

## ANAMMOX リアクター内における微生物間の相互関係の解析

広島大学大学院 学生会員 ○百合 昭太  
 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

## 1. はじめに

ANAMMOX反応は、 $(\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O})$ で表される、アンモニア性窒素と亜硝酸性窒素から直接窒素ガスを生成する微生物反応である。このANAMMOX反応は硝化脱窒という従来の窒素除去の代謝経路を大きく短縮するものであるため、省エネルギー型のリアクターとして様々な研究が行われている。既往の研究より、無機人工基質で運転しているANAMMOXリアクター内には有機物を利用する従属栄養細菌が存在しており、ANAMMOX細菌と共存していることが明らかになった。しかしながら、これらの共存細菌がどのようにエネルギーを獲得して生存しているかは十分には解明されていない。そこで本研究では、微生物群集の単位で機能・構造を把握することが可能な分子生物学的手法を用いてANAMMOX細菌群集の解析を行い、リアクター内の細菌間の相互関係を解明することを目的とした。

## 2. 実験方法

## (1) ANAMMOX 細菌の培養

ANAMMOX細菌の培養に適している生物膜リアクターを用いて培養を行った。生物膜リアクターには生物膜担体として園芸用のネットを用い、up-flow式のカラムリアクターを採用した。担体に植種汚泥を付着させ、培地を流入させて培養を開始した。カラムの容積は  $207 \text{ cm}^3$ 、水理的滞留時間(HRT)は 1~2 h、担体表面積は  $117 \text{ cm}^2$ である。溶存酸素濃度が  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ 以下になるように培地を作成し、 $37^\circ\text{C}$ の恒温器内のカラムに連続的に流入させ、培地には人工の無機栄養塩を用いた。そこにアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素を加え、その濃度を段階的に増加させるか、またはHRTを段階的に短縮することによって流入窒素負荷を上昇させた。流入・流出における各態窒素濃度をイオンクロマトグラフィーにより測定し、窒素除去能力の把握を行うとともに窒素除去速

度の向上を目指した。

## (2) 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

運転開始から 145 日目の ANAMMOX リアクター内の細菌群集から DNA を抽出し、全細菌を対象とした Bact11f-Univ1492 のプライマーセットを用いて PCR 増幅し、クローニングを行った。得られたクローンの塩基配列を基に系統樹を作成した。

## (3) MAR-FISH 法

MAR-FISH法とは、放射性同位元素で標識された物質を基質として細菌を培養し、その基質の取り込みを Microautoradiography によって確認し、FISH法によって細菌を同定する手法である。運転中のリアクターより採取した細菌群集を、 $^{14}\text{C}$ で標識された炭酸水素ナトリウム(以下 $^{14}\text{C}$ -炭酸水素ナトリウム)を炭素源として培養し、ANAMMOX細菌を標識した。培養時間は 24 時間(ANAMMOX細菌を標識)と 3 日間(従属栄養細菌を標識)とした。さらに培養を継続することにより、ANAMMOX細菌から由来する細胞成分や代謝産物中の $^{14}\text{C}$ を、共存する従属栄養細菌が利用することで、ANAMMOX細菌→従属栄養細菌といった炭素フローを明らかにすることができる。

## 3. 結果と考察

## (1) 窒素除去速度

図 1 にリアクターの流入窒素負荷、HRT の経時変化とともに窒素除去速度の経時変化を示す。運転開始 17 日目から ANAMMOX 反応と見られるアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の同時除去が確認された。その後、212 日目までは窒素除去速度の継続的な上昇が見られたが、214 日目に急激に低下した。このような窒素除去速度の急激な低下の原因として、生物膜内部に窒素ガスが滞留し、培地が行き届かなくなっていたことが考えられる。この問題はカラムの形状を改良することによって、窒素ガスの滞留を防ぐことが可能となると考えられる。

キーワード 嫌気性アンモニア酸化(ANAMMOX)、窒素除去速度、MAR-FISH 法、従属栄養細菌

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

## (2) 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

得られた系統樹を図2に示す。リアクター内から検出された82個のクローンから、ANAMMOX細菌(46%)の他に、*Chlorobi* (22%)、*Betaproteobacteria* (22%)、*Chloroflexi* (7%)、*Verrucomicrobia* (2%)に属する細菌が検出された。

## (3) MAR-FISH 法

培養24時間、3日間の活性系において図3-1に示すとおり、ANAMMOX細菌による $^{14}\text{C}$ -炭酸水素ナトリウムの取り込みが見られた。それとともに、培養3日間の活性系においてANAMMOX細菌と共存する従属栄養細菌による $^{14}\text{C}$ の取り込みも観察された(図3-2)。しかし、ANAMMOX細菌による炭酸水素ナトリウムの取り込みは多く観察されたのに対して、ANAMMOX細菌由来の有機物質を取り込んだ従属栄養細菌はわずかにしか観察されなかった。これより、共存する従属栄養細菌の存在量がANAMMOX細菌と比べて少ないため(FISH法による構成比は全細菌に対してANAMMOX細菌が約90%)、従属栄養細菌をANAMMOX細菌由来の $^{14}\text{C}$ によって標識することが困難であること、もしくは従属栄養細菌がANAMMOX細菌由来の有機物質を主に異化代謝に用いていたことが考えられる。

## 4. まとめ

リアクター内の細菌群集に $^{14}\text{C}$ -炭酸水素ナトリウムを炭素源として与えた結果、ANAMMOX細菌による $^{14}\text{C}$ -炭酸水素ナトリウムの取り込みと、共存する従属栄養細菌による $^{14}\text{C}$ の取り込みが観察された。これより、ANAMMOX細菌と従属栄養細菌の共存関係は、ANAMMOX細菌の代謝産物もしくは菌体を従属栄養細菌が取り込むという形であることが考えられる。今後はさらに詳しい相互関係を解明する。

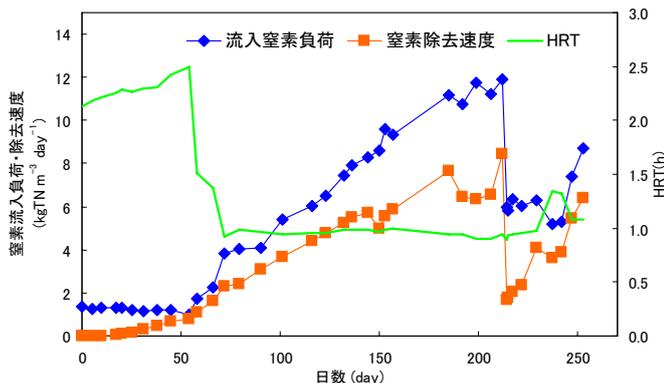


図1 窒素除去速度の経時変化

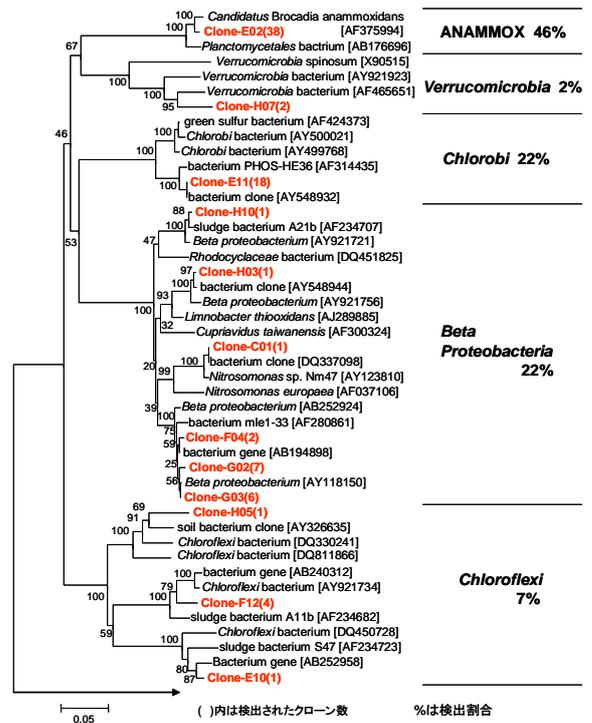
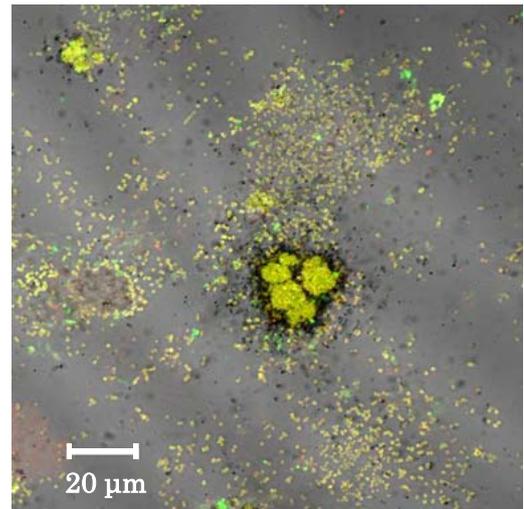
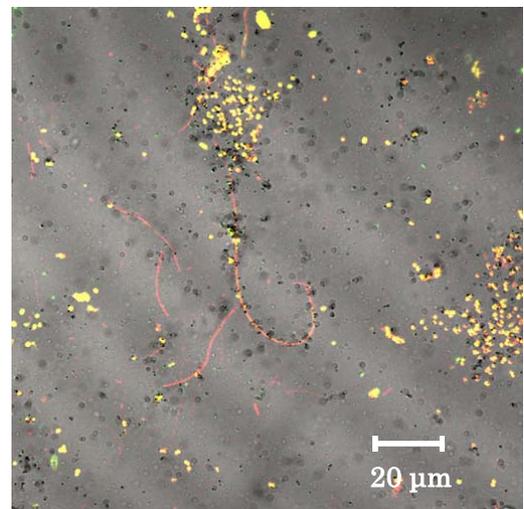


図2 リアクター内に存在する細菌の系統樹

図3-1 ANAMMOX細菌による $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ の取り込み図3-2 従属栄養細菌による $^{14}\text{C}$ の取り込み