

B-4 亜硝酸塩脱窒リアクターの運転と リアクター内の活性汚泥微生物群集の解析

○新田 匡^{1*}・間蔵 毅行²・中村 一穂¹・松本 幹治¹

¹横浜国立大学大学院工学研究院機能の創生部門（〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5）

²横浜国立大学大学院工学府システム統合工学専攻（〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5）

* E-mail: nittami@ynu.ac.jp

1. はじめに

活性汚泥などの微生物を利用した廃水処理では、硝化-脱窒という2つの工程を設けることにより廃水中の窒素(アンモニア態窒素)が除去される。その硝化-脱窒工程における窒素の形態変化は以下のとおりである($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)。脱窒工程($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)が脱窒細菌と呼ばれる微生物群単独で行われるのに対し、硝化は $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ をアンモニア酸化細菌、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ を亜硝酸酸化細菌と、別個の微生物群が分担する。廃水処理の研究では、かねてよりこの亜硝酸酸化細菌の反応($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)を阻害し、 NO_2^- 経由の硝化脱窒($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)を実現しようという試みが行われてきた。なぜなら NO_2^- 経由の窒素除去には、硝化における曝気量の低減および脱窒におけるメタノールなどの電子供与体添加量の低減といったメリットが見込まれるためである¹⁾。

亜硝酸酸化を阻害するための反応槽の制御方法の研究と同時に、近年では同反応槽内のアンモニア酸化細菌を解析し、処理性能と比較する研究も行われている。しかし一方で、反応槽内の脱窒細菌についてはあまり興味をもたれていない。これは亜硝酸酸化の阻害に脱窒細菌の影響が少ないためだと考える。しかし電子受容体の形態(NO_3^- or NO_2^-)が脱窒細菌群集構造を決定する可能性は高く、その脱窒細菌群集構造の相違に伴う脱窒性能への影響もまた想像に難くない。よって NO_2^- からの脱窒性能に寄与の大きい細菌群集を把握し、その細菌群集の馴養に適した環境を整えることも、 NO_2^- 経由窒素除去反応槽の制御を研究する上で考慮される重要事項だと考える。

そこで本研究では、電子供与体が同一な環境において、 NO_3^- または NO_2^- を唯一の電子受容体とした脱窒を担う細菌群集を比較することで、 NO_2^- からの脱窒性能に寄与の大きい細菌群集を把握することを目的とした。方法

は脱窒反応のみを行う活性汚泥反応槽を運転し、供与する電子受容体を運転期間の途中で NO_3^- から NO_2^- に切り替える。そして同反応槽の処理水質の測定と同時に、全真正細菌が保有する 16S rDNA、および脱窒細菌のみが保有する遺伝子 *nirK*, *nirS* の解析を行った。なお供与する主な電子供与体は、運転期間を通してグルコースとした。

2. 実験方法

(1) 脱窒リアクターの運転

活性汚泥反応槽にはFig. 1に示すsequencing batch reactor (SBR)を用いた。SBRの容積は6 L、HRT、SRTはそれぞれ12 hと6 dであった。バッチの1サイクルは6 hとし、流入工程(40 min)、脱窒工程(4.5 h)、沈殿工程(0.5 h)、排出工程(20 min)の4工程を行った。流入工程でSBRに添加した基質60 mlの組成[g l⁻¹]は、 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 22.5; NaNO_3 , 30.9 (or NaNO_2 , 44.3); NH_4Cl , 0.86; KH_2PO_4 , 3.74; K_2HPO_4 , 0.28; 2NaEDTA, 10.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.14; 微量元素溶液(0.4 ml)²⁾であった。SBRには都市下水処理場のA₂Oプラントから採取した汚泥を植種し、延べ54日間の馴養を行った。前半22日間は電子受容体として NaNO_3 のみを添加し、後半32日間では NaNO_2 のみを添加した。SBRの脱窒速度は運転開始から約1SRTの間隔で調べた。脱窒工程開始後10, 100分に採取したSBR内の汚泥懸濁水の NO_3^- 濃度および NO_2^- 濃度をイオンクロマトグラフで測定し、下水試験方法に記された計算式に従って脱窒速度を算出した。

(2) 微生物群集解析

SBRから汚泥サンプルを採取し、FastDNA SPIN Kit for Soil (Qiogene)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型に、16S rDNAをターゲットとしたプライマーセット8F-1492r および *nirS* をターゲットとしたプライマーセットnirS1F-nirS6Rを用いてクローニングを行った^{3,4)}。16S rDNAの各クローンより解読した塩基配列は、DNA data bank of Japan

(DDBJ) が提供するプログラム Clustal W により多重アライメントを行った。その結果99%以上の配列が同一であったものは、1つの operational taxonomic unit (OTU) とみなした。また *nirS* の各クローンより解読した塩基配列は、アミノ酸配列に変換した後、Clustal W により多重アライメントを行い、Neighbor-joining法を使って系統樹を作成した。なお *nirK* については、抽出したDNAをプライマーセット *nirK1F-nirK5R* でPCR増幅した後⁴⁾、制限酵素 *HaeIII* で切断し、RFLP解析を行った。

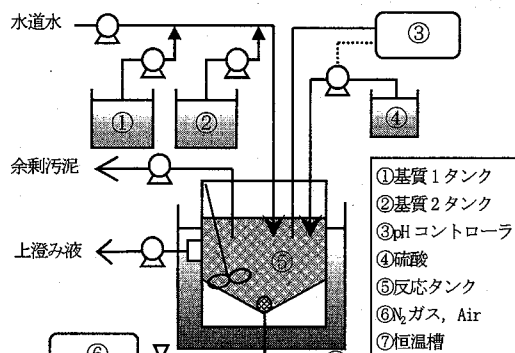


Fig. 1 SBR 概略図

※基質1: 炭素源と微量元素
基質2: 窒素源とリン酸基質

3. 結果

(1) SBRの脱窒速度

脱窒反応の電子供与体を同一とした系において、電子受容体を NO_3^- から NO_2^- に切り替えた前後で、脱窒速度がどのように変化するかを調べるため、SBRの脱窒速度を経時的に測定した。Fig. 2は運転2日目から48日目までのSBRの脱窒速度を示す。ただし前半22日間は NO_3^- -Nの脱窒速度を示し、後半は NO_2^- -Nの脱窒速度を示す。また黒塗りのプロットはSBRの単位体積あたりの速度を示し、白抜きのプロットはSBR内のMLSSあたりの速度を示す。

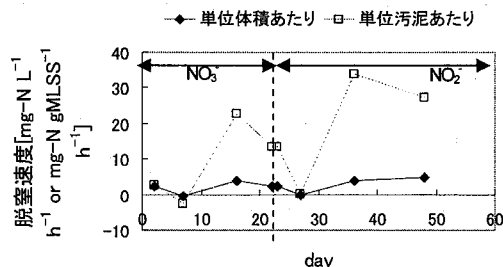


Fig. 2 SBR運転日数に伴う脱窒速度の変化

SBRの運転開始当初は両脱窒速度ともに2.5 mg-N 程度であった。その後20日ほどの馴養により、単位体積あたりの速度に大きな変化はなかったが、MLSSあたりの速

度は15 mg-N程度まで上昇した。添加する電子受容体を NaNO_3 に切り替えた23日目以降も、やはり単位体積あたりの脱窒速度に大きな変化はなかったが、MLSSあたりの脱窒速度は15 mg-N程度から30 mg-N程度まで上昇した。上記一連のMLSSあたりの脱窒速度の増加は、種汚泥が運転前半でSBRの運転、特に電子供与体としてグルコースを利用することになったこと、そして運転後半では電子供与体として NO_2^- を利用することになったことを示唆する。なお27日目における脱窒速度の減少は、ポンプの流量変化によりグルコースの添加量が減少したことが原因であった。

(2) 微生物群集解析の結果

23日目と48日目の活性汚泥における細菌群集を比較するため、両日に採取した活性汚泥サンプルの16S rDNAおよび *nirS* をクローニング解析した。両遺伝子のクローンライブラリーをFig. 3に記す。

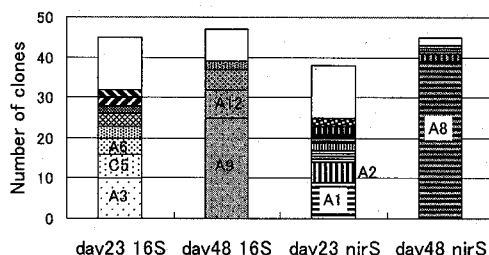


Fig. 3 クローンライブラリー

Fig. 3において、同色同デザインの様子は1つの配列(16S rDNAでは99%以上同一である配列)を意味する。棒のy座標が0-10の範囲を占めれば、その配列は10個のcloneから検出されたことを表す。ただし白抜きの棒には、1つのcloneのみから検出された配列をまとめた。Fig. 3は、16S rDNA、*nirS*ともに運転開始23日目から48日にかけて、遺伝子の多様性が低下したことを表している。つまり電子受容体を NO_2^- に変えたことにより、真正細菌および *nirS* を保有する脱窒細菌の群集構造が単純化したことを示唆する結果であった。*nirS* 遺伝子群の単純化は特に顕著であり、48日目のサンプルで解析した45 cloneのうち39 cloneは同じ配列であった。各サンプルから4つ以上検出された配列については、Table 1に近縁な配列をまとめた。48日目に最も多く検出された16S rDNAの配列は、 γ プロテオバクテリアに属す *Klebsiella trevisanii* の配列に近縁で、同一な部分は99%であった。また48日目に最も多く検出された *nirS* は、 γ プロテオバクテリアに属す *Pseudomonas* sp. の配列に近縁で、同一な部分は94%であった。

Table 1 主要な配列に近縁な配列の情報

day	gene	sequence	frequency	sequence identity	species (accession number)
23	16S	A3	10/45 (22%)	503/512 (98%)	<i>Candidatus Amoebivorus massiliae</i> strain CY2301169 (AY204874)
23	16S	A6	4/45 (9%)	549/549 (100%)	<i>Citrobacter</i> sp. AzoR-4 (DQ279751)
23	16S	C5	6/45 (13%)	484/509 (95%)	<i>Chryseobacterium</i> sp. C121 (DQ530083)
48	16S	A9	25/47 (53%)	543/547 (99%)	<i>Klebsiella trevisanii</i> strain ATCC 33558T (AF129444)
48	16S	A12	7/47 (15%)	281/319 (88%)	<i>Mucos bacterium</i> 111 (AY654758)
48	16S	D10	5/47 (11%)	539/547 (98%)	<i>Klebsiella ornithinolytica</i> strain ATCC 31898 (AF129441)
23	nirS	A1	9/38 (24%)	161/178 (90%)	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28400 (AM230913)
23	nirS	A2	5/38 (13%)	138/176 (76%)	<i>Ralstonia eutropha</i> (AF114789)
48	nirS	A8	39/45 (87%)	168/178 (94%)	<i>Pseudomonas</i> sp. R-25061 (AM230904)

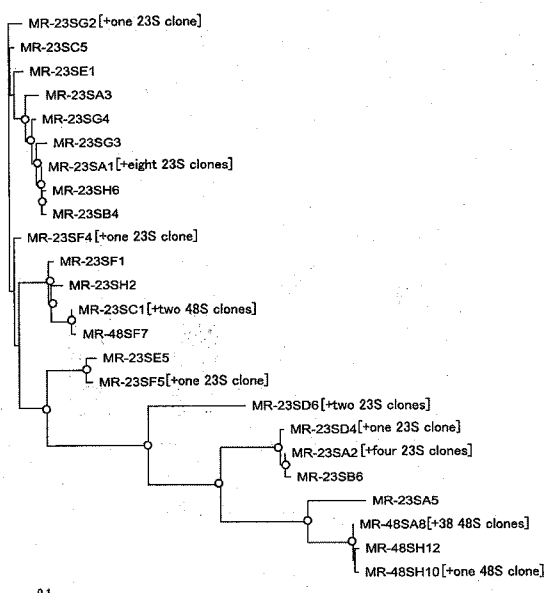


Fig. 4 nirSの系統樹

nirSについては解説した各配列の系統的な位置関係を確認するため、全71 cloneの配列を用いて系統樹を作成した。Fig. 4にはnirS(アミノ酸178残基に基づく)の系統樹を示す。図中の配列の名前において、MR-23S, MR-48Sから始まるものは、それぞれ23日目、48日目の汚泥サンプルから検出されたことを意味する。例えば“MR-23SA1”は、Fig. 3およびTable 1の配列“A1”と同一である。また配列名の後ろに記した“+two 23S clone”等の表記は、同配列が23日目のサンプル由来の他の2つのcloneからも検出されたことを表す。なお分岐点の白抜き丸印は、bootstrap 値が500/1000以上であったことを示す。48日目に最も多く検出されたnirS配列MR-48SA8は、23日目において検出されたほとんどの配列と近縁でないことが、Fig. 4より分かった。

最後にnirKのRFLP解析結果について記すと、運転開始から1,6,14,20,28,37,48,54日目のサンプルを比べた限り、群

集構造に顕著な変化がないようであった。また活性汚泥中のnirKは多様性が低いという報告もあることから、本研究ではクローニング解析を行わなかった。

4. まとめ

- NO₃を電子受容体とした脱窒系(NO₃脱窒系)で馴養した汚泥をNO₂を電子受容体とした脱窒系(NO₂脱窒系)で3SRTほど馴養すると、NO₂脱窒速度は約2倍に増加した。
- NO₃脱窒系で馴養された汚泥とNO₂脱窒系で馴養された汚泥では、検出される16S rDNAとnirSの種類が異なった。また両遺伝子の多様性は、NO₂脱窒系の汚泥において低かった。
- NO₂脱窒系で馴養した活性汚泥からは、*Klebsiella trevisanii* に近縁な 16S rDNA の配列、および *Pseudomonas* sp. に近縁な nirS の配列が検出された。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金（若手研究(B)、課題番号17710059）の助成を受けて遂行したものである。また実験で使用した活性汚泥は、横浜市環境創造局環境施設部の協力を得て入手したものである。ここに記して、感謝の意を表する。

参考文献

- Turk & Mavinic (1987) Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environ. Technol. Lett.*, 8, 419-426.
- Pai et al. (1999) Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioreagents in wastewater treatment. *Bioresour. Technol.*, 68, 179-185.
- 庄司ら (2006) 下水汚泥の液体コンポスト化における汚泥の分解に関わる細菌群集構造の解析, 水環境学会誌, 29, 407-413.
- Braker et al. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2096-2104.