

平成21年 5月12日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19760373  
 研究課題名（和文）超高速型アナモックスリアクターの安定化技術の確立と  
 生物膜群集構造と機能の解析  
 研究課題名（英文）Stabilization of super high-rate anammox reactors and analysis of  
 the community structure and function.

研究代表者  
 金田一 智規 (Tomonori Kindaichi)  
 広島大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号：10379901

研究成果の概要：アナモックスリアクターの長期安定化をはかるために、実排水を想定した低分子有機酸存在下でのアナモックス活性の評価を行った。その結果、酢酸およびプロピオン酸はアナモックス活性に影響を与えないことが明らかとなった。本リアクター内には二種類のアナモックス細菌が存在し、その一方は有機酸に耐性のある種に近縁であった。リアクター内に共存する他栄養細菌は放射性同位元素を用いて有機物の追跡を行ったところ、アナモックス細菌由来の有機物質を分解しており、系内に有機物の蓄積を防ぐ役割をもつことが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）、微生物群集構造、MAR-FISH法

## 1. 研究開始当初の背景

閉鎖性水域の富栄養化防止、地下水の硝酸塩汚染への対策の観点から効率的な窒素除去技術の確立が求められている。従来、硝化反応と脱窒反応を組み合わせた生物学的窒素除去プロセスが多く採用されてきたが、このプロセスでは、硝化反応においては十分な曝気が必要とし、脱窒反応においてはメタノールなどの外部炭素源の添加、もしくは、大量の硝化液循環を必要とするため、このプロセスの達成には多くのエネルギー資源が必要となっている。一方、近年アナモックス（嫌

気性アンモニア酸化）反応を用いた窒素除去プロセスが注目されている。アナモックス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、省エネルギーかつ副産物の生成がない理想的な独立栄養性の微生物反応である。

アナモックス反応を担う細菌が発見されたのは最近のことであり、1995年にデルフト工科大学のグループにより発表されている。国内では大学や企業などいくつかの研究グループがアナモックス細菌の集積培養に成

功している。また、現在ではアナモックス細菌は環境中に広く存在することがわかっているが、適切な培養条件が十分に明らかにされていないことや、比増殖速度が極めて小さく培養が非常に困難であることから、これまでに環境中から分離した事例はなく、海外も含めて実規模のアナモックス処理プロセスはほんの2,3件しかないのが現状である。

現在、我々の研究室では小規模の生物膜リアクターを用いてアナモックス細菌の集積培養に成功しており、連続的なアナモックス反応を確認している。250日間の運転で窒素除去率は80%以上を維持しながら、最大窒素除去速度  $26 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$  という極めて高い処理性能を示した。この窒素除去速度は従来の硝化脱窒による速度と比べると数十倍の能力があるものの、突発的にアナモックス活性が低下することがある。また、この高窒素除去能力を持つアナモックス細菌群集の構造、分布および活性についての知見はほとんど得られていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

アナモックスリアクターを安定的に運転させるためにはリアクター内にアナモックス細菌をいかに高活性のまま大量に保持するかがキーポイントとなる。しかしながら、現在稼働中の理想的な条件かつ人工排水を用いたリアクターの場合においてもアナモックス活性が突然低下することがある。本研究では、アナモックス細菌の活性に影響を及ぼす阻害物質濃度を探るとともに、リアクター最適運転条件の検討を目的とする。また、この実験と並行して、高窒素除去を担うリアクター内のアナモックス細菌の存在量および空間的分布などの生物膜群集構造の解析を行い、生物膜内に共存共生するアナモックス細菌以外の細菌の機能を推定することを研究の目的とする。このように、なぜその微生物生態系が構築されているかを微生物群集レベルで明らかし、運転条件に反映させるというリアクターレベル（マクروسケール）と微生物群集レベル（ミクروسケール）から得られる知見の相互フィードバックによって、安定的な微生物生態系が構築でき、微生物機能強化型のリアクターの設計手法の確立という最終目標が達成できると考えられる。

## 3. 研究の方法

図1に研究方法の概略を示す。実験は大きく二つに分かれ、以下に詳細を示す。

(1) リアクターの運転条件の最適化と活性に影響を与える因子の検討

アナモックス細菌の集積培養が困難な理由のひとつに、自身の代謝産物によって活性が阻害されることがある。このため連続式リ

アクターによる培養の方が代謝産物も排出でき、集積培養に有利であると考えられるが、アナモックス細菌の活性に影響を及ぼす阻害物質・代謝産物の特性に関する検討は十分に行われていない。溶存有機物や溶存酸素を含む実排水をアナモックスリアクターに通水させた場合、アナモックス細菌の活性が低下すると考えられる。そこでまず、人工排水に溶存有機物（酢酸などの低分子有機酸）を加えた排水を用いてアナモックス活性の回分試験を行う。また、硝酸性窒素の添加の有無によりバイオマス中に存在する脱窒活性にも同時に評価を行う。このときのアナモックス活性の評価にはアンモニア性窒素の減少速度から求める異化代謝能と  $^{14}\text{C}$  炭酸の取り込み速度から求められる同化代謝能の両方の観点から活性を評価する。さらにアナモックスリアクターの実用化のために不可欠な実排水を用いた窒素除去性能および溶存有機物濃度の影響について検討を行う。実排水として下水処理場の二次処理水を対象とする。予備的検討の結果、県内の都市下水浄化センターの二次処理水は有機物、懸濁物質および溶存酸素がほとんどなく、窒素成分のみを含む処理水であるために、独立栄養細菌であるアナモックス細菌を用いた窒素除去に適していると考えられる。実験は実排水として用いる二次処理水中に含まれる有機物量（DOC）や栄養塩類、溶存酸素のモニタリングを行うとともに、高窒素除去能力を有するアナモックスリアクターに実排水を通水させたときの窒素除去能力をモニタリングする。

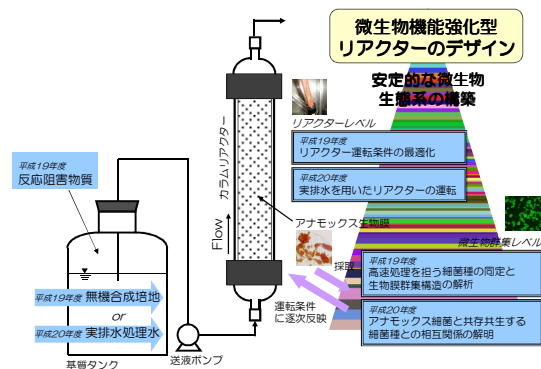


図1 研究方法の概略

(2) 高速処理を担う細菌種の同定と生物膜群集構造の解析

リアクターの流出水中に含まれる微生物細胞から DNA を抽出し予備的な系統解析を行ったところ、本リアクター内のアナモックス細菌は既報のアナモックス細菌と系統学的に異なる可能性がある。そこで、この高速アナモックス反応に関与する細菌を種レベルで特定するために 16S rRNA 遺伝子系統解析を用いて群集構造の把握を行う。まず、高

窒素除去速度を維持しているリアクターの生物膜から DNA を抽出し、全細菌を対象としたプライマーセットを用いて PCR 増幅後、クローニングを行い、全塩基配列を解読する。その後系統樹を作成し、報告のあるアナモックス細菌との系統学的距離を解析し、新種のアナモックス細菌の可能性を探る。

実験で用いる上向流生物膜リアクターにおける流れ方向のアナモックス細菌の分布を FISH 法により検討する。もし均一に分布していれば、その滞留時間が適切であり、もしカラム上部において存在量が少なければ滞留時間を短くし、生物膜全体に分布するように運転する。このように本実験は (1) の実験と連動して行うことで微生物群集レベルの知見を最適運転条件に反映させることができる。さらに、(1) の実験においてはリアクター内の微生物群集構造は変化しないと考えられるが、リアクター内の微生物群集構造が変化した場合は FISH 法および 16S rRNA 遺伝子系統解析を用いて群集構造の把握を行う。リアクター内の微生物群集構造は FISH 法などを用いて随時モニタリングする。

アナモックス細菌は細胞外に代謝産物として有機物を排出し、この代謝産物が生態系内に高濃度に蓄積すると、アナモックス細菌自身の活性を阻害すると考えられているが、安定した微生物生態系では細胞外代謝産物は効率的に従属栄養細菌により利用され無機化されているとも考えられる。また、その細胞外代謝産物を分解する従属栄養細菌は一種類ではなく、様々な系統分類にわたる複数種の微生物の分業により段階的に低分子化されていると考えられる。アナモックス細菌にとって従属栄養細菌は自らの老廃物としての代謝産物を分解除去してくれる存在であり、従属栄養細菌にとってアナモックス細菌は有機物の提供者であることから、この両者の関係を共生関係の一つと考えることができる。つまり、この共存共生微生物はリアクターが目的とする処理反応は行わないものの、安定した微生物生態系の維持のために必要不可欠な存在といえる。したがって、この共存共生微生物の群集構造および機能（基質資化特性）を明らかにすることが重要となる。実験は放射性同位体元素で標識された重炭酸 ( $\text{H}^{14}\text{CO}_3$ ) を炭素源、 $\text{NH}_4^+$  を電子供与体、 $\text{NO}_2^-$  を電子受容体として小型バイアル瓶により短時間培養を行う。この段階ではアナモックス細菌の菌体のみが  $^{14}\text{C}$  で標識され、この菌体由来の  $^{14}\text{C}$  有機物を代謝産物として用い、再びアナモックスバイオマスとともに培養することで、共存共生微生物がアナモックス細菌由来の有機物を利用すれば、 $^{14}\text{C}$  で標識されることになる。この  $^{14}\text{C}$  を利用した共存共生微生物を MAR-FISH 法により可視化し、各微生物種の基質資化特性を調査する。

#### 4. 研究成果

##### (1) アナモックス活性に影響を与える因子の検討

人工基質を用いた運転では、200 日以上にわたって除去率 70%以上を維持しながら安定した運転が達成でき、その平均窒素除去性能は  $10 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$  以上（最大  $24 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ ）を達成できた。

次に実排水を想定した低分子有機酸存在下でのアナモックス活性の評価を検討した。運転中のリアクターから採取したアナモックスバイオマスに有機酸（ギ酸、酢酸、プロピオン酸）を添加し、回分のアナモックス活性試験を行ったところ、酢酸、プロピオン酸においては異化代謝によるアナモックス活性に影響を与えず、むしろ増加する傾向が得られた。一方で、 $^{14}\text{C}$  炭酸取り込みから求められる同化代謝によるアナモックス活性はギ酸による減少が最も大きく、酢酸やプロピオン酸ではわずかに活性が低下するという傾向が得られた。

有機物を含む排水として都市下水処理場の処理水（放流水）をアナモックスリアクターに通水した場合、放流水中に含まれる有機物濃度や浮遊物質濃度はわずかであり、アナモックス細菌の活性には影響を及ぼさないことが確認できた。

##### (2) 高速処理を担う細菌種の同定と生物膜群集構造の解析

まず、本リアクター内に存在するアナモックス細菌を系統解析や FISH 法により細菌種の同定を行った。その結果、リアクター内には二種類のアナモックス細菌が存在し（図 2）、優占的なアナモックス細菌は系統学的に近年報告のあった酢酸に対して耐性があるアナモックス細菌（*Candidatus Brocadia flugida*）と近縁であることが明らかとなった。また、このアナモックス細菌以外にも別の種（初期の植種源に存在していたもの）も検出された。このように数種のアナモックス細菌をリアクター内に保持する技術が確立できれば、負荷変動のあるような排水、特に、有機物を含む排水に対してアナモックスプロセスを適用する上で、有利であると考えられる。

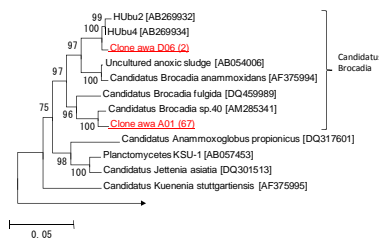


図 2 アナモックス細菌の系統樹

アナモックスリアクター内の微生物群集構造を解析したところ、リアクター内にはア

ナモックス細菌が優占種（90%）ではあるものの、それ以外の細菌（10%）も存在しており、これらの共存細菌は系統学的に非常に多様であった。アナモックスリアクター内に共存する細菌として *Chloroflexi* 門（34%）、*Betaproteobacteria* 綱（29%）、*Chlorobi* 門（22%）に属する細菌が存在することが明らかとなった。これらの細菌グループの基質利用特性を MAR-FISH 法により解析した結果、糸状性の *Chloroflexi* 門が細胞壁の構成成分と考えられる N アセチルグルコサミンやスクロース、グルコースを同化できることが明らかとなった。次に cross-feeding を利用する 2 段階に分けた培養法によって MAR-FISH 法を行った結果、糸状性の *Chloroflexi* 門の細菌がアナモックス細菌由来の有機物質を利用していることが明らかとなった。これらの結果によりリアクター内の共存する *Chloroflexi* 門の細菌はリアクター内に有機物質が蓄積するのを防ぐ働きをもつことが示唆され、必ずしもアナモックス細菌が 100% である群集構造は必要がないことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 16 件）

1. 栗田貴宣, 金田一智規, MAR-FISH 法を用いた低級脂肪酸の ANAMMOX 反応に及ぼす影響, 第 43 回日本水環境学会年会, 2009 年 3 月 18 日, 山口市
2. 百合昭太, 金田一智規, ANAMMOX リアクター内の微生物群集の機能・構造解析, 第 43 回日本水環境学会年会, 2009 年 3 月 16 日, 山口市
3. 百合昭太, 金田一智規, ANAMMOX リアクター内の細菌群集の機能・構造解析, 第 45 回環境工学研究フォーラム, 2008 年 11 月 29 日, 大阪市
4. 栗田貴宣, 金田一智規, 低級脂肪酸が ANAMMOX 反応に及ぼす影響, 第 45 回環境工学研究フォーラム, 2008 年 11 月 29 日, 大阪市
5. 栗田貴宣, 金田一智規, 低級脂肪酸存在下での ANAMMOX 活性, 第 24 回大会日本微生物生態学会, 2008 年 11 月 26 日, 札幌市
6. 金田一智規, アナモックスプロセスにおける低分子有機酸の影響, 第 16 回衛生工学シンポジウム, 2008 年 11 月 14 日, 札幌市
7. 栗田貴宣, 金田一智規, 低分子有機酸存在下の ANAMMOX の活性評価, 第 63 回

- 土木学会年次学術講演会, 2008 年 9 月 10 日, 仙台市
8. 栗田貴宣, 金田一智規, ANAMMOX プロセスにおける有機物質添加による活性評価, 第 60 回土木学会中国支部研究発表会, 2008 年 5 月 31 日, 広島市
9. 金田一智規, Community Analysis of Coexisting Bacteria in ANAMMOX Reactors, COE シンポジウム, 2008 年 1 月 22 日, 長岡市
10. 金田一智規, ANAMMOX リアクター内における共存細菌の機能解析, 第 44 回環境工学研究フォーラム, 2007 年 11 月 16 日, 山口市
11. 金田一智規, ANAMMOX リアクター内に共存する細菌群集の構造と機能解析, 第 15 回衛生工学シンポジウム, 2007 年 11 月 9 日, 札幌市
12. 金田一智規, ANAMMOX リアクター内に存在する細菌群集の構造と機能解析, 第 10 回日本水環境学会シンポジウム, 2007 年 9 月 18 日, 熊本市
13. 下川正貴, 金田一智規, 上向流 ANAMMOX バイオフィルムリアクターの構築と処理特性, 第 10 回日本水環境学会シンポジウム, 2007 年 9 月 18 日, 熊本市
14. 岡部聡, 金田一智規, ANAMMOX バイオフィルムの生態学的構造と機能解析, 第 10 回日本水環境学会シンポジウム, 2007 年 9 月 18 日, 熊本市
15. 下川正貴, 金田一智規, Key physiology of ANAMMOX bacteria, 第 23 回日本微生物生態学会, 2007 年 9 月 16 日, 松山市
16. 百合昭太, 金田一智規, ANAMMOX リアクター内における微生物間の相互関係の解析, 第 62 回土木学会年次学術講演会, 2007 年 9 月 13 日, 東広島市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

金田一 智規 (Tomonori Kindaichi)  
 広島大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号：10379901

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

佐藤 久 (Hisashi Satoh)  
 北海道大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号：80326636

笠原 伸介 (Shinsuke Kasahara)  
 大阪工業大学・工学部・准教授  
 研究者番号：90309170