

プロピオン酸の酸化能力をもつアナモックス細菌の集積培養の試み

広島大学 非会員 ○寒河邦彦
 広島大学 正会員 大橋晶良
 広島大学 正会員 尾崎則篤
 広島大学 正会員 金田一智規

1. 目的

現在、多くの下水処理施設で硝化・脱窒法が利用されている。この処理法は、硝化細菌と脱窒細菌を用いて窒素除去を行うプロセスである。しかしながら硝化の際に酸素による曝気や脱窒の際に有機物が大量に必要なことが課題であった。一方、アナモックス細菌はアンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を直接窒素ガスへ変換でき、従来の硝化・脱窒法と比べてエネルギーの削減や余剰汚泥の減少により処理費用の削減が期待できる。アナモックス細菌は現在、Ca.“Scalindua,” Ca.“Brocadia,” Ca.“Jettenia,” Ca.“Kuenenia,” Ca.“Anammoxoglobus,” の五属が報告されている。アナモックス細菌の中で Ca.“Anammoxoglobus propionicus”はプロピオン酸、Ca.“Brocadia flugida”は酢酸の酸化能力が他のアナモックス細菌より優れており^{1),2)}、有機酸が高濃度に含まれている実廃水にも適用が可能であると考えられている。この二種のアナモックス細菌に関して存在は確認されているものの Kartal ら^{1),2)}と Hsu³⁾らの報告以外の有機酸存在下で集積培養されていない。本研究の既往研究⁴⁾によって膜分離リアクターよりカラムリアクターに優位性があると判断し、本研究では上向流カラムリアクターを用いてプロピオン酸酸化能力に優れた Ca.“Anammoxoblobus propionicus”の集積培養を目的とする。

2. 実験方法

本研究では Fig. 1 に示すカラムリアクターを用いてプロピオン酸を一定濃度(2 mg-CH₃CH₂COO⁻/L)入れ続ける RUN1 とリアクター流出部で常にプロピオン酸が検出限界(0.7 mg-CH₃CH₂COO⁻/L)以下ならプロピオン酸濃度を増加させていく RUN2 と今回の実験で用いたアナモックス細菌の植種源であるリアクターをプロピオン酸を入れない RUN3 として計三系統を立ち上げて実験を行った。植種源は本研究室内で培養しているアナモックス細菌である Ca.“Brocadia sinica”と Ca.“Jettenia caeni”の混合培養系(RUN3)を植種した。本混合培養系には僅かながら Ca.“Anammoxoglobus propionicus”の存

在が確認され、系統的にも近種であることがわかっている。RUN3 では植種日の時点で 1109 日運転しており、NH₄⁺、NO₂⁻の除去率は 97.0%、98.8%であった。このバイオマスを RUN1, RUN2 に 20 g-wet ずつ移植した。植種後アナモックス活性が回復するまで 77 日かかり、RUN1, RUN2 の NH₄⁺の除去率は 90.6%、90.7%、NO₂⁻の除去率は 89.9%、95.2%まで回復したため、その後プロピオン酸ナトリウムを投入した。RUN1, RUN2 では基質は 5L 瓶、プロピオン酸は 1L 瓶を使用し、RUN3 では基質は 20L 瓶を使用した。またプロピオン酸水

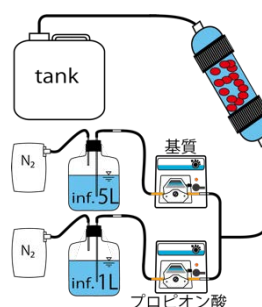


Fig. 1 Schematic of reactors

Table 1 Synthetic inorganic medium

成分	RUN1	RUN2	RUN3	単位
(NH ₄) ₂ SO ₄	40.0			mg-N/L
NaNO ₂	50.0			
NaNO ₃	85.0	0.0		
KHCO ₃	1000.0			mg/L
KH ₂ PO ₄	27.2			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300.0			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	180.0			
CH ₃ CH ₂ COONa	2.0	1.0からスタート	0.0	mg-CH ₃ CH ₂ COO ⁻ /L
Trace Element1	EDTA-2Na	5.0		mg/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	9.0		
	EDTA-2Na	15.0		
	CnSO ₄ ·5H ₂ O	0.25		
	NaSeO ₃	0.11		
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.19		
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.24		
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.22		
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.99		
	H ₃ BO ₃	0.014		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.43		

溶液は二日以上経過すると基質瓶内で濃度が低下するため、二日置きに粉末の試薬から水溶液を作成した。基質とプロピオン酸を供給する際には窒素ガスでパージを行い、それぞれの瓶に窒素ガス入りのアルミニウムガスバッグを繋ぎ、嫌気条件を保ちながら実験を行った。基質組成は Table 1 に示す。リアクター流入部と流出部の二か所でサンプリングを行い、各態窒素濃度とプロピオン酸濃度を測定した。各態窒素濃度とプロピオン酸濃度の測定にはイオンクロマトグラフィーを使用した。16S rRNA 菌相解析は株式会社 生物技研に委託し、シーケンシングには Miseq を使用した。FISH 解析には蛍光プローブ EUB338mix, Bfu613 を使用した。

3. 実験結果及び考察

Fig. 2 では窒素負荷と窒素除去速度、Fig. 3 では Anammox 比⁵⁾、Fig. 4 では流出水のプロピオン酸濃度を

キーワード アナモックス細菌, 脱窒, 上向流リアクター, プロピオン酸, Anammoxoblobus 属

連絡先 M204786@hiroshima-u.ac.jp

示す。Fig. 2 では RUN1 と RUN3 は窒素負荷、窒素除去速度共に安定しているのに対し、RUN2 では窒素除去速度が安定していない。

Fig. 3 においても RUN1 と RUN3 では文献値に近い値を示しているのに対し、RUN2 では文献値を大きく外れる値を示している。Fig. 4 の流出水のプロピオン酸濃度は RUN1 では常に 0 となりリアクター内で全てプロピオン酸が酸化されているのに対して RUN2 ではリアクター内でプロピオン酸が完全に酸化されず検出されることがあった。

運転 33 日目にバイオマスに特徴が見られた。Fig. 5 のようにアナモックス活性が高く、発生した窒素ガスが付着することで浮遊し、赤いバイオマスである Top、アナモックス活性の低く赤いバイオマスの Middle、白いバイオマスである Bottom の三部位に区分した。Bottom は RUN1 ではアナモックスの死骸のようなゼリー状であり、RUN2 では脱窒細菌のような黄土色でペースト状であった。よって部位によって菌相が異なると考え、部位別に菌相解析を行った。RUN3 はカラム内の部位によるバイオマスの差異がないと判断し Top を代表として菌相解析を行った。解析の結果アナモックス細菌は OTU_001, 008, 022 の三種類検出された。Fig. 6 の系統分析の結果、OTU_001 は Ca. “*Brocadia sinica*”, OTU_008 は Ca. “*Jettenia caeni*”, OTU_022 は Ca. “*Brocadia flugida*” か Ca. “*Brocadia sp. 40*” のどちらかであると判明した。Fig. 7 では各部位のアナモックス細菌の存在割合を示している。RUN1, 2 の Bottom ではアナモックス細菌の存在割合が大きく減少した。しかし RUN3 では存在していない OTU_022 が RUN1 の Bottom では最も多く存在していた。OTU_022 を特定するために Ca. “*Brocadia flugida*” の特定プローブである Bfu613 を使用し、FISH 解析を行った結果、Fig. 8 のようになり Bfu613 と結合したバイオマスは黄色く光った。これによって OTU_022 が Ca. “*Brocadia flugida*” である可能性が高い。また Table 2 では二つの菌相解析の結果を比較している。この結果 RUN1 Bottom では Ca. “*Brocadia flugida*” の存

在割合が 1.4% から 4.1% に増加しており、さらなる存在割合の増加が期待できる。

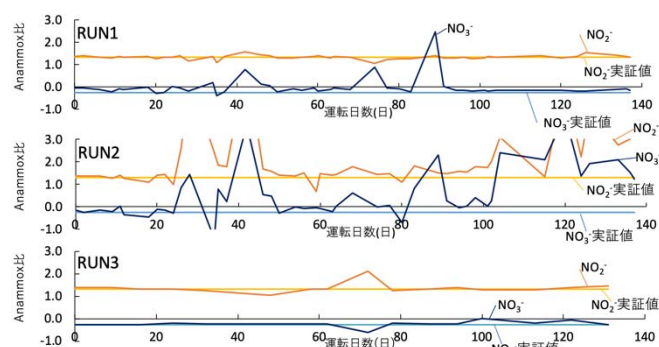


Fig. 3 Anammox ratio

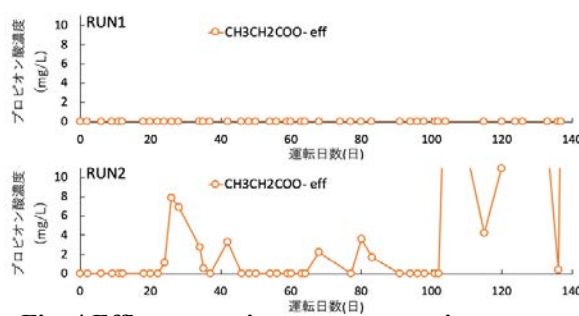


Fig. 4 Effluent propionate concentration

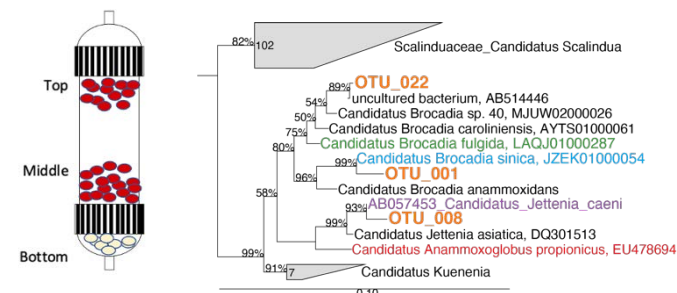


Fig. 5 Distribution of biomass in column reactor

Fig. 6 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of known anammox bacteria and OTUs

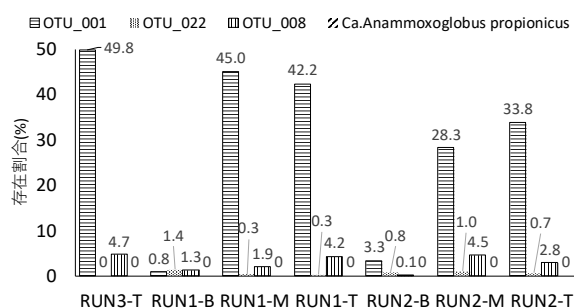


Fig. 7 Existence ratio of anammox bacteria

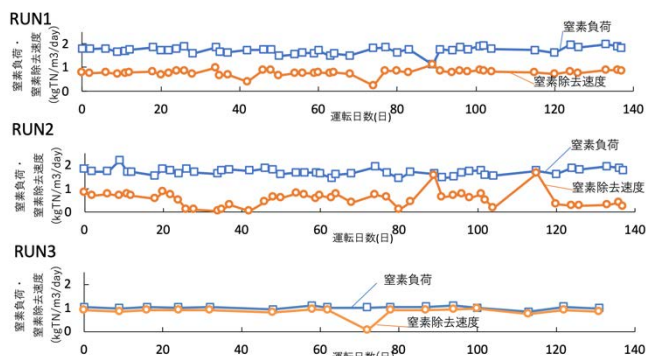


Fig. 2 Nitrogen loading and nitrogen removal rate

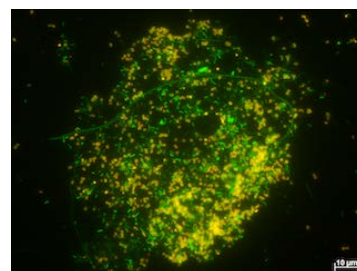


Fig. 8 FISH image

**Table 2 Existence ratio of anammox bacteria
(1/10 and 2/12)**

	2020/1/10		2/12-1/10		2020/2/12				2020/1/10		2/12-1/10		2020/2/12	
	Reads	%		%	Reads	%			Reads	%		%	Reads	%
RUN3														
Jettenia caeni	1017	4.7												
Brocadia flugida	0	0.0												
total	21529													
RUN1 Bottom														
Jettenia caeni	334	1.3	-0.9		88	0.4			37	0.1	0.5		164	0.6
Brocadia flugida	354	1.4	2.7		917	4.1			221	0.8	1.1		487	1.9
total	24977				22345				26366		0.0		25514	
RUN1 Middle														
Brocadia sinica	11763	45.0	-2.4		11364	42.6			7875	28.3	6.7		10036	35.0
Brocadia flugida	89	0.3	0.0		95	0.4			277	1.0	-0.5		132	0.5
total	26126				26655				27860				28673	
RUN1 Top														
Jettenia caeni	1054	4.2	-2.5		476	1.7			657	2.8	1.5		1060	4.3
Brocadia flugida	63	0.3	0.0		82	0.3			157	0.7	1.4		500	2.0
total	24981		0.0		27398				23387		0.0		24697	
RUN2 Bottom														
Jettenia caeni														
Brocadia flugida														
total														
RUN2 Middle														
Brocadia sinica														
Brocadia flugida														
total														
RUN2 Top														
Jettenia caeni														
Brocadia flugida														
total														

4. 結論と今後の展望

RUN1, RUN2 共に Top, Middle, Bottom のバイオマスで Ca.“Anammoxoglobus propionicus”の増殖は確認されなかった. RUN1 の Bottom では Ca.“Brocadia sinica”の存在割合が減少したが植種源では見られなかった Ca.“Brocadia flugida”の存在割合が最も増えた. Ca.“Brocadia flugida”は Ca.“Anammoxoglobus propionicus”の次にプロピオン酸酸化能力の高いアナモックス細菌である. 今後は Ca.“Brocadia flugida”の集積培養のために RUN1 の培養条件を継続すると共に酢酸を有機酸として投入を試みる. また Top の Ca.“Brocadia sinica”の多

いバイオマスを排出可能なシーケンシングバッチリアクターを用いて培養を試みる.

参考文献

- 1) Kartal, B. *et al.*: Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, Syst. Appl. Microbiol., Vol.30, No.1, pp. 39-49, 2007.
- 2) Kartal, B. *et al.*: Candidatus ‘Brocadia fulgida’ :an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium, FEMS Microbiol. Ecol., Vol.63, No.1, pp.46-55, 2007.
- 3) Hsu, S.C. *et al.*: Successful enrichment of rarely found Candidatus Anammoxoglobus propionicus from leachate sludge, J. Microbiol. Biotechnol., Vol.24, No.7, pp.879-887, 2014.
- 4) 松村康平：完全混合リアクターを用いたプロピオン酸酸化能力をもつ新規アナモックス細菌の集積培養，平成 30 年度 広島大学卒業論文，2018.
- 5) Strous, M. *et al.*: The sequencing batch reactor as powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, Appl. Microbiol Biotechnol., Vol.50, No.5, pp.589-596, 1998.