

リン蓄積細菌 2 種のリン除去能力及び亜硝酸阻害感受性の相違

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
 日本大学理工学部土木工学科 正会員 吉田 征史
 正会員 齋藤 利晃

1、はじめに

近年、閉鎖性水域の富栄養化対策として生物学的リン除去プロセスが用いられているが、突如としたリン除去率の低下が問題視されており、そのメカニズムの解明が喫緊の課題である。その原因の一つとして亜硝酸曝露が挙げられている。生物学的リン除去法は、嫌気好気工程を経てリン蓄積細菌(以下 PAOs)がリンを蓄えることによって排水からリンを取り除く方法であるが、好気工程下に亜硝酸が存在すると PAOs の好氣的リン摂取が阻害され、リン除去量が低下する。これまで、多くの研究者により PAOs に対する亜硝酸の影響が調べられてきたが、それぞれに異なる亜硝酸感受性が報告されており、未だ不明な点が多い。しかし、近年 PAOs の亜硝酸に対する感受性が PAOs の脱窒能力の違いによって異なることが明らかにされ¹⁾、亜硝酸阻害の定量的評価の糸口が見えてきた。

そのような中、下水処理場の汚泥には多様な PAOs が存在することが明らかにされ、細菌種による亜硝酸耐性の相違が定量的把握を困難にしていることが考えられた。特に、酢酸を主基質として培養した場合に優占化する *Candidatus 'Accumulibacter Phosphatis'*(以下 CAp) と *Actinobacterial-PAO*(以下 A-PAO) が主要な PAOs であるという報告²⁾がなされていることから、我々は、炭素源を代えて培養したリン蓄積能を有する汚泥の亜硝酸耐性を調べ、両細菌種の亜硝酸への感受性が著しく異なる可能性を指摘^{4),5)}した。しかし、両細菌種の存在量との関係は未だ明らかではない。

そこで本研究は、酢酸、ペプトンおよびそれらの混合基質で培養した汚泥中の PAOs の能力(有機物摂取速度、リン放出速度およびリン摂取速度と亜硝酸阻害耐性を調べ、定量 PCR による CAp および A-PAO のコピー数(以下 C_{CAp} および C_{A-PAO})と関連づけることで、汚泥中の量細菌種の存在比と亜硝酸感受性との関係を検討した。

2、実験方法

(1)連続培養方法

表 1 に表記するように炭素源として、酢酸、ペプトンおよびそれらの混合基質を用いて PAOs の集積培養を嫌気好気回分式反応槽内(A/O SBR)で行った。定期的に一回分サイクル中のリン酸濃度を測定し、リン除去能力の経日変化を調べた。また、ATU(アリルチオ尿素)を定期的に添加し、硝化細菌の増殖抑制を行った。

(2)リン除去能力調査

A/O SBR から嫌気工程前の汚泥を採取し、酢酸もしくはペプトンのどちらか一方の炭素源を添加することにより、それぞれを炭素源として利用できる細菌が活性化できるようにし、嫌気工程下 180 分間に有機物摂取とリン放出を行わせた。その後、好気工程下 130 分間にリン摂取を行わせ、それぞれの PAOs の能力を調べた。

表 1

運転条件			
条件	数値	単位	
反応槽容積	4	L	
サイクル時間	6	hour/cycle	
SRT	10	day	
HRT	12	hour	
pH制御	6.9-7.1		
流入濃度			
リン酸	30	mgP/L	
アンモニア	40	mgN/L	
その他栄養塩			
有機物濃度			
培養日数(day)	酢酸	ペプトン	
過去の実験(H17)	400	0	mgCOD/L
0〜371	0	400	mgCOD/L
371〜	200	200	mgCOD/L

キーワード リン蓄積細菌, 亜硝酸阻害, *Actinobacteria*, *Candidatus Accumulibacter Phosphatis*

連絡先 〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14 TEL 03-3259-0875

(3) 亜硝酸阻害実験

能力調査実験方法の好気工程はじめに定量の亜硝酸を添加することにより、PAOs の好氣的リン摂取を阻害させ、無添加系と比較した。比較指標として、式1に示すように、無添加系に対する添加系のリン摂取速度比をリン摂取活性比と定義して用いた。

$$\text{リン摂取活性比 (\%)} = \frac{\text{亜硝酸添加系リン摂取速度(mgP/gVSS.h)}}{\text{亜硝酸無添加系リン摂取速度(mgP/gVSS.h)}} \times 100 (\%) \quad \cdots \text{式 1}$$

(4) PCR 実験

連続実験汚泥と回分実験汚泥中の CAp と A-PAO のコピー数を定期的に測定した。測定には RT-PCR(LightCycler)を使用し、その条件は文献^{6), 7)}に従った。

表 2

PAOsの能力	連続培養基質	酢酸		ペプトン	
	優先種	CAp		A-PAO	
	回分実験基質	酢酸	ペプトン	酢酸	ペプトン
有機物摂取速度	mgCOD/gVSS.h	155	微量	45	149
リン放出速度	mgP/gVSS.h	60	微量	21	18
リン摂取速度	mgP/gVSS.h	45	微量	29	24
P/COD比	gP/gCOD	0.39		0.47	0.12
MLSS	mgSS/L	3000		3500	
MLVSS	mgVSS/L	2000		2700	

3、実験結果

3-1. 能力調査実験の結果

表 2 は汚泥中の PAOs の優占種が CAp もしくは A-PAO の場合に、回分基質（酢酸もしくはペプトン）の違いによって、それぞれの能力を比較したものである。また、その代表例として図 1 にリン濃度挙動、図 2 に有機物濃度挙動を示した。CAp が優占した汚泥に酢酸を投入した場合、有機物摂取速度、リン放出速度およびリン摂取速度はいずれも他に比べて大きい結果が得られた。しかし、CAp が優占した汚泥にペプトンを投入した場合、微量の有機物摂取しか行われず、明確なリンの放出と摂取は観察されなかった。一方、A-PAO が優占種の汚泥にペプトンを投入した場合、有機物摂取速度は CAp が優占した汚泥に酢酸を投入した場合と同等であったが、リン放出および摂取速度はいずれも著しく低い値を示した。また、一方、A-PAO が優占種の汚泥に酢酸を投入した場合も、低いながら有機物摂取とそれに伴うリン放出および摂取が行なわれた。以上のことから、図 3 に示すように CAp は酢酸のみを摂取でき、一方で A-PAO はペプトンを好んで摂取するが、酢酸も摂取が可能であるのではないかと考えた。

図 4 に、ペプトン単一基質培養から酢酸とペプトンの混合基質培養に代えた時の C_{CAp} と C_{A-PAO} およびリン除去量の経日変化を示した。ペプトン単一基質培養時でも、 C_{CAp} が確認できることから、ペプトンを何らかの形で C_{CAp} が摂取していることが示唆され、ペプトンの発酵物質が利用してされているのではないかと考えられる。

また CAp 優占化時、A-PAO 優占化時および CAp

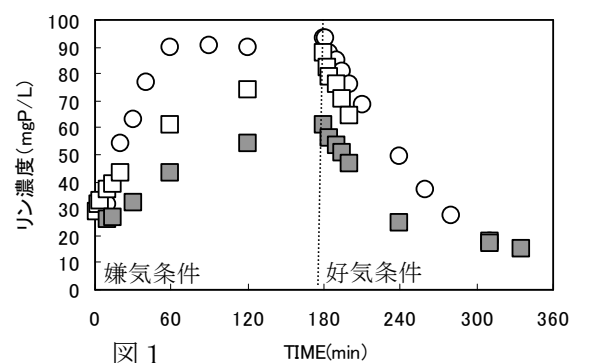


図 1

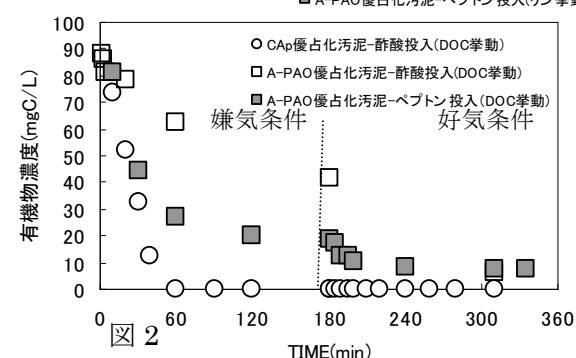


図 2

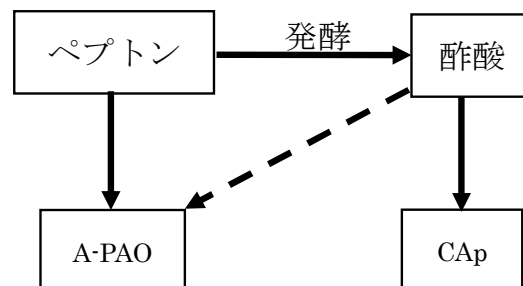


図 3

と A-PAO 拮抗時 (図 4 ★印日) の汚泥の 1 サイクル中リン濃度経時変化を比較した図 5 から、 C_{CAp} と C_{A-PAO} が遷移することによって、異なるリン除去挙動が観察されること、 CAp が優占化している時期のほうがリン除去量高いことが示された。

これらのことから、 CAp と A-PAO の能力には明らかな違いがあることが示唆された。

3-2 亜硝酸阻害実験の結果

図 6 は、亜硝酸比濃度とそれに対するリン摂取活性比を示している。ペプトンで培養した汚泥 (A-PAO が優占種) は回分基質に酢酸またペプトンを用いた両系ともに亜硝酸阻害がほとんど見られなかった。このことにより、A-PAO は亜硝酸に対する感受性がほとんどないことが示された。

一方で、酢酸で培養した汚泥 (CAp が優占種) は亜硝酸比濃度が 2.0mgN/gVSS 程度ではほとんどリンを摂取しなくなった。したがって、 CAp は亜硝酸に対する感受性が A-PAO に比べてとても大きいことが示された。

また、混合基質で培養した汚泥は経日的に CAp と A-PAO のコピー数が遷移していることが図 4 から示されている。1 細胞当たりに 16SrRNA 遺伝子数は明らかでないので、ここでは単純に CAp 割合を式 2 のようにコピー数の比で表し、その結果を合わせて亜硝酸阻害実験結果 (図 6) に示した。コピー数の比として CAp が 97%・32%・28%割合で存在する汚泥に酢酸を投入した系では、酢酸で培養した汚泥 (CAp が優占種) の亜硝酸に対する感受性と同一ような値を示した。しかし、混合基質培養汚泥には酢酸培養汚泥よりも A-PAO が多く存在し、A-PAO も酢酸を摂取することによって、これらの結果に A-PAO の亜硝酸の感受性も含まれることが考えられるが、この場合、 CAp の酢酸摂取速度が A-PAO よりも 3 倍近く大きいので、ほとんどの酢酸を CAp が摂取したことにより、A-PAO の影響が現れなかったのではないかと考えられる。

次に、コピー数の比として CAp が 97%・32%・28%割合で存在する汚泥にペプトンを投入した系では、 CAp がペプトンを摂取できないことから、ペプトンで培養した汚泥 (A-PAO が優占種) の亜硝酸に対する感受性と同一ような値を示すと推察されたが、コピー数の比で CAp 割合の高い全ての系においても若干の

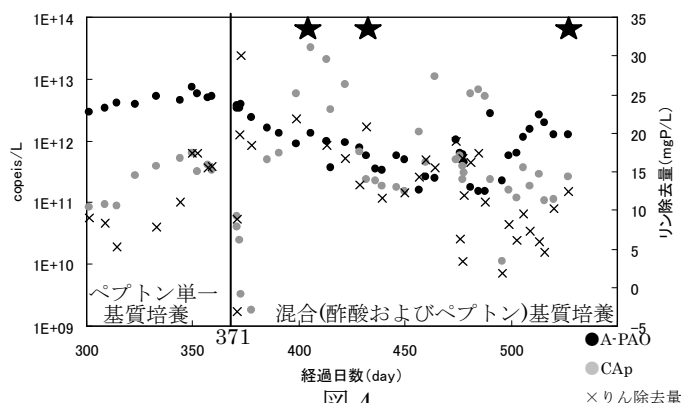


図 4

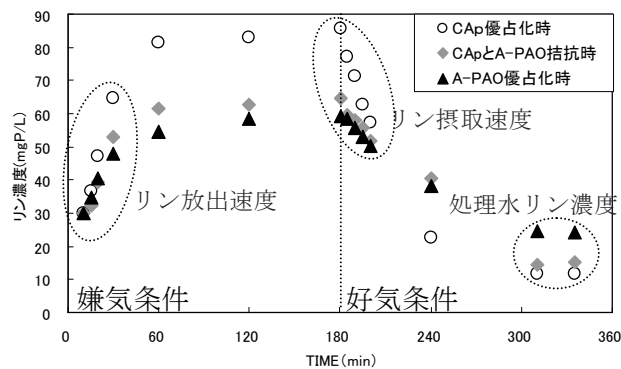


図 5

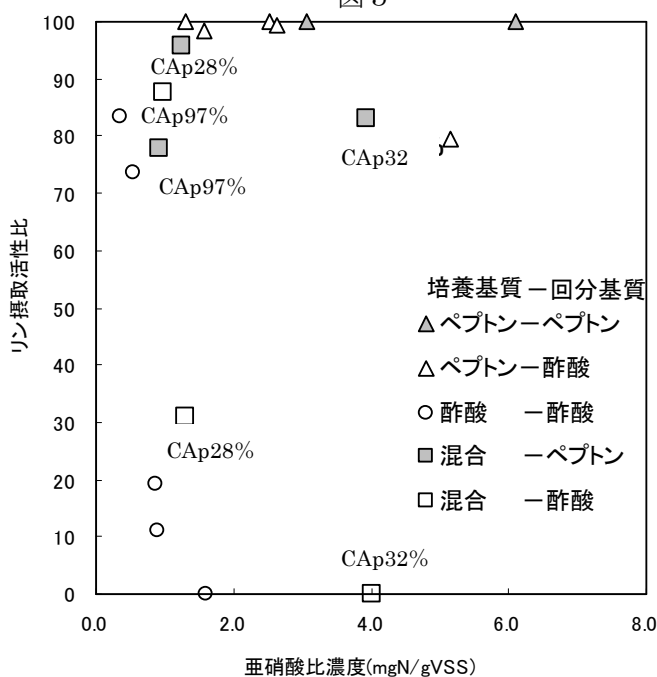


図 6

$$\text{汚泥中の } C_{CAp} \text{ 割合}(\%) = \frac{C_{CAp}}{C_{CAp} + C_{A-PAO}} \times 100 (\%)$$

…式 2

亜硝酸阻害が見られた。これは、前述したように、ペプトンが何らかの形で CAp に摂取されていることにより、CAp の感受性も含まれた結果を示しているのではないかと考えられる。

また、亜硝酸阻害の原因は呼吸阻害であるといわれており、PAOs が遊離型酸素の変わりに利用効率の悪い結合型酸素（亜硝酸）を利用することにより PAOs の好氣的代謝を阻害する。

図 7 は、酢酸添加系とペプトン添加系別に亜硝酸添加比濃度に対する亜硝酸減少速度を示している。両系も亜硝酸比濃度が増えるに従い、亜硝酸減少速度が増加しているが、これは亜硝酸の飽和度の影響であると考えられる。しかし、図中の亜硝酸比濃度が大きい箇所では酢酸添加系のほうが亜硝酸減少速度に高い値を示している。このことから、酢酸を優先的に利用する CAp が亜硝酸を多く利用し、好氣的代謝に対し阻害を受けやすいことが示唆された。

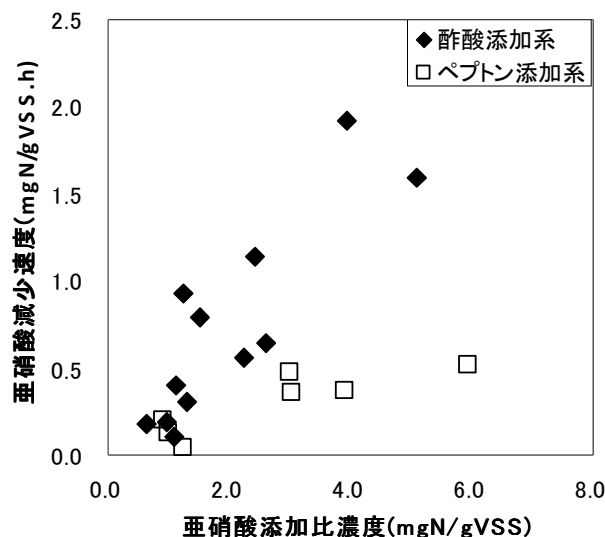


図 7

4. まとめ

酢酸、ペプトンおよびそれらの混合基質で培養した汚泥中の PAOs の能力（有機物摂取速度、リン放出速度およびリン摂取速度）と亜硝酸阻害耐性を調べることで、CAp と A-PAO の能力の違いを得た。これらを検証したところ、CAp と A-PAO の特徴の相違は CAp が酢酸のみを、A-PAO は酢酸とペプトンを両方利用できること、また、ペプトンが何らかの形で CAp に利用されること、A-PAO が優占化している期間よりも CAp が優占化している期間のほうがリン除去量を大きい値を示すことが示唆された。さらに、CAp が優占化している汚泥は亜硝酸に対する感受性が高く、A-PAO が優占化している汚泥は亜硝酸に対する感受性がほとんど見られなかった。また、酢酸を優先的に利用した CAp による亜硝酸減少速度がペプトン添加系汚泥のそれより高いことから、CAp は亜硝酸阻害を受けやすく、A-PAO は受けにくい、もしくは受けないのではないかと考える。

今後、CAp と A-PAO それぞれに対しての亜硝酸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 RT-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。

参考文献

- 1) 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.
- 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) Saito et.al (2007) WEF Nutrients Removal
- 4) 坪井ら (2006) 第 34 回土木学会関東支部技術研究発表会
- 5) 坪井ら (2007) 第 35 回土木学会関東支部技術研究発表会
- 6) Okunuki ら (2007) Microbes Environ, 22 (2), 106-115
- 7) Fukushima ら (2007) Microbes Environ, 22 (4), 346-354