

**亜硝酸型硝化-完全硝化反応の制御と  
その遷移過程における硝化細菌の挙動解析**  
Control of Partial- and Complete-Nitrifications and  
Behavior of Nitrifiers in the Transition

学籍番号	4 6 8 8 2
氏名	金井 佑樹
指導教官	味埜 俊

### 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、水域へ排出される廃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廃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。硝化脱窒法は、自然界での窒素循環に関わる微生物、すなわち硝化細菌群と脱窒細菌群の特性を活かした生物学的窒素除去法である。

硝化脱窒法では、廃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 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) を経て硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) まで酸化 (硝化) した後に、その硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) を脱窒細菌群によって窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) まで還元 (脱窒) することで廃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。

この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。この反応に付随し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

が理論上ではそれぞれ 25%、40%削減できることになる。

ところで、消化を担う硝化細菌群は大きく二つのグループに分けられる。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) である。亜硝酸型硝化反応実現のためには、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は、現在まで主に、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<sup>1)</sup>、水温を高温 (30-40°C) に保つ方法<sup>2)</sup>、酸素濃度を低くする (曝気量を小さくする)<sup>3)</sup> 方法などが検討されている。しかし、相対的に AOB よりも NOB の方がより少ない栄養条件下で生育できる<sup>4)</sup> 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、製鐵過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」の硝化脱窒方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。そして田中ら<sup>1)</sup>はこの試験プラントをモデルにして構築した実験室

規模リアクターにおいて同様の亜硝酸型硝化反応を再現できた。このリアクターにおける亜硝酸型硝化反応を詳細に解析することにより、亜硝酸型硝化反応の実用化に向けた新たな知見の獲得が期待できる。

本研究では、そのリアクターにおいて亜硝酸型硝化・完全硝化を決定する要因を究明することを目的として、このリアクターの運転条件を変更し、その影響を調べた。また、微生物学的知見を得ることを目的とし、亜硝酸型硝化から完全硝化に遷移する過程における亜硝酸酸化細菌の挙動を解析した。亜硝酸型硝化反応及び完全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

本研究における実験は「実験室規模 SBR での亜硝酸型硝化運転および完全硝化運転」、「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る。

「実験室規模リアクターの亜硝酸型硝化運転および完全硝化運転」では、亜硝酸蓄積型硝化反応から完全硝化反応および完全硝化反応から亜硝酸型硝化反応への切り替えの原因となるキーファクターの解明を目指し、様々な条件での運転を試みた。

「処理水質の分析」では、リアクターの処理水質を定期的に測定し、運転条件と処理水質の関係性を検討することとした。

「活性汚泥中の硝化細菌群挙動解析」では、リアクターから継続的にサンプリングした活性汚泥（微生物群集）中の硝化細菌群を、定量的・定性的に解析し、亜硝酸型硝化反応に寄与する硝化細菌群のふるま

いを把握することを目的とした。また、亜硝酸酸化細菌（NOB）の解析手法は発展途上であり、その遺伝的多様性から網羅的な解析方法をもたない。本研究では従来の遺伝学的アプローチとともに新たな機能的アプローチとして RNA-SIP 法による NOB 解析の適用を試みた。

## 3. 実験方法

### 3-1. 実験室規模リアクター（SBR）の運転条件及び人工廃水組成

実験に用いたリアクターセットを Fig. 2 に示した。亜硝酸型硝化反応が行われていた SBR (R1) から 587 日目、633 日目に汚泥を分配して同様の2つの SBR (R2, R3) の運転を開始した。638 日目までは全ての装置を、同じ組成の流入水 (Glucose: 143mgL<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub>COONa: 196mgL<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>Cl: 600mgL<sup>-1</sup>, NaCl: 14000mg L<sup>-1</sup>), SRT20 日, HRT=16 時間, 水温 24-28°C, pH>8., 0 ばっ気量 0.6 L L<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, 運転サイクル 8 時間 (沈殿・放流・流入 1 時間+脱窒 2 時間+好気 5 時間) で運転した。683 日目以降は pH、脱窒の有無、および好気工程開始時に亜硝酸を添加するといった条件変更を行った (表 1)。

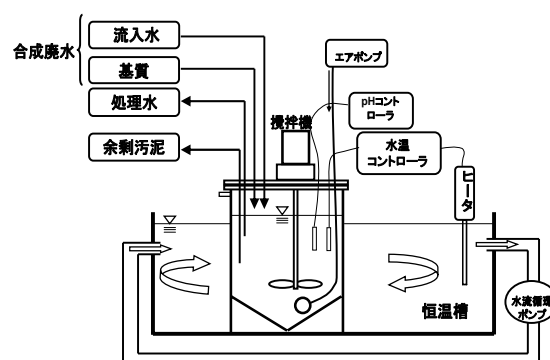


Fig. 1 SBR 概観図

### 3-2. 処理水質の分析

処理水質の分析は窒素成分に主眼を置いて行うこととした。分析項目は  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , 溶存有機態炭素 (TOC) とした。

### 3-3. 硝化細菌群集挙動解析

硝化反応を担う AOB および NOB の挙動解析は、それぞれ TRFLP 法に AOB 群集構造の定性解析、Real-time PCR 法を用いて NOB 由来の DNA 量を定量解析することによって評価した。AOB 由来 DNA の定性解析には ammonia monooxygenase をコードした *amoA* gene を標的にした FAM-*amoA*-1F, 2R プライマー<sup>2)</sup> を用いた。NOB 由来 DNA の定量には *Nitrobacter* 属レベルで特異的な 16S rDNA を標的とした FGPS プライマーセット<sup>3)</sup> を用いた。また、同時に硝化細菌の数だけでなく、活性も評価するという目的で 16SrRNA を逆転写処理して獲得した cDNA を同様の手法で定量した。NOB への RNA-SIP の適用には、亜硝酸型硝化時の 483 日目の汚泥と完全硝化時の 707 日目の汚泥を用いた。Table2 の合成廃水組成のうち、glucose と  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を除き、 $^{13}\text{C}$  標識した  $\text{NaHCO}_3$  と  $\text{NaNO}_2$  579mg  $\text{L}^{-1}$  を含む培地で汚泥を 7 日間培養して NOB を  $^{13}\text{C}$  標識した。

## 4. 結果と考察

### 4.1 亜硝酸型硝化に影響を与えた因子

脱窒工程をなくした R1-b および R3-b で亜硝酸型硝化反応から完全硝化反応に変化した。一方、脱窒工程を維持し pH のみを低下させた R2-b では亜硝酸型硝化のままであった。このことから、また、脱窒工程を再度導入した R1-c, R3-c において亜硝酸型硝化に回帰したことから、pH ではなく脱窒工

程の有無が決定因子であったと考えられる。脱窒工程が亜硝酸酸化細菌の活性に影響を与える機構として、利用可能な酸素や亜硝酸が不足していた可能性があると考えた。そこで、前者は送気量の増加 (R3-d), 後者は好気開始時亜硝酸添加 (R2-c) を行った。しかし、いずれの場合も亜硝酸型硝化のままであった。脱窒工程の導入が亜硝酸酸化細菌に影響を与える機構は、好気槽滞留時間の不足, あるいは酸素不足状態でのストレス<sup>4)</sup> など他の要因によると考えられる。

### 4-3. 硝化細菌群集挙動解析

運転期間を通じて優先 AOB の群集構造に変化はなかった。

亜硝酸型硝化から完全硝化への遷移時 (R1-b, R3-b) には, *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数の増加が観察された。しかし, R1-c, R3-c で再び亜硝酸型硝化に戻っても, *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数は維持されていた。亜硝酸酸化活性と DNA コピー数の間に明確な関連性は認められなかった。単位細胞あたりの亜硝酸酸化活性は, 亜硝酸型硝化時, 完全硝化時ともに既往の文献値<sup>5)</sup> と同等か小さかった。

## 5. まとめと今後の予定

本研究で運転したリアクターでは脱窒時間の導入が亜硝酸型硝化反応の引き金となっていた。脱窒工程の導入がどのような仕組みで NOB の活性に影響を与えたのか、さらなる追求が必要である。

また、本研究ではこれまで *Nitrobacter* 属の NOB のみを対照としてきたが、リアクター内に他の NOB が存在している可能性もある。今回は間に合わなかった RNA-SIP 法による活性汚泥中の NOB の同定を行なう。

Table1 亜硝酸型硝化反応における制限要因の検討因子

		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		生物反応時間		送気量 L/(L・min)	好気初亜硝酸 添加濃度
		開始日 mg L <sup>-1</sup>	pH	脱窒 hr	好気 hr		
R1	a	112-	212	>8.0	2	5	0.6
	b	574-	0	同上	同上	同上	同上
	c	640-	同上	>7.2	0	7	同上
	d	714-	同上	同上	2	5	同上
R2	a	587-	0	>8.0	2	5	0.6
	b	640-	同上	>7.2	同上	同上	同上
	c	721-	同上	同上	同上	同上	有(100mgN/L)
R3	a	633-	0	>8.0	2	5	0.6
	b	640-	同上	同上	0	7	同上
	c	661-	同上	同上	2	5	同上
	d	721-	同上	同上	同上	同上	1.2

Table.2 合成廃水組成 (mgL<sup>-1</sup>)

glucose	362
CH <sub>3</sub> COONa	565
NaHCO <sub>3</sub>	400
NH <sub>4</sub> Cl	600
CaCl <sub>2</sub>	50
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	212
NaCl	14000

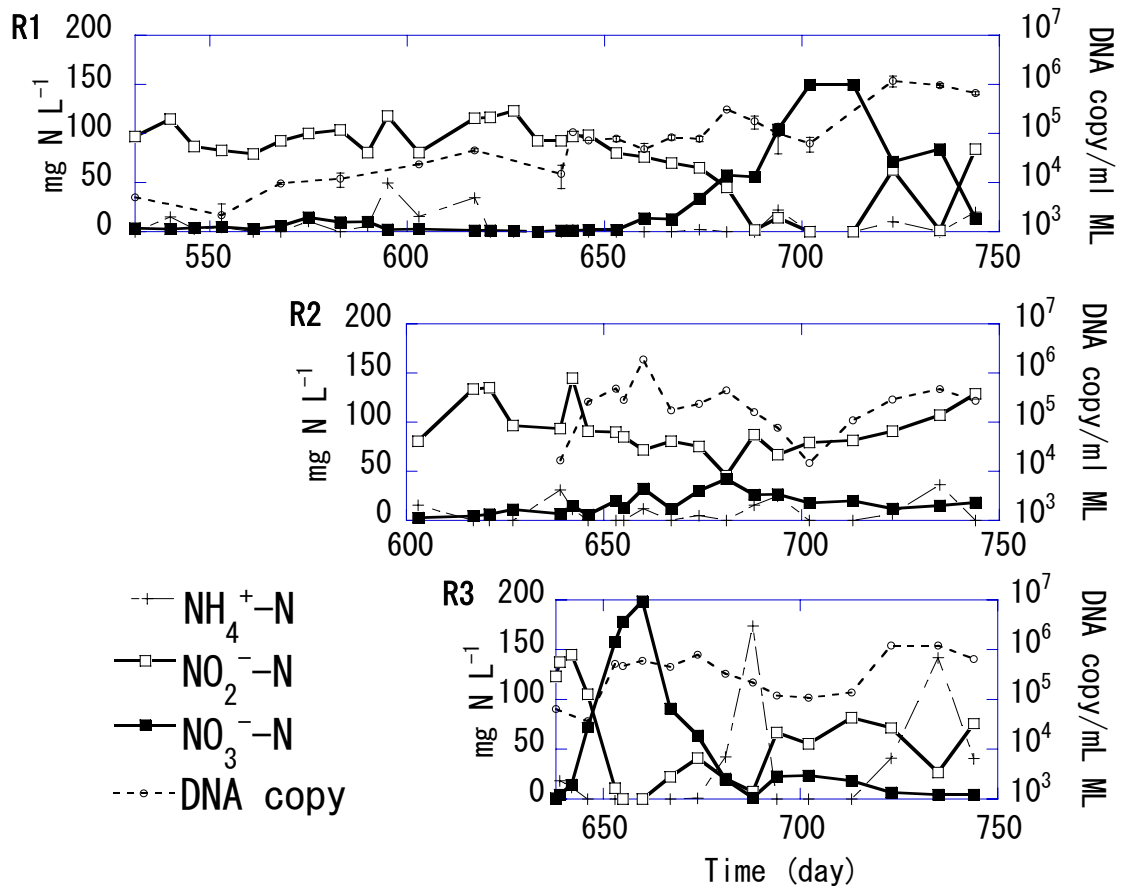


Fig.2 各リアクターにおける処理水中溶存態窒素濃度と *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数の経時変化

引用文献 1) 田中ら, 2006, 第40回水環境学会講演集, p37. 2) Rotthauwe et al., 1997, AEM, 63, 4704-4712. 3) Degrange and Bardin, 1995, AEM, 61, 2093-2098, 4) Mota et al., 2005, AEM, 71, 8565-8572. 5) Sorokin et al., 1998, Archives of Microbiology, 170, 345-352.