

リン蓄積細菌の亜硝酸に対する感受性を用いた分画

日本大学大学院理工学研究科土木工学専攻 学生会員 ○坪井 宣太
 非会員 湯本 高太
 日本大学理工学部 正会員 吉田 征史
 正会員 齋藤 利晃

1. はじめに

生物学的リン除去の不安定化因子の一つとして亜硝酸が注目されている。我々はこれまでに、酢酸を主基質として嫌気好気法により集積培養したリン蓄積細菌（PAOs）に対し、亜硝酸阻害を詳細に検討し、PAOsの有する脱窒能力の大きさが阻害応答と密接に関連していることを示した¹⁾。酢酸を用いた理由は、これまでPAOsに関する研究の多くが酢酸を用いて行われてきたためであるが、単独基質による培養は生物叢を単純化してしまい、実下水処理場に存在しているPAOsの一部を抽出しているに過ぎない可能性が指摘されている。実際、分子生物学的手法（PCRやFISHなど）を用いた研究により、下水処理場の汚泥には多様なPAOsが存在し、特に、*Candidatus Accumulibacter Phosphatis*（以下Accumulibacter）と*Actinobacteria*が主要PAOsである²⁾ことが報告されているのに対し、酢酸を主基質として培養した場合にはAccumulibacter³⁾が、またペプトンを主基質として培養した場合には*Actinobacteria*²⁾が優占化するとの報告がある。従って、亜硝酸が生物学的リン除去に与える影響を解明するには、これまで行われてきたAccumulibacterのみならず*Actinobacteria*など他のPAOsが示す亜硝酸阻害応答についても詳細に調べる必要がある。そこで本研究では、酢酸とペプトンの混合基質でPAOsの集積培養を行い、得られた汚泥に対し亜硝酸阻害回分実験を行うことで、優占種による亜硝酸阻害応答の相違を調べた。また、同じ汚泥でも用いる有機物の種類によって亜硝酸阻害応答が異なるから、集積培養汚泥中のPAOsを亜硝酸阻害応答の大きさと分画する方法について検討を行った。

2. 研究方法

(1) 汚泥培養方法

表1に表記するように、炭素源として酢酸とペプトンの混合液を用いてPAOsの集積培養を嫌気好気回分式反応槽（以下A/O SBR）内で行った。定期的に嫌気工程開始時・終了時・好気工程終了時のリン酸濃度の測定を行い、経日変化について調べた。

この実験の特徴は、集積培養に使用した有機物濃度は変えずに、酢酸単独基質から酢酸とペプトンのCOD比1対1の混合基質に調整したことである。

(2) 亜硝酸阻害試験

回分試験方法は連続運転中のA/O SBRから嫌気工程前の汚泥を採取し、それに酢酸もしくはペプトンのどちらか一方を添加、嫌気工程180分間に曝し、PAOsによる有機物摂取とリン放出を観察した。

その後、好気工程下130分間に移った直後に亜硝酸を添加し、PAOsの好氣的リン摂取に及ぼす亜硝酸阻害を調べた。この試験の特徴は、回分試験時の投入有機物を、ペプトンもしくは酢酸のどちらか一方のみとすることで有機物によりPAOsを分画し、利用可能な有機物で分画されたPAOs毎に亜硝酸阻害を見られるよう工夫したことである。表2に回分試験の条件を示す。

運転条件		
条件	数値	単位
反応槽容積	4	L
サイクル時間	6	h/cycle
SRT	10	d
HRT	12	h
嫌気工程(流入10min)	180	min
好気工程	130	min
沈殿排水時間	50	min
余剰汚泥引抜	0.1	L/cycle
pH制御	6.9-7.1	
流入濃度		
酢酸	200	mgCOD/L
ペプトン	200	mgCOD/L
リン酸	30	mgP/L
その他栄養素		

キーワード リン蓄積細菌, 分画, 亜硝酸, 阻害, 活性汚泥モデル

連絡先 〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台1-8-14 TEL03-3259-0875

表2 亜硝酸阻害回分実験の条件

(共試汚泥, 有機物, 汚泥量, 亜硝酸濃度)				
略称	培養日数 (days)	有機物	汚泥量 (gVSS/L)	亜硝酸添加濃度 (mgN/L)
Pe26	26	ペプトン	1.90	0
				3
Pe40	40	ペプトン	2.18	0
				5
Ac51	51	酢酸	2.04	0
				5
Pe61	61	ペプトン	1.90	0
				16
				24
Ac93	93	酢酸	2.48	0
				6
				10

また、亜硝酸阻害試験は酢酸（平成 16・17 年度）およびペプトン（平成 19 年度）単独基質で集積培養した汚泥に対しても行った。

(3) 分画方法

混合基質により集積培養された汚泥中の PAOs を、酢酸のみを利用可能なグループ（PAO-A）と酢酸およびペプトンの両方を利用可能なグループ（PAO-B）に分け、それらの存在比を表3に示すモデル式を用いて推定した。左辺はいずれも実験より得られる値である。なお、生物学的定数は酢酸（平成 16, 17 年度）、ペプトン（平成 19 年度）および酢酸とペプトンの混合基質（平成 18 年度）により集積培養を行った 3 種の汚泥について別途行った回分試験の結果を用いた。

表3 存在比の推定方法

(1) 亜硝酸阻害応答を利用する方法

$$\eta_{obs} = \frac{PUR_{Ac(NO2)}}{PUR_{Ac}} = \frac{\eta_{Inh(Ac)-A} q_{PP(Ac)-A} X_{PAO-A} + \eta_{Inh(Ac)-B} q_{PP(Ac)-B} X_{PAO-B}}{q_{PP(Ac)-A} X_{PAO-A} + q_{PP(Ac)-B} X_{PAO-B}}$$

(2) 嫌氣的有機物摂取速度を利用する方法

$$\frac{OCUR_{Pe}}{OCUR_{Ac}} = \frac{q_{PHA(Pe)-B} X_{PAO-B}}{q_{PHA(Ac)-A} X_{PAO-A} + q_{PHA(Ac)-B} X_{PAO-B}}$$

(3) 嫌氣的リン放出速度を利用する方法

$$\frac{PRR_{Pe}}{PRR_{Ac}} = \frac{Y_{PO4(Pe)-B} q_{PHA(Pe)-B} X_{PAO-B}}{Y_{PO4(Ac)-Ac} q_{PHA(Ac)-A} X_{PAO-A} + Y_{PO4(Ac)-B} q_{PHA(Ac)-B} X_{PAO-B}}$$

(4) 好氣的リン摂取速度を利用する方法

$$\frac{PUR_{Pe}}{PUR_{Ac}} = \frac{q_{PP(Pe)-B} X_{PAO-B}}{q_{PP(Ac)-A} X_{PAO-A} + q_{PP(Ac)-B} X_{PAO-B}}$$

PUR: 好氣的リン摂取速度[mgP/gCOD.h] OCUR: 嫌氣的有機物摂取速度[mgCOD/gCOD.h]
 PRR: 嫌氣的リン放出速度[mgP/gCOD.h] η: リン摂取活性比[%] Y: 収率[gP/gCOD]
 添字 obs: 観測値, Ac: 酢酸, Pe: ペプトン, Inh: 阻害, PP: リン摂取, PO4: リン酸イオン,
 PHA: ポリヒドロキシアルカノエイト, A: PAO-A, B: PAO-B

3. 結果と考察

(1) 共試汚泥のリン除去能

図1に反応槽のリン除去能の経日変化を示す。運転開始後すぐにリン除去挙動が確認され、嫌気終了時のリン濃度は最大70mgP/Lに達した。処理水濃度も15mgP/L程度まで低下し、15mgP/Lのリンが除去されたことになる。その後トラブルもあり、若干処理能力は低下したが、回分試験に使用した汚泥の多くは、嫌気終了時に60-70mgP/Lのリン酸イオン濃度を維持した期間の結果である。

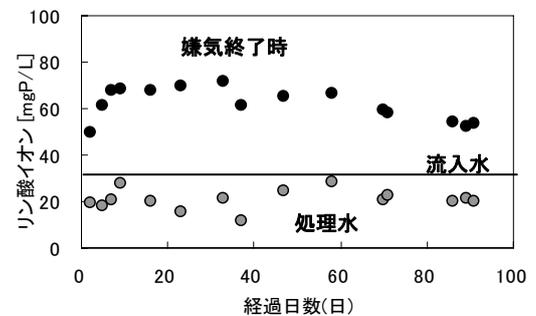


図1 連続反応槽における PAOs の集積状況

(2) 亜硝酸阻害試験結果

亜硝酸阻害回分試験におけるリン濃度の変化を図2に示す。図に示されるように、同じ汚泥（厳密には実験

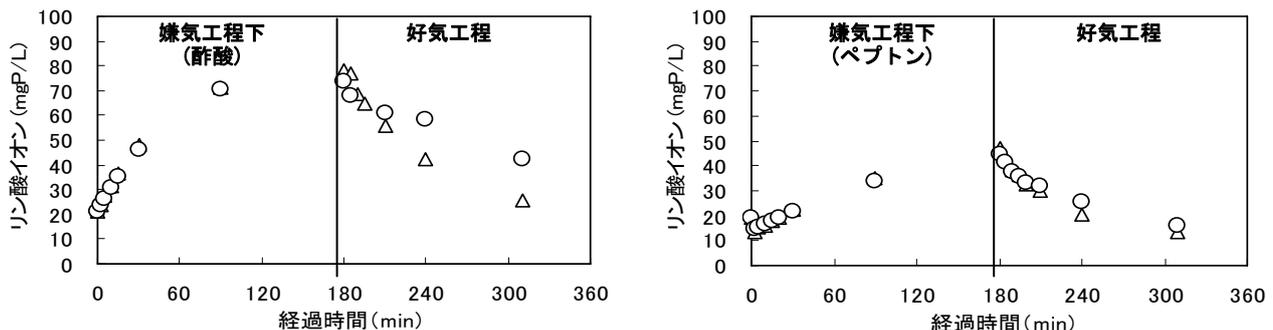


図2 混合基質を用い培養された PAOs の亜硝酸阻害応答 (左: 酢酸基質, 右: ペプトン基質 ○: 亜硝酸添加, △: 無添加)

日が異なる)を用いた場合に於いても、与える有機物が酢酸の場合(左)とペプトンの場合(右)では阻害の大きさが異なり、酢酸を利用可能なPAOsの方が阻害を受けやすい結果が得られた。

この結果を含め、全回分試験について活性比(亜硝酸無添加系に対する亜硝酸添加系のリン摂取活性の割合)を算出した結果をまとめて図3に示す。ここでMix(Pe)とMIX(Ac)は、本研究で用いた混合基質で培養した汚泥について、それぞれペプトンもしくは酢酸のどちらかを使用した場合の結果であり、Ac(Ac)は平成16,17年度に行った既存の知見¹⁾である。また、Pe(Pe)とPe(Ac)は、平成19年度に行った研究で得られたペプトン単独基質で培養した汚泥について、それぞれペプトンもしくは酢酸のどちらかを使用した結果である。この図は、PAOsの亜硝酸に対する感受性の大きさがAc(Ac) > MIX(Ac) > MIX(Pe) ≒ Pe(Pe) ≒ Pe(Ac)の順、すなわち酢酸で集積されたPAOsの感受性が最も高く(阻害を受けやすい)、次いで混合基質で培養したPAOsのうち酢酸を利用可能なグループ、最も阻害を受け難いのは、混合基質で培養されたPAOsのうちペプトンを利用可能なグループとペプトンで集積されたPAOsであることを示している。吉田ら⁴⁾は、亜硝酸に対する感受性の相違を脱窒能力で説明したが、本研究で用いた汚泥は、その培養条件(定期的にATU添加)から脱窒能力を有しているとは考えにくい。むしろ、PAOsの種類自体が異なっているためであると考えられる。また、平成19年度の研究から得られたペプトン基質で集積したPAOsはペプトンと酢酸ともに摂取可能である結果とMIX(Pe) ≒ Pe(Pe) ≒ Pe(Ac)という同程度の感受性の結果から、混合基質で集積したPAOs中のペプトンを利用可能なPAOsとペプトンで集積したPAOsは同一種であると考えられる。さらに、Ac(Ac) > MIX(Ac)の感受性の結果から、共試汚泥には酢酸のみを利用可能なグループ(PAO-A)と酢酸およびペプトンの両方を利用可能なグループ(PAO-B)が存在し、MIX(Ac)の結果は、両グループの性質を示していると予想される。

(3) 分画結果

酢酸、ペプトンおよび酢酸ペプトンの混合基質を用いてそれぞれ嫌気好気法により集積培養したリン蓄積細菌について、別途行った回分試験により得られた基本的なリン除去定数を表4に示す。回分試験により得られた各種速度は、理想的条件下に於いて得られる最大速度とした。

表4 各種集積培養リン蓄積細菌について得られた生物学的定数

培養時有機物	回分時有機物	酢酸	ペプトン		酢酸ペプトン混合(Mix)	
			酢酸	ペプトン	酢酸	ペプトン
有機物摂取速度 (mgCOD/gVSS.h) ^{注)}	q_{PHA}	140	67.3	90.2	90.4	39.9
リン放出速度 (mgP/gVSS.h) ^{注)}		55	28.3	13.9	26.4	10.3
P/C比 (gP/gCOD)	Y_{P04}	0.39	0.48	0.17	0.28	0.22
リン摂取速度 (mgP/gVSS.h) ^{注)}	q_{PP}	35	32	25.5	26.5	22.2

注) 存在比を求める上で影響を及ぼさないで、CODではなくVSSのまま表記

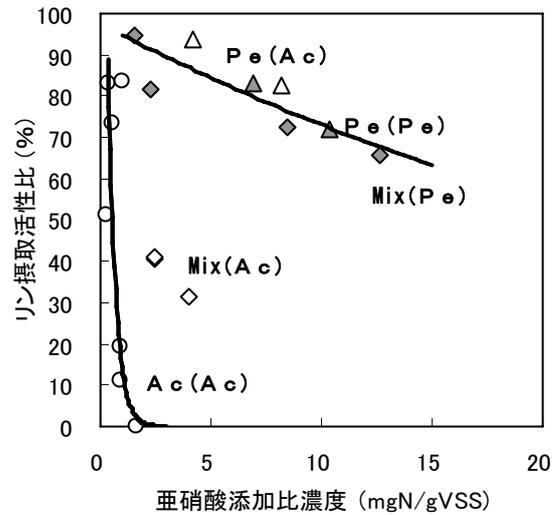


図3 基質による亜硝酸阻害応答の相違

- Ac(Ac): 酢酸で集積培養した汚泥にペプトンを投与
- ◇ Mix(Ac): 混同基質で集積培養した汚泥に酢酸を投与
- ◇ Mix(Pe): 混合基質で集積培養した汚泥にペプトンを投与
- △ Pe(Ac): ペプトンで集積培養した汚泥に酢酸を投与
- △ Pe(Pe): ペプトンで集積培養した汚泥にペプトンを投与

表4の生物学的定数と回分実験の結果を用い、混合基質で培養した汚泥中のPAOsを4つの方法(表3参照)により分画した。結果を図4に示す。プロットが少ないこと、回分試験に於いて酢酸添加系とペプトン添加系の実施日が10日以上ずれていること、日数が経過しているためポピュレーションが変化している可能性が高いことなどのため解釈は難しいが、亜硝酸阻害応答を用いた分画法(1)による推定値は、PAO-Bの存在比をリン放出やリン摂取を用いた方法に比べ小さい結果が得られた。

酢酸を単独基質として嫌気好気法により集積培養した汚泥中の *Actinobacteria* および *Accumulibacter* 量を、リアルタイムPCRを用いて測定したところ、既存の知見と同様に *Accumulibacter* がほぼ100%であったことから、本研究のPAO-Aは *Accumulibacter* と考えてよいと思われる。一方、ペプトンを単独基質として嫌気好気法により集積培養した場合には、*Actinobacteria* が9割、混合基質で嫌気無酸素好気法の場合、*Actinobacteria* が8割を占めていたことから、既存の報告通り、ペプトンを主に優先的に利用するのは *Actinobacteria* であると考えられる。しかし、PAO-Bを *Actinobacteria* であると考え、亜硝酸に対する阻害応答の結果から得られたPAO-B存在比は低めに見積もられていることになる。これは表4の混合基質で培養した汚泥におけるペプトンを回分基質として求めたP/Cの値が0.22gP/gCODであることと合わせて考えると、混合基質で培養した汚泥中にはペプトンを速やかに分解し、*Accumulibacter* が利用できる有機物に転換することができる細菌が共存していたこと、すなわちPAO-Bに分画されるPAOsの亜硝酸阻害応答には、*Accumulibacter* による応答が含まれていた可能性を示している。

4. まとめ

培養時の有機物として酢酸、ペプトンおよび酢酸とペプトンの混合基質を用いて集積培養を行ったリン蓄積細菌の亜硝酸阻害応答を調べることで、有機基質毎に亜硝酸阻害に関する定量的応答関係を得た。これらを用いて2種類のPAOsの存在比を亜硝酸に対する阻害応答を用いて推定する方法を検証ところ、PAOsではない共存細菌によって影響を受ける可能性が示唆された。今後、亜硝酸に対するPAOsの定量的阻害応答関係について更に詳細な検討を加え、生物学的リン除去の安定化につなげていきたいと考えている。

謝辞 リアルタイムPCRによるPAOsの定量について、東京大学大学院新領域創成科学研究科の佐藤弘泰先生、庄司仁研究員、福島寿和研究員の多大なる協力を頂きました。

なお、この研究は、平成18年度クリタ水・環境科学振興財団の研究助成を受けて行われたものである。ここに感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) Saito, T. et al. (2007). Unstable Nitrite Inhibition of Phosphate Uptake Caused by Aerobic Nitrite Denitrification of Phosphate-Accumulating Organisms, WEF NUTRIENT REMOVAL 2007, CD-ROM.
- 2) 宇田ら(2006) 実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌のFISH法による群集解析, 日本水環境学会年会講演集, 40, 469.
- 3) Crocetti, G. R. et al. (2000). Identification of polyphosphate-Accumulating Organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1175-1182.
- 4) 吉田征史ら(2005) 亜硝酸による好氣的リン摂取阻害を緩和する脱リン細菌の脱窒能力, 環境工学研究論文集, 42, 69-80.

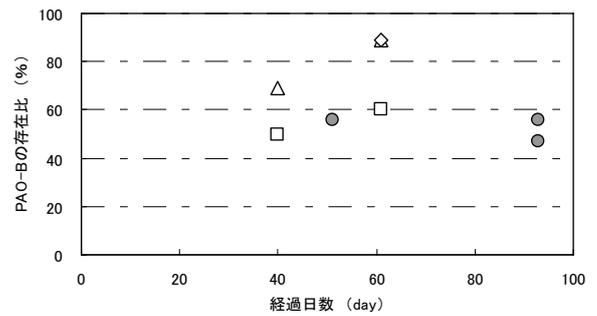


図4 活性試験を用いた分画結果

- (1) 亜硝酸
- (2) 有機物摂取
- △ (3) リン放出
- ◇ (4) リン摂取