

# 微小電極と分子生物学的手法を併用した廃水処理プラントの評価

北海道大学大学院 学 山川 岳志 正 岡部 聡 フェロー 渡辺 義公

## 1.はじめに

生物学的廃水処理の分野では、処理効率の強化、向上を目的として分子生物学的手法 (FISH 法、16S rDNA アプローチ) や微小電極等を用い、ブラックボックスとして取り扱われてきた微生物集塊 (生物膜や活性汚泥) の生態学的構造やその機能を解明する試みが盛んに行われてきた。しかし、このようなマイクロレベルの情報が実際の処理効率の向上にどの様に反映されるかについては、マイクロレベルの情報とプラントの処理性の間に大きなギャップが存在するため、未だ十分な議論は為されて来なかった。そこで、本研究では、窒素除去を主な目的として建設されたものの窒素除去率が思わしくない廃水処理プラントの原因を追及するため、このプラント内の微生物群集に対し、*In situ* の活性を測定するために微小電極、微生物の生態学的構造を把握するために 16S rDNA に基づく系統解析、微生物の存在を確認し空間的分布を把握するために FISH 法を適用して、これら 3 つの手法から得られた微生物に関するマイクロな情報を総合的に検討することで、プラント不調の原因につながる知見を得て、プラントの処理性評価に、さらには、処理性改善のための指針の模索に活かすことを試みた。

## 2.実験方法

対象としたのは、化学系工場廃水の処理プラントで、第一脱窒槽、硝化槽、第二脱窒槽及び再曝気槽から構成されている。このプラントのフローを図 1 に示す。硝化槽から第一脱窒槽に硝化液を循環させ、第二脱窒槽には有機源としてメタノールを添加しており、第一、第二脱窒槽の DO はほぼゼロに保ってある。このプラントの 3 つの槽 (第一脱窒槽、硝化槽、第二脱窒槽) から生物膜の付着したプラスチック担体を採取し、以下の実験に供した。

### 2.1 微小電極による測定

担体に付着した生物膜を基質 { C/N=2 (炭素源は NaAC)  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$  及び  $\text{NO}_3^-$  =300  $\mu\text{M}$  } で満たしたフローセルに固定して、硝化槽のサンプルは DO=230  $\mu\text{M}$  に、脱窒槽のサンプルは DO = 25  $\mu\text{M}$  に設定し、DO、 $\text{NH}_4^+$  及び  $\text{NO}_3^-$  測定用の微小電極で生物膜内の基質濃度分布を測定した。また、測定した濃度分布から  $\text{NO}_3^-$  生成速度を硝化速度: J(硝化)、 $\text{NO}_3^-$  消費速度を脱窒速度: J(脱窒)と定義して (単位は  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ )、生物膜と液本体間の濃度勾配を用い、Fick の拡散方程式から算出した。



図 1. プラントフロー

### 2.2 16S rDNA に基づく系統解析

それぞれのサンプルから全 DNA を抽出し、GM3F & GM4R (真正細菌に特異的) を用いて 16S rDNA の約 1500bp を PCR で増幅した。次に、クローニングを行い、大腸菌からプラスミドを回収後、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) によって OTU (操作的分類単位) を作成した。その後、それぞれの OTU から一つのクローンを選択し、シーケンシングプライマーとして 341F (真正細菌に特異的) を用いて、可変領域 V3 region を含む約 600bp の塩基配列を決定し、系統解析を行った。

### 2.3 FISH 法

生物膜の付着した担体を OCT compound で包埋し、-20 で凍結した。凍結後、担体から生物膜の付着した部位を切り外し、生物膜をクライオミクロトームで 20  $\mu\text{m}$  にスライスして、スライドガラスに貼りつけた。その後、Ntspa1026 と Ntspa454 (共に *Nitrospira moscoviensis* に特異的) を 1:1 で混合したプローブと Nso190 (Proteobacteria- subclass に属する全てのアンモニア酸化細菌に特異的) を用いて、FISH を行った。

## 3.実験結果

表 1. 原水及び各槽流出水の水質

### 3.1 プラントの処理性

担体サンプリング日 (11/10) とその前後の日の原水及び各槽流出水の水質を表 1 に示す。濃度の単位は mg/l で、(11/3 / 11/10 / 11/15) の順に水質を示した。原水の特徴として、Total-N に占める有機体窒素の割合が大きいことが挙げられ、この有機体窒素は後段で  $\text{NH}_4^+$  や  $\text{NO}_3^-$  に変化している可能性がある。また、この水質から第一脱窒槽では脱窒が、硝化槽では硝化が良好に行われていないことがわかった。

	原水	第一脱窒槽 流出水	硝化槽 流出水	第二脱窒槽 流出水
Total-N	36.9/32.2/37.5	30.8/22.6/23.1	31/21.4/22.6	Not Determined
$\text{NH}_4^+$ -N	29.9/18.4/15.9	3.81/16.9/12.7	1/16.9/10.5	Not Determined
$\text{NO}_3^-$ -N	3日とも<0.25	22.7/<0.25/9.9	25.6/0.51/10.4	16/<0.25/8.97
$\text{NO}_2^-$ -N	3日とも<0.05	<0.05/<0.05/0.054	0.051/<0.05/<0.05	<0.05/<0.05/0.087
TOC	35.2/109/210	140/65.8/61.5	256/95.9/90.9	117/72/67

### 3.2 微小電極による測定

微小電極でそれぞれの槽の担体に付着している生物膜内の基質濃度分布を測定した。一例として、第一脱窒槽内の担体の生物膜内基質濃度分布を図 2 に示す。測定の結果、第一脱窒槽では  $\text{NO}_3^-$  の増加が見られ、硝化反応が生じていることが考えられた。この際に  $\text{NH}_4^+$  は減少していないが基質に  $\text{NO}_2^-$  が入っているため、 $\text{NO}_2^-$  が酸化された結果と考えられる。硝化槽では  $\text{NH}_4^+$

Keywords: 生物学的窒素除去、系統解析、16S rDNA、微小電極、FISH 法

連絡先: 〒001-0813 札幌市北区 13 条西 8 丁目 北海道大学大学院工学研究科 Tel&Fax 011-706-6267

\*の減少に伴い  $\text{NO}_3^-$  が増加し、硝化反応が生じていることが、また、第二脱窒槽では  $\text{NO}_3^-$  の減少が見られ、脱窒反応が生じていることが明らかとなった。それぞれの基質濃度分布から J(硝化)又は J(脱窒)を算出したところ、第一脱窒槽で J(硝化)=0.024、硝化槽では J(硝化)=0.15、第二脱窒槽では J(脱窒)=0.011 (単位は全て  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) となり、硝化槽の方が第一脱窒槽よりも硝化が良く生じていることがわかった。

### 3.3 16S rDNA に基づく系統解析

第一脱窒槽、硝化槽及び第二脱窒槽からそれぞれ 30、56 及び 34 個のクローンを採取し、RFLP によって、それぞれ 22、43 及び 21 個の OTU を作成した。その後、系統解析を行い、系統樹を作成した。その一例として図 3 に第一脱窒槽の系統樹の一部を示す。第一脱窒槽からは脱窒菌<sup>1)</sup>である *Rhodopseudomonas palustris* (相同性:96%) や *Hyphomicrobium zavarzinii* (相同性:98%)、*Rhodobacter sphaeroides* (相同性:97%)、*Zoogloea ramigera* (97%) に近縁な菌が検出された。一方、亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira* (相同性:98%) に近縁な菌も検出され、微小電極による測定の結果とも一致し、 $\text{NO}_3^-$  の増加は硝化反応によると推察された。硝化槽からは、Proteobacteria- subclass に属するアンモニア酸化細菌である *Nitrosospora* (相同性:92%) に近縁な菌が検出され、プラント内で硝化は良好に行われていないもののアンモニア酸化細菌は存在することが明らかとなった。また、硝化槽からも通性嫌気性の脱窒菌<sup>1)</sup>である *Hyphomicrobium zavarzinii* (相同性:98%) や *Hyphomicrobium denitrificans* (相同性:97%) に近縁な菌が検出された。第二脱窒槽からも同様に脱窒菌<sup>1)</sup>である *Hyphomicrobium zavarzinii* (相同性:98%) や *Rhodobacter azotoformans* (相同性:98%) が検出されたが、硝化細菌は検出されなかった。また、有機源にメタノールを添加しているために、これまでの 2 槽からは検出されなかったメタノール資化性の *Methylophilus methylotrophus* (相同性:97%) に近縁な菌が検出された。この様に系統解析の結果、様々なバイアスはあるが、各槽に特徴的な微生物群集構造を把握することができたと思われる。

### 3.4 FISH 法

系統解析で硝化細菌が検出されたので、生物膜内でその存在を確認し、存在の程度を把握するため、第一脱窒槽及び硝化槽のサンプルに対して Ntspa454&1026 と Nso190 を用いて FISH 法を行ったところ、両槽とも両方のプローブで蛍光が得られた。第一脱窒層ではアンモニア酸化細菌及び *Nitrospira* は局所的に存在し、硝化槽では両細菌とも膜全体で検出された。第一脱窒槽ではアンモニア酸化細菌が多かったのに対し、硝化槽では両細菌とも同程度であった。*Nitrospira* に関しては硝化槽の方が第一脱窒槽よりも多く検出された。この事は、硝化槽の J(硝化)が第一脱窒槽の J(硝化)よりも大きいことと一致する。また、系統解析の際に第一脱窒槽から検出された *Nitrospira* は FISH 法でも検出され、硝化槽から検出された *Nitrosospora* も Nso190 で検出可能であるため、この二つの手法による結果は概ね一致したと言える。

### 4.まとめ

本研究では窒素除去を目的とした工場廃水処理プラントの処理性を評価するために、生物膜に対して微小電極による測定、16S rDNA に基づく系統解析及び FISH 法を用いて包括的にアプローチし、プラントの状態を評価、さらには改善の指針を模索することを試みた。得られた具体的な結論は以下のようである。

1. 微小電極の結果から、第一脱窒槽及び硝化槽では硝化反応が、第二脱窒槽では脱窒反応が生じていることがわかった。
2. 16S rDNA に基づく系統解析の結果から、第一脱窒槽からは脱窒菌と *Nitrospira* に近縁な菌が、硝化槽からは脱窒菌とアンモニア酸化細菌に近縁な菌が、第二脱窒槽からは脱窒菌に近縁な菌が検出された。
3. FISH 法によって、硝化槽及び第一脱窒槽からアンモニア酸化細菌及び *Nitrospira* が検出され、微小電極による測定の結果及び 16S rDNA に基づく系統解析の結果と概ね一致した。

以上を総合すると、本研究で対象としたプラントでは、脱窒を目的とした第一脱窒槽内に硝化細菌が存在し、生物膜内で硝化反応が生じていることが、また、硝化槽内には硝化細菌が存在し、生物膜内で実際に硝化反応が生じていることが明らかとなった。よって、第一脱窒槽を ORP や DO を下げるなどして脱窒効率を向上させることにより、第一脱窒槽で TOC を消費して硝化槽に流入する TOC 負荷を下げ、硝化槽での硝化反応を促進する等の対策をとることで、プラント全体の窒素除去率を向上させることができることが推察された。

参考文献) 1. Van Verseveld H. W. et al : The Denitrifying Prokaryotes. In *The Prokaryotes*, ed. Chap. 23, Springer Verlag, New York.

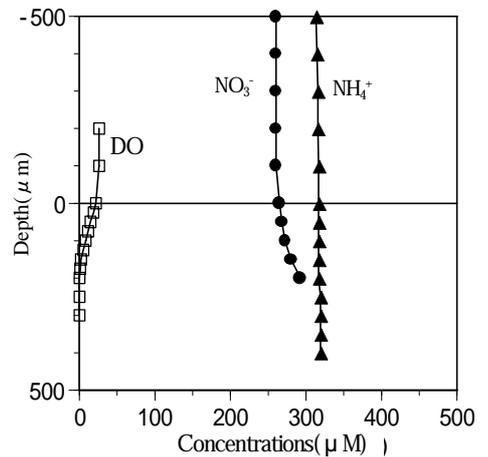


図 2. 生物膜内基質濃度分布 (第一脱窒槽)

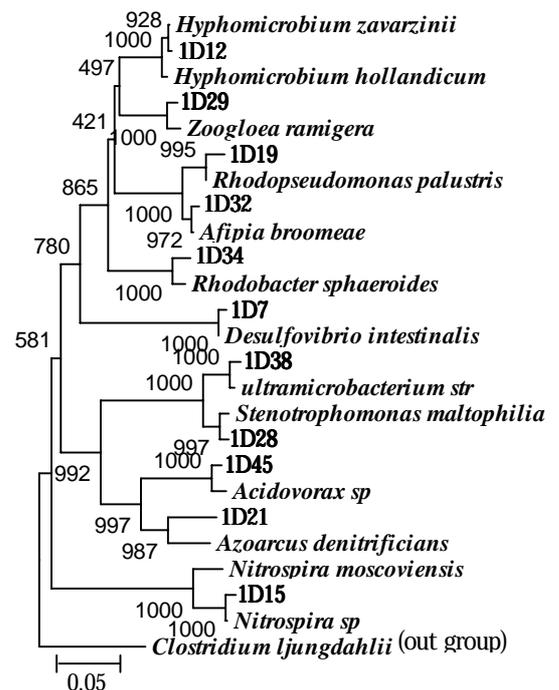


図 3. 検出されたクローンと近縁な菌の間で描いた系統樹 (第一脱窒槽)