

B-8 ANAMMOX 反応を利用した生物膜リアクターの構築と生物膜群集構造解析

広島大学大学院
北海道大学大学院 対馬 育夫、小笠原 雄二、岡部 聡

○金田一 智規、尾崎 則篤

1. はじめに

近年、嫌気性アンモニア酸化 (ANAMMOX) 反応を利用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微生物反応である。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。ANAMMOX 反応を担う細菌は近年発見されたばかりであり、独立栄養性で比増殖速度が極めて小さく培養が困難であることから、集積培養技術が十分に確立しておらず、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きたのが現状である。したがって、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 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。

2. 実験方法

リアクターの植種源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¹⁾を適用し、ANAMMOX 細菌 DNA 量を測定した。また、ANAMMOX 細菌は有機物による活性の阻害の可能性があるため、流入 C/N も汚泥の選定の評価項目に加えた。生物膜リアクターは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 1.16-8 h、担体充填率は 14% である。人工無機培地は van de Graaf²⁾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。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解析するために、リアクター流出水を対象として 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。本研究では全細菌を対象とした Bac11f-1492r と ANAMMOX 細菌が属する *Planctomycetales* 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 1 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 2)。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²⁾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だと考えられる。活性の低下後、流入負荷を下げてもう一度10 日程度で回復し、260 日目には最大窒素除去速度 $3.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成した。

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 3)。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 流出水を対象とした 16S rDNA クローン解析

クローン解析の結果を表 1 に、その系統樹を図 4 に示す。ANAMMOX 細菌に近縁なクローン BUI3 とクローン PUI1 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。Pla46f-1492r のプライマーセットで

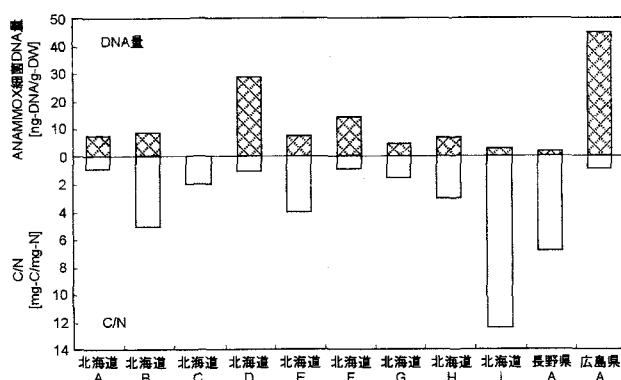


図 1 汚泥中の ANAMMOX 細菌の DNA 量と流入 C/N

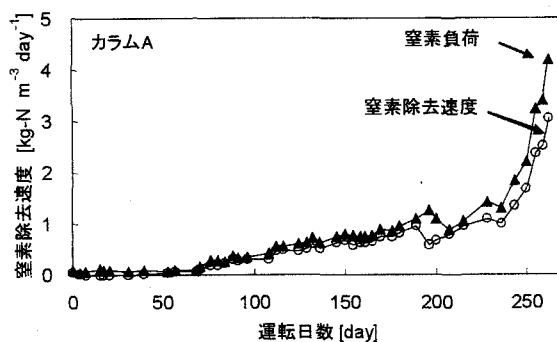


図 2 生物膜リアクター A の窒素除去速度の変化

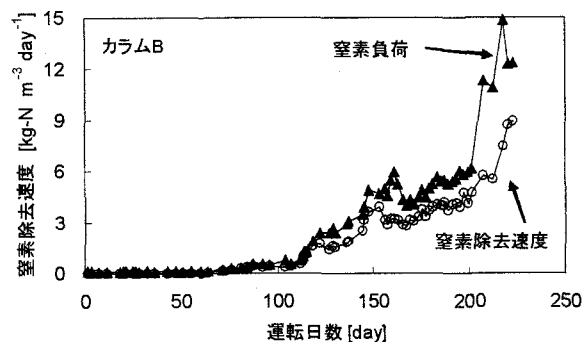


図 3 生物膜リアクター B の窒素除去速度の変化

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。

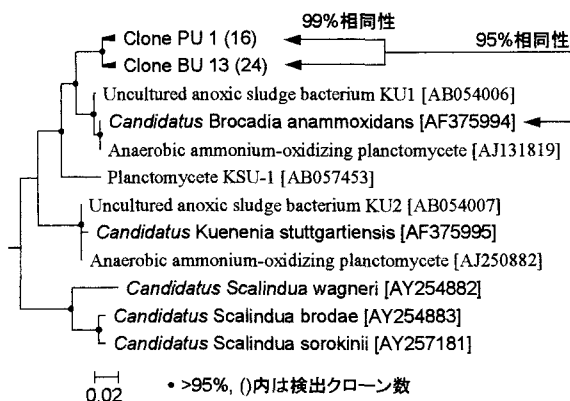


図 4 検出されたクローンの系統樹

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%	<i>Beta proteobacterium</i> (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 &	PU1	15/16 (94%)	94-95%	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> (AF375994)
1492r	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。その結果、広島県 A 下水処理場の汚泥が適していると判断し、ANAMMOX 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、最大窒素除去速度 $3.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ が達成できた。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リアクターの立ち上げが可能であり、最大窒素除去速度 $8.9 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 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) 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.
- 2) van de Graaf et al., (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142, 2187-2196.