

(78) 主要ポリリン酸蓄積細菌 2 種の 消長に与える亜硝酸の影響

齋藤利晃^{1*}・湯本高太¹・福島寿和²・庄司仁²・佐藤弘泰²

¹日本大学理工学部 (〒101-8708 東京都千代田区神田駿河台1-8)

²東京大学大学院新領域創成科学研究科 (〒277-8563 千葉県柏市柏の葉5-1-5)

* E-mail: saito@civil.cst.nihon-u.ac.jp

生物学的リン除去の安定化に寄与するため、代表的ポリリン酸蓄積細菌2種 (*Candidatus Accumulibacter phosphatis*, Actinobacterial-PAOs) の消長に与える影響因子および競合関係を調べた。両細菌種が存在する運転条件下、亜硝酸を添加してリン除去性能の変化と両細菌種の存在量の変化を定量PCRにより調べた。その結果、亜硝酸を添加している期間、リン除去性能は悪化し、汚泥量当たりの有機物摂取速度の低下とリン放出速度の低下が観察された。また、その間、単位汚泥量当たりの細菌量は、*Candidatus Accumulibacter phosphatis* が減少したのに対し、Actinobacterial-PAOsでは増加する傾向を示した。その結果を解釈するため、両細菌種がそれぞれ優占化した汚泥を別途培養し、亜硝酸に対する阻害応答の相違、基質の利用特性の違いを調べた結果、Actinobacterial-PAOsは亜硝酸の阻害を受け難いこと、また、*Candidatus Accumulibacter phosphatis* に比べると小さいものの、酢酸を摂取しうることが示された。これらのことから、亜硝酸の添加によって両細菌種の酢酸を廻る競合関係が変化したものと考えられた。

Key Words :quantitative PCR, poly-phosphate-accumulating organisms,nitrite, *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, Actinobacterial-PAOs

1. 研究背景

生物学的リン除去は、富栄養化対策およびリン資源の回収利用の観点から、今後ますます重要な役割を担うと考えられる。しかし、生物学的リン除去は未だ不安定な処理法であり、突如としてリン除去性能が悪化することが問題となっており、適切な運転管理手法の開発が求められている。生物学的リン除去を不安定化させる影響因子として、これまでに、亜硝酸の影響を検討してきた¹⁾。亜硝酸は、細菌への生物阻害性を有する^{2a)}ため、リン蓄積細菌へも影響を与えうると考えたためである。特に、亜硝酸によるリン摂取阻害の大きさが、汚泥毎に異なることが、不安定化を助長していると考え、これまでに、ポリリン酸蓄積細菌 (以下、PAOs) の脱窒能力が関与していることを明らかにしてきた^{3a)}。しかし、亜硝酸阻害応答の不確実性はそれだけで説明できないことも示唆されている³⁾。

生物学的リン除去を担うPAOsとして、酢酸を主基質として培養した際に優占化する*Candidatus Accumulibacter*

phosphatis (以下、CAp) が知られている³⁾。これまで、CApの性質をもとに生物学的リン除去法の運転制御がなされてきたが、未だ安定した処理がなされていない。一方、近年、実処理汚泥には、CAp以外にも多様なPAOsがいるとされ、特にペプトン培養時に優占化するActinobacterial-PAOs (以下、A-PAO) も実汚泥中に多く存在し³⁾、それらの存在割合は汚泥によって異なることが示されている³⁾。すなわち、これら2種類のPAOsの亜硝酸阻害性が異なれば、存在割合の違いで異なる応答を示すことは理解できる。

そこで、本研究では、代表的リン蓄積細菌2種 (CAp, A-PAO) が存在する運転条件下、亜硝酸を添加してリン除去性能の変化と両PAOsの存在量の変化を調べた。また、その結果を考察するため、両PAOsがそれぞれ優占化した汚泥を培養し、亜硝酸に対する阻害応答の相違、基質の利用特性の違いを調べ、理由を考察した。

本研究の成果により、両PAOsの消長および競合関係が明らかとなり、生物学的リン除去の安定制御法の確立に寄与することができればと考えている。

2. 実験方法

(1) 連続回分式反応槽の運転

有効容積 4 L の回分式反応槽を、1 サイクル 6 時間（嫌気 180 分、好気 130 分、沈殿排水 50 分）の嫌気好気法により、連続回分式の運転を行った。培養炭素源として、ペプトンおよび酢酸の混合基質を COD 比 1 対 1 で、合計 400 mg COD/L になるように、嫌気工程の初めの 10 分間に投入し、リン除去能を有する汚泥を培養した。排水は 1 サイクル 2 L とし、HRT は 12 時間に調整した。余剰汚泥は好気工程終了前の 5 分間に 100 ml ずつ排出し、SRT は 10 日間とした。また、アリルチオ尿素 (ATU) を適宜投入して硝化の抑制を行い、酸化態窒素への曝露を避け、PAOs が脱窒能を持たないように工夫した。流入水の組成は、以下のとおり。酢酸ナトリウム 200 mg COD/L、ペプトン 200 mg COD/L、 K_2HPO_4 98 mg/L、 KH_2PO_4 56 mg/L、 NH_4Cl 107 mg/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 180 mg/L、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 14 mg/L および微量栄養素溶液 0.3 mL/L (EDTA 10 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.54 g/L、 H_3BO_3 150 mg/L、 $CaSO_4 \cdot 5H_2O$ 30 mg/L、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 120 mg/L、KI 180 mg/L、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 60 mg/L、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 120 mg/L、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 150 mg/L)。

ペプトンと酢酸の混合基質を用いた培養がおおよそ定常に到達した後、3 サイクルのみ、槽内に微量の亜硝酸を添加し、処理水質の変化と両 PAOs 存在量の変化を調べた。亜硝酸は、消費されない時の理論上の最終濃度が 1 mg/L になるように、好気開始時より 1 時間かけてゆっくり添加した。

(2) 亜硝酸阻害応答試験

両 PAOs の亜硝酸阻害応答特性を調べるため、リン蓄積能を有する汚泥を培養した。基本的な培養方法は (1) に示した反応槽と同じである。異なる点は、炭素源を酢酸もしくはペプトンのどちらか一方を用いたことであり、投入した COD 濃度は 400 mg/L で同じにした。

酢酸およびペプトン単独による培養がそれぞれ定常に到達した後、集積された汚泥をサイクル終了時に採取し、実験に供した。採取汚泥を 2 つに分割し、一方に酢酸、他方にペプトンを与えて両基質の利用特性を調べるとともに、2 時間の嫌気工程後、有機物を含まない栄養塩溶液で洗浄し、幾つかに分割後、好気条件下で濃度を変えた亜硝酸を投与し、阻害応答の相違を調べた。

(3) 測定方法

溶解性成分は、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、リン酸イオンをモリブデンブルー法、硝酸イオンおよび亜硝酸イオンはイオンクロマトグラフィーで測定した。TOC は島津 TOC-5000A を用い、MLSS および MLVSS はガ

ラスろ紙法を用いた。

汚泥中の C_{Ap} および A-PAO の存在量を、文献^{10,11)}に基づいた定量 PCR 法により測定した。PCR 装置は、ロシュのライトサイクラーを用い、C_{Ap} については SYBR Green I を用いたインターカラーター法、A-PAO については Qprobe 法によって定量した。使用したプライマーを表 1 に示す。

3. 実験結果

(1) 連続回分式反応槽の運転結果

酢酸とペプトンの混合基質を用いた連続回分処理におけるリン除去性能の経日変化を図-1 に示す。亜硝酸添加前は、流入水濃度 30 mg P/L に対し、嫌気終了時のリン濃度がおおよそ 65 mg P/L、処理水のリン濃度がおおよそ 18 mg P/L で典型的な生物学的リン除去挙動とともに安定した処理がなされていた。

そこで、リンの処理能力が定常に達したと考え、476 日目から 3 サイクル分のみ亜硝酸を添加したところ、添加期間において処理水リン酸イオン濃度の一時的な上昇が観察され、添加停止後、すぐに回復した。

(2) 亜硝酸添加の影響

a) 処理水質に及ぼす影響

リン除去性能に及ぼす亜硝酸の影響をより詳細に検討するため、各サイクルにおけるリン酸イオン濃度の経日変化を図-2 に示した。亜硝酸の添加濃度はわずか 1

表 1 PCR の測定条件

	手法	F primer	R primer	Q primer
C _{Ap}	Intercalator (SYBR GREEN I)	PA0551	PA0845	
A-PAO	Qprobe	APA0184	APA0445	APA0-QP309
Primer or Probe	Target	Sequence (5' → 3')		
PA0551	C _{Ap}	CTGGAGTTTGGCAGAGGG		
PA0845	C _{Ap}	GTTAGCTACGGCAGTAAAGG		
APA0184	A-PAO	TACCGATACGAGACGAG		
APA0445	A-PAO	GTCACITTCGCTTCTTCC		
APA0-QP309	A-PAO	CGGTGTCTCAGTCCGAGTGTGACC (800 (PY FL))		

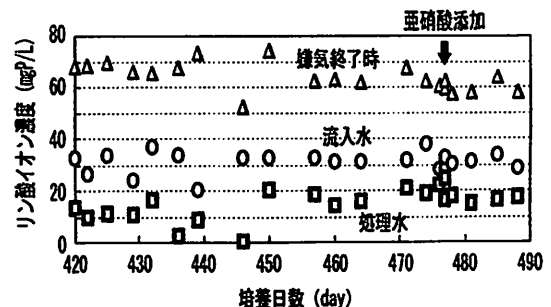


図-1 連続回分実験における処理状況

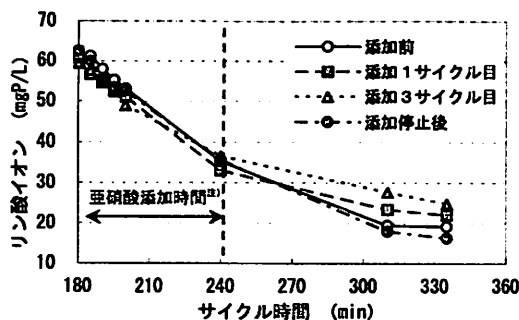


図-2 亜硝酸添加前後の好氣的リン摂取の状況
注) 3サイクルのみ、好気開始時(180分)より1時間添加

mg/Lであるにも関わらず、処理水質は、直前に19mg/Lであったのに対し、1サイクル目から処理水質は22mg/Lに悪化し、3サイクル目には25mg/Lへと更に悪化する結果が得られた。因みに、亜硝酸添加後、初めの数十分間に阻害が見られないのは、亜硝酸濃度が一定以上に達するまで、阻害効果が顕著に表れなかったためであると考えられる。また、添加停止後、すぐに処理水質は16mg/L程度まで回復し、阻害の継続は観察されなかった。結果は省略するが、同様の実験を別途行った結果、リン除去性能の悪化が再現されていること、および、1mg/L程度の微量の亜硝酸でも好氣的リン摂取を阻害することが報告⁹⁾されていることから、亜硝酸の存在下、PAOsの両方もしくはいずれかが影響を受けることにより、リン摂取が阻害されたことが示唆された。

b) 処理速度に及ぼす影響

次に、亜硝酸が処理速度に及ぼす影響を検討するため、サイクル変化の結果から、gVSS当たりのリン放出/摂取速度および有機物摂取速度を調べ、それぞれ図-3および図-4に示した。図に示されるように、有機物摂取速度は亜硝酸添加とともに低下し、その傾向は投入停止後も継続した。リン放出速度は、亜硝酸添加前後でばらついており、解釈は難しい。亜硝酸添加時は上昇しているようであるが、亜硝酸添加直前および終了後も含めて考えると、全体的には減少傾向にあると判断された。一方、リン摂取速度は亜硝酸添加後から増加傾向を示し、添加停止後もその傾向は維持されるという興味深い結果が得られた。これは、リン摂取速度は初期の20分間の変化で求めているため、亜硝酸の阻害を余り受けていない時間帯の速度を示していることがその理由と考えられるが、詳細は不明である。一方、汚泥量(MLVSSおよびMLSS)は低下をしていた(データ省略)ので、反応槽当たりではリン摂取速度は低下していた。これは処理水質が悪化していたことと対応している。

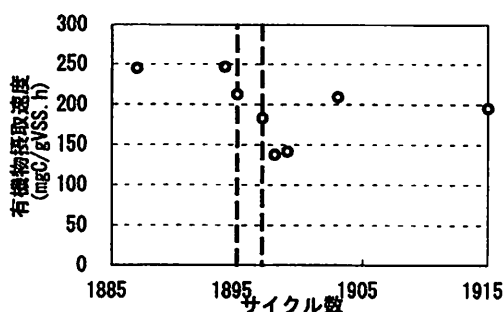


図-3 亜硝酸添加による有機物摂取速度の変化

注1) 1895サイクルは476日目の2サイクル目に相当

注2) 破線で挟まれた1895から1897サイクルに亜硝酸を添加

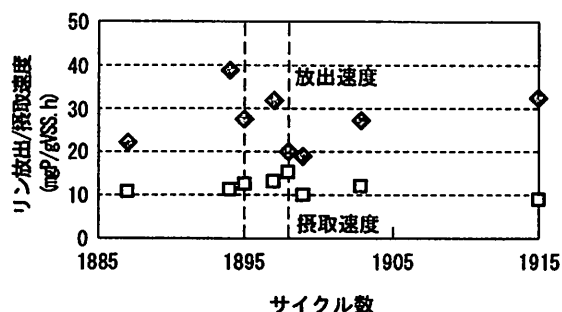


図-4 亜硝酸添加によるリン放出/摂取速度の変化

c) PAOsの消長に及ぼす影響

亜硝酸添加による両PAOsの存在量の変化を図-5に示す。亜硝酸添加後、CApの存在量は急激に減少し、亜硝酸添加停止後も数サイクル減少が続いた。このことから、CApは亜硝酸によって著しく阻害を受けたと考えられる。因みに実験系はATUを添加し、酸化態窒素の曝露がほとんど無いことから、本実験系におけるCApは脱窒能力を有していないと考えられる。脱窒能力を有していないCApは亜硝酸阻害を受け易いという報告^{9,10)}から、微量の亜硝酸添加によってCApの存在量が減少したことは、妥当な結果と考えられる。一方A-PAOは、亜硝酸の影響は観察されず、CApの減少につれて増加する傾向を示した。

また、興味深いことに、亜硝酸添加停止後数サイクル後、CApが増加すると、逆にA-PAOは減少する傾向を示し、両PAOsが極めて対照的な挙動を示す結果が得られた。更に、ほぼ同じタイミングで、有機物摂取速度は減少から増加へ、リン放出速度は減少から増加へ、リン摂取速度は増加から減少に変化している。このことは、両PAOsが何らかの競合関係にあり、亜硝酸添加によって阻害を受けたCApに代わって、A-PAOの存在量が増加したと考えられる。CAp量の急激な減少にも関わらず、処理水質への影響があまり大きく無かったのは、A-PAOが補うように機能したと推察される。

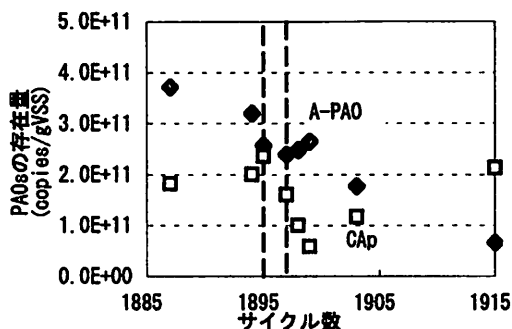


図-5 亜硝酸添加による両PAOsの存在量の変化

なお、図-5に示された両PAOsの存在量変化は必ずしも大きくは無いが、本研究で用いた定量PCRの測定結果を汚泥量当たりで比較する場合、その誤差はおおよそ20%と見積もられ、傾向を十分に把握しようと判断した。

(3) 両PAOsの亜硝酸阻害応答特性および基質利用特性

連続回分式反応槽を用いた処理実験の結果から得られた推論を検証するため、次に、両PAOsの亜硝酸阻害応答特性および基質利用特性を調べた。

a) 亜硝酸阻害応答特性

両PAOsがそれぞれ優占化した汚泥に対し、亜硝酸阻害応答実験を行った結果の代表例を図-6に示す。酢酸を単独の炭素源として培養した汚泥では、CApが優占していたので、酢酸を主基質として回分実験を行い、ペプトン単独の炭素源を利用したA-PAOが優占している汚泥については、ペプトンを用いた結果を示している。

図に示されるように、CApが優占した汚泥では、リンの摂取阻害が大きく表れている。この時の亜硝酸添加量は、 2.6mgN/gVSS であり、無添加系のリン摂取速度は $24\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$ 、添加系が $5.7\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$ で、およそ25%程度の活性残存率であった。一方、A-PAOが優占している汚泥では阻害を受けておらず、添加系、無添加系ともに、 $27\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$ の速度が得られた。このとき、酢酸系よりも高い 6mgN/gVSS の亜硝酸を添加していたことから、両PAOsの亜硝酸感受性は大きく異なり、特にCApは阻害を受け易く、A-PAOは阻害を受け難い結果が得られた。

以上より連続回分式反応槽による処理実験で亜硝酸添加時にCApが減少したことは説明できるが、A-PAOが増えたことは説明できない。そこで、次に、両PAOsの基質利用特性を調べた。

b) 両PAOsの基質利用特性

両PAOsがそれぞれ優占している汚泥に対し、酢酸およびペプトンをそれぞれ嫌気状態で与え、基質の種類によ

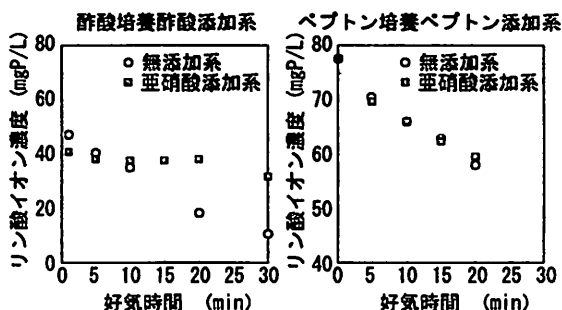


図-6 両PAOsの亜硝酸阻害応答特性

表-2 2種のリン除去能力調査結果

連続培養基質		酢酸		ペプトン	
両PAOs存在量	copies/gVSS	CAp	6.5 × 10 ⁴	CAp	7.8 × 10 ⁴
		A-PAO	検出下限	A-PAO	1.4 × 10 ⁵
回分実験時の基質		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	gP/gCOD	0.39		0.47	0.12
MLSS	mgSS/L	3,000		3,500	
MLVSS	mgVSS/L	2,000		2,700	

る利用性の相違を調べた。結果を表-2に示す。酢酸で培養し、A-PAOがほとんど存在しておらず、CApが優占していた汚泥に対して、酢酸を与えると当然ながら良好な有機物摂取 ($155\text{mgCOD/gVSS}\cdot\text{h}$) とリン放出 ($60\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$) および好気条件下における良好なリン摂取 ($45\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$) が観察された。しかし、この汚泥にペプトンを与えた場合には、有機物の摂取、リン放出およびリン摂取はいずれも微量で、明確なリン除去挙動は観察されなかった。このことから、CApはペプトンを利用できないことが示された。

一方、ペプトンで培養し、A-PAOが優占した汚泥では、酢酸を与えた場合においても、ペプトンを与えた場合においても、いずれも有機物摂取 (それぞれ $45\text{mgCOD/gVSS}\cdot\text{h}$ および $149\text{mgCOD/gVSS}\cdot\text{h}$) とそれに伴うリン放出 ($21\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$ および $18\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$) および好気条件下におけるリン摂取 ($29\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$ および $24\text{mgP/gVSS}\cdot\text{h}$) が観察された。

以上の結果は、CApに比べて劣るもののA-PAOも酢酸を摂取する能力を有していると考えられる。すなわち、連続回分式反応槽による処理実験では混合基質を用いていたため、両PAOsは酢酸を廻って摂取競争を生じ、通常は酢酸利用能力の高いCApが優占し、A-PAOはペプトンを優先的に利用して増殖していたが、CApが亜硝酸によって阻害を受けた際には、A-PAOが酢酸摂取を代替し、その結果、処理水質への影響は限定的であったと考えられる。

4. まとめ

実処理場において、生物学的リン除去に主要な役割を果たしていると考えられる*Candidatus Accumulibacter phosphatis* およびActinobacterial-PAOsについて、亜硝酸存在下における競合関係を定量PCRを用いて調べた。

その結果、極めて微量の亜硝酸添加によって、その阻害特性の相違からPAOsの遷移が生じること、特に、酢酸摂取競合に変化が生じ、CApの減少に対してA-PAOが増加することを明らかにすることができた。このことは、実処理場においてわずかな環境条件の変化が、主要PAOsの競合関係に影響を与え、存在量の変化とそれによる汚泥の性質の変化が生じると推察される。従って、今後、両PAOsの特性を詳細に検討し、競合関係に及ぼす影響因子を明らかにしていくことが、生物学的リン除去の安定化につながると考えられる。

なお、本研究で用いた汚泥には、他のPAOsやGAOsも共存していると考えられることから、今後は、これらの影響を加味した解析を行う必要があると考えている。

謝辞：本研究は、平成18年度科学研究費補助金（17560489）、クリタ水・環境科学振興財団研究助成および平成20年度日本大学学術研究助成金（総合研究）の補助によりなされたもので、ここに謝意を表す。

参考文献

- 1) Saito, T., Brdjanovic, D., Van Loosdrecht, M.C.M.: Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms, *Wat. Res.*, Vol.38, No.17, pp. 3760-3768, 2004.
- 2) Rowe, J.J., Yarbrough, J.M., Rake, J.B. and Eagon, R.G.: Nitrite Inhibition of Aerobic Bacteria, *Current Microbiol.*, Vol.2, pp.51-54, 1979.
- 3) Weon, S.-Y., C.-W. Lee, S.-I. Lee, and B. Koopman: Nitrite inhibition of aerobic growth of *Acinetobacter* sp., *Wat. Res.* Vol.36, pp. 4471-4476, 2002.
- 4) Yoshida, Y., Kim, Y., Saito, T. and Tanaka, K.: Development of the modified activated sludge model describing nitrite inhibition of aerobic phosphate uptake, *Wat. Sci. and Technol.*, Vol.59, No.4, pp. 621-630, 2009.
- 5) 吉田征史, 高橋紘平, 齋藤利晃, 田中和博: 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, Vol. 42, pp. 69-80, 2005.
- 6) Saito, T., Takahashi, K., Tsuboi, S., Yumoto, K., Yoshida, Y.: Mechanisms of unstable nitrite inhibition of aerobic phosphate uptake activity, *Journal of Water and Environment Technology*, Vol.6, No.1, pp. 65-75, 2009.
- 7) Crocetti, G. R., P. Hugenholtz, P. L. Bond, A. Schuler, J. Keller, D. Jenkins, and L.L.Blackall: Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microb.*, Vol.66, pp. 1175-1182, 2000.
- 8) Kong, Y., Nielsen, J.L and Nielsen, P.H.: Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.71, pp. 4076-4085, 2005
- 9) 宇田ら：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, Vol. 40, pp. 469, 2006.
- 10) Okumaki S, Nakamura K, Kawasaki M, Tanaka H, Uchiyama H, and Noda N: Quantification of Rhodocyclus-related and Actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in an enhanced biological phosphorus removal process using quenching probe PCR, *Microbes Environ.*, Vol.22, No.2, pp. 106-115, 2007.
- 11) Fukushima T, Uda N, Okamoto M, Omaki M, Satoh H and Mino T.: Abundance of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in Enhanced Biological Phosphorus Removal Activated Sludge Acclimatized with Different Carbon Sources, *Microbes and Environments*, Vol.22, pp. 346-354, 2007.

(2009. 5. 22 受付)

Nitrite Effect on Population Shift of Two Representative Groups of Polyphosphate-Accumulating Organisms

Toshiaki Saito¹, Kouta Yumoto¹, Toshikazu Fukushima², Hitoshi Shoji² and Hiroyasu Satoh²

¹College of Science and Technology, Nihon University

²Institute of Environmental Studies, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

Nitrite is one of inhibiting factors of biological phosphorus removal. In order to tackle with unstable performance of biological phosphorus removal, nitrite effect on population shift of two representative groups of Polyphosphate-Accumulating organisms was investigated. Sludge cultivated in sequencing batch reactor under alternating anaerobic and oxic conditions were exposed to 1mgN/L of theoretical concentration of nitrite during only 3cycles. We observed significant suppression of biological phosphorus removal and population shift of PAOs. Quantitative PCR revealed that during nitrite presence, the amount of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (copies per gVSS) significantly decreased, on the other hand, the amount of Actinobacterial-PAOs (copies per gVSS) increased. After a few cycles from suspension of nitrite addition, *Candidatus Accumulibacter phosphatis* increased, whereas Actinobacterial-PAOs decreased. To make clear these interesting phenomena, batch experiments were conducted with two sludge cultivated with sole carbon source of acetate and peptone, respectively. We observed that two groups of PAOs showed clearly different responses to nitrite exposure and both can utilize acetate. From these results, we concluded that *Candidatus Accumulibacter phosphatis* and Actinobacterial-PAOs compete each other in terms of acetate uptake and nitrite significantly affects their competition.