

生物膜リアクターによる ANAMMOX 細菌の集積培養と群集構造の解析

広島大学大学院 正会員 ○金田一 智規
 広島大学大学院 正会員 尾崎 則篤
 北海道大学大学院 小笠原 雄二
 北海道大学大学院 對馬 育夫
 北海道大学大学院 正会員 岡部 聡

1. はじめに

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であり、排水処理の分野への適用が注目されている。しかしながら、ANAMMOX 反応を担う細菌は独立栄養細菌であり、比増殖速度が小さく培養が困難であるため、ANAMMOX 細菌の集積培養技術の確立やリアクター内に高濃度に菌体を保持することが重要となる。本研究では生物膜リアクターを用いて ANAMMOX 細菌の集積培養を試みた。また、分子生物学的手法を用いて集積した ANAMMOX 細菌群集を解析した。

2. 実験方法

生物膜リアクターとして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。リアクター容積は 0.8 L、生物膜表面積は 500 cm²、HRT は 8 h、担体充填率は 14% である。人工無機培地は van de Graaf¹⁾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 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。

植種汚泥は、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⁾により抽出 DNA 量あたりの ANAMMOX 細菌 DNA 量を定量し、その定量値と施設の運転性や処理性を考慮して選定した。

リアクター流出水を対象として、FISH 法および 16S rDNA に基づく系統解析により解析を行った。FISH 法では二種類の ANAMMOX 細菌に特異的なプローブ Amx820 (TRITC 標識) を用いた。系統解析では全細菌を対象とした 11f-1492r および *Planctomycetales* を対象とした Pla46f-1492r のプライマーセットを用い、NJ 法により系統樹を作成した。

3. 結果と考察

表 1 に抽出 DNA 1 g あたりに存在する ANAMMOX 細菌の DNA 量を示す。本研究では、広島県 A 処理場の定量値が最も大きく、流入 C/N も低かったために広島県 A 下水処理場の嫌気槽汚泥を生物膜リアクターの植種源として用いた。

表 1 ANAMMOX 細菌の割合と流入 C/N

汚泥採取施設	mg-Amx/ g-totalDNA	流入C/N
北海道Aし尿処理場, 硝化槽汚泥	0.046	12.4
北海道B下水処理場, 活性汚泥	0.069	4.2
北海道C下水処理場, 脱窒槽汚泥	0.079	5.1
長野県A下水処理場, 活性汚泥	0.020	1.9
広島県A下水処理場, 嫌気槽汚泥	0.093	1.2

この汚泥を生物膜に付着させ、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 1 に示すように、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¹⁾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。窒素負荷は図 2 に示すように、70 日目から段階的に上げた。70 日目以降は、窒素負荷を上げた直後は窒素除去率の低下が見られたが、10 日以内に回復し、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することができた。窒素負荷の上昇に伴い、窒素除去速度も上昇し、運転開始から 150 日目には 0.84 kg-N m⁻³ day⁻¹ を達成した。

キーワード 嫌気性アンモニア酸化 (ANAMMOX)、生物膜、分子生物学的手法

連絡先 〒739-8527 広島県東広島市鏡山 1-4-1 広島大学大学院工学研究科 TEL 082-424-5718

運転開始から 90 日目の流出水を対象として、FISH 法および 16S rDNA に基づく系統解析を行った。

FISH 法の結果では、Amx820 プローブで標識される細菌が検出され、DAPI の蛍光に対してほとんどがこのプローブで検出される細菌であった。Amx820 プローブで検出される細菌は図 3 に示すように、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。今回はリアクターの流出水を対象としたが、流出する細菌のほとんどが Amx820 で検出される細菌であったことから、生物膜内にも ANAMMOX 反応を担う細菌が多く存在していることが示唆される。

系統解析の結果を図 4 に示す。11f-1492r (BacUni) および Pla46f-1492r (PlaUni) のプライマーセットで検出されたクローンはお互いに 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。これらの両プライマーセットで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%であった。したがって、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も示唆された。Pla46f-1492r で検出されたクローンは全てが ANAMMOX 細菌に近縁なクローンであった。一方、11f-1492r で検出されたクローンのうち ANAMMOX 細菌に近縁なクローンは全体の 60%を占め、残りは β -*Proteobacteria* などが占めた。これらはもともと活性汚泥中に存在していた細菌であると思われる。

4. まとめ

ANAMMOX 細菌が多く存在する可能性のある汚泥を植種源としてリアクターを立ち上げた結果、運転開始から 50 日ほどで ANAMMOX 反応が見られた。FISH 法や系統解析により流出水を解析した結果、*Planctomycetales* 目に属する ANAMMOX 細菌に近縁な細菌がリアクター内の ANAMMOX 反応を担っており、リアクター内に高濃度に集積されていると考えられた。今後はさらに窒素負荷を増加させるとともに、流出水から ANAMMOX 細菌の分離を試みる。

参考文献

- 1) van de Graaf et al, (1996) Microbiology, 142, 2187-2196.
- 2) 對馬ら, (2003) 第 38 回水環境学会講演集, 368.

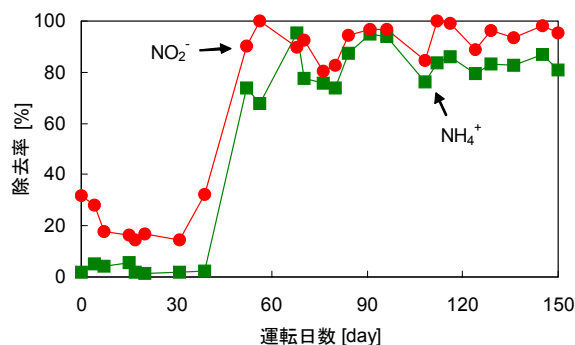


図 1 生物膜リアクターの除去率の変化

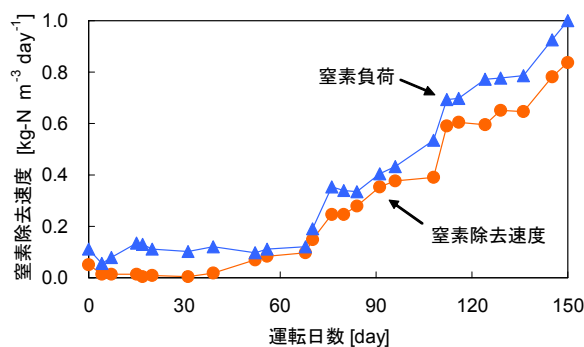


図 2 生物膜リアクターの窒素除去速度の変化

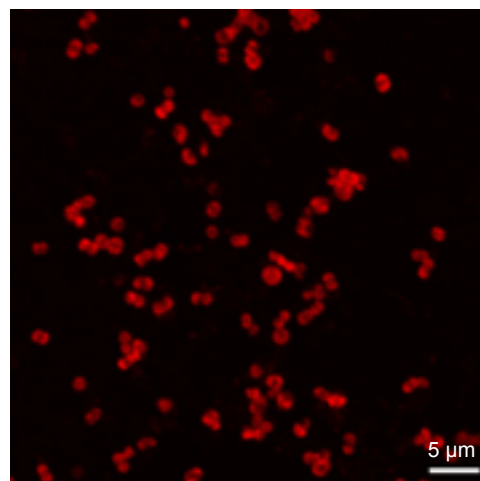


図 3 Amx820 プローブによる FISH 画像

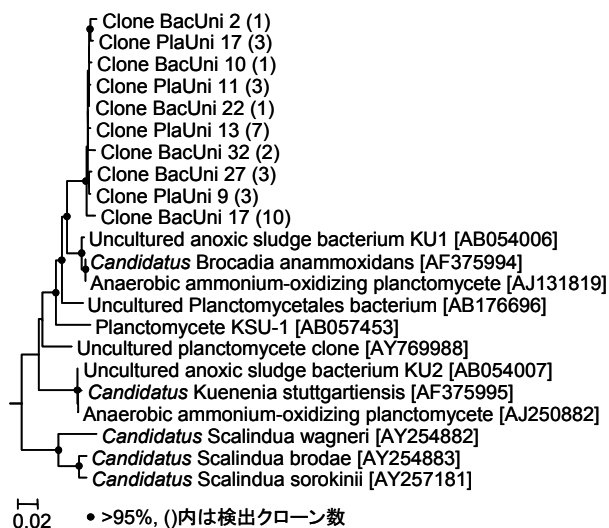


図 4 検出されたクローンの系統樹