

# 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの構築と硝化細菌群集解析

Development of partial nitrification and analysis of nitrifying bacteria  
in laboratory-scale reactor

学籍番号 46831

氏名 田中 秀治 (TANAKA, hideharu)

指導教員 味埜 俊 教授

## 1. 研究の背景と目的

閉鎖性水域における富栄養化を抑止するためには、水域へ排出される排水中の栄養塩の削減が重要と考えられる。現在、富栄養化原因物質の一つである窒素を排水中から除去する技術として硝化脱窒法が実下水処理場を中心に広く普及している。硝化脱窒法では、排水処理システムに流入する溶存態窒素の主成分であるアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) を硝化細菌群の働きで亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) を経て酸化生成された硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) を脱窒細菌群によって窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) まで還元 (脱窒) することで排水からの窒素除去を実現している。そのため、本法では硝化の際に酸素が、脱窒の際に還元力 (有機物) が要求される。

硝化脱窒法を効率化する微生物反応として「亜硝酸型」硝化反応が注目されている。亜硝酸型硝化反応とは、前述の硝化反応を  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  までの酸化で停止させた反応を指す。この反応に続けて脱窒反応を行うことにより (亜硝酸型硝化脱窒反応)、通常の硝化脱窒反応が要求する酸素、還元力がそれぞれ 25%、40%削減できることになる (理論値)。

ところで、硝化を担う硝化細菌群は二つのグループ、すなわち  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  を  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  まで酸化するアンモニア酸化細菌群 (AOB) と、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  を  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  まで酸化する亜硝酸酸化細菌

群 (NOB) に大別される。亜硝酸型硝化反応の実現ためには、AOB を存在させつつ NOB を排除すればいい。NOB の選択的な排除による亜硝酸型硝化反応の実現のために、現在まで主として、遊離アンモニア ( $\text{NH}_3$ ) や亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) を高濃度に保つ方法、水温を高温 (30-40℃) に保つ方法、酸素濃度を低くする (曝気量を小さくする) 方法などが検討されている。しかし、相対的に AOB よりも NOB のほうがより少ない栄養で生育できることが、安定的な亜硝酸型硝化反応の実現を困難にしている。

そのような中、新日本製鐵 (株) において、製鐵工程で排出される高濃度のアンモニア等の窒素成分やフェノール類、チオシアン、チオ硫酸、タール状油分などを含む「安水」の硝化脱窒法による処理を試みたところ期せずして安定的な亜硝酸型硝化反応が観察された。この試験プラントで起こった亜硝酸型硝化反応を詳細に解析することによる、亜硝酸型硝化反応の実用化に向けた新たな知見の獲得にむけ、本研究では、当試験プラントで観察された亜硝酸型硝化反応を参考に実験室規模リアクター (排水処理マイクロゾム) を構築し、硝化反応の主役である硝化細菌群 (AOB および NOB) の挙動を詳細に解析することとした。亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の挙動との関係性を示し、亜硝酸型硝化反応制

御への提言を行うことを研究の目的とした。

## 2. 研究の流れ

本研究の流れを Fig. 1 に示した。本研究における実験は「実験室規模亜硝酸蓄積型硝化(脱窒)リアクターの構築・運転管理」, 「処理水質の分析」, 「活性汚泥中の硝化細菌群集挙動解析」の3つの部分から構成された。最後に, これら実験から得られた情報をもとに, 「運転条件・処理成績と硝化細菌群集構造の関係性および処理機構の微生物生態学的な解明」を目指し, 最終的には「亜硝酸型硝化反応制御への提言」を目標とした。

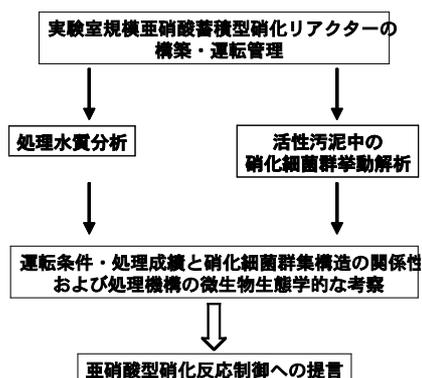


Fig. 1 研究の流れ

## 3. 実験方法

### 3-1. 亜硝酸型硝化リアクターの構築

「1.研究の背景と目的」で紹介した新日本製鐵(株)試験プラントの運転条件を参考に, 実験室規模リアクターにおいて亜硝酸型硝化反応を得ることを目指した。実験に用いたリアクターセットを Fig. 2 に示した。また, 運転の基本となる条件は Table. 1 に示した。流入排水は模擬排水とした(Table. 2)。リアクターに投入した活性汚泥(微生物群集)は新日本製鐵(株)より分与いただいた。

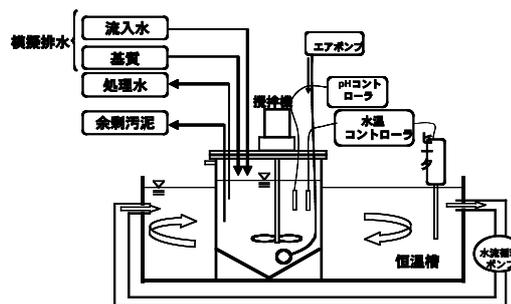


Fig. 2 リアクターセット模式

Table 1 リアクター基本運転条件

|      |   |
|------|---|
| 有効容量 | 5L  |
| 系    | 連続回分式   |
| HRT  | 16時間  |
| SRT  | 20日   |
| 水温   | 30℃   |
| pH   | 80g NaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> を用いて下限のみ制御 |
| 曝気量  | 3L min <sup>-1</sup>                              |

Table 2 リアクター運転条件の履歴

| 処理サイクル                        | 運転開始-74日目   |                                  |                            | 75-111日目                         |                            |                                  | 112-現在 |  |  |
|-------------------------------|---|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------|--|--|
|                               | 合成廃水流入<br>硝化<br>汚泥沈殿<br>放流                        | 合成廃水流入<br>脱窒<br>硝化<br>汚泥沈殿<br>放流 | 合成廃水流入<br>硝化<br>汚泥沈殿<br>放流 | 合成廃水流入<br>脱窒<br>硝化<br>汚泥沈殿<br>放流 | 合成廃水流入<br>硝化<br>汚泥沈殿<br>放流 | 合成廃水流入<br>脱窒<br>硝化<br>汚泥沈殿<br>放流 |        |  |  |
| 模擬排水<br>[mg L <sup>-1</sup> ] | glucose 143                                       | 362                              | 362                        | 362                              | 362                        | 362                              |        |  |  |
|                               | CH <sub>3</sub> COONa 196                         | 565                              | 565                        | 565                              | 565                        | 565                              |        |  |  |
|                               | NaHCO <sub>3</sub> 400                            | 400                              | 400                        | 400                              | 400                        | 400                              |        |  |  |
|                               | NH <sub>4</sub> Cl 600                            | 600                              | 600                        | 600                              | 600                        | 600                              |        |  |  |
|                               | CaCl <sub>2</sub> 50                              | 50                               | 50                         | 50                               | 50                         | 50                               |        |  |  |
|                               | MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 30            | 30                               | 30                         | 30                               | 30                         | 30                               |        |  |  |
|                               | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50                | 50                               | 50                         | 50                               | 50                         | 50                               |        |  |  |
|                               | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 212 | 212                              | 212                        | 212                              | 212                        | 212                              |        |  |  |
|                               | NaCl 14000  | 14000                            | 14000                      | 14000                            | 14000                      | 14000                            |        |  |  |
| pH                            | > 7.2   | > 7.2                            | > 7.2                      | > 7.2                            | > 7.2                      | > 8.0                            |        |  |  |
| 窒素除去状況                        | 硝化  | 硝化脱窒                             | 硝化脱窒                       | 硝化脱窒                             | 硝化脱窒                       | 硝化脱窒<br>→亜硝酸型硝化脱窒                |        |  |  |

### 3-2. 処理水質の分析

処理水質の分析は処理水中の窒素成分に主眼をおいて行った。また, 単にリアクターから放流される処理水質の分析だけでなく, リアクターに模擬排水が流入してから処理水となるまでの時系列的データも採取した。

### 3-3. 硝化細菌群集解析

分子生物学的手法をもちいて硝化反応の主役である AOB および NOB の挙動解析を行った。条件を変更しながら運転管理を続けたリアクターから定期的(1-2週間に1度)に採取した活性汚泥サンプル中の硝化細菌群の定量的解析および定性的解析を行うことで, 運転条件・処理成績と硝化細菌群由来 DNA

の消長、優占種(属)の変化との関係性を見出すことを目的とした。

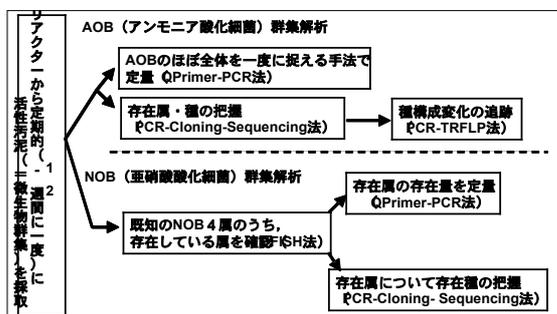


Fig. 3 硝化細菌群集解析フロー

#### a) アンモニア酸化細菌 (AOB) の解析

AOB の解析には、*\_proteobacteria* に属する AOB 種が有する酵素, ammonia monooxygenase をコードする *amoA* を標的とした *amoA*-1F,2R primer set を一貫して使用した。AOB 由来 DNA の定量には QPrimer-PCR を、優占 AOB 種の把握には PCR-cloning-sequencing および PCR-TRFLP を行った。

#### b) 亜硝酸酸化細菌 (NOB) の解析

NOB は系統学的に離れた分類群に散在しており、NOB 種を広く一度に捉える手法は確立されていないため、様々な解析に先立って本リアクター内に優占している NOB 群を決定する必要があった。既知の NOB 属それぞれの 16S rRNA に特異的な probe を用いた FISH により、リアクター内の優占 NOB は *Nitrobacter* 属と決定された。これをうけて *Nitrobacter* 16S rDNA を標的とした FGPS872f-1269r primer set を用いた解析をもって、本研究における NOB 解析とした。NOB 由来 DNA 量の定量には QPrimer PCR を、優占 NOB 種の同定には PCR-cloning-sequencing を用いた。

### 4. 結果と考察

#### 4.1. リアクター運転結果

実験室規模で亜硝酸型硝化反応を得るため

に運転を開始したリアクターは、亜硝酸型硝化反応を示さなかった。運転開始から 2 ヶ月あまりの間亜硝酸型硝化反応が得られなかったため、運転条件の変更を数度行った (Table 2)。まず、硝化プロセスの前段に脱窒プロセスを導入した。これは脱窒工程の導入が NOB の生育を抑制することを期待した変更であった。しかし、亜硝酸型硝化反応は得られなかった。次に、pH の下限値を上げた。これは、より高い pH で選択的に NOB 活性を阻害できるという知見に基づいた操作であった。pH 変更後、約 1 ヶ月目 にほぼ完全な亜硝酸型硝化反応を得ることに成功し、その後本研究終了時までその状態を維持した (Fig. 4)。

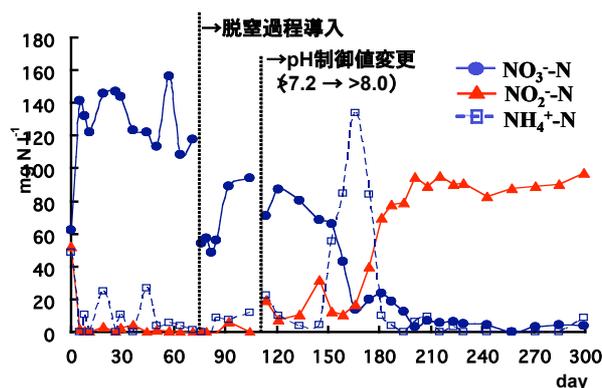


Fig. 4 リアクター処理水中の溶存態窒素濃度の変動

#### 4.2. 硝化細菌群集解析

AOB および NOB 由来 DNA 定量結果を Fig. 5 に示した。NOB (*Nitrobacter* 16S rDNA コピー) 数は 159 日目までは  $10^6$  copies/ 1mL mixed liquor 程度を維持したが、処理水中の高濃度の亜硝酸態窒素蓄積に少し遅れるようにして  $10^5$  copies/ 1mL mixed liquor 以下まで減少し、亜硝酸型硝化反応との関連性を示唆した。一方 AOB (*amoA* コピー) 数には、NOB (*Nitrobacter* 16S rDNA コピー) 数のような大きな変動はみられなかった。処理水中へアンモニア態窒素が蓄積しはじめる直前から処理水中アンモニア態窒素が最大にな

るまで (133-166 日目) において, AOB(*amoA* コピー)数が漸減しているが, その変動はアンモニア酸化活性が安定している時期と比べて特に大きなものではなかった。

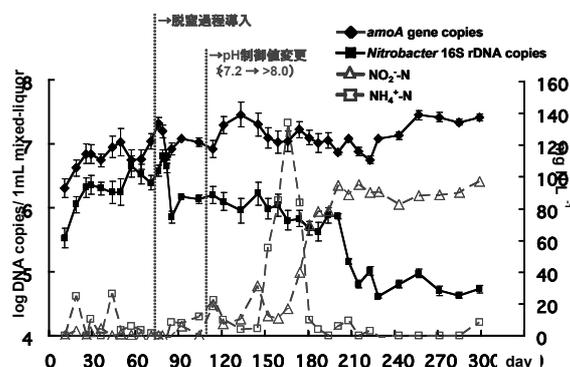


Fig. 5 AOB 由来由来 DNA および NOB 由来 DNA 量とリアクター処理水中の溶存態窒素濃度の変

リアクター水質モニタリング結果, および NOB (*Nitrobacter* 16S rDNA コピー) 数の変動に注目した運転期間中各時期における単位 NOB あたりの亜硝酸酸化活性を算出した (Table.3)。その結果, 本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応は単位 NOB あたりの亜硝酸酸化活性が失活したことをきっかけに起こったこと, その後の亜硝酸型硝化反応の安定的な維持は, 単位 NOB あたりの亜硝酸酸化活性の低下によるものではなく, NOB の細胞数の減少によって起こったことが示唆された。

AOB は, その存在量には大きな変動は見られなかったが, 種構成にはダイナミックな変動が確認された。PCR-Cloning-Sequencing により 92 日目 (完全硝化型) の汚泥から得られた 40 クローン全てが *Nitrosococcus mobilis* に近縁であり, 257 日目 (亜硝酸型) の汚泥から得られた 40 クローン中 28 クローンが *Nc. mobilis* に, 12 クローンが *Nitrosomonas eutropha* に近縁であったことから完全硝化型と亜硝酸型の汚泥では  $\beta$ -AOB 種構成が異なることが示された。PCR-TRFLP による解析から,  $\beta$ -AOB の種構成変化

が現れたのはアンモニア酸化活性が回復を始めた 181 日目ごろと推察された (Fig. 6)。

Table 3 単位 NOB あたりの亜硝酸酸化

| リアクター運転日 | NOB (Nitrobacter) の状態 | 16S rDNAあたりの硝化生成速度                        | 単位 NOB あたりの硝化生成速度                         |
|----------|-----------------------|---|---|
|          |                       | (mg NO <sub>2</sub> -N/ mg dry cell/ day) | (mg NO <sub>2</sub> -N/ mg dry cell/ day) |
| 19 日目    | 完全硝化反応                | 増加傾向                                      | $2.64 \times 10^{-2}$                     |
| 104 日目   | 完全硝化反応                | 安定  | $1.68 \times 10^{-2}$                     |
| 201 日目   | 亜硝酸型硝化反応              | 減少傾向                                      | $2.71 \times 10^{-2}$                     |
| 271 日目   | 亜硝酸型硝化反応              | 安定  | $1.59 \times 10^{-2}$                     |

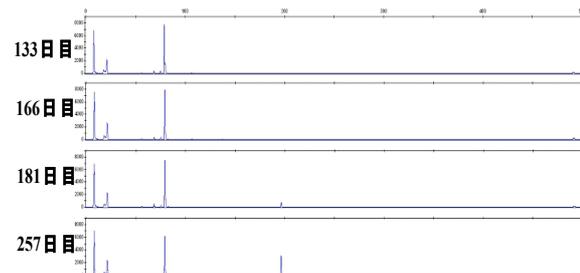


Fig. 6 PCR-TRFLP による AOB 種構成変動の追跡; 181 日目以降, 矢印で示したピークが出現し

## 5. まとめ

本研究における最大の成果は, 詳細な水質モニタリングと硝化細菌群集解析により, リアクターのパフォーマンス (完全硝化反応 or 亜硝酸型硝化反応) と硝化細菌の挙動の関係を丁寧に記述できたことである。特に, 定量的 PCR 法によって得られた NOB 存在量の情報と水質モニタリング結果から判断された単位 NOB あたりの亜硝酸酸化活性から, 本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応の実態に迫ることができた。また完全硝化型から亜硝酸型への硝化反応の遷移過程において, AOB の種構成変化を捉えることができたのは, AOB と NOB の相互関係を考える上で大変興味深いことであった。

一方で, 本研究で得られた亜硝酸型硝化反応の実現に必要な運転管理条件を明確にすることはできなかった。亜硝酸型硝化反応の直前に観察されたアンモニア酸化活性の失活は, 何によってもたらされたのか, 直後の亜硝酸型硝化反応へ寄与した現象であったのか, について紐解くことが今後の課題である。