

## B-1 ANAMMOXリアクター内における 共存細菌の機能解析

○金田一 智規<sup>1\*</sup>・百合 昭太<sup>1</sup>・尾崎 則篤<sup>1</sup>・大橋 晶良<sup>1</sup>・岡部 聡<sup>2</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院工学研究科社会環境システム専攻（〒739-8527広島県東広島市鏡山1-4-1）

<sup>2</sup>北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻（〒060-8628札幌市北区北13条西8丁目）

\* E-mail: tomokin@hiroshima-u.ac.jp

### 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。本研究室では既にANAMMOX細菌の集積培養に成功し、世界トップレベルの窒素除去速度を達成することができた<sup>1)</sup>。この人工無機栄養塩培地で長期間運転（250日以上）したANAMMOXリアクター内の微生物群集構造を解析した結果、リアクター内にはANAMMOX細菌以外にも共存する細菌が存在し、糸状性を示す細菌も存在していた<sup>2)</sup>。これらのANAMMOX細菌と共存する細菌群のANAMMOXリアクター内での生態学的役割を解明することは、ANAMMOXリアクターの更なる安定化や高効率化につながると考えられる。本研究ではこの共存細菌の生態学的役割を把握するために、16S rRNA遺伝子に基づく系統解析を行い、共存細菌の系統学的位置関係を特定するとともに、MAR-FISH法を用いて共存細菌のANAMMOXリアクター内での基質利用特性について解析を行った。

### 2. 実験方法

#### (1) ANAMMOX リアクターの運転

ANAMMOX リアクターは上向流の生物膜リアクターを用いた。生物膜担体として園芸用のネットを用いた。植種源は不織布を担体として長期間運転しているリアクターからANAMMOX汚泥を採取し、園芸用ネット付着させ、人工無機栄養塩培地<sup>3)</sup>を流入させて運転を開始した。カラムの容積は207 cm<sup>3</sup>、水理学的滞留時間（HRT）は1~2 h、担体表面積は117 cm<sup>2</sup>である。運転

は37℃の恒温条件で行った。流入窒素負荷はアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素濃度を増加させるか、もしくはHRTを段階的に短縮することによって調整した。流入・流出における各態窒素濃度はイオンクロマトグラフィーにより測定した。

#### (2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

ANAMMOX リアクター内のANAMMOX生物膜からDNAを抽出し、全細菌を対象としたBact11f-Univ1492r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neighbor-joining法にて系統樹を作成した。

#### (3) MAR-FISH法による基質利用特性の解析

本研究ではリアクター内に共存する細菌はANAMMOX細菌を由来とする有機物（菌体成分や代謝産物）を基質として利用しているという仮定に基づき、以下の二つの実験を行った。実験の流れを図1に示す。

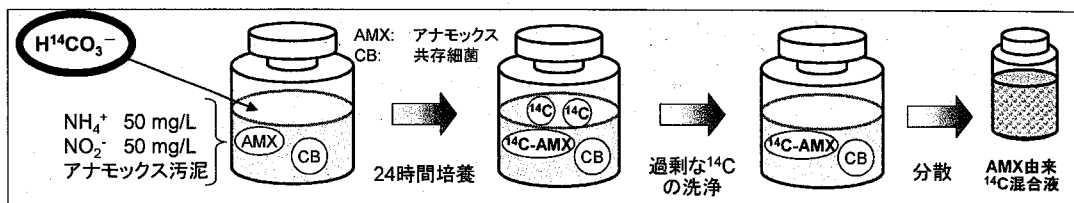
##### 1) ANAMMOX 細菌の<sup>14</sup>Cラベル化実験

5 mLのバイアル瓶にANAMMOX生物膜を10 mg程度採取し、リアクターの運転と同様な人工無機栄養塩培地を5 mL添加し、24時間37℃で培養した。アンモニア性窒素および亜硝酸性窒素濃度はともに50 mg-N/Lとした。<sup>14</sup>CのトレーサーとしてNaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>を100 μCi添加した。24時間後に遠心分離を行い、ANAMMOX細菌に取り込まれなかった過剰な<sup>14</sup>Cを除去し、<sup>14</sup>Cで標識されたANAMMOX細菌の混合液を得た。この時点でANAMMOX細菌のみが<sup>14</sup>C無機炭素を利用していることをMAR-FISH法にて確認した。

##### 2) 共存細菌のANAMMOX細菌由来<sup>14</sup>Cの利用実験

1)で得られたANAMMOX細菌由来<sup>14</sup>C混合液を新たにリアクターから採取した生物膜とともに48時間培養し、MAR-FISH画像にて共存細菌の取り込みを観察した。

### 第一段階: アナモックス細菌のラベル化



### 第二段階: 共存細菌のAMX由来 $^{14}C$ の利用実験

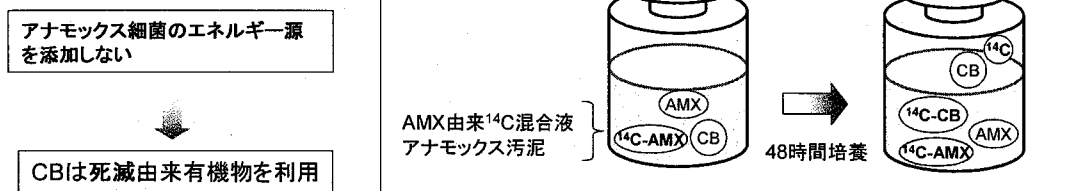


図1 本実験のMAR-FISH法のフロー

## 3. 結果と考察

### (1) リアクターの窒素除去性能

図2にリアクターの窒素除去速度の経時変化を示す。活性の高かったANAMMOX汚泥を植種後、運転開始からわずか17日目に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低下は340日目付近にも見られた。現在のところはっきりとした原因は不明であるが、リアクターに生成した窒素ガスが滞留し、短絡流により一部のANAMMOX細菌のみが活性を有したことによることが原因のひとつであると考えられる。

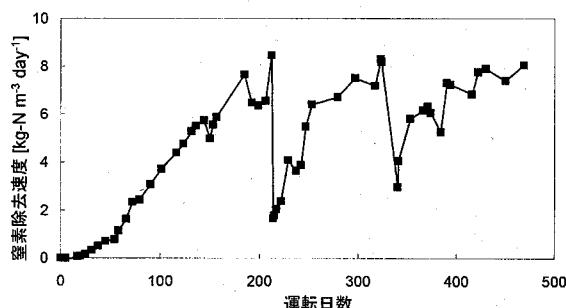


図2 リアクターの窒素除去性能

### (2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

図3および図4検出されたクローンの系統樹を示す。全細菌を対象としたプライマーセットで229クローンを解析した結果、既報のANAMMOX細菌である*Brocadia*

*anammoxidans*に近縁なクローンが多く検出された。またANAMMOX細菌が属するグループである*Planctomycetes*に属するクローンも検出されたことから、リアクター内には新種のANAMMOX細菌が存在している可能性も示唆された。ANAMMOX細菌以外では*Betaproteobacteria*や*Chlorobi*, *Chloroflexi*に近縁なクローンが比較的多く検出された。またこれら以外にもわずかながらいくつかの門レベルで異なるクローンも検出された。このように共存細菌の機能を系統樹のみから推定することは困難であるが、本リアクター内には門レベルで多様な細菌種が共存していることが明らかとなった。

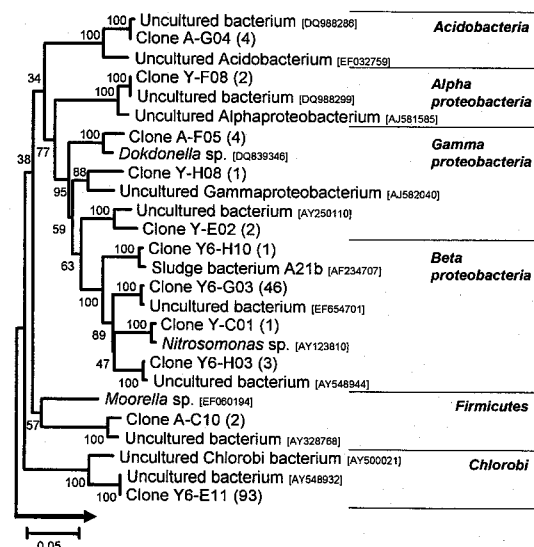


図3 検出されたクローンの系統樹①

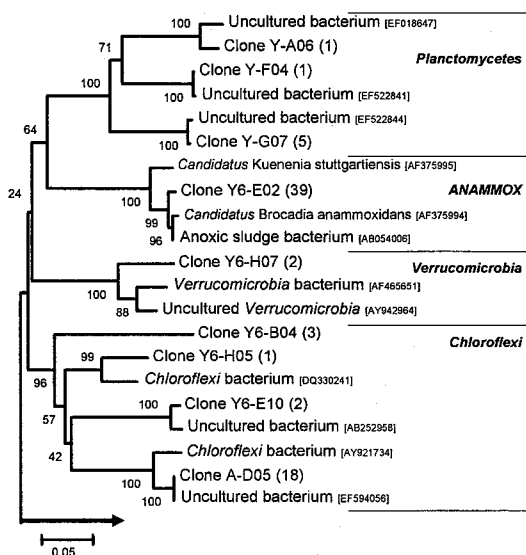


図4 検出されたクローンの系統樹②

①は検出されたクローン数を示す

### (3) MAR-FISH法による基質利用特性の解析

$^{14}\text{C}$  重炭酸を用いて ANAMMOX 生物膜を 24 時間培養した第一段階において MAR-FISH 画像の観察から、ANAMMOX 細菌のみが  $^{14}\text{C}$  の取り込んだことを確認できた。その後、第一段階で作成した  $^{14}\text{C}$  菌体を生物膜ともに 48 時間培養した。その MAR-FISH 画像を図 5 および図 6 に示す。図 5 において ANAMMOX 細菌以外の糸状性を示す細菌の位置に図 6 において銀粒子の形成がみられたことから、この未知の糸状性細菌は ANAMMOX 細菌を由来とする有機物を資化することができると考えられる。今後はこれらの共存細菌と ANAMMOX 細菌との細菌間の相互作用について検討を行い、ANAMMOX リアクター最適化のためにはこれらの共存細菌の共生が必要か、もしくは排除が有効なのかを見極めていく必要がある。

本実験では 48 時間培養後の MAR-FISH による観察では ANAMMOX 細菌以外の共存細菌の取り込みはわずかにしか観察できなかった。これは共存する細菌の存在量が 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%)、ANAMMOX 細菌を由来とする  $^{14}\text{C}$  によって共存細菌を標識することが困難であること、もしくは共存細菌が 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。本実験での ANAMMOX 細菌の  $^{14}\text{C}$  の取り込み率は 24 時間の培養で 10%程度であったため、24 時間後の  $^{14}\text{C}$  で標識された ANAMMOX 細菌の混合液をあらかじめ大量に作成することで ANAMMOX 細菌から共存細菌への炭素のフローについてより解析しやすくなると考えられる。

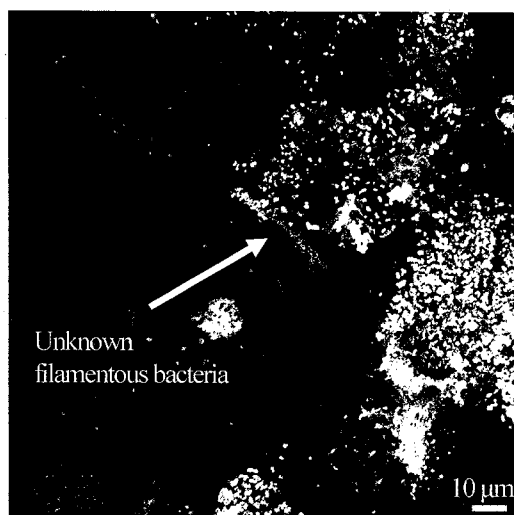


図5 第二段階における FISH 画像

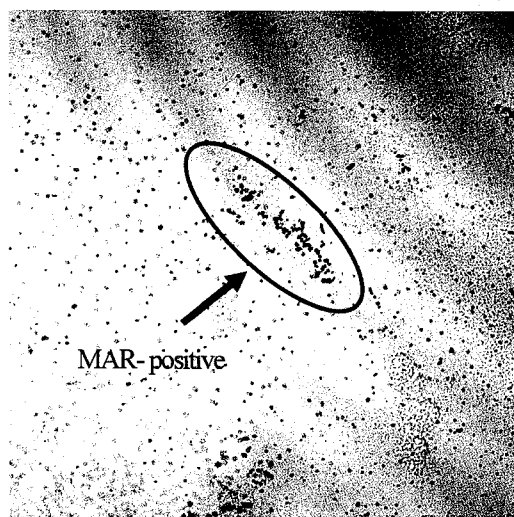


図6 第二段階における MAR 画像

### 4. まとめ

リアクター内にはアナモックス細菌以外にも様々なグループの細菌が共存していた。 $^{14}\text{C}$  重炭酸を用いて ANAMMOX 細菌のみを標識することができ、この  $^{14}\text{C}$  菌体成分とともに ANAMMOX 生物膜をさらに培養することで、共存する糸状性細菌が  $^{14}\text{C}$  を取り込んだことから、リアクター内には ANAMMOX 細菌から共存細菌への炭素のフローが存在していることが示唆された。

### 参考文献

- 1) Tsushima et al. (2007) *Water research*, **41**:1623-1634.
- 2) Kindaichi et al. (2007) *Applied and Environmental Microbiology*, **73**:4931-4939.
- 3) Van de Graaf et al. (1996) *Microbiology*, **142**:2187-2196.