

## 東京湾干潟底泥の ANAMMOX 集積培養における菌叢解析

木更津工業高等専門学校 学生会員 ○池田 直生, 鎌田 彩花, 名取 哲平  
 正会員 大久保 努, 湯谷 賢太郎, 上村 繁樹  
 長岡技術科学大学 木村 昌典, 東北大学, 井口 晃徳

### 1. まえがき

嫌気アンモニア酸化 (Anaerobic Ammonium Oxidation : ANAMMOX) とは, 1995 年に存在が確認された化学合成独立栄養細菌による新たな窒素の代謝経路である. 嫌気条件下において, 等量のアンモニア性窒素 (NH<sub>4</sub>-N) と亜硝酸性窒素 (NO<sub>2</sub>-N) を窒素ガスに変換する<sup>1)</sup>. ANAMMOX 細菌は Planctomycete に属し, 主に排水処理プラントの汚泥において発見されてきた. また自然界にも広く分布していることが報告されていることから, ANAMMOX 細菌は自然界における窒素代謝にも大きく貢献していると考えられる.

そこで, 我々は, 自然界において活発に窒素代が行われている干潟に注目し, 東京湾, 木更津市小櫃川河口の盤洲干潟の底泥を採取し, 海水と同程度の高塩分環境下において ANAMMOX 細菌の集積培養を行った. その結果, 培養開始 176 日より ANAMMOX 反応特有の NH<sub>4</sub>-N と NO<sub>2</sub>-N の等量の減少と微量の硝酸性窒素 (NO<sub>3</sub>-N) の発生が確認された (図-1). これより, 干潟における窒素除去においても ANAMMOX 反応が寄与していることが示唆された<sup>2)</sup>.

本研究では, 既報で得た ANAMMOX 集積培養が干潟由来であることから, 塩分と ANAMMOX の関係をバッチ実験により調査した. また PCR 法によるクローニングを行い, 集積培養の ANAMMOX 細菌の菌叢解析を行った.

### 2. 実験方法

#### 2-1 バッチ実験

本研究では, 既報の研究で得られた ANAMMOX 集積培養 (人工海水により塩分を 3.42%に調整) より底泥を取り出し, 異なる塩分の基質を用意しバッチ実験を行った. 基質の塩分は人工海水により調整し, 海水と同程度の 3.42%を海水 100%とし, 以下,

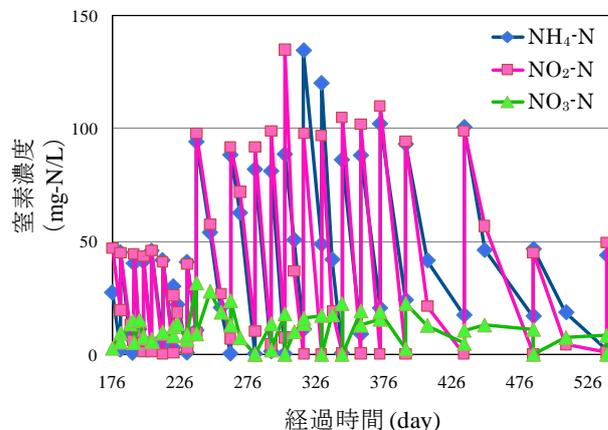


図-1 干潟底泥における ANAMMOX 反応

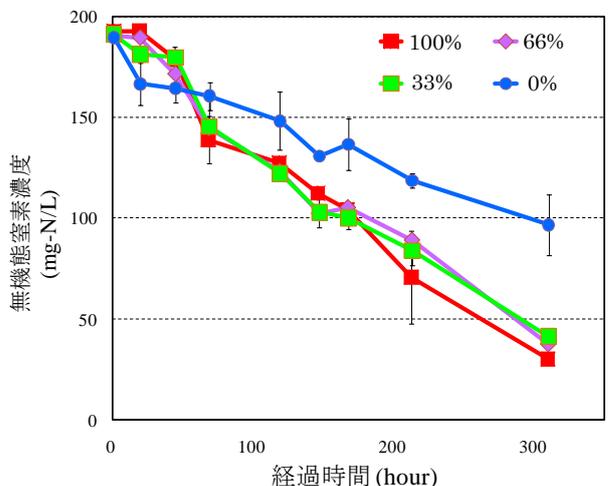


図-2 各サンプルにおける基質の無機態窒素濃度

海水 66%, 33%, 0%の基質を用意した. 基質の NH<sub>4</sub>-N と NO<sub>2</sub>-N をそれぞれ 100mg-N/L に設定し, また微量元素成分等については, 既報の ANAMMOX 培地を参考とした. ANAMMOX 集積培養の底泥 3.5g (湿潤重量) と基質 25ml をバイアル瓶に投入し密封した. 操作は全て窒素置換を行った無菌ボックス内で行った. 実験温度は 30℃とし, 実験開始後, 任意の時間ごとに NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N を分析した.

キーワード ANAMMOX, 東京湾, 干潟底泥, 塩分, PCR

連絡先 (上村) 〒292-0041 千葉県木更津市清見台東 2-11-1 木更津高専環境都市工学科 TEL 0438-30-4152

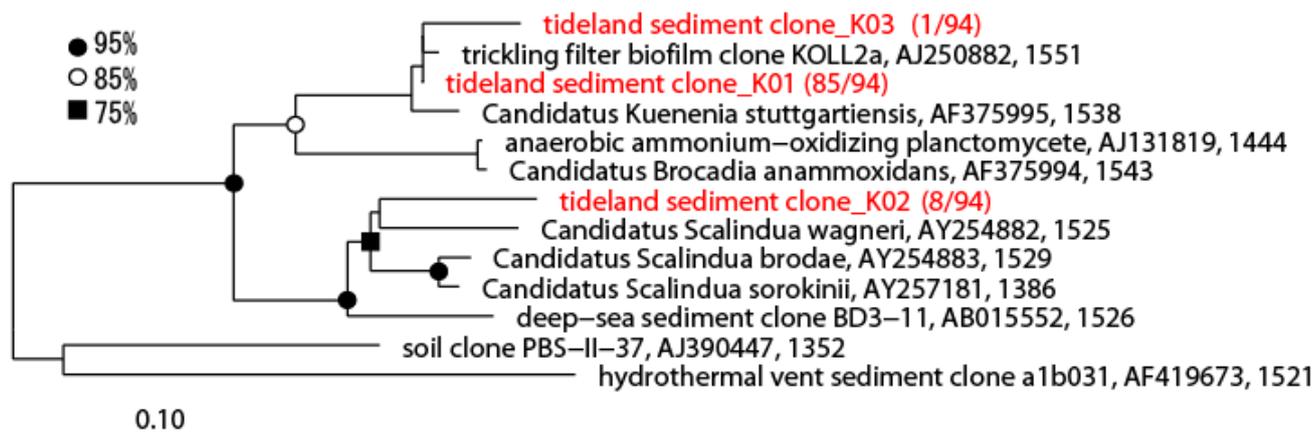


図-3 ANAMMOX 集積培養の系統樹

## 2-2 DNA 解析

ANAMMOX 集積培地の底泥サンプルより DNA を抽出し、クローニングを行った。プライマーは Planctomycetales に特異的な Pla46F と ANAMMOX 細菌に特異的な Amx820R を使用し、PCR を行い、PCR 産物を生成した。得られた PCR 産物を環状 DNA 分子に挿入し、宿主細胞に組み込みクローンを生成した。その後、各クローンより DNA を抽出し、塩基配列を決定した。それぞれの塩基配列を、遺伝子解析ツール (Arb) を用いて系統樹を作成した。

## 3. 結果・考察

### 3-1 バッチ実験

各塩分条件において、全てのサンプルで等量の  $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{NO}_2\text{-N}$  の減少が見られ、ANAMMOX 反応が確認された。図-2 は経過時間と  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$  の合計値である無機態窒素濃度 (IN) の変化を示す。これより、塩分が海水 33%、66%、100% と高いサンプルにおいては、IN の減少パターンに差は生じなかったが、海水 0% では、IN の減少パターンは緩やかになった。

### 3-2 DNA 解析

作成した系統樹を図-3 に示す。系統樹は marine sediment clone Sva0503(AJ241009)を外郡とした。94 クローンの内 85 クローン (tideland sediment clone K01) が相同性 97%以上であり、同一の細菌叢であるということが確認された。K01 は、trickling filter biofilm clone KOLL2a (AJ250882) と *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (AF375995)の両者に対して、相同性 97%以上が認められた。両者に近縁である

ANAMMOX 細菌は、他の研究でもいくつか報告されている<sup>3)</sup>。しかしながら、その多くは廃水処理施設の汚泥由来であり、とくに高塩分条件下で培養されたものではなく、両者が好塩性・耐塩性を有するという事実は報告されていない。本研究では、高塩分条件下において、むしろ ANAMMOX 反応が良好に進行することがバッチ実験より確認された。この原因は現在のところ不明であるが、本集積培養で優先した ANAMMOX 細菌は、上記 2 つのクローンと非常に近縁ではあるものの、元来、好塩性あるいは耐塩性を有していたなどが考えられる。

## 4. おわりに

本研究で得られた主な成果を以下に示す。

- 1) 干潟底泥の ANAMMOX 集積培養により、干潟における窒素除去においても ANAMMOX 反応が寄与していることが示唆された。
- 2) 干潟由来の ANAMMOX 集積培養底泥は、高塩分条件下において ANAMMOX 反応が良好に進行することを確認した。
- 3) 菌叢解析の結果、好塩性あるいは耐塩性の ANAMMOX 細菌の優先は確認されず、今後、より詳細な解析が必要である。

## 参考文献

- 1) 藤井隆夫ら (2004) 水環境学会誌, 27 (7), 448-452
- 2) T. Natori, et. al. (2010) 土木学会第 37 回関東支部技術研究発表会ポスター発表
- 3) Chih-Cheng Wang, et. al. (2010) *Journal of Hazardous Materials*, 175, 622-628