

氏 名（本 籍）	DENNY HELARD（インドネシア）
学 位 の 種 類	博 士（工学）
学位授与番号	甲第 433 号
学位授与日付	平成 25 年 3 月 25 日
専 攻	生産開発システム工学専攻
学位論文題目	Formation and roles of bacterial community in the sediment of open channels receiving effluent of small-scale onsite wastewater treatment facility ( <i>Johkasou</i> ) (小型污水处理施設（浄化槽）の処理水放流先水路内堆積物中における微生物群集の形成と役割)
学位論文審査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 健 (副 査) 教 授 李 富 生 准教授 山 田 俊 郎

### 論文内容の要旨

*Johkasou* is a small-scale onsite household wastewater treatment facility and has been widely applied in Japan at areas where sewage systems are not available. Different from sewage systems, the effluent from *johkasou* is generally discharged into open channels built within the areas with *johkasou* installations before it enters local receiving water bodies. Suspended solids (including bacteria) remaining in the effluent can settle to the channel bed to form sediment. Meanwhile, the organic and inorganic nutrients remaining in the effluent can facilitate multiplication of microbial community in the sediment and lead to enhanced consumption of dissolved oxygen in the shallow water flowing through the channels. Decay of dead bacteria in the sediment is also blamed for water quality and surrounding living environment deteriorations. To date, many studies have been conducted for evaluation of the treatment performance of *johkasou*; however, little is known about the formation of sediment bed bacterial community and its roles in the changes of water quality in open channels receiving the *johkasou* effluent.

The aims of this study were to quantify the formation of sediment bed microbial community in open channels and to investigate its correlations with various water quality parameters for generation of information for better understanding the roles of sediment bed microbial community in the changes of water quality in the channels.

For these purposes, a residential area in Gifu Prefecture, Japan was used as the study field. Sediment and water samples were collected at 6 sites in the open channels of the field. For sediment samples, three parameters, namely total solids (TS), heterotrophic bacteria (HPCS) and DNA-based microbial community density (DNAS) were analysed. In addition, polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analysis was employed to trace the changes of the microbial community. For water samples, the general physicochemical and microbial parameters (BOD, DOC, UV260, SS, temperature, DO, nitrogen, phosphorous, chloride ion, EC, etc.) were measured. The measurement results of microbial parameters for the sediment bed revealed apparent seasonal and spatial changes. The highest concentration of HPCS was obtained in autumn and the site that only receives *johkasou* effluent. Different trend was found for DNAS that showed variations with seasons and sampling times. The ratio of HPCS to DNAS was calculated as  $-2.19 \pm 1.22$  (in log unit), indicating relatively higher viability for the microbial community formed in the sediment bed. Two-way ANOVA (analysis of variance) at the 95% confidence level performed to further evaluate the variances within seasons, sites and the interaction between both on the sediment parameters indicated a significant difference between autumn and winter ( $p = 0.02$ ); whilst for the sites, no significant difference was observed ( $p = 0.40$ ). Significant interaction between the season and site was not found ( $p = 0.98$ ), indicating independent variations for all sediment parameters.

For most water quality parameters, the concentration and its variation range were found larger and broader in autumn. The broader variation range at each site suggests the presence of temporal variations caused probably by the pollution sources and/or some climatic factors. The lowest DO and the highest BOD, total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) levels were found the site that received only the *johkasou* effluent. At this site, the

dilution effect from paddy fields and underground water associated with other sites was not existent. Two-way ANOVA confirmed significant seasonal and spatial effects on the water quality changes. Principle component/factor analysis (PCA/FA) revealed three dominant components responsible for the water quality data structure, accounting for 86.25% of the total variance in the dataset. The PCA/FA results also suggested that dissolved organic matter and nutrients were major parameters regarding the water quality environment inside the channels. Hierarchical cluster analysis for each principal component grouped all six study sites into 2 or 3 statistically significant clusters, reflecting different characteristics and pollution levels among the sites.

Furthermore, to evaluate the roles of sediment bed parameters in the variations of the water quality parameters, correlation analysis of the microbial parameters with the principal water quality parameters and the pairwise similarity analysis of the DGGE band patterns were undertaken. Statistically significant relationships of the sediment bed microbial density were found with BOD, TN, TP and the microbial parameters in the water of the channels. A similarity in the bacterial population among the sites and the presence of several unique bands were found at some sites. Furthermore, evaluation of the likely interaction between bacteria and organic constituents, which was conducted through batch experiments of degradation of 17 $\beta$ -estradiol by the biofilm detached from a practical slow sand filter, indicated there were bacterium species in the biofilm that can degrade the estrogenic compound, with the degradation capability revealed a trend in similarity with the density profile of either heterotrophic bacteria or general bacteria.

### 論文審査結果の要旨

浄化槽は、生物学的酸化の原理に基づいた家庭生活汚水を処理するための小型污水处理施設として下水道未整備区域で利用され、衛生的で快適な生活環境の維持、自然水域水質環境の保全に重要な役割を果たしている。下水道と異なって、浄化槽の処理水は側溝と水路を通じて河川や湖沼などの自然水域に分散的に放流されるので、浄化槽整備区域に流水環境をもたらすとともに、河川水量の維持にも寄与している。しかしながら、浄化槽の種類や使用及び保守点検の状況によって、処理水の水質が大きく異なり、放流先水路（側溝も含む）の水質環境が好ましくない浄化槽整備区域が多く存在し、浄化槽の機能向上のみでなく、有効な放流先水路管理も含めた浄化槽整備区域の統合管理が必要になると考えられる。浄化槽の処理水放流先水路の水質は、処理水の水質のみならず、整備区域周囲の農業用水や農地からの流出水、降雨時の雨水の混入などによる影響を受けると同時に、水路底に形成された堆積物との二相間で生じる沈着・溶出・分解・拡散などの物理化学的・生物学的プロセスによっても影響される。特に堆積物には浄化槽放流水に残存する微生物や農地などからの微生物が沈着し、最終的な微生物構造は生息地点を流下する水中の有機物や栄養塩の組成と利用可能性、及び水温などの環境因子によって決定される。このような微生物は有機物や栄養塩を利用して増殖するので、これらの水質指標からみた水路水質の改善に寄与する反面、多くの場合、特に水量の少ない水路や農地などからの混入水量が少ない時期では、水中の溶存酸素が大量に消費され、堆積物相も含め水路環境の嫌気化の進行に伴い、堆積物の浮上、臭気物の放出、栄養塩の溶出などの水質環境の悪化を招いている。

本論文における研究は、岐阜県内に位置する浄化槽整備区域から、農地や地下水の混入による効果も評価可能となる 39 の合併浄化槽施設が整備されている区域を選定し、同区域の水路内堆積物中の微生物を従来の培養法に分子生物学手法であるリアルタイム PCR 法と PCR-DGGE 法を組合せて定量・解析し、複雑に絡み合って変化する様々な物理化学的水質指標に対する詳細調査、並びに得た大量のデータに対して多変数解析手法を援用した分析と合わせて、浄化槽放流先水路内堆積物中における微生物群集の形成と役割を総合的に評価したものである。本研究の主な成果は以下の通りである。

水路内堆積物中の微生物群集について、培養法に基づく生菌密度とリアルタイム PCR 法に基づく全細菌密度（生菌と死菌の合計）は、浄化槽放流水を直接受けた地点に比べ、地下水と農地流出水の混入がある地点及び水路下流地点で低いことが確認され、後述の水質変化特性と合わせると、このことは地下水と農地流出水による希釈効果と流下過程における生物利用による有機物と窒素やリンの栄養塩の減少の影響を複合的に受けた結果であること；また、全細菌に対する生菌の割合は、河川・湖沼などの一般自然水域の堆積物中の微生物群集に比べて高く、放流先水路は有機物と栄養塩を消費する生菌の密度を高く維持できる環境であることが明らかになった。また、PCR-DGGE を援用して微生物構造を解析することにより、水路内におけ

る微生物種の多くは調査地点と調査時期によらず類似しているものの、特定な種も存在していることが確認された。

次に、水路内の水質項目について、浄化槽放流水を直接受けた地点で EC, BOD, TN, TP, 大腸菌, 従属栄養細菌, 全細菌の濃度が高く、浮遊物質 (SS) と DO が低く、地下水と農地流出水の混入がある地点及び、水路下流地点と水質特性が明確に異なっていること；水路内における SS は農地からの混入分が大いに寄与していること；DO の低下は水路内水相に浮遊して微生物と堆積物に生息している微生物によるものであることが明らかになり、良好な水路水質特徴の形成と水質改善に浄化槽の処理機能の更なる向上が必要であると同時に、地下水や農地流出水による希釈効果を期待できるような水路管理手法が重要であることが示唆された。また、全ての水質結果に対して分散分析と主成分分析を行った結果、水質変動の季節的・空間的依存性が確認され、BOD と窒素・リンは水路堆積物中微生物と密に関連していることが明らかになった。

さらに、主成分分析で得た主成分に対してクラスター分析を行い、水相の水質特徴から全調査地点を地下水または農地流出水の混入の有無によって 2 つまたは 3 つの統計的有意な調査地点グループに、また PCR-DGGE による堆積物相微生物の構造から全調査地点を浄化槽放流水の影響を大きく受ける上流に位置する地点グループとその下流の農地流出水の混入が卓越になっている下流グループに分類することができ、流下方向に沿った浄化槽放流先水路の水質特徴と堆積物中の微生物構造に応じて水路環境を評価し改善策を講じることが有効であることが示唆された。

以上のように、本論文は、浄化槽放流先水路内堆積物中における微生物群集の形成と役割を水路水質の特徴と合わせて評価し、浄化槽整備区域の水質環境の改善に寄与する水路環境の管理手法や浄化槽の処理機能向上の技術の提案につながる有用な知見を多数もたらしており、学術と応用の両面において水質工学分野への寄与が大きいと評価されることから、博士（工学）の学位論文に適合しているものと判定した。

### 最終試験結果の要旨

学位審査委員会は、提出論文の基礎となる発表論文（査読付論文 2 編）の内容を確認し、2 月 15 日（金）に開催された学位論文公聴会における論文提出者との質疑応答、その後の口頭試問などに基づき慎重に審査した結果、最終試験に合格と判定した。