

# 分子生物学的手法による嫌気脱窒バイオリアクター中の微生物群集の解析

## Analysis of Bacterial Community in Anerobic Denitrification Reactor by Molecular Biological Technique

齋藤 禎一 ・ 北川 陽介 ・ 中村 公人 ・ 田中 千尋 ・ 三野 徹  
Yoshimoto Saito, Yosuke Kitagawa, Kimihito Nakamura, Chihiro Tanaka and Toru Mitsuno

### はじめに

生物学的環境浄化を行う場合、その浄化作用に働く微生物群集の情報は不可欠である。近年、PCR (Polymerase Chain Reaction) や DGGE (Denatured Gradient Gel Electrophoresis) などの分子生物学的手法の導入により、環境浄化に關与する微生物群集の解析技術は格段に進歩し、浄化作用の主役となる微生物種も多く報告されてきた。

そこで、本研究では現在硝酸態窒素除去の主流となっている嫌気脱窒バイオリアクターを用いて、分子生物学的手法によりその内部で働く微生物群を解析した。そして明らかになった微生物群集とリアクターの処理能力との相関を求め、脱窒に關与する微生物種の同定を試みた。今日、農業および生活排水中に含まれる硝酸態窒素による閉鎖水系の富栄養化現象が顕在化し、徹底した硝酸態窒素の除去が望まれている。本研究により得られる脱窒微生物種の情報は、生態学的特性を考慮した高度な脱窒処理に有効な指標となることが期待される。なお本研究は研究課題番号 12460113 として科学研究費補助金の援助を受けて行われた。

### 実験結果

#### 1 嫌気脱窒リアクターの構造および性能試験

本研究で使用したリアクターの構造を Fig. 1 に示す。このリアクターは既に実用化され、高い性能が確認されている嫌気リアクターの 1/200 モデルである。処理場より採取した汚泥を付着させた泡担体をリアクターに投入し処理に利用した。脱窒菌の有機炭素源にはメタノールを用いた。中央に攪拌体を設置し、担体を効率的に汚水と接触させた。また攪拌体によりリアクター内に下方向水流を発生させ、担体内に脱窒にともなう気泡が発生にし、担体が浮上するのを防止した。このリアクターを起動する際、まず硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) 濃度 120mg/L の条件でバッチ運転をおこなった。リアクター内の  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度が 15mg/L に減少した時点で被処理水をリアクター内に流入させ、連続運転による脱窒処理に移行した。リアクター処理水の水質推移を Fig. 2 に示す。グラフ上部のアルファベットおよび黒塗りのプロットで示した時点では同時にリアクター内の担体を採取し、微生物群集の解析を行った。

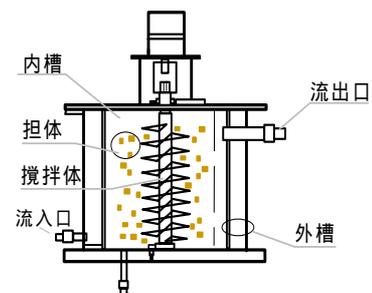


Fig. 1 リアクター構造

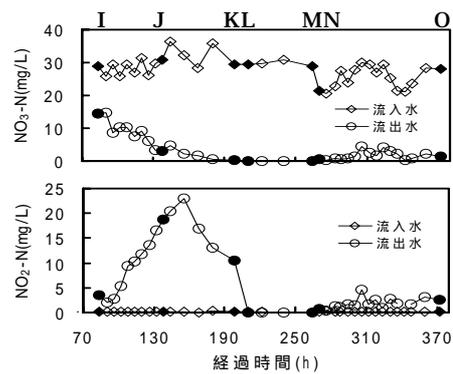
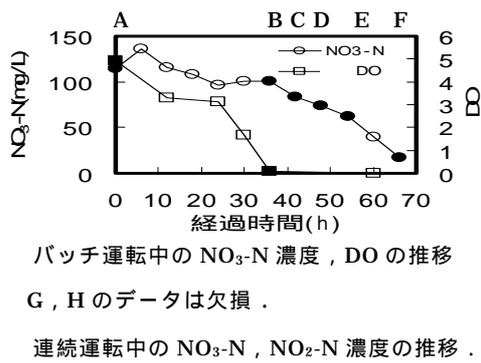


Fig. 2 リアクター処理水の水質推移

## 2 嫌気脱窒型リアクター内の微生物群集解析

分子生物学的手法である DGGE 法を用いてリアクター内に形成される微生物群集の解析を行った。その結果を Fig. 3 に示す。図中の各レーン中に見られるバンド 1 本が 1 微生物種に相当する。各レーンに示されるアルファベットは Fig. 2 に示すアルファベットの水質データと対応する。バッチ運転開始直後のサンプル A ではバンドを検出することができなかったが、36 時間後のサンプル B から 10 種類のバンドが確認できた。連続運転移行後は脱窒処理率が向上するにつれて検出されるバンドの数は減少し、処理率 90%以上で安定した 180 時間 (サンプル L) 以降では、バンド 8, 9, 10 のみが検出された。そこでこの 3 種類のバンドについて塩基配列を決定し、既知種との相同性から種の推定を行った。その結果バンド 8 は *Ralstonia eutropha*, バンド 9 は *Comamonas testosteroni* とそれぞれ高い相同性を示した。*R. eutropha* については現在土壌脱窒菌として研究が進められている。また *C. teststeroni* は好気脱窒菌として報告されており、リアクター内で好気脱窒の行われている可能性が示唆された。この 2 種がリアクター内の脱窒に有効に働いているものと思われる。一方バンド 10 については単離培養された種との相同性が見られず、その生態は不明である。

A B C D E F G H I J K L M N O

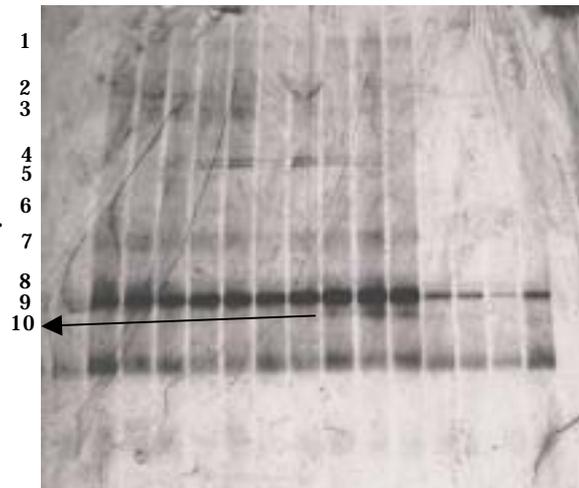


Fig. 3 DGGE 法による微生物群集解析

## 考察

今日利用されている硝酸態窒素除去リアクターのほとんどは、嫌気条件化での脱窒を想定している。本研究で用いたリアクターも嫌気処理槽として設計され、リアクター内の溶存酸素濃度は 1ppm 以下に抑えられている。しかし微生物群集解析の結果から、本研究で用いたリアクター内では好気脱窒により硝酸態窒素が除去されていることが示唆された。このことより現在排水処理場で利用されている嫌気脱窒槽においても好気脱窒が行われている可能性が考えられる。好気脱窒では温室効果ガスである N<sub>2</sub>O が多量に放出される。今後、脱窒処理場における好気脱窒由来の N<sub>2</sub>O 放出のモニタリング、および N<sub>2</sub>O 発生を抑制する新規脱窒処理の開発が求められる。