

廃水処理プロセスにおける脱窒細菌の迅速・簡便な生菌数計測法の開発

豊橋技術科学大学 正会員 ○山田 剛史、非会員 川島 淳一
非会員 松本 周平、非会員 平石 明

1. はじめに

生物学的脱窒プロセスでは、脱窒細菌の生化学反応 ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) を介して排水中の硝酸を窒素まで還元する。現在、これらのプロセスでは、pH、温度、処理負荷や硝酸除去率などの水質指標に基づいて管理・制御されており、硝酸除去を実際に担っている脱窒細菌は、半ばブラックボックス的に扱われているのが現状である。そのため、現状では脱窒細菌の特性に見合った制御・管理が難しく、ひとたび処理水質の低下などプロセス運転が悪化した場合、回復に多大な労力を必要とする。この問題を克服するためには、水質指標のみならず、プロセス内で硝酸除去を実際に担っている脱窒細菌も指標化し、水質と微生物の相互補完的な管理体制の強化が必要であると思われる。プロセス内の高活性脱窒細菌の正確な計測は、亜硝酸還元酵素遺伝子などの脱窒関連遺伝子の転写物を標的とした *fluorescence in situ hybridization* 法や定量 RT-PCR 法などの非培養的な技法を選択することが望ましい。しかしながら、これらの方法は、高度な知識を要するだけでなく、操作の迅速性や簡便性と言う点で未だ問題がある。そのため、現在のところ、脱窒細菌の生菌数を正確に測定する迅速・簡便な技法は未だ知られていない。

そこで我々は、脱窒細菌の生菌数を迅速・簡便に計測する技法を確立するために、好気性細菌の呼吸活性菌計測法で用いられている 5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride (CTC) 染色法を利用することを考案した(図1)。CTC 法を原理とした計測技術の確立のために、本研究では、脱窒細菌の数種の純粋株を用いて、硝酸呼吸由来の CTC 還元反応の最適条件の検討を行った。また、生物学的脱窒プロセス内の活性汚泥を用いて実際にプロセス内の脱窒細菌の生菌数を計測できるかを評価したので報告する。

2. 実験方法

2.1 純菌株を用いた CTC 反応条件の最適化

硝酸呼吸に基づく CTC 還元反応の最適条件の評価は、*nirS* 型および *nirK* 型の数種の脱窒細菌を用いて行った。CTC 反応の最適条件を検討するために、CTC 濃度、反応時間および呼吸阻害剤の種類や濃度をそれぞれ操作した。CTC 反応に用いた脱窒細菌は、脱窒条件下において培養を行なった対数増殖期にあるものを使用した。硝酸呼吸下の CTC 反応は、MOPS 緩衝液 (pH 6.5) で洗浄した菌体懸濁液をバイアル内に入れ、アルゴンガスを封入して密栓した後、25℃でインキュベートしながら行った。CTC 染色率は、蛍光顕微鏡下で計測した CTC 陽性菌数を SYBR Green I で染色した全菌染色数で除して算出した。

2.2 廃水処理プロセス内の活性汚泥を用いた脱窒細菌の生菌数計測

廃水処理プロセス内における脱窒細菌の生菌数計測は、グルコースを単一の電子供与体として運転したラボスケール回分式脱窒プロセス内の活性汚泥 (MLSS: 2,000 mg/l) を用いた。本プロセスは、約2ヶ月間に亘り、良好な硝酸除去速度と硝酸除去効率で運転されていた。CTC 反応条件 (CTC 濃度、反応時間および呼吸阻害剤の種類や濃度) は、活性汚泥でも同様に評価した。

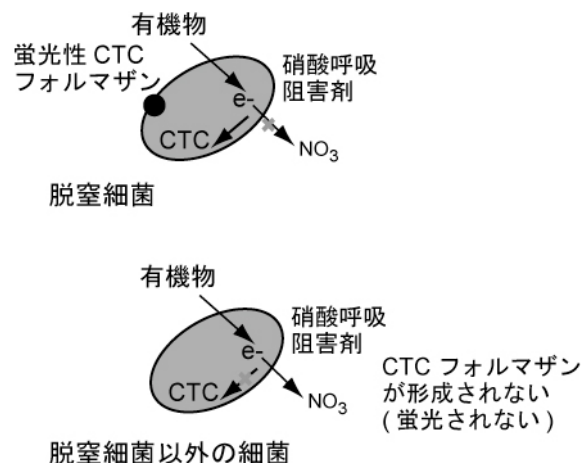


図1 脱窒細菌を標的とした CTC 染色法の原理

キーワード CTC、脱窒細菌、廃水処理プロセス、生菌数測定技術

連絡先 〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 TEL: 0532-44-6912

3. 実験結果および考察

3.1 純菌株を用いた CTC 反応条件の最適化

nirS 型および *nirK* 型の数種の脱窒細菌を用いて CTC 法の最適化を行った。まず、CTC 濃度 1 mM および硝酸呼吸阻害剤なしの条件下において CTC 反応時間（1～72 時間）の検討を行ったところ、いずれの反応時間においても 90%以上の CTC 染色率を示した。そのため本研究では、迅速な測定を測る上で、CTC 反応時間を 1 時間とした。次に、CTC 濃度の検討を行った。その結果、硝酸呼吸阻害剤を添加せずに CTC 濃度を 1 mM 以上にすることによって、脱窒細菌の純粋株の 90%以上が、細胞内に蛍光性 CTC フォルマザンを蓄積していることが観察された（図 2）。このことは、CTC 濃度を過剰に添加することによって、偽陽性細菌であっても CTC 陽性菌として検出されることを示していた。そこで、硝酸呼吸に由来する CTC 染色菌を明確に計測するためには、硝酸呼吸阻害剤を使用するとともに、CTC 濃度 0.1～0.2mM 程度とすることが重要であることが分かった（図 2）。さらに本研究では、様々な硝酸呼吸阻害剤を用いて、硝酸呼吸に由来する CTC 染色菌率が増加するかを評価した。その結果、シアン化カリウムやアジ化ナトリウムを硝酸呼吸阻害剤として使用した場合、CTC 染色率を高める効果はなかったが、diethyldithio carbamate（DDC）を 0.5～1 mM 程度添加することにより、*nirS* 型脱窒細菌のみ CTC 染色率を高める（80%以上）効果が確認できた（図 3）。これらの結果は、本研究で開発を試みた新規 CTC 法は、DDC を硝酸呼吸阻害剤として使用することによって *nirS* 型脱窒細菌の生菌数を計測法として利用できることを示す。

3.2 廃水処理プロセス内の活性汚泥を用いた脱窒細菌の生菌数計測

脱窒プロセス内の脱窒細菌が、上記で決定した CTC 反応条件で検出可能かについて評価した。その結果、DDC（1 mM）を添加することにより、CTC 濃度（0.2mM）、CTC 反応時間（1 時間）で 80 %以上の脱窒細菌の生菌数を測定することができた。これは、通常の脱窒プロセス内の活性汚泥は、*nirS* 型脱窒細菌が優占しているケースが多いためであると考えられる。従って、本技法は、脱窒プロセス内の脱窒細菌の生菌数を測定する上で有効な方法であることが示された。

4. 謝辞

本研究は、科学技術振興機構 A-STEP フィジビリティースタディイー[FS]ステージ探索タイプ、日本学術振興会科学研究費補助金若手研究 B および公益財団法人科学技術交流財団「知の拠点」重点研究プロジェクトの助成の成果として得られたものであり、ここに深謝の意を表する。

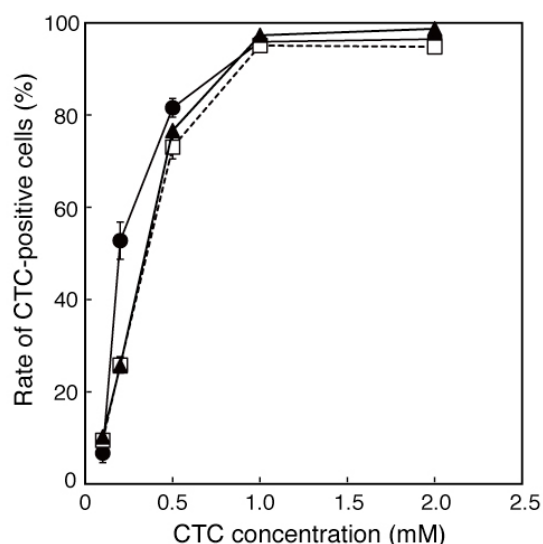


図 2 CTC 濃度を変化させた時の *nirS* および *nirK* 型脱窒細菌の CTC 染色率の変化。●: *Pseudomonas aeruginosa* (*nirS*)、□: *Pseudomonas fluorescens* (*nirS*)、▲: *Rhizobium radiobacter* (*nirK*)

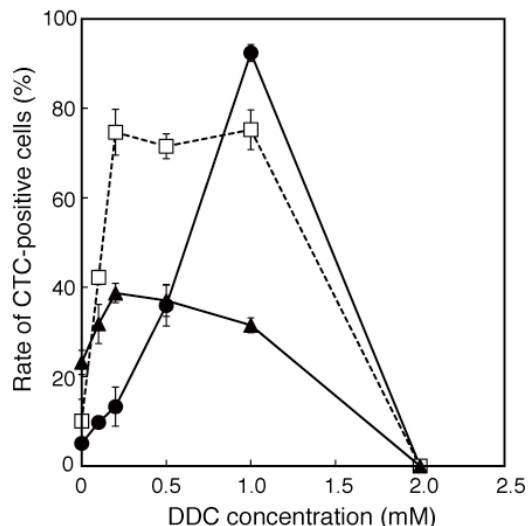


図 3 DDC 濃度を変化させた時の *nirS* および *nirK* 型脱窒細菌の CTC 染色率の変化。●: *Pseudomonas aeruginosa* (*nirS*)、□: *Pseudomonas fluorescens* (*nirS*)、▲: *Rhizobium radiobacter* (*nirK*)