

## 脱窒能を有する嫌気性グラニュールを形成する微生物群集構造の解析

群馬大学大学院工学研究科 学生会員 森 俊輔

伊藤 司 正会員 渡邊 智秀

### 1. はじめに

高濃度の有機成分と窒素成分を含む排水を効率的に処理するために、単一槽で有機物除去と脱窒処理を行う方法として、通常の嫌気性グラニュールに脱窒能を付加した脱窒グラニュールを作成し、これを用いて処理を行うことを検討してきた。我々はこれまでメタン生成と脱窒処理を同時に行う脱窒グラニュールの作成に成功し、安定したリアクターの処理性能を得ている。作成した脱窒グラニュールは、外観から判断して嫌気性グラニュールのさらに外側に脱窒細菌が増殖したと考えられるが、増殖速度の速い脱窒細菌がどのようにして嫌気性グラニュール内の微生物と共存し、さらにグラニュールとしての形態を維持するのか、また、脱窒細菌の増殖が内側の嫌気性グラニュールの有機物分解やメタン生成に与える影響等については不明である。そこで本研究では、脱窒グラニュールの処理の安定性およびグラニュール構造の安定性に関する要因を明らかにするために、その第一段階として嫌気性グラニュールから安定した脱窒グラニュールへの形成過程を微生物群集のグラニュール内分布とその変化から解析することを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 2.1 グラニュールの培養とサンプル採取

円筒形リアクターに有機性産業排水のUASB処理槽から採取した嫌気性グラニュールを充填し、グルコースを主成分とする基質および硝酸塩をHRT=1dayで連続供給した。リアクターは、別途培養した脱窒細菌を植種した系(R1)、植種しない系(R2)、硝酸塩を供給しない通常の嫌気性の系(R3)の3系を設けた。培養開始から103日以降、流入基質のCOD<sub>cr</sub>容積負荷を一定(3.4 kg-COD<sub>cr</sub>/m<sup>3</sup>/day)とし、硝酸塩濃度を段階的に上げることで流入水のNO<sub>3</sub>-N/COD<sub>cr</sub>比を0から0.2まで増加させ、グラニュールの脱窒活性の向上を目指した。また、培養開始から415日以降、基質のCOD<sub>cr</sub>容積負荷はHRTを短縮することによって1.2倍の4.1 kg-COD<sub>cr</sub>/m<sup>3</sup>/dayに増加させた。図1に示すように流入水のNO<sub>3</sub>-N/COD<sub>cr</sub>比を変更し、図1中の

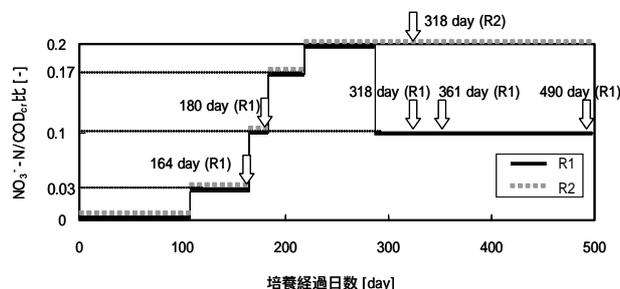


図1 流入水のNO<sub>3</sub>-N/COD<sub>cr</sub>比の変更とサンプル採取日

矢印で示した日にグラニュールを採取した。なお、NO<sub>3</sub>-N/COD<sub>cr</sub>比の増加およびグラニュールの採取は各NO<sub>3</sub>-N/COD<sub>cr</sub>比でリアクターの処理性能が定常状態に達したときに行った。

#### 2.2 FISH法

採取したグラニュールは、4%パラフォルムアルデヒドによる固定(24 hr)、エタノールおよびキシレンによる脱水を行った後にパラフィンに包埋した。マイクロームで10~15 μm厚のグラニュール切片を作成し、キシレンおよびエタノールにより脱パラフィンを行い室温で乾燥させた後、FISH法により微生物群集の解析を行った。使用したプローブは、ARC915、EUB338、ALF968、BET42a、GAM42a および BONE23A の他、酢酸資化性の脱窒細菌群を標的とする DEN124、DEN581、DEN1454、DEN444 および DEN441、メタノール資化性の脱窒細菌群を標的とする DEN67、*Paracoccus* を標的とする PAR1457、*Hyphomicrobium* を標的とする HYP1241 を使用した。

### 3. 結果

#### 3.1 リアクターの処理性能の変化

図2(a)にR1とR2の平均COD<sub>cr</sub>およびTN除去率の経日変化を示し、図2(b)にR1、R2およびR3のメタン生成速度の経日変化を示す。除去率はR1とR2に大きな差がなく、系外からの脱窒細菌植種の効果はないと考えて両者の平均値を示した。NO<sub>3</sub>-N/COD<sub>cr</sub>比が0.1~0.2の範囲ではCOD<sub>cr</sub>およびTN除去率は約90%であった。メタン生成速

キーワード 脱窒、脱窒グラニュール、メタン生成

連絡先 〒376-8515 桐生市天神町1-5-1 群馬大学大学院工学研究科 社会環境デザイン工学専攻 渡邊智秀  
TEL: 0277-30-1631、E-mail: watanabe@ce.gunma-u.ac.jp

度は平均 50 mL/hr ( $\text{NO}_3\text{-N}/\text{COD}_{\text{cr}}=0$ ) から 10 ~ 20 mL/hr ( $\text{NO}_3\text{-N}/\text{COD}_{\text{cr}}=0.2$ ) に低下し、 $\text{NO}_3\text{-N}/\text{COD}_{\text{cr}}$  比の増加に伴い低下する傾向にあった。R1 については 287 日目以降に  $\text{NO}_3\text{-N}/\text{COD}_{\text{cr}}$  比を 0.2 から 0.1 に変更した結果、メタン生成速度は約 35 mL/hr に上昇した。

### 3.2 脱窒グラニュールの形成および微生物群集構造

培養経過日数の異なる脱窒グラニュールに対して FISH 法を行い *Bacteria* と *Archaea* のグラニュール内分布を解析した結果、外側の *Bacteria* 層は嫌気性グラニュールと比較すると硝酸塩の流入を開始した初期の培養開始 164 日目においては厚さ 15 ~ 20  $\mu\text{m}$  が 5 ~ 10  $\mu\text{m}$  まで減少したが、その後の  $\text{NO}_3\text{-N}/\text{COD}_{\text{cr}}$  比増加に伴い 180 日目においては厚さ約 10 ~ 20  $\mu\text{m}$ 、318 日目においては厚さ 30 ~ 50  $\mu\text{m}$  まで増大していた。また、180 日目以降では *Archaea* の優占種が *Methanosaeta* 様の糸状性の種に変化していた。この糸状性の *Archaea* の存在は  $\text{NO}_3\text{-N}/\text{COD}_{\text{cr}}$  比を 0.2 から 0.1 に変更した 361 日目の R1 においても確認できた。

表 1 に脱窒グラニュール内での各プローブによる検出結果を示す。増大した *Bacteria* 層には、プローブ BET42a と GAM42a の標的細胞が多数検出され、特に BET42a で検出された細胞が多く、*Bacteria* 層の約 30 % を占めていた。一方、プローブ ALF968 ではほとんど蛍光は検出されなかった。また、脱窒細菌を標的としたプローブの中で最も多く検出されたのはプローブ DEN124 および DEN441 であり、両者とも *Bacteria* 層の約 30 % を占めていた。データベース解析より、これらのプローブが共通して検出する可能性がある脱窒細菌として *Thauera* 属が考えられた。

### 4. 考察

リアクター内では脱窒反応とメタン生成反応が同時に行われており、安定した処理が維持できていた。FISH 法の結果として酢酸資化性の脱窒細菌を標的とする DEN124 および DEN441 が多く検出された。また、別途行ったグラニュールの脱窒活性試験において培養日数の経過に伴い酢酸を基質とした脱窒速度が向上した。このことから脱窒グラニュールの脱窒細菌は酢酸資化性が優占化したと考えられた。一方、培養日数の経過に伴いメタン生成古細菌の優占種は糸状性で酢酸に対する親和性の高い *Methanosaeta* に変化していた。これは、脱窒グラニュールにおいて酢酸資化性の脱窒細菌が増殖したために、酸生成細菌によるグラニュール内部への酢酸供給が減少したことに起因すると思われる。脱窒細菌とメタン生成古細菌は

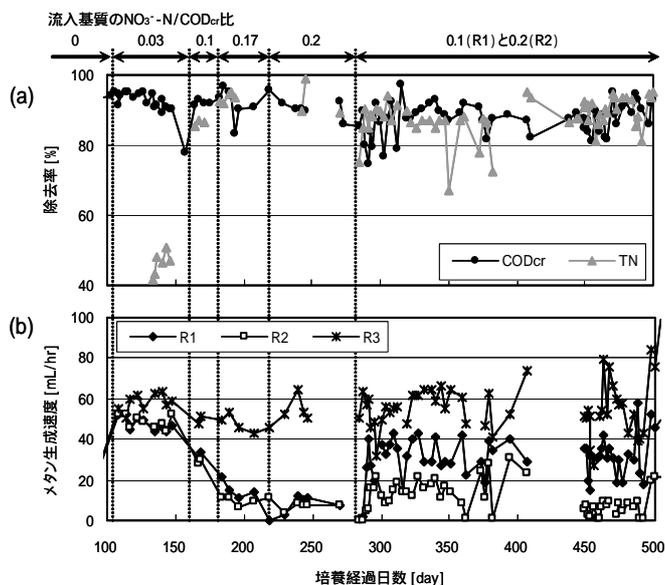


図 2 リアクターの処理性能の経日変化

表 1 脱窒グラニュール内での各プローブによる検出結果

プローブ	存在量
ALF968	-
BET42a	+++
GAM42a	++
BONE23A	+
DEN124	+++
DEN581	+
DEN1454	-
DEN444	-
DEN441	+++
DEN67	+
PAR1457	-
HYP1241	-

酢酸を競合しながらも、主要微生物種が変遷した結果、脱窒グラニュールとしては安定した生態系が形成されたと考えられた。

### 5. まとめ

(1) 脱窒グラニュールは、リアクターへ硝酸塩を流入したことにより、嫌気性グラニュールの外側に *Bacteria* 層が増大したことにより形成されていた。また、増大した *Bacteria* 層には *Betaproteobacteria* が優占していた。

(2) 酢酸資化性の脱窒細菌を標的とするプローブ DEN124 および DEN441 の標的細胞が多数検出されたことから、脱窒グラニュールにおいて優占した脱窒細菌は *Betaproteobacteria* の *Thauera* 属である可能性が高い。また、酢酸資化性の脱窒細菌の増殖に伴い、メタン生成古細菌の優占種は酢酸に対する親和性の高い *Methanosaeta* に変化していた。