

2006 年度 修 士 論 文

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

金井 佑樹

Kanai, Yuki

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学研究系 社会文化環境専攻

目次

第1章 序論

- 1.1 はじめに
- 1.2 研究の目的
- 1.3 研究の流れと本論文の構成

第2章 既往の知見

- 2.1 自然界における窒素循環と微生物
- 2.2 水中からの生物学的窒素除去
 - 2.2.1 生物学的排水処理
 - 2.2.2 生物学的窒素除去
 - 2.2.3 亜硝酸型硝化反応と新規生物学的窒素除去
- 2.3 独立栄養硝化細菌
 - 2.3.1 アンモニア酸化細菌
 - 2.3.2 亜硝酸酸化細菌
- 2.4 亜硝酸型硝化反応 (Partial-nitrification) に影響を与える因子
 - 2.4.1 pH
 - 2.4.2 遊離アンモニア
 - 2.4.3 溶存酸素
 - 2.4.4 温度
 - 2.4.5 塩濃度
 - 2.4.6 チオ硫酸
 - 2.4.7 複合的な影響
- 2.6 分子生物学的手法を用いた環境微生物群集解析
 - 2.6.1 環境からのDNA・RNAの抽出
 - 2.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) 法
 - 2.6.3 Cloning
 - 2.6.4 Real-time PCR
 - 2.6.5 Terminal Restriction Fragment Length (T-RFLP)
 - 2.6.6 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) 法
 - 2.6.7 RNA-SIP (Stable Isotope probing) 法

第3章 実験方法

- 3.1 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの運転
 - 3.1.1 リアクターの運転条件
 - 3.1.2 リアクターの水質モニタリング
- 3.2 ルンゲ=クッタ法による数値シミュレーション
- 3.3 硝化細菌群集解析
 - 3.3.1 活性汚泥サンプルの採取
 - 3.3.2 FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization)
 - 3.3.3 核酸の抽出

3.3.4 PCR primer の選定とPCR 条件

3.3.5 QPrimer-PCR

3.3.6 PCR-TRFLP

3.3.7 RNA-SIP

第4章 亜硝酸型硝化に影響する因子の検討

4.1 実験室規模活性汚泥リアクター実験結果

4.1.1 リアクター水質モニタリング結果

4.1.2 1サイクルあたりの窒素化合物モニタリング結果

4.2 考察

4.2.1 運転条件の変更と処理成績の変化

4.2.2 亜硝酸型硝化反応の律速因子

4.2.2.a 流入水中のチオ硫酸イオンの有無と亜硝酸型硝化反応

4.2.2.b pHと亜硝酸型硝化反応

4.2.2.c 脱窒工程と亜硝酸型硝化反応

4.2.2.d ばっ気量と亜硝酸型硝化反応

 ルンゲ=クッタ法による数値シミュレーション

4.2.2.e 亜硝酸の供給と亜硝酸型硝化反応

4.4 まとめ

第5章 硝化細菌群集解析

5.1 PCR-TRFLP によるAOB 種構成変化の追跡

5.2 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) 群集解析結果

5.2.1 FISH による優占NOB 属の同定

5.2.2 QPrimer-PCR による *Nitrobacter* 由来16S rDNA・RNA コピー数の定量

5.2.3 RNA-SIP, PCR-Cloning-Sequencing によるNOB 存在種の同定

5.3 考察

5.3.1 リアクター処理水質の変動と硝化細菌由来DNA コピー数の変動

5.3.2 亜硝酸酸化速度と *Nitrobacter* 数の変動

5.3.3 リアクター処理水質の変動とNOB 種構成変化

5.4 まとめ

第6章 総括

6.1 研究成果と総合考察

6.2 課題と展望

謝辞

引用文献

付録：水質モニタリング全データ

第1章 序論

1.1 はじめに

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かかわる微生物、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、硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) を脱窒細菌群によって窒素ガス (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、1 mol のアンモニア態窒素を除去するのに2 mol の酸素 (O_2) と5 mol の還元力 ($[\text{H}]$) が必要となる。

この硝化脱窒法を効率的化する微生物反応として亜硝酸型硝化反応 (partial nitrification) 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)、通常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)。また、亜硝酸型硝化反応の安定的な制御は、1995年にオランダ・デルフト工科大学の研究グループにより報告された嫌気性アンモニア酸化 (Anaerobic Ammonium Oxidization; anammox) (Mulder et al. 1995) とよばれる、アンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を基質とした脱窒反応を利用した最も先進的な生物学的窒素除去法の実用化に不可欠な要素でもある。

ところで、硝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、現在まで主に、遊離アンモニア (NH_3) や亜硝酸 (NO_2^-) を高濃度に保つ方法 (Anthonisen et al. 1976)、水温を高温 (30-40°C) に保つ方法 (Hellings et al. 1998)、溶存酸素濃度を低くする (曝気量を小さくする) 方法 (Kuai & Verstraete 1998) などが検討されている。しかし、相対的にAOBよりもNOBのほうが基質親和性が高い (Rittmann & McCarty 2001) 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。この試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応の詳細な解析は、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繋がると期待され、当研究室においてこれまで研究されてきた。高崎 (2005) は新日本製鐵ミニプラントにおける亜硝酸酸化細菌の挙動を解析し、田中 (2006) はこのミニプラントをモデルに実験室規模活性汚泥リアクターを構築し、亜硝酸型硝化脱窒反応を再現した。

本研究では、田中が構築した実験室規模活性汚泥リアクターを使用して、様々な条件で運転して詳細な水質モニタリングを行い、亜硝酸型硝化反応の制限要因を突き止めるとともに、硝化反応の主役である硝化細菌群（AOB およびNOB）の挙動を解析することとした。そして、本リアクターにおいて得られ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目指した。

1.2 研究の目的

本研究の目的は以下の3点に集約される。

- 1) 実験室規模活性汚泥リアクターにおいて亜硝酸型硝化反応および完全硝化型反応を得る。
- 2) 1)のリアクターにおける硝化細菌群集の挙動を解析し、亜硝酸型硝化反応、完全硝化型反応と硝化細菌群集の関係性を見出す。
- 3) 1), 2)を踏まえ、亜硝酸型硝化反応と完全硝化型反応を制限する要素を記述する。

1.1 で既述の通り、亜硝酸型硝化反応についての研究報告は少なくないが、その安定的な制御方法は確立されていない。よって、本研究における最大の難所が目的1)であった。リアクターの運転管理条件は、新日本製鐵（株）の試験プラントにおけるそれを参考にし、目的の達成を目指した。また目的2)への取り組みとして、分子生物学的手法を用いてリアクター内硝化細菌群集の定量的・定性的な解析を行い、構築したリアクターにおける水質モニタリング結果とあわせた考察を行った。また3)では1)・2)を踏まえ、安定的に亜硝酸型硝化反応を維持するための条件を整理することで、亜硝酸型硝化反応の実用化へ向けた提言を行うことを狙いとした。

1.3 研究の流れと本論文の構成

本研究の流れをFig. 1-1 に示した。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及び完全硝化運転**」，「**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SBRでの亜硝酸型硝化運転及び完全硝化運転**」では、研究の土台となる亜硝酸型硝化(脱窒)反応を行う廃水処理反応槽を様々な条件下で運転し、亜硝酸型硝化・完全硝化反応を決定する要因を究明した。

「**処理水質の分析**」では、構築された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集挙動解析**」では、リアクターから定期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、硝化細菌群集の挙動を捉えることを目的とした。

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考察**」を行い、最終的には「**亜硝酸型硝化反応制御要因の解明**」を目標とした。

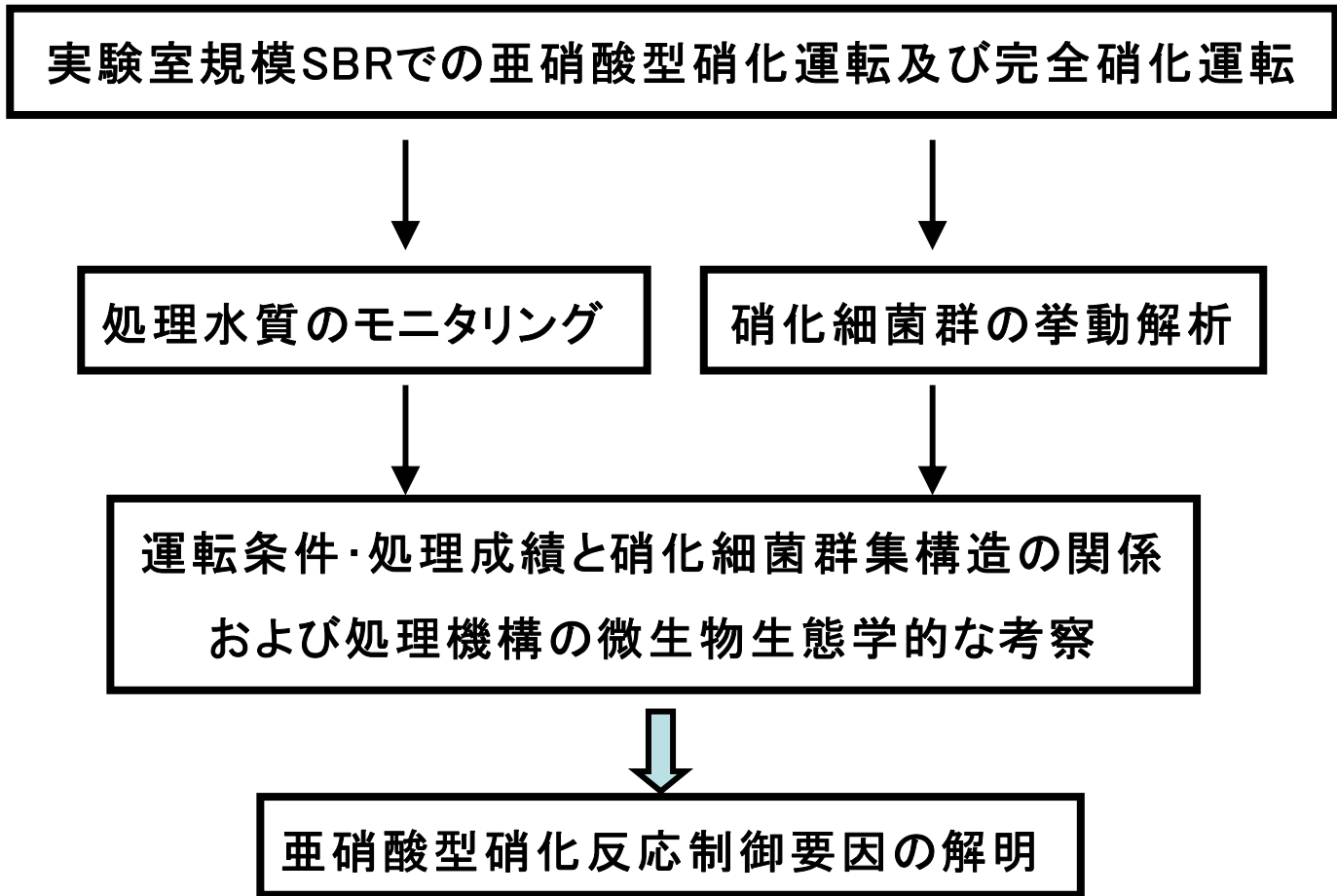


Fig. 1-1 研究の流れ

本論文は全6章から構成される。各章を概説する。

第1章 序論

本章。研究背景およびその目的等。

第2章 既往の知見

本研究に関わる既往の研究報告を簡潔にまとめた。

第3章 実験方法

本研究で用いた実験材料、実験方法について詳説した。

第4章 亜硝酸型硝化に影響する因子の検討

第1章1.2で述べた目的1)に関する研究成果をまとめた。実験室規模のリアクターにおいて亜硝酸型硝化反応および完全硝化型反応を得るまでの水質モニタリング結果と運転管理条件から、本リアクターで観察された硝化反応について考察した。

第5章 硝化細菌群集解析

第1章1.2 目的2)に関する研究成果をまとめた。第4章で構築されたリアクターにおける硝化細菌（アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌）の挙動解析結果を示し、リアクター水質モニタリング結果と併せた考察から、本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応と硝化細菌群集の挙動との関係性について考察した。

第6章 総括

本研究全体の成果と、本研究が為しえなかった部分についてまとめた。

第2章 既往の知見

本章では、本研究にかかわる既往の知見について整理した。

2.1 自然界における窒素循環と微生物

自然界における窒素循環とそれに関わる微生物についての概念図を Fig. 2-1 に示した。われわれを取り巻く大気の主成分は窒素である。生物は、生体を構成する核酸、アミノ酸等の合成に窒素を必要とするが、ほとんどの生物は大気中の窒素 (N_2) を直接利用することはできない。シアノバクテリアやある種の植物の根に共生する土壌細菌などの少数の生物のみが大気中窒素をアンモニア (NH_3 , NH_4^+) に変換 (窒素固定) し、利用できる。ある微生物はそのようにしてできたアンモニアを酸化し、亜硝酸 (NO_2^-) や硝酸 (NO_3^-) を生成する (硝化)。また、ある微生物は硝酸を還元し、窒素を再び窒素分子 (N_2) として大気中に放出する (脱窒)。より高次の生物、たとえば植物はこのような循環サイクルのなかで生成されたアンモニアや硝酸を窒素源として根から吸収・利用 (同化・有機化) し、脊椎動物は植物が合成したアミノ酸などを摂取することで生体を維持する。生体が分解されると有機化された窒素は再び無機態窒素として循環される。

2.2 生物学的窒素除去

1.1 で述べたように、微生物が自然界における窒素循環に寄与するところは大きい。このような微生物の働きを利用した窒素除去法が、実下水処理を中心に活用されている。以下に生物学的手法を利用した排水処理システム、窒素除去システムについて概説する。

2.2.1 生物学的排水処理

自然界における物質循環に寄与する生物を集中させた排水の浄化することを生物学的排水処理という。代表的な生物学的排水処理法に、本研究でも用いた活性汚泥法がある。活性汚泥法には様々な変法が存在するが、その基本形は、高濃度の微生物群集 (=活性汚泥) を維持した処理槽内に大量の酸素を供給し (曝気)、排水中有機物の微生物による酸化分解を促進するもの (標準活性汚泥法, Fig. 2-2) である。

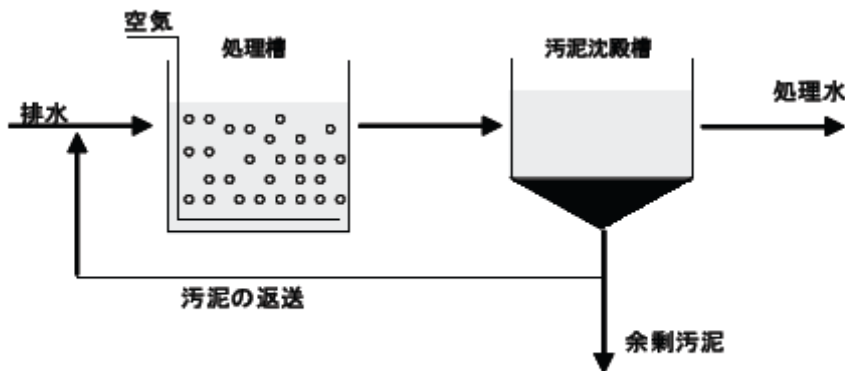


Fig. 2-2 標準活性汚泥法

2.2.2 生物学的窒素除去

実排水処理場などに広く普及している生物学的窒素除去法の一つに活性汚泥を用いた硝化脱窒法がある。本法は、標準活性汚泥法 (Fig. 2-2) において自然界における窒素循環に関わる微生物の働きを強調させる工夫を取り込んだものである。

Fig. 2-3 に最も単純な硝化脱窒法を示した。標準活性汚泥法と異なり、硝化脱窒法では、好気(硝化)槽と嫌気(脱窒)槽の二つの処理槽が必要となる。好気槽では、有機成分が酸化分解されるとともに溶存態窒素の主成分であるアンモニア態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) が亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) を経て硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) まで酸化(硝化)される。嫌気槽では、硝化槽で生成された硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) が分子状窒素 (N_2) まで還元(脱窒)される。

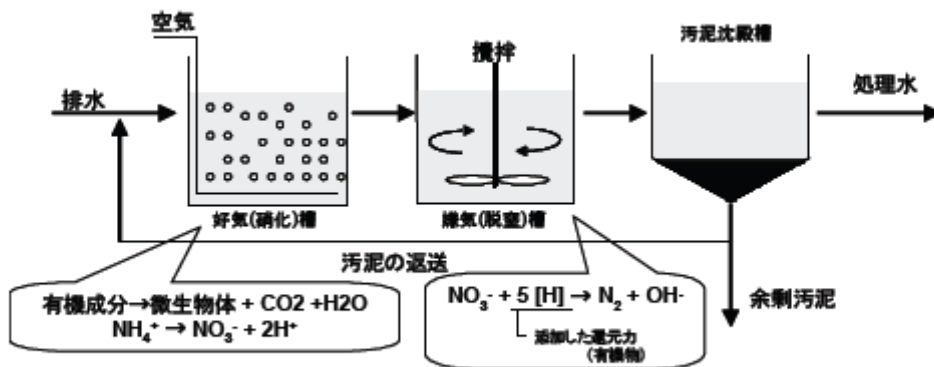


Fig. 2-3 硝化脱窒プロセス

硝化脱窒法に関わる微生物反応を次式 2.1 から 2.3 に示した。硝化反応が要求する酸素量は大きく、1mol のアンモニアを完全に硝化するには 3mol の分子状酸素が必要となり、副産物として H^+ が生成されるので処理槽内の pH が低下する (式 2.1, 2.2)。また、脱窒反応には電子供与体 (還元力) が必要であり、1mol の硝酸を分子状窒素まで完全に脱窒するためには 5mol の水素の還元力に相当する (式 2.3)。硝化反応とは反対に副産物として OH^- を生成され、pH が上がる。



脱窒の際に要求される電子供与体（還元力）には通常メタノールや酢酸などの安価な有機物が利用される。しかし、排水中の有機成分を有効に活用することができれば、還元力の添加に伴うコストや手間を削減できる。Fig. 2-4 に示した、硝化脱窒法の変法である硝化液循環式硝化脱窒法はこの考えに立った合理的な手法である。

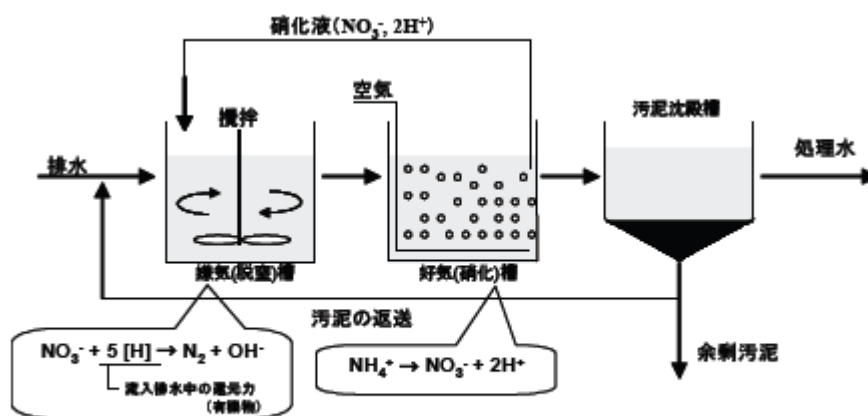


Fig. 2-4 硝化液循環式硝化脱窒プロセス

硝化液循環式硝化脱窒法では、流入排水はまず嫌気条件の脱窒槽に導かれ、後段の硝化槽から循環される硝酸を含んだ循環水と混合される。こうすることによって、排水中の有機成分を利用した脱窒が実現でき、有機成分と脱窒による窒素除去を同時に行える。脱窒工程を終えた汚泥混合液は後段の硝化槽に送られ、残存する有機成分の酸化分解とアンモニア態窒素の硝化が起こる。また、硝化液を循環させることで硝化反応や脱窒反応で起こる pH の変動が低く抑えられる。本法は、処理プロセスの合理性と装置の構造のシンプルさから、実下水処理において普及している。

2.2.3 亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) と新規生物学的窒素除去法

2.2.2 で紹介した、微生物による硝化脱窒反応を利用した手法に対して、より洗練された生物学的窒素除去法がいくつか提案されている。本研究が注目した亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) は、提案されている新規生物学的窒素除去法の肝になる反応である。

(1) 亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification)

亜硝酸型硝化反応とは、硝化反応の基質とアンモニア ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) を硝酸 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) まで酸化せず、亜硝酸 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) までの酸化で停止させた反応を指す。

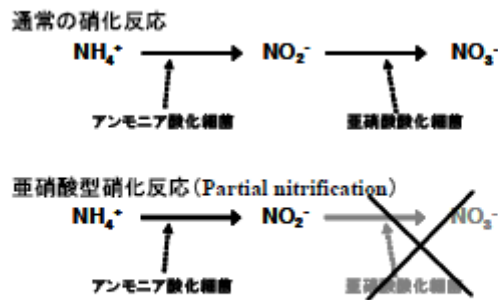


Fig. 2-5 亜硝酸型硝化反応の概念

Fig. 2-5 に示したように、通常の硝化反応はアンモニア酸化細菌によるアンモニア (NH_4^+) の亜硝酸 (NO_2^-) までの酸化と、亜硝酸酸化細菌による亜硝酸 (NO_2^-) の硝酸 (NO_3^-) までの酸化という、連続した二段階の反応からなる。つまり、亜硝酸型硝化反応の実現は、硝化反応の過程から亜硝酸酸化細菌による亜硝酸の酸化が選択的に排除されたときになされる。しかし、安定した亜硝酸型硝化反応を得るための手法が現時点ではほとんど確立されておらず (本章 2.4 参照)、排水処理への実用には至っていない。以降述べる新奇生物学的窒素除去法には、この亜硝酸型硝化反応を利用したものが多くあり、この反応の制御の確立がより洗練された手法の実現の大きな課題となっている。

(2) 新規生物学的窒素除去法

現在研究が進められている生物学的窒素除去法は、Fig. 2-6 で示した二つの概念を踏襲したものである。

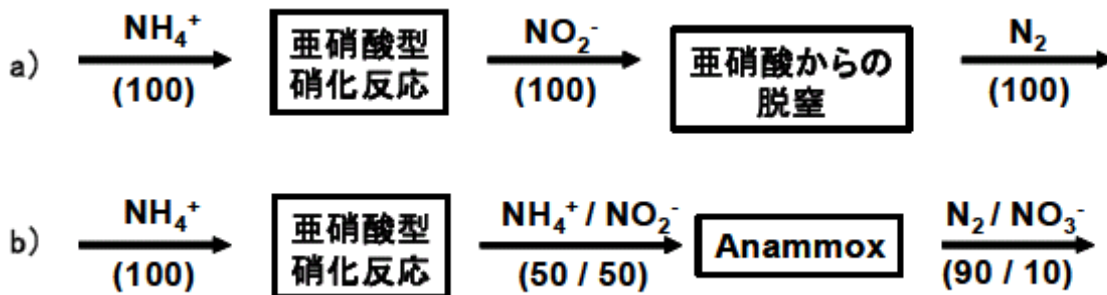


Fig. 2-6 新規生物学的窒素除去法の概念

Fig. 2-6a) は、亜硝酸型硝化反応を利用したもっとも基本的な生物学的窒素除去法である。硝化反応を亜硝酸の生成までで止め、亜硝酸から脱窒反応を行うことで、理論的に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。

Fig. 2-6b) における anammox とは anaerobic ammonium oxidation (嫌気性アンモニア酸化細菌) の略称であり、現在もっとも注目を集めている微生物反応のひとつである。

anammox は、等モルのアンモニアと亜硝酸から窒素分子を生成するため、有機物などの電子供与体を必要とする従来の脱窒反応とは一線を画する。しかし、anammox 反応を行う微

生物の増殖速度はきわめて小さく、いかに処理槽内に高濃度の菌体を集積するかが課題となっている。

以下に、Fig. 2-6 の概念をもとに現在までに提案されている新規生物学的窒素除去プロセスの代表的なものを紹介する。

SHARON (Single reactor system for high rate ammonia removal over nitrite)

亜硝酸型硝化反応を実現した数少ないプロセスの一つである。高濃度アンモニアの存在下で、溶存酸素 (DO) 0.4mg/L 以下 (Schmidt et al., 2003), 温度 26°C 以上, pH7-8 に制御することで亜硝酸型硝化反応を実現した (Schmidt et al. 2003, Hellinga et al. 1998)。本法は anammox と併用され、実下水処理に利用された実績がある (Mulder et al. 2001)。

Canon (Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite)

亜硝酸型硝化反応と anammox 反応を 1 槽のリアクターで行うプロセス (Schmidt et al., 2003)。好気下でアンモニア酸化反応が起こる際に酸素が消費されることにより嫌気環境が作られることを利用している。

OLAND (Oxygen-limited nitrification and denitrification)

1 槽のリアクターで亜硝酸型硝化脱窒反応 (Fi. 2-6a) を行うというものである (Kuai and Verstraete 1998, Schmidt et al. 2003)。処理槽内の DO を低くコントロールすることのみによっている。

2.3 独立栄養硝化細菌

本研究では、排水処理系における亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) を研究の主題とし、独立栄養硝化細菌に注目した解析を多く行った。独立栄養硝化細菌は、硝化反応の主役であり、アンモニア (NH_3 , NH_4^+) を亜硝酸 (NO_2^-) や硝酸 (NO_3^-) に酸化する過程で生じるエネルギーを用いて炭酸ガスを同化する化学合成独立栄養細菌である。硝化細菌はアンモニアを亜硝酸まで酸化するアンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) と、亜硝酸を硝酸まで酸化する亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) に大別される。

以下に、AOB, NOB についての知見を整理する。

2.3.1 アンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB)

(1) アンモニア酸化細菌の系統分類

現在までに、アンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) として 5 つの属, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio* が知られている (Prosser 1989, Koops et al. 2003)。これらの属名は当初、細胞の外形態と細胞内膜の特徴をもとに決定された。

分子生物学的手法の発展に伴い単離培養された AOB の 16S rRNA 塩基配列を用いた系統解析が行われてきた (Head et al. 1993, Teske et al. 1994; Pommerening-Röser et al. 1996)。その結果, AOB は Betaproteobacteria (β -proteobacteria) あるいは Gammaproteobacteria

(γ -proteobacteria) に分類されることが明らかとなった (Head et al., 1993; Teske, et al., 1994)。

Fig. 2-7 に 16S rRNA に基づく, AOB の系統樹を示した。

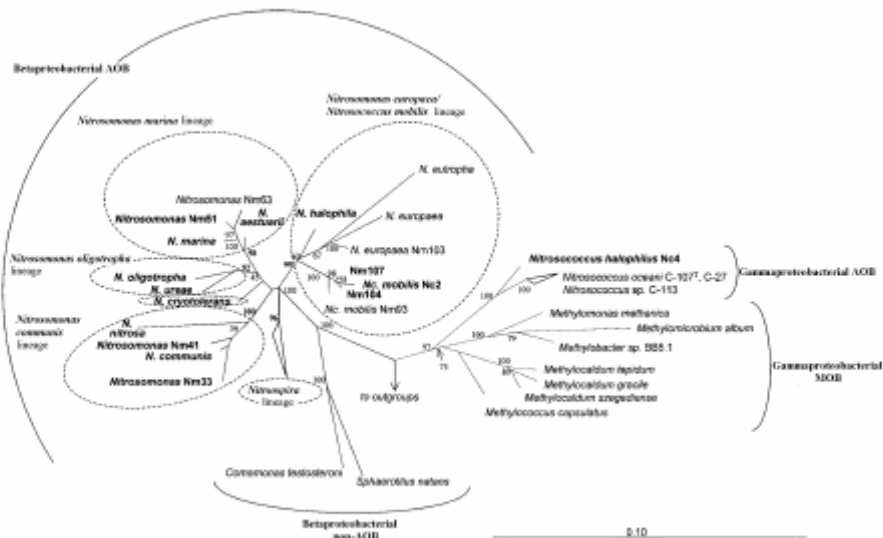


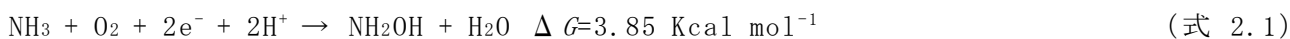
Fig. 2-7 16S rRNA 塩基配列に基づいた AOB の系統関係 (Purkhold et al. 2000 を一部改変)

16S rRNA を用いた系統解析のほかに, AOB が共通して有するタンパク質である ammonia monooxygenase subunit A (AmoA) をコードする遺伝子 (*amoA*) に注目した系統解析も積極的に行われており, 16S rRNA を用いた系統解析との比較から, *amoA* による系統解析は十分に意義のあるものであるとされている (Mc Tavish et al. 1993; Klotz and Norton 1995; Suwa et al. 1997; Purkhold et al. 2000; Aakra et al. 2001, Purkhold et al. 2003)。

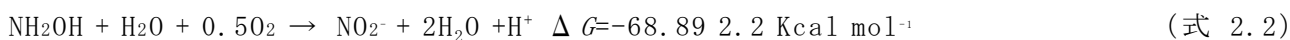
(2) アンモニア酸化細菌の生理学的・生化学的性質

AOB は独立栄養 (化学無機独立) 細菌であり, 2 つの酵素を用いた二段階の化学反応によりアンモニアを亜硝酸へ酸化する際に生成されるエネルギーを利用し, 炭酸ガスを固定することで菌体を生成する (式 2.1, 2.2)。

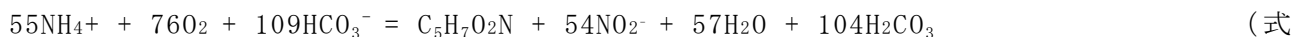
AMO (ammonia monooxygenase) によるアンモニア酸化



HMO (hydroxylamine oxidoreductase) によるヒドロキシルアミン酸化



また, アンモニアの亜硝酸への酸化反応で得られたエネルギーを用いて, 式 2.3 のように炭酸ガスを固定し, 菌体を合成する。



2.3)

(3) アンモニア酸化細菌の分子生物学的研究

AOB の 16SrRNA 系統樹解析の研究がはじめられて以来、次々に PCR primer や, dot-blot hybridization 及び FISH 用の probe が開発されてきた (Koops et al., 2003)。

AOBに限らず、これら primer や probe を用いて環境微生物の解析を行う際には、primer, probe の感受性（より多くの目的微生物を検出できること）と特異性（目的の微生物のみをより選択的に検出できること）が重要となってくる。特に、多様性の研究においては、顕著なバイアスを避けるために高い感受性ほどよく低い特異性が推奨されている (Koops et al., 2003)。

Table 2-1 に現在までに知られている AOB を標的とした primer, probe の代表的なものを一覧で示した。

Table 2-1 AOB に特異的な既存の primer および probe(本表に記載した文献の中には巻末の引用文献一覧に掲載していないものも含まれる)

Primer or Probe	Target	Specificity	Ref.
NM-75	16S rRNA	Terrestrial <i>Nitrosomonas</i> spp. <i>Nitrosococcus mobilis</i>	Hiorns et al.1995
NS-85	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> spp.	Hiorns et al.1995
NmI	16S rRNA	<i>Nitrosomonas communis</i> lineage	Pommerening-Röser et al. 1996
NSMR32f	16S rRNA	<i>Nitrosospira tenuis</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NSMR71f	16S rRNA	<i>Nitrosomonas marina</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NSMR34	16S rRNA	<i>Nitrosospira tenuis</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NSMR76	16S rRNA	<i>Nitrosomonas marina</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NitA	16S rRNA	ΔAOB	Voytek & Ward 1995
ΔAMOf	16S rRNA	ΔAOB	McCaig et al. 1994
NSPM	16S rRNA	ΔAOB	Silyn-Roberts & Lewis 2001
Nm0	16S rRNA	<i>Nitrosomonas</i> spp.	Pommerening-Röser et al. 1996
Nsm 156	16S rRNA	<i>Nitrosomonas</i> spp. <i>Nitrosococcus mobilis</i>	Mobarry et al. 1996
NmV	16S rRNA	<i>Nitrosococcus mobilis</i>	Pommerening-Röser et al. 1996
CTO189f A/B-GC	16S rRNA	ΔAOB	Kowalchuk et al. 1997
CTO189f C-GC	16S rRNA	ΔAOB	Kowalchuk et al. 1997
Nso 190	16S rRNA	ΔAOB	Mobarry et al. 1996
Noli191	16S rRNA	<i>Nitrosomonas</i> cluster 6a	Gieseke et al. 2001
TAOfwd	16S rRNA	Terrestrial AOB	Chandler et al. 1997
NM198	16S rRNA	<i>Nitrosomonas urea</i> <i>Nitrosomonas</i> sp. AL212	Suwa et al. 1997
NmoCL6a_205	16S rRNA	<i>Nitrosomonas</i> cluster 6a	Stephen et al. 1998
NmI	16S rRNA	<i>Nitrosomonas europaea</i> -lineage	Pommerening-Röser et al. 1996
Nmo218	16S rRNA	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> -lineage	Gieseke et al. 2001
TMP1	16S rRNA	AOB	Hermansson & Lindgren 2001
β-AO233	16S rRNA	ΔAOB	Stephen et al. 1998
NspCL1_249	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> cluster 1	Stephen et al. 1998
Nmo254a	16S rRNA	All <i>Nitrosomonas</i>	Stephen et al. 1998
Nmo254	16S rRNA	All <i>Nitrosomonas</i>	Stephen et al. 1998
RT1r	16S rRNA	AOB	Hermansson & Lindgren 2001
AAO258	16S rRNA	Terrestrial ΔAOB	Hiorns et al.1995
Primer 356f	16S rRNA	Nested PCR in NitAB amplicons	Hollibaugh et al. 2002
NmoCL6b_376	16S rRNA	<i>Nitrosomonas</i> cluster 6b	Stephen et al. 1998
Nsp436	16S rRNA	All <i>Nitrosospira</i>	Stephen et al. 1998
NmoCL7_439	16S rRNA	<i>Nitrosomonas</i> cluster 7	Stephen et al. 1998
Nm439	16S rRNA	<i>Nitrosomonas ureae</i> <i>Nitrosomonas</i> sp. AL212	Suwa et al. 1997
NitD	16S rRNA	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Ward et al. 1997
NMOB1f	16S rRNA	<i>Nitrosococcus mobilis</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NSMR52f	16S rRNA	<i>Nitrosomonas europaea</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
Nev 443	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> spp.	Mobarry et al. 1996
NspCL4_446	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> cluster 4	Stephen et al. 1998
Nsp0	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> spp.	Pommerening-Röser et al. 1996
NspCL3_454	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> cluster 3	Stephen et al. 1998
NspCL2_458	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> cluster 2	Stephen et al. 1998
Nim 459r	16S rRNA	<i>Nitrosospira multififormis</i> <i>Nitrosospira</i> sp. C-141	Hastings et al. 1997
NSM1B	16S rRNA	<i>Nitrosomonas europaea</i> -lineage <i>Nitrosococcus mobilis</i>	Hovanec & DeLong 1996
Primer 517r	16S rRNA	Nested PCR in NitAB amplicons	Hollibaugh et al. 2002
TAOrev	16S rRNA	Terrestrial ammonia oxidizers	Chandler et al. 1997
CTO654r	16S rRNA	ΔAOB	Kowalchuk et al. 1997
NITROSO4E	16S rRNA	ΔAOB	Hovanec & DeLong 1996
NEU	16S rRNA	Most halophilic and halotolerant <i>Nitrosomonas</i>	Wagner et al. 1995
Amβ	16S rRNA	ΔAOB	Utaaker & Nes 1998
NitF	16S rRNA	ΔAOB	Ward et al. 1997
NitC	16S rRNA	ΔAOB	Voytek & Ward 1995
NmIII	16S rRNA	<i>Nitrosomonas marina</i> -lineage	Pommerening-Röser et al. 1996
NSMR53r	16S rRNA	<i>Nitrosomonas europaea</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NSMR74r	16S rRNA	<i>Nitrosomonas marina</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NMOB1r	16S rRNA	<i>Nitrosococcus mobilis</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
NSMR33r	16S rRNA	<i>Nitrosospira tenuis</i> -like AOB	Burrell et al. 2001
RNM-1007	16S rRNA	Terrestrial <i>Nitrosomonas</i> spp.	Hiorns et al.1995
NS-1009	16S rRNA	<i>Nitrosospira</i> spp.	Hiorns et al.1995
NmIV	16S rRNA	<i>Nitrosomonas cryotolerans</i> -lineage	Pommerening-Röser et al. 1996
NitB	16S rRNA	ΔAOB	Voytek & Ward 1995
Nso 1225	16S rRNA	ΔAOB	Mobarry et al. 1996
ΔAMOr	16S rRNA	ΔAOB	McCaig et al. 1994
Nse 1472	16S rRNA	<i>Nitrosomonas europaea</i> -lineage	Juretschko et al. 1998
AMO-f	<i>amoA</i>	<i>Nitrosomonas</i> / <i>Nitrosococcus</i>	Sinigalliano et al. 1995
AMO-r	<i>amoA</i>	<i>Nitrosomonas</i> / <i>Nitrosococcus</i>	Sinigalliano et al. 1995
<i>amoA</i> -1F	<i>amoA</i>	ΔAOB	Rotthauwe et al. 1997
<i>amoA</i> -2R	<i>amoA</i>	ΔAOB	Rotthauwe et al. 1997

2.3.2 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB)

(1) 亜硝酸酸化細菌の系統分類

既知の亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) は, *Nitrobacter* 属, *Nitrococcus* 属, *Nitrospina* 属, *Nitrospira* 属の 4 つのグループに分類される (Koops et al. 2001)。これらの属名は, AOB の場合と同様にその細胞の外形態と構造の特徴によって付けられた (Prosser 1989)。

NOB の中でももっとも多く研究がなされている *Nitrobacter* 属は Alphaproteobacteria (α -proteobacteria) に分類され, 4 つの種, *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgaris*, *Nitrobacter alkalicus* が記載されている。16S rRNA 塩基配列をもちいた解析から, これらの *Nitrobacter* 種は非常に近接したクラスターを形成することが知られている。Orso et al. (1994) による *Nitrobacter* 属の 16S rRNA の全塩基配列を用いた系統解析によると, 各 *Nitrobacter* 種の平均的な相同性は 99.2%であった。また, 亜硝酸酸化能を持たない *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter palustris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Blastobacter denitrificans*, *Afipia felis*, *Afipia clevelandensis*, などとも近接していることが知られている (Teske et al. 1994)。

Nitrococcus 属は Gammaproteobacteria (γ -proteobacteria) に, *Nitrospina* 属は Deltaproteobacteria (δ -proteobacteria) にそれぞれ分類され, この 2 属の単離株である *Nitrococcus mobilis* と *Nitrospina gracilis* は海洋にその存在が確認されている。*Nitrospira* 属は門レベルで他の NOB 種と異なるとされており, 二つの種, *Nitrospira marina* と *Nitrospira moscoviensis* が知られている。

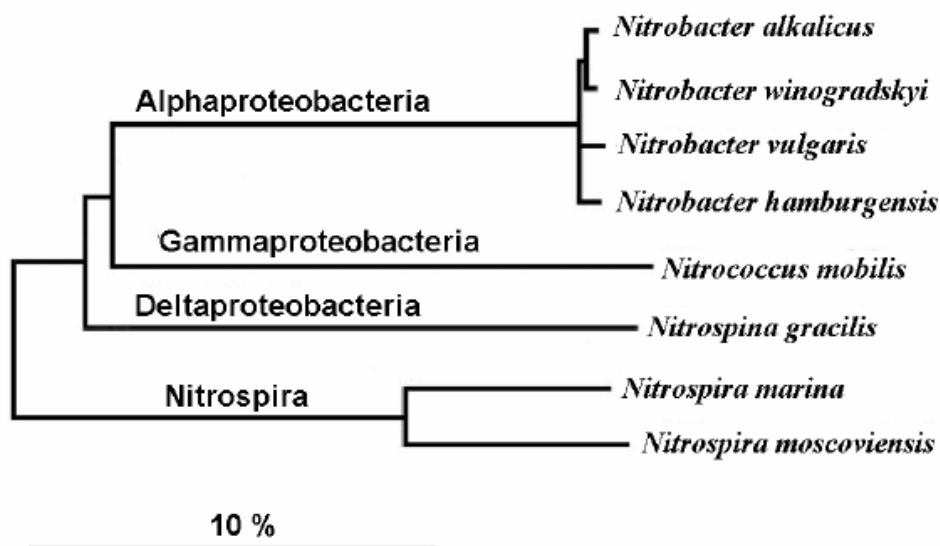


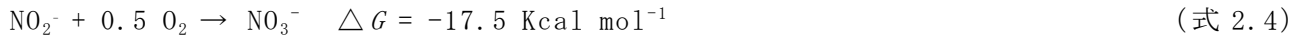
Fig. 2-8 16S rRNA 塩基配列に基づいた NOB の系統関 (Koops & Pommerening-Röser 2001 を一部改変)

(2) 亜硝酸酸化細菌の生理学的・生化学的性質

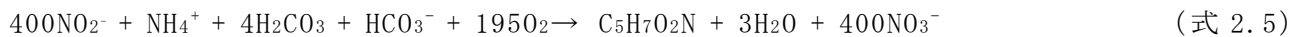
NOB は独立栄養 (化学無機独立栄養) 細菌であり, 亜硝酸を電子供与体, 酸素を電子受

容体として利用した亜硝酸酸化を行う。この反応には NOB が有する酵素 nitrite oxidoreductase (亜硝酸酸化還元酵素; NOR) に触媒される (式 2.4)。

NOR (nitrite oxidoreductase) による亜硝酸酸化



この反応で生成されるエネルギーを利用し、炭酸ガスを固定して増殖を行う (式 2.5)。



(3) 亜硝酸酸化細菌の分子生物学的研究

一般に自然環境では亜硝酸酸化反応の速度がアンモニア酸化反応の速度を上回り、アンモニア酸化反応が硝化反応の律速因子となるため、NOB よりも AOB の研究が重視されてきた。また、NOB は 4 つもの属にまたがって存在しているため、その解析を効率よく行うための分子生物学的ツール (PCR primer, FISH probe, etc.) の設計も容易ではない。よって、AOB に比べ NOB の解析手法は充実とは程遠い状況にある。

Table 2-2 に NOB を標的とした既存の PCR primer と FISH probe をまとめた。

Table 2-2 NOB に特異的な既存の primer および probe (本表に記載した文献の中には巻末の引用文献一覧に掲載していないものも含まれる)

Primer or Probe	Target	Specificity	Ref.
FGPS872f	16S rRNA	genus <i>Nitrobacter</i>	Degrange & Bardin 1995
FGPS1269r	16S rRNA	genus <i>Nitrobacter</i>	Degrange & Bardin 1995
FGPI149-457	16S rRNA	genus <i>Nitrobacter</i> ITS	Gradmann et al. 2000
FGPL420' -458	16S rRNA	genus <i>Nitrobacter</i> ITS	Gradmann et al. 2000
NSR1113f	16S rRNA	genus <i>Nitrospira</i>	Dionisi et al. 2002
NSR1264r	16S rRNA	genus <i>Nitrospira</i>	Dionisi et al. 2002
norB269f	<i>norB</i>	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	赤司 2004
norB443r	<i>norB</i>	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	赤司 2004
NB1000	16S rRNA	<i>Nitrobacter</i> spp.	Mobarry et al. 1996
NIT3	16S rRNA	<i>Nitrobacter</i> spp.	Wagner et al. 1996
NSR1156	16S rRNA	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , freshwater <i>Nitrospira</i> spp.	Schramm et al. 1998
NSR447	16S rRNA	<i>Nitrospira</i> spp.	Schramm et al. 1998
NSR826	16S rRNA	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , freshwater <i>Nitrospira</i> spp.	Schramm et al. 1998
Ntspa1026	16S rRNA	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , activated sludge clones A4 and A11	Juretschko et al. 1998
Ntspa454	16S rRNA	<i>Nitrospira moscoviensis</i> 710-9 clone	Hovanec et al. 1998
Ntspa662	16S rRNA	genus <i>Nitrospira</i>	Daims et al. 2001
Ntspa685	16S rRNA	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , <i>Nitrospira</i> <i>marina</i> and 710-9 clone	Hovanec et al. 1998
Ntspa712	16S rRNA	most members of the phylum <i>Nitrospira</i>	Daims et al. 2001
NTAPA714	16S rRNA	Phylum <i>Nitrospira</i> , not <i>Thermodesulfovibrio islandicus</i>	Loy et al. 2002
Ntspn693	16S rRNA	<i>Nitrospina gracilis</i>	Juretschko 2000
Ntspn994	16S rRNA	<i>Nitrospina gracilis</i>	Juretschko 2000
Ntcoc84	16S rRNA	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Juretschko 2000
Ntcoc206	16S rRNA	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Juretschko 2000

2.4 亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification)

本研究がその主題とした亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) は、端的にいえば、アンモニア酸化細菌 (AOB) の活性が維持された状態で亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性が選択的に抑制されたときに起こる。亜硝酸型硝化反応による環境中への亜硝酸の蓄積は、AOB によるアンモニア酸化速度が NOB による亜硝酸酸化速度を上回るわずかなギャップで起こ

る (Smith et al. 1997b)。このわずかなギャップをいかに作り出すかが、亜硝酸型硝化反応の人為的な制御の要となる。

亜硝酸型硝化反応制御に関する一般的な研究報告はおおよそ、pH、遊離アンモニア (NH₃)、溶存酸素 (DO)、温度、塩濃度などの環境要因制御による NOB の選択的抑制に関するものがほとんどである。加えて鉄工所排水である安水処理過程においてチオ硫酸の有無が亜硝酸型硝化反応を制御した例、また、当研究室の実験室規模リアクターにおいて観察された複合的な要因による亜硝酸型硝化反応も実現された。以下に、これらの環境要因と亜硝酸型硝化反応についての知見を整理する。

2.4.1 pH

代表的な AOB である *Nitrosomonas* の至適 pH は 8-9 の間であり、代表的な NOB である *Nitrobacter* の至適 pH は 7 弱というのが一般的な見解である (北尾高嶺, 2003)。Hutton et al., (1975) は 16-21°C, pH 7.8 - 8.4, SRT 30 日, に制御された硝化槽で亜硝酸の蓄積観察を観察し, Surmacz-Gorska et al. (1997) も排水の pH が NOB の阻害要因になることを述べた。Glass & Silverstein (1998) は, 連続回分式リアクター中の汚泥混合液の pH の上昇 (7.5, 8.5, 9.0) とともに亜硝酸態窒素が系内に蓄積 (250, 500, 900 mg NO₂-N L⁻¹) したことを報告した。一方で Venterea & Rolston (2000b) はカリフォルニアの畑土壌において一定以下の pH 条件下で, 一時的な亜硝酸蓄積を観察した。

このように pH 制御による亜硝酸蓄積を観察した文献は複数あるが, pH 制御による亜硝酸蓄積は長期間継続し得ないものであるという報告 (Ruiz et al., 2003) もある。加えて, 過剰な pH 制御を行うと AOB 活性が阻害されてしまうことを報告した研究もある。Ruiz et al. (2003) は pH 6.45-8.95 でアンモニア態窒素の硝酸態窒素までの完全な硝化を観察し, その範囲外の pH ではアンモニアの酸化が起こらない, という結果を得た。

2.4.2 遊離アンモニア (Free ammonia; FA; NH₃)

高い pH は環境中に高濃度の遊離アンモニア (Free ammonia; FA; NH₃) が存在することを示唆するものであり, FA 濃度こそが亜硝酸型硝化反応を引き起こす要因になると記述した報告も少なくない。FA は AOB・NOB 両方の生育を阻害するが, NOB のほうがより FA に対する感受性が高いことがいわれている。FA は NOB が有する亜硝酸酸化還元酵素 (nitrite oxidoreductase) の活性を阻害する (Yang & Alleman 1992)。Anthonisen et al. (1976) は NOB 活性を阻害するような FA 濃度は 1.0 mg L⁻¹ 以上であるとした。また, Mauret et al. (1996) は混合培養系における実験から NOB を阻害する FA 濃度の閾値は 6.6-8.9 mg NH₃-N L⁻¹ であると報告した。Bae et al. (2001) は pH 8 (30°C, DO=1.5 mg L⁻¹) で, Jianlong & Ning (2004) は, pH 7.5 (30°C, DO=1.5 mg L⁻¹) で効率的に亜硝酸蓄積を実現できる FA 濃度が得られたとしている。

FA 濃度の NOB に対する影響は, バルク環境あたりの濃度ではなく, NOB バイオマスあたりの濃度によって決まるとを主張した報告があり (Suthersan & Ganczarczyk 1986, Rols et al. 1994, Villaverde et al. 2000), Rols et al. (1994) は閾値を 0.5-0.3 mg NH₃-N (mg viable NOB⁻¹) と結論した。

しかし, FA の NOB 阻害効果による亜硝酸型硝化反応は一時的なものであるとする報告も

ある。Suthersan & Ganczarczyk (1986) や Turk & Mavinic (1989) は、AOB も NOB も FA の阻害に徐々に耐性を持つようになるとした。Turk & Mavinic (1989) は AOB・NOB ともに、40 mg NH₃-N L⁻¹ もの FA に耐えられることを示唆した。

2.4.3 溶存酸素

硝化という、酸素を多量に消費する反応を考えると、環境中の酸素濃度がその重要な因子になることは容易に想像できる。NOB は AOB に比べ低い酸素親和性を示すことが知られている (Stentrom & Poduska 1980, Jayamohan et al. 1988, Wiesmann 1994, Sanchez et al. 2001)。Tonkovic (1998) は実験室規模リアクターを用いた実験から、亜硝酸型硝化反応は pH には因らず、むしろ溶存酸素濃度に影響されるとした。実際に、溶存酸素濃度が減少すぎると硝化速度もそれに対応して遅くなる (Stentrom & Poduska, 1980) ことや、亜硝酸酸化活性のほうがアンモニア酸化活性よりも溶存酸素濃度の影響を強く受ける (Hanaki et al., 1990ab, Dangcong et al., 2000) ことが知られている。

また、NOB は間欠的な嫌気条件への順応性に乏しく、嫌気-好気サイクルの導入によりその活性が阻害されることがいわれている (Van Loosdrecht & Jetten, 1998, Mota et al., 2005)。

2.4.4 温度

Partial nitrification-anammox process の先駆けであるデルフト工科大学が提唱した SHARON Process (温度を 26°C 以上に制御することで亜硝酸蓄積を実現) に関する報告を始めとして、亜硝酸蓄積を実現するためにリアクター内の温度を高く維持することの有効性について触れた文献は多数あり、亜硝酸蓄積に適した温度として 30°C を提唱する文献 (Bae et al., 2002, Jianlong & Ning, 2004) もある。

2.4.5 塩濃度

塩濃度が亜硝酸型硝化反応に与える影響について指摘した報告がある。Sanchez et al. (2004) は硝化リアクターにおいて、60 g NaCl L⁻¹ で亜硝酸の蓄積傾向を観察した。Chen et al. (2003, 2004) は硝化リアクターにおいて 10000 mg Cl⁻¹ L⁻¹ 以上の塩濃度で亜硝酸の蓄積を観察している。

しかし一方で硝化反応 (アンモニア酸化反応自体) へ影響する塩濃度の閾値を 20 g Cl⁻¹ L⁻¹ 以上とする報告もあり (Dahl et al. 1997, Dinçer & Kargi 1999), 亜硝酸型硝化反応に最適な塩濃度の統一見解は得られていないようである。

2.4.6 チオ硫酸【新日本製鐵(株)安水処理硝化脱窒試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応】

第 1 章 1.1 でも述べたように、新日本製鐵(株)において過去に運転された、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」の硝化脱窒処理試験プラントにおいて安定的な亜硝酸型硝化反応が観察された。本研究の動機はこの試験プラントにおける亜硝酸型硝化反応にあった。以下に新日本製鐵(株)試験プラントの概要と、その亜硝酸型硝化反応の特徴について述べる。

2.4.6.1 新日本製鐵（株）試験プラント（ミニプラント）の概要

2002年8月、新日本製鐵（株）先端技術研究所（千葉県君津市）において製鐵所コークス炉からの排水である安水を硝化脱窒法で処理する試験プラント（以降「ミニプラント」とする）が立ち上げられ、2003年9月まで運転された（新田見 2003, 高崎 2004）。安水は、アンモニア、フェノール類、シアン、硫化水素、油分など含む排水である。安水処理の中核となるプロセスは活性汚泥法であるが、その成分のために活性汚泥微生物群集の代謝機能の障害が起りやすく、活性汚泥法による処理に先立つ前処理が必要となる。従来製鐵所では、凝集沈殿による脱油工程とアンモニアストリッピング法による脱安工程により、過剰な油分、シアン、硫化水素、アンモニアを除去していたが、アンモニアストリッピング法によるアンモニア除去はコストがかかるという問題がある。そこで安水処理に硝化脱窒法を適用し、生物学的にアンモニアを除去する研究が行われるようになった。新日本製鐵（株）における試験プラントはその流れを汲んだ研究目的のために立ち上げられた。Fig. 2-9 にミニプラントのフロー図を示した。ミニプラントに流入させた排水は人工的に合成した排水（人工安水、Table 2-3）であった。人工安水は希釈槽において海水により2.5倍に希釈され、標準的な硝化液循環式硝化脱窒プロセスにより処理された。水温は25-30℃に管理され、SRTは50日程度（2003年4月からは30日程度）に管理され、プラント内のMLSSは一定に保たれた。HRTは脱窒槽で18時間、硝化槽で54時間であった。

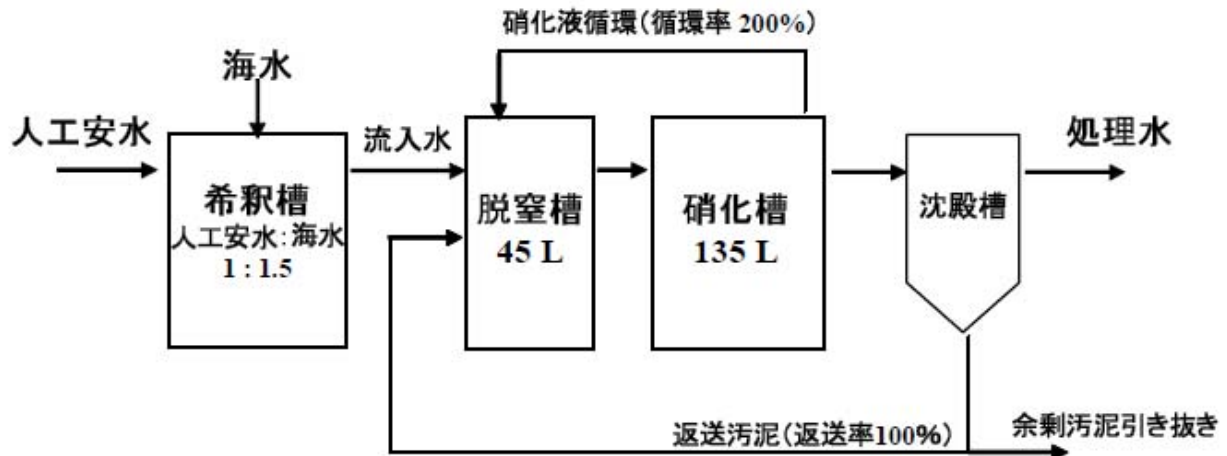


Fig. 2-9 新日本製鐵（株）試験プラント（ミニプラント）処理フロー
（新田見 2003, 高崎 2004 をもとに作成）

Table 2-3 人工安水の基本的な組成(高崎, 2004)

pH	安水 ^a	NH ₄ ⁺ -N	Phenol	チオシアン SCN	チオ硫酸 S ₂ O ₃ ⁻	NaHCO ₃ ^b	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O
8.3	5%	500	600	100	300	1800-5000	51

a:非人工安水を容積で5%のみ添加した。

b:途中アルカリ度を上げるため、添加量を何回か変更した。

Fig. 2-10 に新日本製鐵(株)ミニプラントの処理成績を示した。ミニプラントでは運転開始当初から安定的な亜硝酸型硝化反応が観察された。Run 5 において、Table 2-3 に示した人工安水からチオ硫酸(S₂O₃²⁻)を除いたところ、硝化反応が完全に進行し、処理水中に硝酸態窒素が蓄積を始めた。Run 6 おいて人工安水中にチオ硫酸を再び加えたところ、再び亜硝酸型硝化反応が得られ、Run 7 におけるチオ硫酸抜きの条件で完全な硝化反応が観察された。

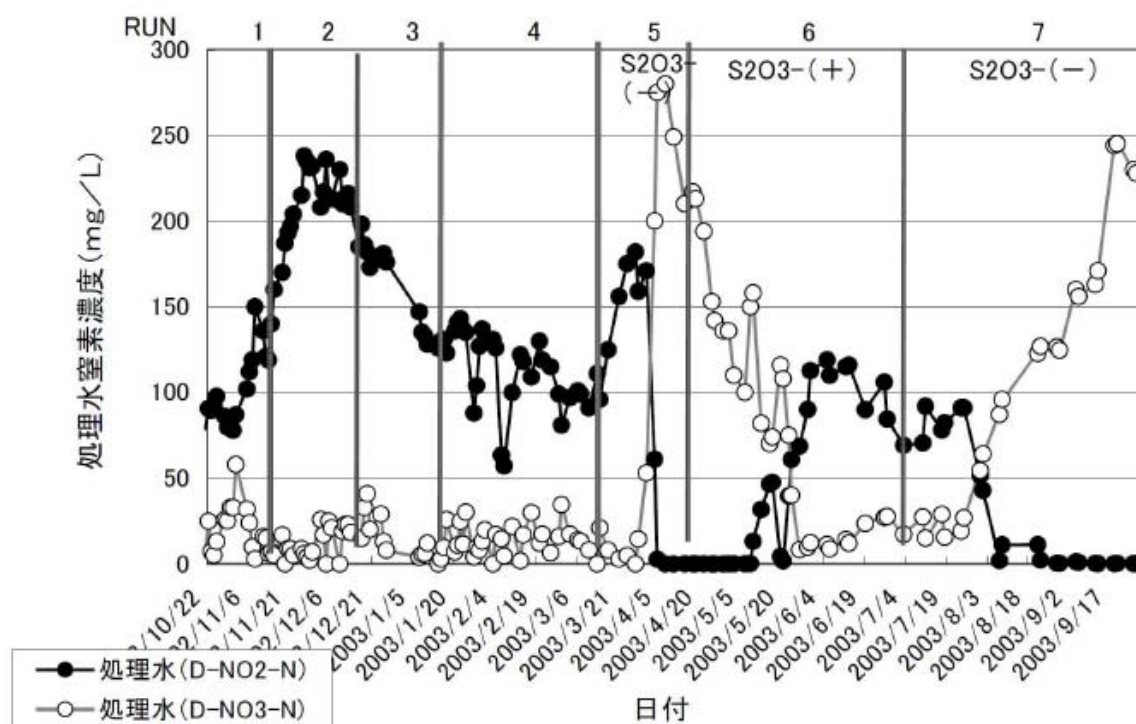


Fig. 2-10 新日本製鐵(株)試験プラント(ミニプラント)処理水中における亜硝酸態窒素(NO₂⁻-N)および硝酸態窒素(NO₃⁻-N)濃度(高崎 2004)

Fig. 2-10 にあらわした結果は、人工安水中のチオ硫酸が亜硝酸型硝化反応に何らかのかたちで寄与していることを示唆するものであった。排水処理の分野において、チオ硫酸による亜硝酸型硝化反応制御について検討したものは皆無に等しい状況の中、この結果は大

興味深いものであった。

2.4.6.2 チオ硫酸と亜硝酸型硝化反応

チオ硫酸が硝化に及ぼす影響についての既存の研究は、排水処理の分野よりもむしろ農業の分野において多い。農業では、窒素肥料 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) が施肥後に硝化・脱窒によって失われることを防ぐために硝化抑制剤を用いることがあり、硝化抑制剤としてのチオ硫酸の可能性について論じた報告が複数ある (Goos 1985, Janzen & Bettany 1986, Sallade & Sims 1992, Saad et al. 1996)。これらの多くはアンモニア酸化抑制効果の是非に注目している場合が多く、チオ硫酸の亜硝酸酸化に及ぼす影響について言及していないものもあるが、チオ硫酸の添加による土壌中への亜硝酸態蓄積を観察した報告もある (Janzen & Bettany 1986, Saad et al. 1996)。排水処理分野における研究では、Schreiber & Pavlostathis (1998) が COD, アンモニア, チオ硫酸が混在する模擬排水を活性汚泥を用いて好気処理した際に亜硝酸型硝化反応が起こったことを示唆する実験結果を示している。チオ硫酸の生物学的酸化過程においてテトラチオネート (Tetrathionate; $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) が生成されるが (Suzuki 1999), Janzen & Bettany (1986) はテトラチオネートこそが硝化抑制に関わっていることを示唆する報告をした。

2.4.7 複合的な影響

第1章 1.1でも述べたように、田中は新日鐵ミニプラントをモデルに実験室規模活性汚泥リアクターを構築し、亜硝酸型硝化脱窒反応を再現した。リアクター運転当初は亜硝酸型硝化反応は得られなかったが、2度の運転条件変更の末に、亜硝酸型硝化反応を獲得した。亜硝酸型硝化反応は最初の運転条件変更 (硝化工程前段への脱窒工程の導入) からおよそ2ヵ月後、2度目の運転条件変更 (pH制御値の上方修正) からおよそ1ヵ月後に獲得された。その様子を Fig.2-11 に示した。

しかし、2度の運転条件変更から亜硝酸型硝化反応の獲得までの数ヶ月もの時間差は説明できず、亜硝酸型硝化反応は単一ではない複数 (pH, 温度, 嫌気好気条件, etc.) の条件がそろったときに起こる現象であることを示唆した。また、亜硝酸型硝化反応が獲得された直前にアンモニア酸化活性が低下し、それに伴って AOB の種構成が変化したという、AOB と NOB の相互関係を考える上で興味深い結果も得られた。

阿部ら (2006) は温度条件の異なる3台のスポンジ担体を充填したエアリフト型リアクターにおいてアンモニア流入負荷を段階的に上げて運転を行ったところ、流入負荷を上げるに連れて流入水中にアンモニア性窒素が残存し、それに伴い亜硝酸性窒素の蓄積も確認された。この亜硝酸性窒素の蓄積は運転温度が高いほど増加する傾向が見られた。阿部らはアンモニア流入負荷と温度の複合的な要因によって生じる遊離アンモニア濃度の増加が強く影響していると結論付けた。

また、彼らの実験においてもアンモニア酸化細菌の優先種が、完全硝化時は *Nitrosomonas oligotropha / marina* lineage に属しており、亜硝酸型硝化時には *Nitrosomonas europea* lineage に属するものへと交代した。しかし、この変化は単にアンモニア流入負荷が増したことに伴う、基質親和性の違いが主要因であると考えられた。亜硝酸酸化細菌についても同様に基質親和性の高い *Nitrospira* sp. から *Nitrobacter* sp. に

優先菌種が交代した。

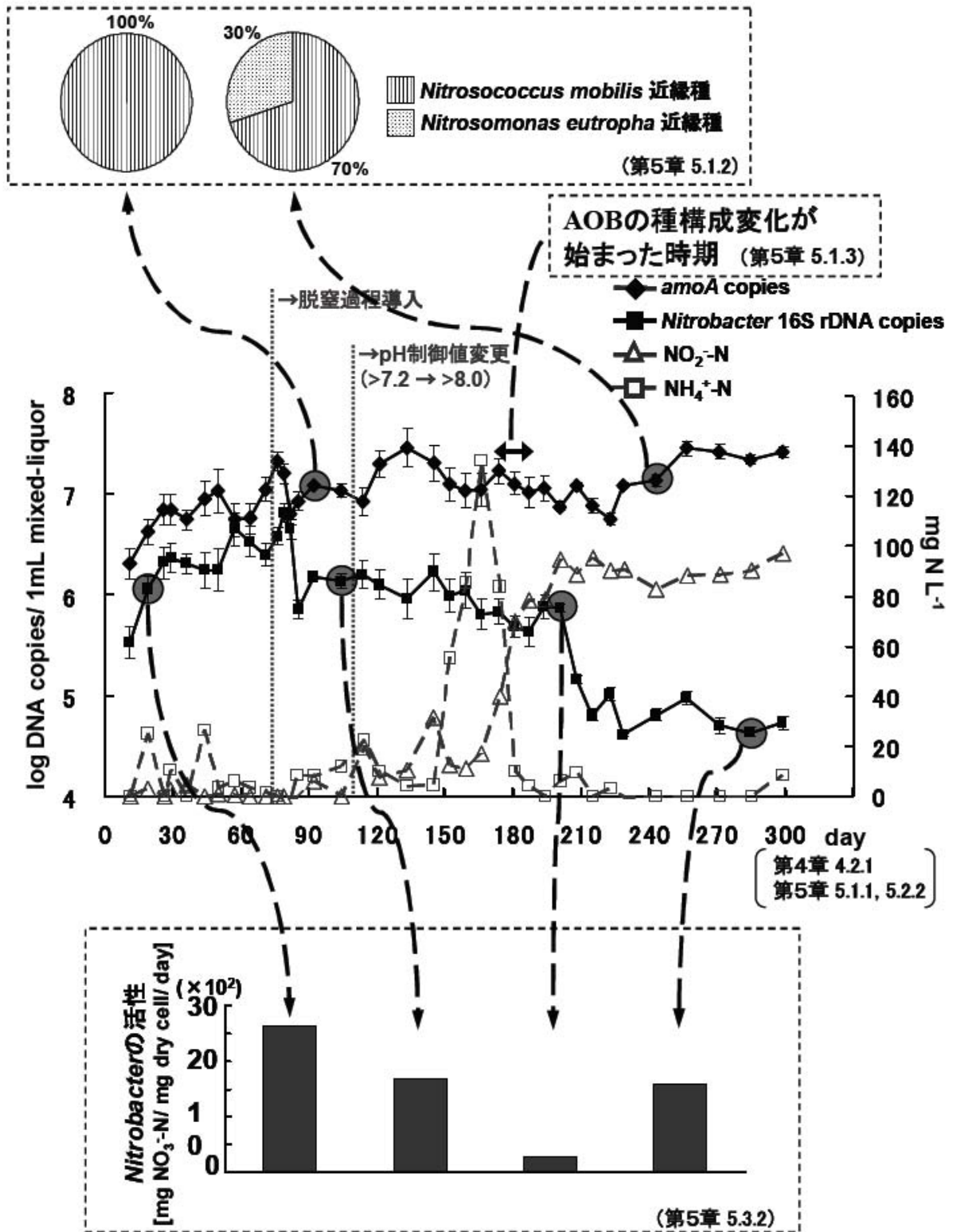


Fig.2-11 実験室規模亜硝酸型硝化脱窒リアクター処理水中における窒素化合物と活性汚泥中の AOB, NOB のモニタリング結果 (田中, 2006)

2.6 分子生物学的手法を用いた環境微生物群集解析

古典的な微生物学による環境微生物群集の解析（検出・定量）は、基本的に培養法によって成り立っていた。培養法は、微生物の生理学・生化学的性質を議論するうえで欠かせない手段となるため今日でも用いられる手法ではあるが、自然界には培養の困難な微生物も多く存在すること、複合系微生物系にはおいてすべての微生物に適した培養条件を設定することが不可能なことが指摘されているように、培養法による環境微生物の解析には限界がある。

1980年代、分子生物学の発展とともに、環境中に存在する微生物由来のDNAやRNAに注目した解析手法が提案されるようになり、それまでとらえることの難しかった培養困難な微生物を検出・解析できるようになり、環境微生物学は飛躍的な発展を遂げてきた。

本節では、本研究で用いた手法を中心に、分子生物学的手法による環境微生物解析法について概説する。

2.6.1 環境からのDNAの抽出

DNA抽出は、分子生物学的手法の中でも最も基本的な操作である。DNAの抽出方法には、フェノールクロロホルム法、ベンジルクロライド法、各種DNA抽出キットによる方法などがあるが、ここでは本研究で使用したFastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene, 現MP Biomedicals)による抽出原理を解説する。

FastDNA® SPIN Kit for Soilは500mgまでの土壌や活性汚泥などの環境サンプルから短時間で効率よくDNAを回収できるキットとして広く用いられている。本法では、専用のホモナイズ装置が必要であるが、フェノールやクロロホルムなどの有機溶剤が不要であり、比較的抽出が難しいとされているグラム陽性細菌のDNAの回収も可能である。

本法は大きく2つの操作からなる。

①細胞の破碎・DNAの可溶化・タンパク質の可溶化

サンプルをホモジナイズとタンパク質の可溶化が可能なバッファーに溶解させ、それをセラミックとシリカからなるビーズと混合・高速振とうすることにより、細胞を破碎しDNAを可溶化させる。

②DNAの精製と濃縮

可溶化したDNAのみをシリカ製のBinding Matrixに吸着させ、不要なタンパク質などを除去し、精製DNAを得る。

2.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction) は微量なDNAの特定領域を、各種解析手法による検出可能な濃度にまで増幅する手法であり、今日の遺伝子工学の発展に大きく寄与した。PCRの技術にはさまざまな変法が存在するが、ここでは最も基本的なPCRの原理を紹介する。

PCR は三段階の DNA の合成反応によって DNA を増幅する手法である。

①増幅元となる DNA (鋳型, テンプレート) 2 本鎖を加熱し, 変性 (解離) させ, 一本鎖にする (denaturation)。

②温度を下げ, 増幅させたい特定部位の両端の DNA 塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチド短鎖 (プライマー, primer) とテンプレートを結合させる (annealing)。

③DNA 合成酵素 (DNA polymerase) と DNA 合成基質 (dNTP) により, ②の状態プライマー結合部位から不足分の DNA が合成され, 標的にした DNA の完全な 2 本鎖が得られる (extention)。

①-③の工程を 1 サイクルとし, これを n 回繰り返すことにより, 1 つのテンプレート DNA 鎖から 2^n の DNA 鎖を得ることができる。

2.6.3 Cloning

複合微生物系から, 単一の DNA を抽出する方法のひとつに Cloning がある。Cloning によって単離された DNA の塩基配列を読むことによって, 複合微生物系から得られた DNA の集合体が, どのような塩基配列種によって成り立っているのかを解析することができる。本法は, 環境微生物の DNA 配列情報の獲得に大きな貢献を果たしている。

Fig. 2-11 にクローニングの手順を示した。PCR 産物などの DNA 集合体 (インサート群) を, ベクターと呼ばれる環状 DNA 群と反応させ (ライゲーション), そのベクターを大腸菌などに感染 (トランスフォーメーション) させることで, 大腸菌の増殖とともにベクターおよび組み込まれた DNA が増幅できる。原理的に, 1 つのベクターには 1 つの DNA 鎖 (インサート) が, 1 つの大腸菌には 1 つのベクターが組み込まれるので, 培養された大腸菌のコロニー一つひとつが別のインサートを持つことになる。

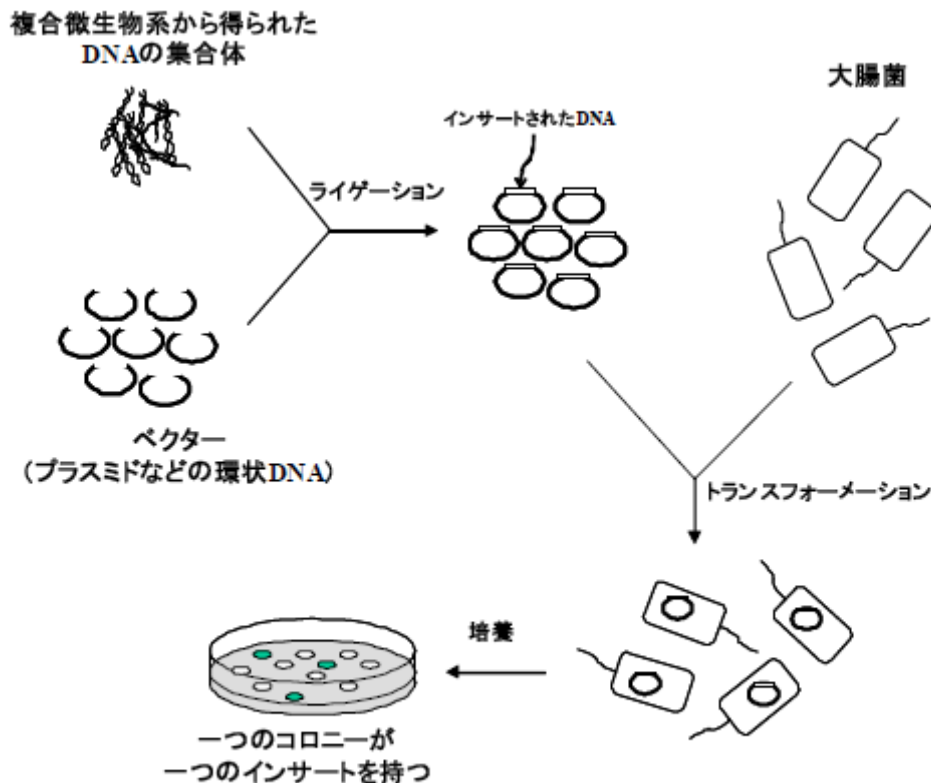


Fig. 2-11 Cloningの流れ

2.6.4 Real-time PCR

Real-time PCR は、PCR 増幅産物濃度は初期テンプレート濃度に依存するという原理を利用して、増幅産物濃度から初期テンプレート濃度を求める定量的 PCR の一手法である。Real-time PCR による DNA 定量には、サーマルサイクラー (Thermocycler) と分光蛍光光度計を一体化した機器を用い、PCR での増幅産物の精製の過程をリアルタイムで検出し、解析する方法である。増幅産物の生成の過程を追跡することが出来るため、より正確な定量が期待出来る。また、解離曲線分析を行う事により、目的産物のみが増幅されたことが確認できる。以下に Real-time PCR の原理と、本研究で用いた Real-time PCR の一手法である QPrimer-PCR 法について解説する。

(1) Real-time PCR の原理

定量したい核酸について希釈系列 (検量線作成用の標準サンプル) を作り、それぞれについて PCR を行い、そのタイムコースをリアルタイムで取る。増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold cycle; Ct 値) を縦軸、核酸量を横軸にプロットし、検量線を作成する。目的の試料についても同じ条件で PCR を行い、Ct 値を求める事により、検量線から試料中の目的産物の量を測定することができる。

核酸の検出には様々な方法があるが、主流となっているのは蛍光を用いたものである。蛍光は SYBER Green や FRET (fluorescence resonance energy transfer) を用いたハイブリダ

イゼーションプローブ等がある。現在、Real-time PCR の主流となっているのは FRET を利用した TaqMan プローブ (PE Biosystems 社) である。TaqMan プローブ法は、目的の増幅産物のみ測定できるため正確な定量が可能であるという利点がある。一方、目的産物に応じたプローブをデザインし、合成する必要がある点や、増幅サイズが 80~150bp、長くても 300bp のものしか利用できないという欠点がある。それに対して、Kurata et al. (2001) により開発された QPrimer-PCR 法は増幅サイズの制限が低くなり (900bp 程度まで解析可能)、プライマーに蛍光色素をつけるだけで利用できるというメリットがある。本研究では、この QPrimer-PCR 法を用いた。

以下に Real-time PCR の長所・短所についてまとめた。

長所 ・微量遺伝子でも強力な検出力を持つ。

- ・一度に大量のサンプルを処理できる
- ・短時間 (2 - 4 時間) で反応が行える
- ・準備が簡便であり、ルーチンなモニタリングには最適
- ・測定後のアガロースゲルチェックが不要

短所 ・非特異的産物の増幅

・最初はわずかなコンタミネーションであっても、PCR の過程で大量に増幅されて致命的失敗を招いてしまう。

- ・プライマーのデザイン、温度条件などの最適化に時間がかかる

今までに PCR を行ったことのない領域の遺伝子を増幅しようとする場合には、プライマーデザインからはじめる必要がある。非特異的産物の生成およびプライマーダイマーのできない箇所を捜し当てるのが非常に困難である。また、温度条件やプライマー濃度等を最適化するのにも多くの時間が費やされる。

- ・検出機器、ランニングコストが高い

(2) QPrimer-PCR

QPrimer-PCR (Quenching Primer-PCR) は蛍光消光プライマーを用いる。この手法は、に蛍光色素 (BODIPY) を付加させた DNA の構成塩基である C (シトシン) に、C の相補的な塩基である G (グアニン) が結合したときに G との相互作用により BODIPY の蛍光が消光するという現象を PCR での定量に応用したものである (Kurata et al., 2001)。PCR を行う際に用いるプライマーの末端に蛍光標識した C 塩基を付加しておき (これを Qprimer と呼ぶ)、PCR の伸長反応によって G が Qprimer 末端の C 塩基に結合したときの蛍光消光率をサイクルごとにプロットすることで増幅をリアルタイムに観察することが出来る。

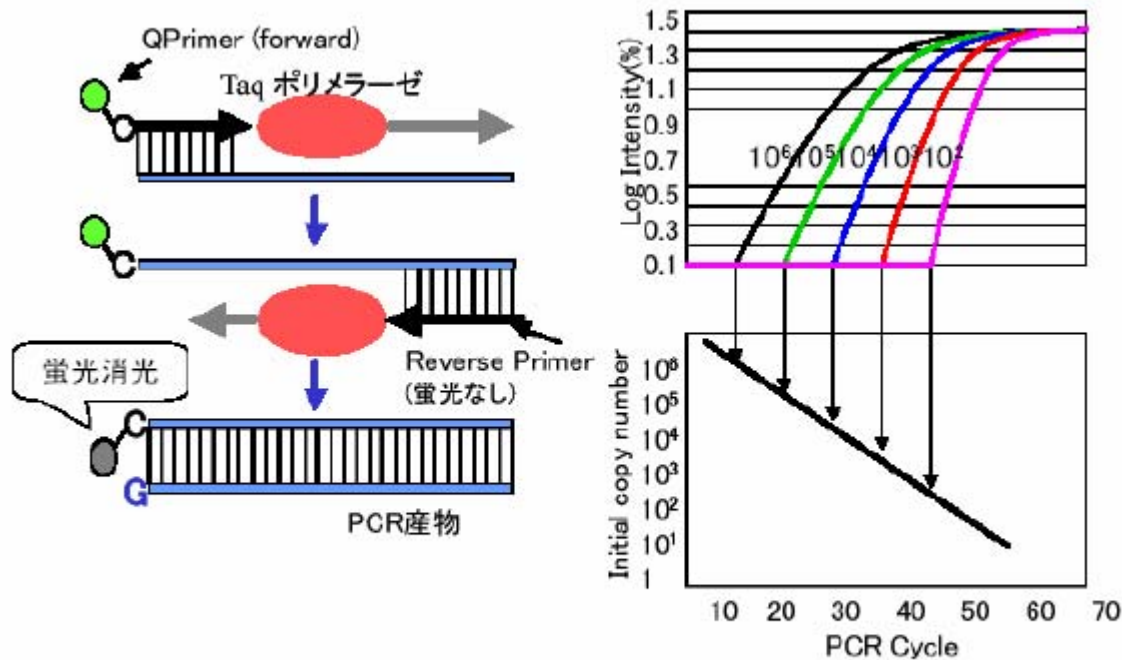


Fig. 2-12 QPrimer-PCRによるDNA量の定量

2.6.5 Terminal Restriction Fragment Length (TRFLP)

蛍光標識されたDNA断片の集合体（片方の primer の 5' 末端に蛍光標識を付加した primerset を用いた PCR 産物など）を，特定の塩基配列を認識してDNA鎖を切断する制限酵素で処理し，蛍光色素が付加された側の断片長によって，異なる塩基配列をもつDNA同士を分離する手法である。Liu et al. (1997) により環境微生物の群集解析を目的として開発され，AOB 群集解析にも活用されている (Hortz et al. 2000, Sakano et al. 2002)。

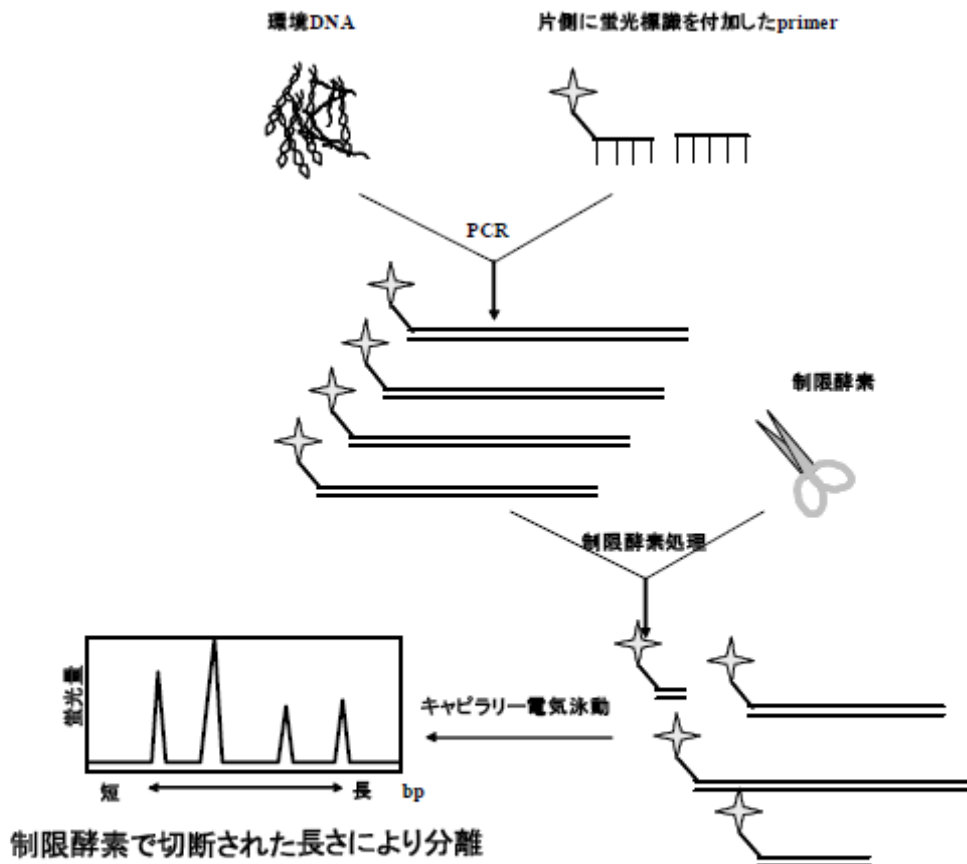


Fig. 2-13 PCR-TRFLP の流れ

2.6.6 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

1980年代末より開発された手法であり、Amannらにより、この手法が環境微生物分野でも十分適用可能であることが示され、その具体的な実験手法が紹介された (Amann, 1995)。標的塩基配列に相補的な塩基配列 (oligonucleotide probe) を蛍光物質で標識し、細菌内の標的塩基配列と結合 (Hybridize) させ、それを蛍光顕微鏡で観察することにより、目的の細菌を検出、定量する。FISH法を微生物の検出に用いる場合、rRNA (ribosomal RNA) を標的とする。標的となる rRNA は1つの細胞に 10^3 - 10^5 存在しており、結合した probe の蛍光を顕微鏡下で観察することが可能である。

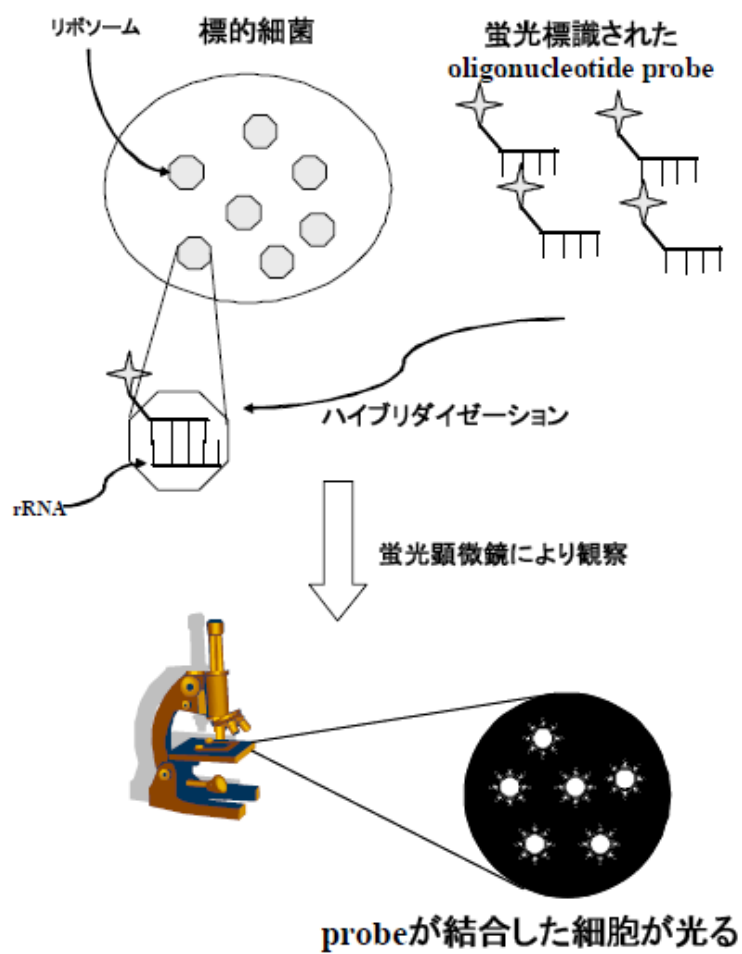


Fig. 2-14 FISHによる標的細菌の検出

第3章 実験方法

本研究における実験手法を詳説する。

3.1 実験室規模亜硝酸型硝化リアクターの運転

排水を処理する水槽を反応槽，リアクターなどと呼ぶ。本研究では田中が2004年に構築し，運転していたリアクターをそのまま流用したのに加え，このリアクターで発生した余剰汚泥を利用して同様のリアクターをそれぞれ運転587日目，633日目に新たに構築した。以下，田中から引き継いだリアクターをR1，新たに構築したリアクターをそれぞれR2, R3と呼ぶ。田中がリアクターを構築するにあたり運転条件等の参考にした新日本製鐵（株）の試験プラント（ミニプラント）では，それぞれが一つの処理工程を担う複数の槽を用いて，排水がそれらの槽を順々に流下することで処理される連続式リアクター(Continuous-Flow Reactor) が用いられたが，本研究で用いたリアクターは一槽式リアクターであり，時間によって処理工程（嫌気工程，好気工程，沈殿工程など）を区切る連続回分式リアクター (Sequencing Batch Reactor; SBR) とよばれるものとした。

連続回分式リアクターは，一定量の合成排水がリアクターに流入すると一つの反応槽の中で各処理工程が行われるため，合成排水が流入してから処理が終わるまで（この一連の過程を「サイクル」と呼ぶ）の物質収支を求めやすい。また，経時的にリアクター内の水質を分析することで，各処理工程における処理速度も実験的に求めやすくなる。

3.1.1 リアクターの構造

本リアクターセットは，有効容量5 L (R1) , 3L (R2, R3) の「リアクター本体（一槽式，アクリル製）」と水温制御用の「恒温槽」からなる。「リアクター本体」は，リアクター，各種ポンプ，基質タンク，各種センサ・電極からなり，「恒温槽」は，恒温槽用コンテナ，投げ込みヒータ，水循環ポンプで構成される。リアクターシステム全体の写真をFig. 3-1 に示し，模式図をFig. 3-2に示した。

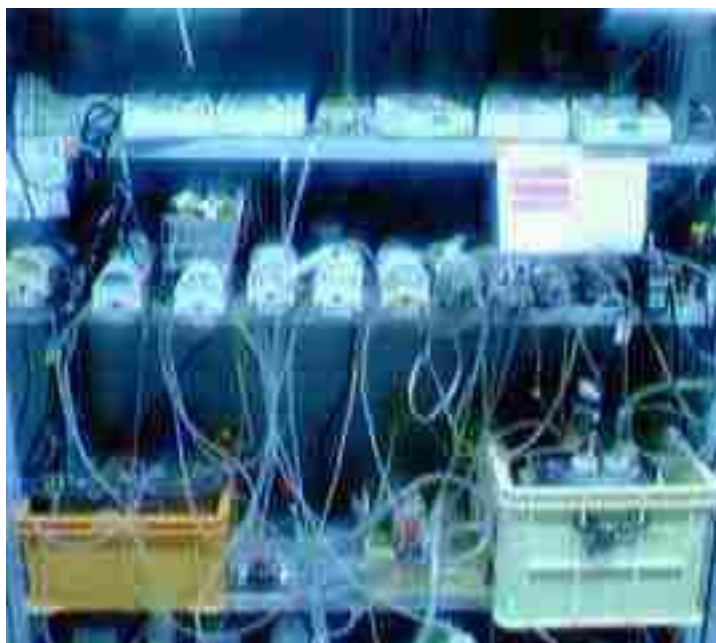


Fig.3-1 リアクターセット概観

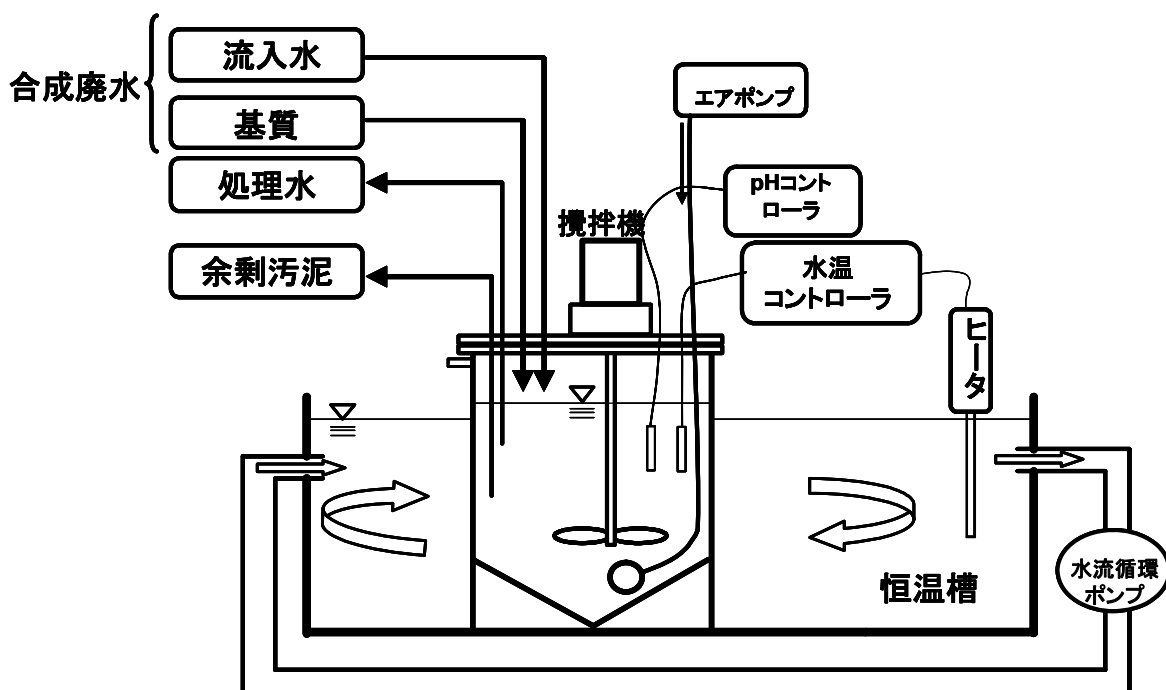


Fig.3-2 リアクターセット模式図

3.1.2 リアクターの運転条件

リアクターの基本運転条件をTable 3-1 に示した。また、リアクター制御に関わる項目について以下に解説する。

① サイクル制御

連続回分式リアクターにおいて、合成排水が流入し一連の処理工程を経て浄化された処理水が得られるまでの一連の過程を「サイクル」と呼ぶ。サイクル制御には Programmable Controller SYSMAC CPM1A-30CDR-A-V1（オムロン）を使用した。本リアクターは1 サイクル8 時間とし、運転期間中にサイクルの内訳（各処理工程の時間的配分）を変更した。詳細は第4章に譲るが、Fig. 3-3に用いたサイクルを示し、Table 3-3に亜硝酸型硝化反応における制限要因を究明するために検討した運転条件の履歴を示した。

② 合成排水

合成排水とは、実排水を模倣した有機物や無機物からなる混合液のことを指す。本リアクターで使用した合成排水の組成は新日本製鐵（株）ミニプラントのものを参考に、田中ら（2006, 修士論文）がデザインした。本研究で使用した合成排水の成分をTable 3-2 に示した。ミニプラントではコークス炉排水の主成分であるフェノールやチオンアンが含まれていたが、本リアクターでは取り扱い上の困難さから使用せず、同程度のTOC分をグルコースと酢酸で代用した。

また、Table 3-3 R2のc期に示した好気工程開始時の亜硝酸添加とは、サイクルの150分にペリスタポンプ（PERISTA PUMP SJ-1211, ATTO）で 49.285 g L^{-1} の NaNO_2 溶液を30mL加えた操作を指す。

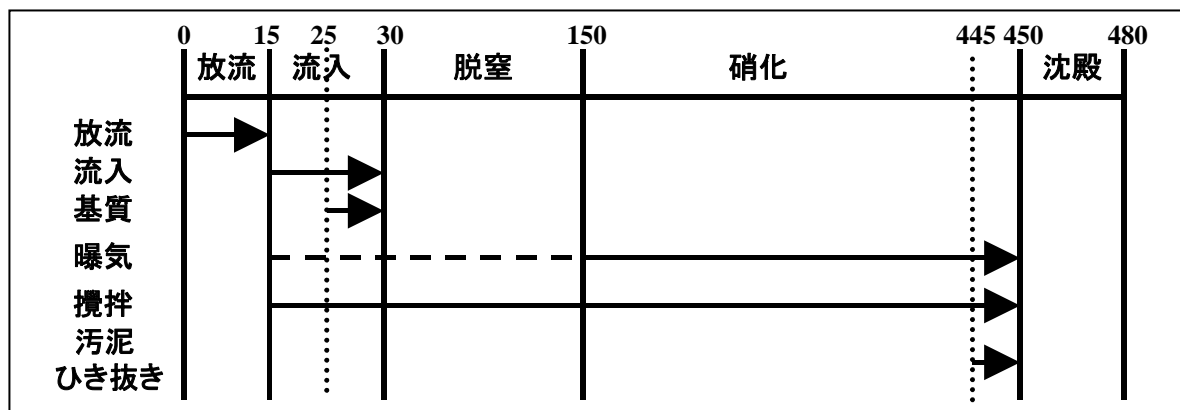


Fig.3-3 1サイクルにおけるリアクター運転スケジュール

Table 3-1 リアクター基本運転条件

有効容量	R1:5L R2,R3:3L
系	連続回分式
HRT	16時間
SRT	20日
水温	24-28°C
pH	>8.0
送気量	R1:3L min ⁻¹ R2,R3:1.8L min ⁻¹

Table 3-2 合成廃水組成

基質	濃度[mg L ⁻¹]
Glucose	362
CH ₃ COONa·3H ₂ O	874
NaHCO ₃	400
NH ₄ Cl	900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50
KH ₂ PO ₄	50
Na ₂ S ₂ O ₃	212
NaCl	14000

Table 3-3 亜硝酸型硝化反応における制限要因の検討因子

		開始日	Na ₂ S ₂ O ₃	pH	生物反応時間		送気量 L/(L·min)	好気初亜硝酸 添加濃度
			mg L ⁻¹		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	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	

③ 塩濃度

新日本製鐵（株）ミニプラントミニプラントでは実際の海水を用いていたが、本リアクターでは、標準海水と規定されているもの（淵，1970）を参考に、塩化ナトリウム溶液（14.0g NaCl L⁻¹）をもって模擬海水とし、合成排水に混入させた。

④ HRT およびSRT の制御

HRT（Hydraulic Retention Time；水理学的滞留時間）とはすなわち流入した合成排水がリアクター内に滞留する時間であり，SRT（Solid Retention Time；固形物滞留時間）はリアクター内の固形物=活性汚泥が更新される時間である。

本リアクターでは1 サイクルを8 時間とし，サイクルごとにリアクターの有効容量（R1:5L, R2, R3: 3L）の半分に相当するそれぞれ2.5 L（7.5 L day⁻¹），1.5L（7.5 L day⁻¹）の処理水を放流し，同量の合成排水を流入するように制御した。よって，一度流入した合成排水が処理水として完全に放流される時間 $HRT=5/7.5 = 2/3 \text{ day} = 16 \text{ hr}$ に制御された。

SRT は良好な活性汚泥の維持に関わる重要な要因となる。最適なSRT よりも短い

SRTを設定すると、活性汚泥微生物群集の生育速度を汚泥の更新速度が凌駕してしまい、リアクターから活性汚泥がウォッシュアウトされてリアクター内の適度な汚泥濃度が維持できなくなる。本研究では、生育速度の遅い独立栄養の硝化細菌をターゲットにしたため、SRT= 20 日と比較的長めに設定した。SRT は、沈殿工程の直前5分間にR1では83mL、R2,R3では50mlの汚泥混合液をリアクターから引き抜くことで制御した。

⑤ 水温制御

本リアクターでは、水温コントローラ（FHP-301，東京硝子器械）による水温の自動調節を行った。R1リアクター内水温をセンサでモニタリングし、恒温槽の投げ込みヒータがそれに呼応する仕組みとし（Fig. 3-2），リアクター内水温を30℃に保つようにした。実際には合成排水流入直後は水温が下がること、リアクターを増設したために恒温槽も増大させた影響で水温は24-28℃で保たれていた。

⑥ pH 制御

pH の制御にはpH コントローラ（PU-01，SHIBATA）とペリスタルティックポンプ（PERISTA PUMP SJ-1211，ATTO），80g NaHCO₃ L⁻¹ 溶液を用いた，下限のみの制御を行った。pH の制御値は，pH>8.0またはpH>7.2とした（詳細は第4章参照）。

⑦ 曝気量制御

酸素を多量に消費する硝化反応において、リアクターの曝気量は重要な意味を持つ。本リアクターでは、エアポンプ（APN-085V-1，IWAKI）と流量計（ヒヨシ器械産業）により曝気量の制御を行った。曝気量は0.6L L⁻¹ min⁻¹または1.2L L⁻¹ min⁻¹とした（詳細は第4章参照）。

3.1.3 リアクターの水質モニタリング

水質モニタリングは、1日-2週間に一度、任意のサイクルにおいて合成排水流入直後から一連の処理工程が終わるまでの間に経時的に採取した汚泥混合液（Mixed liquor）中の溶存態物質に対して行った。本研究におけるリアクター水質分析項目をTable 3-4に示した。

また、リアクターの汚泥濃度を把握するために毎回の水質モニタリング時にMLSS，MLVSSを測定した。

Table 3-4 水質分析項目

分析項目	分析法
アンモニウムイオン	インドフェノール法
亜硝酸イオン	ナフチルエチレンジアミン法
硝酸イオン	イオンクロマトグラフィー
チオ硫酸イオン	イオンクロマトグラフィー
硫酸イオン	イオンクロマトグラフィー
溶存有機態炭素	全有機態炭素計

以下に、各モニタリング項目の分析方法を紹介する。

a) アンモニウムイオン

アンモニウムイオンはインドフェノール法により定量した。リアクターから採取した汚泥混合液を遠心分離（3500rpm, 3-5min.）し、上澄み液を0.45 μm のメンブレンフィルター（Cellulose acetate）でろ過したものを供試検体とした。以下に分析の詳細を示す。

使用器具・装置

分光光度計

2.5 mL 比色管, etc.

汲んだばかりの超純水

試薬

・フェノールアルコール溶液

プロピルアルコール（1-プロパノール）5 mL にエタノールを加えて全量を100mL とした液に、フェノール10g を溶かした。

・ニトロプルシッドナトリウム溶液

ニトロプルシッドナトリウム（ペンタシアノニトリル鉄（Ⅲ）酸ナトリウム）1g を超純水200mLに溶かし、遮光保存。一ヶ月有効。

・アルカリ性クエン酸三ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム5g を超純水約350mL に溶かし、クエン酸三ナトリウム100g を加えて溶かし、最後に超純水で500mL にメスアップした。

・次亜塩素酸ナトリウム溶液

次亜塩素酸ナトリウムを2-5 倍程度希釈して用いた。測定当日に調整。

・酸化剤溶液

アルカリ性クエン酸三ナトリウム溶液：次亜塩素酸ナトリウム溶液 = 4 : 1 で混合した。測定当日に調整。

・アンモニア性窒素標準原液（1000mgN L⁻¹）

塩化アンモニウムを硫酸デシケートで4 時間以上乾燥させた後、3.82g を正確に量り取り、汲んだばかりの超純水に溶かして1 L に定容。

検量線の作成

(1) アンモニア性窒素標準原液から0-0.8mgN/Lの範囲で5 段階以上の標準液を、各10mLずつ、25mL比色管内に作成した。

(2) 試料と同様に発色させ、アンモニア性窒素濃度と吸光度の関係から、検量線を作成した。

測定

(1) 25mL 比色管に、適当に希釈した試料を10mL とった。

(2) フェノールアルコール溶液0.4mL, ニトロプルシッドナトリウム溶液0.4mL, 酸化剤液1 mL, を毎回よく混合しながら、この順に加えた。

(3) 室温（暗所）で1 時間以上静置した。

(4) 分光光度計を用いて波長640nm の吸光度を測定し、検量線から濃度を決定した。

b) 亜硝酸イオン

亜硝酸イオンの定量はナフチルエチレンジアミン法により行った。リアクターから採取した汚泥混合液を遠心分離（3500rpm, 3-5min.）し、上澄み液を0.45 μm のメンブレンフィルター（Cellulose acetate）でろ過したものを供試検体とした。以下に分析の詳細を示す。

使用器具・装置

分光光度計

25mL 比色管, etc.

汲んだばかりの超純水

試薬

・スルファニルアミド溶液

塩酸60mL と超純水約80mL の混合液にスルファニルアミド（4-アミノベンゼンスルホンアミド）2g を加えて溶かした。さらに超純水を加えて、200mL に定容した。

・N-(1-ナフチル)エチレンジアミン溶液

N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩0.2g を超純水に溶かして200mL とした。遮光保存。

・亜硝酸性窒素標準原液（250mgN L⁻¹）

亜硝酸ナトリウム1.23g を正確に秤量し、超純水で1 L に定容した。これにクロロホルム1mL を加え、冷蔵保存した。

検量線の作成

(1) 亜硝酸性窒素標準原液（250mgN L⁻¹）から0-0.2mgN/L の範囲で5 段階以上の標準液を、各10mL ずつ、25mL 比色管内に作成した。

(2) 試料と同様に発色させ、亜硝酸態窒素濃度と吸光度の関係から、検量線を作成した。

測定

(1) 25mL 比色管に亜硝酸性窒素が0.2mgN L⁻¹ になるように調整した試料を10mL とった。

(2) スルファニルアミド溶液1mL を各試料に加えよく混合し、5 分間静置した。

(3) N-(1-ナフチル)エチレンジアミン溶液を1 mL 加え、よく混合し20 分間室温（暗所）で静置した。

(4) 分光光度計を用いて波長540nm の吸光度を測定し、検量線から濃度を求めた。

c) 硝酸イオン，硫酸イオン，チオ硫酸イオン

硝酸イオン，硫酸イオン，チオ硫酸イオンは水溶液中で陰イオンとして存在している。本研究では陰イオン分離カラムを搭載したイオンクロマトグラフィー（Compact IC 761, メトローム, 2006年9月以降はDX-AQ1110, （GLサイエンス）を使用）により、これらのイオンを定量した。

採取した汚泥混合液を遠心分離（3500rpm, 3-5min.）し、その上澄みを0.45 μm のメンブレンフィルター（Cellulose acetate）でろ過したものを適当に希釈し、分析に供した。また、同定・定量のための標準溶液を各成分につき調製し、そのピーク面積から検量線を作成した。得られた供試検体のピーク面積値と検量線から、各イオン濃度を求めた。

d) 溶存有機態炭素

溶存有機態炭素（Dissolved Organic Carbon; DOC）は下水試験法（1997）に従い、上澄み液中の全有機態炭素（Total Organic Carbon; TOC）と定義し、測定にはTOC-V（島津製作所）のNPOC（Non-Purgeable Organic Carbon; 不揮発性有機態炭素）測定モードを用いた。この方法では、供試検体に酸を加えてpH<3 にした後スパージガスを通気することで検体中の無機態炭素を二酸化炭素（CO₂）となり除去した後に測定したTOCをもって、DOC を測定する方法である。

分析には、採取した汚泥混合液を遠心分離（3500rpm, 3-5min.）し、その上澄みを0.45 μm のメンブレンフィルター（Cellulose acetate）でろ過後、適当に希釈したものを供した。また、定量のための標準液としてフタル酸水素カリウム溶液を用意した。NPOC法による測定で得られたピーク面積値から、DOC 濃度を求めた。

e) MLSS, MLVSS

MLSS（Mixed Liquor Suspended Solids; 汚泥混合液浮遊物質）、MLVSS（Mixed Liquor Suspended Solids; 汚泥混合液揮発性浮遊物質）の定義および測定方法は下水試験法（1997）に倣った。以下に測定手順の詳細を述べる。

- ① 蒸発皿を600℃で30分乾燥させ、秤量した（A）。
- ② リアクターから汚泥混合液25mL×2を採取。遠沈管にいれ、3500rpm, 5min. 遠心分離した。
- ③ 上清を捨て、無機塩類を完全に除去するためRO水を入れて汚泥を懸濁させもう一度遠心分離した。
- ④ Aの蒸発皿に汚泥をとり、湯浴上で水分を蒸発させた。
- ⑤ 110℃オーブンで2時間乾燥させ、デシケータ中で放冷。その後秤量（B）。
- ⑥ 600℃オーブンで30分乾燥、放冷（110℃オーブン、デシケータで）、秤量（C）。
- ⑦ ① - ⑥の手順より得られたA, B, Cを用いた以下の計算式により、MLSS, MLVSSを算出した。

$$\text{MLSS} = (A - B) \times 40000 \text{ [mg L}^{-1}\text{]}$$

$$\text{MLVSS} = (B - C) \times 40000 \text{ [mg L}^{-1}\text{]}$$

3.1.4 ルンゲ=クッタ法による数値シミュレーション

ルンゲ=クッタ法（Runge-Kutta method）とは、数値解析において常微分方程式の近似解を求める一連の方法である。この技法は1900年頃に数学者C. RungeとM. W. Kuttaによって発展された。

古典的な4次ルンゲ=クッタ法

一般に用いられているルンゲ=クッタ法は4次のルンゲ=クッタ法 (RK4) と呼ばれるものである。

初期値問題を次のように設定する。

$$y' = f(t, y), \quad y(t_0) = y_0$$

次に, RK4 ではこの問題に対して次式を与える。

$$y_{n+1} = y_n + \frac{h}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)$$

ここで,

$$k_1 = f(t_n, y_n)$$

$$k_2 = f\left(t_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{h}{2}k_1\right)$$

$$k_3 = f\left(t_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{h}{2}k_2\right)$$

$$k_4 = f(t_n + h, y_n + hk_3)$$

である。

このようにして, 次のステップの値 (y_{n+1}) が, 現在の値 (y_n) とその間隔 (h) の積から見積もられた勾配から求められる。その勾配は重み付け平均である。

k_1 は初期値における勾配である。

k_2 は区間の中央における勾配であり, 勾配 k_1 を用いて $t_n + h/2$ における y の値をオイラー法により決定したものである。

k_3 は区間の中央における勾配を再計算したものであり, k_2 の値から決められた y の値を用いる。

k_4 は区間の最後における勾配であり, k_3 の値から決められた y の値を用いる。

これら4つの平均を取るには, 中央の勾配に対して大きな重み付けを与える。

$$\text{slope} = \frac{k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4}{6}$$

RK4 は4次の方法であり, 全体の推定誤差が h^4 のオーダーになることを意味する。

このルンゲ=クッタ法にMonod式を適用してAOBとNOBの増殖速度と基質消費速度をシミュレーションした。用いたAOB, NOBのMonod式を式3-1, 3-2, 3-3に示した。

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{AOB} X_{AOB} \frac{S_{NH_4}}{K_{S_{NH_4}} + S_{NH_4}} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{S_{O_2}} + S_{O_2}}$$

式 3-1

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{NOB} X_{NOB} \frac{S_{NO_2}}{K_{S_{NO_2}} + S_{NO_2}} \bullet \frac{S_{O_2}}{K_{S_{O_2}} + S_{O_2}} \quad \text{式 3-2}$$

$$r_u = -\frac{dS}{dt} = -\frac{r_g}{Y}$$

$$r_g = \frac{dX}{dt} \quad \text{式 3-3}$$

用いたパラメータ等の詳細は4章に示す。

3.2 硝化細菌群集解析

3.1 において構築された実験室規模活性汚泥リアクターにおいて、硝化反応の主役である硝化細菌群集の挙動解析を行った。硝化反応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。すなわちアンモニア態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) を亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) まで酸化するアンモニア酸化細菌 (Ammonium Oxidizing Bacteria; AOB) と、亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) を硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) まで酸化する亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) である。亜硝酸型硝化反応は、AOB の活性が維持された状態でNOB の活性が抑制された場合にのみ起こると考えられる。よって、本実験室規模活性汚泥リアクターの亜硝酸型硝化反応を議論するうえで、AOB およびNOB の動態を解析は必要不可欠であると考えられる。

本研究では、リアクターの運転期間中におけるAOB, NOB の存在量, 存在属あるいは存在種の変動を把握するために、分子生物学的な手法による解析を行った。AOB, NOB 存在量の把握には定量的PCR の一手法であるQPrimer-PCR 法 (Kurata et al. 2001) を、存在属/存在種の把握にはFISH 法 (Amann et al. 1995-a), PCR-Cloning-Sequencing 法 (Giovannoni et al. 1990), PCR-TRFLP (Moeseneder et al. 1999) を用いた。以下にそれぞれの実験について詳説する。

3.2.1 活性汚泥サンプルの採取

硝化細菌群集解析用の活性汚泥サンプルは以下の要領で採取・保存した。サンプル採取は毎回のリアクターの水質モニタリングのときに行った。

(1) FISH 法による解析に用いるための活性汚泥サンプルの採取

1. 曝気 (硝化) 過程中のリアクターから汚泥混合液1.0mL を凍結保存用の1.8mL 容クライオチューブ (Nalge Nunc International) に採取した。
2. すぐに -80°C に急冷し、分析に供するまでそのまま凍結保存した。

(2) DNA 抽出に供するための活性汚泥サンプルの採取

1. 曝気 (硝化) 過程中のリアクターから汚泥混合液1.0mL を凍結保存用の1.8mL 容クライ

チューブ (Nalge Nunc International) に採取した。

2. 遠心分離 (3500rpm, 10min.) を行い, 上澄み液をデカンテーションにより除去した。
3. TE buffer を1.0 mL 加え, 汚泥を手で軽く分散させ, 再び遠心分離 (3500rpm, 10min.) を行った。
4. 上澄み液をデカンテーションにより除去し, DNA 抽出に供するまで -80°C で凍結保存した。

3.2.2 核酸の抽出

a) DNAの抽出

DNA の抽出はFastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene, 現MP Biomedicals) により行った。抽出はキットに付属のプロトコルに従って行った。以下に手順について記す。

1. -80°C で凍結保存された活性汚泥サンプル (3.2.1 (2)) を解凍し, Lysing Matrix E Tube に移した。
2. $978\ \mu\text{L}$ のSodium Phosphate Buffer と $122\ \mu\text{L}$ のMT buffer を加えたLysing Matrix E TubeをFastPrep® Instrument (Qbiogene, 現MP Biomedicals) にセットし, speed 5.5, 30 sec. で細胞破碎処理を行った。
3. 遠心分離 ($14000\ \text{g}$, 30 sec.) を行い, マイクロピペットで上澄み液を新しいチューブに移し, $250\ \mu\text{L}$ のPPS reagent を加え, 10 回転倒混和した。
4. 遠心分離 ($14000\ \text{g}$, 5 min.) し, マイクロピペットをもちいて上澄み液を $15\ \text{mL}$ チューブに移した。Binding Matrix を $1\ \text{mL}$ 加え2 分間転倒混和したのち, 3 分間静置した。
5. 上澄み液を $500\ \mu\text{L}$ 捨て, 再び混和した。混和液をSPIN™ Filter に移し, $14000\ \text{g}$ で1分間遠心分離した。
6. Catch tube に通過した液 (flow-through) を捨てた。 $500\ \mu\text{L}$ のSEWS-M をFilter 上に加え, 再び遠心分離 ($14000\ \text{g}$, 1 min.) , flow-through を捨てた。
7. Filter 上のBinding Matrix-DNA 結合体に $100\ \mu\text{L}$ のDES を加えピペッティングし, DNAを溶出した。Filter を新しいチューブに移し遠心分離 ($14000\ \text{g}$, 1 min.) することでDNAを回収した。回収したDNA は解析に供するまで -20°C で凍結保存した。

上記手順により得られたDNA 抽出産物中のDNA 濃度をNanoDrop ND-1000 (NanoDrop) を用いて吸光度 $260\ \text{nm}$ の波長を測定することにより求めた。測定値は各種解析の際の濃度調整の際に活用した。

b) RNA の抽出

RNA-SIP に用いた RNA の抽出は RNeasy mini kit を用いて行った。抽出はキットに付属のプロトコルと Manfieldら (2002) の方法を参考にし, 抽出効率を上げるために一部変更を施した。

1. -80°C で凍結保存された活性汚泥サンプルを解凍し、24mMPosphate Buffer 500 μL を添加後、Mora EXTRACT 付属のジルコニアビーズチューブに移した。
 2. Phenole-Clolofolm solution (Ambion) 500 μL と Buffer RLT 600 μL を添加する。
 3. チューブを FastPrep® Instrument (MP Biomedicals) にセットし、speed 6.5, 40sec. で細胞破碎処理を行った。
 4. FastPrep® Instrument からサンプルを取り外し、遠心分離(14000g, 5min)を行い、ビーズを沈殿させた。
 5. 水層を新しいマイクロ遠心チューブに移し、遠心分離(14000g, 2min)し、上清を新しいマイクロ遠心チューブ(別売り)に移した。上清のみを次のステップに使用した。
 6. ホモジナイズしたライセートに同量(通常 350 μL)の 70%エタノールを添加し、ピペットで良くミックスした。遠心操作を行わなかった。
 7. 形成した沈殿物を含んだサンプルを、2 mL コレクションチューブ(付属品)にセッティングした RNeasy ミニカラムにアプライした。ふたを静かに閉め、 $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{ rpm}$) で 15 秒間遠心操作した。フロースルー*を捨てた。コレクションチューブはステップ 8 で再使用した。残りのサンプルを続けて RNeasy カラムにアプライして上記の条件で遠心操作を行ってください。各遠心操作の後フロースルーを捨てた。
 8. 700 μL の Buffer RW1 を RNeasy カラムにアプライした。チューブのふたを静かに閉めて、洗浄のために $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{ rpm}$) で 15 秒間遠心した。フロースルーとコレクションチューブを捨てた。
 9. RNeasy カラムを 2 mL の新しいコレクションチューブ(付属品)に移した。500 μL の Buffer RPE を RNeasy カラムにピペットでアプライした。ふたを静かに閉めて洗浄のために $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{ rpm}$) で 15 秒間遠心操作を行った。フロースルーを捨てた。コレクションチューブはステップ 10 で再使用した。
 10. 500 μL の Buffer RPE を RNeasy カラムに添加する。チューブのふたを静かに閉め、RNeasy シリカゲルメンブレンを乾燥するため、 $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{ rpm}$) で 2 分間遠心操作した。
 - 10 a. 最高スピードで 1 分間マイクロ遠心機で遠心操作を行った。残存しているエタノールがダウンストリーム反応を妨害することがあるため、RNeasy シリカゲルメンブレンの乾燥は重要であった。この遠心操作により、溶出の際のエタノールのキャリーオーバーを防ぐことができた。
- 注：遠心操作後、カラムがフロースルーに触れて、その結果エタノールのキャリーオーバーが起こらないように、コレクションチューブから注意して RNeasy ミニカラムを取り除いた。
11. 溶出のために、RNeasy カラムを新しい 1.5 mL コレクションチューブ(付属品)に移した。RNeasy シリカゲルメンブレンに 50 μL の RNase フリー水を直接ピペットで添加した。ふたを静かに閉め、 $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000 \text{ rpm}$) で 1 分間遠心操作を行い溶出した。

一方, RT-Qprimer PCR に用いた RNA サンプルには, MORA-EXTRACT®を用いた。こちらのキットは RNA を選択的に抽出する能力はないが, 全核酸の抽出効率がよく, 費用が安く済むという利点があるため, このキットで得られたサンプルのうち, 少量を十分に DNase 処理した上で RT-QPrimer PCR に供することとした。

1. -80°C で凍結保存された活性汚泥サンプルを解凍し, $150\ \mu\text{L}$ のライシスバッファを添加後, よく懸濁した。
2. 懸濁液をビーズ充填チューブに移し, 70°C で 10 分間加熱して溶菌した。
3. 加熱処理後, チューブを FastPrep® Instrument (MP Biomedicals) にセットし, speed 4.5, 60sec. で細胞破碎処理を行った。
4. FastPrep® Instrument からサンプルを取り外し, 卓上ミニ遠心機でスピンドウンを行い, ビーズを沈殿させた後, SDS 溶液 $200\ \mu\text{L}$ を加えて混ぜ, 再び 70°C , 10 分間加温した。
5. $400\ \mu\text{L}$ のフェノール混合液を加え, 混合後 $15,000\text{rpm}$, 3 分間遠心し, 上層を付属の実験用 2mL チューブに回収した。
6. 粗精製核酸に 99% エタノールを 1mL 加え混合後, 再度 $15,000\text{rpm}$, 3 分間遠心した。上澄みを捨てた後, 70% エタノールを 1mL 程度加え混合後, $15,000\text{rpm}$, 3 分間遠心した。その後, 上澄みを捨てて乾燥させた。
7. 乾燥させた沈殿に, $200\ \mu\text{L}$ の TE buffer を加え溶解させた。
8. 上記手順により得られた RNA 抽出産物中の RNA 濃度を NanoDrop ND-1000 (NanoDrop) を用いて吸光度 $260\ \text{nm}$ の波長を測定することにより求め, TE Buffer で濃度を 100ngL^{-1} に調整し, $25\ \mu\text{L}$ を DNase 処理した。

c) DNase 処理

RNA と大きく浮遊密度の異なる DNA がサンプル中に共存すると核酸の分離が阻害される。また, 逆転写反応後はもともとサンプル中に混入していた DNA と RNA 由来の cDNA は区別できない。そこで, DNase 処理を行うことによってサンプル中の DNA を分解し, 純度の高い RNA サンプルを得た。DNase 処理には TURBO DNA-free™ (Ambion) を用いた。

1. 抽出済み RNA サンプルの核酸濃度を NanoDrop ND-1000 (NanoDrop) を用いて測定した。測定値より, サンプル濃度が $10\ \mu\text{g}/50\ \mu\text{L}$ 以下となるように希釈した。
2. 0.1volume 10X TURBO DNase Buffer と $1.5\ \mu\text{L}$ TURBO DNase を添加し, 穏やかに混合した。
4. 37°C で 30 分間 incubate した。
5. さらに $1.5\ \mu\text{L}$ の TURBO DNase を添加し, 穏やかに混合後, 37°C で 30 分間 incubate した。
6. DNase Inactivation Reagent を 0.1volume 添加し, よく混合した。
7. 室温で 2 分間, 時々振りながら incubate した。
8. 10000g で 1.5 分間遠心分離し, 上澄みを新しいチューブに移した。

3.2.3 FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization)

第2章で述べたように、AOB群を一度に広く捉えることのできるPCR primer や FISH probe が存在する一方で、NOB群に対してはそのようなツールは現時点で存在しない。したがって、リアクター内 NOB の定量/定性を行う前に、NOB として知られている *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* の4属のうちリアクター内に優占している属を決定する必要があった。

NOB を標的にした既存の FISH probe の一覧は第2章で紹介した通りであり、本研究では Table 3-5 に示した4つの NOB-target probe を用いた。これらの probe はそれぞれ *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* に特異的であるとされており、これらの probe による細胞の検出の有無で、リアクター内における優占 NOB 属を決定することとした。また EUB-mix probe (EUB-I, EUB-II, EUB-III の混合 probe) を作成し、対比染色に用いた。供試検体は亜硝酸酸化活性が活発であったリアクター運転8日目の汚泥を用いた。

Table 3-5 使用 probe 一覧

probe name	sequence	specificity	Fc [%]	reference
EUB338-I	5'- GCTGCCTCCCGTAGGAGT -3'	Eubacteria	20-35	Amann et al. (1990)
EUB338-II	5'- GCAGCCACCCGTAGGTGT -3'	Eubacteria	35	Amann et al. (1990)
EUB338-III	5'- GCTGCCACCCGTAGGTGT -3'	Eubacteria	35	Amann et al. (1990)
NIT3	5'- CCTGTGCTCCATGCTCCG -3'	<i>Nitrobacter</i> spp.	40	Wagner et al. (1996)
Ntspa662	5'- GGAATTCGCGCTCCTCT -3'	genus <i>Nitrospira</i>	35	Daims et al. (2001)
Ntspn693	5'- TTCCCAATATCAACGCATTT -3'	<i>Nitrospina gracilis</i>	20	Juretschko S. (2000)
Ntcoc84	5'- TGGCCAGCCACCTTCCG -3'	<i>Nitrococcus mobilis</i>	10	Juretschko S. (2000)

Fc: Formamideconcentration

FISH法の操作手順は基本的に Amann et al. (1995)に従った。以下にその詳細について記す。

(1) サンプルの固定とスライドガラスの作成

1. -80℃で保存したリアクター運転8日目の活性汚泥サンプル(3.2.1 参照)を解凍した。サンプル 200 μL に対し固定液 (4% paraformaldehyde) 600 μL を加え、4℃で1-3時間固定した。
2. 5000g で遠心分離し固定液を捨てた。固定液を完全に除去するために、1×PBS を適量加え懸濁し、再び遠心分離後、上澄み液を捨てた。
3. 1×PBS, 氷冷したエタノールをそれぞれ 200 μL 加え、氷冷しながら超音波分散を行った (10W, 4min.)。
4. 予めゼラチンコート (0.1%ゼラチン溶液に 2 分間浸し、風乾) を施したスライドガラスのウェル一つに 2 μL ずつ固定、超音波分散の済んだサンプルを分注、風乾し、供試標本とした。

(2) プローブハイブリダイゼーション

1. 10 μM に濃度調製した oligonucleotide probe 1 容に対し hybridization buffer (x%formamide, 0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 0.01%SDS, pH7.2) 8 容を加え、標本スライドガラス上の各ウェルに 9 μL ずつ滴下した。
2. hybridization buffer を染み込ませたろ紙を入れ、ハイブリダイゼーション温度(46℃)

で気液平衡状態にしておいた 50 mL ポリプロピレン遠沈管にスライドガラスを入れ、ハイブリダイゼーションを行った (46°C, 2 時間)。

3. スライドガラスをポリプロピレン遠沈管から取り出し、ハイブリダイゼーション温度に保っておいた Washing buffer (5 M NaCl, 0.01% SDS, 20mM Tris-HCl) で未結合 probe を軽く洗い流した。
4. さらに washing buffer の入った 50 mL ポリプロピレン遠沈管にスライドガラスを浸し、ハイブリダイゼーション温度で 20 分静置した。
5. スライドガラスを取り出し、MilliQ 水で washing buffer を洗い流し、すぐにスライドガラスを振って水を切り、暗所で空気乾燥した。

(3) 顕微鏡観察

顕微鏡観察には蛍光顕微鏡 (DP70, Olympus) を用いた。明視野、緑色励起 (FITC 標識した EUB mix probe の観察)、赤色励起 (Cy3 標識した NOB 標的 probe の観察) について画像を撮り、蛍光の確認を行った。

3.2.4 PCR primer の選定と PCR 条件

硝化細菌を標的にした PCR (Polymerase Chain Reaction) 用の primer が設計されている。本研究では、実験室規模活性汚泥リアクター内における既知の AOB および NOB の定量/定性を行うことを掲げているため、より幅広くかつ特異的に AOB・NOB を捉えられる PCR primer を用いた解析を行うことが肝要であった。

AOB を標的にした primer としては、第 2 章で紹介したものが知られているが、本研究では Rotthauwe et al. (1997) が設計した *amoA*-1F, *amoA*-2R primer set を用いることとした (Table 3-6)。この primer set は、*Betaproteobacteria* に属する AOB (betabacterial AOB; β -AOB) が有するタンパク質 ammonia monooxygenase subunit A (AmoA) をコードする機能遺伝子 *amoA* を標的としたものであり (Rotthauwe et al., 1997) 使用実績も数多い。*amoA* を標的にすることで、16S rDNA を標的にした PCR よりも特異的に AOB を捉えられることを期待した。また、数ある既知の細菌の機能遺伝子の中でも *amoA* 塩基配列のデータベースは充実しており、得られた *amoA* 配列から近縁種を求めることは十分可能であると考えられている (Purkhold et al., 2000, Aakra et al., 2001, Purkhold et al., 2003)。本研究では、3.2.3 の FISH 法によりリアクター内の優占属と決定された (第 5 章参照) *Nitrobacter* 属の 16S rDNA を標的とする FGPS872f-1269r primer set を用いることとした (Table 3-6)。既知の NOB は 16S rRNA 塩基配列に基づいた分類では 4 つもの属に散在して存在しているため (第 2 章参照)、それら全てを特異的に捉える primer の設計は困難であり、現時点で開発についての報告はない。現在開発されている NOB 16S rDNA を標的にする primer set としては、*Nitrobacter* 属 (α -proteobacteria) を特異的に増幅する FGPS872f-1269r (Degrange & Bardin, 1995) と *Nitrospira* 属 (*Nitrospira*) を特異的に増幅する NSR1113f-1264r (Doinishi et al., 2002) が知られている。16S rDNA を標的とする primer のほかにも、*Nitrobacter hamburgensis* の亜硝酸酸化還元酵素 (NOR) をコードする機能遺伝子 *norB* の塩基配列から設計された norB269f-443r primer set の開発が報告されている (赤司, 2004) が、このプライマーの実績は皆無に等しい。

Table 3-6 PCR primer

Primer		Sequence(5'-3')	Target	Reference
27f-1492r primer set	27f 1492r	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGTTACCTTGTTACGACT	eubacteria	Lane,D.J. 1991
amoA-1F-2R primer set	amoA-1f amoA-2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	β -AOB	Rotthauwe et al. 1997
FGPS872f-1269r primer set	FGPS872f FGPS1269r	CTAAAACTCAAAGGAATTGA TTTTTTGAGATTTGCTAG	genus <i>Nitrobacter</i>	Degrange & Bardin 1995
NSR1113f-1264r primer set	NSR1113f NSR1264r	CCTGCTTTTCAGTTGCTACCG GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	genus <i>Nitrospira</i>	Dionisi et al. 2002

[K=G or T, S=G or C]

以下に本研究において一貫して用いた PCR 条件と,アガロース電気泳動による PCR 産物の確認について述べる。

(1) PCR 条件

本研究における *amoA*-1F-2R FGPS872f-1269r および NSR1113f-1265r を用いた PCR は,特に断りのない限り Table 3-7, 3-8 の条件で行った。

Table 3-7 PCR 条件

<i>amoA</i> -PCR			FGPS-PCR		
Primer			Primer		
<i>amoA</i> -1F: 5'- ggg att tot act gat ggt -3'			FGPS872f: 5'- cta aaa ctc aaa gga att ga -3'		
<i>amoA</i> -2R: 5'- ccc ctc kgs aaa gcc ttc ttc- 3'			FGPS1269r: 5'- ttt ttt gag att tgc tag -3'		
PCR mixture			PCR mixture		
	Final conc	volume [μ L]		Final conc	volume [μ L]
ddH ₂ O	-	29.5	ddH ₂ O	-	29
10xAmpliTaq PCR buffer (with 1.5mM MgCl ₂)	1x	5	10xAmpliTaq PCR buffer (with 1.5mM MgCl ₂)	1x	5
2mM dNTP	0.2 mM	5	2mM dNTP	0.2 mM	5
100 μ M forward primer	0.25 μ M	0.125	100 μ M forward primer	0.5 μ M	0.25
100 μ M reverse primer	0.25 μ M	0.125	100 μ M reverse primer	0.5 μ M	0.25
5U/ μ L AmpliTaq Gold	1.25 unit	0.25	5U/ μ L AmpliTaq Gold	2.5 unit	0.5
template (5ng/ μ L)	50ng	10	template (5ng/ μ L)	50ng	10
total	-	50	total	-	50
Thermalcycler program			Thermalcycler program		
step	temperature [$^{\circ}$ C]	incubation [sec]	step	temperature [$^{\circ}$ C]	incubation [sec]
hot start	94	600	hot start	95	600
denature	94	15	denature	94	45
anneal	55	20	anneal	50	45
extention	72	120	extention	72	90
final extention	72	300	final extention	72	600

Table 3-8 NSR-PSR 条件

NSR-PCR		
Primer		
NSR1113f:	5'-cct gct ttc agt tgc tac cg -3'	
NSR1264r:	5'-gtt tgc agc got ttg tac cg-3'	
PCR mixture		
	final conc.	volume(μ L)
ddH ₂ O	-	29
10xAmpliTaq PCR buffe	1x	5
2mM dNTP	0.2mM	5
100 μ M forward primer	0.5 μ M	0.25
100 μ M reverse primer	0.5 μ M	0.25
5U/ μ L AmpliTaq Gold	2.5U	0.5
template(5ng/ μ L)	50ng	10
total		50
Thermalcycler program		
step	temperature($^{\circ}$ C)	incubation(sec)
hotstart	94	300
denature	94	30
anneal	65	30
extention	72	30 35cycle
final extention	72	900

(2) アガロース電気泳動による PCR 産物の確認

PCR 産物が、目的とする標的配列が正しく増幅されたものであることを確認する手法としてのアガロースゲル電気泳動を活用した。アガロースゲルにアプライされた DNA 断片は、その長さによって異なる電気泳動距離を示す。よって、既知の DNA 断片長からなる DNA マーカーとともに PCR 産物を電気泳動することで、PCR 産物が標的 DNA 断片長に等しい長さであるかが確認できる。以下にアガロース電気泳動の手順を示した。

1. Agarose S (日本ジーン) を 1×TAE に溶かし、1.0-1.5% (w/mL) アガロースゲルを作成した。
2. i-Mupid-J(ADVANCE) にアガロースゲルをセットし、PCR 産物 5 μ L と 6×Loading Dye 1 μ L を混合後、ゲルのウェルにローディングした。DNA マーカーには DNA Ladder Markers, 100bp DNA Ladder (TOYOBO) を用いた。
3. 100 V で 15-20 分電気泳動したのち、5 万倍希釈したエチジウムブロマイド溶液 (BIO-RAD) に 15-20 分染色した。
4. 染色が済んだゲルを UV-Transilluminator (FAS-III システム, TOYOBO) にセットし、観察することで、目的の DNA 断片長の増幅を確認した。

3.2.5 QPrimer-PCR

QPrimer-PCR 法は、5' 末端を蛍光色素 BODIPY[®] で修飾した oligonucleotide primer を使用して PCR 増幅をリアルタイムで検出する、定量的 PCR 法の一手法である (Kurata et al., 2001)。

本研究では、と FGPS872f-1269r primer set を用いて、*Nitrobacter* 属由来 16S rDNA, 16S rRNA の QPrimer-PCR 法による定量を行った。

(1) QPrimer-PCR 用 primer の作成

QPrimer-PCR に用いる primer set は、forward 側か reverse 側のどちらの 5' 末端

が BODIPY[®]修飾されている必要がある。また、グアニン (G) との相互作用によりその蛍光が消える, という BODIPY[®]の性質を利用した蛍光消光反応を利用するためには, BODIPY[®]修飾する末端はシトシン (C) である必要がある。本研究では, *amoA* をターゲットとした QPrimer-PCR 法には *amoA*-1F 5' 末端に C を付加したものに (Table 3-8), *Nitrobacter* 16S rDNA をターゲットとした QPrimer-PCR 法には FGPS872f 5' 末端 (もともと C) に (Table 3-9), それぞれ BODIPY[®]修飾を施した。BODIPY[®]修飾 primer の作成は環境エンジニアリング(株)に依頼した。

(2) 外部標準サンプルの調製

定量のための外部標準サンプルを以下の要領で調製した。

1. 本研究で用いたリアクターから採取した運転 11 日目の活性汚泥から, 3.2.2 の要領で抽出した DNA をテンプレートとした PCR を行った。PCR primer は, *amoA* 定量用の標準サンプルの作成には *amoA*-1F-2R primer set (Table 3-6) を, *Nitrobacter* 属由来 16S rDNA の標準サンプルの作成には FGPS872f-1269r primer set (Table 3-6) を用いた。PCR mixture の組成とサーマルサイクラー (T3 Thermocycler, Biometra) プログラムは 3.2.4 に準じた。
2. 得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し, 精製産物中の DNA 濃度を NanoDrop ND-1000 (NanoDrop) を用いて吸光度 260 nm の波長を測定することにより求めた。
3. DNA 濃度から, 以下の式により PCR-精製産物中の *amoA*-1F-2R 領域 (491 bp) あるいは FGPS872f-1269r 領域 (397 bp) の DNA 断片のコピー数を算出した。

$$\text{DNAコピー数} = \frac{\text{DNA濃度}[\text{ng} / \mu\text{L}] \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{塩基長}[\text{bp}] \times 660}$$

4. 算出したコピー数を元に, PCR-精製産物を適宜希釈し, 10₁, 10₂, 10₃, 10₄, 10₅, 10₆, copies μL⁻¹ の標準サンプルを作成した。

(3) RNA サンプルからの cDNA の合成

RNA を直接定量 PCR に用いることはできないため, 逆転写反応によって合成した cDNA の定量 PCR を行った。逆転写反応には ReverTra Plus キット (TOYOBO) を用いた。反応は Table 3-9 の条件で行った。

Table 3-9 ReverTra Plus キットを用いた逆転写反応条件

Step 1	
Primer	
FGPS1269r: 5'-ttt ttt gag att tgc tag-3'	
PCR mixture	volume(μl)
RNase Free Water	2.5
10 μ M reverse primer	0.5
template RNA	3
total	6

Thermalcycler program		
step	temperature(°C)	incubation(sec)
denature	65	300
Cooling	on ice	

Step 2	
RT mixture	volume(μl)
Mixture of Step 1	6
5XRT buffer	2
10mM 4dNTP	1
10U/μ L RNase inhibitor	0.5
ReverTra Ace	0.5
total	10

Thermalcycler program		
step	temperature(°C)	incubation(sec)
anneal	30	600
reverse transcriptior	42	3600
denature	85	300

(4) LightCycler® (Roche Diagnostics) による Real-time 定量

Real-time 定量には LightCycler® (Roche Diagnostics) を用いた。16S rRNA を定量するには Table 3-8, Table 3-9 に *Nitrobacter* 16S rDNA 定量のための PCR mixture の組成と LightCycler® のプログラムを示した。検量線作成のために、LightCycler® 専用キャピラリー内に 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 コピーの標的 DNA 断片がテンプレートとして存在する外部標サンプルを作成した。データの解析には Macro for LightCycler ver. 2.2 for win (環境エンジニアリング) を用いた。定量は各サンプルについて 3 反復行い、平均値と標準偏差を求めた。

Table. 3-10 *Nitrobacter* 16S rDNA を標的とした QPrimer-PCR の条件

FGPS primer set for QP-PCR						
BODIPY-FGPS872f: 5'-(BODIPY)-CTAAACTCAAAGGAATTGA-3'						
FGPS1269r: 5'-TTTTTTGAGATTTGCTAG-3'						
QPrimer-PCR mixture (for FGPS)						
component	Final conc.	Vol. [μL]				
ddH ₂ O	-	3.9				
10x KOD PCR buffer	1x	2.0				
25mM MgSO ₄	1.0 mM	0.8				
10mg/ml BSA	0.25mg/mL	0.5				
2mM dNTP	0.2mM	2.0				
10μM forward primer	0.1μM	0.2				
10μM reverse primer	0.1μM	0.2				
1unit KOD-plus-	0.02unit	0.4				
template DNA (5ng/μL)	2.5ng/μL	10				
mixture total volume	-	10				
LightCycler program (for FGPS)						
step	Temperature [°C]	Incubation [sec]	Temperature Transition Rate (°C/sec)	Analysis mode	Acquisition mode	
hot start	95	300	20	None	NON	
PCR	(denaturation)	94	30	20	SINGLE	
	(annealing)	48	30	20	Quantification	NONE
	(extension)	68	30	20	SINGLE	
final extension	68	300	20	None	NONE	
melting curve		95	45	20	Melting	NONE
		50	120	0.2	Curve	NONE
cooling	80	0	20	None	CONT	
	40	30	20	None	NONE	

3.2.6 PCR-TRFLP

リアクター内の *amoA* の構成変化を追跡するため、*amoA* を標的にした PCR-TRFLP を行った。TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) は、蛍光色素を付加した primer を用いて得た PCR 産物を制限酵素で切断し、その断片長からサンプル中の DNA の構造を推定する方法である。以下に手順について記す。

(1) PCR

primer *amoA*-1F の 5' 末端に蛍光色素 6-Fam を付加したものを作成し (Table 3-14) , 本実験における PCR に用いた (Table 3-7) 。PCR は 3.2.6 (1) と同様の条件で行った。供試検体は運転 57, 92, 133, 145, 159, 166, 174, 181, 194, 257, 299 日目の活性汚泥か

ら抽出した DNA とした。

Table3-11 TRFLP 用 *amoA* 標的 primer

<i>amoA</i>-1F:	5'-(6-Fam) ggg gtt tct act ggt ggt -3'
<i>amoA</i>-2R:	5'- ccc ctc kgs aaa gcc ttc ttc- 3'

(2) 制限酵素処理

3.2.6 の結果より得られたリアクター内の *amoA* 塩基配列情報をもとに、使用する制限酵素の選定を DNASIS Pro (日立ソフトウェア) を用いて行った。リアクター内 *amoA* の特徴的な塩基配列を示した TR92_amoA-28, TR257_amoA-32 の 2 クローン (第 5 章 5.1.2 Fig. 5-3) の塩基配列情報を DINASIS Pro に入力した。「制限酵素サイト検索」機能を利用して、TR92_amoA-28, TR257_amoA-32 を異なる断片長で切断する制限酵素を検索した。結果、TR92_amoA-28 を forward 側 5' 末端から 77 bp の位置で、TR257_amoA-32 を 192 bp の位置で切断する制限酵素 *Mob I* を使用することとした (Table 3-15)。*Mob I* による PCR 産物の切断は Table 3-16 の通り行った。

(3) DNA 断片長の解析

制限酵素処理によって得られた DNA 断片の長さの解析は、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) の GeneScan モードにより行った。制限酵素処理の済んだ PCR 産物 5 µL, Hi-Di formamide 42 µL, DNA マーカー (GeneScan™-500 ROX™ size standard, Applied Biosystems) 0.5 µL の混合液を作成した。混合液を熱処理 (95°C, 2min.) した後直ちに 5 分間氷冷し、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer に供した。ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer の操作は付属マニュアルに準じて行った。測定データの解析にはソフトウェア GeneMapper™ (Applied Biosystems) を用いた。

Table 3-12 制限酵素 *Mob I*

Restriction site	GATC CTAG
Source:	<i>Moraxella bovis</i>
Concentration:	4-12 units/µl
Supplied buffer:	K
Reaction temperature:	37° C
Substrate for unit definition	N6-methyladenine free λ DNA
Effect of DNA methylation	Enzyme activity is affected by dam methylase. Enzyme activity is not affected CG methylase. Therefore, generally available DNAs from <i>E. coli</i> are not cleavable.

Table 3-13 制限酵素処理条件

Reaction mixture		Restriction enzyme reaction	
Component	vol. [μL]	temperature [$^{\circ}\text{C}$]	incubation [sec.]
ddH ₂ O	6	37	3 hr.
10x K buffer	1	70	15 min.
<i>Mbo</i> I (10 U μL^{-1})	2		
Substrate (PCR product)	1		
Total volume	10		

3.2.7 SIP 法

¹³C での NOB の標識

リアクターR1 より亜硝酸型硝化時（483 日目）と完全硝化型時（707 日目）の汚泥 25ml を採取した。それぞれの汚泥を遠心（34500rpm, 10 分）した後、milliQ を 50ml 加えて再び遠心処理して洗浄した。これを 2 回繰り返したことによって、汚泥中に残存していた ¹²C を除去した。

洗浄した汚泥に Table 3-14 の組成の培地を加えて振盪した混合液を 100ml のバイアル瓶に移し、ブチルキャップとアルミシールで密閉した。気相は純空気（G1）で置換し、CO₂ を取り除いた。

一日 1 回、亜硝酸（100mgN）の添加と純空気によるガス交換を行い、2 日に 1 回 ¹³C-NaHCO₃（20mgC）の添加を行なった。

培養 7 日目にバイアル中より 2ml の汚泥混合液を凍結保存用の 1.8mL 容クライオチューブ（Nalge Nunc International）に採取し、遠心分離処理（34500rpm, 10 分間）した。上澄みをデカンテーションにより除去し、1ml の TE Buffer (pH8.0) を加えて再度遠心処理（34500rpm, 10 分間）した。上澄みを除去し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

Table. 3-14 SIP 標識培養培地

substrate	concentration [mg L ⁻¹]
NaHCO ₃	400
NaNO ₂	579
CaCl ₂ ·2H ₂ O	600
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500
KH ₂ PO ₄	50
NaCl	1400

密度勾配溶媒の調整

4.5ml の 2g/ml CsTFA(Amersham Pharmacia Biotech), 175 μ l の deionized folmamid, 600 μ l の Gradient Buffer (GB;0.1M Tris-HCl,pH8.0; 0.1M KCl; 1mM DTA) をよく混合した。この溶媒の屈折率を Refractmeter AR200 (Reichert) で測定し, GBを加えることで屈折率が 1.3727 nD-TC になるように調整した。この屈折率がすなわち密度 1.795g/ml を示している (Manefield 2002)。

Table. 3-15 密度勾配溶媒の調整に用いた溶媒の密度と屈折率の関係

CsTFA stock solution (ml)	GB (ml)	Deionized folmamide(ml)	Total (ml)	density (g/ml)	refluction [nD-TC (20°C)]
4.5	0.0	0.175	4.675	1.9007	1.3770
4.5	0.1	0.175	4.775	1.8843	1.3763
4.5	0.2	0.175	4.875	1.8697	1.3756
4.5	0.3	0.175	4.975	1.8487	1.3749
4.5	0.4	0.175	5.075	1.8393	1.3743
4.5	0.5	0.175	5.175	1.8203	1.3737
4.5	0.6	0.175	5.275	1.8067	1.3731
4.5	0.7	0.175	5.375	1.7897	1.3726
4.5	0.8	0.175	5.475	1.7767	1.3720
4.5	0.9	0.175	5.575	1.7620	1.3714
4.5	1.0	0.175	5.675	1.7460	1.3708
4.5	1.1	0.175	5.775	1.7347	1.3704
4.5	1.2	0.175	5.875	1.7293	1.3700
4.5	1.3	0.175	5.975	1.7183	1.3695
4.5	1.4	0.175	6.075	1.7067	1.3690
4.5	1.5	0.175	6.175	1.6960	1.3685

超遠心溶媒作成時の目安	density (g/ml)	refluction [nD-TC (20°C)]
	1.795	1.3727

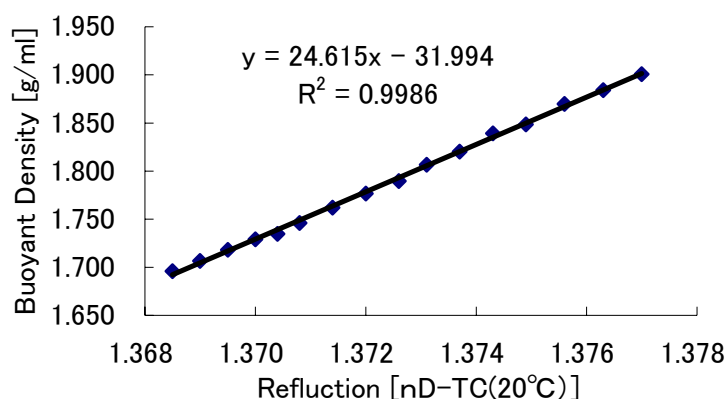


Fig.3-3 Buoyant Density standard curve

◆ density (g/ml)

超遠心分離

^{13}C - NaHCO_3 で標識した汚泥より RNeasy mini kit を用いて RNA を抽出した(3.2.2 b))。抽出した RNA は Turbo DNA freeTM (Ambion) を用いて DNA を除去した。得た RNA 溶液中の RNA 濃度を Quant-iTTM RiboGreen[®] RNA Assay Kit from Molecular Probes (Invitrogen) を用いて測定した。RNA 溶液は密度勾配溶媒のバイアル充填時にチューブ 1 本あたり 500ng となるようにローディングした。

超遠心分離機は Hitachi Koki の CP80WX を、ローターは SRP83VT を用いた。44500rpm, 20°C, 66 時間の超遠心分離を行なった (Lueders *et al.*, 2004)。超遠心分離終了後、チューブの底より 400 μl ずつ計 12 フラクションを回収した。その際、形成された密度勾配を崩さずに一定流量でフラクションを回収する必要があったため、ペリスタポンプ (PERISTA PUMP SJ-1211, ATTO) を用いてチューブの上部より 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ で RNase free water を置換した。回収したそれぞれのフラクションから 60 μl をリフラクトメータによる密度測定に用いた。その後、回収したフラクションよりイソプロパノール沈殿によって RNA を回収した。

イソプロパノール沈殿

各フラクションに 0.1volume の 3 M acetate を添加後、1.0volume のイソプロパノールを添加した。よく混合した後、 -80°C で 10 分間インキュベート(凍結しないように)、その後、 -20°C で一晩以上インキュベートした。

15000rpm, 4°C, 90 分間遠心分離し、ピペットで注意深く上澄みを捨てた。1ml 70% エタノールを加え、15000rpm, 4°C, 20 分間遠心分離し、上澄みをピペットで注意深く捨てた。その後、遠心乾燥機でドライアップした。25 μl の TE Buffer に RNA を溶かし、RNA サンプルとした。浮遊密度の高いフラクションに含まれる微量の RNA は、一度でも凍結融解を行なうと失われてしまうため、サンプルは凍結はせずに直ちに RT-PCR 反応に供した。

RT-PCR

回収フラクションからの RT-PCR には Access Quick (Promga) を用いた。RT-PCR 条件は Table.3-14. に示した。

Table 3-16 AccessQuickTM を用いた RT-PCR 条件

16S rRNA-RT-PCR

Primer

27f: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'
 1492r: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'

PCR mixture	volume(μ l)	Final Conc.
AccessQuick™ Master Mix, 2X	25	1X
10 μ M forward primer	5	1.0 μ M
10 μ M reverse primer	5	1.0 μ M
Nuclease-Free Water	10	
RNA template	5	
AMV Reverse Transcriptase (5U/ μ l)	1	0.1U
total	51	

Thermalcycler program

step	temperature(°C)	incubation(sec)
Reverse Transcription	48	2700
Hotstart	94	120
denature	94	45
anneal	50	45
extention	72	90
final extention	72	720

3.2.4 に示したアガロースゲルチェック法により、RT-PCR 産物の存在を確認した。¹³C で標識したサンプルから得られた RT-PCR 産物のうち、同浮遊密度で ¹³C で標識したサンプルのみにバンドが存在するフラクションと、¹³C、¹²C 双方にバンドが存在する中でもっとも浮遊密度の高いフラクションから得られた産物を Cloning-Sequence に用いた。

PCR-Cloning-Sequencing

27f-1492r primer set を用いた PCR-Cloning-Sequencing 法により亜硝酸型硝化時と完全硝化時の SIP サンプル由来 16S rDNA の塩基配列を求めた。以下に手順の詳細を記す。

(1) Cloning

Cloning には QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN) を用い、実験手順は QIAGEN が配布している「QIAGEN® PCR Cloning Handbook (April 2001)」に従った。RT-PCR により得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製、Ligation に供した (Table 3-10)。

Transformation が済んだ大腸菌株は LB 培地 (Table 3-11) にスプレッドし、37°C で 15-18 時間培養した。

(2) Sequencing

得られたクローンをコロニー PCR (Table 3-12) にかけたものを Sequencing に供した。

Sequencing はタカラバイオ (株) ドラゴンジェノミクスセンターの大規模塩基配列受託解析サービスを利用した。

Table 3-17 Ligation Reaction Mixture

Component	volume
pDrive Cloning Vector (50 ng μ L ⁻¹)	1 μ L
PCR product	1-2 μ L
Distilled water	3-2 μ L
2 × Ligation Master Mix	5 μ L
Total volume	10 μ L

Table 3-18 LB培地の組成

LB Broth (DIFCO)	Bact Agar(DIFCO)	X-gal	IPTG	アンピシリン
4 g	3 g	20 mg	15 mL	200 mg

Table 3-19 コロニーPCR条件

PCR mixture			PCR procedure (SP6-T7)		
	SP6-T7		step	temperature [°C]	incubation [sec]
	Final conc	volume [ul.]			
ddH ₂ O	-	34.55	hot start	95	600
10xAmpliTaq PCR buffer (with 1.5mM MgCl ₂)	1x	5.0	denature	94	30
2mM dNTP	0.2 mM	5.0	anneal	52	30
100 μ M forward primer	0.2 μ M	0.1			30 cycles
100 μ M reverse primer	0.2 μ M	0.1	extention	72	120
5U/ μ L AmpliTaq Gold	1.25 U	0.25	final extention	72	600
template (colony in 50mL ddH ₂ O)	-	5.0			
total	-	50			

得られたforward, reverse の塩基配列の波形データをassemble し, それをもって各Clone の塩基配列情報とした。Assemble には, ソフトウェアAutoAssembler™ (Applied Biosystems) を用いた。

第4章 亜硝酸型硝化に影響する因子の検討

第5章 硝化細菌群集解析

本研究で運転した実験室規模活性汚泥リアクターにおける硝化細菌群集の解析を行った。第4章ではリアクターの水質モニタリングによって、亜硝酸型硝化反応 ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$) を示していた活性汚泥が完全硝化反応 ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) を示し、再び亜硝酸型硝化反応を示すようになるまでの遷移過程を捉えることができた。本章では、この遷移過程における硝化細菌群集の挙動を解析することで、亜硝酸型硝化反応制御に向けた微生物学的な知見を得ることを目的とした。

硝化細菌群集解析は、リアクター活性汚泥内のアンモニア酸化細菌 (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) と亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) に対する存在量および存在属・存在種の評価を分子生物学的手法により行った。具体的には、PCR-TRFLPによるAOB種構成変化の追跡、FISHによる存在NOB属の推定、QPrimer-PCRによるNOB由来DNAコピー数の定量、RNA-SIPによる存在NOB種の同定を行った。

5.1 *amoA* を標的としたアンモニア酸化細菌 (AOB) 群集解析結果

田中ら (2006) の運転時において、実験室規模活性汚泥リアクターで安定的な亜硝酸型硝化反応が観察される直前に、アンモニア酸化活性の失活・回復というダイナミックな変動が認められた。このアンモニア酸化活性の変動は、アンモニア酸化反応の主役である β -AOBの種構成が大きく変化したことと時期を同じくしていた (Fig. 2-11)。また、第4章に示したR3のc期における水質モニタリング結果 (Fig. 4-10) においてもそれに類似した現象が認められ、同様のAOB種構成の変化が起こった可能性を示唆している。

本研究におけるAOB解析は、田中ら (2006) の結果から類推される、完全硝化反応→亜硝酸型硝化反応遷移に伴う β -AOB種構成変化の把握のみに絞込み、*Betaproteobacteria* に属するAOB (betaproteobacterial AOB; β -AOB) が有するタンパク質ammonia monooxygenase subunit A (AmoA) をコードする機能遺伝子 *amoA* を標的として設計された *amoA*-1F, *amoA*-2R primer set (Rotthauwe et al., 1997) を用いて行ったT-RFLP解析 (第3章) を行った。T-RFLPピークプロファイルと β -AOB種構成を結びつけるのに必要な塩基配列情報は、田中ら (2006) が作成したクローンライブラリの塩基配列情報を利用した。

5.1.1 PCR-TRFLP による β -AOB 種構成変化の追跡

制限酵素の選定は、PCR-Cloning-Sequencing (田中ら, 2006) で得られたクローンの塩基配列をもとに、Fig. 5-1におけるOUT 1 とOUT 2 であらわされるグループを異なる塩基長で切断できることを条件として *Mbo* I を用いた。詳細は第3章3.2.6を参照されたい。本実験では、OTU1は77bp, OTU2は192bpの塩基長として検出された。

T-RFLPの結果をFig. 5-2に示した。40bp以下に検出されたピークは、非結合プライマーやプライマーダイマーの残渣によるものと考えられる。運転を通して77bpに大きなピークが検出され、非常に微小なピークの消長はあるもののほぼ変化はないといえた。このことから、本研究での β -AOBの種構成は田中ら (2006) の研究における現象とは異なり、アンモ

から得られたクローン, ” TR257_amoA-#” は亜硝酸型硝化時の活性汚泥から得られたクローン。

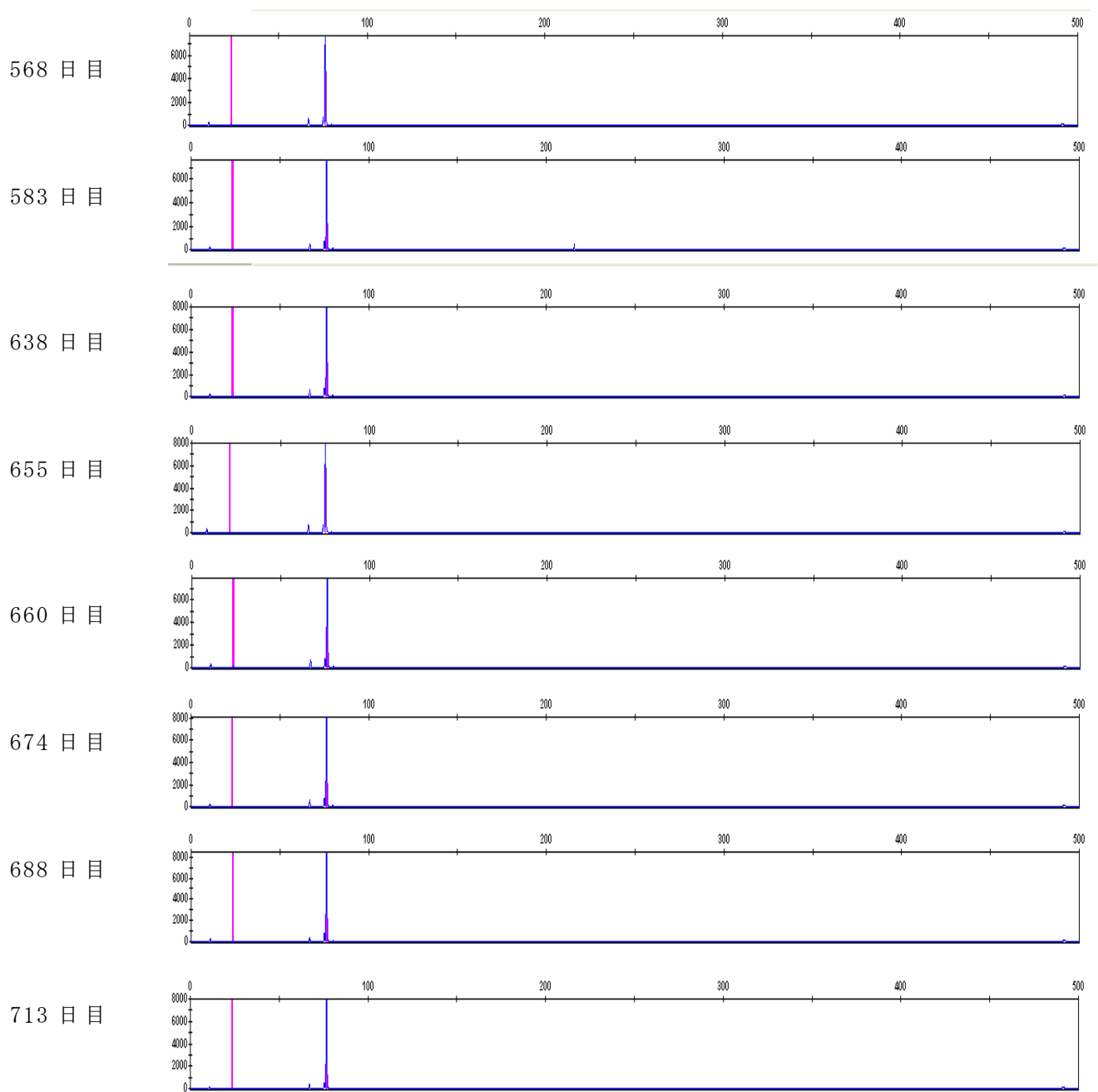


Fig. 5-2 R1 における *amoA* を標的とした PCR-TRFLP; Fig. 5-1 における OTU1 は 77bp, OTU2 は 192bp にピークが現れる。40bp 以下のピークは Primer dimer による。

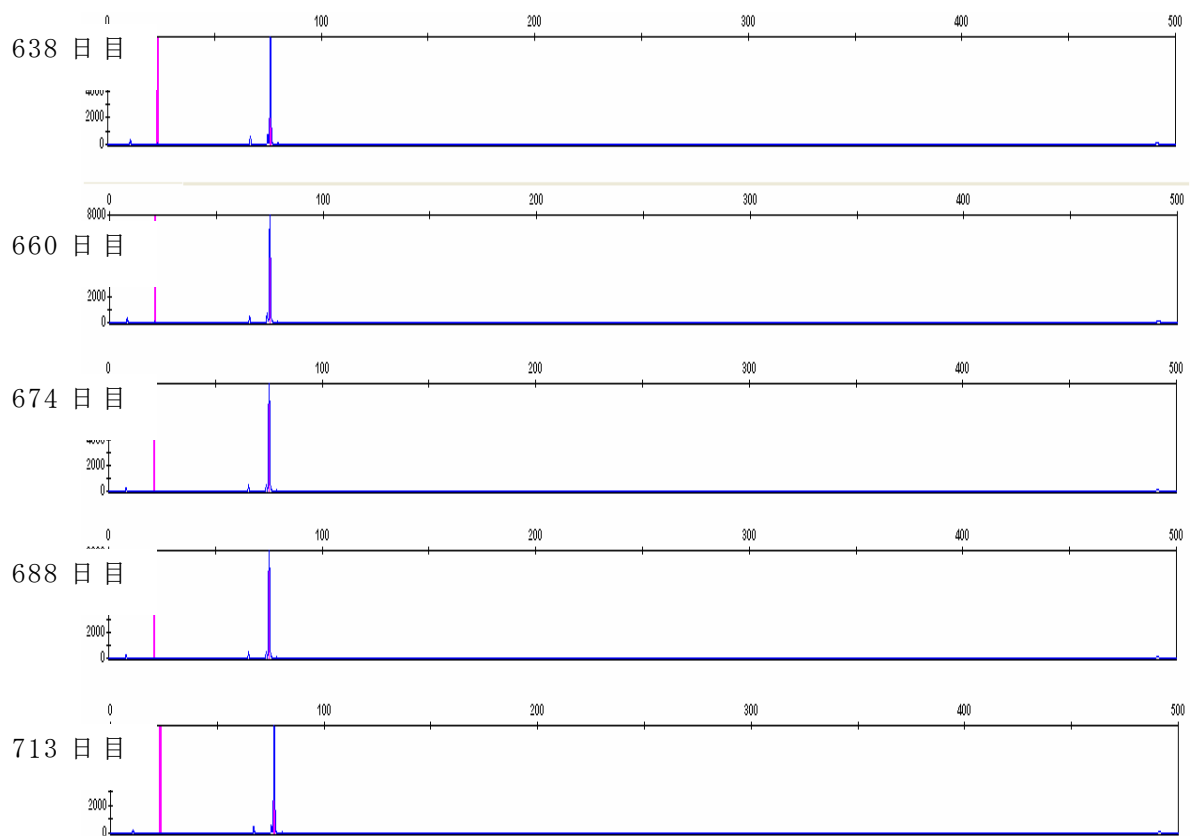


Fig. 5-2 R2 における *amoA* を標的とした PCR-TRFLP; Fig. 5-1 における OTU1 は 77bp, OTU2 は 192bp にピークが現れる。40bp 以下のピークは Primer dimmer による。

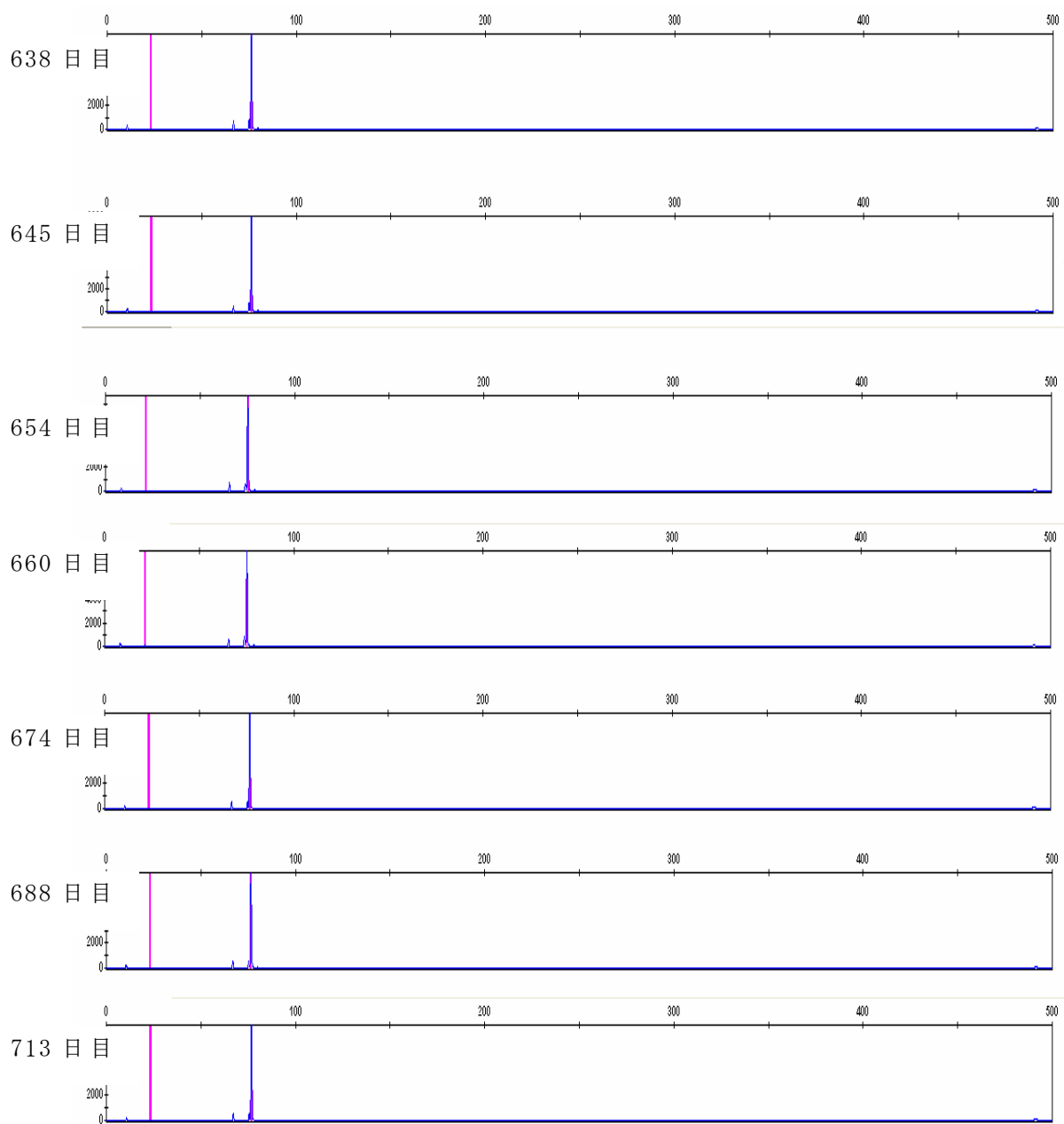


Fig. 5-3 R3における *amoA* を標的とした PCR-TRFLP; Fig. 5-1 における OTU1 は 77bp, OTU2 は 192bp にピークが現れる。40bp 以下のピークは Primer dimer による。

5.2 亜硝酸酸化細菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) 群集解析結果

亜硝酸型硝化反応は、アンモニア酸化細菌 (AOB) の活性が維持された状態で亜硝酸酸化細菌 (NOB) の活性が抑制されたときに起こると考えられる。実験室規模活性汚泥リアクターにおいて観察された、完全硝化反応を行っていた活性汚泥が亜硝酸型硝化反応を行うまでの遷移過程 (第4章) におけるNOBの挙動解析は、すなわち、本リアクターで観察された亜硝酸型硝化反応が亜硝酸型硝化反応の鍵と考えられているNOBの存在量変化や構造変化によって説明されうるものであるかどうかを検証することを意味する。

現在までに知られているNOBは系統発生的に多様であり、Proteobacteriaの複数のsubdivisionに現れる。既知のNOB4属のうち*Nitrobacter*属は α -proteobacteriaに、*Nitrococcus*は γ -proteobacteriaに、*Nitrospina*属は δ -proteobacteriaにそれぞれ分類される。*Nitrospira*属は、系統発生的にNOBでない*Leptospirillum ferrooxidans*のような細菌と関係があり、Proteobacteriaとは異なるグループを形成する。このようにNOBは系統学的に散在しているために、NOBを広く一度に捉えられるような分子生物学的解析ツールの発展はAOBを標的としたそれに比べて遅れをとっている。

第4章で観察したリアクターにおける完全硝化反応⇄亜硝酸型硝化反応遷移過程でのNOBの挙動を追跡するためには、まずリアクター内に優占するNOBを属レベル以下で把握する必要がある。優占NOBを決定した上で、その属に特異的なoligonucleotide primerあるいはprobeを用いた解析を行うことが求められる。

田中らは、NOB各属に特異的なprobeを用いたFISHを行い、本実験に用いたリアクター内に優占するNOB属を*Nitrobacter*属と決定した。また、種特異的なPrimerが確立されている*Nitrospira*

属に関してはPCR法によっても存在しないことが確認された。そこで、*Nitrobacter*属を対象に定量解析を行った (Fig. 5-3)。

5.2.1 FISH, PCRによる優占NOB属の同定

田中らは亜硝酸酸化活性が活発であった8日目の活性汚泥に対して、*Nitrobacter*, *Nitrospira*の2属それぞれに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたFISH

(Florescence *in situ* Hybridization) を行い、リアクター内に優占するNOBを同定したところ*Nitrobacter*属に特異的なNIT3のみにおいて蛍光が検出された (Table 5-1, Fig. 5-5)。また、Table 3-7に示したNSR primer setによるPCRでもPCR産物は全く検出されなかったため、*Nitrospira*属はいないことが確認された。よって、本リアクターでは*Nitrobacter*属が優占NOBであることが示唆された。

Table 5-1 NOB を標的とした既存のprobe によるFISH ; 亜硝酸型硝化反応が活発であった8日目の活性汚泥に対して行った.

Probe	Specificity	Signal
NIT3	<i>Nitrobacter</i> spp.	+
Ntspa662	genus <i>Nitrospira</i>	-
Ntspn693	<i>Nitrospina gracilis</i>	-
Ntcoc84	<i>Nitrococcus mobilis</i>	-

(+: 蛍光検出, -: 蛍光検出できず)

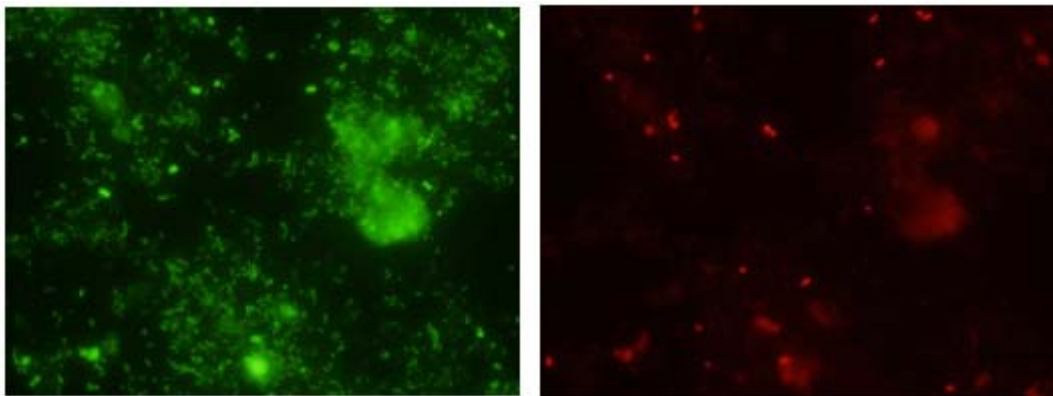


Fig. 5-5 FISH による*Nitrobacter* の検出 ; EUB-mix (FITC) による真正細菌の検出 (左) と, 同視野におけるNIT3 (Cy3) による*Nitrobacter* の検出 (右) .

5.2.2 QPrimer-PCR による *Nitrobacter* 由来16S rDNA コピー数の定量

5.2.1で本リアクター内の優占NOBであると決定された*Nitrobacter* 属に由来する16S rDNAコピー数の変動を求めた。DNAコピー数の定量には、定量的PCR法の一手法であるQPrimer-PCR により行った。各サンプルにつき3反復の測定を行い、その平均値 (mean) と標準偏差 (standard deviation; SD) を求めた (Fig. 5-6) 。Navarro et al. (1992) によると、*Nitrobacter* は1細胞あたり1つの16S rRNA オペロンを持つ。よって、QPrimer-PCR で求められた16S rDNAコピー数がすなわち*Nitrobacter* の細胞数であると考えられる。

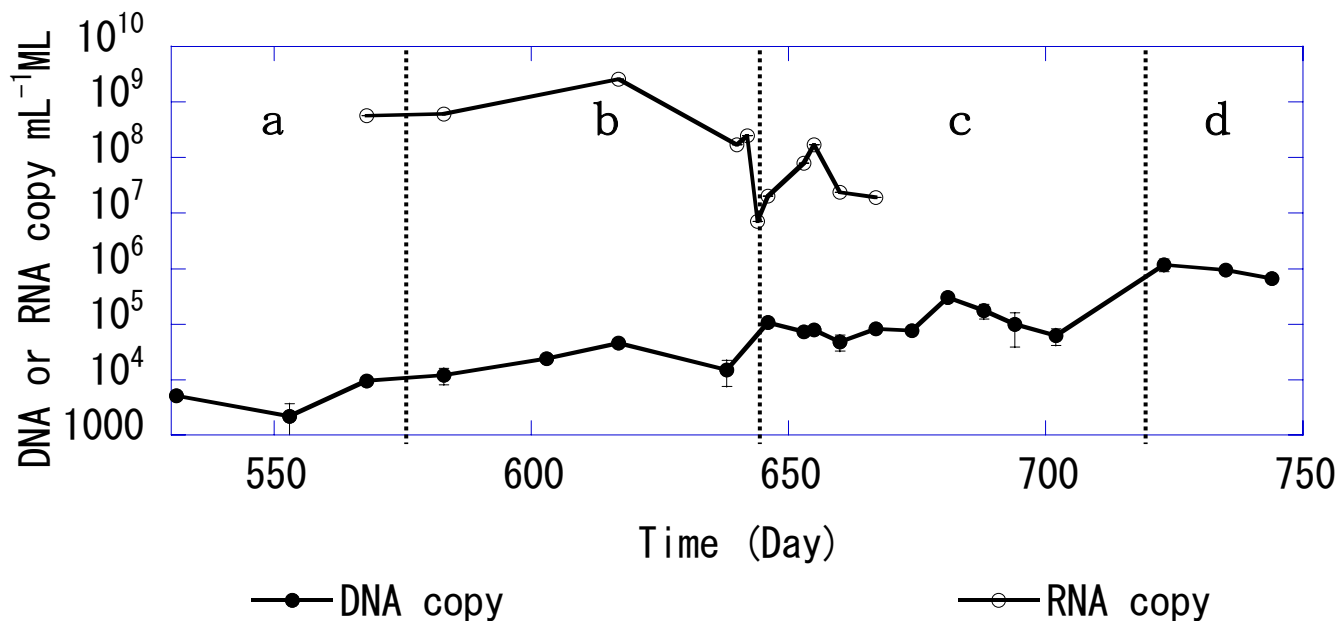


Fig. 5-6 R1における活性汚泥中の*Nitrobacter*由来16S rDNAと16S rRNAのモニタリング結果 (mean±SD, n=3)

R1における*Nitrobacter*属に由来する16S rDNAコピー数は、a期の 5.1×10^3 より漸増し、c期に減りかけるがd期に最高 4.0×10^5 まで増え続けた。一方、16S rRNAコピー数は16S rDNAコピー数の 10^2 から 10^5 と大量であったが、DNAコピー数の増減とは特に相関は認められなかった。

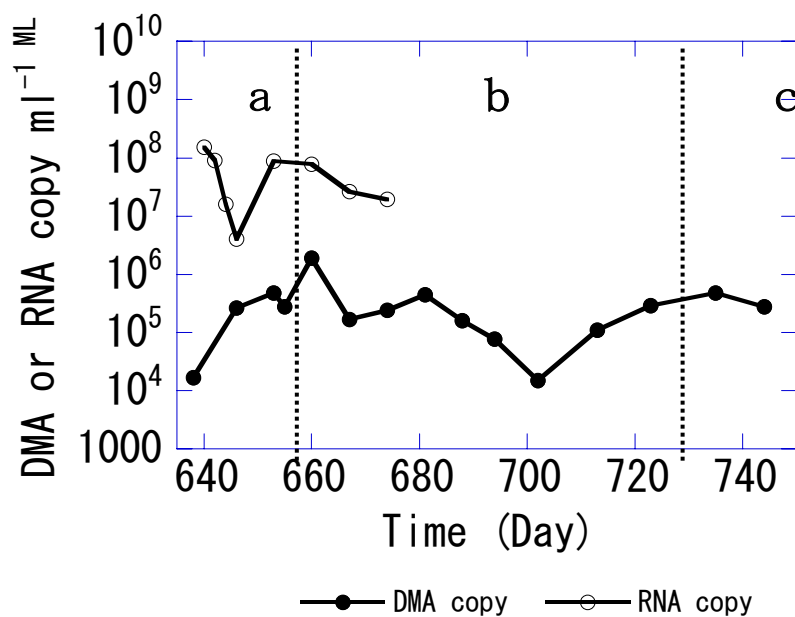


Fig. 5-7 R2における活性汚泥中の*Nitrobacter*由来16S rDNAと16S rRNAのモニタリング結果 (mean±SD, n=3)

R2における*Nitrobacter*属に由来する16S rDNAコピー数は、a期の 1.7×10^4 よりb期の初期に 2.6×10^5 まで急増し、その後、 1.5×10^4 から 1.9×10^6 の間を増減した。一方、16S rRNAコピー数は 4.0×10^6 から 1.5×10^8 であった。16S rDNAコピー数との差は 10^1 から 10^4 であり、その増減幅は大きかったが、DNAコピー数の増減とは特に相関は認められなかった。

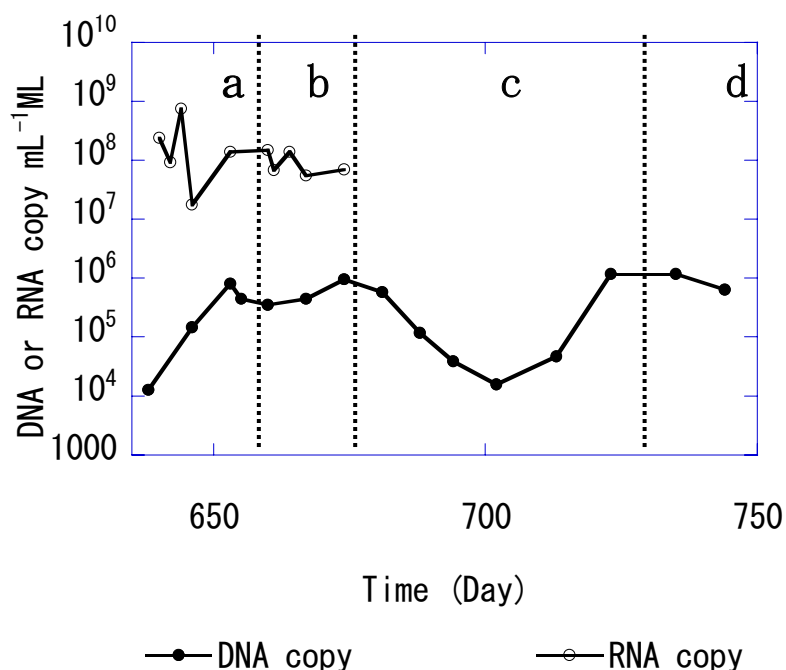


Fig. 5-8 R3における活性汚泥中の*Nitrobacter*由来16S rDNAと16S rRNAのモニタリング結果 (mean±SD, n=3)

R3における*Nitrobacter*属に由来する16S rDNAコピー数は、a期の 1.3×10^4 よりb期の初期に 1.5×10^5 まで急増し、その後、b期はほぼ一定であったがc期に 9.7×10^5 から 1.6×10^4 まで増減した。d期には再び増殖してb期と同等の 1.2×10^6 まで回復した。一方、16S rRNAコピー数は 6.9×10^7 から 7.6×10^8 であった。16S rDNAコピー数との差は 10^1 から 10^4 であり、DNAコピー数の増減に比べると増減は小さく、特に相関は認められなかった。

5.2.3 RNA-SIPによる*Nitrobacter*存在種の同定

田中ら(2006)のFISHによる優先NOB同定結果や5.2.1におけるPCRによる優先NOB同定結果から、本研究ではここまで*Nitrobacter*. spを本研究で用いたリアクターにおける活性汚泥中NOBの代表としてその挙動を追ってきた。しかしながら、NOBに含まれる4属の内、*Nitrobacter*, *Nitrospira*を除く*Nitrococcus*, *Nitrospina*には特異的なPCR primer, FISH probeは確立されていない。その為、これら2属のNOBが汚泥内に存在していた可能性は否定できない。そこで、遺伝子配列による系統学的なアプローチからではなく、NOBの機能を対象とした生理学的なアプローチから汚泥内のNOBの同定を試みた。これに用いたのがRNA-SIP法である。

RNA-SIPによって、 ^{13}C でプロービングされた重いRNAを通常のRNAから分離成功した例を Fig. 5-9に示す

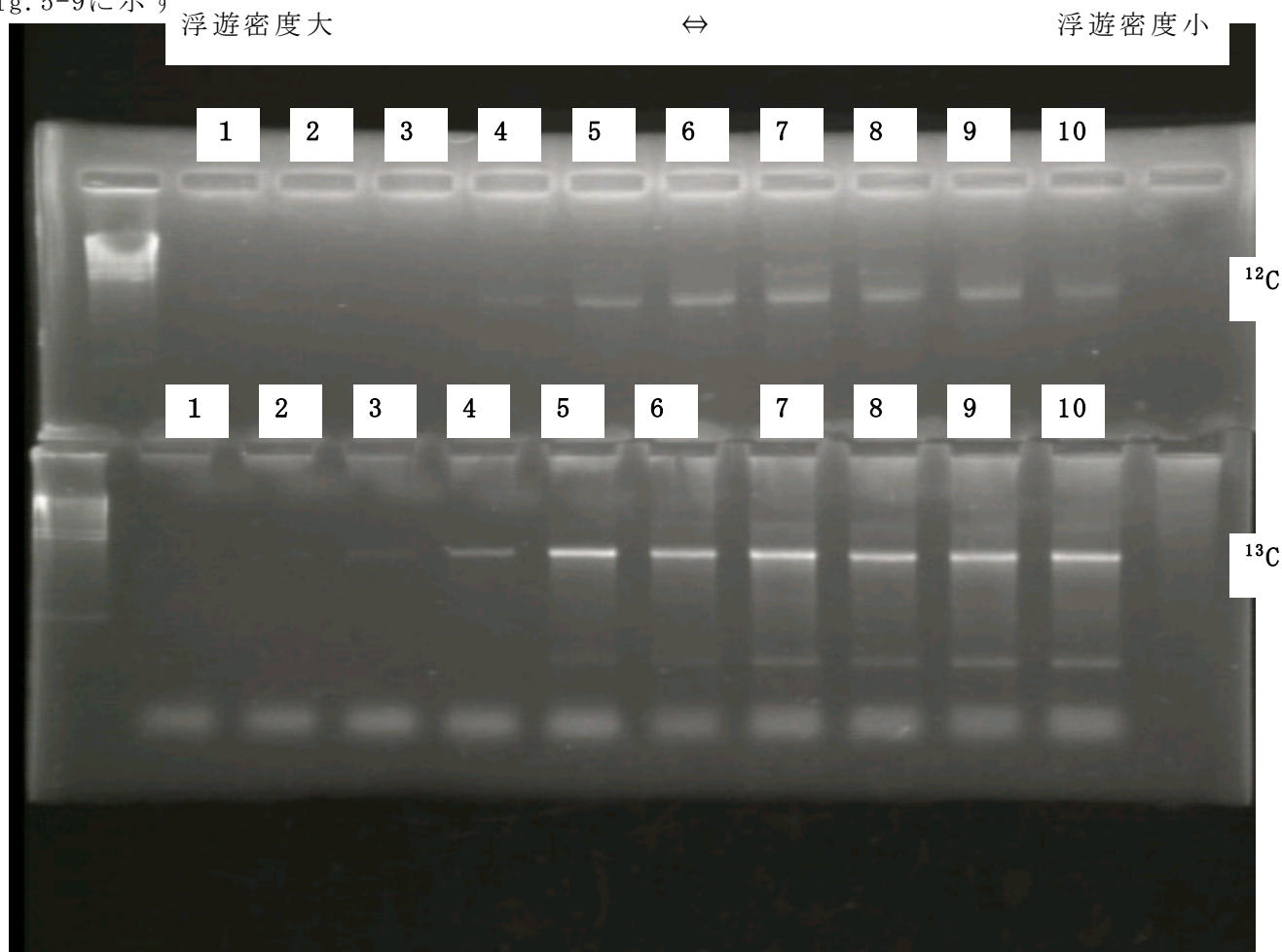


Fig. 5-9 483日目の汚泥をRNA-SIPに供し、構築した密度勾配フラクションから回収したRNAにRT-PCRを行った結果、得られたcDNAのアガロース電気泳動画像。上段は ^{13}C を与えていない対照サンプルから得られたcDNA。下段は ^{13}C を与えて重く標識したサンプルから得られたcDNA。

Fig. 5-9に示した1から10までのフラクションの浮遊密度は1.81789g/mLから1.7834 g/mLで直線的に減少し、良好な浮遊密度勾配が作られていた。 ^{12}C のサンプルでは4番目のフラクションから、 ^{13}C のサンプルでは2番目のフラクションからcDNAが確認され始めた。これはつまり、その浮遊密度にRNAが存在していたことを示す。 ^{12}C の4番目、 ^{13}C の2番目のフラクションの浮遊密度はそれぞれ1.8080 g/mL, 1.81542 g/mLであった。Cloningするのに過度に薄いPCR産物は避け、 ^{13}C の3番目、5番目のフラクションから得たcDNAをCloning-Sequenceに用いた。インサートチェックの結果、目的配列がCloneに挿入されたのは、亜硝酸型硝化反応時（483日目）のサンプルの重いフラクションは2Clone、軽いフラクションは7Cloneであった。完全硝化時（660日目）のサンプルは重いフラクションが5Clone、軽いフラクションは13Cloneであった。計22Cloneの挿入塩基配列情報を読んだ。

得られたClone塩基配列情報からblast検索で得られた近縁種を含めた系統樹を作成した。

ただし、得られたClone塩基配列情報の多様性が高すぎたために一つの系統樹にまとめることは不可能であった。*Nitrosomonas*近縁種の系統樹をFig.5-10に、その他をFig.5-11に示した。系統樹作成にはMolecular Evolutionary Genetics Analysis, ver. 3.1 (MEGA 3.1)を用いた。系統樹はNeighbor-Joining法で作成し、Bootstrapは1000回行った。

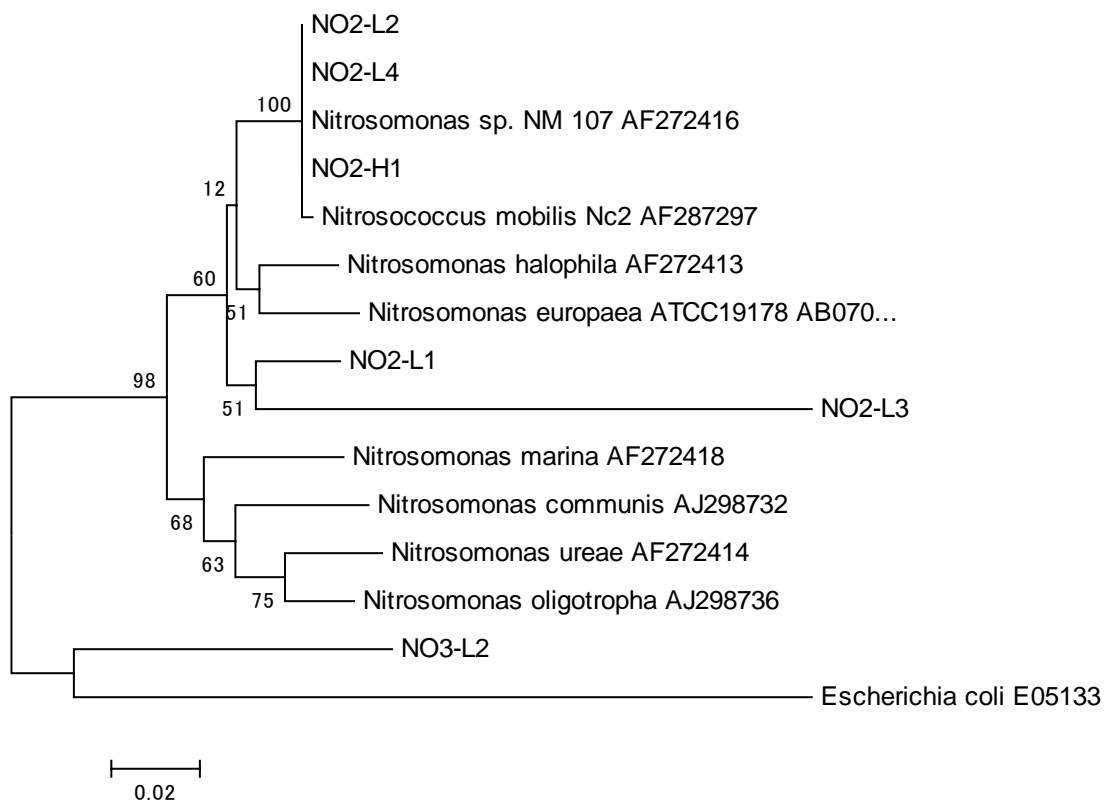


Fig.5-10 RNA-SIPで得られたCloneのうち、*Nitrosomonas*属に近縁な種の系統樹

Clone名のNO2は亜硝酸型硝化反応を行っていた汚泥から得られたCloneであること、NO3は完全硝化反応汚泥から得られたことを示している。-HはSIPによる重い(Heavy)フラクションから回収されたRNA由来であること、Lは軽い(Light)フラクション由来であることを意味している。つまりNO2-H1とは、亜硝酸型硝化反応を行っていた汚泥のSIPにより、重いフラクションから回収したRNA由来のCloneの1つ目ということである。

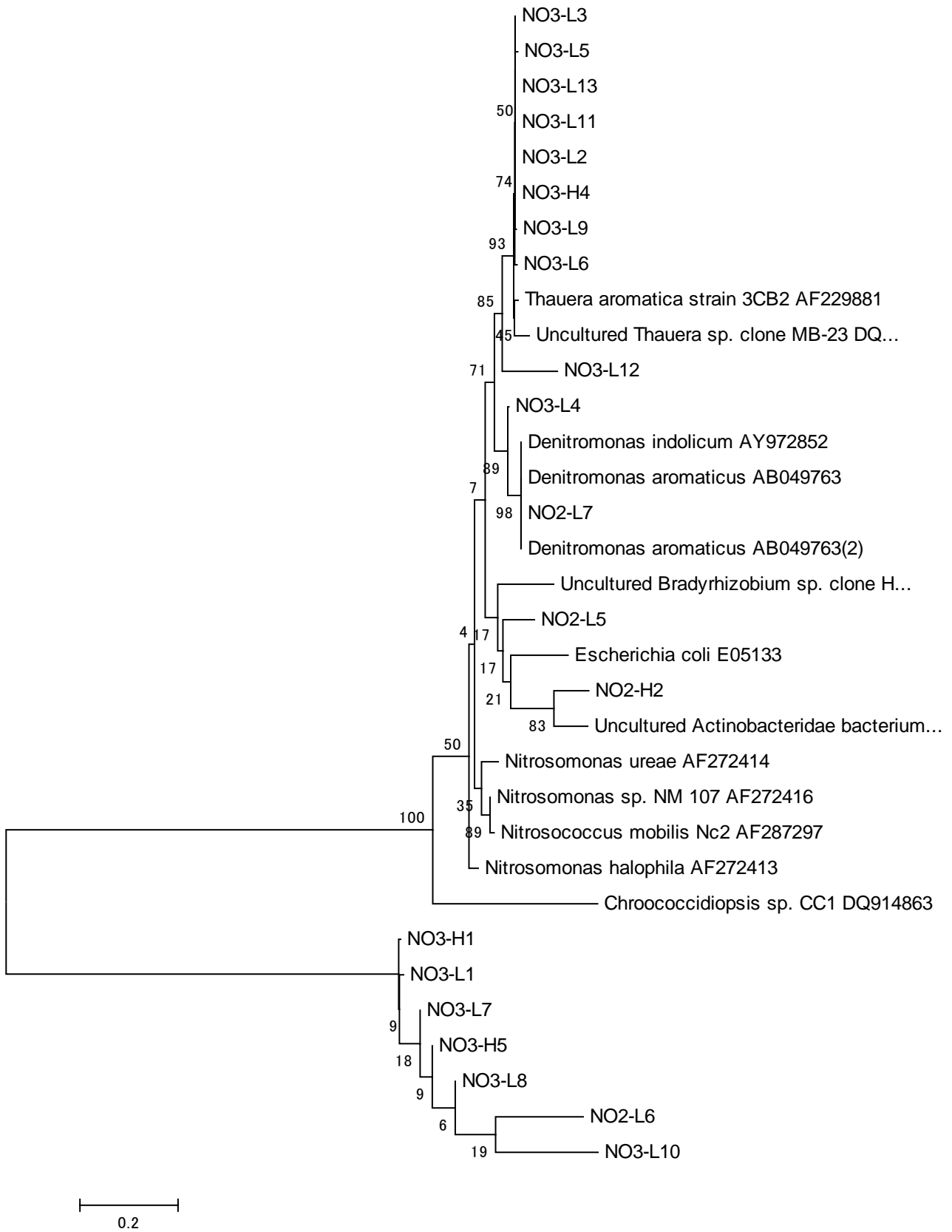


Fig.5-11 RNA-SIPで得られたCloneのうち、*Nitrosomonas*属に近縁Cloneを除いた系統樹

5.3. 考察

5.3.1 リアクター処理水質の変動とAOB種構成の変化

田中らは2005年度のリアクターの運転において、完全硝化型反応から亜硝酸型硝化反応への遷移過程で一時的なアンモニア酸化活性の停止とその後に亜硝酸型硝化反応に変化したことを確認した。その前後で完全硝化反応時は*Nitrosococcus mobilis*近縁種が優先しており、亜硝酸型硝化反応時は*Nitrosomonas eutropha*近縁種が出現したことを確認し、このAOB種構成変化が亜硝酸型硝化反応実現のきっかけになった可能性を示唆した。本研究においてもR3において完全硝化型反応から亜硝酸型硝化反応に遷移する過程で同様のアンモニア酸化反応の停止が観察されたが、リアクター内のAOB種構成は運転期間中ほぼ一定であり、77bpのみに大きなピークが常に検出されていた。これはOTU1、すなわち*N. mobilis*近縁種が優先した汚泥であったことを示唆していた。よって、今回の処理水質変化にAOBが寄与した可能性は低いと考えた。

5.3.2 リアクター処理水質の変動と*Nitrobacter*由来DNA，RNAコピー数の変動

5.2.1に示したように、本リアクターにおける優先NOBは*Nitrobacter*属であった。本リアクターのように亜硝酸濃度が高い水中にはよりも*Nitrobacter*が優先することが知られている(Kim et al. 2006)。*Nitrobacter*由来RNAのモニタリングを行ったのは、遺伝子発現機能としてDNAよりも上流のRNAの方がコピー数が多く、DNA、すなわち細胞数の変化よりも敏感に細胞活性を反映するであろうと考えたためである。しかし、実際にはDNAコピー数よりも大量ではあるものの、リアクター処理水質やDNAコピー数の変動との関係がほとんど読み取れないところで大きな増減を示しており、RNAコピー数のモニタリングとそこから得られると期待される結果のコストパフォーマンスの悪さから674日目までモニタリングを打ち切った。

このようにRNAのモニタリングから得られた結果が予想を大きく裏切るようなことになった原因は、手法の不確実さにあると考えた。RT-Qprimer PCRに用いたRNAサンプルには、RNA抽出、DNase処理後のサンプル中の核酸濃度をNanoDrop ND-1000 (NanoDrop) を用いて吸光度260 nm の波長を測定することにより求め、必要な濃度に希釈して用いた。しかし、NanoDrop ND-1000 (NanoDrop) ではDNase処理後のサンプル中の核酸はRNAだけでなく、DNAの分解産物も核酸として一緒に定量してしまう。そのため、テンプレートのRNA濃度を正確に調整することは難しい。また、RNAからDNAへの逆転写反応効率というバイアスもかかっているため、DNAの定量に比して信頼性は大きく落ちると言わざるを得ないであろう。今後の改善点としては、テンプレートRNA濃度をQuant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit from Molecular Probes (Invitrogen)を用いて正確に測定すること、できる限り逆転写反応効率の高い逆転写反応キットを用いることなどがあげられる。しかし、両キットともに高価であり、かつ、作業の煩雑さが格段に上がってしまう。確実に有益な結果が得られると言う知見が待たれるところである。

Fig. 5-11にリアクター処理水質の変動と*Nitrobacter*由来DNAコピー数の変動を示した。R1においてはa期からd期にかけて漸増するDNAコピー数が処理水中の硝酸態窒素濃度の

増加と一致するように見受けられる。同様にR3のb期のDNAコピー数の急増と処理水中硝酸態窒素濃度の急増も一致しているが見えるが、同様にDNAコピー数の観察されたR2のb期、R3のd期には処理水中硝酸態窒素濃度は増加していなかった。また、細かく見るとR1のc期では処理水中硝酸態窒素濃度が増加している最中に一時、DNAコピー数が減少していた。

田中ら（2006）はリアクター処理水中の亜硝酸態窒素の蓄積に少し遅れるようにして*Nitrobacter*由来DNAコピー数が漸減したことで亜硝酸型硝化反応との関連性を示した。一方、高崎ら（2005）も亜硝酸型硝化反応から完全硝化型反応に遷移する過程で処理水中の硝酸態窒素が増加するのに少し遅れてDNAコピー数が増加したことを示したが、再び亜硝酸型硝化反応に戻ってもDNAコピー数は減少しなかった。また、同程度の亜硝酸酸化活性を持っている2つの時点の*Nitrobacter*由来DNAコピー数に100倍の差があり、その時点の亜硝酸酸化を*Nitrobacter*属細菌によるものとするには無理があると述べた。既往の知見と比べても*Nitrobacter*由来DNAコピー数と亜硝酸酸化活性の関連ははっきりしなかった。

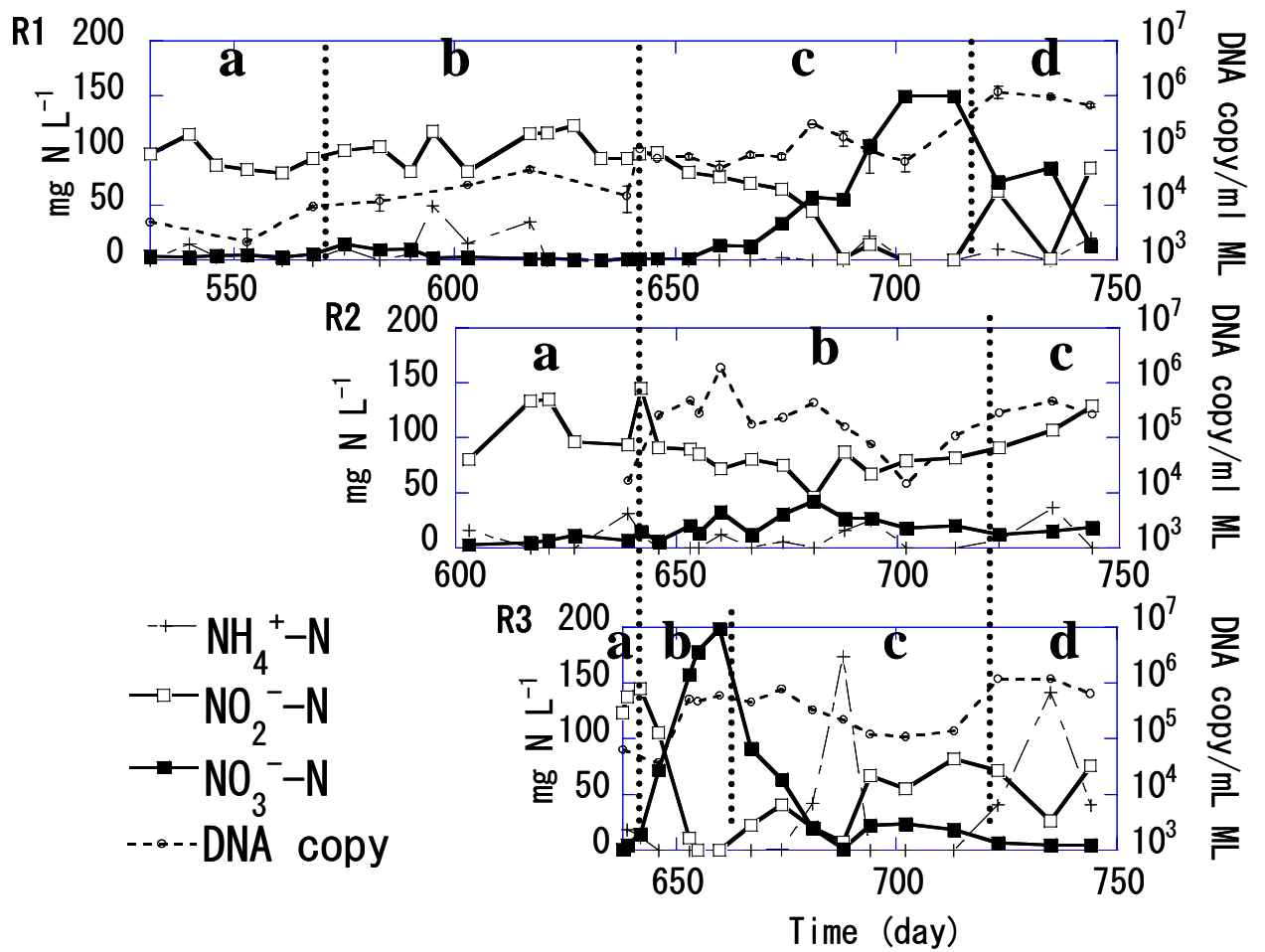


Fig. 5-11 リアクター処理水質の変動と硝化細菌由来 DNA コピー数の変動

5.3.3 亜硝酸酸化速度と *Nitrobacter* 数の変動

リアクターの水質モニタリングから得られた硝化速度から求められる亜硝酸酸化速度 (第4章) と QPrimer-PCR によって得られた *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数 (本章5.3.2) から, 本活性汚泥リアクターで観察された亜硝酸型硝化反応が *Nitrobacter* 由来の DNA コピー数で説明することができるか検証した。

Nitrobacter 16S rDNA コピー数の変動と処理水質変動に関連が見られない時期, および, コピー数が安定している時期 (完全硝化型の安定期, 亜硝酸型の安定期) における,

実験値から求められた*Nitrobacter* 単位量あたりの亜硝酸酸化活性（硝酸生成速度）を算出し、得られたそれぞれの値を比較することをもって、検証とした。

また、既往の研究から算出された*Nitrobacter* の亜硝酸酸化活性と、本研究が示した亜硝酸酸化活性の比較も行った。

(1) コピー数変動期およびコピー数安定期における*Nitrobacter* の亜硝酸酸化活性

リアクターにおける水質モニタリング結果（第4章）とQPrimer-PCR結果（Fig. 5-11）を用い、Fig. 5-11に示した各時期における*Nitrobacter* 単位量あたりの亜硝酸酸化活性を求めた。

(i) 計算に用いた前提

a. 亜硝酸酸化活性

硝酸生成速度をもって亜硝酸酸化活性とした。硝酸生成速度は、リアクター水質モニタリングによる実験値（第4章および巻末付録）から求め、Fig. 5-8にまとめた。亜硝酸酸化活性の算出の一例としてR3の660日目（b期）の亜硝酸酸化活性の求め方をFig. 5-12に示した。

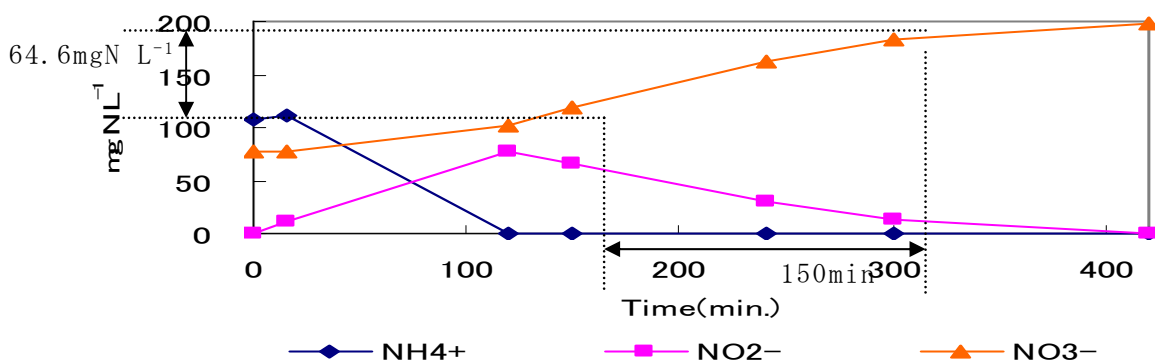


Fig. 5-12 亜硝酸酸化活性（硝酸生成速度）の算出例. R3の660日目（b期）の水質モニタリング結果（巻末付録参照）を示した. 硝酸態窒素濃度は一次直線で近似できるような増加を示した. この場合においては、亜硝酸酸化活性（硝酸態窒素生成速度）は、 $25.84 \text{ mg N L}^{-1}/\text{hr}$ とした.

b. *Nitrobacter* 1細胞が有する16S rDNA コピー数

1つの細胞が有する16S rRNAのオペロン数は種によって様々であるが（Klappenbach et al. 2001）、Navarro et al. (1992)は、*Nitrobacter* は1細胞あたり1つの16S rRNA オペロンを持つとした。よって、QPrimer-PCRで実験的に求められた16S rDNA コピー数がすなわち*Nitrobacter* の細胞数とした。

c. *Nitrobacter* の細胞の大きさと乾重

本章6.2.3において、本リアクターに存在する*Nitrobacter* 種は一様であり、塩基配列が決定された351 bpにおいて*Nitrobacter Alkalicus* AN1と100%相同であった（田中、2006）。Sorokin et al. (1998)は*Nitrobacter Alkalicus* AN1の細胞の大きさ

を $0.6-0.9 \times 1.2-1.8 \mu\text{m}$ としている。この数値から細胞の体積を概算すると、

$$N. \textit{alkalicus} \text{ の体積} = (0.75 \mu\text{m}/2)^2 \times \pi \cdot 1.5 \mu\text{m} = 6.62 \times 10^{-13} \text{ cm}^3 / \text{cell} \quad (\text{式 5.1})$$

となる。

また、細胞の湿重を体積 1cm^3 あたり 1000 mg とすると、*N. alkalicus*の湿重は

$$N. \textit{alkalicus} \text{ の湿重} = 6.62 \times 10^{-10} \text{ mg} / \text{cell} \quad (\text{式 5.2})$$

である。細胞の含水率を、典型的な細胞の含水率である70% (Neidhardt et al. 1990)と仮定すると、*N. alkalicus*の乾重は

$$N. \textit{alkalicus} \text{ の乾重} = 1.99 \times 10^{-10} \text{ mg} / \text{cell} \quad (\text{式 5.3})$$

となる。

以上を用いて、以降の計算を行った。

(ii) 本研究における*Nitrobacter* 単位量あたり亜硝酸酸化活性 (硝酸生成速度) の算出法

Fig. 5-12 に示した、R3の660日目 (b期) における単位量の*Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化 (硝酸生成) 速度の算出を例にして以下に示す。

R3の660日目のリアクターにおける硝酸生成速度は $73.7 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1} \text{hr}^{-1}$ であり、*Nitrobacter* 細胞数 (=16S rDNA コピー数) は、 $3.6 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$ であった (Fig. 5-11)。よって、単位細胞数あたりの硝酸生成速度は、

$$\begin{aligned} \textit{Nitrobacter}_{\text{R3-660日目}} \text{ 硝酸生成速度} &= (64.6/150 \times 60 \times 24) \div (3.6 \times 10^5 \times 10^3) \\ &= 1.73 \times 10^{-6} \text{ mg NO}_3^- \text{-N} / \text{cell} / \text{day} \end{aligned} \quad (\text{式 5.4})$$

となる。

また、式6.3 より単位細胞乾重あたりの硝酸生成速度は、

$$\begin{aligned} \textit{Nitrobacter}_{\text{R3-660日目}} \text{ 硝酸生成速度} &= (1.73 \times 10^{-6}) \div (1.99 \times 10^{-10}) \\ &= 8.68 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N} / \text{mg dry cell} / \text{day} \end{aligned} \quad (\text{式 5.5})$$

となる。

同様の計算により、他の時期における*Nitrobacter* 単位量あたりの亜硝酸酸化（硝酸生成）速度を算出した。

(iii) 処理水質変動・コピー数変動と単位量の*Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性
前述(ii)の方法により、各時期の単位量の*Nitrobacter* あたり亜硝酸酸化活性（硝酸生成速度）を算出した。結果を以下に示す。

R 1

a) 亜硝酸型硝化安定・コピー数安定期 (R1 b期-583日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R1-583\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 1.67 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.6})$$

b) 亜硝酸酸化活性増大・コピー数増大期 (R1 c期-667日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R1-667\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 3.36 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.7})$$

c) 完全硝化安定・コピー数減少期 (R1 c期-694日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R1-694\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 2.79 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.8})$$

d) 亜硝酸酸化活性減少・コピー数安定期 (R1 d期-745日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R1-745\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 1.21 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.9})$$

R 2

a) 亜硝酸型硝化安定・コピー数増大期 (R2 b期-660日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R2-660\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 5.44 \times 10^2 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.10})$$

b) 亜硝酸型硝化安定・コピー数減少期 (R2 b期-713日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R2-713\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 5.71 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.11})$$

R 3

a) 亜硝酸酸化活性減少・コピー数安定期 (R3 b期-674日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R3-674\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 1.99 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.12})$$

b) 亜硝酸型硝化安定・コピー数安定期 (R3 c期-713日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R3-713\text{日}} \text{ 硝酸生成速度} = 1.28 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.13})$$

c) 亜硝酸型硝化安定・コピー数増大期 (R3 d 期-723日目)

$$\text{Nitrobacter}_{R3-723\text{日目}} \text{硝酸生成速度} = 1.12 \times 10^3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \quad (\text{式 5.14})$$

R1, R2は*Nitrobacter* 単位量あたりの亜硝酸酸化 (硝酸生成) 速度に同様の傾向が見られた。処理水質が安定していて, *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数が安定, もしくは減少時は $1.5 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day}$ であった。その他の状況では*Nitrobacter* 単位量あたりの亜硝酸酸化 (硝酸生成) 速度はその10分の1程度と算出された。

一方, R2は運転を通じて他のリアクターよりも10倍近く*Nitrobacter*由来DNAコピー数が多かったために, *Nitrobacter* 単位量あたりの亜硝酸酸化 (硝酸生成) 速度は10倍小さく見積もられた。

(2) *Nitrobacter alkalicus* AN1 における亜硝酸酸化速度の文献値

Sorokin et al. (1998) は, *Nitrobacter alkalicus* AN1 の純粋培養系 (0.2M NaCl, pH 8) を用いた回分実験により, $500 \text{ nmol O}_2 \text{ / mg protein / min.}$ 程度の酸素が亜硝酸酸化により消費されるという結果を得た。1 mol の O_2 消費により亜硝酸から2 mol の硝酸が生成されることから,

$$\begin{aligned} \text{Nitrobacter}_{\text{Sorokin}} \text{の硝酸生成速度} &= 500 \times 2 \text{ nmol NO}_3^- \text{ / mg protein / min} \\ &= 2.02 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \end{aligned} \quad (\text{式 5.15})$$

であった。

タンパク質が細胞乾重に占める割合を52.4% (w/w)とすると (Stouthamer, 1973), 細胞乾重あたりの硝酸生成速度は,

$$\begin{aligned} \text{Nitrobacter}_{\text{Sorokin}} \text{の硝酸生成速度} &= (2.02 \times 10^4) \times (0.524) \\ &= 1.05 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day} \end{aligned} \quad (\text{式 5.16})$$

以上, 文献値から得られた単位*Nitrobacter alkalicus* あたりの亜硝酸酸化活性は, 本研究で構築したリアクターにおいて処理水質が安定していて, *Nitrobacter* 16S rDNA コピー数が安定, もしくは減少時の亜硝酸酸化活性とほぼ一致した。この推定が正しいとすれば, $1.05 \times 10^4 \text{ mg NO}_3^- \text{-N / mg dry cell / day}$ 程度の活性を持っていたときが最も安定した状態であり, 本研究で観察されたDNAコピー数の減少は一時的な環境の変化に反応して増えすぎたバイオマスの調整と言った現象にも解釈できる。

(3) まとめ

(1), (2) で得られた結果についてまとめる。

(1), (2) より, 本研究で観察された *Nitrobacter* 単体量あたり亜硝酸酸化活性 (硝酸生成速度) は文献値から算出された理論値と比べて逸脱したものではなかった。しかし, *Nitrobacter* が増殖して活性が高まっていると予測されるような状況でむしろ活性が低下していることから, *Nitrobacter* が細胞数を過大評価している可能性がある。

過大評価を生んでしまう原因として考えられる一つの原因としてPrimerの特異性がある。*Nitrobacter* 属の近縁種として次のものは1ないし2のミスマッチでFGPS primerで増幅される可能性がある。*Bradyrhizobium japonicum*, *Caulobacter crescentus*, *Afipia felis*, *Afipia clevelandensis* が挙げられるが, これらのうち水環境中に存在するのは *C. crescentus* のみである。高崎 (2005), 田中 (2006) はFGPS primer領域を対象に汚泥中の微生物を同定したが, 得られた全ての配列は *Nitrobacter* 属由来のものであったため, 本研究で用いたリアクター内にミスマッチで同定されるような細菌が存在している可能性はきわめて低いと言えるかもしれないが, 手法の正確さを証明するためには, 同様にPCRで増幅されたFGPS領域の遺伝子配列を解読して定量されていた細菌種を同定する必要があるだろう。

また, 式5.16 で示した, 本リアクターに存在する *Nitrobacter* と高い相同性 (決定された351 bp の塩基配列が100%相同) を示した *Nitrobacter alkalicus* AN1 の純菌株を用いた実験値 (Sorokin et al. 1998) から求められた活性は, 本リアクターにおける処理水質, *Nitrobacter* 由来DNAコピー数が一致していた状況における活性とほぼ一致したが, Sorokin et al. (1998) は, *N. alkalicus* は有機基質が存在する混合培養系でその活性を著しく減少させると述べた。よって, 純粋培養系で観察された式6.11 に対し, 本研究 (従属栄養微生物との混合系) から得られた値が一致したことは, 逆に活性を過大評価, すなわち *Nitrobacter* 由来DNAコピー数を過小評価していた可能性も捨てられないことを意味する。特にR1のc期後半のように, *Nitrobacter* 数が減っているにもかかわらず亜硝酸酸化活性が上昇するのは, 亜硝酸を酸化して得たエネルギーを利用して増殖するNOBの生理学からすれば不自然であり, *Nitrobacter* 数の過小評価, あるいは *Nitrobacter* 以外のNOBが亜硝酸酸化を行っていたことが疑われる。

5.3.4 リアクター処理水質の変動とNOB 種構成変化

NOBの検出には5.2で述べたように, 既存の分子生物学的手法では亜硝酸を酸化するというNOBの機能を持った細菌を網羅的に検出する方法はなく, 加えて主要NOB4属のうち種特異的なprimer, probeといった検出方法は *Nitrobacter* 属と *Nitrospira* 属をターゲットにしたものしか確立されていない。加えて5.3.3 でも述べたように, 種特異的なprimerでも完全な同定を保証するものではない。

以上のような問題点から, NOBを遺伝学的なアプローチではなく, 機能的なアプローチで同定しようと試みたのがRNA-SIPを適用した理由であった。

RNA-SIPを行うのにあたって, 最も困難であると目していたのが¹³Cで標識された重いRNAを通常の軽いRNAから確実に分離することであった。RNA-SIPは与えた標識化合物を対象生物が同化し, その基質を用いて核酸を合成することで可能となる技術であるため, 対象微

生物の基質摂取速度，増殖速度が重要となる。そのため，近年は汎用性が高く，遺伝子情報と機能を結びつける新技術として注目を集めてはいるが，生長が遅く¹³Cで標識しにくい独立栄養細菌に適用した例は少なく，NOBを標的とした知見は皆無であると言える（2006年1月現在）。

本研究ではFig. 5-9に示したように重い核酸と軽い核酸の分離に成功した。得られたRT-PCR産物をCloningに供したが，大腸菌Cloneへの標的配列の挿入効率が著しく悪く，Sequence解析に供することができたのはたったの26Cloneであった。この原因としては，回収した浮遊密度勾配フラクション中のRNAは非常に微量であったためにRT-PCRの際，プレートRNAと結合せずにprimer同士が結合してできてしまった大量のprimer dimerが挿入されてしまったためと考えた。塩基長100bp以内のPrimer dimerは標的領域である27f-1492r領域（約1500bp）よりもはるかに短いため，標的領域よりもvectorに挿入されやすい。

たった26 Cloneではあったが，Blast検索結果による相同性解析から系統樹を作成した。重いフラクションから回収されたRNAにNOBに近縁の遺伝子配列が存在することを期待していたが，軽いフラクションを含めた全体に近縁配列は1つもなかった。今回は得られたCloneが少なすぎるため，NOBが標識されなかった，あるいはNOBが存在しなかったという結論に至るには早計である。再度RT-PCR実験を行い，亜硝酸型硝化時と完全硝化時における微生物群集構造を明らかにする。次回はPrimer dimerを確実に除去するために，RT-PCR産物をアガロース電気泳動して目的塩基長を切り出して精製する。

5.4 まとめ

本章では，第4章で様々な条件下で運転したリアクターにおける硝化細菌群集の挙動解析を行った。

NOB に対して，その存在量の変動を追跡するために行ったQPrimer-PCRの結果は，亜硝酸型硝化反応から完全硝化反応への遷移，あるいはその逆の遷移を説明できるものではなかった。

AOB のPCR-TRFLPによる多様性解析によってAOB種構成の変化を確認した。完全硝化反応が観察された時期では*N. mobilis*に近縁な種の存在が示唆され，亜硝酸型硝化反応が観察され始めた運転181日目ごろから*N. mobilis*近縁種のほかに*N. eutropha*近縁種が出現した田中（2006）の結果とは異なり，運転期間を通じて*N. mobilis*に近縁な種が大きく優先していた。

本章および第4章で得られた実験結果を元に，QPrimer-PCRによって得られた*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*Nitrobacter*あたりの亜

硝酸酸化活性を算出した。その結果，本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応は算出された単位*Nitrobacter*あたりの亜硝酸酸化活性では説明できず，多くの疑問を投げかけるものであった。*Nitrobacter*の定量に用いた手法の妥当性の確認や，RNA-SIPによる機能面からのアプローチによるNOBの同定など，更なる努力が要される。

RNA-SIPにより得られた16S rDNAの塩基配列情報は今回はあまりに少なすぎ，議論できる

ものではない。今回は時間がないためにある限りのデータを載せたが、早急に再試験を行いたい。

以上、第4章で様々な条件下で運転したリアクターにおける硝化細菌群集の挙動解析により、AOB, NOB ともにその興味深い挙動が観察された。だが一方で、第4章におけるリアクター水質モニタリングでとらえた、亜硝酸型硝化反応と完全硝化反応との間の遷移を、特に脱窒工程の有無が与えた影響を明確に説明できるような実験データは得られなかった。

第6章 総括

本章をもって本論文のまとめとする。

6.1 研究成果と総合考察

第1章において本研究が掲げた目的を顧みたい。本研究では、以下の3点を目的として掲げた。

- 1) 実験室規模活性汚泥リアクターにおいて亜硝酸型硝化反応および完全硝化型反応を得る。
- 2) 1)のリアクターにおける硝化細菌群集の挙動を解析し、亜硝酸型硝化反応、完全硝化型反応と硝化細菌群集の関係性を見出す。
- 3) 1), 2)を踏まえ、亜硝酸型硝化反応と完全硝化型反応を制限する要素を記述する。

これらを踏まえ、以降、本研究の成果についてまとめる。

本研究では、ANAMMOX反応をはじめとする新規生物学的窒素除去法の確立への多大な貢献が期待される、亜硝酸型硝化反応 (Partial nitrification) と呼ばれる微生物反応を取り上げた。亜硝酸型硝化反応は、多くの研究者による取り組みにも関わらず、未だその安定的制御法が確立されていない。これは、亜硝酸型硝化反応がアンモニア酸化細菌 (AOB) と亜硝酸酸化細菌 (NOB) の間のわずかな生育速度の差、至的環境要因の差等、複合的なパラメータが絡み合うようにして起こる現象であるとともに、亜硝酸型硝化反応の鍵を握る亜硝酸酸化細菌の解析手法がアンモニア細菌に比べてはるかに発展途上であることにも一因があるだろう。

そのような状況の中、本研究では実験室規模活性汚泥リアクターにおいて自在に亜硝酸型硝化反応と完全硝化反応を制御することを目指し、様々な条件下でのリアクター運転と詳細な水質モニタリング、硝化細菌群集の挙動解析を行うことによって、亜硝酸型硝化反応の発現に必要な因子の探索、その因子がもたらす微生物生態学的な影響の解明を目標とした。

本研究における実験結果は論文中第4章と第5章にまとめた。第4章では、実験室規模リアクターにおいて亜硝酸型硝化反応から完全硝化反応に遷移させる因子の検討について記述した。リアクターにおける亜硝酸型硝化反応に影響を与える因子として流入水中のチオ硫酸の影響、pH制御値の影響、生物反応工程における脱窒工程削除の影響を検討し、生物反応工程における脱窒工程の導入が亜硝酸型硝化反応の維持に重要であることが判明した。その後は脱窒工程の導入という操作上の条件がどのような影響を作り出したのか、詳細な検討に乗り出し、亜硝酸添加によるNOBへの基質補強の影響、数学モデルと実際の送気量増加による酸素供給量の影響評価を行ったが、どれも脱窒工程の導入がもたらす現象を明らかにすることはできなかった。

しかしながら、脱窒工程とは廃水処理プラントにおける窒素除去には不可欠な工程であり、この工程が脱窒処理だけでなく亜硝酸酸化に与える影響が大きいとすれば、脱窒工程の適切な管理によって、より運転の効率化を特別な工事無しに省エネルギーで実現する可

能性を示唆するものである。近年増えてきている間欠ばっ気が亜硝酸型硝化反応を導くと言う知見 (Turk and Mavinic 1987, Baumann et al. 1997, Van Loosdrecht and Jetten 1998, Hidaka 2002, Mota et al. 2005) とともに注目していくべきであろう。

第5章では第4章において亜硝酸型硝化と完全硝化間の遷移を実現したリアクターにおける硝化細菌の挙動解析実験結果について述べた。硝化反応の主役であるAOB, NOBの定性的・定量的解析を行い、リアクターで観察された各硝化反応パターン(亜硝酸型硝化または完全硝化)に対する硝化細菌群の挙動を記述した。まず、同リアクターを用いた田中の知見では、AOBの種構成変化が引き金になって、NOBの存在量が完全硝化反応時と亜硝酸型硝化反応時の遷移過程において 10^2 程度減少したことを示唆した。しかし、本研究における運転中は同様の完全硝化反応から亜硝酸型硝化反応への遷移過程でアンモニア酸化活性の停止は認められたものの、優先AOBの多様性は変化しなかった。

また、*Nitrobacter*由来16S rDNAコピー数の変動は、処理水質の変動から予想されるものとは異なる部分が多く、この既存のPrimerを用いた遺伝子情報を標的とした定量方法の妥当性や、あるいは遺伝学的なアプローチからではなく生態機能的なアプローチからのNOBの同定の必要性を考えさせられるなど、多くの疑問を投げかけてくるものであった。とはいえ、本研究における成果の特徴である、様々な運転条件変更と詳細な水質モニタリングによる、リアクターのパフォーマンス(完全硝化反応と亜硝酸型硝化反応間の遷移)の制御要因の絞込みは、亜硝酸型硝化反応維持のために有益な知見となりえたと自負する。

6.2 課題と展望

6.1で述べたように、本研究では実験室規模で亜硝酸型硝化反応と完全硝化反応を隔てる影響を及ぼす運転条件を突き止め、亜硝酸型硝化反応と完全硝化反応を自在に制御できた。

しかし、キーとなった脱窒工程の導入は活性汚泥、特に硝化細菌群集に与える物理的、化学的影響が不明瞭であり、今後の更なる研究の必要性を説く結果となった。例えば、好気反応時間の増減の影響、あるいは酸素飢餓状態が亜硝酸酸化活性に与える影響の検討などから行い、さらに単離菌株などをモデルとして用いた、より微生物学的な実験によって得られたパラメータとの複合作用を考慮して明らかにしていくことになるのであろう。

また、一方で、第5章において記述したように、本リアクターにおける亜硝酸酸化活性と*Nitrobacter*との関連性を明確に説明するデータを得ることはできなかった。今後の課題としては6.1でも述べたように、定量PCRで増幅・定量されているPCR産物の塩基配列の確認やPCR条件の最適化など、*Nitrobacter*を遺伝学的なアプローチから評価する方法の妥当性の確認と嚇怒の向上である。くわえて、既存の遺伝学的アプローチではなく、機能的なアプローチからのNOBの同定など、NOBを網羅的に把握する手法の開発であろう。その意味で、今回の修士論文に十分量のデータを間に合わせるができなかったRT-PCRによるNOBの群集解析を、修了までの残されたわずかな時間で早急に行いたい。

本研究は注目されているにもかかわらず、未だによくわかっていない亜硝酸型硝化反応をテーマにしたことで、何度も壁にぶち当たり、その都度一つ一つ検討を行っていくと言

うような、行き当たりばったりの場面に遭遇することが多かった。秋入学から数えて2年半研究を行ってきて、わからなかったことが明らかになったことも多いが、それ以上にわからないことが新たに目の前にたくさん現れてきたと言う印象であった。しかし、だからこそおもしろい、やりがいがあると感じられた研究テーマでもあった。春から就職する私には、2年半かけてもまだ時間が足らなかったことが口惜しい。本研究で為しえなかった上記の課題が克服されることを願うとともに、亜硝酸型硝化反応の制御方法が確立し、実排水処理に広く普及する日が近い将来訪れることを期待する。願わくば私も是非ともまたこの研究テーマに取り組み、普及に貢献したい。

謝辞

修士課程における成果を本論文にまとめるにあたりお世話になった方々にお礼申し上げます。

指導教官として惜しみないご指導を賜りました，味埜俊 教授，佐藤弘泰 助教授，小貫元治特任講師（東京大学サステナビリティ連携研究機構）に心からの感謝の意を表します。味埜先生は研究に関することにとどまらず，卒業後の進路などについての相談にも親身に応じてくださいました。佐藤先生には，研究で壁にぶち当たるたびに有効なアイデア，アドバイスを提案していただき，一番近くで研究をサポートしていただきました。また，小貫先生は，御自身の異動，お子様の誕生など，激動のときを過ごしたにもかかわらず，グループミーティングに出席されたときには相変わらずの鋭い洞察でこちらの意を汲んで助けていただきました。

本研究の第一歩であったリアクターの立ち上げから，最後の実験を終えるまで，実験に関わる実際的な相談事に細やかに対応してくださいました。味埜・佐藤研究室の，学生の自主性を重んじる気風の中で，三先生の多大なるご支援に助けられ，のびのびと研究に励むことができました。

また，副指導教員を快く引き受けてくださった，東京大学先端科学技術研究センター 栗栖聖講師に深謝いたします。聖先生の的確なご指摘，ご助言は，社会文化環境専攻で基礎からわかりやすいプレゼンテーションを要する際に多くのヒントを与えてくださいました。

本研究で用いたリアクターは2006年卒の田中秀治氏より引き継ぎました。彼がリアクターの運転管理方法を確立してくれていたおかげで，非常にスムーズに実験を引き継ぐことができました。1年前にこのリアクターで完成度の高い論文を仕上げた彼に追いつき追い越せと目標にやってきたのも一つのモチベーションでした。

本リアクターの種汚泥は新日本製鐵株式会社先端技術研究所における安水処理試験プラントから分与いただき，運転管理条件，亜硝酸型硝化反応にチオ硫酸が影響を与えたという知見も，同研究所におけるそれを参考にさせていただきました。同研究所の三木理 博士，伊藤公夫 博士には，惜しみない情報の提供を賜りました。心からお礼申し上げます。

本研究における実験は，2004年10月より2006年6月まで工学系研究科都市工学専攻の実験室（工学部14号館）および工学系研究科附属水環境制御研究センターの実験室（工学部9号館）において行いました。14号館では，技官の唐沢祥嗣さん，中川博之さんに様々な面倒を見ていただきました。14号館の実験室では，流入水タンクから漏水を起こしてしまうなど多くの失敗をしてしまいましたが，お二人のサポートのおかげで柏キャンパスへの引越しまで不自由なく実験を続けることができました。ありがとうございました。9号館では，工学系研究科都市工学専攻博士2年 岩井祥子さん，技官の坂田佳子さん（現 産業技術総合研究所）をはじめ，多くの方にお世話になりました。分子生物学的手法を用いた実験の経験が全くなかった私が滞りなく実験を進めることができたのも，皆さんのおかげであったと思っています。

味埜・佐藤研究室のメンバーの方々には，研究の相談はもちろんのこと，修士課程における様々な局面で多くの助けを頂きました。当専攻博士課程3年の小田和賢一さん，末岡一男さん，福島寿和さんからは，皆さん忙しいにもかかわらず，御自身の時間を削って指

導していただき、ここには書ききれないほどの本当に多くのことをご教示いただきました。特に末岡さんとは研究室内でたった二人になってしまった窒素グループの、そしてSIPグループの仲間として苦楽をともにしました。SIPの条件検討においては末岡さんに頼った部分が多かったのですが、RNAの分離に成功したときの歓喜は忘れられそうにありません。半年先に修了した宇田直樹君、博士課程に進学して今も良くしてくれる押木守君は、やはり分子微生物学的な知識など皆無であった私を良く助けてくれました。

研究内容の隔たりが大きいためにその手の会話はほとんどなかった玉井暁大君、護山元気君とのかかわりは、また技術屋肌の人間とは全く違う雰囲気を持っており、研究室以外の世界から離れがちな私にとっていつも新鮮な風でした。私より半年あとに入学してきた新井俊介君、西条拓磨君、都筑敦君、中野拓磨君、藤原和也君、村上達也君は修了が一緒になり、実質的に同期生として、研究室内外でたくさんの楽しい時間をともにしてきました。終了後も関係が続いて行って欲しいと願っております。

最後になりましたが、一度は入学した東京農工大学大学院を半年で中退し、本学への進学に理解を示し、学生生活を全面的に支え続けてくれた両親、兄弟に感謝します。そして学生時代の一番つらい時期を癒してくれていたが、本学在学中の一昨秋に天寿を全うした愛犬 リリーの冥福を祈ります。

2007 年1 月29 日

金井 佑樹

参考文献

- Aakra, A., Utaaker, J. B. and Nes, I. F., 2001, Comparative phylogeny of the ammonia mono- oxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia -oxidizing bacteria FEMS Microbiology Letters, **205**:237-242.
- Amann, R.I., David, L.K., and Stahl, A., 1990, Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. Journal of Bacteriology, **171**:762-770.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., 1995, Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, Microbial Reviews. **59**:143-169.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., and Srinath, E., G., 1976, Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, Journal WPCF, **48**(5): 835-852.
- Bae, W., Baek, S., Chung, J., Lee, Y., 2002, Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors, Biodegradation, **12**: 359-366.
- Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R., Lema, J. M., 2002, Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit, Water Research, **36**: 2555-2560.
- Catalan-Sakairi, M. A. B, Wang, P. I. C., Matsumura, M., 1997, Journal of Fermentation and Bioengineering, **84**(6): 563-571.
- Cébron, A, Berthe, T, and Garnier, J, Nitrification and Nitrifying Bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France), Applied and environmental Microbiology, 2003, 7091-7100,
- Chen, G. H., Wong, M. T., Okabe, S. and Watanabe, Y., 2003, Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increase chloride concentration, Water Research, **37**: 3125-3135.
- Chen, G. H. and Wong, M. T., 2004, Impact of increased chloride concentration on nitrifying-activated sludge cultures, Journal of Environmental Engineering, **130**(2): 116-125.

Dahl, C., Sund, C., Kristensen, G. H., and Vredendregt, L., 1997, Combined biological nitrification and denitrification of high-salinity wastewater, *Water Science and Technology*, **36**(2-3): 345-352.

Daims, H., Nielsen, P. H., Juretschko, S. and Wargner, M, 2000, Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology, *Water Science and Technology*, **41**(4-5): 85-90.

Dangcong, P., Bernet, N., Delgenes, J. P., and Moletta, R., 2000, Effect of oxygen supply methods on the performance of a sequencing batch reactor for high ammonium nitrification, *Water Environment Research*, **72**(2): 195-200.

Degrange, V., and Bardin, R., 1995, Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 5273-5284.

Dinçer, A. R., and Kargi, F., 1999, Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater, *Environmental Technology*, **20**: 1147-11553.

Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G. , Gregory, I. R., Robinson, K. G., and Sayler, G. S., 2002, Quantification of *Nitrosomonas oligotropha* like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. From full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:245-253.

Glass, C., and Silverstein, J., 1998, Denitrification kinetics of high nitrite concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation, *Water Research*, **32**(3): 831-839.

Goos, R. J., 1985, Identification of ammonium thiosulfate as a nitrification and urease inhibitor, *Soil Science Society of America Journal*, **49**: 232-235.

Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., and Field, K. G., 1990, Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton, *Nature*, **345**: 60-63.

Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., and Saunders, J. R., 1993, The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences, *Journal of General Microbiology*, **139**: 1147-1153.

Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S., 1990a, Effect of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor, *Water Research*, **24**(3): 289-296.

Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S., 1990b, Nitrification at low DO levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor, *Water Research*, **24**(3):

Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loodsdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J., 1998, The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater, *Water Science and Technology*, **37**(9): 135-142.

Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J. and Saunders, J. R., 1993, The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences, *Journal of General Microbiology*, **139**: 1147-1153.

Henze, M., et al. *Waste Water Treatment; Biological and Chemical Process*, Environmental engineering, 1995.

Hidaka, T., Yamada, H., Kawamura, M. and Tsuno, H., Effect of dissolved oxygen conditions on nitrogen removal in continuously fed intermittent-aeration process with two tanks, *Water Science and Technology*, **45**(12): 181-188

Hortz, H. P., Rotthauwe, J. H., Lukow, T. and Liesack, W., 2000, Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products, *Journal of Microbiological Methods*, **39**: 197-204.

Hutton, W. C., and LaRocca, S. A., 1975, Biological treatment of concentrated high ammonia wastewaters, *Journal Water Pollution Control Federation*, **47**(5): 989-997.

Janzen, H. H., and Bettany, J. R., 1986, Influence of thiosulfate on nitrification of ammonium in soil, *Soil Science Society of America Journal*, **50**: 803-806.

Jayamohan, S., Ohgaki, S., Hanaki, K., 1988, Effect of DO on kinetics of nitrification, *Water Supply*, **6**(3): 141-150.

Jianlong, W., and Ning, Y., 2004, Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions, *Process Biochemistry*, **39**: 1223-1229.

Joo, So-Hyun, Kim, Dong-jin, Yoo, Ik-Keun, Park, Kyungmoon & Cha Gi-Cheol, Partial nitrification in an upflow biological aerated filter by O₂ limitation, *Biotechnology Letters*, 2000, **22**: 937-940

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Röser, A., Koops, H. P., and Wagner, M., 1998, Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations, *Applied Environmental Microbiology*, **64**: 3042-3051.

Juretschko, S., 2000, Mikrobielle Populationsstruktur und -dynamik in einer nitrifizierenden/ denitrifizierenden Belebtschlammanlage, Doctoral thesis (Technische Universität München).

Kim, D. J., Kim, S. H., Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics, *Water Research*, **40** (2006) 887-894.

Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R. and Schmidt, T. A., 2001, rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database, *Nucleic Acids Research*, **29**: 181-184.

Klotz, M. G., and Norton, J. M., 1995, Sequence of an ammonia monooxygenase subunit A-encoding gene from *Nitrosospira* sp. NpAV, *Gene*, **163**: 159-160.

Koops, H. P., Harms, H., and Wehrmann, H., 1976, Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp., *Archives of Microbiology*, **10**: 277-282.

Koops, H. P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommering-Röser, A., and Stehr, G., 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov., and *Nitrosomonas halophila* sp. nov., *Journal of General Microbiology*, **137**: 1689-1699.

Koops, H. P. and Pommerening-Röser, A., 2001, Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species, *FEMS Microbiology Ecology*, **37**: 1-9

Koops H. P., Purkhold U., Pommerening-Röser A., Timmermann G., and Wagner M., 2003, The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria, *In* M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* third edition, release 3.13, March.

Kuai, L., and Verstraete, W., 1998, Ammonium removal by the oxygen limited autotrophic nitrification and denitrification (OLAND) system, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(11): 4500-4506.

Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaru, T., Kamagata, Y., and Kurane, R., 2001, Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA BODIPY® FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Research*, **29**: e34.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J., 1997, Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4516-4522.

Lueders, T., Manfield, M., Friedrich, M. W., Enhanced sensibility of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients, *Environmental Microbiology* (2004) **6** (1) 73-78.

Manfield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I., and Bailey, M. J., RNA Stable Isotope Probing, a Novel Means of Linking Microbial Community Function to Phylogeny, *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 5367-5373,

Mauret, M., Paul, E., Puech-Costes, E., Mauret, M. T., and Baptiste, P., 1996, Application of experimental research methodology to the study of nitrification in mixed culture, *Water Science and Technology*, **34**(1): 245-252.

McTavish, H., Fuchs, J. A., and Hooper, A. B., 1993, Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*, *Journal of Bacteriology*, **175**: 2436-2444.

Mosquera-Corral, A., González, Campos, J. L., Méndez, R., Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds, *Process Biochemistry* **40**, (2005) 3109-3118.

Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., and Herndl, G. J., 1999, Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(8): 3518-3525.

Mota, C., Head, M. A., Ridenoure, J. A., Cheng, J. J., and de los Reyes III, F., 2005, Effect of aeration cycle on nitrifying bacteria populations and nitrogen removal in intermittently

Aerated reactors, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(12): 8565-8572.

Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., Hellinga, C. and van Kempen, R., 2001, Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Science and Technology*, **43**:127-134.

Navarro, E., Fernandez, M. P., Normand, P., and Bardin, R. 1992. Genomic heterogeneity of the genus *Nitrobacter*. *Integrated Journal of Systematic Bacteriology*, **42**:554-560.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Schaechter, M., 1990, *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., Klotz, M. G., 2002, Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria, *Archives of Microbiology*, **177**: 139-149.

Orso, S., M. Gouy, E. Navarro, and P. Normand, 1994, Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp, *Integrated Journal of Systematic Bacteriology*, **44**:83-86

Peng, Yongzhen, Zhu, Guibing, Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway, *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) **73**:15-26.

Pollice A, Tandoi, V, Lestingi, C, Influence of aeration and Sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate, *Water research* 36(2002)2541-2546.

Pommerening-Röser, A., G. Rath, and H.-P. Koops, 1996, Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*, *Systematic and Applied Microbiology*, **19**:344-351.

Prosser, J. I., 1989, Autotrophic nitrification in bacteria, *Advanced in Microbial Physiology*, **30**: 125-181.

Purkhold, U., Pommering-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P. and Wagner, M., 2000, Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5368-5382.

Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Röser, A. and Koops, H. P., 2003, 16S rRNA and *amoA*-based Phylogeny of 12 Novel Betaproteobacterial Ammonia Oxidizing Isolates: Extension of the Data Set and Proposal of a New Lineage within the Nitrosomonads, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**:

1485-1494.

Rittmann, B. E. and McCarty, P. L., 2001, Environmental biotechnology: principles and applications, McGraw-Hill, New York. Rols, J. E., Mauret, M, Rahmani, H., Ngyen, K. M., Capdeville, B., Cornirer, J. C., and, Deguin, A., 1994, Population dynamics and nitrite build-up in activated sludge and biofilm processes for nitrogen removal, Water Science and Technology, **29**(7): 43-51.

Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., and Liesack, W., 1997, The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, Applied and Environmental Microbiology, **63**: 4704-4712.

Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R., 2003, Nitrification with high-nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration, Water Research, **37**: 1371-1377.

Saad, O. A. L. O., Lehmann, S., Conrad, R., 1996, Influence of thiosulfate on nitrification, denitrification, and production of nitric oxide and nitrous oxide in soil, Biology and Fertility of Soils, **21**: 152-159.

Sakano, Y., Pickering, K. D., Strom, P. F., Kerkhof, L. J., 2002, Spatial distribution of total, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support, Applied and Environmental Microbiology **68**: 2285-2293.

Sallade, Y. E., and Sims, J. T., 1992, Evaluation of thiosulfate as a nitrification inhibitor for manures and fertilizers, Plant and Soil, **147**: 283-291.

Sánchez, O., Marti, M. C., Aspe, E., and Roeckel, M., 2001, Nitrification rates in a saline medium at different dissolved oxygen concentrations, Biotechnology Letters, **23**(19): 1597 - 1602

Sánchez, O., Aspe, E., Marti, M. C., Roeckel, M., 2004, The effect of sodium chloride on the two-step kinetics of the nitrifying process, Water Environment Research, **76**(1): 73-80.

Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. and Strous, M, 2003, New concept of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater, FEMS Microbiology Reviews, **27**:481-492.

Schreiber, D. C., and Pavlostathis, S. G, 1998, Biological oxidation of thiosulfate in mixed heterotrophic/

- autotrophic cultures, *Water Research*, **32**(5): 1363-1372.
- Smith, R. V., Doyle, R. M., Burns, L. C., and Stevens, R. J., 1997b, A model for nitrite accumulation in soils, *Soil Biology and Biochemistry*, **29** (8): 1241-1247.
- Sorokin, D. Y., G. Muyzer, T. Brinkhoff, J. G. Kuenen, and M. S. Jetten, 1998, Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov., *Archives of Microbiology*, **170**:345-352.
- Stenstrom, M. K., and Poduska, R. A., 1980, The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification, *Water Research*, **14**:643-649.
- Stouthamer, A. H., 1973, *Antonie van Leeuwenhoek*, **39**:545-565.
- Surmacz-Gorska, J., Cichon, A., and Miksch, K., 1997, Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification, *Water Science and Technology*, **36**(10): 73-78.
- Suthersan, S., and Ganczarczyk, J. J., 1986, Inhibition of nitrite oxidation during nitrification, some observations, *Water Pollution Research Journal of Canada*, **21**(2): 257-266.
- Suwa, Y., T. Sumino, and K. Noto. 1997. Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**:373-379
- Suzuki, I., 1999, Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions, *Canadian Journal of Microbiology*, **45**: 97-105.
- Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, T. S., B. E. Rittmann, and D. A. Stahl, 1994, Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, *Journal of Bacteriology*, **176**: 6623-6630
- Turk, O., and Mavinic, D. S., 1989, Stability of nitrite build-up in an activated sludge system, *Journal of WPCF*, **61**(8): 1440-1448.
- Van Loosdrecht M.C.M., Jetten, M.S.M., 1998, Microbiological conversions in nitrogen removal, *Water Science and Technology*, **38**(1), 1-7.
- Venterea, R. T., and Rolston, D. E., 2000, Mechanisms of and kinetics of nitric and nitrous oxide

production during nitrification in agricultural soil, *Global Change Biology*, **6**(3): 303-316.

Villaverde, S., Fdz-Polanco, F., and Garcia, P. A., 2000, Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged bifilters, *Water Research*, **31**(2): 602-610.

Wagner, M., Rath, G., Koops, H. P., Flood, J., and Amann, R., 1996, In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, *Water Science and Technology*, **34**(1-2): 237-244.

Wiesmann, U., 1994, Biological nitrogen removal from wastewater, *Advanced Biochemical Engineering*, **51**:113-154

Yang, L., and Alleman, J. E., 1992, Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture, *Water Science and Technology*, **26**(5-6): 997-1005.

Ye, R. W., and Thomas, S. M., 2001, Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications, *Current Opinion in Microbiology*, **4**:307-312.

赤司昭, 2004, 亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 (*norB*) のPCR による検出, 第38 回日本水環境学会
年会講演集: 381.

伊藤公夫, 2005, 私信.

北尾高嶺, 2003, 生物学的排水処理工学, pp.160-163, コロナ社, 東京.

高崎由紀, 2004, 亜硝酸蓄積型硝化脱窒処理プロセスにおける硝化細菌の挙動解析, 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文.

新田見匡, 2003, 亜硝酸還元酵素遺伝子に着目した脱窒細菌解析手法の確立及びその活性汚泥微生物群集解析への適用, 東京大学大学院新領域創成科学研究科博士論文.

淵秀隆, 1970, 海水の組成と塩分・塩素, 増沢健太郎 編, 海洋物理 I, pp. 7-13, 東海大学出版会.

山内泉, 竹村伸一, 米本豊, イオウ化合物の硝化に与える影響, 第38回下水道研究発表会、388-389.

本章では、第3章 3.1の方法で行った実験室規模活性汚泥リアクターにおける、亜硝酸型硝化反応 - 完全硝化反応の交代を狙った運転条件の変遷と処理水質モニタリングの結果と考察について述べる。

4.1 実験室規模活性汚泥リアクター実験結果

4.1.1 運転条件の変遷とリアクター水質モニタリング結果

リアクターR1は、田中ら（2006）が安定的な亜硝酸型硝化の維持に成功したリアクターをそのまま引き継いだものであり、運転181日目より運転条件を変更するまで長期間にわたって安定的な亜硝酸型硝化反応を維持していた。このリアクターで発生した余剰汚泥を分配して、同様の条件のリアクターをそれぞれ運転587日目、633日目に新たに構築したのがR2、R3であった。この3つのリアクターを用いて亜硝酸型硝化反応に影響する因子を検討した際の水質モニタリング結果についてまとめた。

(1) MLSS, MLVSS の変化

水質モニタリング結果の前に、本リアクターの活性汚泥の状況について簡単に触れる。Fig. 4-1, Fig. 4-2, Fig. 4-3にそれぞれR1, R2, R3のMLSS, MLVSSの経時変化を示した。R3において660日目以降、汚泥の発泡（フォーミング）が起こって汚泥の沈降性が悪化し、MLSS, MLVSSが減少し続けたために、690日目に余剰汚泥をリアクター内に戻して汚泥濃度を調整した。このときを除けば、各リアクターともに高濃度のSSを維持した。フロックがよく発達した汚泥であり、運転期間を通じて沈降は極めて良好であった。

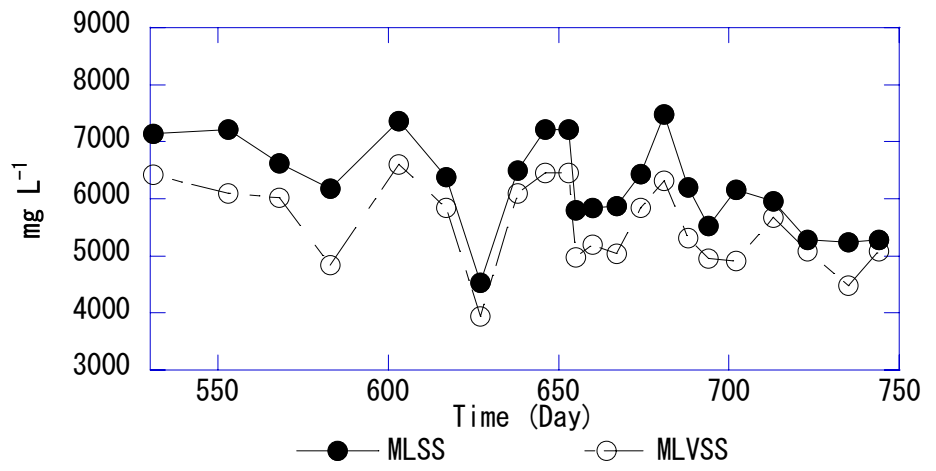


Fig. 4-1 R1におけるMLSS, MLVSSの経日変化

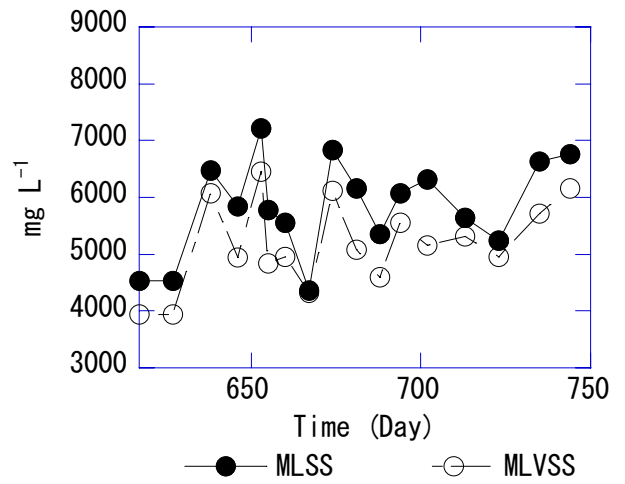


Fig. 4-2 R2におけるMLSS, MLVSSの経日変化

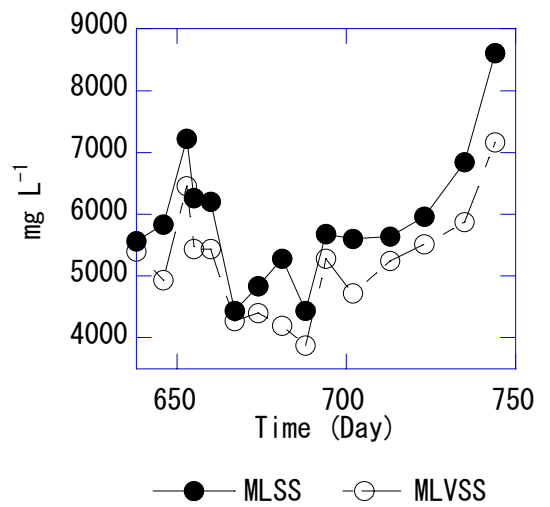


Fig. 4-3 R3におけるMLSS, MLVSSの経日変化

(2) 運転条件の変更による亜硝酸型硝化に影響する因子の検討

リアクターR1は、前述したように長期間にわたって亜硝酸型硝化反応を維持していた。そこで、このリアクターをもとに構築したR1, R2, R3の3つの亜硝酸型硝化脱窒リアクターの運転条件を様々に変更し、亜硝酸型硝化反応と完全硝化反応を隔てる影響因子を検討した。Fig. 4-4に1サイクルにおけるリアクターの運転スケジュールを示した。運転112日より運転条件検討前までは、1サイクル（8時間）の内訳が {流入・放流30分→脱窒工程120分→好気（硝化）工程300分→沈殿工程30分} という硝化脱窒サイクルの設計であった。影響因子の検討に用いた生物反応時間の違いとは、脱窒工程の有無であり、脱窒工程を除いた運転では、1サイクルの内訳を {流入・放流30分→好気（硝化）工程420分→沈殿工程30分} とした。亜硝酸型硝化反応における制限要因の検討に用いた全運転条件とそのスケジュールをTable 4-1に示した。

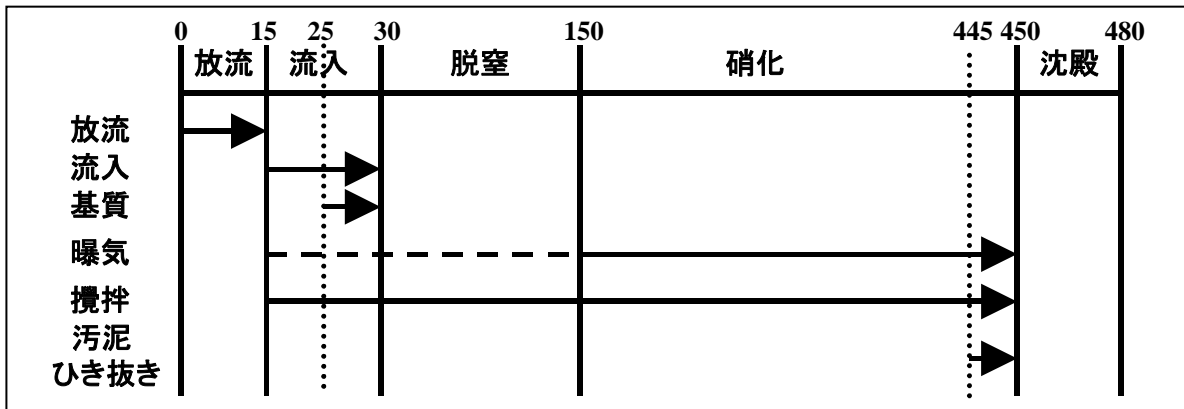


Fig.4-4 1サイクルにおけるリアクター運転スケジュール

Table 4-1 亜硝酸型硝化反応における制限要因の検討因子

		開始日	Na ₂ S ₂ O ₃		生物反応時間		送気量 L/(L·min)	好気初亜硝酸 添加濃度
			mg L ⁻¹	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	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	

(3) 処理水中溶存態窒素濃度の経時変化

Fig. 4-5に合成排水流入直後のR1リアクター内の溶存態窒素濃度を, Fig. 4-6に運転期間中の処理水中溶存態窒素濃度経日変化を示した。以下、処理水中の溶存態窒素濃度の変化と(2)で述べた運転条件の変更履歴(Table. 4-1)を照らし合わせて各a-dの各期間における結果を述べる。

- a 期：田中ら(2006)が亜硝酸型硝化反応を実現した条件そのままに運転。長期間にわたって安定した亜硝酸型硝化反応を維持した。
- b 期：a期の条件から流入水中のチオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)を除いた。直後に処理水中の硝酸濃度がわずかに増加したが、依然として安定した亜硝酸型硝化反応を維持した。以降、全ての実験は流入水中にチオ硫酸は含んでいない。
- c 期：b期の条件より、pHの下限値を >8.0 から >7.2 に、加えて生物反応時間から脱窒工程を除き、好気工程のみに変更した。674日目あたりから処理水中の NO_3^- -N濃度が増加し、694日目には完全硝化反応に完全に変わり、これを維持した。
- d 期：c期の条件より、生物反応時間に再び脱窒工程を導入した。ただちに亜硝酸蓄積が始まり、744日目には亜硝酸型硝化反応に完全に移行した。

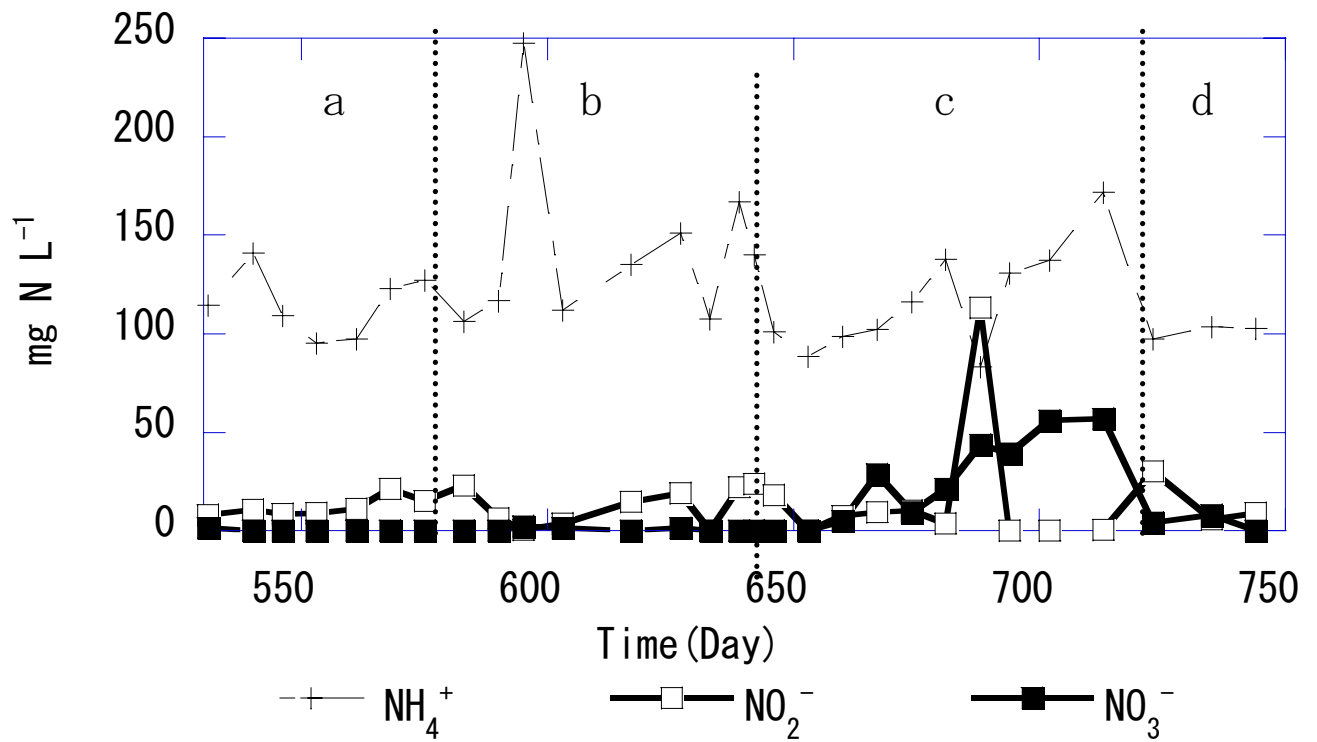


Fig. 4-5 合成廃水流入直後のR1リアクター内容存態窒素濃度の変化

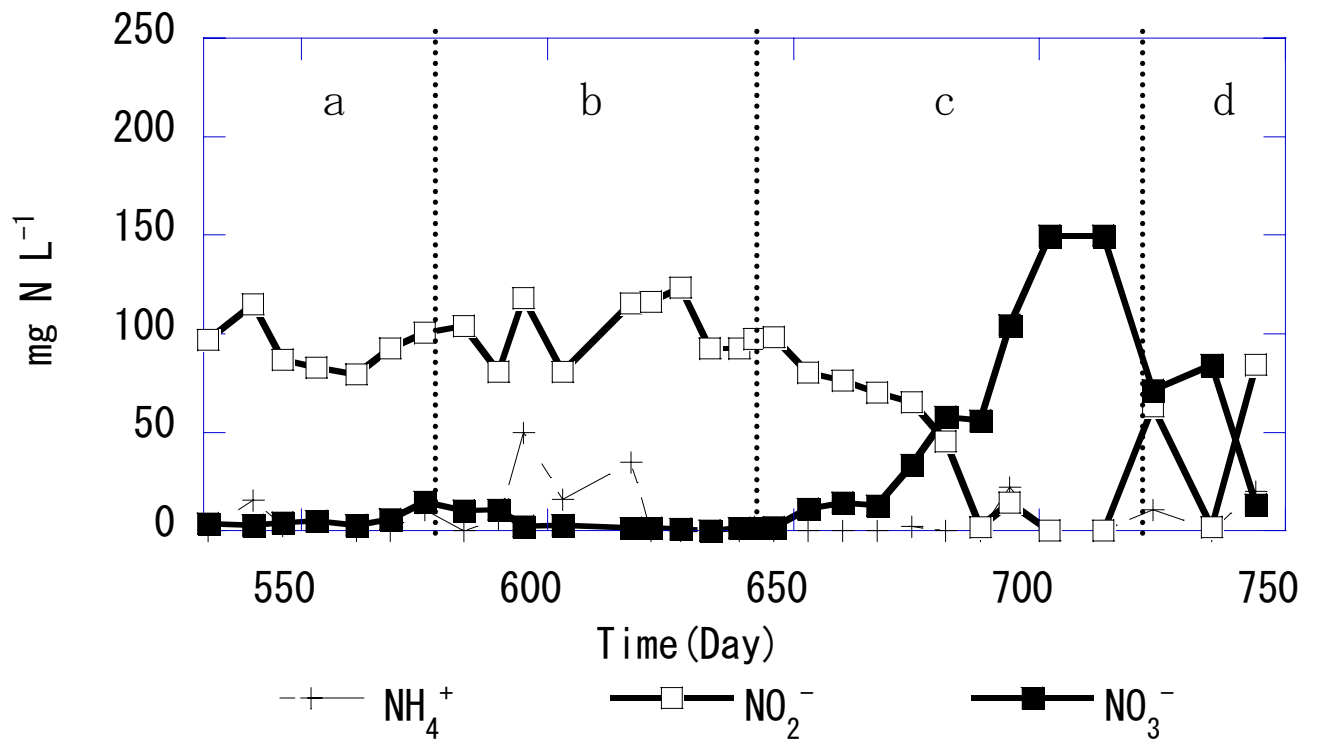


Fig. 4-6 R1処理水中溶存態窒素濃度の変化

Fig. 4-7に合成排水流入直後のR2リアクター内の溶存態窒素濃度を, Fig. 4-8に運転期間中の処理水中溶存態窒素濃度経日変化を示した。以下、処理水中の溶存態窒素濃度の変化と(2)で述べた運転条件の変更履歴(Table. 4-1)を照らし合わせてa-cの各期間における結果を述べる。

- a 期：R1のb期の汚泥から株分けして運転を開始した。運転条件はR1のb期と同様であった。安定した亜硝酸型硝化反応を維持した。
- b 期：a期の条件からpHの下限値を >8.0 から >7.2 に変更した。依然として安定した亜硝酸型硝化反応を維持した。
- c 期：b期の条件に加え、生物反応時間の好気工程開始時に亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) 溶液を添加した。処理水中により高濃度の NO_2^- -Nが蓄積するようになったが、 NO_3^- -N濃度は増加しなかった。

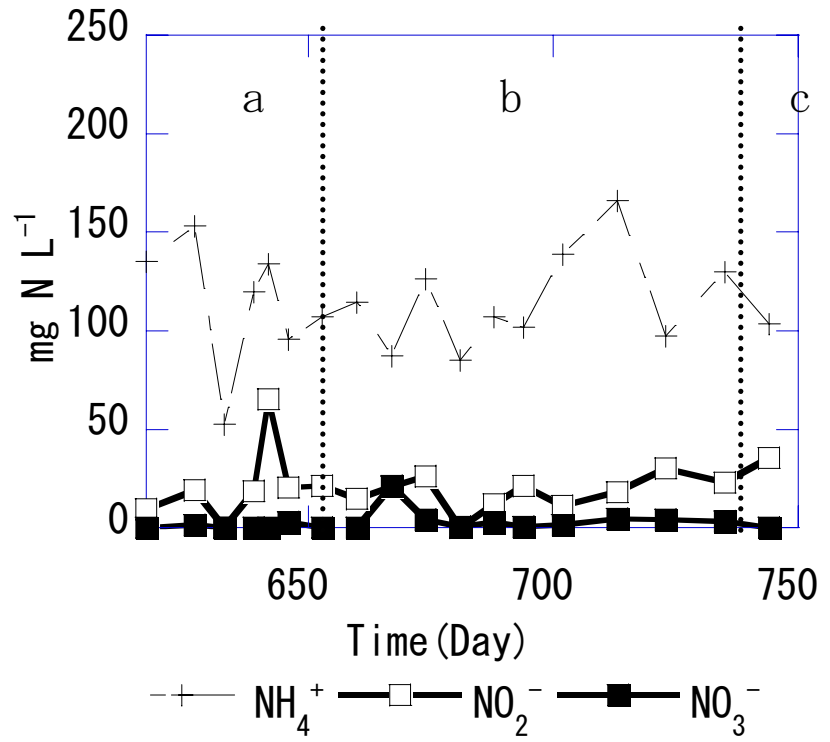


Fig. 4-7 合成廃水流入直後のR2リアクター内溶存態窒素濃度の変化

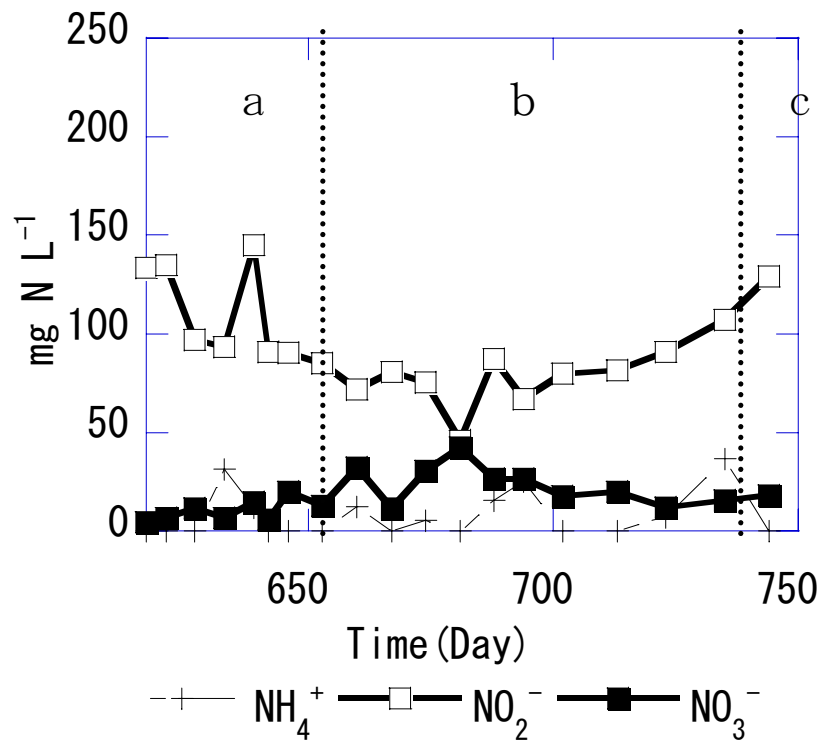


Fig. 4-8 R2処理水中溶存態窒素濃度の変化

Fig. 4-9に合成排水流入直後のR1リアクター内の溶存態窒素濃度を、Fig. 4-10に運転期間中の処理水中溶存態窒素濃度経日変化を示した。以下、処理水中の溶存態窒素濃度の変化と(2)で述べた運転条件の変更履歴(Table. 4-1)を照らし合わせて各a - dの各期間における結果を述べる。

- a 期：R1のb期の汚泥から株分けして運転を開始した。運転条件はR1のb期と同様であった。安定した亜硝酸型硝化反応を維持した。
- b 期：a期の条件より、生物反応時間から脱窒工程を除き、好気工程のみに変更した。ただちに処理水中の NO_3^- -N濃度が増加し、653日目には完全硝化反応に完全に変わり、これを維持した。
- c 期：b期の条件より、生物反応時間に再び脱窒工程を導入した。ただちに亜硝酸蓄積が始まったが、これと同時期に汚泥の発泡(フォーミング)が起こった。完全に亜硝酸型硝化に移行する前の688日目にはアンモニア酸化を含む硝化反応が完全に停止した。保存していた余剰汚泥をリアクター内に戻すとアンモニア酸化反応は再開し、しばらくしてから発泡も収まった。以降、亜硝酸型硝化反応を維持した。
- d 期：c期の条件に加えて送気量を2倍に変更し、 1.8Lmin^{-1} から 3.6L min^{-1} にした。一度アンモニア酸化反応が停止したが、亜硝酸型硝化を維持した。

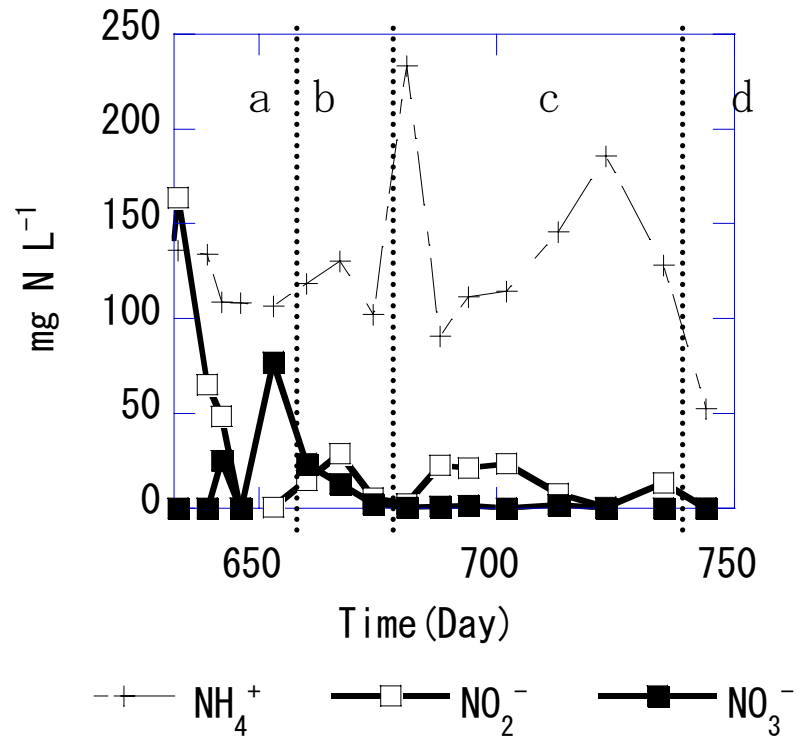


Fig. 4-9 合成廃水流入直後のR3リアクター内溶存態窒素濃度の変化

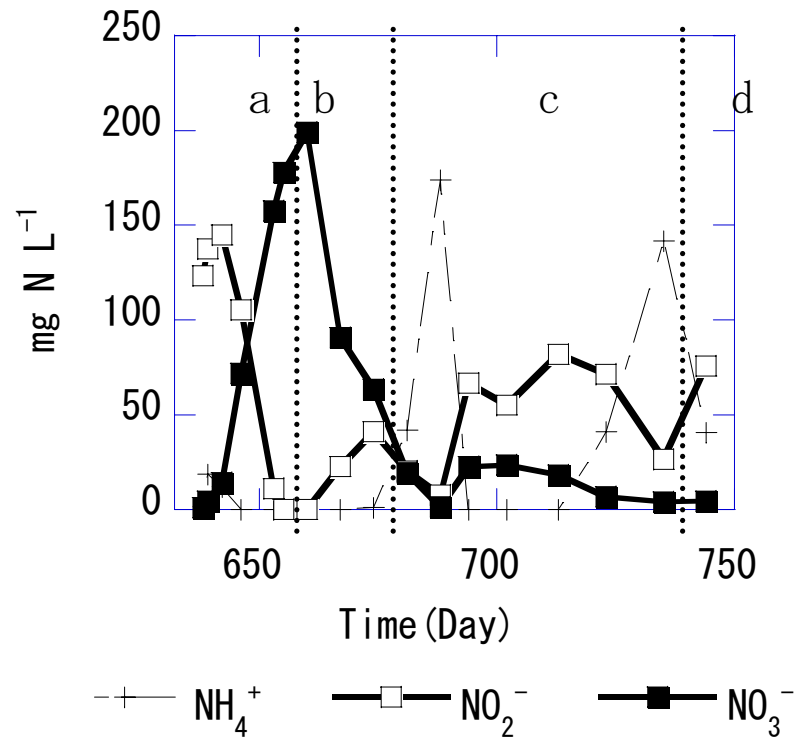


Fig. 4-10 R3処理水中溶存態窒素濃度の変化

4.1.2 1サイクルあたりの窒素化合物モニタリング結果

本研究におけるリアクター水質モニタリングは、任意のサイクルにおいて合成排水流入直後から一連の処理工程が終わるまでの間に経日的に採取した汚泥混合液 (mixed liquor) 中の溶存態物質に対して行った。4.1.1 ではその水質モニタリングのうちでも合成排水流入直後の水質と処理水質の経日的な変化に注目した記述したが、ここでは運転期間各時期における1サイクルあたりの水質変化について述べたい。

Fig. 4-11にR1の a, b, c, d期間における典型的なモニタリング結果について示した。同様に、Fig. 4-12ではR2のa-c期間, Fig. 4-13ではR3のa-d期間における典型的なモニタリング結果を示した。

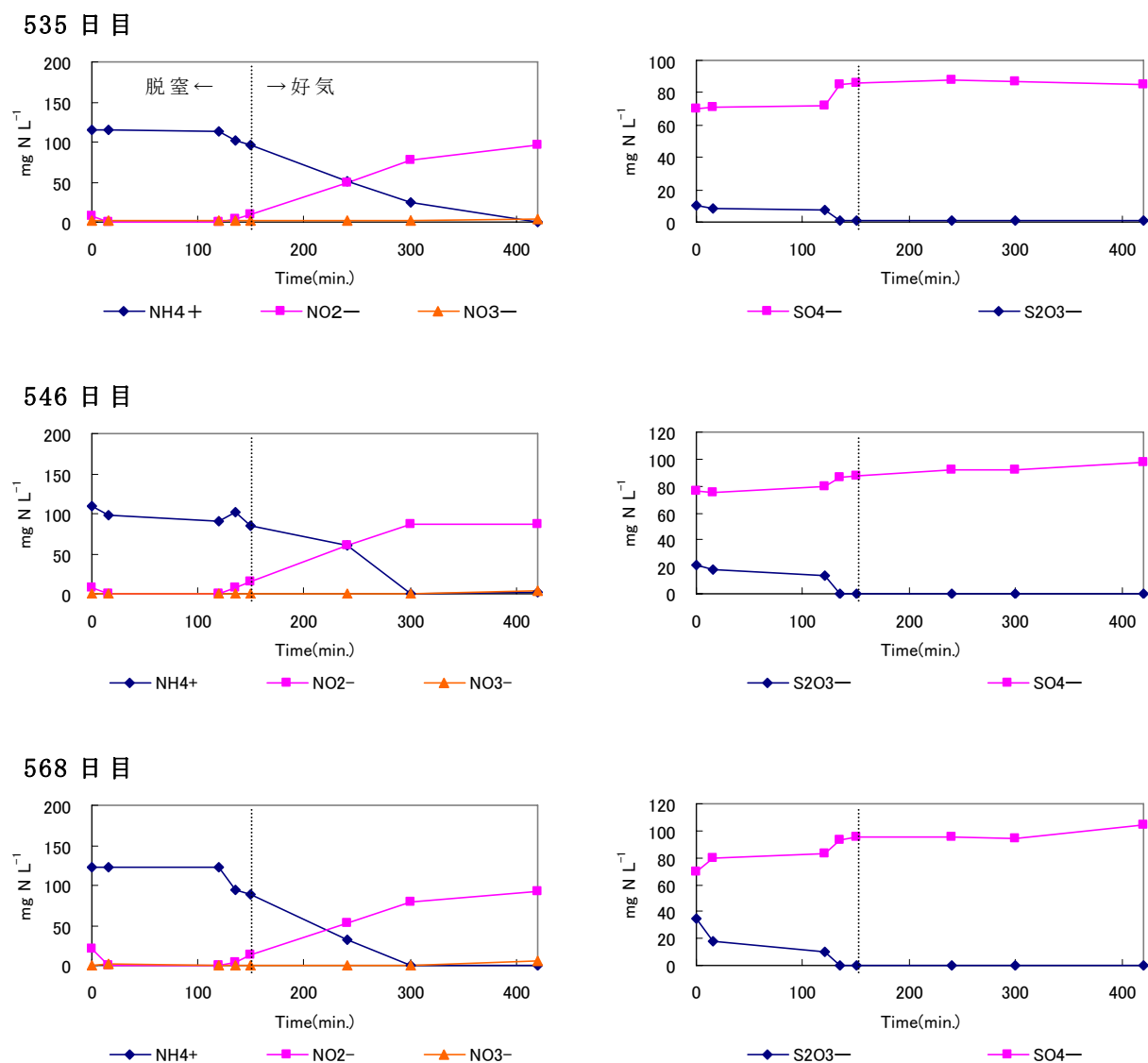
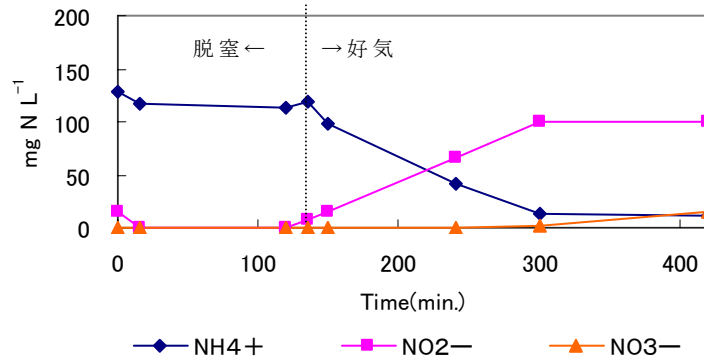
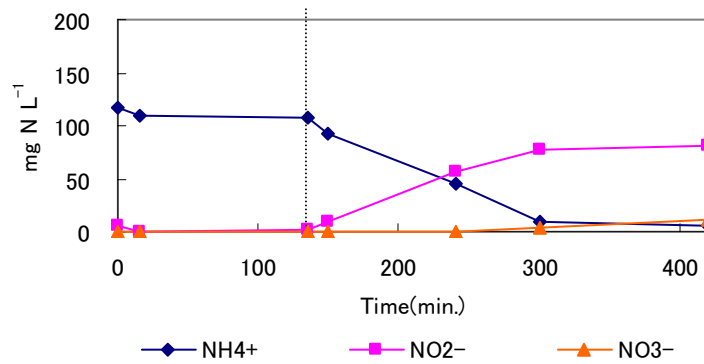


Fig. 4-11-a R1の a 期間における典型的なモニタリング結果

575 日目



590 日目



633 日目

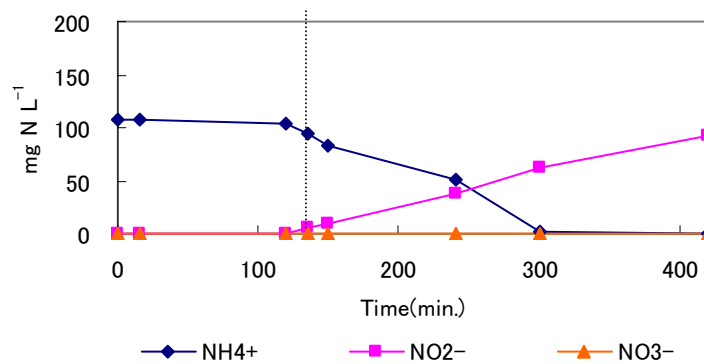


Fig. 4-11-b R1のb期間における典型的なモニタリング結果

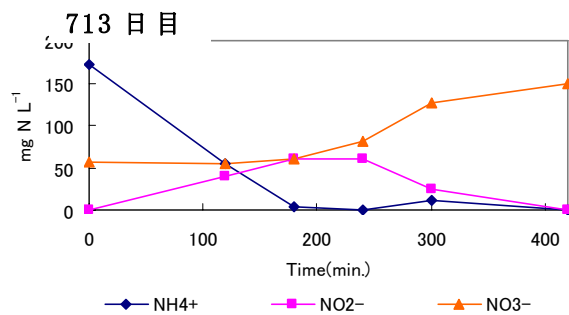
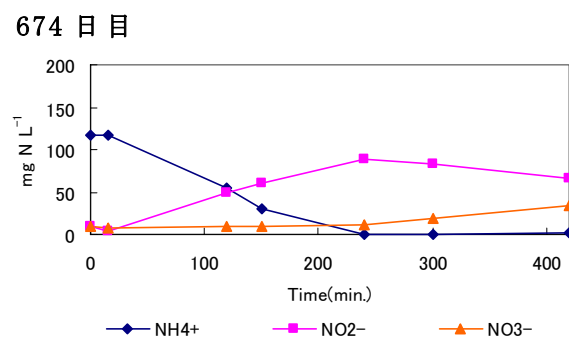
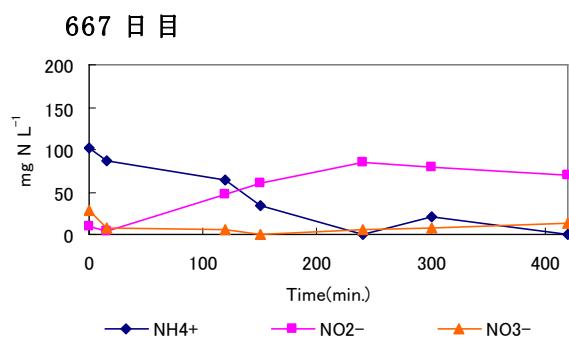
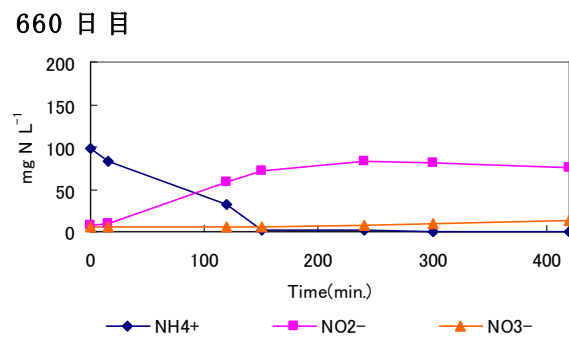
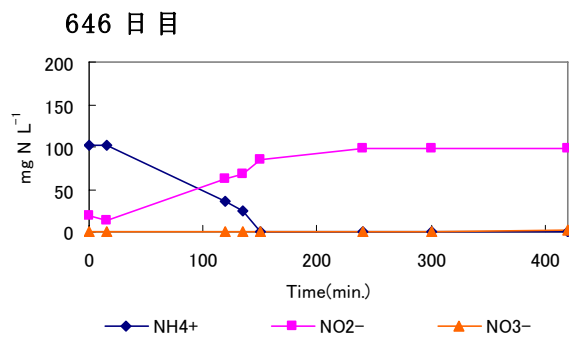
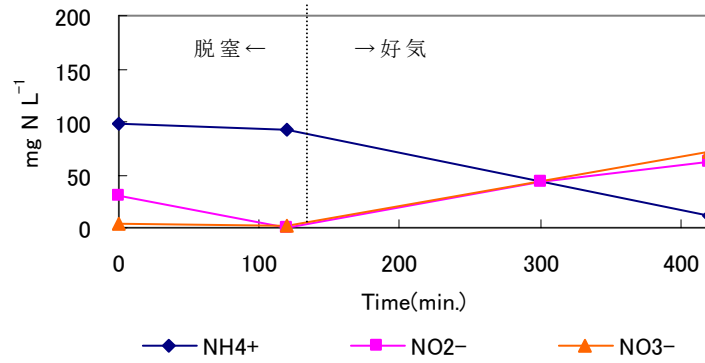
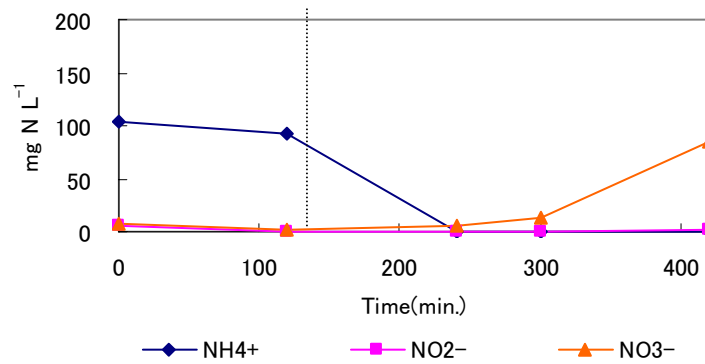


Fig. 4-11-c R1のc期間における典型的なモニタリング結果

723 日目



735 日目



744 日目

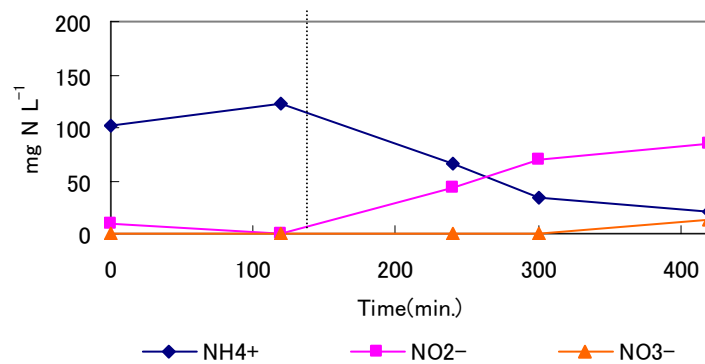
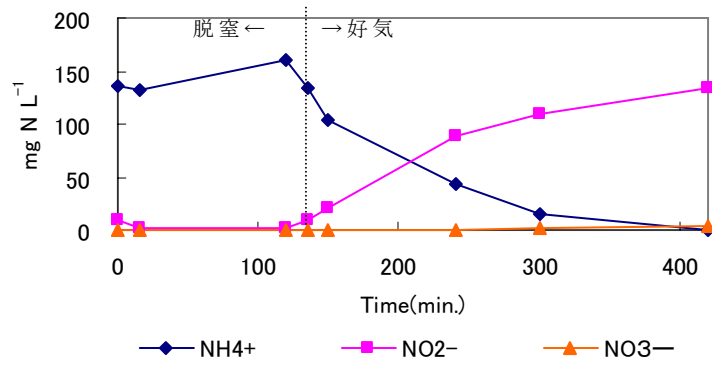


Fig. 4-11-d R1のd期間における典型的なモニタリング結果

617 日目



638 日目

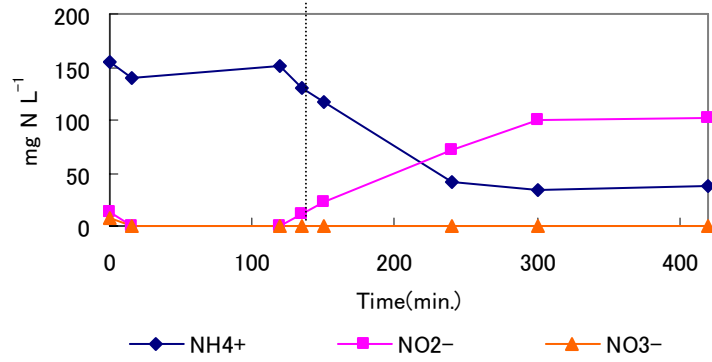
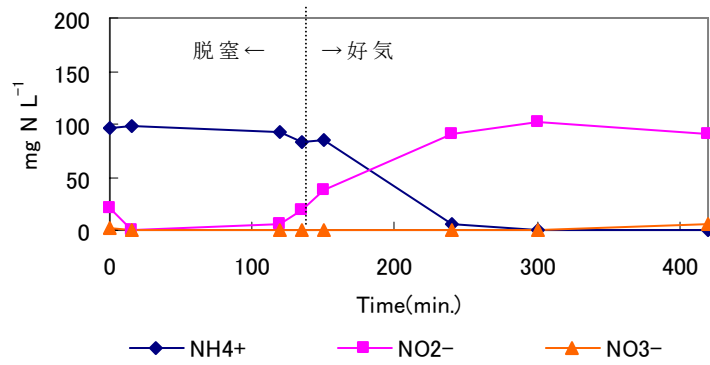
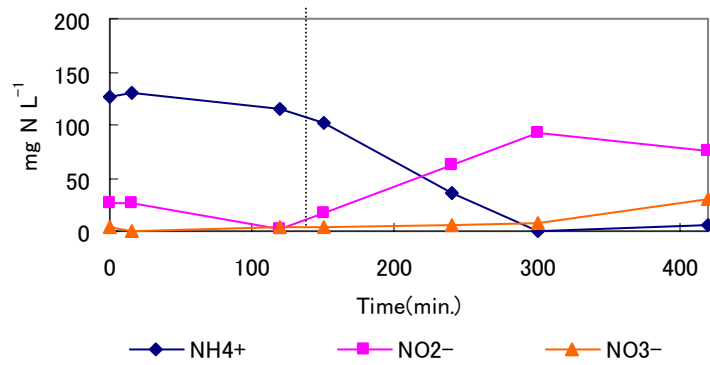


Fig. 4-12-a R2のa期間における典型的なモニタリング結果

646 日目



674 日目



713 日目

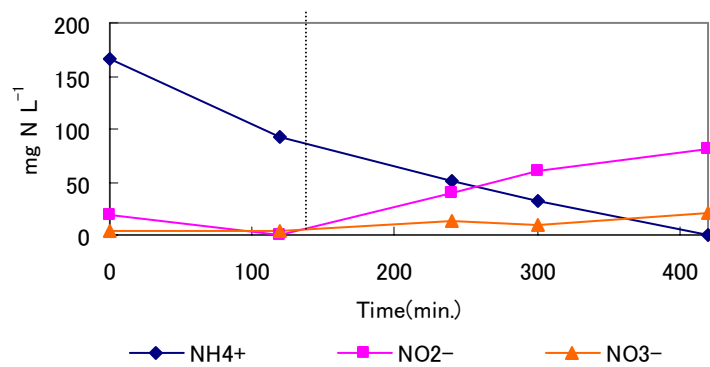
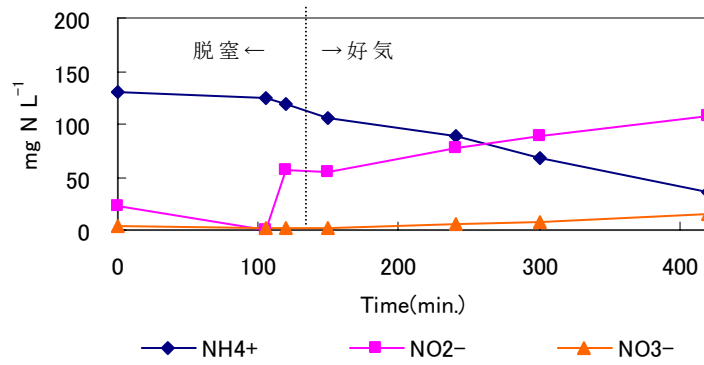


Fig. 4-12-b R2のb期間における典型的なモニタリング結果

735 日目



744 日目

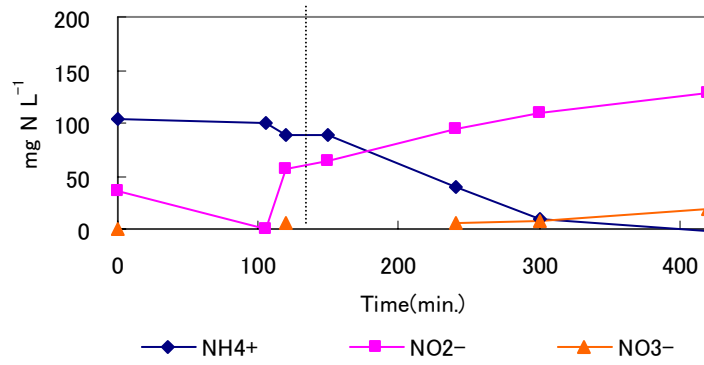


Fig. 4-12-c R2のc期間における典型的なモニタリング結果

638 日目

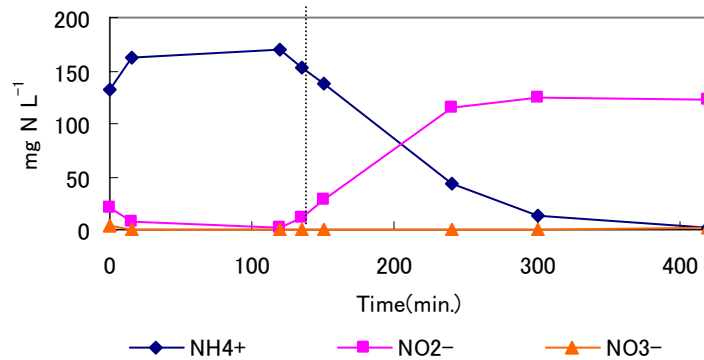
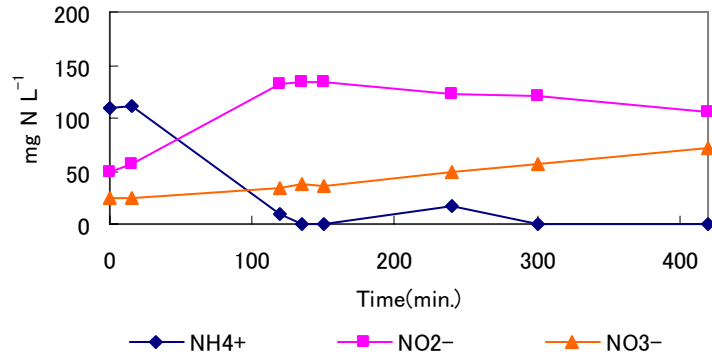
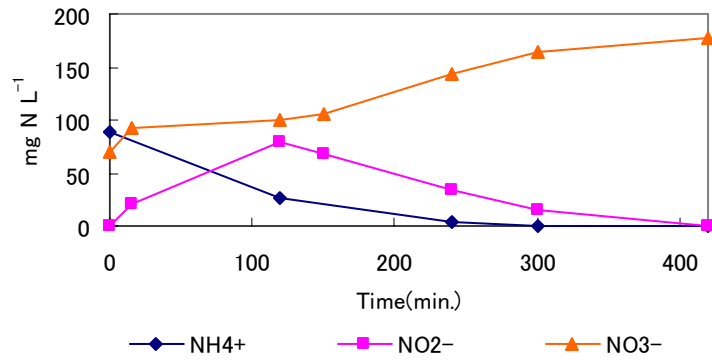


Fig. 4-13-a R3のa期間における典型的なモニタリング結果

646 日目



655 日目



660 日目

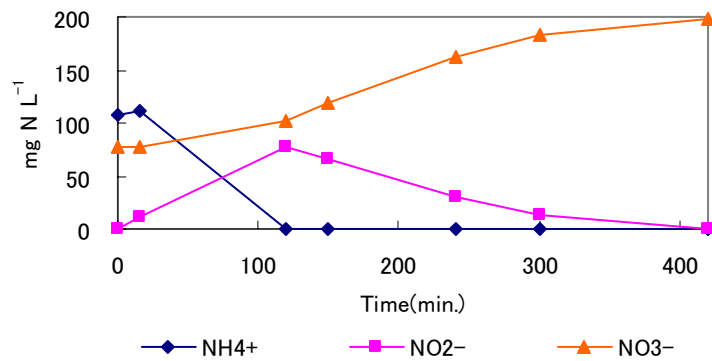
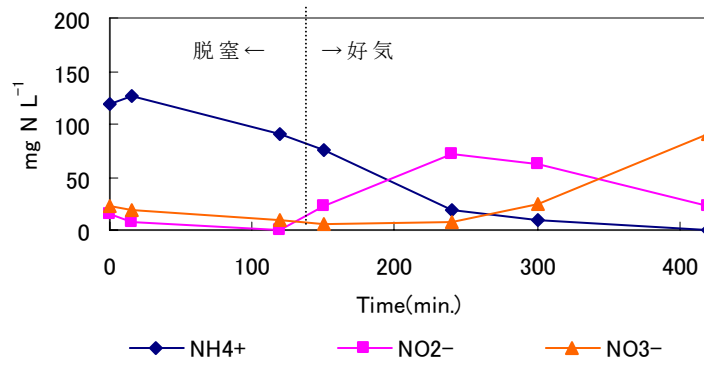
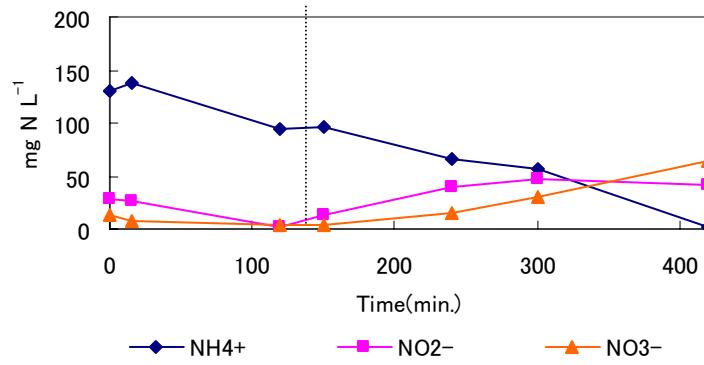


Fig. 4-13-b R3のb期間における典型的なモニタリング結果

667 日目



674 日目



713 日目

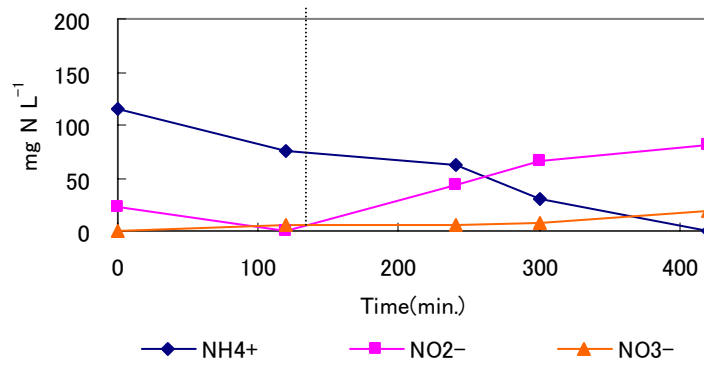


Fig. 4-13-c R3のc期間における典型的なモニタリング結果

744 日目

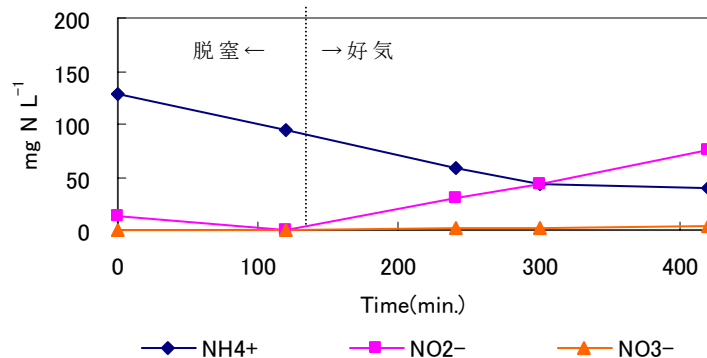


Fig. 4-13-d R3のd期間における典型的なモニタリング結果

4.2 考察

4.2.1 運転条件の変更と処理成績の変化

各リアクターの運転条件の変更は、各リアクターの処理成績とそこから演繹された仮説によって定めた。よって、まずは運転条件の変更にいたった処理成績の考察を述べる。

リアクターR1は、新日本製鐵（株）旧ミニプラントの運転条件を模倣することで、実験室規模活性汚泥リアクターで亜硝酸型硝化反応を得ることを目的に田中ら（2006）が構築した。2.4.6に示したように、新日本製鐵ミニプラントでは流入水中のチオ硫酸の有無がスイッチとなったと示唆するような完全硝化反応⇄亜硝酸型硝化反応の交代が観察された。また、一方で2.4.7に示したように、田中ら（2006）が実験室規模活性汚泥リアクターを運転開始した当初は期待していた亜硝酸型硝化反応ではなく、完全硝化反応が観察された（Fig. 2-11）。この後、脱窒工程の導入、pH制御値の上方修正を行って数ヵ月後に亜硝酸型硝化反応が獲得されたため、亜硝酸型硝化反応をもたらした直接的な原因は説明できなかった。これらの現象を解析することを目的として本研究では3つのリアクターを用い、Table 4-1に示した制限要因の検討を行ったのであった。

まずR1のb期においてチオ硫酸の影響を評価するために流入水中のチオ硫酸を除いた。硝化への影響は認められなかったため、以降はチオ硫酸を除いたままで運転を継続した。この状態のリアクター内活性汚泥から、様々な条件を同時に検討するための実験系増加を目的としてR2、R3を作成した。

次にR1のc期、R2のb期、R3のb期においては田中ら（2006）の実験において観察されたpHあるいは脱窒工程の導入の影響を評価するためにR2はpH制御値を変更、R3は脱窒工程の除去、R1はその二つの複合影響を評価するためにpHと脱窒工程を同時に変更した。R1とR2において完全硝化反応に移行し、R2は亜硝酸型硝化反応を維持したため、pHは制限要因ではないことが示唆された。

続いてR1のd期、R3のc期において脱窒工程の再導入が亜硝酸型硝化反応を導くという再現性も得られた。よって、本研究で用いたリアクターにおける亜硝酸型硝化反応獲得の要

因は脱窒工程の導入であったと結論付けた。

脱窒工程の導入という処理工程上の違いでは、亜硝酸型硝化反応のキーフアクターと考えられるNOBにどのような影響を及ぼすのかは明らかではない。そこで、脱窒工程の導入がNOBの生長に影響を及ぼしそうな因子として以下の仮説を立てた。

仮説 1：亜硝酸の不足

脱窒工程の導入により好気工程の時間が短くなった。そのため、AOB が生産する亜硝酸が NOB の呼吸に利用できるような濃度にまで蓄積するのに時間がかかるために NOB の呼吸に利用できるようになったときには好気工程が終わってしまっているのではないかとすなわち、アンモニア酸化細菌による亜硝酸の生産が律速となって亜硝酸型酸化反応になっていると考えた。

そこで R2 の c 期において、脱窒過程が終わって送気が始まる生物反応時間開始 120 分にリアクター内の亜硝酸濃度が 100mgN/L 程度になるように亜硝酸ナトリウム溶液を添加した。しかしながら、硝酸が生産され始める時間に変化はなく、最終的に生産される硝酸の濃度はほとんど変化しなかった。よって、この仮説は否定された。

仮説 2：酸素の不足

好気工程開始後 180 分程度までは各リアクターにおける溶存酸素濃度 (DO) は 0.8-1.5mg L⁻¹ 程度であった。その後、おそらく亜硝酸酸化が行われている時間は 4.5mg L⁻¹ 以上であった。DO0.7-1.4mg L⁻¹ で亜硝酸が蓄積したという報告がある (Ruiz et al. 2003)。また、アンモニア酸化速度から考慮すると pH=7.5, DO=1.5mg L⁻¹, T=30°C が亜硝酸型硝化に理想的という報告もある (Wang et al. 2004)。酸素が不足している状況であるために、亜硝酸酸化に長時間の好気工程時間を要していたのが、脱窒工程導入によって好気時間が短縮され、亜硝酸が蓄積したと考えた。

そこで、R3のd期において送気量を2倍に増加させ、DOの下限を上昇させてみた。しかしながら、処理水中の硝酸濃度は上昇しなかった。

4.2.2 亜硝酸型硝化反応の律速因子

4.2.1ではTable 4-1に示した各検討条件に注目するにいたった考察を述べた。以下は4.2.1で立てた仮説の検証と考察を、各因子についてそれぞれ述べた。

4.2.2.a 流入水中のチオ硫酸イオンの有無と亜硝酸型硝化反応

流入水中にチオ硫酸が存在することによる亜硝酸型硝化への影響を評価するためにR1のb期において流入水中のチオ硫酸を除いたが、亜硝酸型硝化反応に影響を及ぼさなかった。これは2.4.6に示した新日鐵ミニプラントの結果に反していた。2.4.6.2にも述べたようにチオ硫酸が亜硝酸型硝化反応に影響したと言う知見は他にほとんどなく、また、AOBやNOBの生長や活性に直接的に影響する可能性があると言うような知見もない。しかしながら、チオ硫酸以外の他の硫黄化合物、例えばテトラチオネート (Jansezen & Bettany 1986) や硫化水素が硝化を抑制したと言った報告は多数あった (山内ら, 2000)。ミニプラントでは流入水中の有機物の組成が異なるために微生物相が異なり、チオ硫酸の中間代謝産物であ

るテトラチオネートが大量に発生したのかもしれない。また、ミニプラントでは循環式硝化脱窒法が用いられており、脱窒槽で還元された硫化水素が常に供給されていた可能性がある。この硫化水素が硝化反応を阻害していた可能性はありうる。いずれにせよ、本研究ではチオ硫酸が直接的な影響は与えていなかったことを示唆する結果が得られた。

4.2.2.b pHと亜硝酸型硝化反応

代表的なAOBである*Nitrosomonas*の至適pHは8-9の間であり、代表的なNOBである*Nitrobacter*の至適pHは7弱ということから、高pHではNOBの亜硝酸酸化がAOBのアンモニア酸化よりも低下して亜硝酸が蓄積しやすいと言うのが一般的な見解である（北尾高嶺，2003）。また、高pHは水中に高濃度の遊離アンモニア（Free ammonia;FA）を発生させる条件となり、このFAがAOBよりもNOBに対して強力な阻害要因となることが知られている（Yang and Alleman 1992）。式4-1にFA濃度とpHの関係式（Anthonisen 1976）を示す。

$$FA; \text{NH}_3\text{-N}[\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}] = \frac{\text{NH}_4^+\text{-N}[\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}] \times 10^{\text{pH}}}{K_b/K_w + 10^{\text{pH}}} \quad K_b/K_w = e^{6344/(273+T(^{\circ}\text{C}))} \quad (\text{式4-1})$$

—1)

多くの研究者はpH制御によってFA濃度をコントロールすることで亜硝酸型硝化を獲得したことを確認した（Ferhan 1996; Peng et al. 2004）。FAが7mg N L⁻¹以上でアンモニア酸化活性が阻害され、20mg N L⁻¹でほぼ完全にアンモニア酸化が止まる（Abeling and Seyfried 1992）。しかし、アンモニア酸化阻害と亜硝酸酸化阻害を隔てるFA濃度は文献によって異なっている。Anthonisen（1976）はNOBは1.0 mg N L⁻¹以上で亜硝酸酸化活性が阻害されるとした。また、Wong-Chong and Loehr（1978）は3.5 mg N L⁻¹以上で亜硝酸酸化活性は阻害されえたが、50 mg N L⁻¹でも安定した硝化反応が行われたとし、一方でMaure et al.（1996）は6.6-8.9 mg N L⁻¹で亜硝酸酸化活性が阻害されたと報告した。つまり、FA濃度の制御だけで亜硝酸型硝化を獲得するには他の要因も総合的に考慮する必要がある。

4-2式より求めた本研究におけるリアクター内のFA濃度をTable 4-2に示した。

Table 4-2 リアクター内のpHと遊離アンモニア濃度

NH ₄ ⁺ -N(mg·L ⁻¹)	下限pH		下限NH ₃ ⁺ -N(mg·L ⁻¹)	
	最終pH	T(°C)	最終NH ₃ ⁺ -N(mg·L ⁻¹)	
100	8.1	28	8.13	
	9.0		41.26	
100	7.3	28	1.38	
	8.0		6.56	

本研究におけるR2のa期からb期の運転結果によるとpH制御値の変更は亜硝酸型硝化反応に無関係と言えたので、本研究で用いたリアクター運転条件ではFA濃度が40 mg N L⁻¹程度でも亜硝酸酸化活性が止まらないということがいえた。

4.2.2.c 脱窒工程と亜硝酸型硝化反応

本研究で得られた結果から、亜硝酸型硝化反応を決定している因子といえたのがこの生

物反応工程への脱窒工程の導入であった。脱窒工程の導入はNOBの増殖を阻害するといわれている (Van Loosdrecht and Jetten 1998, Hidaka et al 2002, Mota et al 2005)。これは、フロック内に嫌気環境を作り出す、あるいは好気-嫌気条件の繰り返しによるものだと考えられている。

ばっ気パターンは亜硝酸型酸化をコントロールする一つの新しい要素と提唱されている (Hidaka et al. 2002)。ばっ気時間と亜硝酸蓄積の程度には負の相関がある (Turk and Mavinic 1987)。間欠ばっ気法の使用は亜硝酸蓄積の実現に有効であるとも言われている (Pollice et al. 2002)。また、種類の異なる脱窒酵素の誘導は連続的に開始するので、亜硝酸と硝酸といった異なる脱窒基質は好気から嫌気条件に切り替わったあとに一時的に蓄積する。

しかしながら、脱窒工程の導入がどのような仕組みでNOBの亜硝酸酸化活性を阻害して亜硝酸型硝化反応をもたらしたのか、決定的なことはわかっていない。そこで、脱窒工程が亜硝酸型硝化反応に与えた影響をより詳細に知るために、4.2.1で述べた理由から、好気工程開始時に亜硝酸の添加、あるいは送気量の増加という操作を行ったのであった。

4.2.2.d 亜硝酸の供給と亜硝酸型硝化反応

NOBの亜硝酸酸化活性が阻害されていなくても、AOBのアンモニア酸化活性が阻害されて亜硝酸が発生しなければ硝酸は発生しない。1サイクルあたりの窒素化合物モニタリング結果から、硝酸の発生はアンモニアがほぼ完全に酸化されてからであることが読みとれたのに加え、完全にアンモニアが酸化されるまでに要する時間が亜硝酸型硝化時と完全硝化時では異なっていた。完全硝化時は好気工程開始から120分後には全てのアンモニアが酸化されていたのに対し、亜硝酸型硝化時は好気工程開始後120分 (生物反応工程開始後240分) ではアンモニアが残存しており、180分かそれ以上をかけて酸化していた。これらの結果から、亜硝酸型硝化時はアンモニア酸化活性が落ちたことが律速になって結果的に硝酸の発生が抑えられていると考えた。しかしながら、好気工程開始直後の亜硝酸添加も硝酸濃度や亜硝酸酸化速度には全く影響せず、依然としてアンモニアが完全に酸化された好気工程開始180分以降から硝酸の発生が認められた。

以上の結果から、亜硝酸型硝化反応はAOBによる亜硝酸の生成が律速になって起こった現象ではないことが証明された。

4.2.2.e 送気量と亜硝酸型硝化反応

硝化という、酸素を多量に消費する反応を考えると、環境中の酸素濃度がその重要な因子になることは容易に想像できる。NOBはAOBに比べ低い酸素親和性を示すことが知られている (Stentrom & Poduska 1980, Jayamohan et al. 1988, Wiesmann 1994, Picioreanu et al. 1997 Sanchez et al. 2001)。そのため、低い溶存酸素濃度はAOBよりもNOBの生長を強く阻害し、その結果として亜硝酸型硝化が起こる (Peng et al. 2004)。本研究では好気工程時のDOが不足していたために完全硝化までに長時間を要し、そのために脱窒工程導入による好気工程の短縮が亜硝酸型硝化を誘導した可能性を考慮し、送気量の変更による異なるDO制御による影響を評価した。ただし、どの程度のDO増加が亜硝酸型硝化に影響を与えるのかめぼしを杖くするために、ルンゲ=クッタ法による数値シミュレーションを行った。

ルンゲ=クッタ法による数値シミュレーション

下記の式4-2, 4-3, 4-4にTable 4-3に示したパラメータを代入してシミュレーションを行った。X_{0AOB} X_{0NOB}はそれぞれ, 一サイクルあたりのアンモニア酸化, 亜硝酸酸化のパフォーマンスがFig. 4-11a, Fig. 4-11b, Fig. 4-12a, Fig. 4-13aといった亜硝酸型硝化反応と同じになるようにトライ アンド エラーで決めた。DOはやはり亜硝酸型硝化時のモニタリング結果を参考にし, 脱窒工程時は0mg L⁻¹, 好気開始からアンモニア酸化完了までは0.8 mg L⁻¹, アンモニア酸化完了からサイクル終了までは2.0 mg L⁻¹を基本条件とし, DO値を3倍まで増加させたシミュレーションを行った。この計算式ではAOB, NOBは際限なく増えることになってしまうため, 最終的には必ず完全硝化反応を行うことになってしまう。シミュレーションとして不完全ではあるが, DO値がAOB及びNOBの増殖速度に与える影響を評価することは可能と考えた。

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{AOB} X_{AOB} \frac{S_{NH_4}}{K_{S_{NH_4}} + S_{NH_4}} \bullet \frac{S_{O_2}}{K_{SO_2} + S_{O_2}} \quad \text{式 4-2}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{NOB} X_{NOB} \frac{S_{NO_2}}{K_{S_{NO_2}} + S_{NO_2}} \bullet \frac{S_{O_2}}{K_{SO_2} + S_{O_2}} \quad \text{式 4-3}$$

$$r_u = -\frac{dS}{dt} = -\frac{r_g}{Y} \quad \text{式 4-4}$$

$$r_g = \frac{dX}{dt}$$

Table 4-3 ルンゲ=クッタ法による数値シミュレーションに用いたパラメータ

パラメータ	単位					引用元
$X_{0\text{ AOB}}$	mg L^{-1}	170.80				
$X_{0\text{ NOB}}$	mg L^{-1}	9.93				
$S_{0\text{ O}}$	mg L^{-1}	0-6				
$S_{0\text{ NH}_4}$	mg N L^{-1}	150				
$S_{0\text{ NO}_2}$	mg N L^{-1}	0				
$K_{S\text{ NH}_4}$	$\text{g NH}_4\text{-N m}^3$	0.7				Henz et al,1995
$K_{S\text{ NO}_2}$	$\text{g NO}_2\text{-N m}^3$	1.2				Henz et al,1995
$K_{\text{AOB O}_2}$	$\text{g O}_2 \text{m}^3$	1.66				Sanchez 2001
$K_{\text{NOB O}_2}$	$\text{g O}_2 \text{m}^3$	3				Sanchez 2001
μ_{AOB}	d^{-1}	0.8	hr^{-1} 0.033	min^{-1} 0.00056	Henz et al,1995	
μ_{NOB}	d^{-1}	1	hr^{-1} 0.042	min^{-1} 0.00069	Henz et al,1995	
Y_{AOB}	gVSS gN^{-1}	0.12				Henz et al,1995
Y_{NOB}	gVSS gN^{-1}	0.07				Henz et al,1995
Δt	hr	1				min 5
脱窒工程	hr	2				
好気工程	hr	5				

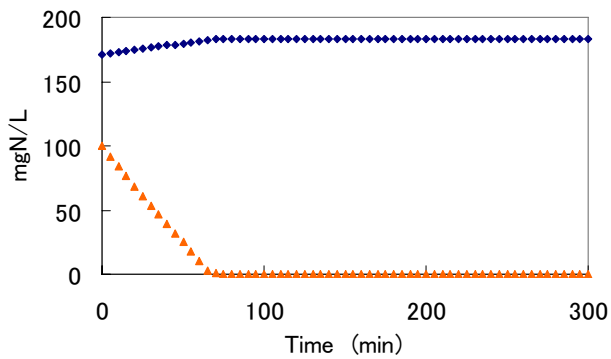


Fig.4-14a 1サイクルにおけるAOBの増殖と基質消費のシミュレーション

◆ XAOB ▲ SNH4

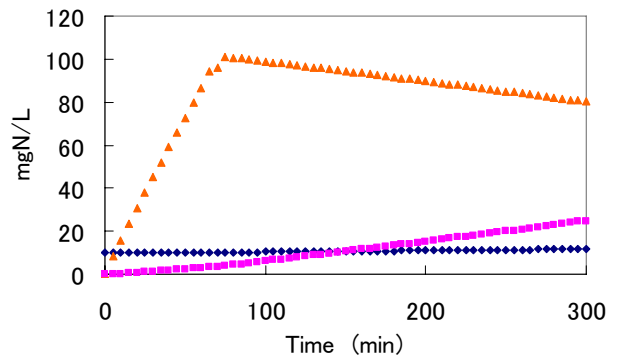


Fig.4-14b 1サイクルにおけるNOBの増殖と基質消費のシミュレーション

◆ XNOB ▲ SNO2 ■ SNO3

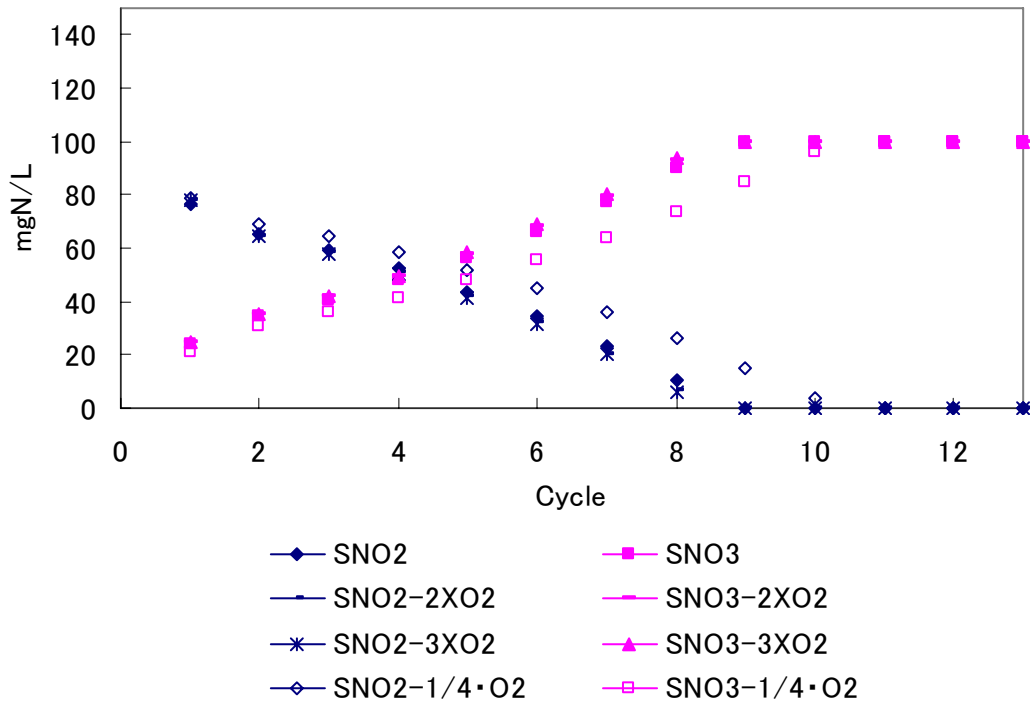


Fig. 4-15 異なるD0条件下での処理水中のNO₂-NとNO₃-N濃度のルンゲ=クッタ法によるシミュレーション

Fig. 4-15のように亜硝酸型硝化反応時のD0濃度を1/4にすると処理水中に亜硝酸が残らなくなるまでのサイクル数は1サイクル遅れる。つまり、NOBの増殖速度は減少するのに対し、D0を2倍、3倍に増やしてもグラフ形状はほぼ変化しない。つまり、D0はすでに十分であり、送気量を増加させても亜硝酸型硝化から完全硝化への変化は獲得できないことが予想された。

実際にR3のd期において送気量を2倍にして運転したが、変わらず亜硝酸型硝化反応を維持していた。つまり、D0が不足した結果による亜硝酸型硝化反応の獲得ではなかったことが示唆された。

4.4 まとめ

亜硝酸型硝化反応を行っていたリアクターに対して流入水中のチオ硫酸、pH制御値、脱窒工程といった条件を変更したところ、脱窒工程を除いたリアクターにおいて完全硝化反応に変化した。よって、本リアクターにおける亜硝酸型硝化反応と完全硝化反応を隔てる制限要因は脱窒工程の有無であることがわかった。

脱窒工程の導入がNOBの亜硝酸酸化活性を阻害した原因として、アンモニア酸化活性の低下による基質としての亜硝酸の不足によるもの、あるいは酸素不足によるものと考えた。しかし、亜硝酸の添加や送気量の増加を行っても亜硝酸型硝化を維持したことから、この2つが直接的な原因ではないことがわかった。

結局、脱窒工程の導入という操作上の条件が影響を与えていたことはわかったが、その

操作が作り出す環境の何が決定的に亜硝酸型硝化に影響していたのかを突き止めることまではできなかった。

今後のさらなる検討要因としては、脱窒工程の導入による好気工程の短縮化の影響を評価するために、サイクルを120分間延長し、好気工程を120分間延長して脱窒工程（120分間）を除いた場合と同じ好気工程時間を与えることを考えている。これによって亜硝酸型硝化反応は好気生物反応時間の長さが影響しているものなのかどうかを明らかにすることができると考える。

