

(32) 亜硝酸を電子受容体とするリン除去汚泥の代謝能力と細菌群集構造

Metabolism and Microbial Community of the Phosphorus
Removing Sludge Using Nitrite as Electron Acceptor

庄司 仁¹, 佐藤弘泰², 味埜 俊²

Tadashi SHOJI¹, Hiroyasu SATOH², Takashi MINO²

ABSTRACT; The effect of nitrite as electron acceptor was examined in a sequence batch reactor (SBR) for biological phosphorus removal. Experiments were carried out using a lab-scale SBR treating a municipal wastewater. The reactor had anaerobic phase followed by anoxic phase. To make anoxic phase, nitrate and nitrite were added. The phosphate uptake rate under both aerobic and anoxic conditions were measured by batch tests. Moreover, microbial communities were also analyzed using polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) assay. The following results were obtained from the batch test: 1) the sludge cultivated with nitrite could readily utilize oxygen as well as nitrite, 2) it could utilize nitrate after one hour adaptation, and 3) it could utilize nitrite to take up phosphate with same efficiency as nitrate or 40 % lower than oxygen. Furthermore, the DGGE image showed that a few bands appeared or disappeared when the operational condition changed. One possibility is that the changing bands were derived from denitrifying polyphosphate accumulating organisms (PAOs) either with nitrate or nitrite. Further research on these bands would clarify the behavior of the microbial community of PAOs.

KEYWORDS; Biological phosphorus removal, electron acceptor, microbial community analysis, nitrite, polyphosphate-accumulating organisms (PAOs)

1 はじめに

生物学的リン除去は、ポリリン酸蓄積細菌 (PAOs) の性質を利用している。PAOsは従属栄養細菌の一種であるが、嫌気状態 (ここでは分子状酸素および硝酸・亜硝酸性窒素の存在しない状態を指す) と好気状態を繰り返すことによって、細胞内にポリリン酸を蓄積する。この性質を活用するにあたって問題となるのは、窒素除去を担う脱窒細菌との競合である。なぜなら、脱窒細菌は硝酸性・亜硝酸性窒素を電子受容体として利用する従属栄養細菌であり、炭素源としての有機物を必要とする。したがって、窒素とリンに対して十分な量の有機物負荷がない限り、生物学的リン除去と窒素除去 (脱窒) とはトレードオフの関係にある。

このような問題を踏まえて、PAOsの脱窒能力に注目が集まっている。1980年代の後半に、硝酸を主要な電子受容体として与えた系においてPAOsを集積できることが報告された¹⁾。この結果は、酸素だけを利用するPAOs (好気性PAOs) と、酸素と硝酸を利用するPAOs (脱窒性PAOs) とを分離するという考え方で

¹ 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (Dept. of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) (現職: 独立行政法人土木研究所)

² 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 (Inst. of Environmental Studies, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

説明された²⁾。脱窒性 PAOs は、摂取した有機物を脱窒とリン除去に併用するため、限られた有機物を効率良く窒素・リン除去に活用できる。そのため、脱窒性 PAOs を選択的に集積する処理方式が提案されており、実際に高度な処理性能が確認されている³⁾。

本研究では、有機物のさらなる効率的な活用のために、亜硝酸性窒素を電子受容体とした生物学的リン除去に注目する。これまでに亜硝酸性窒素を経由した窒素除去の研究は行われているが⁴⁾、リン除去と組み合わせられた例はない。しかしながら、最近になって、脱窒性 PAOs の一部は亜硝酸も利用できるという報告がなされている^{5),6),7)}。特に筆者らは、亜硝酸を一時的に与えるだけでなく、主要な電子受容体として長期的に与えた系でも、脱窒性 PAOs に特有の代謝（嫌気的なリン放出と、脱窒をとまなうリン摂取）を発現させている⁸⁾。このような汚泥を対象として、代謝能力や細菌群集に関する検討を行うことが本研究の目的である。

まず、亜硝酸を電子受容体として利用するリン摂取反応の速度を測定して、電子受容体や基質の影響を検討する。また電子受容体の利用効率に関して、酸素・硝酸・亜硝酸での比較を行う。一般に、酸化的リン酸化での ATP 生成効率（生成 ATP と酸化 NADH の比）は、電子受容体の種類に依存する⁹⁾。PAOs に関して、硝酸を利用する場合には、酸素の 60% 程度に生成効率が低下するという報告例もある¹⁰⁾。この数字が低いことは、増殖収率の低下、すなわち余剰汚泥発生量の減少という利点に結びつく一方で、有機物（NADH の供給源）の効率的な活用という本来の目的に反することになる。そこで、適当な条件を設定したリン摂取活性試験の結果から、亜硝酸で馴致したリン除去汚泥の代謝特性を評価する。

次に、分子生物学的手法を用いて細菌群集構造を解析する。これまでの多くの研究では、酢酸を与えた嫌気好気法の汚泥を対象にして、分子生物学的手法から *Proteobacteria* の β サブクラスである *Rhodocyclus* 属に近縁な細菌群を PAOs 候補として検出している¹¹⁾。しかしこの手法だけでは、実下水を処理する系や脱窒性 PAOs を含む系についての知見が得られない可能性もある。脱窒性 PAOs に関しては、分子生物学的手法で *Rhodocyclus* 属に近縁な細菌群が検出されたという 2 つの報告例^{12),13)}、工夫された培養法により *Proteobacteria* の γ サブクラスに属する細菌が単離された例¹⁴⁾ などがあるものの、いずれも実下水を与えた系ではない。そこで本研究では、実下水を与えた系の汚泥に分子生物学的手法を適用して、電子受容体が細菌群集構造に与える影響を検討する。具体的には、酸素を利用してポリリン酸を蓄積させる条件（嫌気好気法＝AO 法）で馴致した汚泥に対して、酸素の代わりに亜硝酸を利用する条件（亜硝酸投与・嫌気無酸素法＝A2 法）、同じく硝酸を利用する条件（硝酸投与・嫌気無酸素法）へと運転方式を変化させて、群集構造の変化を PCR-DGGE 法で確認する。

2 実験方法

2.1 リアクターの運転

汚泥の馴致には、実験室に設置した有効容量 6 ℓ の回分式装置を用いた（Fig.1 参照）。まず、サイクル開始から 10 分間で、基質である実下水（最初沈殿池越流水）が 3 ℓ 供給される。そして流入の 10 分を含む冒頭の 120 分間は、嫌気状態で保たれる。次にサイクル開始 120 分～121 分の 1 分間では、必要に応じて硝酸/亜硝酸（それぞれカリウム塩）の濃厚溶液が約 20 ml 添加される。これは装置内で 18 $\text{mgNO}_3\text{-N}/\ell$ 、30 $\text{mgNO}_2\text{-N}/\ell$ となる量である。以降の 190 分間は無酸素状態として保持される。その後、沈降性を向上させるための 5 分間の曝気を経て、30 分間の沈殿工程、15 分間の排出工程と続いて 6 時間サイクルが完了する。なお余剰汚泥の引き抜き（約 400 ml ）は、サイクルごとではなく、1 日に 1 回の頻度で無酸素状態の終盤に行った。このような条件設定により、水理学的滞留時間は 12 時間、汚泥滞留時間は 12～14 日となった。また、1N 硫酸の添加により pH を 7.0～7.2 の範囲に制御したこと、装置を 20℃前後に保たれた室内に設置したことを付記しておく。

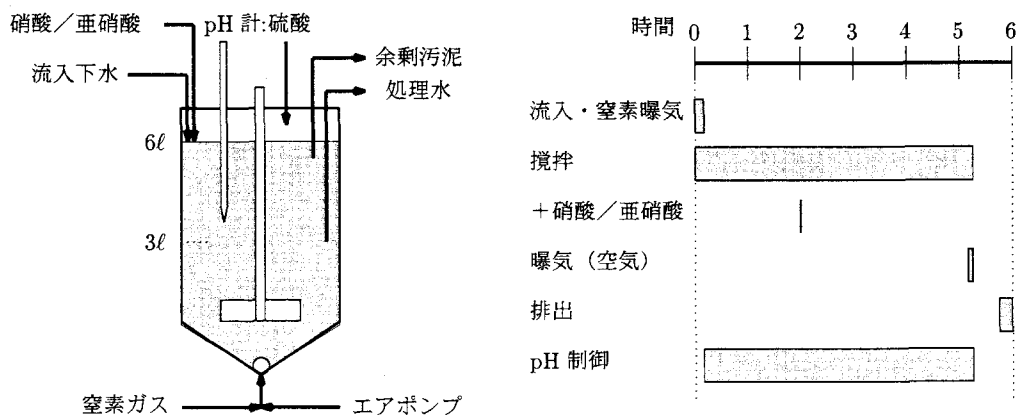


Fig. 1: 実験装置と制御プログラム

この装置では以前から PAOs の馴致を行っていたが、本研究を開始する準備として嫌気好気法で3ヶ月維持した。この間、硝化がほとんど起きていなかったため、汚泥は硝酸にも亜硝酸にも曝されなかった。つまり本研究の種汚泥は、厳密な嫌気好気法で維持された汚泥であった。研究対象の期間では、まず亜硝酸を与えて3ヶ月、その後、硝酸に切り替えて3ヶ月運転した。運転期間中は、1 サイクルの水質モニタリングで脱窒性 PAOs の代謝（嫌気的なリン放出と、脱窒をともなうリン摂取）を確認するとともに、汚泥のリン含有率をほぼ週一回の頻度で測定した。また、後述する群集解析用のサンプルも同時に採取した。

2.2 リン摂取活性試験

さまざまな条件でのリン摂取活性や効率を検討するために、嫌気状態で基質を十分に摂取させた汚泥に対して、酸素・硝酸・亜硝酸を与えた条件でのリン摂取速度を測定した。それぞれの馴致条件において、SRT の3倍以上である50日以上が経過した後に、余剰汚泥を利用した回分実験として、以下に示す手順に従って実験を行った。なお、リン摂取活性試験の場合も、汚泥を馴致した時と同様の pH (7.2 以下) および温度条件 (室温 20 °C) を設定した。

- i. 無酸素状態の終盤に汚泥混合液を採取する。遠心分離 (3500rpm, 1 分程度) して上澄みを捨てる。
- ii. 無機塩類およびアンモニアなどを添加した希釈液⁸⁾で、500~1000mgMLSS/ℓ となるように希釈する。すぐに窒素ガスを通気して溶存酸素を排除する。
- iii. 十分な量 (装置内で約 25mgC/ℓ) の基質を添加する。異なる電子受容体の条件を比較する際には、与える基質を酢酸に統一した。異なる基質の影響を比較する際には、酢酸の他にプロピオン酸・グルコース・グルタミン酸・ペプトンを与えた。
- iv. 窒素ガスの通気を続けて、嫌気状態を維持する (2 時間)。嫌気状態での実験が終わったら、遠心分離して上澄みを捨ててから、同程度の濃度に再希釈する。
- v. リン酸を装置内で約 25~30mgP/ℓ になるように加えて、好気状態の実験ならば曝気を開始する。また、無酸素状態の実験ならば硝酸や亜硝酸の添加と窒素の通気を行う。
- vi. 数時間にわたって条件を維持して、適宜サンプリングを行い、リン酸の濃度変化を見る。好気状態では溶存酸素計を用いて酸素利用速度を、無酸素状態では硝酸や亜硝酸の利用速度 (脱窒速度) を測定する。

2.3 化学分析

いずれの分析も、下水試験方法を参照した¹⁵⁾。汚泥のリン含有率は、超音波分散（50W、2分程度）の後、ペルオキソ二硫酸カリウム分解法とモリブデン青-アスコルビン酸法による全リンの測定、および遠心分離法によるMLVSSの測定を組み合わせで行った。溶存性のイオン（硝酸、亜硝酸、リン酸）は、イオンクロマトグラフ（DX-AQ, DIONEX, USA）に陰イオン分析用カラム（AS-12A, DIONEX, USA）を取り付けて分析した。CODの測定には、市販のキット（HACH, USA）と専用の反応装置・分光光度計を用いた。これらの測定は、孔系0.4 μ mのガラス繊維ろ紙（GB-140, アドバンテック）でろ過をしてから行った。

2.4 群集解析

DNAの抽出 DNA抽出キット（FastDNA SPIN Kit For Soil, Q-BIOgene, USA）を用いた。この方法は、いわゆる物理的破碎に分類されるもので、ビーズによって微生物の細胞膜を破壊した後に、タンパク質などの不純物を取り除いて核酸を精製する仕組みである。抽出方法の詳細はキットのマニュアルに従った。

PCR反応 小貫らの方法¹⁶⁾に従った。核酸濃度を一定に調整しておいたDNA抽出液と、必要な試薬類（10X PCR Buffer, dNTP, Taq Polymerase, いずれもApplied Biosystems, USA）を混合して反応原液とした。これをサーマルサイクラー（T3, Biometra, Germany）に入れて、30サイクルの変性-会合-伸長を繰り返した。使用したプライマーセットは、341f（CCTACgggAggCagCag）にGCクランプを付加したものと、518r（ATTACCGcgCTgCTgg）である¹⁷⁾。このセットは16S rRNA遺伝子のV3領域を標的としており、プライマー部分を除いて160bp程度のDNAが特異的に増幅される。

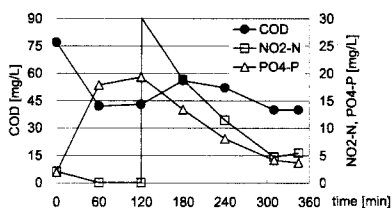
DGGE 主にMuyzerらの方法¹⁷⁾に従い、Dcodeシステム（Bio-Rad, USA）によって濃度勾配を持つゲルの作成および電気泳動を行った。PCR産物20 μ lとローディングバッファ（Bromophenol blue 0.05g, Xylene cyanol 0.05g, TAE buffer 10ml）4 μ lの混合物を、作成したポリアクリルアミドゲルに滴下して、電圧130V・温度60度・5時間で電気泳動に供した。泳動後のゲルはVistra Green（Amersham, USA）で15分間染色してから、蛍光画像解析装置（FluorImager595, Amersham, USA）で画像化した。ゲル上のバンドを回収・精製する際には、カッターで目的のバンド（1~2mm四方）を切り出し、滅菌した超純水50 μ lを加えて凍結融解を2回くりかえした。

塩基配列の解析 精製されたDNA（DGGEのバンド）は、シーケンシング反応を経て、塩基配列を解読した。シーケンシング反応にはThermoSequenase primer cycle sequencing kitとddNTP Set 5mM Solution（Amersham, USA）を用いて、日立計測機器サービス社のマニュアルに従って行った。塩基配列の解読には、DNA Sequencer SQ5500（日立製作所）を同社のプロトコルに準じて使用した。解読した塩基配列については、相同性検索プログラムBLAST（WU-BLAST2, DNA data bank of Japan, <http://www.blast.genome.ad.jp>）によって、近縁な既知配列を検索した。

3 結果と考察

3.1 リアクターの処理性能

添加した硝酸・亜硝酸を脱窒するのに適当な量の有機物が含まれる時には、典型的な脱窒性PAOsの代謝パターンを示した（Fig.2）。しかしながら、合流式下水道のため流入水質が不安定だったので、処理水中に



0 分の値は、その回の流入水と、前回の残存水の測定結果にもとづく計算値（加重平均）である。

Fig. 2: 亜硝酸添加時の水質変化例（45 日目）

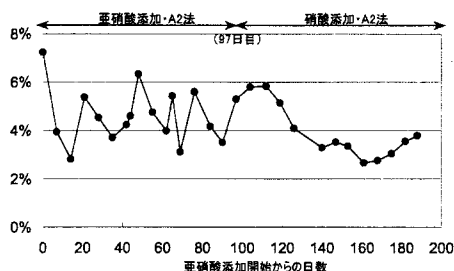


Fig. 3: リン含有率の推移

リン酸が残存するケースも見られた。たとえば有機物量が少ない場合には、脱窒が十分に進まないため、嫌気状態に硝酸・亜硝酸が残存してしまい、PAOs のリン放出が阻害される。一方、有機物が過剰な場合には、無酸素状態で硝酸・亜硝酸が枯渇してしまい、PAOs のリン摂取が不可能となる。今回のような一定量の硝酸・亜硝酸を添加する運転条件では、汚泥の性状というよりも流入水質の影響を反映してしまうので、PAOs の指標として処理水質を用いることは必ずしも適当でない。そこで、別の指標である汚泥のリン含有率を見ると、一般にリン除去能力を持つ汚泥ならば2~3%以上と言われるが、亜硝酸添加時には4~6%、硝酸添加時には3~4%となっていた（Fig.3）。したがって、実験期間を通して、基本的にリン除去能力を持つ汚泥として維持できたものと想定できる。なお硝酸添加時にリン含有率が低下しているのは、電子受容体を変更した影響というよりも、降雨と流入設備の機械的トラブルとの影響で、流入水中の有機物濃度が継続的に低かったためと考えられる。

3.2 基質の種類とリン摂取活性

亜硝酸で馴致されたリン除去汚泥の特徴として、まずは基質の種類とリン摂取活性との関係について検討した。5種類の基質（酢酸、プロピオン酸、グルコース、グルタミン酸、ペプトン）を与えて、嫌気-好気および嫌気-無酸素（亜硝酸）状態で回分実験を行い、好気状態および無酸素状態における累積リン摂取量を Fig.4, Fig.5 に示した。これらの基質は、いずれも PAOs の馴致に用いられたことが報告されているものだが、実下水で馴致した本研究の汚泥が示した応答は、それぞれ異なっていた。

まず酢酸とプロピオン酸は、どちらの電子受容体でも高いリン摂取活性を示した。つまり「基質=実下水、電子受容体=亜硝酸」という条件で馴致したリン除去汚泥も、これまで報告されている多くの PAOs と同様に、酢酸やプロピオン酸を利用できる。一方、グルコースとグルタミン酸およびペプトンの場合には、いずれもリン摂取活性が低かったが、亜硝酸を電子受容体とする条件で相違が見られた。グルタミン酸やペプトンを与えた時には少ないながらもリンを摂取したが、グルコースを与えた時にはまったく摂取しなかった。このような特徴を考察するには、馴致に用いた実下水に含まれる各成分の評価が必要である。本研究では一定量（全 COD の 2 割程度）の酢酸が含まれていることを確認したが、他の物質の濃度は測定していない。それでも、電子受容体と基質との間に、何らかの相互関係が存在することを示唆する結果が得られたと言える。

3.3 電子受容体の種類とリン摂取活性

次に電子受容体の種類とリン摂取活性について検討した。前節の結果から、基質が律速とならないように、すべて酢酸を与えることで統一して、さらに硝酸馴致汚泥についての実験も行い、Fig.6 に整理した。

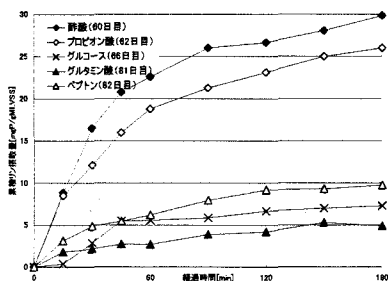


Fig. 4: 基質の種類とリン摂取活性
(電子受容体: 酸素)

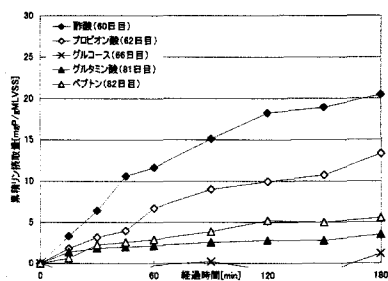


Fig. 5: 基質の種類とリン摂取活性
(電子受容体: 亜硝酸)

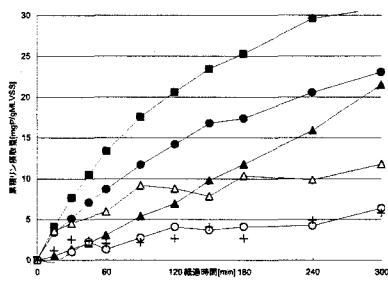


Fig. 6: 電子受容体の種類とリン摂取活性
(基質: 酢酸)

- 亜硝酸馴致汚泥 (95 日目) + 酸素
- 亜硝酸馴致汚泥 (79 日目) + 亜硝酸
- ▲ 亜硝酸馴致汚泥 (83 日目) + 硝酸
- 硝酸馴致汚泥 (188 日目) + 亜硝酸
- △ 硝酸馴致汚泥 (170 日目) + 硝酸
- + 硝酸馴致汚泥 (191 日目) + 亜硝酸, 基質投与なし

亜硝酸馴致汚泥に関しては、酸素・硝酸・亜硝酸のいずれも利用できることがわかるが、リン摂取の挙動は異なっている。まず馴致時にほとんど触れていない酸素には、順応する時間をまったく必要としていない。亜硝酸を与えた実験でも、リアクターの処理性能から予想されたとおりにリン摂取が観察された。グラフの形状は酸素を与えたときと似ているが、速度はやや劣る。以上より、亜硝酸で馴致された脱窒性 PAOs は、その大部分が酸素も亜硝酸も利用可能であると確認された。これに対して硝酸を与えた場合には、実験開始から 1 時間ほど、基質を与えていない実験、すなわち PAOs のはたらき以外のリン減少と同程度の速度に過ぎない。この順応時間を過ぎた後に、ゆるやかなリン摂取が観察された。約 1 時間という順応時間のオーダーからは、たとえば硝酸を還元する酵素の誘導に時間がかかる、といった原因が推定される。

硝酸馴致汚泥に関しては、前述のとおり、流入水の不具合のため概してリン除去活性が低かった。それでも、基質を投与しなかった実験での速度と比較すると、硝酸を与えた時には一定のリン摂取速度を持つものの、亜硝酸を用いたリン摂取能力は失われたことがわかる。亜硝酸の還元反応は硝酸の還元反応に含まれるため、この原因を酵素誘導では説明できない。むしろ亜硝酸を優先的に利用する PAOs や、亜硝酸の毒性に耐えられる PAOs が死滅するといったような、細菌群集の変化に起因するものと考えられる。

3.4 電子受容体の利用効率

Fig.6 の結果と溶存酸素および硝酸・亜硝酸の測定から、電子受容体あたりのリン摂取量として、電子受容体の利用効率をまとめる (Table1)。亜硝酸馴致汚泥については、硝酸と亜硝酸がほぼ同レベルの利用効率を示して、酸素の 50~60% となっている。この数値は、硝酸と酸素との効率を比較した既存の知見 (脱窒細菌

Table 1: リン除去汚泥における電子受容体の利用効率

馴致条件 電子受容体の種類		亜硝酸馴致			硝酸馴致		
		酸素	亜硝酸	硝酸	亜硝酸	硝酸	亜硝酸(*)
最大リン摂取速度	[mgP/gMLVSS/h]	13.3	8.5	4.4	2.1	5.4	2.1
最大酸素利用速度	[mgO ₂ /gMLVSS/h]	6.8	—	—	—	—	—
最大脱窒速度	[mgN/gMLVSS/h]	—	11.7	3.3	7.6	4.2	2.0
電子受容体利用効率	[mol-P/mol-e ⁻]	0.22	0.11	0.12	0.04	0.12	—

(*) 基質を投与せずに嫌気状態に曝してから亜硝酸を投与したもの。

の純菌で60%⁹⁾、PAOsで57%¹⁰⁾)と一致するものである。一方、これまで知られていなかった亜硝酸の利用効率は、硝酸と同じ程度に低いだけだったととらえられる。つまり毒性が高いために利用効率が極度に低いことはなく、硝酸と同等にリン摂取の電子受容体とみなすことができる。

次に硝酸馴致汚泥については、硝酸の利用効率が亜硝酸馴致汚泥における硝酸・亜硝酸の利用効率、すなわち先に述べた既存の知見と同程度であった。このことから、脱窒性PAOsを活用した処理方式が実用性を持つ以上、亜硝酸経由の脱窒とリン除去を組み合わせる処理方式でも、電子受容体の利用効率に問題がないことがわかる。なお、数字としては亜硝酸を利用したリン酸摂取効率が低下したように見えるが、そもそもこの条件ではPAOsによるリン摂取がほとんど起きていないので、この結果だけで結論付けることはできない。

3.5 細菌群集構造の推移

DGGEの結果をFig.7に示した。また、特徴的な挙動を示すバンドのうち塩基配列が解読できたものについては、Table2にその情報を整理した。注目すべき点は、嫌気好気法（実験開始時点）から亜硝酸添加・嫌気無酸素法への変更、さらに硝酸添加・嫌気無酸素法への変更に際して、消長を見せるバンドの有無である。

最初の条件変更で強度を下げるものとして、上から順にX, 41, Yなどがある。これらは亜硝酸による阻害を受けるか、もしくは酸素を必要とする好気的な細菌に由来すると考えられる。逆に強度を上げるのは、84, 08, 0eなどがある。これらは、亜硝酸添加・嫌気無酸素法という運転条件を好む細菌に由来するだろう。同様に、強度を上げてても下げてもない88, 89, 83などは、どちらの運転条件にも適応可能な細菌に由来するだろう。次に亜硝酸から硝酸への条件変更では、先に挙げたバンドのいくつかが特徴的な挙動を示している。亜硝酸の添加を機に強度を上げた3種類のバンドのうち、84と0eが消失してしまうのに対して、08は変化なく維持された。そして亜硝酸の条件で強度を下げたものから、41は強度を回復した。

以上の結果から、PAOsという細菌群が実際には多様な種類で構成されており、それゆえに電子受容体の利用能力も多様であるという仮説を立てられる。リン摂取活性の実験からは、これまでに知られていた硝酸の利用能力による分類（好気性PAOsと脱窒性PAOs）に加えて、亜硝酸利用能力もしくは亜硝酸への耐性による分類の可能性が示唆された。加えて、高い酢酸利用能力を持つにもかかわらず（Fig.4, Fig.5）、検出された遺伝子配列に*Rhodocyclus*近縁種を含まないなど、嫌気好気法を対象とする既存の報告と重ならないものばかりが検出されている。もちろん現段階では、嫌気無酸素法で強度を上げた84, 08, 0eなどのバンドがPAOsに由来するという確認作業を行っていないので、亜硝酸利用能力を持つPAOsの同定という結論には至らない。しかしながら、DGGEで明らかになった電子受容体の条件にともなう細菌群集の変化は、亜硝酸や硝酸など、酸素以外の利用能力を持つPAOsの解析に際して、対応した条件による馴致の必要性を示唆している。そのような意味で、本研究で検出された遺伝子配列についても、新たなPAOs候補として注目したい。近年、FISH法などによる定量的評価やポリリン酸蓄積能力の確認手法が確立されつつあるので、そのような方向を視野に入れた今後の研究によって、PAOsの全体像が明らかになるものと期待される。

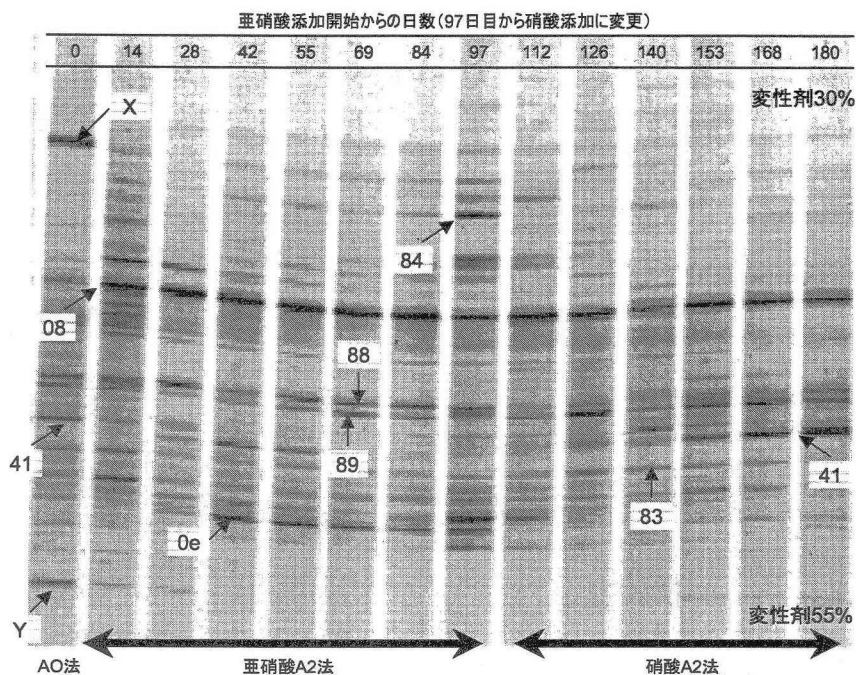


Fig. 7: 16S rRNA 遺伝子 V3 領域を標的とした PCR-DGGE の結果

Table 2: 解読した塩基配列にもとづく近縁種の検索

名前	Accession 番号	最近縁種 *	類似度	系統的な位置
08	AB163897	<i>Aquaspirillum</i> sp.	100%	β Proteobacteria
41	AB163901	<i>Thiothrix</i> sp.	100%	γ Proteobacteria
83	AB163902	<i>Rhodoferrax</i> sp.	96%	β Proteobacteria
84	AB163907	<i>Chryseobacterium</i> sp.	96%	CFB グループ
88	AB163908	<i>Variovorax</i> sp.	91%	β Proteobacteria
89	AB163909	<i>Variovorax</i> sp.	96%	β Proteobacteria
0e	AB163912	<i>Thermomonas</i> sp.	97%	γ Proteobacteria

(*) Uncultured とされるものを除く。すなわち、属名まで登録されている中で最近縁のもの。

4 結論

本研究では、有機物の効率的な活用のために、亜硝酸性窒素を電子受容体とした生物学的リン除去について検討を行った。まず、亜硝酸を電子受容体として利用するリン摂取反応において、電子受容体や基質の影響に関する次のような結論が得られた。

- 亜硝酸で馴致したリン除去汚泥に対して酢酸やプロピオン酸を与えると、酸素・亜硝酸のどちらを電子受容体としても、高いリン摂取活性を示した。
- グルコースとペプトンおよびグルタミン酸の場合には、ともにリン摂取活性が低かった。ただし亜硝酸

を電子受容体とする条件で異なる傾向が観察された。すなわちアミノ酸系の基質を与えた時には一応リンを摂取したが、グルコースを与えた時には摂取しなかった。

- 電子受容体の影響に関しては、馴致時にほとんど触れていない酸素に対して、順応する時間をまったく必要としていない。亜硝酸を与えても、リアクターの処理性能と同様にリン摂取が観察された。一方、硝酸に対しては1時間程度の順応時間を必要とした。
- 硝酸馴致汚泥に関しては、硝酸を与えた時には一定のリン摂取速度を持つものの、亜硝酸を用いたリン摂取能力は失われた。
- 電子受容体あたりのリン摂取量として利用効率をまとめると、馴致条件によらず硝酸と亜硝酸がほぼ同レベルの利用効率を示して、酸素の50～60%になった。つまり、亜硝酸も硝酸と同等にリン摂取の電子受容体となることが示唆された。

次に、分子生物学的手法を用いて、電子受容体が細菌群集構造に与える影響を検討した。電子受容体として酸素だけが利用できる条件（嫌気好気法＝AO法）から、亜硝酸だけが利用できる条件（亜硝酸投与・嫌気無酸素法＝A2法）、硝酸だけが利用できる条件（硝酸投与・嫌気無酸素法）へと変化した際の群集構造について次のような結論が得られた。

- 利用できる電子受容体を酸素から亜硝酸へ変えると、3種類のバンドが強度を下げた。このうちの1つは、塩基配列から見て γ Proteobacteria の *Thiothrix* 属に近縁なものであった。これらは亜硝酸による阻害を受けるか、酸素を必要とする好気的な細菌に由来すると考えられる。
- 強度を上げるものは3つ観察され、それぞれ β Proteobacteria の *Aquaspirillum* 属、 γ Proteobacteria の *Thermomonas* 属、CFB グループの *Chryseobacterium* 属に近縁であった。これらは、亜硝酸添加・嫌気無酸素法に適応した細菌に由来すると考えられる。
- 亜硝酸から硝酸への条件変更に際して、亜硝酸の添加を機に強度を上げた3種類のバンドのうち、*Thermomonas* 属および *Chryseobacterium* 属に近縁なものが消失する一方で、*Aquaspirillum* 属に近縁なものは維持された。亜硝酸の条件で強度を下げたものから、*Thiothrix* 属に近縁なものは強度を回復した。
- リン除去能力を持続けた汚泥でも、利用する電子受容体によって細菌群集構造に変化が見られた。したがってPAOsの全体像を明らかにするためには、嫌気好気法だけでなく、硝酸や亜硝酸を利用する系の解析も必要である。

謝辞

本研究の実施にあたり、東京都下水道局から多大な協力を得た。ここに記して、謝意を表します。

参考文献

1. Vlekke GJFM, Comeau Y, Oldham WK. 1988. Biological phosphate removal from wastewater with oxygen or nitrate in sequencing batch reactors. *Environ Technol Let* 9:791-796.
2. Kerns-Jespersen JP, Henze M. 1993. Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Res* 27:617-624.

3. Kuba T, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. 1996. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Res* **30**:1702-1710.
4. Yoo HS, Ahn KH, Lee HJ, Lee KH, Kwak YJ, Song KG. 1999. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Res* **33**:145-154.
5. Meinhold J, Arnold E, Isaacs S. 1999. Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Res* **33**:1871-1883.
6. Ahn JA, Daidou T, Tsuneda S, Hirata A. 2001. Metabolic behavior of denitrifying phosphate accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions. *J Biosci Bioeng* **92**:442-446.
7. Hu JY, Ong SL, Ng WJ, Lu F, Fan XJ. 2003. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Res* **37**:3463-3471.
8. Shoji T, Satoh H, Mino T. 2003. Biological phosphorus removal using nitrite as electron acceptor. Proceedings of ASIAN WATERQUAL 2003 (CD-ROM), Bangkok, Thailand.
9. John P, Whatley FR. 1970. Oxidative phosphorylation coupled to oxygen uptake and nitrate reduction in *Micrococcus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* **216**:342-352.
10. Kuba T, Murnleitner E, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. 1996. A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnol Bioeng* **52**:685-695.
11. Crocetti GR, Hugenholtz P, Bond PL, Schuler A, Keller J, Jenkins D, Blackall LL. 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rDNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl Environ Microbiol* **66**:1175-1182.
12. Ahn JA, Daidou T, Tsuneda S, Hirata A. 2002. Characterization of denitrifying phosphate accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Res* **36**:403-412.
13. Zeng RJ, Saunders AM, Yuan Z, Blackall LL, Keller J. 2003. Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate accumulating organisms. *Biotechnol Bioeng* **83**:140-148.
14. 浜田康治, 久場隆広, 金山拓広, 楠田哲也. 2003. 嫌気-無酸素連続回分スクリーニングによる脱窒脱リン菌単離の試み 環境工学研究論文集 **40**:53-61.
15. 日本下水道協会. 1997. 下水試験方法 1997 年度版.
16. 小貫元治, 佐藤弘泰, 味埜俊. 2000. PCR-DGGE 法による嫌気好気汚泥の微生物群集解析 環境工学研究論文集 **37**:9-16.
17. Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**:695-700.