



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ANAMMOX反応を利用した窒素除去リアクターの開発と群集構造解析
Author(s)	金田一, 智規; 尾崎, 則篤; 對馬, 育夫 他
Description	第13回衛生工学シンポジウム (平成17年11月17日 (木) -18日 (金) 北海道大学クラーク会館) . 一般セッション . 6 水処理 . 6-4
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 13, 195-198
Issue Date	2005-11-16
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/1365
Type	departmental bulletin paper
File Information	6-4_p195-198.pdf



6-4 ANAMMOX 反応を利用した窒素除去リアクターの開発と群集構造解析

○金田一智規、尾崎則篤（広島大学）
對馬育夫、小笠原雄二、岡部聡（北海道大学）

1. はじめに

閉鎖性水域の富栄養化防止、地下水の硝酸塩汚染への対策の観点から、排水・環境水中からの効率的な窒素除去技術の確立が求められている。現在、微生物反応を利用した生物学的窒素除去プロセスが一般的に用いられているが、エネルギーコストや敷地面積の面から、より効率的なプロセスが求められている。近年、嫌気性アンモニア酸化（ANAMMOX）反応という新たな代謝経路を持つ細菌が発見され、その効率の面から ANAMMOX 反応を導入した窒素除去プロセスが注目されている。

ANAMMOX 反応は嫌気性条件下でアンモニアを電子供与体、亜硝酸を電子受容体として窒素ガスへ変換する反応 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 \uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$) である。酸素のない条件下でアンモニア性窒素を酸化する細菌はそれまで見つかっておらず、嫌気性アンモニア酸化反応（ANAerobic AMMonium OXidation）と命名された。ANAMMOX 反応を担う細菌は独立栄養細菌で比増殖速度が極めて小さく（倍加時間は 11 日）、培養が非常に困難であるため、集積培養技術が十分に確立していない。ANAMMOX 細菌の純粋培養系は現在までに得られていないが、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析から、*Planctomycetales* 目に属する細菌であり、*Candidatus Brocadia anammoxidans* をはじめとする 3 属 5 種の存在が示唆されている¹⁾。

ANAMMOX 反応を排水処理の分野へ適用した場合、従来の窒素除去プロセスと比べて省エネルギーかつ経済的なプロセスが達成できるものとして期待されている。これまでに報告されている ANAMMOX 細菌の集積培養は試行錯誤的に行われており、集積培養の報告例は極めて少ないのが現状である。したがって、これまでに ANAMMOX 細菌を用いた

窒素除去プロセスの実用化の報告はない。ANAMMOX 反応を用いた窒素除去プロセスを構築するためには、リアクター内に ANAMMOX 細菌を高濃度に保持することや、リアクターの迅速なスタートアップ技術を確立することが重要となる。

本研究では植種汚泥中の ANAMMOX 細菌の存在量に着目し、Real-Time PCR 法を用いて定量することで、ANAMMOX リアクターの迅速なスタートアップに適した植種汚泥を探索し、この植種汚泥を用いた ANAMMOX 生物膜リアクターの構築を目的とした。さらに、この生物膜リアクター内に存在する微生物群集に対して FISH 法による検出や 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。

2. 実験方法

培養が長期間にわたる ANAMMOX 細菌の培養を成功させるためには、適切な植種源を選定することが不可欠である。適切な植種源は ANAMMOX 細菌の存在量とその環境によって評価した。まず、様々な排水処理施設から採取した汚泥に ANAMMOX 細菌に特異的なプライマーセットを用いて Real-Time PCR 法²⁾を適用し、ANAMMOX 細菌由来の DNA 濃度を定量することで、存在量の指標とした。さらに、ANAMMOX 細菌は有機物による活性阻害の可能性があるため、流入 C/N も植種汚泥の選定の評価項目に加えた。

培養が困難な ANAMMOX 細菌を窒素除去プロセスとして利用する場合には、効率よくリアクター内に細菌を保持することが重要である。既往の報告では ANAMMOX 細菌は浮遊増殖系では培養が困難であり、生物膜系のほうが適していると報告されているため³⁾、本実験においても生物膜リアクターを用いた。生物膜リアクターは図 1 に示すような不織布

を生物膜担体とした上向流カラムリアクターを用いた。カラムAは選定した植種汚泥を不織布に付着させて培地を通水し、カラムBはANAMMOX活性が見られた後のカラムAの流出水（ANAMMOX細菌を含んでいる）を植種源として用いて培養を行った。リアクター容積は 0.8 L、生物膜表面積は 500 cm²、HRTは 3-8 h、担体充填率は 14%である。人工無機培地はvan de Graaf⁴⁾らの培地を参考にし、DOを 0.5 mg/L以下に保ちながら 37°Cの条件で連続通水した。培地はアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素濃度のみを段階的に増加させた。各窒素濃度はイオンクロマトグラフ法により測定した。

生物膜リアクター内に存在する細菌相を把握するために、分子生物学的手法により解析した。まず、ANAMMOX 細菌に特異的なプローブを用いた FISH 法による検出を試みた。さらに、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。系統解析では全細菌を対象とした Bac11f-1492r と ANAMMOX 細菌が属する *Planctomycetales* 目を対象とした Pla46f-1492r のプライマーセットを用いてクローニングを行い、得られた塩基配列の相同性検索を行うとともに、Neighbor-joining 法により系統樹を作成した。

3. 結果と考察

3.1 植種汚泥の選定と生物膜リアクターによる ANAMMOX 細菌の集積培養

図 2 に汚泥乾燥重量 1 gあたりに存在する ANAMMOX細菌のDNA量と処理施設の流入 C/Nを示す。解析の結果、広島県A処理施設のANAMMOX細菌のDNA量が最も大きく、かつ流入C/Nも低かったために広島県A処理施設の汚泥をカラムAの植種汚泥として用いた。この汚泥を不織布担体に付着させ、基質中のアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素濃度をともに 15 mg-N/Lに設定し運転した（図 3）。運転日数が 40 日を越えたあたりからアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素の同時除去が確認され、60 日目の窒素除去率は 90%

に達した。50 日目以降のアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素除去量、硝酸性窒素生成量の比は既往の研究⁴⁾と同様に、1 : 1.2 : 0.21であったことや、生物膜の一部が赤褐色に変化したことからANAMMOX細菌の集積が達成されたと考えられる。流入窒素負荷を 70 日目から段階的に上げたところ、アンモニア性窒素および亜硝酸性窒素ともに 80%以上の除去率を維持しながら順調に窒素除去速度が上昇した。しかしながら、190 日目には突然のANAMMOX活性の低下が見られた。これはリアクター内への酸素の混入が原因であると考えられる。活性の低下後、流入窒素負荷を下げたところ 10 日程度で回復し、260 日目には最大窒素除去速度 3.0 kg-N m⁻³ day⁻¹を達成した。

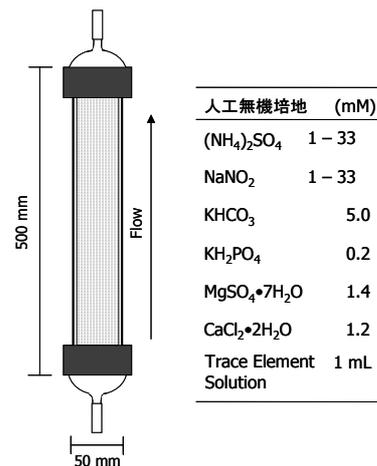


図 1 カラムリアクターの概要

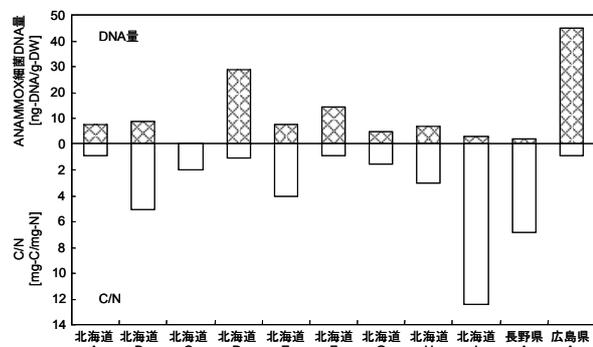


図 2 汚泥中の ANAMMOX 細菌の DNA 量と流入 C/N

カラムAの運転開始から 96 日目の流出水を 2L採取し、カラムBに植種源として通水した (図 4)。運転開始から 85 日目で ANAMMOX 反応が確認された。その後カラムAと同様に流入窒素負荷を段階的に上げたところ、窒素除去速度の上昇が見られた。除去率は 80%程度を維持しながら、運転開始から 223 日目には最大窒素除去速度 $8.9 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成している。このことから、ANAMMOX 反応を達成した生物膜リアクターの流出水を植種源として用いた場合でも、時間はかかるものの ANAMMOX リアクターの立ち上げが可能であることを示唆している。

3.2 生物膜内の微生物群集構造解析

生物膜リアクター内に存在する細菌群集を解析するために、分子生物学的手法を用いた。まず、カラム A の赤褐色に変化した汚泥を採取し、FISH 法により ANAMMOX 細菌の検出を試みた。その結果、ANAMMOX 細菌を対象とする Amx820 プローブで標識される細菌が検出され (図 5)、これらは ANAMMOX 細菌と思われる形態をしていた。なお、結果には示していないが、ANAMMOX 細菌が属する *Planctomycetales* 目に特異的なプローブ Pla46 を用いた FISH においても同様の蛍光を示した。このことから、生物膜内には ANAMMOX 細菌が存在していることが確認された。

16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析の結果を表 1 に、その系統樹を図 6 に示す。ANAMMOX 細菌に近縁なクローン BU13 とクローン PU1 はお互いに 99%以上の相同性があり、同じ細菌を検出したものと考えられる。これらの検出されたクローンは *Candidatus Brocadia anammoxidans* に近縁であったが、その相同性は 95%程度であった。一般に 97%以上の相同性があれば同種であると考えられるため、これらのクローンはこれまでに排水処理系から報告されている二種類の ANAMMOX 細菌とは異なる種である可能性が示唆された。

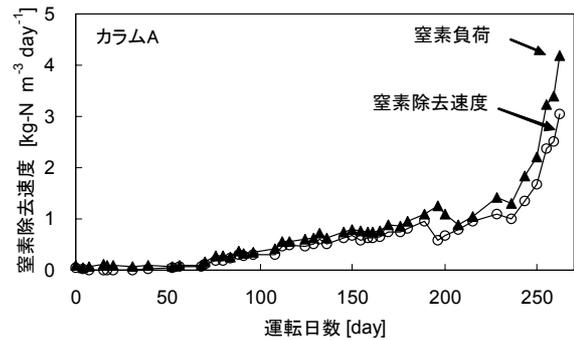


図 3 生物膜リアクターAの窒素除去速度の変化

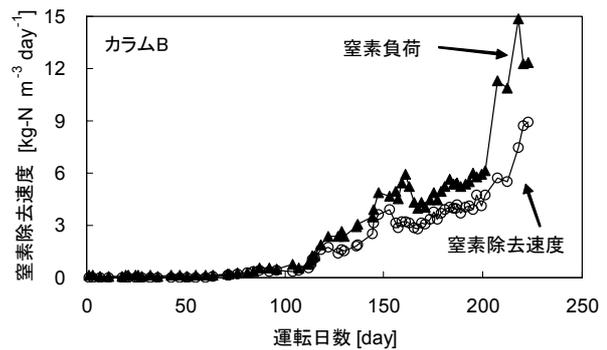


図 4 生物膜リアクターBの窒素除去速度の変化

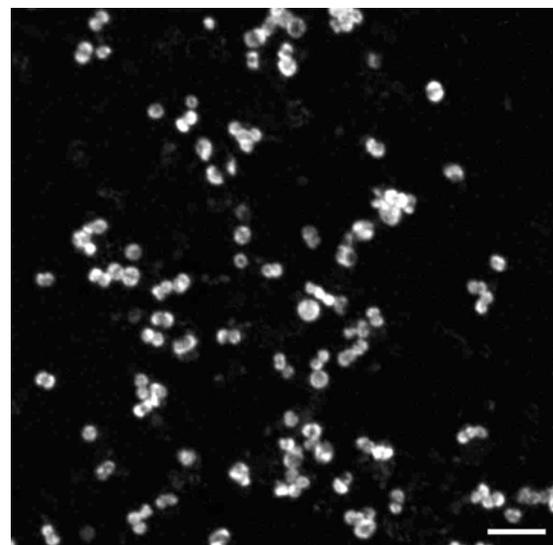


図 5 Amx820 プローブによる FISH 画像
スケールバーは $10 \mu\text{m}$

Pla46f-1492r のプライマーセットで検出されたクローン (PU) は全てが ANAMMOX 細菌に近縁なクローンであった。一方、Bac11f-1492r プライマーセットで検出され

たクローン (BU) のうち ANAMMOX 細菌に近縁なクローンは全体の 60% を占め、残りは *Betaproteobacteria* などが占めた。ANAMMOX 細菌以外のこれらの細菌は初期に植種汚泥中に存在していた細菌であり、ANAMMOX 細菌を由来とする有機物 (菌体成分や代謝産物) を利用して生物膜内に共存していると考えられる。今後はこれらの細菌の生物膜内での構造や機能を明らかにし、ANAMMOX 細菌との生物膜内の相互作用について解析を行う。

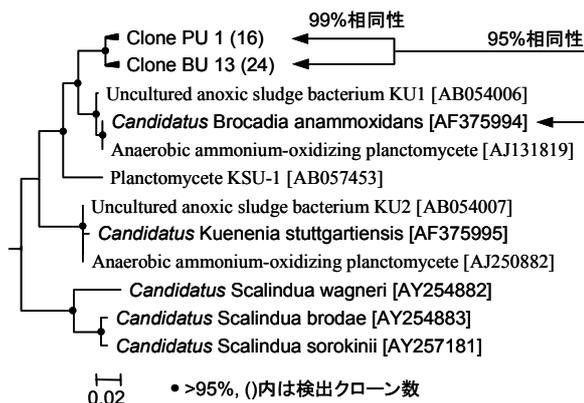


図 6 検出されたクローンの系統樹

表 1 各プライマーセットで検出された生物膜内のクローン

primer set	clone	frequency	similarity	species
Bac11f & 1492r	BU11	12/41 (29%)	93-98%	Uncultured anoxic sludge bacterium KU1 (AB054006)
	BU2	5/41 (13%)	94-97%	Uncultured Planctomycetales (AB176696)
	BU13	5/41 (13%)	93-95%	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> (AF375994)
	BU14	2/41 (5%)	93%	Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete (AJ131819)
	BU7	4/41 (11%)	98-99%	Uncultured bacterium (AY328574) (betaproteobacteria)
	BU29	3/41 (8%)	98%	<i>Thauera</i> sp. (AJ315678) (betaproteobacteria)
	BU44	2/41 (5%)	95%	Uncultured beta proteobacterium (AY118150)
	BU24	1/41 (2%)	98%	Beta proteobacterium (AB194096)
	BU4	1/41 (2%)	89%	Uncultured bacterium (AY328608) (betaproteobacteria)
	BU25	1/41 (2%)	97%	Uncultured bacterium (AY328712) (betaproteobacteria)
	BU16	1/41 (2%)	98%	Uncultured soil bacterium (AY699582) (betaproteobacteria)
	BU18	1/41 (2%)	91%	Uncultured alpha proteobacterium (AJ318133)
	BU33	1/41 (2%)	95%	<i>Bacteriovorax</i> sp. (AY294218) (delta-proteobacteria)
	BU20	1/41 (2%)	88%	Uncultured <i>Hydrogenothermus</i> sp. (AY861789) (Aquificae)
	BU1	1/41 (2%)	84%	Uncultured Acidimicrobiales bacterium (AY882671) (Actinobacteria)
Pla46f & 1492r	PU1	15/16 (94%)	94-95%	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> (AF375994)
	PU5	1/16 (6%)	97%	Uncultured anoxic sludge bacterium KU1 (AB054006)

4. まとめ

本研究では植種汚泥中の ANAMMOX 細菌の存在量に着目し、Real-Time PCR 法によって ANAMMOX 細菌 DNA 量を定量し、処理場の C/N を考慮して適切な植種源を選定した。選定した汚泥を植種源として生物膜リアクターの立ち上げを試みたところ、運転開始から 40 日ほどで ANAMMOX 反応が見られ、その後、 $3.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ の窒素除去速度を達成できた。また、この流出水を別のカラムリアクターに植種源として通水しても同様の ANAMMOX 反応がみられ、 $8.9 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ の最大窒素除去速度を達成できた。系統解析を行った結果、ANAMMOX 細菌に近縁なクローンが検出され、これまでに報告されている ANAMMOX 細菌とは異なる種である

可能性が示唆された。また、生物膜内には ANAMMOX 細菌と共存する細菌の存在が示唆され、これらの細菌の構造や機能については今後の課題である。

参考文献

- 1) 藤井隆夫 (2004) 微生物学的側面からみた anammox, 水環境学会誌, 27, 448-452.
- 2) 對馬ら, (2004) ANAMMOX 集積汚泥の微生物構造および機能解析, 第 38 回水環境学会講演集, 370.
- 3) 古川憲治 (2004) 嫌気性アンモニア酸化 (anammox) の発見とその後の研究開発動向, 水環境学会誌, 27, 442-447.
- 4) van de Graaf et al., (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142, 2187-2196.