

(61) 微生物群集解析による茶園流出水の硫黄脱窒処理プロセス評価

Assessment of Sulfur Denitrification Process for Tea Field Effluent
By Microbial Community Analysis

松崎祐子^{*}, 長谷川聖^{**}, 花木啓祐^{**}

Yuko MATSUZAKI^{*}, Kiyo HASEGAWA^{**} and Keisuke HANAKI^{**}

ABSTRACT; Sulfur utilizing autotrophic denitrification process is an effective tool for on-site nitrate treatment of agricultural wastewater. In this study, the performance of on-site sulfur denitrification plants treating tea field effluent was evaluated. In addition, the microbial community was analyzed to identify sulfur denitrifying bacteria working in the plant. PCR-DGGE method targeting V3 region of 16S rDNA suggested that some bands were derived from sulfur denitrifying bacteria. These bands were not detected from the samples collected during the period of performance deterioration. Since sulfur denitrification was recovered by re-incubation, some environmental factors may affect the growth of sulfur denitrifying bacteria in the field plant. Water quality and oxygen condition could be main factors affecting treatment performance.

KEYWORDS; Denitrification, Sulfur, PCR-DGGE, Tea field

1. 研究背景及び目的

近年、硝酸性窒素による地下水汚染が問題となっている。地下水への窒素の供給源として、降雨など自然由来、生活排水・工場排水の土壌浸透など様々な要因があるが、現在顕在化している硝酸性窒素汚染の多くは、畜産廃棄物の土壌浸透処理や農地に施用された窒素肥料に由来すると考えられている¹⁾²⁾。汚染は先進国、途上国を問わず問題となっており、オンサイトでの処理が重要視されている³⁾。

硫黄脱窒は、そのコスト面や維持管理の容易さから、オンサイトの処理方法として有望視されている⁴⁾⁵⁾。しかし、処理性能が不安定である例も報告されており、現場への導入には課題が残されている。また、硫黄脱窒に関わる研究のほとんどが水質にのみ注目して行われているが、微生物の代謝を用いた処理プロセスの場合、その挙動と処理能力の関係を把握することで、より有用な情報が得られる。更に、オンサイトでの調査例が少なく、知見の蓄積が望まれる。

以上の流れを受け、本研究では 1)現場における硫黄脱窒の処理性能を評価する、2)硫黄脱窒反応に関わる微生物相を把握する、3)処理性能の変動と微生物相の関係を検討する、の3点を目的とした。

2. 硫黄脱窒試行現場における調査

2.1 調査地概要及び調査方法

対象調査地は静岡県内の湧水および農業用ため池で、周囲を取り巻く茶園における過剰施肥によって原水の硝酸性窒素濃度が 20mgN/L 前後、pH は 4.5 程度を示している。容量 500L の水槽を 2 系列配置し、硫黄一石灰系脱窒剤 (SC11、ニッチツ、 $S^0:CaCO_3=1:1.2$) を充填した硫黄脱窒処理装置を稼働している。宮永ら⁶⁾によると、2001 年 11 月から 2002 年 2 月までの運転期間中、中川根で最大 95.9%(平均 48.4%)、潮海寺で最

※ 東京大学大学院工学系研究科 (現職: 住友重機械工業株式会社) (Sumitomo Heavy Industries, Ltd.)

※※ 東京大学大学院工学系研究科 (Graduate school of Engineering, The University of Tokyo)

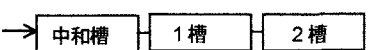
大 48.0% (平均 32.2%)の硝酸性窒素除去率を示している。また資材中の石灰により、反応槽内の pH は中性に保たれていた。しかし 2003 年に硝酸性窒素除去能力の低下が確認されたため、中川根のサイトでは、2004 年 4 月から 7 月中旬まで運転を停止し、現場で原水より数倍硝酸性窒素濃度の高い KNO_3 溶液を添加して再馴致を行った。調査期間の各サイトにおける運転条件の概要を表 1、表 2 に示した。

月に 1 度、水及び硫黄－石灰資材サンプルを各槽から採取し、水中の NO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 濃度を測定した。硫黄－石灰資材サンプルは、プライマーとして 357fGC(CgCCCgCCgCgCgCggCgggCggggCACggggggg-CCTACgggAggCagCag)、518r(ATTACCgCggCTgCTgg)を用いた PCR により真正細菌の 16SrDNA V3 領域を増幅し、増幅産物を DGGE で分析した。また主要なバンドについてはシーケンシングを行い、得られた塩基配列について相同性検索ソフト BLAST(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>)を用いた解析を行った。

表 1 運転条件の概要(中川根)

期間	2003.10.～2004.3. (Run 1)		2004.7.～ (Run 2)	
	系列 1	系列 2	系列 1	系列 2
原水	湧水			
流量	3.8m ³ /day	1.2 m ³ /day	0.31 m ³ /day	
資材充填量	2 槽計 1250 kg	2 槽計 500 kg	550 kg	550 kg
装置の形態				

表 2 運転条件の概要(潮海寺)

期間	2003.10～2004.9. (Run 1)			2004.10～ (Run 2)		
原水	ため池用水					
流量	1.5m ³ /day					
資材充填量	2 槽計 1000 kg			500 kg		
装置の形態						

2.2 水質及び微生物群集解析結果

原水中の硝酸性窒素濃度は中川根、潮海寺のいずれにおいても調査期間中、15～20mgN/L の高濃度に保たれていた。硝酸性窒素除去率の季節変化を図 1 に示す。中川根の Run 1 の平均除去率は 1 系で 1.6%、2 系で 3.7%と低くなっていた。一方、再馴致後の Run 2 では、1 系で最高 40.3% の除去率を示し、平均除去率も Run 1 に比べ 1 系で 19.2%、2 系で 11.8% と上昇した。月による除去率の変動は大きく、依然安定した処理が行われているとはいえないものの、脱窒

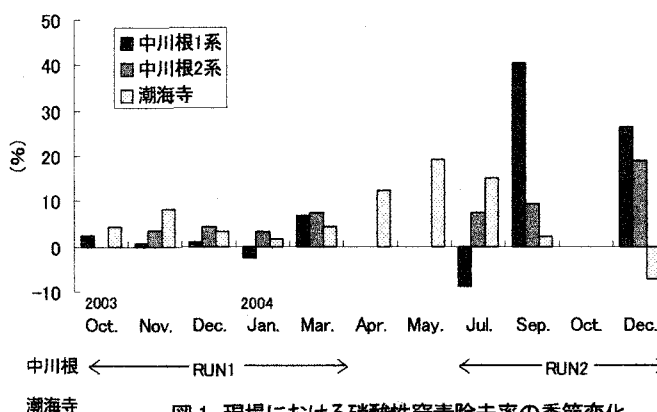


図 1 現場における硝酸性窒素除去率の季節変化

*2004 年 10 月の中川根はデータ無し

能力の回復が伺えた。潮海寺では調査期間を通して低い除去率を示した。

再馴致に伴い処理性能が変化した中川根の微生物群集構造に着目し、PCR-DGGE による解析を行った。結果を図 2 に示す。Run 1 で濃く現れていたバンドは Run 2 にはほとんど確認できなくなり、新たなバンドが現れている。馴致期間を経て微生物相が大きく変化したことが分かる。図中で印をつけたバンドについてシーケンシングを行った結果、ほとんどのバンドで最近縁の配列は Uncultured もしくは Unidentified となった。しかし Run 2 に現れたバンド F に関しては硫黄脱窒細菌 *Thiobacillus denitrificans* (AJ243144) と比較的近縁 (Similarity: 97%) であることが示され、微生物群集構造からも処理性能の回復が推察された。

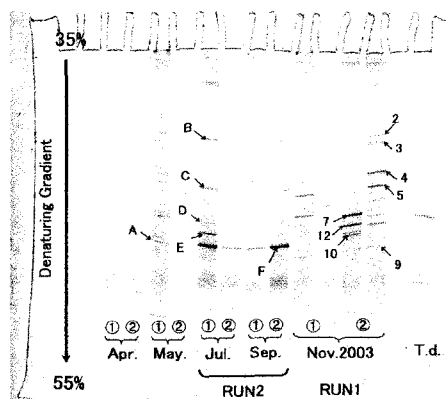


図 2 PCR-DGGE による微生物群集構造解析

* 2004 年 4 月は Run 1 終了後、5 月は馴致期間

3. 培養実験による処理能力低下要因の検討

現場における処理性能低下に与える影響因子の特定を室内バッチ実験により試みた。硫黄脱窒能力に影響する要因としては、温度⁷⁾や酸素濃度⁸⁾の他、栄養塩濃度⁹⁾や pH¹⁰⁾、アルカリ度¹¹⁾等、原水水質に由来するものが考えられる。また、不調期には硫黄脱窒細菌が存在していない可能性も考えられた。そこで、室内において①硫黄脱窒細菌の有無、②現場流入水、③酸素の影響に着目した培養実験を行い、処理性能及び微生物群集構造に与える影響を評価した。

3.1 ①: 再培養による硫黄脱窒細菌存在確認試験

(1) 実験の概要及び方法

中川根の不調期(Run 1)において、現場に硫黄脱窒細菌が存在するかどうかを、微生物群集解析により検討した。Run 1 期間に現場から採取した硫黄-石灰資材サンプルを用い、硫黄脱窒に最適な条件下で培養し、DGGE バンドパターンの変化を確認することを主目的とした。また、現場におけるバンドの特性を検討するため、硫黄酸化条件、従属栄養性脱窒条件での培養も同時に行った。

1 L 試薬瓶に硫黄-石灰資材 50 g と培地 1 L を入れ、*T. denitrificans* の生育最適温度である 30°C で静置培養を行った。硫黄脱窒条件、従属栄養性脱窒条件では試薬瓶気相部を窒素パージシ密閉することで、無酸素条件を保った。硫黄酸化条件ではエアポンプとディフューザーを用いて空気による曝気を行い好気条件とした。実験は 2 連で行い、硫黄脱窒条件、硫黄酸化条件の培地には JCM の S8 Medium を用いた。従属栄養性脱窒条件の培地には JCM の Nutrient Agar No.2 を基本としたが、Agar を添加せず、硫黄脱窒条件と同量の KNO₃ を加えた。数日毎に培地の NO₃⁻、NO₂⁻、SO₄²⁻を測定し、硫黄資材については PCR-DGGE による解析を行った。

(2) 培養に伴う水質及び微生物群集構造の変化

硫黄脱窒条件下での NO₃⁻、NO₂⁻、SO₄²⁻濃度の変化を図 3 に示す。培養期間中、NO₃⁻濃度が徐々に低下し、SO₄²⁻濃度の上昇が見られた。NO₃⁻減少に伴う SO₄²⁻生成の割合は、理論値の 1.4 倍となっており、NO₃⁻の減少は主に硫黄脱窒によるものであると推察された。硫黄酸化条件では SO₄²⁻濃度の上昇により、硫黄酸化が起きていることが確認された。また、従属栄養性脱窒条件では NO₂⁻の蓄積が見られた。

微生物群集構造解析の結果を図 4 に示す。いずれの条件下でも培養により濃くなるバンドが見られ、特に d2 は硫黄

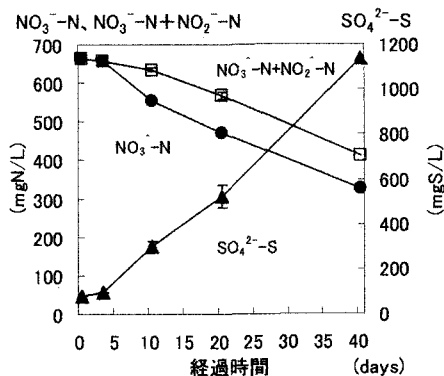


図 3 培養中の水質変化

脱窒条件での培養によってバンドが濃くなったことから、硫黄脱窒細菌であると考えられた。また、16S rRNA の全長解析により、現場で見られたバンド F と同一であることが確認されたため、処理不調期には、硫黄脱窒細菌が存在しないのではなく、何らかの要因で菌体数が減少していると推察された。

3.2 ②:現場水質がもたらす影響の評価

(1) 実験の概要及び方法

3.1 の結果より、現場には硫黄脱窒細菌が存在することが示された。ただし、現場においてその菌体数が高くなれない何らかの要因があることが考えられた。そこで、処理装置への流入水が硫黄脱窒細菌の増殖に与える影響を検討するため、現場より採取した微生物と水を用いたバッチ実験を行った。気温や酸素濃度、HRT といった他因子の影響を取り除くため、室内で 30℃、無酸素条件を保ち、バッチ的に培養することで十分な HRT を保った上で、処理性能と微生物相の変化を調査した。Run 2 期間に採取した硫黄資材 100 g に、現場における処理槽への流入水 300 mL を添加し、静置培養を行った。硫黄脱窒の最適培地を添加する系は、比較のため設定した。NO₃⁻、NO₂⁻、SO₄²⁻を測定し、NO₃⁻の値がほぼ 0 mg/N/L になったところで水を全て入れ換え、培養を継続した。また 16S rDNA V3 領域を対象とした PCR-DGGE を行い、微生物相の経時変化を解析した。

(2) 窒素除去量及び微生物群集構造の変化

NO₃⁻の濃度変化から求めた窒素除去量の平均値を現場と比較した(図 5)。中川根の系では現場流入水を用いた場合(Nf)、培地を用いた最適条件(Nm)に比べ低いものの、現場の 10 倍以上の窒素除去能力が示された。一方潮海寺の系では、最適培地を用いた系(Cm)では高い硝酸性窒素除去量が示されたのに対し、現場流入水を用いた場合(Cf)では、現場と同程度の処理能力しか示されなかった。

微生物群集解析の結果を図 6 に示す。中川根では培地を用いた場合(Nm)でも現場水も用いた場合(Nf)でも、同様に c1 に濃いバンドが見られ、硫黄脱窒細菌の菌体数が現場水の影響により減少してはいないと考えられた。一方、潮海寺では、最適培地条件下(Cm)では培養に伴い、バンド c1 が濃くなっていくのに対し、現場流入水を用いた場合(Cf)には、培養を通じて濃くなるバンドが全く見受けられなかった。

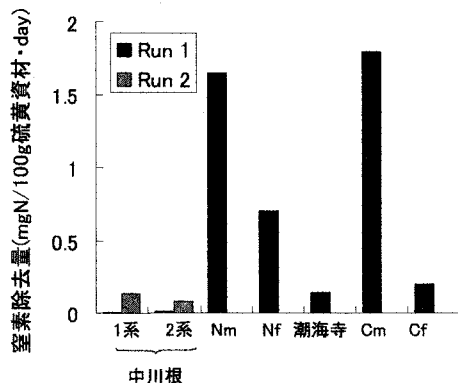


図 5 窒素除去量の比較

Nm : 中川根資材+培地、Nf : 中川根資材+現場水
Cm : 潮海寺資材+培地、Cf : 潮海寺資材+現場水

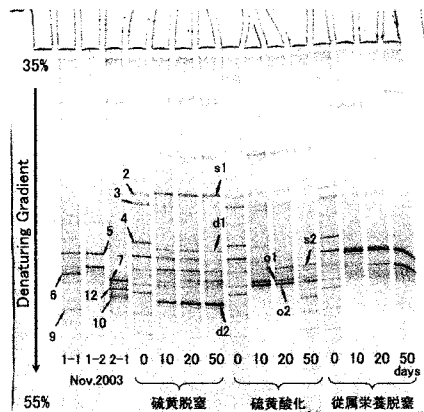


図 4 硫黄脱窒細菌確認試験における PCR-DGGE 解析結果

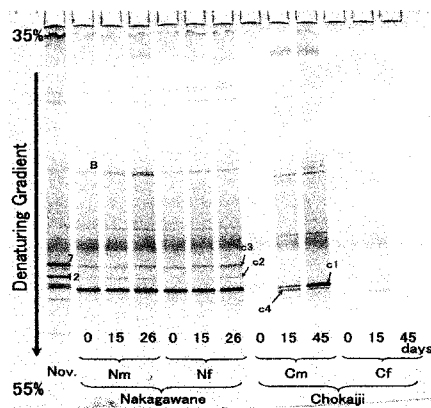


図 6 現場水質試験 PCR-DGGE 結果

以上の結果より、潮海寺では、原水条件下において硫黄脱窒細菌の増殖が困難であり、現場流入水が処理能低下の一因となっていることが示唆された。

3.3 ③:培養中の酸素条件の影響評価

(1) 実験の概要及び方法

3.2の結果より、中川根においては、硫黄脱窒細菌が増殖できない別の要因があることが示唆された。そこで、影響しうる要因の一つとして、酸素条件に着目した。硫黄脱窒細菌は、硫黄酸化細菌でもあることから、酸素存在下でも生育可能ではあるが、脱窒能を持たない硫黄酸化細菌に比べ、低酸素濃度条件を好むことが知られている。現場より採取した硫黄-石灰資材 10 g に対し、特に低酸素濃度条件下での厳密な酸素濃度のコントロールは困難であるため、完全な無酸素条件として窒素パージする系(Nn)を、より現場に近い形を模擬するためパージをしない系(No)を設定した。いずれも現場流入水 30 mL を添加して静置培養とし、僅かな酸素条件の違いが硫黄脱窒に与える影響を検討した。また、実際の現場では通水に伴う水の流れが生じることから、パージをせず振とうする系(Ns)も設けた。培養には 50mL バイアル瓶を用い、Nn はブチルゴムセプタムとアルミシールにより密閉し、気相を窒素パージした。一方、No、Ns ではシリコ栓を使用し、通気性を確保した。分析は 3.2 と同様に行った。

(2) 酸素条件の影響結果

硫黄顆粒 100g あたりの窒素除去量を図 7 に示す。窒素パージをした系(Nn)では平均 2.3mgN/day とパージしていない系(No : 1.0mgN/day)の 2.3 倍の除去量を示した。パージをしない系でも振とうした場合(Ns)よりは高い窒素除去量が見られ、現場では酸素条件の僅かな違いにより、除去速度が大きく影響されることが考えられた。

PCR-DGGE の結果を図 8 に示す。Run 1 にあたる 2003 年 11 月と Run 2 にあたる 9 月のサンプルも同時に示した。いずれの条件においても、処理回復期 (Run2) に濃く見られ、硫黄脱窒条件で培養した際にも濃くなるバンド F(d2)が見られている。しかし、振とう条件下 (Ns) では、培養開始 32 日後には、本バンドが薄くなってきているのがわかる。また、窒素パージした条件 (Nn) では、現場での処理能回復期 (Run2) に出現したバンド s2 と近い位置にバンド n1 が濃く現れた。よって、酸素濃度の僅かな違いが特定の細菌数の消長に何らかの影響を与えていることが考えられた。

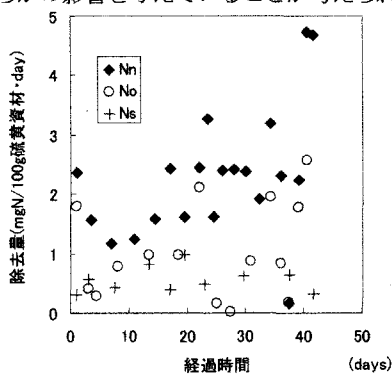


図 7 培養期間中の窒素除去量

Nn : 窒素パージ, No : パージ無し Ns : パージ無し+振とう

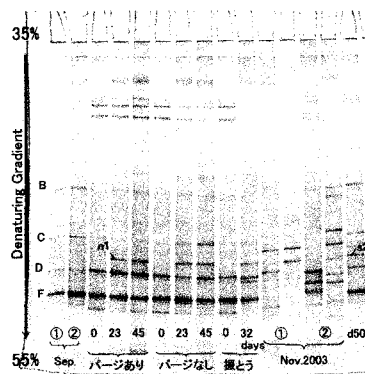


図 8 酸素濃度試験の PCR-DGGE 結果

3.4 培養実験のまとめ

培養実験の結果から、硫黄脱窒の進行と、硫黄酸化細菌由来であると考えられたバンドの挙動について表 3 にまとめた。16S rDNA V3 領域の配列が一致するバンドに関しては同時に示した。硫黄脱窒反応が進んで

いる条件下で常に存在し、実験①の硫黄脱窒条件(sd)において脱窒反応が起こるようになった際に出現したバンド B、C、F は硫黄脱窒細菌由来のものであると考えられた。実験①の硫黄脱窒条件及び実験③の無酸素条件で出現しているバンド s2 も硫黄脱窒を行う細菌である可能性がある。バンド 7 は脱窒能のない硫黄酸化細菌であると考えられた。

培養実験の結果、不調時の現場にも硫黄脱窒細菌は存在することが確認されたため、現場では何らかの要因により硫黄脱窒細菌数が低下していることが、処理性能悪化に影響を与えていると考えられた。潮海寺サイトにおいては、流入原水自体が硫黄脱窒細菌の増殖には適していないことが、主に現場での処理能低下に影響していると考えられた。原水水質の影響としては、細菌増殖を阻害する物質の存在や栄養素の欠落などが考えられるものの、それらを特定することはできなかった。中川根サイトについては、現場流入水を用いた場合にも、水温等の条件を整え、十分な HRT を与えることで現場の 10 倍以上の硝酸性窒素除去が可能であったため、現場流入水質以外の影響因子が考えられた。硫黄脱窒速度は微量の酸素によって著しく低下し、また硫黄脱窒を担うと考えられたバンド F 強度の低下が見受けられた。そのため中川根の現場では主に通水に伴う酸素供給が、処理能低下に影響したのではないかと考えられた。

表 3 各条件における硫黄脱窒の進行と DGGE バンドの挙動

	現場		実験①			実験②		実験③		
	Run 1	Run 2	sd	so	hd	Med	Fie	N	O	S
硫黄脱窒	不調	良	良	無	無	良	良	良	良	不調
7=D(ol)	○	○	×	+	×	○	○	○	○	○
B=s1	×	○	+	+	×	○	○	○	○	○
s2(m1)	○	×	+	+	×	×	×	+	+	+
C(d1)	×	○	+	×	×	○	○	○	○	—
F=d2	×	○	+	×	×	○	○	○	○	—

○：バンドを確認、+：培養により出現、—：培養によりバンド強度低下

実験①：培地を用いた培養 (sd:硫黄脱窒条件、so:硫黄酸化条件、hd:従属栄養性脱窒条件)

実験②：現場の顆粒を用いた培養 (Med:硫黄脱窒培地 Fie:現場の水)

実験③：現場の顆粒と水を用いた培養 (N:窒素パージあり、O:パージなし、S:パージなし+振とう)

4. まとめ

硫黄脱窒によるオンサイト処理を行っている現場において、処理能悪化に影響する因子の特定を試みた。硫黄脱窒細菌の菌体数低下が処理能悪化への直接的な要因であると考えられ、さらに、菌体数の低下をもたらしている因子としては、現場流入水質及び、酸素濃度の僅かな上昇が考えられた。今後はより細かな条件設定による影響因子のさらなる検討が求められる。

謝辞：本研究は(財)鉄鋼業環境保全技術開発基金の助成により行われた。また、サンプルの採取にご協力いただいた(独)野菜茶業研究所松尾喜義様に心より感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Almasri, M.N., and Kaluarachchi, J.J. (2004) *Journal of Hydrology*, 295(1-4), 225-245
- 2) Thorburn, P.T. et al., (2003) *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 94, 49-58
- 3) 圓岡大治、西村実司 (1999) 用水と排水, 41(10), 914-919
- 4) Darbi, A. et al., (2003) *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 38(9), 1703-1715
- 5) 河原塚琢磨、谷田貝敦、増島博 (2001) 東京農業大学農学集報, 46(1), 7-12
- 6) 宮永俊明ら(2003)環境省平成 14 年度環境技術開発等推進事業『農業生産に起因する公共水域下での硝酸性窒素汚染地下水、河川および湖沼の環境回復および修復技術の開発』平成 14 年度開発事業報告書
- 7) Yamamoto-Ikemoto, R. et al., (2000) *Water Sci. Technol.*, 42(3-4), 369-376
- 8) Kimura, K. et al., (2002) *Water Res.*, 36, 1758-1766
- 9) Nugroho, R. et al., (2002) *Water Sci. Technol.*, 46(11-12), 99-104
- 10) Koenig, A. and Liu, L.H. (2004) *Water Environ. Res.*, 76(1) 37-46
- 11) Koenig, A. and Liu, L.H. (2002) *J. Biotechnol.*, 99, 161-171