NO₃⁻およびNO₂⁻を電子受容体としたメタノール脱窒 リアクターの運転とその脱窒細菌の遺伝子の解析

新田見 匡* 今井 裕子**
 中村 穂* 松本 幹治*

Operation of a Methanol Denitrification Reactor Fed with NO₃⁻ and NO₂⁻ as Electron Acceptors and Analysis of Denitrifying Bacterial Genes

Tadashi NITTAMI*, Yuko IMAI**,
 Kazuho NAKAMURA* and Kanji MATSUMOTO*

*, ** Division of Materials Science and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Tokiwadai
 79-5, Hodogaya-ku, Yokohama, 240-8501, Japan

Abstract

We compared the denitrification rates and bacterial denitrification genes (*nirK* and *nirS*) between denitrification processes using NO₂⁻ and NO₃⁻. We operated a sequencing batch reactor (SBR) for denitrification using activated sludge. The SBR was first fed with NO₃⁻ (Run 1), and the electron acceptor was then changed to NO₂⁻ (Run 2). Methanol was fed as the major electron donor through out the operational period (64 days). Denitrification rates (mg-N·g-MLSS⁻¹·h⁻¹) were measured at regular intervals. Results showed that the maximum denitrification rates were more than 40 mg-N·g-MLSS⁻¹·h⁻¹ irrespective of electron acceptor type. However, it takes 12 days to reach the maximum denitrification rate after changing the electron acceptor to NO₂⁻. The results of the cloning analysis of *nirK* and *nirS* implied that the lag time was attributable to bacterial population shifts, because the *nirK* and *nirS* detected at Run 1 were phylogenetically different from those at Run 2. However, the changes in the total copy numbers of *nirK* or *nirS* could not explain the changes in the denitrifying rates.

Key words: activated sludge, cloning, nitrite denitrification, nitrite reductase gene (*nir*), real-time PCR

1. はじめに

活性汚泥を利用した生物学的廃水処理では、硝化、脱窒という2つの工程を設けて廃水中のアンモニア態窒素を除去する。その硝化、脱窒における窒素の形態変化には、硝酸イオン (NO₃⁻) または亜硝酸イオン (NO₂⁻) を経由する以下の経路がある (NH₃→NO₂⁻→NO₃⁻→NO₂⁻→NO→N₂O→N₂, NH₃→NO₂⁻→NO→N₂O→N₂)。脱窒工程では、廃水中の有機物を電子供与体とした、NO₃⁻またはNO₂⁻からN₂までの還元反応が生じる。しかし廃水中の有機物濃度が低い場合には、電子供与体として酢酸塩、エタノール、グルコース、メタノール、プロピオン酸塩などを添加し、脱窒効率を上昇させる措置がとられる¹⁻³⁾。中でもメタノールは、他の電子供与体に比べ価格が安く、発生汚泥量が少ないことから、添加材として選択される場合が多い^{4,6)}。しかし一方、酢酸などの有機酸に比べ、メタノールを電子供与体とした場合の脱窒速度は低いようである⁷⁾。またメタノールを電子受容体とした場合、メタノール添加開始から脱窒速度が上昇するまでに、少なくとも数日から数週間の時間のずれが生じるという問題が指摘されている^{4,6,8,9)}。

このラグタイムの原因を解明するため、以前よりメタノールを電子供与体とした脱窒に関与する微生物の解析が行われてきた。真正細菌が保有する16S rRNAの解析では、*Hyphomicrobium*, *Paracoccus* 属の細菌が、メタノールを電子供与体とした脱窒に関与するとの報告がある^{10,11)}。また近年では、添加するメタノールの炭素を安定同位体 (¹³C) あるいは放射性同位体 (¹⁴C) とした実験において、16S rRNAの解析が行われ、*Hyphomicrobium*, *Paracoccus* 属の細菌よりも *Methylophilales* 科の細菌がメタノールを電子供与体とした脱窒に関与している可能性が高いと報告されている^{12,13)}。一方、脱窒細菌がそのいずれかを保有するとされる¹⁴⁾、NO₂⁻還元酵素遺伝子 (*nirK*, *nirS*) を標的とした解析も盛んに行われている。これまで同解析からは、メタノールを電子供与体とした場合は脱窒細菌群集構造が特異的なこと、脱窒細菌群集の増減と汚泥の脱窒活性の増減に相関があること、などを示唆する結果が報告されている^{12,15,16)}。

以上のとおり、メタノールを電子供与体とした脱窒に関与する微生物種の解析は進み、ラグタイムの原因についても、微生物の解析結果に基づいて盛んに研究されている。

* 横浜国立大学大学院工学研究院機能の創生部門 〒240-8501 横浜保土ヶ谷区常盤台79-5

** 横浜国立大学大学院工学府機能発現工学専攻 〒240-8501 横浜保土ヶ谷区常盤台79-5

しかしながらこれまでの研究の対象は、電子受容体を NO_3^- とした脱窒系がほとんどであった。近年 NO_2^- 経由の硝化、脱窒経路が注目されている¹⁷⁻¹⁹⁾ことを考えると、電子受容体を NO_3^- とした場合だけでなく、 NO_2^- とした場合においても脱窒を担う微生物の解析をする必要があると考える。また活性汚泥から単離した細菌の脱窒活性を調べた既往の研究では、 NO_3^- から N_2 までの還元を行う細菌の中には、 NO_3^- から NO_2^- の還元速度が、 NO_2^- から NO の還元速度に比べ、速いものと遅いものが存在したと報告されている²⁰⁾。よって最終電子受容体を NO_2^- とした場合には、 NO_3^- の場合とは異なる微生物が優占する可能性があると考えられる。

そこで本研究では、メタノールを主な電子供与体とした脱窒リアクターを運転し、同リアクターの電子受容体を運転の途中で NO_3^- から NO_2^- に切り替えることとした。そして同活性汚泥中の16S rRNA geneをDGGE法、*nirK*、*nirS*をcloning法、real-time PCR法により解析し、電子供与体の違いによる脱窒細菌群集の相違について、調べることを目的とした。

2. 方法

2.1 脱窒リアクターの運転

活性汚泥反応槽にはFig. 1に示すsequencing batch reactor (SBR)を用いた。SBRの容積は6 l, HRT, SRTはそれぞれ12 hと6 dであった。バッチの1サイクルは6 hとし、流入工程 (20 min), 脱窒工程 (4.5 h), 沈殿工程 (0.5 h), 排出工程 (40 min) の4工程を温度20°Cの条件下で延べ64日間行った。流入工程ではSBRに水道水 (3 l) と基質 (60 ml) を添加した。基質の組成 ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) は、メタノールを電子供与体とした脱窒リアクターの報告¹³⁾に従い、 CH_3OH , 26.3; Bacto Pepton (Difco Laboratories), 12.2; Bacto Yeast Extract (Difco Laboratories), 2.0; NaNO_3 , 83.7 (or NaNO_2 , 113.2); NH_4Cl , 5.0; KH_2PO_4 , 1.1; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.6; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9.0; $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 16.0; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.2; 微量元素溶液 (30 ml)²¹⁾とした。ただし前半39日間は NaNO_3 を添加し、後半25日間では NaNO_2 を添加した。脱窒工程では窒素曝気により活性汚泥懸濁液中の溶存酸素を排出した。また適宜希硫酸を添加することでpHを7.2以下に調整した。そして工程の最後に、活性汚泥懸濁液250 mlを排出した。排出工程では沈殿工程で得られた上澄み水を排出し、SBR内の液量を3 lとした。なお種汚泥には横浜市内の水再生センターの A_2O プラントから採取した汚泥を植種した。

2.2 脱窒速度の測定

SBRの脱窒速度は運転開始7日目 (day 7) から5~12日の間隔で調べた。脱窒工程において経時的に汚泥懸濁水を採取し、ガラス繊維フィルターGB-140 (ADVANTEC) でろ過した後、 NO_3^- と NO_2^- の濃度を測定した。測定にはイオンクロマトグ

Fig.1 Schematic diagram of the SBR.

ラフ LC-10A (島津製作所) を使用し、イオン交換カラムには Shim-pack IC-A3 (島津製作所) を用いた。イオン濃度測定結果を用いて、式 (1) よりMLSSあたりの脱窒速度 ($\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{g}\cdot\text{MLSS}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) を求めた。式 (1) の脱窒速度は、 NO_3^- または NO_2^- が NO 以降にまで還元される速度を表す。なお NaNO_3 を添加した運転前半のサンプルから NO_2^- を検出した場合は、 NO_2^- 増加量を NO_3^- 減少量から差し引き、脱窒速度を算出した。

$$\text{脱窒速度} = \frac{\text{NO}_3^- \text{の減少量}(\text{mgN}\cdot\text{l}^{-1}) + \text{NO}_2^- \text{の減少量}(\text{mgN}\cdot\text{l}^{-1})}{\text{時間}(\text{h}) \times \text{MLSS}(\text{g}\cdot\text{l}^{-1})} \quad (1)$$

2.3 汚泥サンプルからのDNA抽出

脱窒活性試験を行う前に各汚泥サンプルを1 ml 取り分け、滅菌したTE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) を用いて洗浄し、-20°Cで冷凍保存した。冷凍保存したサンプルからFastDNA SPIN Kit for Soil (Qbiogene) を用いてDNAを抽出した。手順は同キットのプロトコルに従った。また抽出したDNAは、分光光度計 U-2000A (日立) によりその濃度を測定した。

2.4 DGGE法

汚泥サンプルから採取したDNA50 ngを鋳型に、16S rRNA geneのV3 regionをターゲットとしたプライマーセット357fGC-518r²²⁾を用いてPCRを行った。PCRの実験条件はKurisu *et al.* の報告²³⁾に準じた。ただし温度条件は以下のとおりに設定した (95°C 10分, 94°C 30秒-53°C 30秒-72°C 30秒×30 cycle, 72°C 10分)。得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動により目的の塩基長であることを確認した後、DCode system (Bio-Rad Laboratories Japan) によるdenaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) に供した。DGGEの実験条件もまたKurisu *et al.* の報告²³⁾に準じた。ただし8%ポリアクリルアミドゲルの変性剤濃度勾配は30-60%とした。また電気泳動後のゲルはSYBR Gold (Molecular Probes) で染色し、UVトランスイルミネータのゲル撮影装置Mupid-Scope WD (Takara Bio) で観察した。

2.5 PCR産物のライゲーション

SBR運転37日目 (day 37) と64日目 (day 64) の汚泥サンプルから抽出したDNA50 ngを鋳型に、*nirK*をターゲットとしたプライマーセットnirK1F-nirK5R¹⁴⁾および*nirS*をターゲットとしたプライマーセットnirS1F-nirS6R¹⁴⁾を用いてPCRを行った。PCRの実験条件は, Braker *et al.* の報告に準じた。ただし温度条件は以下のとおりに設定した (95°C 10分, 94°C 30秒-56°C [1 cycleごとに0.5°C低下] 40秒-72°C 40秒×10 cycle, 94°C 30秒-54°C 40秒-72°C 40秒×25 cycle, 72°C 7分)²⁴⁾。得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動により目的の塩基長であることを確認した後、Wizard DNA Clean-Up System (Promega) により精製を行った。そしてQIAGEN PCR Cloning kit (QIAGEN) により精製物のライゲーションを行い、反応物を-20°Cで冷凍保存した。なおライゲーションの条件は、キット付属のプロトコルに従った。

2.6 形質転換と塩基配列の解読

ライゲーション反応物による形質転換、および塩基配列の解読は、タカラバイオ㈱に委託した (http://bio.takara.co.jp/catalog/catalog_d.asp?C_ID=C1653)。nirKおよびnirSのシーケンシング反応におけるプライマーには、PCRで使用したnirK1FおよびnirS1Fを指定した。解読した塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の提供するプログラ

ムBlastに供し、相同性検索を行った。またDDBJの提供するプログラムClustal Wにより多重アライメントにも供し、Neighbor-joining法により系統樹を作成した。

2.7 塩基配列の登録

解読した全ての塩基配列はDDBJに登録した。アクセッション番号はAB296303-AB296355である。

2.8 real-time PCR法

汚泥サンプルから抽出したDNA 5ngに含まれる*nirK*と*nirS*の遺伝子数をreal-time PCR装置MX3005P (Stratagene)により定量した。プライマーセットには*nirK*1F-5Rおよび*nirS*1F-6Rを使用し、検出方法にはSYBR Green Iを使用したインターカーレーター法を用いた。PCRの温度条件はPCR-cloning法と同様とした。またPCR反応液にはSYBR Premix Ex TaqTM (Takara Bio)を使用し、反応液の組成はSYBR Premix Ex TaqTMのプロトコルに従った。なお絶対定量のための外部標準サンプルは、ライゲーション反応に供した精製済みのPCR産物より調製した。まず同産物のDNA濃度を分光光度計 U-2000A (日立)により測定し、以下の式(2)より産物中の*nirK*, *nirS*のコピー数を算出した²⁵⁾。次に算出したコピー数を元に上記産物を希釈し、10¹~10⁶ copies・μl⁻¹の溶液(外部標準サンプル)を調製した。

$$\text{コピー数}(\text{copies} \cdot \mu\text{l}^{-1}) = \frac{\text{DNA濃度}(\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}) \times 10^9 \times 6.02 \times 10^{23}(\text{copies})}{\text{塩基長}(\text{bp}) \times 660(\text{g} \cdot \text{bp}^{-1})} \quad (2)$$

3. 結果

3.1 SBRの脱窒速度の変化

SBRの脱窒速度(mg-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹)を運転7日目(day7)以降、5~12日間隔で測定した。ただし運転前半39日間(day39まで)の電子受容体はNO₃⁻であり、運転後半25日間(day40からday64まで)の電子受容体はNO₂⁻である。Fig. 2に測定結果を示す。Fig. 2より、day19まではほぼ0 mg-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹であった脱窒速度が、その12日後(day31)には40 mg-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹程度に上昇したことがわかる。しかし添加する電子受容体をNaNO₃からNaNO₂に切り替えた後の測定(day45)では、脱窒速度は20 mg-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹程度であった。その7日後のday52では、脱窒速度は50 mg-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹程度まで上昇し、以降day64まで速度を維持した。上記一連の脱窒速度の変化は、運転前半ではメタノールによる馴致に30日程要したこと、そして運転後半ではNO₂⁻による馴致に10日程要したことを示す結果であった。

3.2 *nirK*と*nirS*の増減

Fig. 2にはまた、real-time PCR法により測定した亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirK*, *nirS*)数の増減を示した。なおここで記す遺伝子数は、SBR内の活性汚泥から抽出したDNA1ng当たりの遺伝子数である。Fig. 2より、*nirK*の遺伝子数は

Fig. 2 SBR denitrification rates and abundance of *nir*.

day19で約5,000 copiesを示した以外、運転期間を通して2,000 copies前後で比較的安定していた。一方*nirS*の遺伝子数は、day19で約10,000 copiesを示して以降、day64までに2,000 copies程度まで低下を続けた。その結果*nirK*と*nirS*の遺伝子数の差は、day19では6,000 copies程度あったにもかかわらず、運転終了時(day64)には1,000 copies程度となった。なお*nirK*, *nirS*ともに、電子受容体の切り替えに伴う、遺伝子数の急激な変化は確認できなかった。

3.3 16S rRNA geneのDGGE解析

SBR内の真正細菌群集の変化を確認するため、real-time PCR法に供したのと同じDNAに対し、16S rRNA geneのDGGE解析を行った(Fig. 3)。Fig. 3ではday31とday37, day57とday64において、バンドパターンが類似していた。一方day37とday64ではバンドパターンが異なった。この結果は、汚泥中の細菌群集が、NO₃⁻で馴致した運転前半で一度安定し、電子受容体をNO₂⁻に変えた運転後半では、前半とは異なる構造に安定したことを示唆するものであった。

3.4 *nirK*と*nirS*のクローン解析

NO₃⁻とNO₂⁻で馴致した汚泥の脱窒細菌群集を細菌が保有するNO₂⁻還元酵素のアミノ酸配列で比較するため、day37とday64に採取した2つの汚泥サンプル(D37, D64)に対し、*nirK*, *nirS*のクローン解析を行った。アミノ酸配列(*nirK*:137残基, *nirS*:194-199残基)に基づくクローンライブラリーをFig. 4に示す。まず*nirK*については、D37, D64のサンプルより、それぞれ35, 42クローンを解析した。その結果、D37, D64のサンプルからそれぞれ、17, 22種類のアミノ酸配列を検出した。そのうち2つ以上のクローンから検出された

Fig. 3 DGGE band patterns of 16S rRNA genes.

Fig. 4 Clone library of *nirK* and *nirS*. The "other" indicates that only one of each clone was found.

Table 1 Partial sequence analysis of *nirK* on the basis of amino acid.

Sequence name	Accession number	Related sequence name	Accession number	Identity
37KA2	AB296304	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	AY916794	137/137
37KA6	AB296306	<i>Pseudomonas</i> sp. G-179	M97294	111/137
37KB6	AB296309	<i>Rhizobium</i> sp. R-26820	AM230867	125/137
64KA8	AB296324	<i>Alcaligenes</i> sp.	EF202175	118/137
64KA12	AB296327	<i>Alcaligenes</i> sp.	EF202175	119/137
64KB8	AB296328	<i>Alcaligenes</i> sp.	EF202175	122/137

Table 2 Partial sequence analysis of *nirS* on the basis of amino acid.

Sequence name	Accession number	Related sequence name	Accession number	Identity
37SA7	AB296343	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	CP000089	173/198
37SA10	AB296344	<i>Alicyclophilius</i> sp. R-24611	AM230896	191/194
37SB11	AB296346	<i>Azoarcus</i> <i>tolulyticus</i> strain 2FB6	AY078272	178/195

配列は、D37で6種類、D64では7種類であった。またD37、D64の両サンプルに共通な配列は2種類存在した。ただしその2種類の配列が検出されたクローンは、両サンプル共にそれぞれ1つであった。よってNO₃⁻とNO₂⁻で馴致した汚泥から検出される*nirK*アミノ酸配列の9割程度は、一致しないものであった。

一方*nirS*は、D37とD64のサンプルより、それぞれ24、29クローンを解析した。その結果、D37、D64のサンプルからそれぞれ、6、10種類のアミノ酸配列を検出した。そのうち2つ以上のクローンから検出された配列は、D37で3種類、D64では4種類であった。またD37、D64の両サンプルに共通な配列は3種類（37SA7、37SA10、37SB11）存在した（Fig. 4）。3種類の配列を保有するクローンが占める割合は、両サンプルにおいてそれぞれ、37SA7（58%、14%）、37SA10（13%、24%）、37SB11（17%、34%）であった。各クローンが占める割合はサンプル間で異なった。しかし両サンプルに占める3種類のクローンの割合は88%、72%と大きかった。よって電子受容体が異なる環境において、脱窒細菌群集から検出される*nirS*の相違は、*nirK*の相違に比べ小さかったと言える。なおFig. 4において10%以上検出した*nirK*、*nirS*配列については、Table 1、Table 2に既知の近縁な配列を示した。

3.5 *nirK*と*nirS*の系統解析

Fig. 5には*nirK*および*nirS*の系統樹を示した。Fig. 5において、名前が37、64から始まる配列は、それぞれD37、D64のサンプルから検出されたクローンの配列を表す。また配列名の最後に付記した括弧の数字は、検出された同じ配列の数を表している。*nirK*の系統樹ではclusterが大きく2つ（Ⅰ、Ⅱ）に分かれた。clusterⅠには、D37から検出された配列の97%、およびD64から検出された配列の5%が分布した。一方clusterⅡには、D37から検出された配列の3%、およびD64から検出された配列の93%が分布した。以上より脱窒の電子受容体の異なる2つのサンプルでは、検出される*nirK*は配列が9割程度異なるのみならず、その配列が系統的にも大別されることが分かった。他方*nirS*の系統樹では大きなclusterが3つ（Ⅲ-Ⅴ）存在した。clusterⅢ、Ⅳ、Ⅴに

はそれぞれ、D37から検出された配列が21、67、13%の割合で分布した。またD64から検出された配列は、38、14、41%の割合で分布した。D37では、配列37SA7のあるclusterⅣの配列が多く、D64では配列37SA10、37SB11のあるclusterⅢ、Ⅴの配列が多いという傾向であった。以上より脱窒の電子受容体の異なる2つのサンプルでは、検出される*nirS*にも系統的な相違が存在した。しかしながら電子受容体の違いによる遺伝子の分布の違いは、*nirK*に比べ*nirS*のほうが小さかった。

4. 考 察

本研究では実験室規模のSBRを運転し、電子供与体一定のもと、電子受容体の変化に伴う脱窒速度の変化を確認した。Fig. 2に示すとおり、電子受容体をNO₃⁻からNO₂⁻に切り替えると、電子供与体が同一であるにもかかわらず、脱窒速度が40 mg-NO₃⁻-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹程度から20 mg-NO₂⁻-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹程度に低下した。そして切り替えから12日経過したday52以降は、脱窒速度はほぼ50 mg-NO₂⁻-N・g-MLSS⁻¹・h⁻¹を保った。以上の結果は、NO₂⁻馴致後の最大脱窒速度はNO₃⁻馴致後の最大脱窒速度以上であったことを示すものであった。しかし一方で、電子受容体の変化が脱窒速度の一時的な低下を誘引することも示した。Hallin *et al.*はGinig *et al.*のメタノールを電子供与体とした脱窒実験の結果¹³⁾を引用し、脱窒細菌群集のポピュレーションシフトに要す時間が、脱窒速度上昇までのラグタイムになったと述べている¹⁵⁾。先述のとおり、本研究においてもNO₃⁻からNO₂⁻への切り替えに伴い、*nirK*、*nirS*の群集構造の変化があった。よって本研究における脱窒速度上昇までのラグタイム（12日）にも、一因としてNO₂⁻を電子受容体とした脱窒を担う細菌群集が優占するまでに要した時間が関与していたのではないだろうか。

Fig. 2にはまた、real-time PCR法により測定した*nirK*、*nirS*の遺伝子数の増減を示した。両遺伝子数の増減は、脱窒速度の変化に対応してはいなかった。塚本らは、都市下水処理場二次処理水の窒素除去を行う流動床型脱窒素リアクター内の生物膜中の*nirS*の量（copies・ng⁻¹-total DNA）と汚泥の脱窒比活性（g-NOx-N・kg-SS⁻¹・h⁻¹）との関係をまとめている¹⁶⁾。リアクター運転経過に伴う両者の増減の挙動は、実によく対応するものであった。本研究と塚本らの研究においては、*nirS*のPCRに使用したプライマー、*nirS*定量の単位、脱窒活性の単位が同一であった。しかし本研究では*nirS*の定量結果と脱窒活性との間に関連を見出せなかった。一方本研究では塚本らの研究と異なり、PCRによる*nirK*の増幅が可能であった。しかしその*nirK*の定量結果も、脱窒活性との関連を確認できるものではなかった。本研究で*nir*の定量結果と脱窒活性との間に関連がなかった原因の1つとして、使用したPCRのプライマーが、本実験系の重要な*nir*を増幅できなかった可能性がある。使用したBraker *et al.*のプライマー¹⁴⁾は、汎用されるプライマーである一方、*nir*の多様性を網羅したデザインでないと指摘する報告もある^{12,26)}。しかしながらこの説明は、Braker *et al.*のプライマー¹⁴⁾が、脱窒活性と関連のない*nir*のみを特異的に増幅した仮定に基づくものである。そこで別の原因として、脱窒細菌群集構造の変化による影響を考えた。Fig. 2において脱窒速度が増大したday19-day31、およびday45-day57は、Fig. 3より真正細菌群集構造にも変化が生じた期間であること

Fig. 5 Phylogenetic analysis of *nirK* and *nirS* by the neighbor-joining method. The left figure is composed of partial *nirK* sequences on the basis of 137 amino acids, and the right figure is composed of partial *nirS* sequences on the basis of 194-199 amino acids. Sequences obtained from this study are shown in black, and the sequence name “37” and “64” indicate samples D37 and D64 respectively. The number of identical sequences obtained from the same sample and another different sample are shown in parentheses in black and grey respectively. Scale bar represents a difference of 10 amino acids per 100. Bootstrap values >750 and in the range of 500-750 are indicated at the nodes with closed circle and open circle respectively.

が推測できる。仮にday19-day31, およびday45-day57の各期間において, SBR内に存在する脱窒細菌の総数は減少したにも関わらず, 群集構造はメタノールを電子供与体とした脱窒, およびNO₂⁻を電子受容体とした脱窒に高い活性を示すものにそれぞれ変化したならば, *nirK*, *nirS*の遺伝子量の変化は脱窒活性の指標とはならなかったはずである。これはつまりBraker *et al.*のプライマー¹⁴⁾が, 脱窒活性と関連のある*nir*と無い*nir*の両方を増幅したために, *nir*全体の定量結果から脱窒活性との関連を見出せなかったのではなにかという推察である。

最後に本研究の目的は, 脱窒の電子受容体としてNO₂⁻, 電子供与体として主にメタノールを利用する脱窒細菌群集について調べることであった。そしてまた, 電子受容体としてNO₃⁻を利用する脱窒細菌群集と比較することであった。Fig. 5には, 本研究において検出した*nirK*, *nirS*のアミノ酸配列のほか, Osaka *et al.*により報告されたメタノールの脱窒汚泥から検出された配列 (*nirK*: K-M1, K-M2, K-M4, *nirS*: S-M1, S-M2, S-M3, S-M4, S-M5)¹²⁾を示した。Osaka *et al.*の配列は, 安定同位体¹³Cのメタノールを基質として与え, 脱窒汚泥から抽出した¹³Cを含むDNAより検出されたものであった。Fig. 5において, Osaka *et al.*の配列の多くはcluster I, IVに分布した。同clusterは, 本研究にお

いてNO₃⁻を電子受容体としたD37のサンプルから検出された配列が多く分布するclusterであった。本研究では, 脱窒汚泥から抽出した全てのDNAを解析しており, メタノールを炭素源として利用した細菌のみを標的とした解析ではなかった。しかしながらD37のサンプルより得られた配列の多くは, 系統樹上でOsaka *et al.*の¹³Cを含むDNAの配列と同じclusterに属した。一方NO₂⁻を電子受容体としたD64のサンプルより得られた配列は, その多くがcluster II, III, Vに分布した。以上よりcluster I ~ Vにおける配列の分布は, 電子受容体の種類に依存したものではないかと推察する。メタノールを電子供与体とする脱窒系においては, 活性汚泥の*nirK*, *nirS*の配列を調べることで, NO₃⁻, NO₂⁻に対する脱窒活性を把握できる可能性もあるだろう。

5. ま と め

本研究では, メタノールを主な電子供与体, NO₃⁻またはNO₂⁻を電子受容体とした実験室規模の脱窒リアクターを運転した。そしてリアクターの脱窒速度の測定, およびリアクター内の16S rRNA gene, *nirK*, *nirS*の群集解析を行い, 電子受容体がNO₃⁻の場合とNO₂⁻の場合とで得られた結果を比較した。以下に同脱窒リアクターの解析において得られた知見をまとめる。

- 1) 電子受容体を NO_3^- または NO_2^- としたいずれの場合でも、 $40 \text{ mg-N} \cdot \text{g-MLSS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 以上の脱窒速度を得た。
- 2) 電子受容体を NO_3^- から NO_2^- に切り替えると、脱窒速度が上昇するまでに12日程のラグタイムが生じた。
- 3) 活性汚泥から検出される $nirK$, $nirS$ は、電子受容体を NO_3^- または NO_2^- とした場合で、系統的に異なった。
- 4) 脱窒速度の増減は、活性汚泥中の $nirK$, $nirS$ コピー数の増減とは一致しなかった。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金（若手研究（B）課題番号（17710059）、基盤研究（B）課題番号（18310054））の援助を受けて遂行したものである。また実験で使用した活性汚泥は、横浜市環境創造局環境施設部神奈川水再生センターの協力を得て入手したものである。ここに記して、感謝の意を表する。

（原稿受付 2007年5月11日）

（原稿受理 2008年3月19日）

参考文献

- 1) Manoharan, R., Liptak, S., Parkinson, P., Mavinic, D. and Randall, C. W. (1989) Denitrification of a high ammonia leachate using an external carbon source. *Environ. Tech.*, **10**, 701-706.
- 2) Winter, C. T. (1989) The role of acetate in denitrification and biological phosphate removal in modified Bardenpho systems. *Water Sci. Technol.*, **21**(4-5), 373-385.
- 3) Carley, B. N. and Mavinic, D. S. (1991) The effects of external carbon loading on nitrification and denitrification of a high-ammonia landfill leachate. *Res. J. Wat. Pollut. C. Fed.*, **63**, 51-59.
- 4) Nyberg, U., Aspegren, H., Andersson, B., Jansen la, J. C. and Villadsen, I. S. (1992) Full-scale application of nitrogen removal with methanol as carbon source. *Water Sci. Technol.*, **26**(5-6), 1077-1086.
- 5) Nyberg, U., Andersson, B. and Aspegren, H. (1996) Long-term experiences with external carbon sources for nitrogen removal. *Water Sci. Technol.*, **33**(12), 109-116.
- 6) Hallin, S. and Pell, M. (1998) Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge. *Water Res.*, **32**, 13-18.
- 7) Tam, N. F. Y., Leung, G. L. W. and Wong, Y. S. (1994) The effects of external carbon loading on nitrogen removal in sequencing batch reactors. *Water Sci. Technol.*, **30**(6), 73-81.
- 8) Hallin, S., Lindberg, C. F., Pell, M., Plaza, E. and Carlsson, B. (1996) Microbial adaption, process performance and a suggested control strategy in a pre-denitrifying system with ethanol dosage. *Water Sci. Technol.*, **34**(1-2), 91-99.
- 9) Purtschert, I., Siegrist, H. and Gujer, W. (1996) Enhanced denitrification with methanol at WWTP Zurich-Werdholzli. *Water Sci. Technol.*, **33**(12), 117-126.
- 10) Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H. and Schleifer, K. H. (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methano-fed biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4329-4339.
- 11) Lemmer, H., Zaglauer, A., Neef, A., Meier, H. and Amann, R. (1997) Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. 2. Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Res.* **31**, 1903-1908.
- 12) Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N. and Inamori, Y. (2006) Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. *Microb. Ecol.*, **52**, 253-266.
- 13) Ginige, M. P., Hugenholtz, P., Daims, H., Wagner, M., Keller, J. and Blackall, L. L. (2004) Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 588-596.
- 14) Braker, G., Fesefeldt, A. and Witzel, K.-P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3769-3775.
- 15) Hallin, S., Throbäck, I. N., Dicksved, J. and Pell, M. (2006) Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5445-5452.
- 16) 塚本雄介, 荒木信夫, 長野晃弘, 山口隆司, 原田秀樹 (2004) 都市下水処理流動床型リアクターにおける優占脱窒素細菌の特定と機能遺伝子の定量, 水環境学会誌, **27**, 791-796.
- 17) Bae, W., Baek, S., Chung, J. and Lee, Y. (2002) Optimal operation factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation*, **12**(5), 359-366.
- 18) Peng, Y. Z., Chen, Y., Peng, C. Y., Liu, M., Wang, S. Y., Song, X. Q. and Cui, Y. W. (2004) Nitrite accumulation by aeration controlled in batch reactors treating domestic wastewater. *Water Sci. Technol.*, **50**(10), 35-43.
- 19) Ruiz, G., Jeison, D., Rubilar, O., Ciudad, G. and Chamy, R. (2006) Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresour. Technol.* **97**, 330-335.
- 20) Martiensen, M., and Schöps, R. (1997) Biological treatment of leachate from solid waste landfill sites – alterations in the bacterial community during the denitrification process. *Water Res.*, **31**, 1164-1170.
- 21) Bond, P. L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J. and Blackall, L. L. (1999) Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4077-4084.
- 22) Muyzer G., De Waal E. C. and Uitterlinden A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695-700
- 23) Kurisu, F., Satoh, H., Mino, T. and Matsuo, T. (2002) Microbial community analysis of thermophilic contact oxidation process by using ribosomal RNA approaches and the quinone profile method. *Water Res.*, **36**, 429-438.
- 24) Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H. and Tiedje, J.M. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2096-2104.
- 25) Whelan, J. A., Russell, N. B. and Whelan, M. A. (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods*, **278**, 261-269.
- 26) Heylen, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. and De Vos, P. (2006) The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers *Environ. Microbiol.* **8**, 2012-2021.