

B-6 各種活性汚泥の亜硝酸イオン脱窒速度の比較とその微生物群集構造との関連の解析

○大竹 弘晃^{1*}・新田 見 匡²・中村 一穂²・松本 幹治²

¹横浜国立大学大学院工学府機能発現工学専攻 (〒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機能の創生部門 (〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5)

* E-mail: d06ga610@ynu.ac.jp

1. はじめに

窒素成分を含む廃水进行处理する場合、一般的に微生物の硝化・脱窒という酸化還元反応を利用して、アンモニア態窒素を硝酸態窒素まで酸化させ、さらに窒素ガスまで還元させ大気中に放散させるというプロセスが取られている ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$)。近年このアンモニア態窒素の酸化反応を亜硝酸態窒素で止め、そこから窒素ガスまで還元する NO_2^- 経由のプロセス ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$) が注目されている。このプロセスは理論的には上記の NO_3^- 経由のプロセスに比べ曝気量を 25% 低減できるという利点がある¹⁾。しかしながら NO_2^- には生物毒性もあるため、既存の施設への適用に当たっては、 NO_3^- 経由のプロセス内で処理を担う微生物群集の NO_2^- 経由のプロセスへの適応性を確認しておく必要があると考える。

そこで本研究では、横浜市内の水再生センターの活性汚泥を用いて硝酸・亜硝酸イオン脱窒活性試験を行い、電子受容体の違いによる脱窒速度の違いを調べることとした。また脱窒細菌のみが持つ遺伝子とされる亜硝酸還元酵素をコードする *nirK*, *nirS* をターゲットとして同汚泥の脱窒細菌群集解析を行い、硝酸・亜硝酸態窒素の脱窒活性との関連性を考察した。

2. 実験方法

(1) 脱窒活性試験

実験に用いた活性汚泥をTable 1に示す。1,4,11を除く全ての汚泥は下水処理で脱窒を行っていたものである。また脱窒活性試験装置の概略図をFig. 1に、実験条件をTable 2に示す。電子受容体として、硝酸塩を用いた系と亜硝酸塩を用いた系の2つの系で行った。処理槽より採取した汚泥混合液は、 N_2 ガスを通気して溶存酸素を排除し、攪拌しながら、恒温槽で温度を20℃に保った。基質を加えてから5,15,30,60,90,120分後に汚泥混合液を採取した。採取し

たサンプルはガラス繊維フィルター(ADVA NITEC GB-140)でろ過し、得られたろ液の硝酸、亜硝酸イオン濃度及び硝酸イオン濃度を測定した。測定にはイオンクロマトグラフデュアル流量システム(島津製作所)を用いた。また、式(1)より脱窒速度を求めた²⁾。

$$\text{脱窒速度}(\text{mgN}(\text{gMLSS} \cdot \text{h})) = \frac{\text{NO}_3^- \text{減少量}(\text{mgN} / \text{L}) + \text{NO}_2^- \text{減少量}(\text{mgN} / \text{L})}{\text{時間}(\text{h}) \times \text{MLSS}(\text{g} / \text{L})} \quad (1)$$

Table 1 脱窒活性試験に使用した活性汚泥

サンプル番号	1	2	3	4	5	6	7
場所	F	A	B	C	A	B	C
処理方式	標準(回分)	A ₂ O	AOAO	標準	A ₂ O	AOAO	AOAO
MLSS(mg/L)	1903	1355	910	818	1115	473	1150
サンプル番号	8	9	10	11	12	13	
場所	B	D	E	G	E	E	
処理方式	A ₂ O	A ₂ O	A ₂ O	脱窒(回分)	A ₂ O	疑似嫌気	
MLSS(mg/L)	2540	1240	2200	1165	878	1428	

Table 2 脱窒活性試験の条件

	系1	系2
温度(℃)	20	
活性汚泥(mL)	300	
NaNO3(mgN/L)	20	33.3
NaNO2(mgN/L)		
CH3COONa(mgC/L)	50	

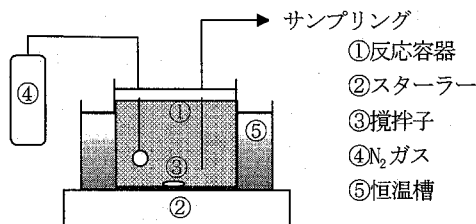


Fig.1 脱窒活性試験装置概略図

(2) 微生物群集解析

Table 1に記す汚泥サンプル3,5からFast DNA SPIN for soil KIT (Q-BIO gene)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは分光光度計によって濃度を測定した。抽出したDNA50ngを鋳型に、*nirK*をターゲットとしたプライマーセット *nirK1F-nirK5R*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⁾。得られた塩基配列について相当性検索を行い、Clustal Wにより多重アライメントを行った後、Neighbor-joining法により系統樹を作成した。

3. 結果

(1) 硝酸塩脱窒速度と亜硝酸塩脱窒速度の比較

脱窒活性試験の結果をFig.2に示す。Fig.2はTable 1に示した13の活性汚泥について、硝酸塩を用いた系と亜硝酸塩を用いた系の2つの実験系で脱窒活性試験を行った結果をまとめたものである。式(1)より算出した NO_3^- 脱窒速度をx軸、 NO_2^- 脱窒速度をy軸にとった。ただし、硝酸塩を用いた系において NO_2^- が生じた場合は、 NO_2^- 発生量(mgNL)を NO_3^- 減少量(mgNL)から差し引き、 NO_3^- 脱窒速度を算出した。また式(2)、(3)より、1モルの酢酸塩を脱窒する場合、硝酸塩85モル、亜硝酸塩83モルを要する。そこで1モルの酢酸塩を脱窒する速度は、 NO_3^- と NO_2^- のいずれを用いたほうが速いかを判断するため、Fig.2には $y=5/3x$ の直線を引いた。同直線より上部にあるサンプルは、 NO_2^- を用いたほうが速いことを意味する。

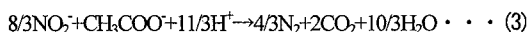
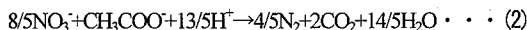


Fig.2より、サンプル2,6,5,7は NO_3^- を用いたほうが、酢酸塩を脱窒する速度が速いことが分かった。特にサンプル2は、亜硝酸塩でのみ高い脱窒活性を示した。既存の NO_3^- 経由のプロセスにも、硝酸塩より亜硝酸塩の脱窒活性が高い汚泥を馴養しているものがあることを示唆した。

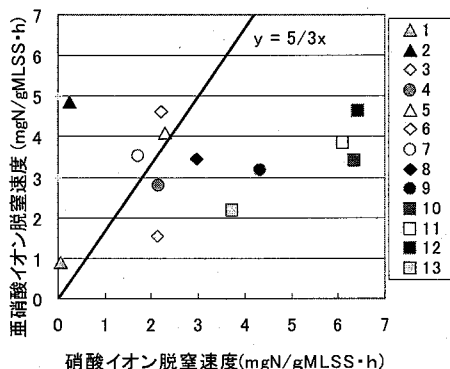


Fig.2 硝酸イオン脱窒速度 vs 亜硝酸イオン脱窒速度

Fig.2においてはまた、汚泥サンプルを採取した処理場の処理方式による傾向がみられた。嫌気・硝化内生脱

窒(AOAO)方式より採取したサンプル3,6,7は、いずれも硝酸塩脱窒速度が2 mgN/gMLSS/h程度にまとまっている一方、亜硝酸塩脱窒速度は1.5-5 mgN/gMLSS/h程度と差があった。また嫌気・無酸素・好気(A₂O)方式より採取したサンプル2,5,8,9,10,12は、亜硝酸塩脱窒速度が3-5 mgN/gMLSS/hの範囲にまとまっている一方、硝酸塩脱窒速度は0-6 mgN/gMLSS/h程度と差があった。

(2) 汚泥サンプルの*nirK*, *nirS* 解析結果

脱窒活性と微生物群集との関係を調べるため、硝酸塩脱窒速度がほぼ同一で、亜硝酸塩脱窒速度の異なる2つの汚泥サンプル3,5に対し、*nirK*, *nirS*のクローニング解析を行った。

*nirK*については、サンプル3,5よりそれぞれ42, 28クローンを解析した。その結果サンプル3の42クローンとサンプル5の27クローンは、アミノ酸配列(155残基)が98%以上同一であった。つまり亜硝酸塩脱窒速度の異なる2つのサンプルにおいて、*nirK*を保有する脱窒細菌相に大きな違いはなかったと考える。なお98%以上同一であった69クローンの配列に近縁な配列は、*Pseudomonas aeruginosa* strain DN24 [accession # AY345247]の配列であり、アミノ酸配列(155残基)の同一な部分は80%であった。

*nirS*については、サンプル3,5よりそれぞれ37, 39クローンを解析した。*nirS*クローンの配列には多様性があったため、配列を比較するために系統樹を作成した。ただしアミノ酸配列(178残基)が97%以上同一であったものは、operational taxonomic unit (OTU)として1つの配列に集約した。Fig.3に作成した系統樹を示す。Fig.3において、clone3,5はそれぞれサンプル3,5から検出されたクローンの配列を表し、括弧内は検出された同じ配列の数を表している。Fig.3ではクラスターが3つに分かれている。サンプル3から検出した配列がクラスターIにまとまっているのに対し、サンプル5から検出した配列はクラスターII, IIIに多い。この*nirS*の系統的な分布の違いが、亜硝酸塩脱窒速度の違いの一因になっている可能性は高いと考える。各クローンの配列に近縁な既知の配列は、Table 3に示すとおりであった。

4. まとめ

- (1) 下水処理(高度処理)の活性汚泥の中には、 NO_3^- 脱窒速度に比べ、 NO_2^- 脱窒速度の高いものが存在した。
- (2) AOAO方式の処理槽から採取した汚泥は、 NO_3^- 脱窒速度が比較的低かった。そのため NO_2^- 脱窒速度のほうが NO_3^- 脱窒速度よりも高くなる傾向があった。
- (3) NO_2^- 脱窒速度の異なる2つの汚泥では、*nirS*の群集構造に違いがあった。*nirS*の系統的な分布の違いが、 NO_2^- 脱窒速度の違いの一因になっている可能性を示唆した。

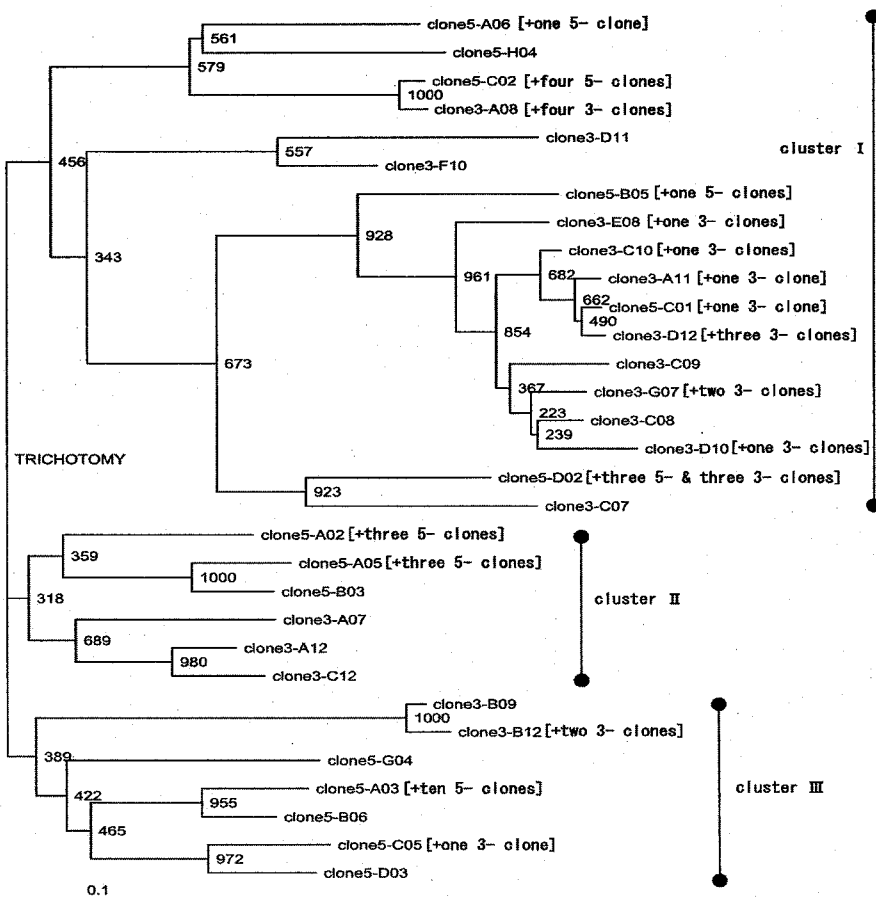


Fig.3 *nirS*の系統樹

Table3 サンプル3,5から検出されたクローン

sample	clone	frequency	sequence identity	species (accession number)
3	A08	5/37(14%)	140/178(78%)	Bacterium CYCU-0207 (DQ232371)
	E08	2/37(5%)	159/178(89%)	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28400 (AM230913)
	D12	4/37(11%)	167/178(93%)	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28400 (AM230913)
	G07	3/37(8%)	172/178(96%)	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28400 (AM230913)
	D10	2/37(5%)	158/178(88%)	<i>Dechloromonas</i> sp. R-28400 (AM230913)
	B12	3/37(8%)	131/178(74%)	<i>Paracoccus</i> sp. R-24615 (AM230906)
	D02	3/37(8%)	129/183(70%)	<i>Azospirillum brasilense</i> (AJ224912)
5	D02	4/39(10%)	129/183(70%)	<i>Azospirillum brasilense</i> (AJ224912)
	B05	2/39(5%)	151/177(85%)	<i>Pseudomonas chloritidis</i> mutans (AJ884572)
	A02	4/39(10%)	153/178(85%)	Bacterium D1 (DQ106864)
	A05	4/39(10%)	163/178(91%)	<i>Alicyclophilus</i> sp. R-24611 (AM230896)
	A03	11/39(28%)	133/178(74%)	<i>Thauera</i> sp.28 (AY829012)

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

- 1) Turk & Mavinic (1987) Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environ. Technol. Lett.*, 8, 419-426.
- 2) 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.
- 3) 日本下水道協会 (1997) 下水試験方法[上巻], pp.285-287, 日本下水道協会, 東京