

# 都市下水処理エアレーションタンク内で好気性脱窒反応を行う細菌の特定

長岡工業高等専門学校 ○樋口裕武 正 荒木信夫 正 押木守  
和歌山工業高等専門学校 正 青木仁考

## 1. はじめに

現在、多くの都市下水処理場において、エアレーションタンクのみによる標準活性汚泥法が採用されている。しかし、嫌気条件で進行するはずの窒素除去が単一のエアレーションタンクにおいても相当量進行している。この脱窒現象に関しては、①曝気槽内が部分的に嫌気状態となり脱窒がおきるという解釈以外にも、②活性汚泥フロック内で局所的な嫌気状態が生じ脱窒がおきる、③好気条件下で脱窒を行う菌が存在する等の解釈が提唱されている。これまでは、エアレーションタンクの窒素除去は①や②が原因と考えられてきた。しかし、好気条件下でも脱窒反応を行う細菌の存在が明らかになっており、単一曝気槽の脱窒現象は、③のほうに寄与していることも考えられる。好気性脱窒細菌は従属栄養細菌であり、ペリプラズムに  $\text{NO}_3^-$  から  $\text{NO}_2^-$  に変える硝酸還元酵素(Nap)を保持しており、*napA* 遺伝子がコードされている。主に好気性脱窒細菌として *Pseudomonas sp.* や *Rhodococcus sp.* などが単離されており、脱窒能が明らかになっている。

本研究では③に着目し、エアレーションタンク内に生息する好気性脱窒細菌を特定し、エアレーションタンク内での窒素除去にこの細菌群がどの程度寄与しているかを明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験方法

### 1) 活性汚泥の採取と *napA* 遺伝子の増幅

標準活性汚泥法を採用している新潟県内の 5 つの下水処理場の全窒素(T-N)除去率を算出し、汚泥サンプルを採取した。この汚泥から Power Soil DNA Isolation Kit(MO BIO)を用いてDNAを回収し好気性脱窒細菌が保持しているペリプラズム硝酸還元酵素をコードした *napA* 遺伝子を標的とした PCR を行った。用いたプライマーペアは、*napA\_F1*(CTGGACIATGGGYTTIAACCA)、*napA\_R1*(CCTTCYTTYTCIACCCACAT)である。PCRの組成は、Extaq 10  $\mu\text{L}$ , DNA sample 2  $\mu\text{L}$ ,

Forward Primer 1  $\mu\text{L}$ , Reverse Primer 1  $\mu\text{L}$ , 1/10 DMSO 4  $\mu\text{L}$ , DDW 2  $\mu\text{L}$  とした。PCRの反応条件は、変性を 98°Cで 10 秒、アニーリングを 55°Cで 30 秒、伸長反応を 72°Cで 30 秒を 35 サイクル繰り返し、ポストエクステンションを 72°Cで 10 分間行った。PCR産物は、1.5%アガロースゲルを用いて増幅範囲である 492 bp 付近でバンドの確認を行い、活性汚泥中に *napA* 遺伝子を保有する細菌の存在を確認した。

### 2) 好気性脱窒細菌の単離

集積培養は、長岡中央浄化センターの活性汚泥 10 mLと脱窒素細菌用DM培地20 mLをオートクレーブ済みの200 mLフラスコに加え、37 °Cの好気条件下で振盪培養し、培養液の50 mLを2日毎に植え継ぎ、8日間培養した。

DM培地(g/L)の組成は、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :1.54g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :1.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :0.1g,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ :4.7g,  $\text{KNO}_3$ :0.6g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ :0.3g, Trace Element Solution :0.2mlでpH7.5に調整した。Trace Element Solution (g/L)の組成は、 $2\text{Na} \cdot \text{EDTA}$ :50g,  $\text{ZnSO}_4$ :2.2g,  $\text{CaCl}_2$ :5.5g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ :5.1g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :5.0g,  $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ :1.1g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :1.6g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :1.6gとした。

その後、50  $\mu\text{L}$ の培養液を1.5%の寒天培地にBTBを10 mg/L加えたものにてコロニーを形成(4日, 37 °C)させた。BTBを加えることで、脱窒反応の際にpHが上昇することから、コロニーの色によって細菌を判別することが可能となる。形成されたコロニーを釣菌し、好気性脱窒試験を行った。

### 3) 好気性脱窒試験

釣菌した菌を密閉した 15 mL バイアル瓶で振盪培養を行った。培地は DM 培地に含まれる硝酸を 15N 標識のものに変更し、アンモニアを添加しないものを用い、ヘッドスペース:培地が 4:1 になるように加えた。バイアル瓶のヘッドスペースには酸素が 100 %になるように置換した。試験開始後ヘッドスペースのガスを GC-MS によって分析を行い、15N 標識の硝酸がどのような窒素化合物

に変化するかを分析した。

### 3. 結果

#### 1) エアレーションタンクの T-N 除去率

各処理場の平均水質を表-1 に示す。また、各処理場の T-N 除去率を図-1 に示す。平均 T-N 除去率は約 50% となっている。昨年、高橋らの研究では、長岡中央浄化センターにおいて T-N 除去率  $55.0 \pm 5.5\%$  に対し、微生物に取り込まれる窒素が  $6.8 \pm 2.7\%$  となっており、曝気槽の窒素除去の  $47.6 \pm 5.1\%$  が脱窒素反応によるものと推定した。この割合を今回の結果に適用すると、微生物によって約 43%の窒素除去が行われていることになる。除去率が高い燕市処理場では DO コントロールは行っておらず、通風量で管理していた。サンプル採取を行った際には、 $0.27 \sim 1.71 \text{mg/L}$  であった。一方、表-1 において長岡流域では  $\text{NH}_4\text{-N}$  が流入水と流出水とで値がほとんど変化していないことから、脱窒素反応の前段階である硝化反応が進行していなかったものと考えられる。

#### 2) napA 遺伝子を対象とした PCR

PCR を行った活性汚泥をアガロースゲル電気泳動に供した写真を図-2 に示す。すべてのサンプルから napA 遺伝子の増幅部位である 492 bp 付近にバンドを確認することができた。活性汚泥中に napA 遺伝子を保有する細菌の存在が示唆された。

#### 3) 好気性脱窒細菌の単離および脱窒試験

寒天培地にて青く変色が確認できたコロニーを 10 個釣菌し、好気性脱窒試験に供した。1 個のコロニーにおいて、培養 216 h 時点で  $^{30}\text{N}_2$  の生成が確認された。生成された  $^{30}\text{N}_2$  はバイアル瓶内に添加した硝酸の 28% 程度であった。残りの硝酸については、バイアル内の液体を採取し硝酸濃度を測定したところほぼ全てが消費されていたため、微生物内に取り込まれたか、脱窒工程内の物質で反応が止まっていることが考えられる。

### 4. まとめ

5 箇所の下水処理場において、微生物によって平均 43%の窒素除去が行われていた。活性汚泥から単離した脱窒素細菌は好気条件で硝酸から窒素ガスを生成する能力を有していることが判明した。

### 5. 参考文献

- 1)星加ら(2001) 東京都下水道局技術調査年報 74-91
- 2)Bin J et al, (2015). Biotech and Biopro Eng,

20:643-651

4)Rocio J et al,(2009).Extremophiles, 13:169-178

5)Zhu L et al, (2011). Bio Tech, 108:1-7

6)高橋ら(2016). 日本水環境学会年会講演集 51:357

表-1 各処理場の平均水質(mg/L)

流入	T-N	NH4-N	NO2-N	NO3-N	有機性窒素
長岡中央	38.0±7.5	30.0±6.3	0.01±0.02	0.03±0.09	8.4±3.8
長岡流域	32.8±3.6	28.1±3.8	0±0	0±0	4.7±1.8
栃尾	32.0±7.3	18.0±3.7	0±0	0.21±0.04	13.8±4.3
三条	45.4±6.4	33.9±5.4	0.001±0.003	0.07±0.05	11.6±3.1
燕	50.1±4.3	20.3±9.7	0.02±0.09	0.14±0.09	29.6±11.7
流出	T-N	NH4-N	NO2-N	NO3-N	有機性窒素
長岡中央	16.0±4.0	9.8±5.6	0.79±1.3	3.6±3.0	1.8±1.3
長岡流域	29.8±4.4	26.3±3.7	0.61±0.24	0.69±0.35	2.2±1.3
栃尾	14.0±3.5	6.2±3.6	0.01±0.03	5.6±2.7	2.2±1.5
三条	23.1±3.8	21.2±4.6	0.04±0.02	0.04±0.03	2.0±1.2
燕	11.5±2.5	5.0±1.4	0.43±0.41	2.1±1.7	4.0±4.1

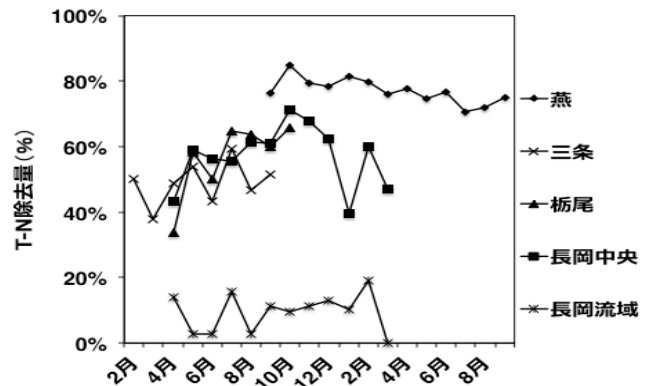


図-1 各処理場の T-N 除去率



図-2 アガロースゲル電気泳動

M:Ladder Maker, 1:P.aeruginosa, 2-9:活性汚泥, 10:DDW