

B-24 微小電極を用いたANAMMOXグラニューール内の微生物活性の解析

○山田 陽平¹・佐藤 久^{1*}・岡部 聡²・三浦 佑己²・曹 順子²

¹北海道大学大学院工学研究科環境フィールド工学専攻（〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目）

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

*E-mail : qsatoh@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

嫌気性アンモニア酸化（ANAMMOX）反応は、無酸素条件下においてアンモニア性窒素（ NH_4^+ ）を電子供与体、亜硝酸性窒素（ NO_2^- ）を電子受容体として、両化合物を窒素ガスへ変換する反応である。ANAMMOX 反応を廃水の窒素除去プロセスに適用できれば、現在一般的に用いられている窒素除去法である硝化脱窒法に比べて、有機物添加コストや余剰汚泥発生量の削減が可能となる。これを実現するためには ANAMMOX 細菌の生態学的知見を集積することが不可欠である。しかしながら、倍加時間が約 11 日であるなど集積培養が困難な ANAMMOX 細菌の生態学的知見は極めて少ない。本研究では ANAMMOX 細菌の集積培養に成功し、超高速（総窒素（T-N）除去速度として 31.2 g-N/L/day）の ANAMMOX 生物膜リアクターを構築した¹⁾。しかしながら、このリアクターにおいても生物膜深部に存在する ANAMMOX 細菌は十分に活性を発揮していなかった²⁾。この結果は、生物膜を薄くすることにより更に処理速度を高められることを示唆している。しかしながら、このリアクターでは生物担体として不織布を用いており、生物膜厚のコントロールは極めて難しいと考えられる。本リアクターの運転を継続したところ、剥離した生物膜がリアクター内でグラニューールとなった。微生物グラニューールはリアクター内の流動条件を変更することにより比較的容易にサイズをコントロールすることができる³⁾。そこで本研究では ANAMMOX グラニューールリアクターを構築することを試みた。また、ANAMMOX グラニューールの物理的性質を解析し、グラニューールリアクターの実現可能性を検討した。さらにグラニューールの生態学的知見（ANAMMOX 細菌の菌体密度分布および *in situ* ANAMMOX 活性分布）を FISH 法および微小電極を用いて解析した。

2. 実験方法

(1) リアクターの運転

本研究では ANAMMOX グラニューールリアクターとしてガスリフトリアクター（GLR）を用いた。GLR は直径 5.5 cm、高さ 60 cm の円筒形であり、上部に処理水、発生ガス、および浮上したグラニューールを分離するための装置を備えている。有効容積は約 3.1 L である。ANAMMOX 生物膜リアクターに形成されたグラニューールを 100 mL 採取し GLR に投入した。人工廃水²⁾は GLR 下部から流入させた。リアクター内水温は 38°C に保った。運転初期はガスを通気しなかった。ANAMMOX 反応が見られ始めた運転開始 21 日目から、発生したガスを GLR 下部から通気することでリアクター内を流動させた。投入したグラニューールの物理的性質（直径、SS、VSS、沈降速度）を求め、グラニューール密度を算出した。

GLR からグラニューールを採取し、FISH 法により ANAMMOX 細菌の空間分布を解析した。プローブは ANAMMOX 細菌に特異的な *Amx820* を用いた。FISH 法の手順は Kindaichi *et al.*²⁾の方法に準拠した。

微小電極を用いてグラニューール内の NH_4^+ 、 NO_2^- 、pH 濃度分布を測定し、*in situ* ANAMMOX 活性を解析した。測定には直径 5 mm 以上の比較的大きなグラニューールを用いた。測定方法は Satoh *et al.*⁴⁾の方法に準拠した。測定用培地は人工廃水と同様とした。 NH_4^+ 濃度は 4, 8, 12 mM、 NO_2^- 濃度は 12 mM、 NO_3^- 濃度は 1 mM に変更した。

3. 結果および考察

(1) リアクターの運転

Figure 1 に GLR の T-N 負荷および除去速度の経日変化を示した。運転開始から 15 日後、0.75 g-N/g-VSS/day の T-N 負荷に対して T-N 除去速度は 0.43 g-N/g-VSS/day に達した。循環を始めた 21 日以降は僅かに処理速度が低下したが、定常状態にあると判断した。既往の研究と比較すると、本研究の比活性（最大で 0.49 g-N/g-VSS/day）は

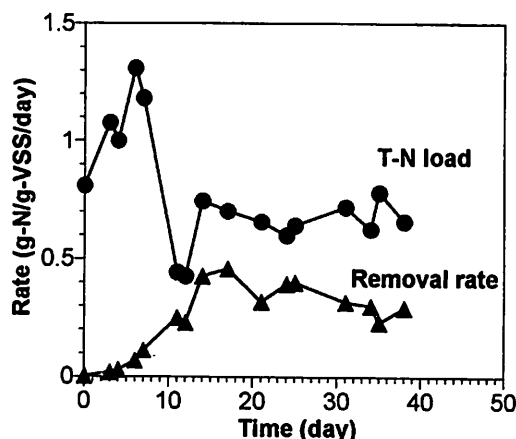


Figure 1 GLR の T-N 負荷および除去速度の経日変化

ANAMMOX 生物膜リアクター³⁾ (1.6 g-N/g-VSS/day) の 1/3 程度であったが, SBR の ANAMMOX グラニュール (0.4 g-N/g-VSS/day)³⁾ よりも高かった。

(2) グラニュールの物理的性質

グラニュールの沈降速度は, 直径約 1.0 mm では約 0.7±0.2 m/min であり, 直径が増大するにつれて増大し, 直径約 5.0 mm では約 1.9±0.2 m/min であった⁹⁾。後述したグラニュールの平均密度を用いて Allen の式から沈降速度を算出した。計算値と実測値の差は直径が大きい場合により顕著であった。この結果は, 直径の大きなグラニュールほど密度が低いことを示している。このことは, 大きなグラニュールは内部にガスが蓄積しやすく, 沈降性が悪いことを意味する。沈降試験終了後, 691 個のグラニュールをランダムに採取し, 画像解析ソフト (ImageJ)⁷⁾を用いて直径を測定した。直径の平均値, 最大値, 最小値は 1.1±0.7 mm, 5.7 mm, 0.16 mm であった。直径を 0.5 mm 毎に区分すると, 42%のグラニュールが 0.5~1.0 mm の範囲に含まれており, 1.0~1.5 mm (29%), 0.15~0.5 mm (11%), 1.5~2.0 mm (10%) の範囲の順にグラニュール数が多かった。すなわち, 直径 2.0 mm 以下のグラニュールが全グラニュールの 92%を占めた。さらに, SS, VSSを測定しグラニュール密度を算出した。グラニュール体積当たりの SS は 41.1±0.6 mg/cm³ (n=3) であった。この結果から, グラニュールの密度を 1.041 g/cm³ とした。VSS/SS 比は 90.3±0.7% (n=3) であった。

(3) グラニュール内の *in situ* ANAMMOX 活性

窒素除去速度が定常となった後にグラニュールを採取し, 微小電極を用いて内部の NH₄⁺および NO₃⁻濃度分布を測定した (Figure 2)。培地中で約 12 mM であった NH₄⁺は, グラニュール内で急激に減少し, 深さ 1,000 μm の地点では約 7.7 mM となり, それ以深では緩やかに低

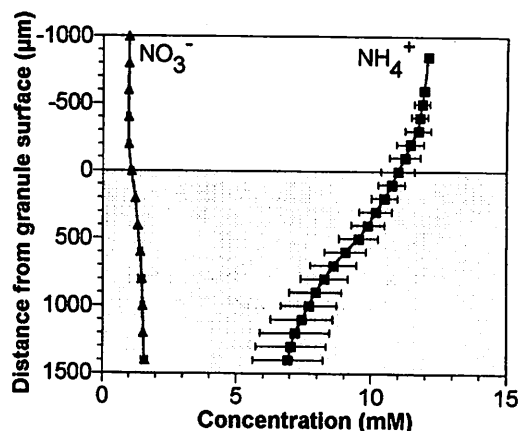


Figure 2 グラニュール内部の NH₄⁺および NO₃⁻濃度分布

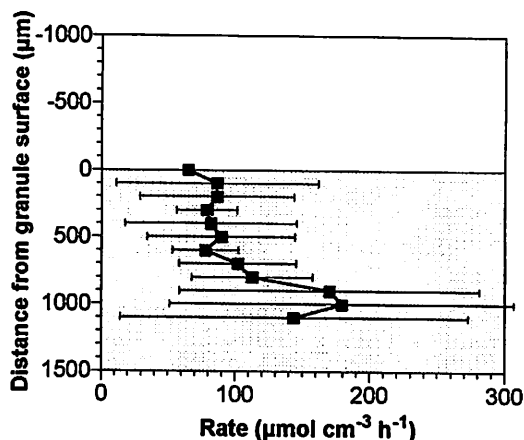


Figure 3 グラニュール単位体積当たりの ANAMMOX 活性分布

下した。培地中で約 1 mM であった NO₃⁻は, 表面から徐々に増大し, 深さ 1,400 μm の地点では約 1.6 mM となった。

この結果から, 単位体積当たりの ANAMMOX (NH₄⁺酸化) 活性を求めた (Figure 3)。グラニュール表層の反応速度は 70 μmol/cm³/h であったが, 中心に向かうに従い増大し, 深さ 1,000 μm の地点では 180 μmol/cm³/h となった。ANAMMOX 活性がグラニュール全体に見られたことから, この測定条件では反応を律速する因子はなかったことが分かる。ANAMMOX グラニュールの活性は ANAMMOX 生物膜³⁾よりも 1 桁, 硝化生物膜⁹⁾よりも 2 桁高かった。

(4) ANAMMOX グラニュール内の ANAMMOX 細菌菌体密度分布

Figure 4 は ANAMMOX グラニュール切片に AMX820 プローブを適用した FISH 画像である。白い部分は ANAMMOX 細菌を, 黒い部分は間隙を示している。

ANAMMOX 細菌は表面から深さ約 1,500 μm の部分に高密度に存在し、深さ方向に著しい菌体密度の差異は見られなかった。

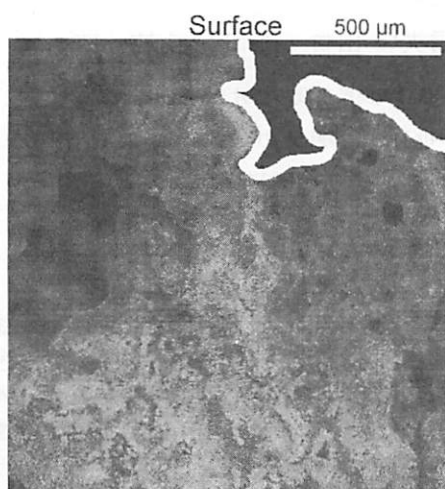


Figure 4 グラニュール内部の ANAMMOX 細菌菌体密度分布

(5) ANAMMOX 活性に及ぼす NH_4^+ 濃度の影響

Figure 5 に培地中の NH_4^+ 濃度が 4, 8, 12 mM の場合の ANAMMOX グラニュール内の NH_4^+ 濃度分布を示した。Figure 1 にも示したように、 NH_4^+ 濃度が 12 mM の場合は深さ 1,400 μm の地点まで NH_4^+ 酸化活性が検出された。これに対し、 NH_4^+ 濃度が 8 mM の場合は深さ 1,000 μm 以深では NH_4^+ はほとんど減少しなかった。さらに NH_4^+ 濃度が 4 mM の場合は、グラニュール全体であまり NH_4^+ が減少しなかった。以上の結果は、この測定条件下では NH_4^+ がグラニュール内の ANAMMOX 反応の律速要因であったことを示唆している。そこで、 NH_4^+ 濃度と ANAMMOX 活性の関係を詳細に検討した。Figure 6 に、 NH_4^+ による ANAMMOX 反応の律速にみられた NH_4^+ 濃度が 8 mM の場合のグラニュール内の NH_4^+ 濃度と ANAMMOX 活性の関係を示した。 NH_4^+ 濃度の低下に伴い ANAMMOX 活性は低下し、グラニュール内の NH_4^+ 濃度が 3.4 mM 以下になると ANAMMOX 活性が検出されなかった。 NH_4^+ が低濃度のグラニュール深部に活性が見られなかった理由として、表層で生成された阻害物質が高濃度に蓄積した、pH が上昇した、栄養物質が律速した、等が考えられたが、原因の解明は今後の研究課題である。

4. 結論

本研究ではガスリフト型の ANAMMOX グラニュールリアクターを構築した。微小電極を用いた測定から、たとえグラニュール内に高濃度に NH_4^+ が存在しても

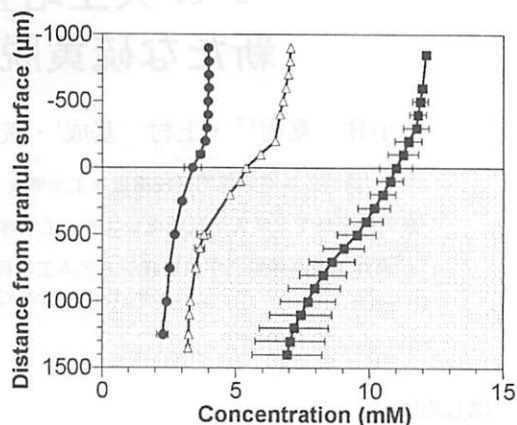


Figure 5 グラニュール内部の NH_4^+ 濃度分布

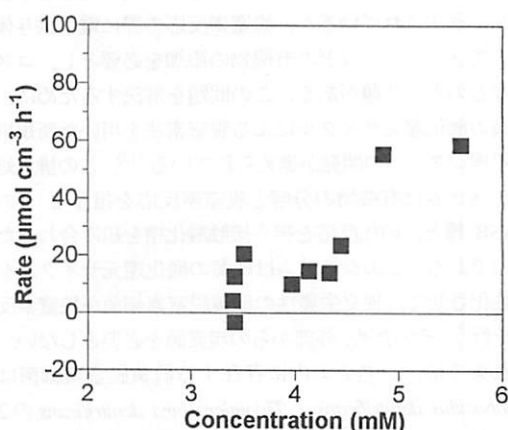


Figure 6 グラニュール内の NH_4^+ 濃度と ANAMMOX 活性の関係

ANAMMOX 反応は生じない場合があることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 高橋ら (2007) 環境工学研究論文集, 44, 201-206.
- 2) Kindaichi *et al.* (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (15), 4931-4939.
- 3) Arrojito *et al.* (2006) *J. Biotechnol.*, 123, 453-463.
- 4) Satoh *et al.* (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (22), 7300-7307.
- 5) Tsushima *et al.* (2007) *Water Res.*, 41, 1623-1634.
- 6) 山田ら (2008) 土木学会第63回年次学術講演会, 7-010.
- 7) <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>
- 8) Okabe *et al.* (1999) *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (7), 3182-3191.

謝辞

本研究の一部は NEDO 「微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発」, 国交省「建設技術研究開発助成制度」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。