

都市下水処理エアレーションタンク内での好気性脱窒現象に寄与する細菌の特定

長岡工業高等専門学校 ○樋口裕武 正 荒木信夫 正 押木守
長岡技術科学大学 渋谷航平
和歌山工業高等専門学校 正 青木仁考

1. はじめに

現在、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。好気条件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。好気性脱窒細菌として *Pseudomonas sp.* や *Rhodococcus sp.* などが土壌や河床から単離されており、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素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。

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) 好気性硝酸除去試験

採取した汚泥を用いて、好気条件下でも硝酸が除去されるかを試験した。採取した汚泥を遠心分離(90 sec, 10000×g)し、DM培地と混合し24時間順応させた後に再度遠心分離し基質洗浄を行った汚泥20 mLとDM培地80 mLを混合したものをを用いて試験を行った。好気条件は曝気装置を用いてDOが0.5~1.0 mg/Lになるように調整し、対照実験として嫌気条件のサンプルを用意した。炭素源としては通常の酢酸と、炭素源の検討

としてコハク酸を用いたサンプルを用意した。

3) 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5 mLと脱窒素細菌用DM培地10 mLをオートクレーブ済みの125 mLフラスコに加え、30 °Cで振盪培養し、嫌気条件で4日間培養した後に植え継ぎ、好気条件で2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, KH_2PO_4 :1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.1g, CH_3COONa :4.7g, KNO_3 :0.6g, NH_4Cl :0.3g, Trace Element Solution :0.2mlでpH 7.5に調整した。

その後、50 μL 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, 30 °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、純粋培養を行った後に寒天培地に対して画線培養を行い、単一のコロニーを採取し、再度純粋培養を行い、好気性脱窒試験に供した。

4) 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 ^{15}N 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はArガスでパージ、Heガスで置換後、酸素が大気濃度と等しくなるように約3 mL添加し、オートクレーブを行った後に菌体を0.1 mL分注し、試験を開始した。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、 ^{15}N 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。

5) 細菌種解析

4)において脱窒能が確認できた菌体をサンガーシーケンスによって塩基配列の解析を行った。解析はeurofins社のValue Readシーケンスサービスに委託した。

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 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。高橋らの研究で求められた微生物に取り込まれる窒素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、0.27~1.71mg/L であった。脱窒反応の前段階である硝化反応を進行させるためにも、十分な酸素供給が必要であると考えられる。

2) 好気性硝酸除去試験

試験の結果を図-2 に示す。好気条件と嫌気条件どちらにおいても、3-6 時間の間で硝酸濃度が著しく低下し、9 時間の時点で全てのサンプルにおいて完全に除去が行われた。コハク酸を用いたサンプルは硝酸濃度の低下がほとんど見られなかったため、グラフから除外した。

3) 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。

4) 好気性脱窒試験

得られたコロニーから純粋培養した 5 種の菌体を好気性脱窒試験に供した (No.1~5 とする)。図-3 にそれぞれの脱窒試験の結果を示す。No.1 は硝酸がほぼ 100% N_2O に変換されている。No.4 も N_2O と N_2 の合算でほぼ 100% 変換されている。No.5 は一度 N_2O に変換された後、 N_2O から N_2 に転換されている。

5) 細菌種解析

サンガーシーケンスによって得られた塩基配列を BLASTn で検索したところ、No.1 は *Bordetella* sp., No.4 は *Achromobacter* sp., No.5 は *Paracoccus* sp. である可能性が高いことが確認された。これらの属はグラム陰性菌で従属栄養生物であり、特に *Achromobacter* sp. と *Paracoccus* sp. は好気性脱窒能を持つ細菌の系統樹内にも記載されている⁵⁾ため、好気性脱窒細菌である可能性が高い。

4. まとめ

活性汚泥から単離した好気条件で脱窒を行える細

菌は *Bordetella* sp., *Achromobacter* sp., *Paracoccus* sp. である可能性が示唆された。

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
- 3) Zhu L et al, (2011). *Bio Tech*, 108:1-7
- 4) 高橋ら (2016). 日本水環境学会年会講演集 51:357

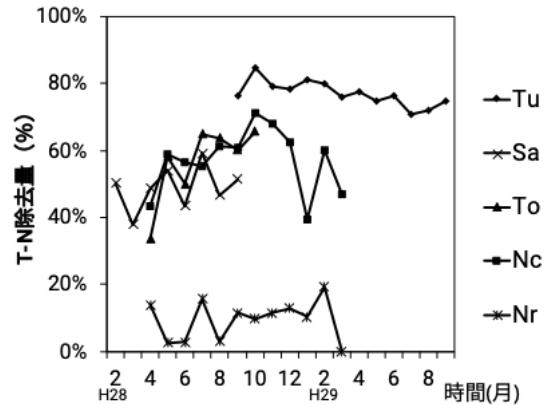


図-1 各処理場の T-N 除去率

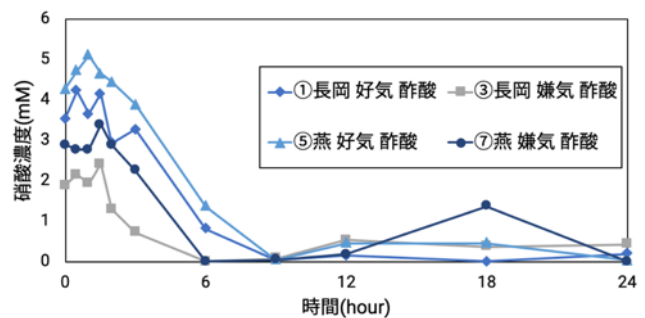


図-2 好気性硝酸除去試験

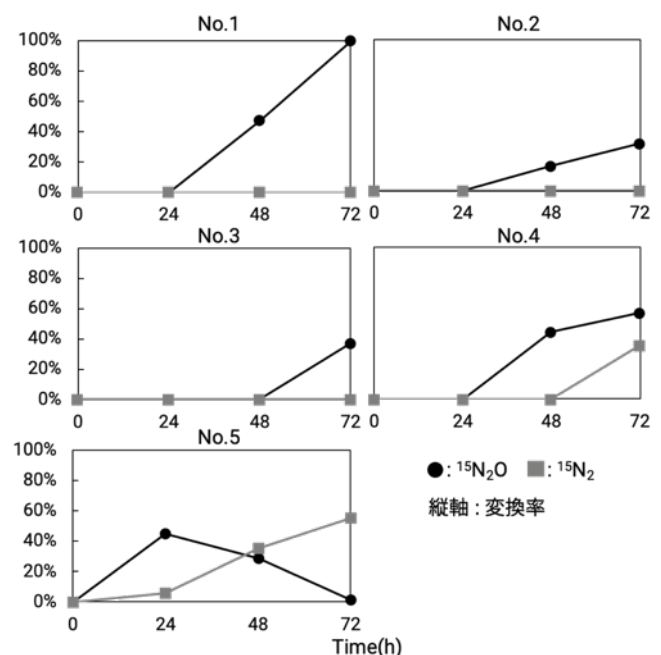


図-3 好気性脱窒試験