

NOBs の細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度の時間変動

山梨大学大学院 (学) 辻 幸志 (正) 藤田昌史
 神鋼環境ソリューション 山下哲生 赤司 昭

1. はじめに

古くから硝化細菌群の最大比増殖速度 μ_A は、下水処理施設ごとにばらつきがあることが知られている。 μ_A は、活性汚泥モデルのパラメータとして組み込まれているが、窒素濃度の予測に非常に寄与が高いことから、煩雑なキャリブレーション作業の簡易化を図るためにも、その要因を定量化してモデルにフィードバックすることが望まれる。

筆者らは、下 wastewater 処理施設を対象として、長期間にわたりアンモニア酸化細菌群、亜硝酸酸化細菌群 (*Nitrospira*、*Nitrobacter*) の細胞数を測定して、細胞数あたりの最大アンモニア酸化速度、最大亜硝酸酸化速度の変動を調べてきた¹⁾。その結果、流入窒素負荷と対応して変動することがわかってきた。つまり、未知だった変動要因を探索する手掛かりを見出すことができた。

本研究では、硝化反応のなかでも亜硝酸酸化に着目した。長期間にわたり亜硝酸基質で好気 SBR 運転を行い、亜硝酸酸化細菌群の集積汚泥を得た。それを用いて、まず、人為的に亜硝酸負荷を変えたときに、これに応じて細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度や呼吸活性も変化することを確認した。次に、亜硝酸負荷を高くして運転し、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度の時間変動を調べた。そして、累積の亜硝酸酸化量に着目して、変動要因についても検討した。

2. 方法

(1) 好気 SBR 運転

火力発電所の廃水処理施設¹⁾ (窒素負荷 = $0.10\text{kg-N/m}^3\cdot\text{day}$) の活性汚泥を 6L-SBR に植種した。そして、pH を 7.0 に調整した亜硝酸基質 3L を、サイクル初期 10 分

間で負荷が $0.2\text{kg-N/m}^3\cdot\text{day}$ となるように流入させた。この流入時間を含めて、曝気工程 5 時間、沈殿・排水 1 時間、合計 6 時間の好気 SBR 運転を行った。水温 20°C 、SRT20 日に設定した。

(2) Real-time PCR

既報¹⁾ にしたがって、*Nitrobacter* については SYBR Green 法、*Nitrospira*、EUB については TaqMan probe 法により、それぞれのコピー数を測定した。いずれの測定でも、同時に採取した 2 試料から別々に DNA 抽出を行い、Real-time PCR を各 3 回行ったことから、 $n=6$ の平均コピー数を代表値とした。*Nitrobacter*、*Nitrospira* については、ひとつの細胞が 1 コピー²⁾、EUB については平均 3.6 コピー³⁾ を持つと仮定して、それぞれの細胞数を算出した。

(3) 亜硝酸負荷を変えた亜硝酸酸化実験

表-1 に示したように、2 つの実験 (Exp. 1、Exp. 2) を行ったが、それぞれ好気 SBR における 132 日目と 226 日目の集積汚泥を用いた。

Exp. 1 では、2 本の 1L メスシリンダーに汚泥 0.8L をそれぞれ入れて、一方は亜硝酸負荷が $0.1\text{kg-N/m}^3\cdot\text{day}$ (Run B)、他方は $0.4\text{kg-N/m}^3\cdot\text{day}$ (Run C) となるように調整して、サイクル 12 時間 (流入・曝気 : 沈殿・排水 = 11 : 1 時間、初期 1 分で亜硝酸基質 0.4L を流入) で 2 サイクル運転した。そして、対照系 (Run A) として集積汚泥も含めて、後述する好気回分活性試験とキノン分析に供した。

Exp. 2 では、3 本の 1L メスシリンダーに汚泥 0.8L をそれぞれ入れて、亜硝酸負荷が $0.4\text{kg-N/m}^3\cdot\text{day}$ となるように調整した。そして、サイクル 6 時間 (流入・曝気 : 沈殿・排水 = 5 : 1 時間、初期 1 分で亜硝酸基質 0.4L を流入) で、それぞ

表-1 亜硝酸負荷を変えた亜硝酸酸化実験の条件

Exp.	Run	Operation mode (hr)	Operation cycle (time)	NO ₂ -N Loading (kg-N/m ³ ·day)
1	A (control)			0.2
	B	11 : 1 *)	2	0.1
	C			0.4
2		5 : 1 *)	4	0.4

*) Aeration : Settling and Discharge

キーワード : *Nitrobacter*、*Nitrospira*、Real-time PCR、最大亜硝酸酸化速度、累積亜硝酸酸化量

〒400-8511 山梨県甲府市武田 4-3-11 Tel : 055-220-8725 E-mail : mfujita@yamanashi.ac.jp 藤田昌史

れ 1、2、4 サイクル運転した。集積汚泥も含めて、速やかに後述する好気回分活性試験に供した。

(4) 好気回分活性試験

採取した汚泥に、十分量の亜硝酸ナトリウムを加えた。その後、pH7.0、水温 20°C に調整して、攪拌と曝気を行い、試験を開始した。そして、定刻毎に採水して、亜硝酸濃度を分析した。ここでは、亜硝酸濃度が直線的に減少した部分に着目して、最大亜硝酸酸化速度を算出した¹⁾。

(5) キノン分析

キノンは、微生物の電子伝達鎖に存在し、水素キャリアーとして機能する補酵素である。Exp. 1 で優占していた *Nitrobacter* は、Q-10 を含有することが知られている⁴⁾。汚泥混合液 150mL をガラス繊維ろ紙 ($\phi = 0.3\mu\text{m}$) を用いてろ過し、得られたろ過残渣物を分析に供した。キノンの抽出には、複数の有機溶媒による抽出、固相抽出カートリッジによる分離・精製を経て、HPLC により同定・定量した⁵⁾。

3. 結果および考察

(1) 亜硝酸酸化実験に用いた集積汚泥の *Nitrobacter*、*Nitrospira*、EUB の細胞数

好気 SBR の運転を開始してから 60 日目までは、曝気工程終了時に亜硝酸が残存していたが、その後、流入した亜硝酸は、すべて酸化されるようになった。

Exp. 1 で用いた集積汚泥の *Nitrobacter*、*Nitrospira*、EUB は、それぞれ $3.8 \times 10^{10} \pm 1.5 \times 10^9 \text{ cell/L}$ 、 $4.5 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^7 \text{ cell/L}$ 、 $4.8 \times 10^{11} \pm 1.9 \times 10^{10} \text{ cell/L}$ であった。*Nitrospira* の細胞数が *Nitrobacter* の細胞数の 1% 程度であったことから、このときの亜硝酸酸化反応は、主として *Nitrobacter* が担っていたと考えられる。また、EUB に占める *Nitrobacter* の割合は、79% であった。

一方、Exp. 2 で用いた集積汚泥の *Nitrobacter*、*Nitrospira*、EUB は、それぞれ $7.7 \times 10^{10} \pm 4.7 \times 10^9 \text{ cell/L}$ 、 $3.4 \times 10^{10} \pm 6.8 \times 10^9 \text{ cell/L}$ 、 $2.1 \times 10^{11} \pm 2.7 \times 10^{10} \text{ cell/L}$ であった。*Nitrobacter*、*Nitrospira* の細胞数は、それぞれ EUB の 37%、16% であったことから、このときには、*Nitrobacter* に加えて *Nitrospira* (以下、両者を NOB) も亜硝酸酸化に寄与していたものと考えられる。

(2) 亜硝酸負荷を増減させたときの細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度と Q-10 (Exp. 1)

a) 細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度

図-1 (a) に示したように、Run A (対照系) の最大亜硝酸酸化速度は $0.72 \text{ mmol/L}\cdot\text{hr}$ であった。亜硝酸負荷を下げた Run B では 24 時間後に $0.59 \text{ mmol/L}\cdot\text{hr}$ にまで低下し、逆に

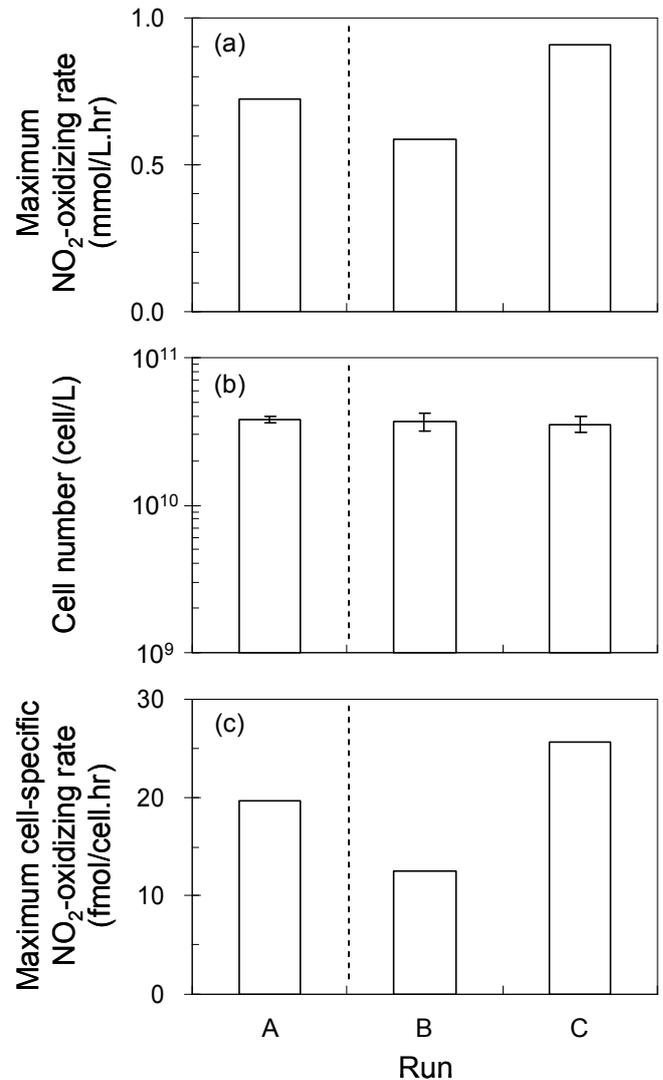


図-1 最大亜硝酸酸化速度、*Nitrobacter* の細胞数、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度 (Exp. 1)

負荷を上げた Run C では $0.91 \text{ mmol/L}\cdot\text{hr}$ にまで上昇した。この間、*Nitrobacter* の細胞数はほとんど変化しなかったことから (図-1 (b))、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度も同様の傾向を示していた (図-1 (c))。したがって、下 wastewater 処理施設で観察されたように、本実験においても、亜硝酸負荷の増減に応じて、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度も変動した。

b) 細胞数あたりの Q-10

図-2 に示したように、細胞数あたりの Q-10 は、Run A では 0.30 fmol/cell であった。一方、Run B では 0.27 fmol/cell に減少していたのに対し、Run C では逆に 0.36 fmol/cell に増加していた。この結果を、亜硝酸負荷の増減に応じて、*Nitrobacter* 一細胞の呼吸活性も連動して増減したと解釈すると、次のような仮説が想定される。すなわち、このように一細胞あたりの呼吸活性に違いが見られたということは、それまでに得られたエネルギーに違いがあったはずである

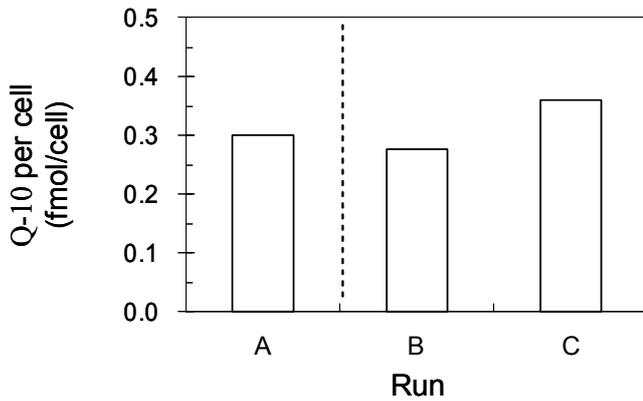


図-2 細胞数あたりのQ-10

ことから、一細胞がそれまでに酸化した亜硝酸量が関係するものと考えられる。

(3) 細胞数あたりの累積の亜硝酸酸化量と最大亜硝酸酸化速度の関係 (Exp.2)

a) 亜硝酸酸化量の推移

各サイクルの亜硝酸酸化量と亜硝酸残存量を積み上げて示した(図-3)。好気SBRの1サイクルにおける亜硝酸酸化量は、2.9mmol-Nである。負荷を2倍にしたことで、1サイクル目の亜硝酸酸化量は4.3mmol-Nと高くなったが、すべて酸化することはできなかった。2サイクル目ではそれほど変化はなかったが、3サイクル目では5.4mmol-N、4サイクル目では5.7mmol-Nに達し、投入した亜硝酸がほとんどすべて酸化されるまでに至った。

b) 細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度の推移

図-4 (a)に示したように、実験開始時の最大亜硝酸酸化速度は1.4mmol-N/L.hrであった。亜硝酸負荷を2倍に上げてから5時間後では、ほとんど変わらなかったが、11時間、23時間後では、それぞれ1.6mmol-N/L.hr、1.8mmol-N/L.hrにまで増加した。したがって、上述した累積亜硝酸酸化量と同様の傾向を示した。この間、NOBの細胞数は、ほとん

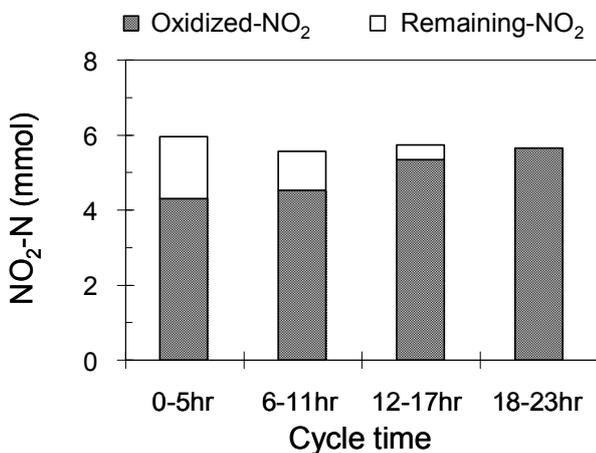


図-3 各サイクルにおける亜硝酸酸化量と残存亜硝酸量

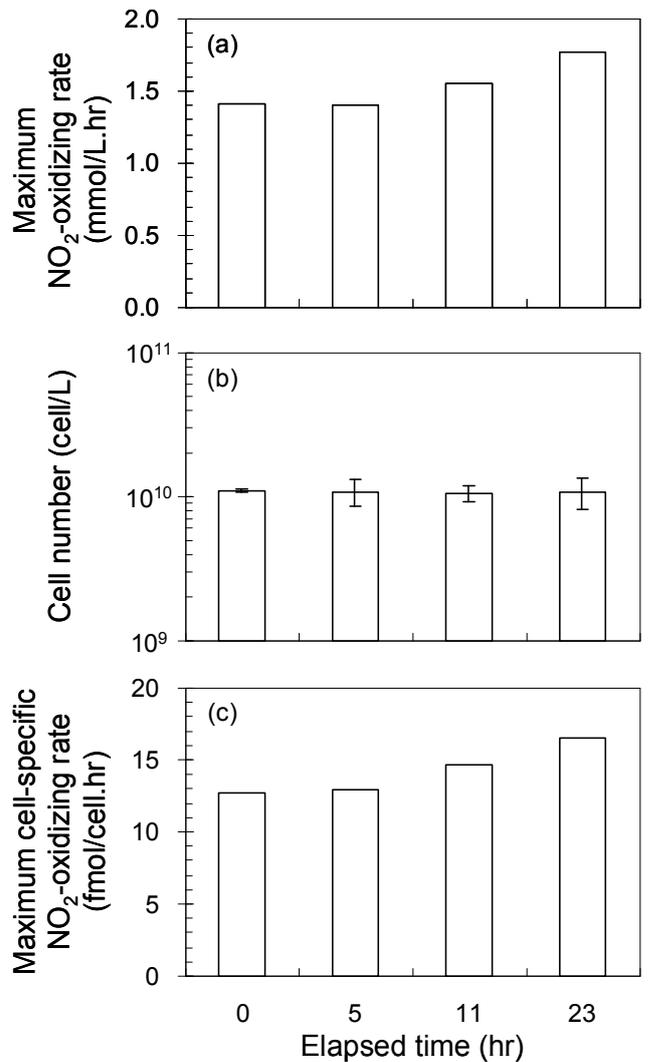


図-4 最大亜硝酸酸化速度、NOBの細胞数、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度 (Exp. 2)

ど変化しなかったことから(図-4 (b))、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度も、同様の増加傾向を示した(図-4 (c))。ここで、実験開始時を基準として、負荷を上げたことによる細胞数あたりの累積亜硝酸酸化量の増分と細胞数あたり

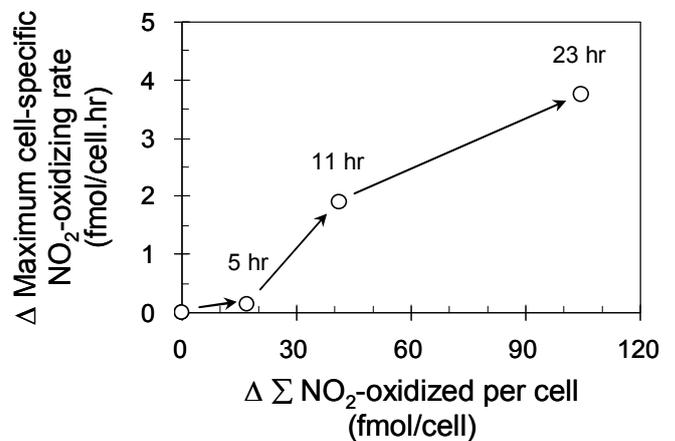


図-5 細胞数あたりの累積亜硝酸酸化量の増分と最大亜硝酸酸化速度の増加量の関係

の最大亜硝酸酸化速度の増加量との関係を図-5 に示した。実験開始から5時間、11時間における細胞数あたりの累積亜硝酸酸化量の増分は、それぞれ20fmol/cell程度であったにも係わらず、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度の増加量は明らかに11時間の方が多かった。細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度が増加するためには、細胞数あたりの累積亜硝酸酸化量がある閾値を超す必要があると推測される。本実験条件においては、少なくとも40fmol/cell程度の細胞数あたりの累積亜硝酸酸化量の増加が必要であった。ただし、前述したように、本実験では、NOBとして、*Nitrobacter*、*Nitrospira*が含まれていることから、今後、両者をわけて評価することが課題となる。

4. まとめ

亜硝酸基質で集積した汚泥を用いて、亜硝酸負荷を増減させたところ、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度や呼吸活性も連動して増減した。これは、一細胞がそれまでに酸化した亜硝酸量に関係するものと考えられたことから、次

に、亜硝酸負荷を上げて実験を行い、この負荷の増分にもなう一細胞あたりの累積亜硝酸酸化量の増分と亜硝酸酸化速度との関係を調べた。その結果、細胞数あたりの最大亜硝酸酸化速度が増加するためには、細胞数あたりの累積亜硝酸酸化量がある閾値を超す必要があると推測され、ここでは少なくとも40fmol/cell程度と見積もられた。

参考文献

- 1) 藤田：水環境学会誌，Vol. 31, No. 1, pp. 17–20, 2008.
- 2) Aakra, A., Utaker, J. B. and Nes, I. F., : *Int. J. Sys. Bacteriol.*, Vol. 49, pp. 123–130, 1999.
- 3) Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R. and Schmidt, T. M., : *Nucleic Acids Res.*, Vol. 29, No. 1, pp. 181–184, 2001.
- 4) Collins, D. M. and Jones, D., : *Microbiol. Rev.*, Vol. 45, No. 2, pp. 316–354, 1981.
- 5) 今井ら：第17回廃棄物学会研究発表会講演論文集，pp. 996–998, 2006.