

海洋性アナモックス細菌の集積培養と微生物群集構造の解析

広島大学大学院	正会員	○金田一	智規
広島大学大学院	学生会員	栗田	貴宣
和歌山県	非会員	鈴木	裕士
広島大学大学院	正会員	尾崎	則篤
広島大学大学院	正会員	大橋	晶良

1. はじめに

アナモックス細菌は近年発見された新しい窒素代謝経路を持つ細菌であり、この細菌を利用した生物学的窒素除去プロセスは排水からの効率的な窒素除去法として注目されている。アナモックス細菌は海洋でも発見され、アラビア海、黒海、ナミビア沿岸、ペルー沿岸など世界各地で発見されている。また、日本国内でも、英虞湾や大阪湾で採取された試料からもその存在が確認されている。これらの海洋性アナモックス細菌は *Scalindua* 属として提案されているが、系統学的には淡水性のアナモックス細菌よりも多様であり、現在では二種類のグループに分類されることが報告されている¹⁾。これらの海洋性アナモックス細菌の特性を解明することによって、高塩濃度排水の窒素除去や閉鎖性水域での窒素除去への適用または海洋における窒素循環システムの解明につながると考えられる。

本研究では閉鎖性海域である広島湾から採取した底泥を植種源とし、難培養微生物を高濃度に保持できる連続式のアナモックスリアクターを構築することで海洋性アナモックス細菌の集積培養を行うことを目的とした。さらにリアクターの窒素除去性能を把握するとともに、反応に関与する海洋性アナモックス細菌群集の構造解析を行った。

2. 実験方法

(1) 海洋性アナモックスリアクター

生物膜リアクターとして不織布を微生物担体とした上向流のカラムリアクターを用いた。リアクター容積は 56 mL (内径 26 mm、長さ 105 mm)、生物膜表面積は 52.5 cm² である。リアクターは 20℃ に設定した恒温器の中に設置した。海洋性アナモックス細菌

菌の集積培養に用いた培地は人工海水 (シーライフ、マリンテック社製) に van de Graaf²⁾ のアナモックス細菌用の培地を加え、1 時間程度窒素ガスでパージすることで DO を 0.5 mg/L 以下に保ちながらリアクターへ連続通水した。培地中のアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素濃度を増加させるか、HRT を短くすることで窒素流入負荷を段階的に増加させた。初期 HRT は 0.9 時間とした。植種源は広島湾奥部の海田湾の底泥を不織布に付着させ、カラムリアクター内に設置した。窒素濃度はイオンクロマトグラフィーを用いて亜硝酸性窒素、硝酸性窒素の濃度を測定し、アンモニア性窒素濃度は HACH により測定した。得られた濃度と HRT から窒素流入負荷と窒素除去速度を計算した。

(2) 微生物群集構造解析

運転開始から 222 日目にリアクター内のバイオマスを採取し、DNA 抽出を行った。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析に用いたプライマーセットはアナモックス細菌が属する *Planctomycetales* 目を対象とした Pla46f-1390r を用い、得られたクローンの塩基配列をもとに ARB プログラムにより系統樹を作成した。FISH 法で用いたプローブは淡水性のアナモックス細菌を対象とするプローブ Amx820、海洋性のアナモックス細菌を対象とする *Scalindua* 属のプローブ Sca1309 を用いた。

3. 結果と考察

(1) 集積培養結果とリアクターの窒素除去性能

運転開始から 40 日目でアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素の同時除去が見られ、114 日目には亜硝酸性窒素の除去率が 97% に達した (図 1)。流出の亜硝酸性窒素濃度が枯渇し始めた 119 日目にアンモニア性窒

キーワード アナモックス, 海洋性アナモックス細菌, FISH 法, 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

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

素、亜硝酸性窒素の濃度をそれまでの 1.5 倍にした。さらに同様の理由から 126 日目、158 日目にもアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素の濃度を 1.5 倍にした。また、166 日目から 172 日目では流入ポンプのトラブルにより極端に流入窒素負荷が上がってしまったが 172 日目に最大窒素除去速度 $1.15 \text{ kgTN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成した。また、90 日目以降アンモニア性窒素の除去量と亜硝酸性窒素の除去量の比はアナモックス反応の化学量論式³⁾の比 ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- = 1 : 1.32$) に近い値を示したことや、バイオマスの一部が赤褐色に変化したことから、リアクター内では海水通水条件においてもアナモックス反応が起こっており、アナモックス細菌が集積されたと考えられる。

(2) 微生物群集構造解析

図 2 にリアクター内のアナモックス細菌の系統樹を示す。解析できた 93 クローンのうち全てが *Scalindua* 属に分類することができた。Clone husu-a2 や b3 はペルーやナミビア沿岸から得られたクローンに近縁であった (98% の相同性)。また、それ以外のクローンは日本やデンマークの海洋底泥から得られたクローンに近縁であった (97% の相同性)。これらの結果から本リアクター内には少なくとも二種類の海洋性アナモックス細菌が存在しており、うまく集積培養ができたと考えられる。

リアクター内に存在する海洋性アナモックス細菌を可視化するために FISH 法を行った。淡水性のアナモックス細菌を標的とするプローブ Amx820 および海洋性のアナモックス細菌を標的とするプローブ Sca1309 とともに蛍光シグナルが得られなかった。今後は他の海洋性アナモックス細菌を標的とするプローブが報告されているので、それを利用するか、新規に設計を行って本リアクター内に存在する海洋性アナモックス細菌を可視化する予定である。

4. まとめ

本研究では広島湾から採取した底泥を植種源としてアナモックスリアクターを構築し、海洋性アナモックス細菌の集積培養に成功した。海洋性アナモックス細菌は系統学的に多岐にわたり、本リアクター内にも少なくとも二種類のアナモックス細菌が存在していることから、今後はこれらの海洋性アナモックス細菌の機能について検討を行い、塩分含有排水

の窒素除去プロセス開発に繋げていく予定である。

参考文献

- 1) Woeckel *et al.*, *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11), 3106-3119.
- 2) van de Graaf *et al.*, *Microbiology*, 1996, 142, 2187-2196.
- 3) Strous *et al.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50, 589-596.

謝辞

本研究の一部は、国土交通省「建設技術研究開発助成制度」、文部科学省科学技術開発補助金「若手研究 B」の支援を受けて実施されました。ここに記して感謝の意を表します。

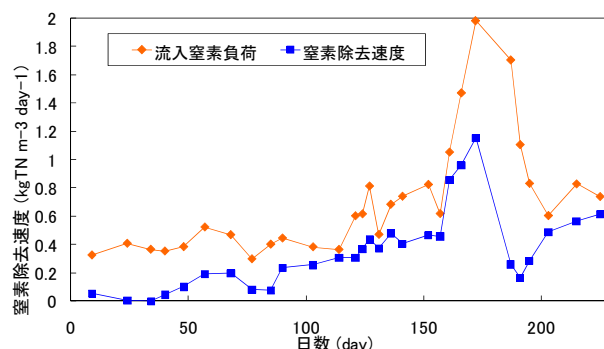


図 1 リアクターの除去性能

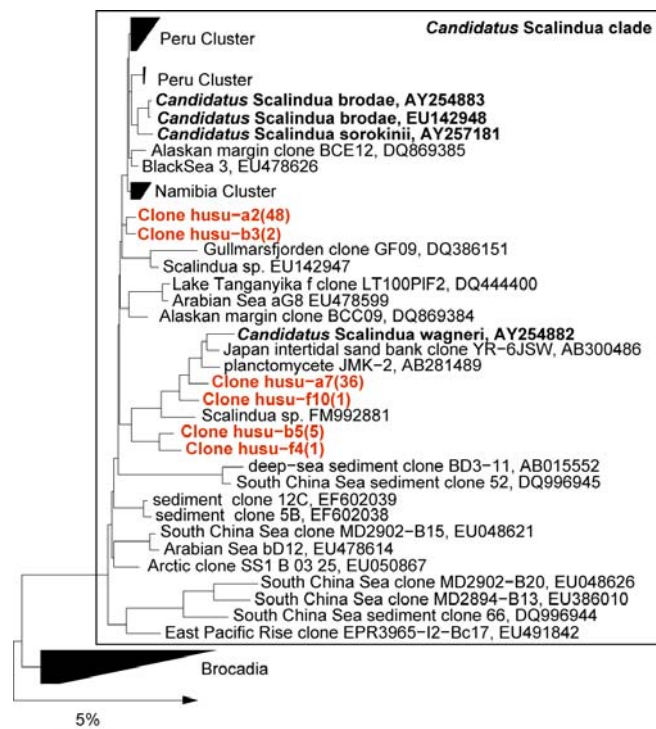


図 2 リアクター内のアナモックス細菌の系統樹