

資 料

ANAMMOX菌による環境浄化の基礎研究（2）

ー循環式リアクター内に生息するANAMMOX菌の遺伝子解析ー

永田 善明*・田島 政弘*・塩村 隆信*

1. 目 的

排水からの新しい窒素除去法として、ANAMMOX菌による脱窒処理が注目されている。ANAMMOX菌はアンモニアを水素供与体とすることで亜硝酸を還元し、脱窒を行う独立栄養生物であるため、水素供与体としてメタノールなどの有機物を必要とする従来型の硝化脱窒法と比較した場合、処理費用の大幅な削減が期待できる¹⁾。

島根県内のK浄化センター（下水処理施設）で稼働している生物脱臭槽内の循環水では、アンモニア・亜硝酸の比が年間を通じてほぼ1：1で安定しており、ANAMMOX菌による脱窒処理に適した条件を備えている。筆者らは、この生物脱臭槽の循環水をANAMMOX菌によって脱窒処理することを目的として、槽内に生息する微生物群の菌相解析を行った²⁾。その結果、ANAMMOX菌の存在が確認できたため、この生物脱臭槽内の汚泥および循環水を種菌としてANAMMOX菌の集積培養に取り組むとともに、培養中の汚泥よりANAMMOX菌DNAを増幅し、既に報告されているANAMMOX菌DNAとの塩基配列比較を行ったので、その結果について報告する。

2. 方 法

2.1 循環式リアクターによるANAMMOX菌の集積培養

ANAMMOX菌の集積培養には、図1の模式図に示す循環式リアクターを用いた。リアクターにはA、Bそれぞれ1.1Lの容積を有するアクリル樹脂製円筒を用い、内部に生物担体としてポリエステル綿を充填した。配管及び脱ガス槽を含むリアクターの総容積は3Lである。培地は文献³⁾に従い、塩化アンモニウム、亜硝酸ナトリウムを主成分とする無機塩を水道水に溶解し作成した。リアクター外部はラバーヒーターで被覆し、培地を30℃に保温した。種汚泥にはK浄化センター生物脱臭槽より採取した汚泥1Lを用い、培地1.5Lとともに9L/分の流速でリアクター内を循環させ、生物担体に付着させた。

2.1.1 回分式培養

脱窒により消費されたアンモニア、亜硝酸は約7日間隔で補充した。pHは0.5mol/L硫酸により7.2となるよう調整

した。また、2週間毎にリアクター内の培地1.5Lを新しく調製した培地と交換した。

2.1.2 連続式培養

リアクター内で培地を循環させながら、窒素ガス曝気により脱窒素を行った新しい培地を3L/日、押し出し流れ方式で連続供給した。

2.1.3 脱窒状態の確認

リアクター内のアンモニウムイオン、亜硝酸イオン、硝酸イオンの各濃度をイオンクロマトグラフ法で測定し、それぞれの値から脱窒状態を考察した。

2.2 ANAMMOX菌16S rDNAの解析

リアクター内に生息する微生物のDNAは、培養開始後177日目にポリエステル綿に付着している汚泥よりISOIL（ニッポンジーン製）を用いて抽出した。ANAMMOX菌16S rDNAの増幅用プライマーには、ana16s-F/ana16S-R2の組み合わせとana16S-F/Bac1513Rの組み合わせを用いた²⁾。各プライマーの塩基配列及び16S rDNA中での位置を図2に示す。PCR用酵素にはKOD plus DNAポリメラーゼ（東洋紡製）を用い、94℃－15秒、50℃－2秒、68℃－90秒を1サイクルとして40サイクルの増幅を行った。反応終了後、アガロース電気泳動によりANAMMOX菌16S rDNAの増幅確認を行った。得られたPCR産物はpBluescript II SK＋ベクター（STRATAGENE製）にサブクローニングし、塩基配列決定に供した。塩基配列の決定は、LIC-4200S-

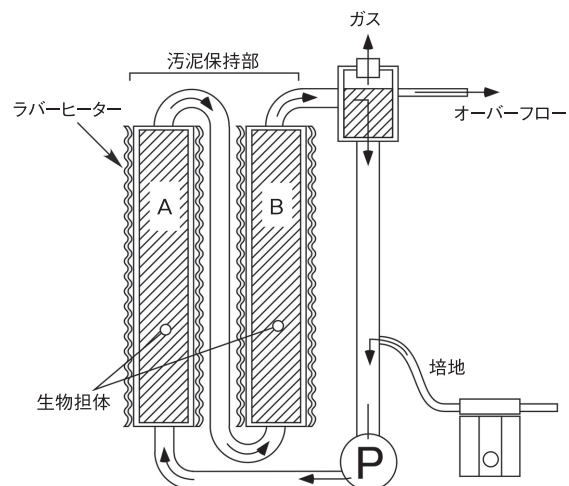


図1 循環式リアクターの模式図

*環境技術グループ

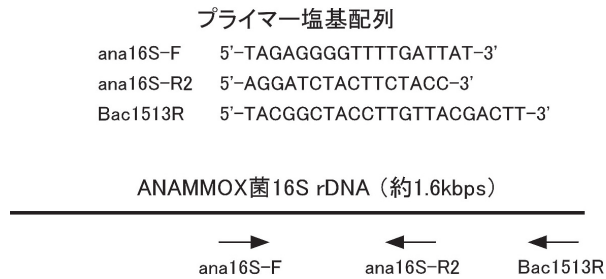


図2 プライマーの塩基配列及びANAMMOX菌16S rDNA中における各プライマーの位置

1G DNAシーケンサー (NEN製) を用いてダイプライマー法により行った. ANAMMOX菌の遺伝子配列データベースにはGenBankを利用し, 系統樹解析にはGENETYX version7 (ゼネティックス製) を用いた.

3. 結果および考察

3.1 回分式によるANAMMOX菌の集積培養

回分式による培養開始後177日目を経過するまでの, リアクター内の形態別窒素濃度を図3に示す. 全窒素濃度が大きい時はリアクターに窒素分が補充されたことを示しており, また濃度の減少は脱窒により窒素分が系外に排出されたことを示している. よって図3から, このリアクターにおいて脱窒が起こっていることがわかる. ANAMMOX菌による脱窒では, 実験式からアンモニア1molと亜硝酸1.32molを消費し, 硝酸を0.23mol生成するとされている^{4), 5)}. しかし, 本リアクターにおける窒素収支を考えると, 脱窒により消費される主な基質は亜硝酸イオンで, アンモニウムイオンの減少はわずかである. 従って, この時点で現象としてANAMMOX菌による脱窒が起こっていると判断するには至らなかった. 本培養で使用した種汚泥中にANAMMOX菌が存在することは前述したが, ここで再度リアクター内の汚泥を採取し, 塩基配列を決定してANAMMOX菌の有無を確認することとした.

3.2 ANAMMOX菌16S rDNAの塩基配列決定および系統樹解析

培養開始後177日目にリアクターより汚泥を採取し, PCR法によるANAMMOX菌16S rDNAの増幅を行った. PCR産物のアガロース電気泳動結果を図4に示す. この図に示されるように, ana16S-F/ana16S-R2およびana16S-F/Bac1513Rのいずれの組み合わせからも良好な増幅結果が得られたため, これらのPCR産物をベクターにサブクローニングした後, 塩基配列を決定した. 図5に, 決定したANAMMOX菌16S rDNAの塩基配列を示す. 今回決定したのは, 16S rDNAの後半部分652塩基である. この塩基配列を用いて, すでに報告されているANAMMOX菌16S rDNAとの系統樹解析を行った結果をGenBank Accession NO.とともに図6に示す. この結果から, リアクターから得られたANAMMOX菌16S rDNAはすでに報告されている

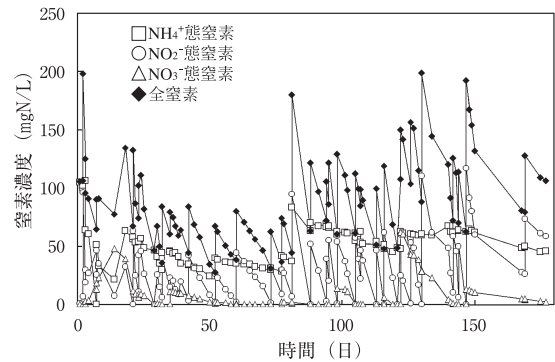


図3 回分式培養におけるリアクター内の形態別窒素濃度の変化 (1-177日)

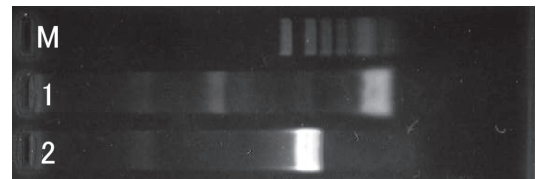


図4 リアクター汚泥DNAより増幅したANAMMOX菌16SrDNA PCR産物

(M) DNAマーカー ϕ 174/Hae III, (1) プライマー ana16S-F/ana16S-R2の組み合わせによるPCR産物, (2) プライマー ana16S-F/Bac1513Rの組み合わせによるPCR産物

ANAMMOX菌の16S rDNAとの相同性が高く, 特に日本国内で集積培養されたKU-2(AB054007)⁶⁾ とは塩基配列の98.4%が一致しており, 極めて近い類縁関係にあることがわかった.

ここで, リアクター内にANAMMOX菌が明らかに存在したという結果をもとに, 回分式による集積培養でANAMMOX活性が得られなかったことについて考察する. ANAMMOX活性の発現を現象として確認するためには, ある程度菌体の量が必要となる. ANAMMOX菌の脱窒活性の発現を確認した培養日数を見ると, 82日⁶⁾ から370日⁷⁾ とばらついているが, かなりの培養日数が必要なのが報告されている. これは, ANAMMOX菌の増殖速度が極めて小さいため, ある程度の菌体を集積するのに要した日数と考えられる. 従って, 本回分式培養においてANAMMOX活性が発現しなかった理由としては, 培養日数の不足で増殖しなかった, あるいは増殖はしたが流亡してしまった, の二つが考えられた.

3.3 連続式によるANAMMOX菌の集積培養

培養開始後178日経過後に, 1) リアクター内の培地濃度の変動を小さくするため, 培地を押し出し流れ式による連続供給とする, 2) 定常状態にあるリアクター内と供給する培地中の溶存酸素を予め排除しておくことで, 硝化反応を抑制する, という2条件を設定し, 連続式によるANAMMOX菌の集積培養を行った. 連続式培養における各形態の窒素除去量の経時変化を図7に示す. この培養期間中, 全窒素除去量はほぼ5-10mgN/日程度で安定的に推

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
TAGAGGGGTT TTGATTATTT CTCTGCCGGA GCTAACGCAT TAAGTGCCCC GCCTGGGGAG TACGGCCGCA AGGTAAAAAA CTCAAAAGAA
100     110     120     130     140     150     160     170     180
TTGACGGGGG CTCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGCTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC CTTACCGGGG CTTGACATGG TAGAAGTAGA
190     200     210     220     230     240     250     260     270
ATCCTGAAAG GTGACGATCG GTATCCAGTC CGAAGCTATC ACAGGTGTTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAG TTGGGTAAAG
280     290     300     310     320     330     340     350     360
TCCCCTAACG AGCGAAACCC TTGTCTTTAG TTGCTAACGG GTAATGCTGA GCACCTTTAGA GAGACTGCCG TCGTTAAGAC GGAGGAAGGT
370     380     390     400     410     420     430     440     450
GGGGACGACG TCAAGTCATC ATGGCCCTTA TGTCCCGGGC TGCACACGTG CTACAATGGT CGGTACAAAG GGATGCTAAG TCGCGAGATG
460     470     480     490     500     510     520     530     540
GTGCGAAACC TATAAAGCCG ATCTCAGTTC AGATTGGAGG CTGAAACTCG CCTCCATGAA GTTGGAATCG CTAGTAATCG CGGATCASTA
550     560     570     580     590     600     610     620     630
CGCCGCGGTG AATATGTTCC CGAGCCTTGT ACACACCGCC CGTCAAGCCA CCCAAGCAAG ATGCACCCAA AATCGCCTGC CTAACCCGTA
640     650     660     670     680     690
AGGGAGGGAA GTGCCTAAGG TGTGTTTTGT GAGGAGGACT AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG TA

```

図5 リアクターから得られたANAMMOX菌16S rDNAの塩基配列
PCRプライマーの配列を除く16S rDNAの後半部分652塩基の配列。下線部はPCRプライマー由来の塩基配列。

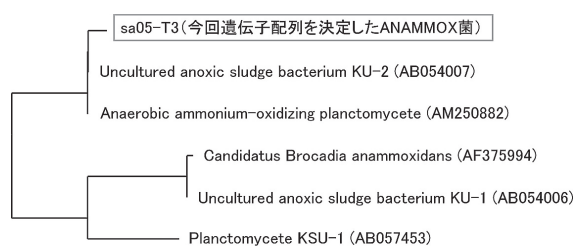


図6 リアクターから得られたANAMMOX菌16S rDNAと既報のANAMMOX菌16S rDNAの系統樹解析結果

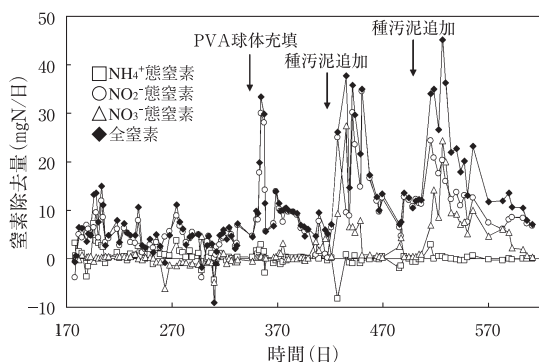


図7 連続式培養におけるリアクターからの各形態別窒素除去量の経時変化（178-611日）

移したが、その中心は亜硝酸イオンの消費によるものであり、アンモニウムイオンの減少は見られなかった。

培養開始後350日経過以降は、リアクターB内の生物担体をポリエステル綿からポリビニルアルコール（以下PVAと称す）球体^{8）}に変更し、また421日目、506日目に種汚泥を各1L補充した。PVA球体充填直後、および種汚泥追加直後に一時的な窒素除去量の上昇が見られたが、これらはPVA球体、種汚泥中に含まれる有機物を水素供与体とする通常の脱窒反応によるものであり、ANAMMOX菌

による脱窒ではないと考えられる。

最終的に、培養開始後611日に至ってもアンモニウムイオンの減少は観察されなかった。また、窒素除去量がわずかであること、外部から有機物を添加していないことから、脱窒は主にリアクター内に生息する脱窒菌の内性呼吸によるものと考えられた。

今回の培養では、リアクター内に既報のANAMMOX菌と類縁関係のあるANAMMOX菌の存在が確認できたが、集積培養においては最終的にANAMMOX活性を得ることができなかった。文献^{3）}によると、成功例の培地は地下水によって作成されていたため、培地中に微量元素を豊富に含んでいる可能性が高いと判断される。よって、今回ANAMMOX活性が得られなかった理由としては、培地中の微量元素の不足によるANAMMOX菌の増殖不良が考えられる。

文 献

- 1) 古川憲治, 嫌気性アンモニア酸化 (anammox) の発見とその後の研究開発動向, 水環境学会誌, 27, 2-7 (2004)
- 2) 永田善明, 田島政弘, 塩村隆信, ANAMMOX菌による環境浄化の基礎研究 (1), 島根県産業技術センター研究報告, 41, 5-9 (2004)
- 3) Fujii, T., Sugino, H., Rouse, J.D., Furukawa, K., Characterization of the Microbial Community in an Anaerobic Ammonium-Oxidizing Biofilm Cultured on a Nonwoven Biomass Carrier, J. Biosci. Bioeng., 94, 412-418 (2002)
- 4) Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Rovertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G., Metabolic Pathway of Anaerobic Oxidation on the Basis of 15N Studies in a Fluidized Bed Reactor, Microbiology, 143, 2415-2421 (1997)
- 5) Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool for the Study of Slowly Growing Anaerobic Ammonium-Oxidizing Microorganisms, Appl. Environ. Microbiol., 50, 589-596 (1998)
- 6) 今城麗, 安井秀齊, 石田浩昭, 藤井隆夫, 杉野浩幸, 古川憲治, 活性汚泥からのANAMMOX微生物の集積培養, 水環境

- 学会誌, 27, 413-418 (2004)
- 7) 對馬郁夫, 金田一智規, 岡部聡, 渡辺義公, ANAMMOX集積汚泥の微生物構造および機能解析, 第38回日本水環境学会年会講演集, 370 (2004)
- 8) 吉田憲治, Rouse, J. D., 今城麗, 古川憲治, 嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 汚泥の調整に関する研究, 土木学会年次学術講演会講演概要集, 323-333 (2001)