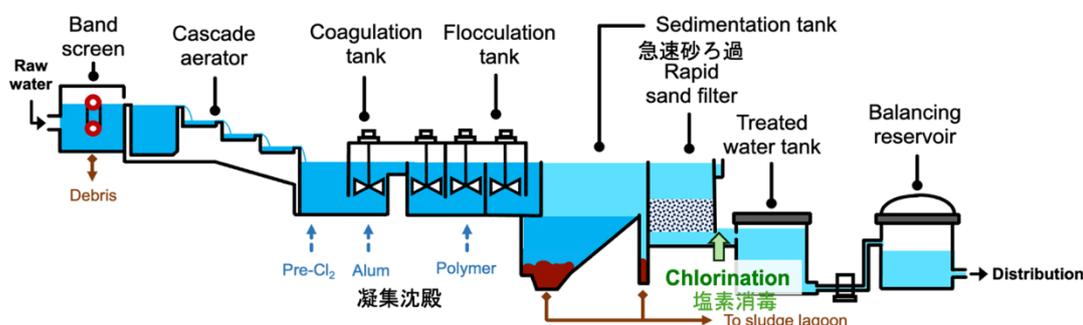


図 35 マレーシアにおける浄水設備のフロー図

この浄水設備では、アンモニア性窒素除去のための設備が含まれていない。消毒を目的とした塩素処理では、ある程度の量のアンモニア性窒素が除去されるが、同時に臭気物質であるトリクロラミンが生成される。また、塩素によるアンモニア性窒素除去反応は安定せず、塩素の投与量が増えるため運用コストが高くなり、健康被害が懸念される消毒副産物 (トリハロメタンなど) が生成されるなどの問題も多い。そのため、原水中のアンモニア性窒素濃度が 1.5 mgN/L を超過すると浄水設備を停止させる必要があり、最終的には給水が中断される。そのため、持続可能で安全な給水を確保するには、従来の浄水設備にアンモニア性窒素除去技術を付加する必要がある。

#### 2.7.1.4 まとめ

クアラルンプール近郊の水源河川の窒素汚染状況について調査を行ったところ、Langat river および Selangor river の二つの流域では人間活動 (未処理生活排水の排出)、農業・産業活動 (面源、産業排水の排出) の結果、中下流域においてアンモニア性窒素汚染が顕著であり、水道水源水の基準値 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ , 1.5 mgN/L) をしばしば超過する事が明らかになった。また、浄水設備の処理フロー調査の結果、アンモニア性窒素を除去する設備が無い事が給水停止の原因であり、早急に窒素除去設備の導入が必要である事が明らかになった。

### 2.7.2 ラボスケール DHS によるアンモニア性窒素除去性能の検討、浄水技術への応用の可能性評価

#### 2.7.2.1 目的と経緯

クアラルンプール近郊河川における水質汚染状況の調査の結果、アンモニア性窒素濃度の基準超過により、給水停止が頻繁に発生していること、また、既存の浄水設備の調査により、アンモニア性窒素の処理設備が備えられていないこ

とが給水停止の主な原因であることが明らかになった。そこで、東南アジア地域においても運用可能な維持管理性、省エネルギー性能を備え、生活排水処理設備としての性能実証がなされているスポンジ担体を用いる好気性ろ床（Down-flow Hanging Sponge:DHS）のアンモニア性窒素除去設備としての浄水技術への応用の可能性評価をラボスケール実験により行うことを目的とした。

### 2.7.2.2 方法

模擬アンモニア性窒素汚染河川水の処理試験は、2系列（DHS-1, DHS-2）のラボスケール DHS（図 36）を用いて行った。DHS は、6 段の円柱状のカラム（上部より Segment 1～6）で構成されており、全長（接続部を含む）は、1.44 m となった。カラムには、直径、高さ 33 mm の円柱状のスポンジ担体を全容量で 8L 充填した。担体には、マラヤ大学学内の池から採取した底泥を植種した。模擬河川水（流入水）は、ポンプにより DHS 上部から供給し、下部から処理水を得た。流入水、処理水を定期的にサンプリングし、水質分析を行ってアンモニア性窒素除去能を評価した。またスポンジ担体から付着汚泥を採取し、16S rRNA 遺伝子を標的とした細菌群集構造解析（増幅領域 515F-806R）を行い、汚泥中に存在する主要なアンモニア酸化細菌を同定した。

表 9 に DHS の各 Phase における運転条件を示した。河川水のアンモニア性窒素汚染の状況を勘案し、それぞれ DHS-1 は、流入アンモニア性窒素濃度を 5 mgN/L、DHS-2 は 2.5 mgN/L として運転を行った。模擬河川水は、水道水に、アン

表 9 DHS の各運転 Phase における運転条件

Reactor	Phase	1	2	3	4
	Days	21 - 72	73 - 201	202 - 302	303 - 360
	HRT (min)	60	30	20	15
DHS-1	Inf. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ( $\text{mg N L}^{-1}$ )	$4.9 \pm 0.2$	$3.2 - 4.9$	$5.0 \pm 0.5$	$4.7 \pm 0.3$
DHS-2	Inf. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ( $\text{mg N L}^{-1}$ )	$2.5 \pm 0.1$	$1.7 - 2.4$	$2.5 \pm 0.3$	$2.2 \pm 0.5$

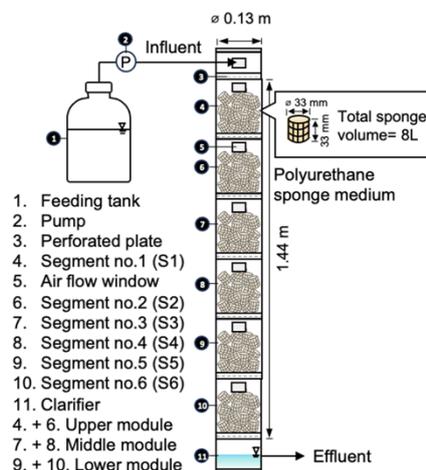


図 36 ラボスケール DHS の概要

モニア性窒素に加え、アルカリ度として  $\text{K}_2\text{CO}_3$  をそれぞれ 83.9 mg/L (DHS-1)、41.9 mg/L (DHS-2) 添加して作成した。また、細菌の生育に必要な無機塩類 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.8 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 34 mg/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 60.5 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 16 mg/L) と少量の有機物およびビタミン源 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 14 mg/L, Peptone, 4.7 mg/L, Yeast extract, 0.8 mg/L) の添加も行った (Loi, J.X. et al., 2024)。

処理時間 (Hydraulic Retention Time: HRT) を 60 分に設定して運転を開始し (Phase 1)、30 分 (Phase 2)、20 分 (Phase 3)、15 分 (Phase 4) と徐々に短縮させた。なお、処理試験期間中の水温は、 $28^\circ\text{C}$ 前後であった。

### 2.7.2.3 結果と考察

図 37 に DHS-1、DHS-2 の流入 (influent) および流出 (effluent) アンモニア性窒素濃度とアンモニア性窒素除去率の経日変化を示した。DHS-1、DHS-2 共にアンモニア性窒素の除去 (硝化) が生じるまでに、およそ 30～40 日を要した。60 日目以降では、アンモニア性窒素除去率が 80～90%以上となり、処理水濃度も 0.5 mgN/L まで低下したため、73 日目より HRT を短縮し、HRT 30 分の条件下 (Phase 2) での性能評価を行った。

Phase 2 では、装置運転上のトラブル (120 日目前後) により、DHS-1 で処理水質が一時的に悪化するが、それ以外の期間ではアンモニア性窒素の除去率は非常に安定しており、特に流入アンモニア性窒素濃度の低い DHS-2 では、除去

率は 99%に達した。Phase 3 では、HRT を 20 分に短縮したが、DHS-1、DHS-2 共にアンモニア性窒素の除去は非常に安定していた。HRT を 15分に短縮したPhase4では、それぞれDHS-1、DHS-2におけるアンモニア性窒素除去率は、95%、99%を達成した。DHS-1 では、アンモニア性窒素の負荷量は、DHS-2 の 2 倍となったため、除去率の低下を招いたが、運転期間を通じて、処理水のアンモニア性窒素濃度は基準値である 1.5 mgN/L を下回った。なお、除去されたアンモニア性窒素は、硝化により硝酸性窒素として処理水中に残存しており、脱窒や同化による窒素除去は、1~2 割程度に止まった。また、亜硝酸性窒素は処理水中で未検出であった。

以上の結果より、DHS は、低濃度のアンモニア性窒素汚染河川水の浄化に対応可能な、処理性能を安定的に発揮できることが明らかになった。

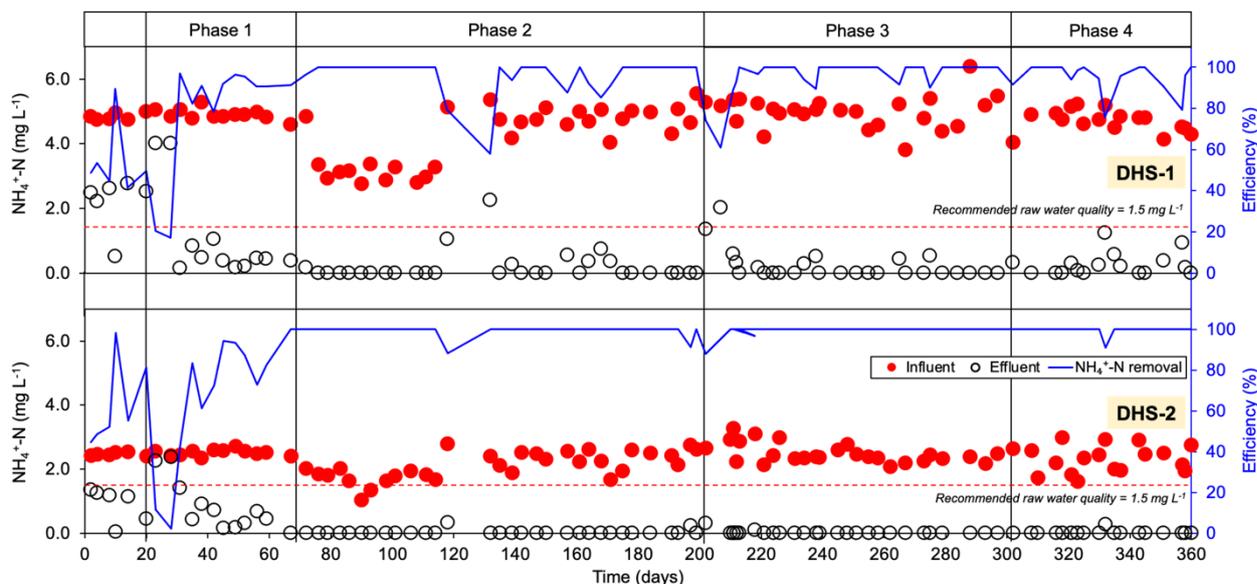


図 37 ラボスケール DHS による模擬アンモニア性窒素汚染河川水の処理特性

図 38 には、DHS のスポンジ担体への汚泥付着状況と、運転開始後 30 日目 (Phase 1) 、356 日目 (Phase 2) における保持汚泥濃度の変化を示した。運転開始後 30 日目の汚泥濃度は、装置上部の Segment 1 で 1.5 g VSS/L-sponge 程度と低かったが、長期運転により、356 日目には、Segment 1~4 で約 7~11 g VSS/L-sponge にまで増加し、DHS の優れた汚泥 (水質浄化に係わる細菌群集) 保持能が示された。この優れた汚泥保持能が、優れたアンモニア性窒素除去性能の発揮に寄与していると考えられる。一方、水質浄化が進行した装置の下部 (Segment 5~6) では、汚泥濃度は相対的に低く推移した。

スポンジ担体への汚泥付着状況

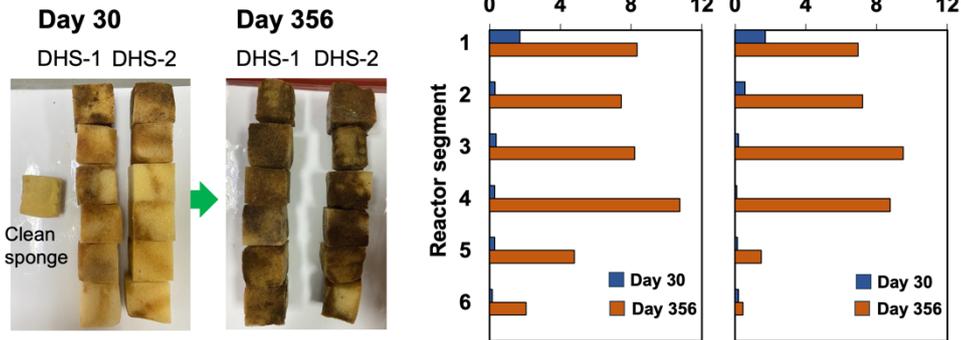


図 38 ラボスケール DHS による模擬アンモニア性窒素汚染河川水の処理特性

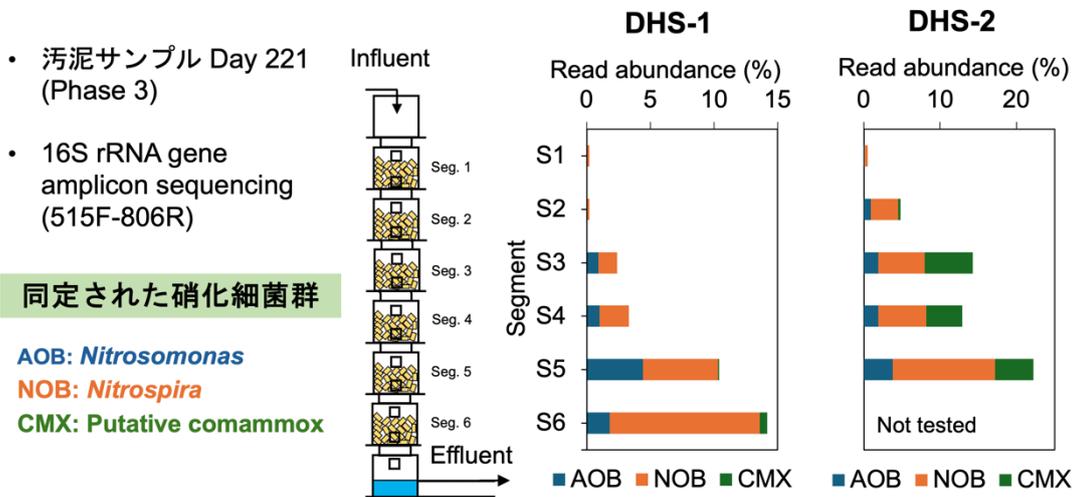


図 39 DHS 担体保持汚泥中の主要な硝化細菌群の存在割合 (221 日目, Phase 3)

DHS のスポンジ担体汚泥中の硝化細菌を同定するために、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした細菌群集構造解析を行った。図 39 には、同定された 3 つの硝化細菌群の各 Segment 保持汚泥における存在割合を全解析配列数に対する割合として示した。

DHS-1 および DHS-2 では、*Nitrosomonas* 属、*Nitrospira* 属がそれぞれアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌として優占化していた。DHS-1 では、Segment 3~6 で硝化細菌が検出され、特に下部の Segment でその存在割合が高かった。これは、DHS におけるアンモニア性窒素濃度の減少傾向と一致していた (Loi, J.X. et al., 2024)。DHS-2 では、Segment 2~5 で硝化細菌が検出され、特に Segment 4~5 でその存在割合が高くなった。また、DHS-2 では、DHS-1 では未検出の完全酸化型のアンモニア酸化細菌 Comammox が検出された。Comammox は、基質親和性に優れており、特に低濃度のアンモニア性窒素に対して高い親和性を持つことが知られている (Kits, K.D. et al., 2017)。これより、DHS-2 においては、基質親和性に優れた Comammox を含むアンモニア酸化細菌が、スポンジ担体に保持されていたことから、優れたアンモニア性窒素除去能を安定的に発揮できたことが明らかになった。

#### 2.7.2.4 まとめ

スポンジ担体を用いる好気性ろ床 (Down-flow Hanging Sponge:DHS) のアンモニア性窒素除去設備としての浄水技術への応用の可能性評価をラボスケール実験により評価した。その結果、実際の汚染濃度に近い、流入アンモニア性窒素濃度 2.5 mgN/L の条件下で、スポンジ担体に完全酸化型のアンモニア酸化細菌 Comammox などの硝化細菌が集積化する事で、15分という非常に短い処理時間で十分なアンモニア性窒素除去効率を達成した。

浄水設備にアンモニア性窒素除去プロセスを導入するためには、アンモニア性窒素除去効率を安定的に保つ事に加え、処理時間を短縮することで、設備導入コストを低減することが重要である。一般的に浄水設備における水処理時間は10～12時間と長く、DHSは15分という非常に短い処理時間で十分なアンモニア性窒素除去効率を達成したことから、実浄水設備における窒素除去設備として導入可能なポテンシャルを持つ事が明らかになった。今後は、現場におけるパイロット試験を行い、流入水質の変動に対する安定性の評価を行うなど、技術実装に向けた検討を行っていききたい。

#### 引用文献

- 1) Kits, K.D., Sedlacek, C.J., Lebedeva, E.V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., et al. (2017) Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 549 (7671) , 269-272
- 2) Loi, J.X., Chua, A.S.M., Rabuni, M.F., Tan, C.K., Lai, S.H., Takemura, Y., Syutsubo, K. (2022) Water quality assessment and pollution threat to safe water supply for three river basins in Malaysia. *Sci. Total Environ.*, 832, 155067
- 3) Loi, J.X., Syutsubo, K., Rabuni, M.F., Takemura, Y., Aoki, M., Chua, A.S.M. (2024) Downflow sponge biofilm reactors for polluted raw water treatment: Performance optimisation, kinetics, and microbial community. *Chemosphere*, 358, 142156
- 4) Ministry of Health, Malaysia (2016) Drinking Water Quality Standard. <https://environment.com.my/wp-content/uploads/2016/05/Drinking-Water-MOH.pdf>

### サブテーマ 3：適切排水処理技術の実装支援

#### 2.8 DHS の技術確認申請とタイでの実機導入

##### 2.8.1 目的と経緯

東南アジア地域においては、未処理生活排水の流入により水質・衛生リスクが顕在化しており、適切な排水処理技術の導入を進めて行くことが必要である。一方、生活排水処理施設は、公共インフラである事から、新技術の導入が難しいという側面も持つ。例えば、タイでは、自治体が公の排水処理施設を導入する場合、技術が実用に足るかどうかを、天然環境資源省（MONRE: Ministry of Natural Resource and Environment）の公害管理局（PCD: Pollution Control Department）もしくは、内務省（MOI: Ministry of Interior）のタイ国下水道公社（WMA: Wastewater Management Authority）による認可を受ける必要がある。実際には、それらの機関と自治体などを含む組織による実証事業を行う必要があり、技術導入までの道のりは遠い。

この様な背景から日本下水道事業団（JS: Japan Sewage works）は、公的な第三者機関である JS が、民間企業が開発した技術について、処理性能や維持管理性などの妥当性を確認する海外向け技術確認制度を展開しており、本研究では、民間企業と連携して、スポンジ担体を用いる好気性ろ床（DHS）のタイ向けの生活排水処理技術としての技術確認申請を行った。

また、これまでのタイ行政機関や大学、民間企業との連携による DHS に関する技術開発の結果、タイの日系民間企業の社宅排水処理設備（既存の浄化槽の後処理設備）として DHS が実装された。そこで実装された DHS の後処理設備としての性能評価を通年で行い、実規模での処理の安定性の評価を実施した。

##### 2.8.2 方法

###### 技術確認申請

タイにおける DHS の排水処理実証試験により取得した水質、消費電力、余剰汚泥発生量などのデータに基づいて、技術確認項目として必要な①処理性能、②汚泥発生量、③消費電力量原単位、④設置面積、⑤維持管理性をとりまとめ（図 40）、日本下水道事業団（Japan Sewage Works Agency, JS）に技術確認申請を行った。

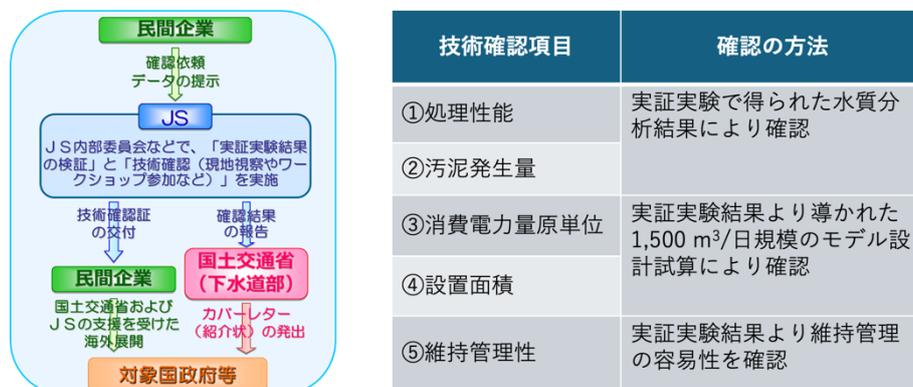


図 40 日本下水道事業団（JS）による技術確認のフローと技術確認項目

###### 実機導入

タイの日系民間企業（T社）は、社宅の生活排水処理設備として浄化槽（日本と異なり技術認証制度は無く、性能保証はされていない）を導入していたが、処理水質が基準値である BOD（生物化学的酸素要求量）30 mg/L、TKN（全ケルダール窒素）35 mgN/L を満たすことが出来ず、県の環境影響評価（EIA: Environment Impact Assessment）委員会より、即時改善の要請があった。適切な後処理技術を導入する必要があり、処理性能の高さと省エネルギー性能から DHS が後処理技術として実規模導入された（図 41）。社宅排水排出量の時間変動が大きいため流量調整槽を設け、その後 DHS に流入させ後処理を行った。処理水は貯留槽に一定時間貯めた後、敷地内の芝に散水を行った。

DHS 処理水の BOD、TKN 濃度の測定に加えて、処理水再利用を見据えて大腸菌 (*E.coli*) 数の計測 (Nissui, Compact dry EC plate を使用) を行う事で、後処理技術としての性能評価を通年で実施した。

また DHS の生活排水処理設備、既存排水処理設備の後処理設備、アンモニア性窒素除去設備 (浄水技術) としての導入を促すため、タイ、マレーシアにおいて技術説明会、意見交換会、ワークショップを開催した。

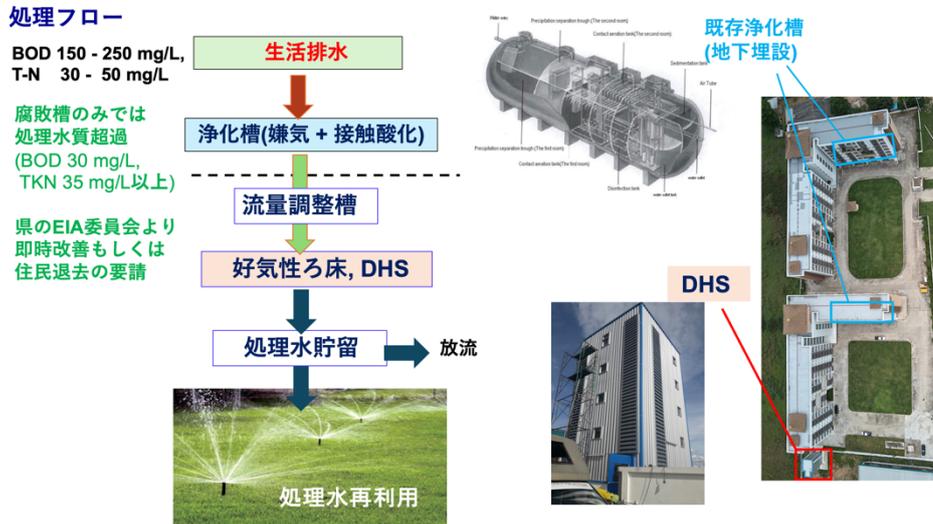


図 41 社宅排水処理設備 (既存浄化槽の後処理) として導入された DHS の概要と処理フロー

### 2.8.3 結果と考察

#### 技術確認申請

DHS による排水処理実証試験により取得した水質、消費電力、余剰汚泥発生量などのデータに基づいて、技術確認項目として必要な①処理性能、②汚泥発生量、③消費電力量原単位、④設置面積、⑤維持管理性を図 42 に示す通りとりまとめた。

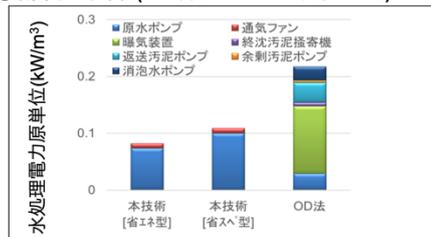
#### 技術確認内容 (既存のOxidation Ditch法との比較)

①処理性能(設定された流入・放流水質を満足する)

	計画流入水質	DHS流入水質	流出水質目標値	DHS流出水質
pH(-)	-	6.5~8.5	5.5~9.0	6.1~8.0
BOD (mg/L)	120	7.3~145	20	0.1~17.2
SS (mg/L)	50	4.0~93.5	30	0.3~21.5
全窒素 (mg/L)	30	3.6~69.5 (3.6~30.0)	20	3.3~49.5 (3.3~20.0)

※全窒素は流入30mg/L以下  
BODは流出20mg/L以下を満足した

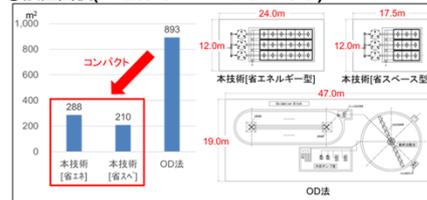
③消費電力原単位(1m<sup>3</sup>/日あたり0.1kW以下である)



②汚泥発生量(除去SS,BODあたり汚泥発生率0.5以下である)

	Bongai	BangNa	目標
除去SS当り汚泥発生率	0.11-0.17	0.14-0.27	0.5
除去BOD当り汚泥発生率	0.11	0.07-0.15	0.5

④設置面積(OD法よりコンパクトである)



⑤維持管理性(機器点数が少なく、維持管理が容易)

項	確認技術(DHS法)	OD法
沈砂槽	汚泥引抜設備 (バルブ)	散気装置 消泡設備 汚泥返送設備 (ポンプ・バルブ) 運転管理機器 (DO計・MLSS計)
DHSろ床	通気ファン 汚泥引抜設備 (バルブ)	最終沈殿池 汚泥掻き機 スカムスキマ 汚泥引抜設備 (バルブ)

図 42 DHS の技術確認の内容、Oxidation Ditch 法との比較

DHS は、排水処理性能を満たしつつ、既存の Oxidation Ditch 法と比較して、消費電力原単位および汚泥発生量が少なく、かつ、設置面積が小さく、維持管理性に優れた技術である事が認定され、タイ国向けの省エネルギー、維持管理容易な DHS 排水処理技術として、日本下水道事業団より技術確認証を取得することが出来た（2022年3月）。

### 実機導入

T社の社宅には、300-450人が居住しており、およそ35~50 m<sup>3</sup>/日の生活排水が排出されている。生活排水は、浄化槽により処理されるが、その処理水（DHS への流入水、DHS influent）は、排水基準である BOD 30 mg/L、TKN 35 mg/L をしばしば超過しており、そのままでは環境放流が出来ない（図 43）。

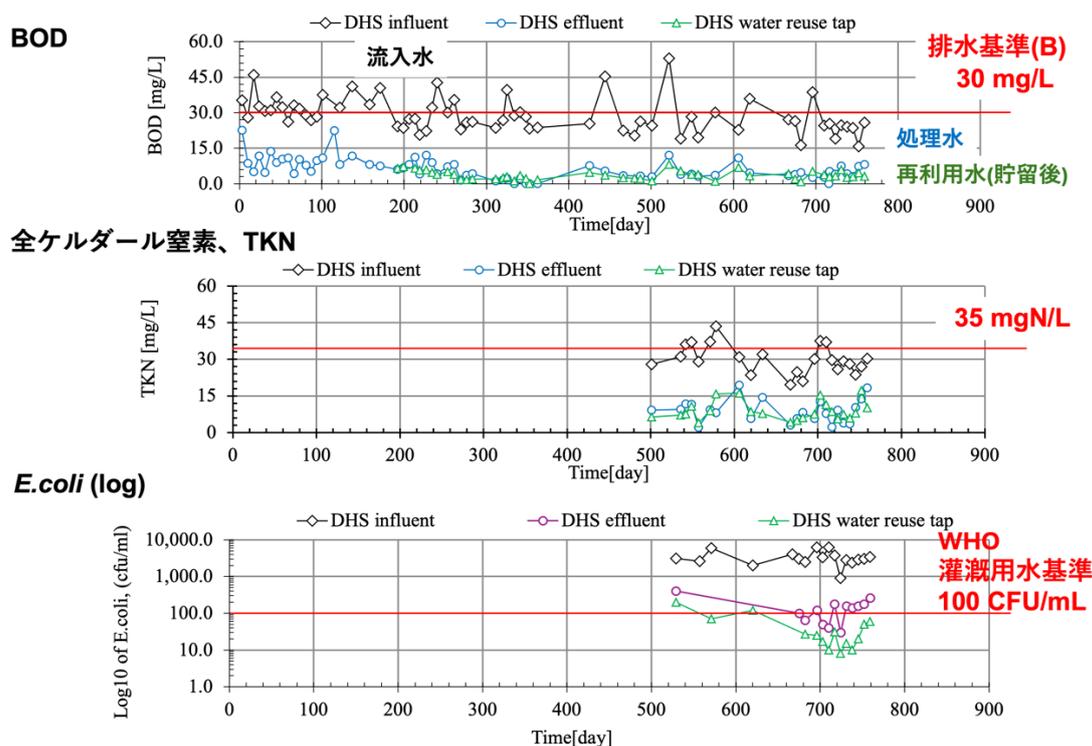


図 43 実規模 DHS による浄化槽処理水の後処理性能

DHS による後処理の結果、BODは3~12 mg/L 程度まで、TKNは5~18 mg/L 程度まで濃度が低減しており、排水基準を満たす水質を長期運転においても安定的に達成することが出来た。タイにおいては、生活排水処理水の大腸菌数については基準値が設定されていないが、DHS による再利用水（DHS 処理水を貯留したもの）については、WHO の灌漑用水基準である 100 CFU/mL を満たすことが出来た。このように、DHS の実装により、生活排水処理水の水質確保（汚濁防止）と安全な再利用を図ることが出来た。また、本 DHS は、長期運転において処理性能が悪化することはなく、また維持管理性にも優れる（1週間に1~2回程度、排水流入部の詰まり確認、清掃のみの作業、余剰汚泥の引き抜きは必要なし）事を立証出来た。

また、タイにおいては、バンコク首都圏庁下水道部、天然環境資源省汚濁管理局、内務省下水道公社、カセサート大学などと連携し、今後のタイ、バンコクにおける生活排水対策、技術導入、水質規制などの方向性についての意見交換、DHS の技術説明会などを実施した（図 44）。バンコク首都圏庁に対しては、水質が不十分な排水処理設備の処理水利用時に住民に通知、後処理の導入による安全性確保、分散型排水処理の導入推進と排水基準の窒素濃度規制強化（例：建物排水基準 A, TKN 35 mg/L より 20 mg/L へ）、水路水質改善のための下水処理水の積極的利用などの提言を行い、一部については、今後、具体的な検討を行うこととなった。マレーシアにおいては、マレーシア国家水サービス委員会（SPAN）、マラヤ大学などとの連携により、DHS の浄水分野への技術適用に関する意見交換を実施した。今後、より関係を密にし、上水分野における技術展開も図っていきたい。

今後のタイ、バンコクにおける生活排水対策、規制などの方向性、技術実装などについての意見交換を実施

バンコク首都圏庁、下水道部  
 天然環境資源省公害管理局（PCD）  
 内務省下水道公社（WMA）、水処理民間企業  
 大学関係者など



意見交換会（カセサート大学）



実規模DHS見学会



マレーシア国家  
 水サービス委員会  
 との浄水分野への  
 技術適用に関する  
 意見交換

図 44 タイ、マレーシアのステークホルダーとの意見交換会

#### 2.8.4 まとめ

東南アジア地域への適切排水処理技術の実装を支援するため、開発を行ってきたスポンジ担体を用いる好気性ろ床（DHS）について、民間企業と連携して、日本下水道事業団（JS）へタイ向けの生活排水処理技術としての技術確認申請を行った。その結果、省エネルギー、維持管理容易な DHS 排水処理技術として、JS より技術確認証を取得することが出来た。また、タイの日系民間企業の社宅排水処理設備（既存の浄化槽の後処理設備）として DHS が導入されることに至り、実装された DHS の後処理設備としての性能評価を行った結果、実規模運転においても優れた処理水質が通年で発揮できること、維持管理性に優れるため、技術者の不足するタイにおいても運用が可能である事が実証された。今後は、生活排水処理や浄水の分野などでの技術展開を進めるために、更なる研究開発の推進と現地のステークホルダーとの連携を図っていきたい。

### 3 まとめと今後の展望

#### 主要な研究成果のまとめ

##### 【サブテーマ1】病原性細菌の検出手法の開発と消長の解析

##### その1：病原性細菌を網羅的に検出するためのデータベース作成

生活排水や汚染環境水に含まれる病原性細菌を網羅的かつ効率的に同定・検出するために、病原性細菌の遺伝子データベースを作成した。本データベースの特徴は、総計 1,120 種の病原性細菌が保有する高品質な 16S rRNA 遺伝子配列情報に加えて、日本細菌学会の Bio Safety level 分類に基づいたリスクレベル情報（低リスク BSL1：693 種、中リスク BSL2：381 種、高リスク BSL3：46 種）も格納したところにある。構築した病原性細菌遺伝子データベースと超並列 DNA シーケンス技術を国内外の 18 排水処理施設の流入排水、処理水および汚染環境水の解析に適用し、生活排水などに普遍的かつ優占的に存在する主要な病原性細菌 18 グループを特定した。

すなわち、生活排水由来の病原性細菌の遺伝子データベースと遺伝子の網羅解析とを組み合わせることで迅速な病原性細菌の特定手段を確立した。

##### その2：病原性細菌の定量手法の開発と水環境、排水処理施設での消長評価

特に生活排水に多く含まれる *Aeromonas*、*Arcobacter*、*Mycobacterium*、および *Klebsiella pneumoniae* species complex (KpSC) 細菌に関して、リアルタイム PCR およびデジタル PCR による高精度定量系を構築した。そして、構築した定量手法を用いて国内外の排水処理施設および模擬汚染湖水における病原性細菌および衛生指標細菌である大腸菌の消長を評価した。その結果、*Aeromonas* および *Arcobacter* といった主要な病原性細菌グループは、大腸菌と同様の消長特性を示し、大腸菌の衛生指標としての確かさが示唆された。一方、*Mycobacterium*（呼吸器の疾患原因）の細菌数と大腸菌数は相関性が低かったため、今後別途モニタリングが必要と考えられる。

また、処理水に比較的多くの病原細菌が残存するバンコク都の管理する施設（接触安定化法で装置構成に問題あり）が明らかになり、処理水の再利用時（散水による路面洗浄など）における安全性確保行動のための情報を提供した。

バンコクの汚染水路における病原性細菌の存在量評価により、 $\text{NH}_4\text{N}$  を含む一部の水質項目と病原性細菌数の間に正の相関性がある事が明らかになった。この結果から、 $\text{NH}_4\text{N}$  濃度の規制や排水処理技術の導入などにより、衛生リスクが低減できる可能性が示された。

その他、浄化槽における大腸菌、病原性細菌の除去特性データを大腸菌群数の排水基準の見直しに係る検討会（環境省、環境管理課）に提供し、日本における排水基準の大腸菌数への見直しに貢献した。

##### 【サブテーマ2】処理水質の確保と再利用を見据えた処理技術の開発と実証

##### その1：好気性ろ床法, DHS による生活排水処理水の後処理試験

処理水質が不十分な排水処理施設の後処理技術の開発を目的とし、バンコク、Bongai 処理場を実証規模のスポンジ担体を用いる好気性ろ床, DHS を設置し、水質が不十分な模擬処理水の仕上げ処理を行った。

その結果、0.4~3 h、HRT の高速処理条件でバンコクの集約型処理場処理水基準（TSS < 30 mg/L, BOD < 20 mg/L,  $\text{NH}_4\text{N}$  < 5 mg/L）を十分に満たすことができた。また、大腸菌除去率は 2 log を達成し、大腸菌負荷を  $4 \times 10^9$  CFU/L-sponge/day 以下に維持することで日本の一律排水基準（大腸菌 800 CFU/mL）を、大腸菌負荷を  $4 \times 10^8$  CFU/L-sponge/day 以下に制御する事で WHO の灌漑用水基準を満たす水質が得られることを明らかにした。さらに、サブ 1 で開発した病原性細菌の定量手法を用いて生活排水に多く（ $10^5 \sim 10^6$  cells/mL）含まれる病原性（下痢疾患）細菌 *Arcobacter* の除去特性を評価した結果、2 log 以上の高い除去性能を示す事が明らかになり、衛生設備としての DHS の性能が実証された。

以上の結果から、消費エネルギーが少なく維持管理が容易なスポンジ担体を用いる好気性ろ床, DHS は、処理水質が不十分な排水処理施設の後処理として有効である事が実証できた。

DHS による病原菌除去メカニズムの解析と適切な装置構造決定のため、排水流下長の異なるラボ試験装置（長:120 cm, 短: 40 cm）を2系統作成し、同じ処理時間（HRT、2h）条件下で、大腸菌を添加した合成下水に対する処理実験を行った。その結果、DHS [長] は DHS [短] に比べて硝化能とともに大腸菌除去能が卓越した（短: 1.5 log, 長: 2.5 log）。この結果、装置形状（流下長）が病原菌除去に影響することが示唆された。またスポンジ担体の保持汚泥中に存在する細菌群集により大腸菌が効果的に殺菌されている可能性が明らかになった。

これらの実証試験、室内実験を通じて、処理対象の排水の質や目標水質（窒素、大腸菌など）に合わせた装置構造、運転条件の決定に係わる指針を得ることが出来た。また本結果を、サブ3の技術認証のためのデータとして提供した。

また、タイの日系民間企業社宅に導入された実規模装置（腐敗槽の後処理として導入）での窒素、大腸菌の除去特性を評価した結果、長期運転においても、安定した性能が得られることが明らかになった。

## その2: DHS の浄水分野への適用可能性評価

マレーシア、マラヤ大学と連携し、河川局から取得したデータの解析を行うことでクアラルンプール近郊における水源河川の窒素汚染の状況を整理した。その結果、特に Langat 川の中・下流域では、未処理の生活排水流入になどによるアンモニア性窒素濃度の超過（基準値 1.5 mgN/L）が頻繁に生じている事が明らかになった。また現地調査より、ほぼ全ての浄水施設で窒素除去のための構造や設備を有していないことが明らかになった。

また、浄水プロセスへの技術適用を考慮した低濃度アンモニア性窒素汚染水（2.5 mgN/L）のラボスケール DHS による処理試験を実施し、スポンジ担体に高いアンモニア性窒素親和性を持つ完全アンモニア酸化 Comammox 細菌（アンモニア性窒素を直接硝酸性窒素に酸化）が集積化することで、低濃度の窒素条件においても優れた除去性能（15 分の HRT で 95%以上のアンモニア性窒素を除去）を示すことを明らかにした。

以上の活動を通じてマレーシア国家水サービス委員会（SPAN）などとの浄水分野での技術的な連携関係の構築に至った。今後、SPAN、マラヤ大と連携して実証試験実施のための体制構築、予算獲得を目指す。

### 【サブテーマ3】適切排水処理技術の実装支援

スポンジ担体を用いる好気性ろ床、DHS のタイでの生活排水処理技術としての展開を図るため、民間企業と連携し、タイにおける実証データを元に必要な運転条件、設計基準のとりまとめを行い、日本下水道事業団（JS）へ技術確認申請を行った。その結果、省エネルギー、維持管理容易な技術としての技術確認を得た。

また、開発を行った DHS がタイの日系民間企業の社宅排水処理腐敗槽の後処理施設として実規模導入された。長期の性能モニタリングにより優れた排水処理（窒素、大腸菌除去）性能の発揮と維持管理性、処理水の循環利用の実現性が立証された。

得られた研究成果の途上国での社会実装を見据え、国際ワークショップを開催し、タイバンコク都、天然環境資源省公害管理局（PCD）、内務省下水道公社（WMA）などと、排水処理技術の普及、安全な処理水の再利用、排水基準および環境基準の検討に関する意見交換を実施した。バンコク都では安全性の十分でない処理水の再利用については、散水時の住民への通知を行う事を検討することおよび水路の水質基準の窒素規制について PCD と協議を行うこととなった。

その他、タイ、マレーシアの地方部での DHS の技術実装について、民間企業を中心とした検討が複数継続している状況である。

## 研究の貢献と今後の展望

### 【学術面への貢献】

生活排水由来の病原性細菌の網羅的な検出、定量手法の開発に関する知見は、今後、モニタリングが必要となる薬剤耐性細菌やその遺伝子定量法の開発に応用することが期待される。

遺伝子に基づく病原性細菌の定量では、死菌由来の DNA も測定してしまうため、正確なリスク判断が難しいが、本研究では、細胞の損傷を判断して生菌の定量が可能な PMA-PCR 法の開発を行った。本手法は、環境浄化や一次生産に係わる細菌の定量、塩素消毒や UV 殺菌の効果検証にも応用していくことが可能である。

#### 【環境問題解決への貢献】

開発を行ったスポンジ担体を用いる好気性ろ床, DHS 技術は、有機物や窒素、病原性細菌の効率的な除去が可能であり、運転にかかるエネルギー消費が少なく、維持管理性に優れるという特徴を持つ。そのため、途上国や国内の地方都市における生活排水およびその処理水の処理、また浄水分野での応用が可能であり、汚濁負荷の削減、衛生リスク低減、適切な処理水の再利用などに貢献が期待出来る。

#### 【社会・行政・国際貢献】

本研究では、広く衛生指標細菌として用いられている大腸菌と生活排水に含まれる主要な病原性細菌の排水処理施設、水環境中での挙動に関する知見を収集した。本知見は、今後指標化を行うべき細菌種やその検出方法に関する議論、環境基準、排水基準や水環境管理手法の策定のための情報提供など行政面（制度面）に貢献出来る。実際に本結果の一部は、排水基準における大腸菌群の見直し（研究代表者が委員長としてとりまとめ、環境省、環境管理課）に反映された。また、タイやマレーシアの政府、行政機関との連携関係も構築できたため、今後の技術実装研究に貢献出来る。

また、民間企業と有機的に連携し、公共施設としての適地排水処置技術の社会実装や普及を促すための技術確認等の取り組みを進めるなど、途上国での環境保全への貢献も大きい。

開発した病原性細菌の定量手法を、より簡便化（低コスト化、迅速化）する事で、各自治体における災害時における迅速な水の衛生的リスク評価（環境水の生活用水としての利用可否の判断など）に繋げる事が出来る。

[資 料]

# 1 研究の組織と研究課題の構成

## 1.1 研究の組織

### [A 研究担当者]

地域環境保全領域	珠坪一晃 青木仁孝 竹村泰幸* (現：和歌山工業高等専門学校) 岡寺智大 小野寺崇 富岡典子
資源循環領域	虻江美孝
気候変動適応センター	真砂佳史

(注) 所属・役職は年度終了時点のもの。また、\* ) 印は過去に所属していた職員等を示す。

### [B 客員研究員]

Adeline Seak May Chua (University of Malaya)	(令和3～5年度)
Wilasinee Yoochatchaval (Kasetsart University)	(令和3～5年度)

### [C 協力研究者]

井口晃徳 (新潟薬科大学)	(令和3～5年度)
松浦哲久 (金沢大学)	(令和3～5年度)

## 1.2 研究課題と担当者

サブテーマ1 水質基準設定に向けた病原性細菌の検出手法の開発と、水環境における消長の解析

珠坪一晃、青木仁孝、竹村泰幸、富岡典子、真砂佳史、Wilasinee Yoochatchaval\*、井口晃徳\*\*、松浦哲久\*\*

サブテーマ2 処理水質の確保と再利用を見据えた技術の開発と実証

珠坪一晃、青木仁孝、竹村泰幸、小野寺崇、富岡典子、虻江美孝、Adeline Seak May Chua\*、Wilasinee Yoochatchaval\*

サブテーマ3 水インフラ評価系の構築と適切排水処理技術の社会実装支援

珠坪一晃、岡寺智大、小野寺崇

(注) \*客員研究員、\*\*協力研究者

## 2 研究成果発表一覧

### 2.1 誌上发表

#### <雑誌>

---

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

---

Aoki M., Takemura Y., Kawakami S., Yoochatchaval W., Tran P. T., Tomioka N., Ebie Y., Syutsubo K. (2023) Quantitative detection and reduction of potentially pathogenic bacterial groups of *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Klebsiella pneumoniae* species complex, and *Mycobacterium* in wastewater treatment facilities. *PLoS ONE*, 18 (9), e0291742

Galagoda R., Chanto M., Takemura Y., Tomioka N., Syutsubo K., Honda R., Yamamoto-Ikemoto R., Matsuura N. (2023) Quantitative 16S rRNA gene amplicon sequencing for comprehensive pathogenic bacterial tracking in a municipal wastewater treatment plant. *ACS ES&T Water*, 3 (4), 923-933.

How S.W., Ting C.X., Yap J.Y., Kwang C.Y., Tan C.K., Yoochatchaval W., Syutsubo K., Chua A.S.M. (2021) Effect of carbon-to-nitrogen ratio on high-rate nitrate removal in an upflow sludge blanket reactor for polluted raw water pre-treatment application. *Sustainable Environment Research*, 31, 16.

Koike K., Honda R., Aoki M., Yamamoto-Ikemoto R., Syutsubo K., Matsuura N. (2023) A quantitative sequencing method using synthetic internal standards including functional and phylogenetic marker genes. *Environmental Microbiology Reports*, 15 (6), 497-511

Loi J.X., Chua A.S.M., Rabuni M.F., Tan C.K., Lai S.H., Takemura Y., Syutsubo K. (2022) Water quality assessment and pollution threat to safe water supply for three river basins in Malaysia. *Science of the Total Environment*, 832, 155067.

Loi, J.X., Syutsubo, K., Rabuni, M.F., Takemura, Y., Aoki, M. Chua, A.S.M. (2024) Downflow sponge biofilm reactors for polluted raw water treatment: Performance optimisation, kinetics, and microbial community. *Chemosphere*, 358, 142156.

Takemura Y., Sekiguchi Y., Syutsubo K., Harada H., Omura T., Li YY, Kubota K. (2021) Sequence-specific capture of oligonucleotide probes (SCOPE): A simple and rapid microbial rRNA quantification method using molecular weight cut-off membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 87 (20), e01167-21.

Takemura Y., Yoochatchaval W., Danshita T., Miyaoka Y., Aoki M., Tran P. T., Tomioka N., Ebie Y., Syutsubo K. (2022) A pilot-scale study of a down-flow hanging sponge reactor as a post-treatment for domestic wastewater treatment system at short hydraulic retention times. *Journal of Water Process Engineering*, 50, 103313.

Tomioka N., Yoochatchaval W., Takemura Y., Matsuura N., Danshita T., Srisang P., Mungjomklang N., Syutsubo K. (2021) Detection of potentially pathogenic *Arcobacter* spp. in Bangkok canals and the Chao Phraya River. *Journal of Water and Health*, 19 (4), 657-670.

Tomioka, N., Tran P. T., Aoki, M., Takemura Y., Syutsubo K. (2024) *Escherichia coli* removal in down-flow hanging sponge reactors: insights from laboratory reactor studies. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 59 (6), 295-304.

Tran P. T., Hatamoto M., Aoki M., Watari T., Syutsubo K., Yamaguchi T. (2022) Effect of inoculum sources on autotrophic nitrogen removal in anaerobic hollow fiber membrane reactors. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102375.

#### <書籍等>

---

発表者・(刊年)・題目・出版社・総頁数

---

該当無し

#### <書籍等(分担執筆)>

---

発表者・(刊年)・題目・編著者名・書名・出版社・頁

---

該当無し

## 2.2 口頭発表

---

発表者・(暦年)・題目・学会等名称・予稿集名・頁

---

Loi J.X., Chua A.S.M., Tan C.K., Rabuni M.F., Takemura Y., Syutsubo K. (2021) Cost and energy savings nitrifying downflow hanging sponge reactor: Addressing water supply disruption challenge. Malaysia International Water Convention 2021.

Loi J.X., Chua A.S.M., Rabuni M.F., Takemura Y., Aoki M., Syutsubo K. (2022) Nitrifying Bacterial Community in Downflow Hanging Sponge Reactors for Nitrogen-polluted Raw Water Treatment. International Technical Postgraduate Conference 2022.

Loi J.X., Chua A.S.M., Rabuni M.F., Takemura Y., Aoki M., Syutsubo K. (2022) Performance of Nitrifying Downflow Hanging Sponge Reactor for Nitrogen-polluted Raw Water Treatment under Short Hydraulic Retention Time. IWA Biofilms 2022 Conference.

Loi J.X., Syutsubo K., Rabuni M.F., Takemura Y., Aoki M., Chua A.S.M. (2023) Downflow Sponge Biofilm Reactor for High Hydraulic Rate Ammonia Removal from Raw Water: Performances and Nitrifiers Community. 9th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition 2023.

Syutsubo K. (2022) Development of appropriate decentralized domestic wastewater treatment technology. The 13th International Symposium on Southeast Asian Water Environment (SEAW-13).

Syutsubo K. (2023) Decentralized Wastewater Treatment Technology and Case Study in Japan. The 22th National Environmental Conference and 12th International Conference on Environmental Engineering, Science and Management.

青木仁孝, 竹村泰幸, Tran Phuong Thao, 富岡典子, 珠坪一晃, Yoochatchaval Wilasinee, 川上周司 (2023) 様々な生活排水処理施設における病原性細菌の除去特性. 第 57 回日本水環境学会年会, 第 57 回日本水環境学会年会講演プログラム・広告集, 70.

竹村泰幸, 富岡典子, 水落元之, 青木仁孝, 珠坪一晃, Yoochatchaval Wilasinee, 松浦哲久 (2022) スポンジ担体散水ろ床法 (DHS)によるバンコクの生活排水処理施設での後段処理特性の評価. 第 56 回日本水環境学会年会, 第 56 回日本水環境学会年会講演プログラム・広告集, 52.

富岡典子, Tran Phuong Thao, 竹村泰幸, 青木仁孝, 珠坪一晃 (2023) DHS スポンジ担体における大腸菌減少の要因について. 第 57 回日本水環境学会年会, 第 57 回日本水環境学会年会講演プログラム・広告集, 78.

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第 148 号  
NIES Research Project Report, No.148

(SR-148-2024)

—

衛生リスク低減を見据えた病原細菌の消長の評価と適地型排水処理技術の開発と実装支援  
(所内公募型提案研究)  
令和 3～令和 5 年度

Evaluation of the fate of pathogenic bacteria with a view to reducing hygiene risk  
and development and implementation of appropriate wastewater treatment technology  
FY2021～2023

---

令和 6 年 10 月発行

編 集 国立環境研究所 編集分科会  
発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所  
〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2  
E-mail : pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies  
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan  
October 2024

---

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。

<https://www.nies.go.jp/kanko/index.html>