

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580487

研究課題名(和文)水質浄化用人工湿地におけるANAMMOX活性の分布と影響する要因の解明

研究課題名(英文)Distribution of ANAMMOX activity in a constructed wetland for wastewater treatment and effects of physico-chemical conditions on the activity

研究代表者

阿部 薫(Abe, Kaoru)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・その他

研究者番号：70355551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気条件下でアンモニウムイオンと亜硝酸イオンから窒素ガスを生じるANAMMOX菌が、アンモニア態と硝酸態窒素を含む浄化槽放流水の浄化用人工湿地に棲息していることを解明した。15N嫌気スラリー培養法で測定した湿地土壌のANAMMOX活性は、表層で最も高く、また流入口からの距離と負の、水分含量、亜硝酸態窒素濃度、ANAMMOX菌のDNAコピー数と正の有意な相関が認められ、基質が常に供給され亜硝酸が蓄積し易い適度な還元条件が必要と考えられた。また、流入口近傍の植生のある常時湛水地点で、常に最も高い活性が観測された。DNAクローン解析の結果、土壌中では浄化槽と異なるアナモックス菌の定着が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An anaerobic ammonium oxidation (anammox) process, which oxidizes NH_4^+ to N_2 using NO_2^- under anoxic conditions, is a novel nitrogen removal process different from a conventional nitrification-denitrification process. We clarified the distribution of anammox bacteria in a constructed wetland receiving effluent from a wastewater treatment facility. Potential anammox activity, which was estimated using a nitrogen isotope pairing technique was greatest in the upper soil layer. Potential anammox activity was negatively correlated with distance from the inflow point, and positively correlated with soil water content and NO_2^- concentration. The highest activity and highest copy number of anammox genes were observed at a site that was submerged, vegetated, and near the inlet. Phylogenetic analysis revealed that anammox bacteria in the wetland had greater similarity to uncultured anammox bacteria from freshwater environments than to that from the wastewater treatment facility.

研究分野：環境農学

キーワード：人工湿地 ANAMMOX 浄化

1. 研究開始当初の背景

湿地生態系の水質浄化機能を強化・活用した人工湿地法は、施工や維持管理に費用がかからないことから、世界的に利用され、我が国でも、有機性汚濁や栄養塩類除去の目的で湖沼や河川、畜産系排水、浄化槽放流水などへの適用が認められる (Cooper et al. 1999, Abe et al. 2010)。人工湿地における窒素除去のメカニズムについては、湿地植生による吸収、土壌粒子への吸着なども一定の寄与があるが、土壌微生物による硝化 - 脱窒のプロセスが最も重要と考えられている (Vymazal, 2007)。申請者等が調査を継続している浄化槽放流水浄化用人工湿地においても、植物への吸収や土壌への蓄積の窒素浄化への寄与はそれぞれ 2-3 割である (Abe et al. 2008 他)。

近年、従来の硝化 - 脱窒とは異なる嫌気的アンモニウム酸化 (Anaerobic Ammonium Oxidation: ANAMMOX) という新しい窒素除去プロセスが、オランダの排水処理プラントで発見され、デルフト工科大学の研究グループにより報告されている (Mulder et al., 1995)。

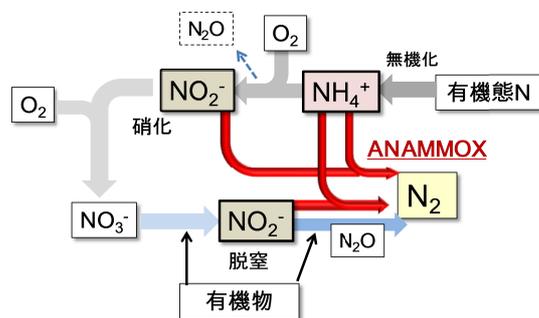


図1. 窒素サイクルと ANAMMOX 反応

この反応は、図1に示すように、アンモニウムイオンと亜硝酸イオンから窒素ガスを生じるもので ($NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$)、Planctomycetes 門に属する絶対嫌気性独立栄養細菌により担われる新規な窒素サイクルである。排水処理分野においては、アンモニアを硝酸まで酸化しなくても良いため酸素供給量を半減できる、脱窒の水素供与体添加の必要がない、亜酸化窒素の生成がないなどのメリットが期待できることから、研究が精力的に行われ (Waki 2010 他)、実用の排水処理プラントも開発されている。

排水処理施設での発見の後、ANAMMOX 細菌の自然界における生息場所をさぐる研究が進み、海洋生態系における多くの研究報告から、海洋の窒素サイクルにおける ANAMMOX の重要性が指摘されている。陸域生態系についても、富栄養化した湖の底泥などにおいて、脱窒に比べ ANAMMOX 反応による窒素除去の寄与が高い領域が見いだされている (Yoshinaga et al., 2011)。排水処理装置や海洋生態系における研究から、ANAMMOX 反応に適した条件として、溶存酸素濃度 $< 2 \mu$

M、 NO_2^- が高すぎない ($< 10 \text{ mM}$)、適度な窒素成分の供給、 $pH 6.7 \sim 8.3$ などが挙げられている。陸域生態系のなかで、水質浄化用の人工湿地は、流入水から窒素化合物が供給され、湿地土壌内が還元的な環境にあることから、ANAMMOX 細菌の生息場所として適した環境と考えられる。近年、窒素動態の観測から、人工湿地における ANAMMOX 反応の存在を示唆する論文が報告されるようになり、無視できない役割を担っていると考えられている (Erlar et al., 2008, Zhu et al., 2010)。

しかしながら、ANAMMOX 細菌の湿地生態系における生息環境や反応に影響する環境条件については、殆ど未解明である。

水質浄化用人工湿地において、酸素供給の少ない環境で進行し、温室効果ガスの発生のない ANAMMOX 反応の有効利用は、アンモニア濃度が比較的高い流入水の窒素除去を強化する手法として魅力的であり、反応に影響する環境条件の解明は、湿地の設計や管理に新しい方向性を与える可能性を秘めている。

2. 研究の目的

水質のモニタリングを続けている、表面流人工湿地 (休耕田を利用、浄化槽放流水の高度処理用) には、アンモニア態と硝酸態窒素が同程度に流入する。本研究では、この水質浄化用人工湿地において、土壌中の ANAMMOX 活性の分布を調査すると共に、湿地内の環境条件分布と環境条件 (反応基質の供給状況、湛水状況、水生植物の分布、土壌の形態別窒素濃度など) を調査し、ANAMMOX 活性を規定する要因を解明する。さらに、アナモックス菌に関する微生物群集構造解析および定量を行い、菌の由来や活性との関係を解明する。

3. 研究の方法

(1) 調査湿地: 31m x 16m、水深 0.1m の表面流型湿地で、マコモ (*Zizania latifolia* L.) が栽植されており、鯉淵学園学生寮の合併浄化槽放流水 (約 10,000 L/d) が流入している (図2)。

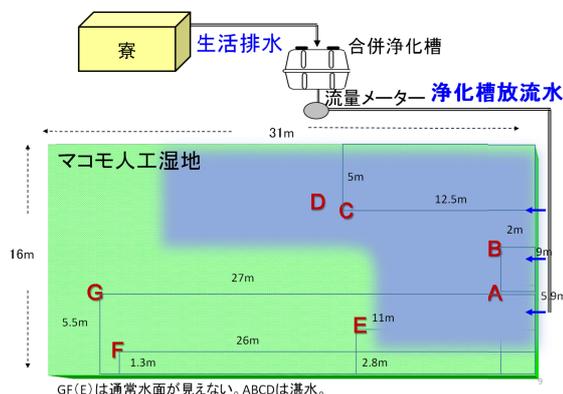


図2 人工湿地と土壌採取地点

(2) ANAMMOX 活性の分布調査: 予備調査で活性の認められた地点において、2012年6月に

サイトDにおいて深度別(0~-2、-2~-5、-5~-10cm)に3点の土壌コアを採取し、ANAMMOX活性を測定した。

また、浄化槽放流水入口からの距離、水深、周辺植生など環境条件が異なる7地点(サイトA~G)で、4回(7月、9月、11月、2月)、表層土壌(2cm深まで)を採取し、ANAMMOX活性を測定した。

ANAMMOX活性の測定：湿地土壌のANAMMOX活性は、 ^{15}N 標識試薬を用いた嫌気スラリー培養法(Yoshinaga et. al., 2011)によりGC-MSを用いて測定した(図3)。



図3. ^{15}N 標識スラリー培養法

(3) ANAMMOX 細菌の調査：アナモックス細菌を標的としたクローン解析および定量をおこなった。また合併浄化槽放流水(湿地流入水)についてもクローン解析をおこなった。系統解析、定量解析：土壌(サイトB; 9月および2月)および放流水から回収したSS成分より、ISOIL for beads beating kit(Nippon Gene Co., LTD., Japan)を用いてtotal DNAを抽出した後、プライマーAMX368FおよびAMX820Rを用いて、クローンライブラリを作成し、系統解析を行った。また同プライマーを用いてリアルタイムPCRを用いたアナモックス細菌数の定量解析を行った。

4)環境条件の計測：採取土壌について、土壌水分、仮比重、 2mol/L KCl抽出による湿地土壌の形態別窒素、埋設白金電極によるEh測定などの計測を行った。

4. 研究成果

(1) ^{15}N 嫌気スラリー培養法によるANAMMOX活性の検出に当たり、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ と $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$ 添加培養した場合と $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ 添加培養した場合とで(アナモックス反応は硝酸還元反応によって生成する亜硝酸を利用)、同様に N_2 が直線的に生成されたことから、今後は $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ と $\text{Na}^{14}\text{NO}_3$ を用いることとした(図4)。

(2) 湿地土壌10cm深までの深さ別のANAMMOX活性は、表層2cm > 2~5cm 深 > 5cm以深の順となり、表層の方が高かった(図5)。以後の湿地内の地点別分布調査は活性の高い表層2cmの土壌について行うことにした。

(3)湿地内の地点によりANAMMOX活性に大きな差が認められた(図6)。相関分析(Spearman)の結果、ANAMMOX活性は流入口からの距離とは負($r=-0.69$)の、含水率とは正($r=0.74$)の有意(0.1%水準)な相関関係が認められ、また、土壌の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度とは1%水準で有意な正の相関関係($r=0.50$)が認め

られた。含水率が高い地点は浄化槽放流水が流れ込み易い地点で、AとB地点は3回の調査時とも湛水しており(表面水がある)、CとD地点は9月を除き湛水していた。一方E、F、Gは概ね表面水の無い状態であった(図6)。ANAMMOX反応の基質を含む浄化槽放流水が連続的に供給されることと、 $\text{NO}_2\text{-N}$ が集積しやすい適度な還元条件が必要と考えられる。

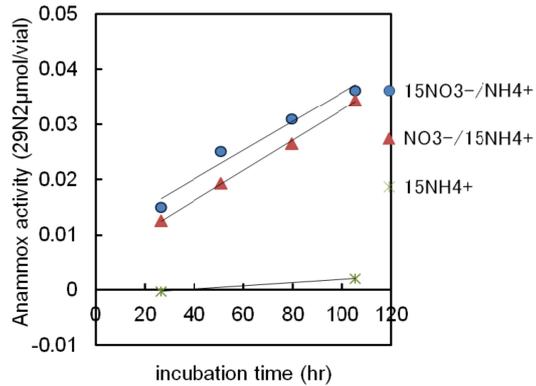


図4. ^{15}N スラリー培養法によるANAMMOX活性の検出

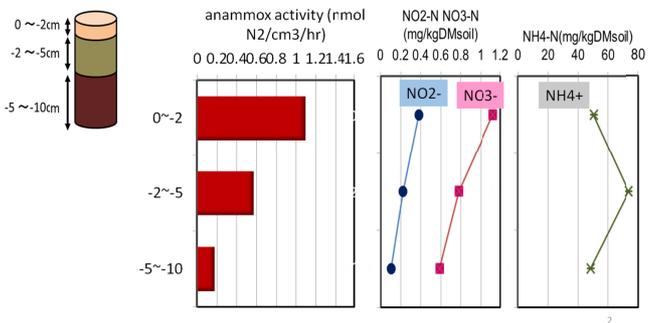


図5. 湿地土壌10cm深までの深さ別のANAMMOX活性分布

| | A | B | C | D | E | F | G |
|------|---|---|---|---|---|---|---|
| 湛水状況 | ○ | ○ | △ | △ | △ | △ | △ |
| 植生 | x | ○ | ○ | △ | ○ | ○ | ○ |

○ 湛水、植生 有り
x 湛水、植生 無し
△ 湛水、植生 僅かにありまたは一時期あり

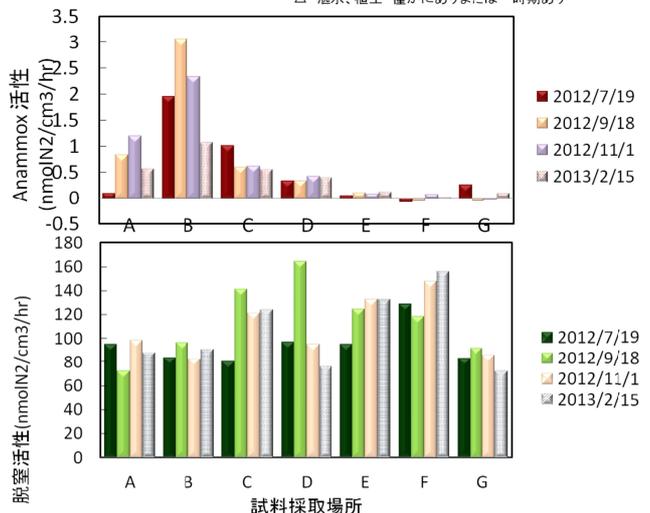


図6. 湿地内のサイト別のANAMMOX活性の分布

(4)常時湛水している2地点(AとB)では、植生のあるB地点の活性が顕著に高かった。また、同時に測定される脱窒活性(ポテンシャル)に対するANAMMOX活性の比率は低いものの、B地点では他の地点より顕著に高かった(約3%) (図7)。

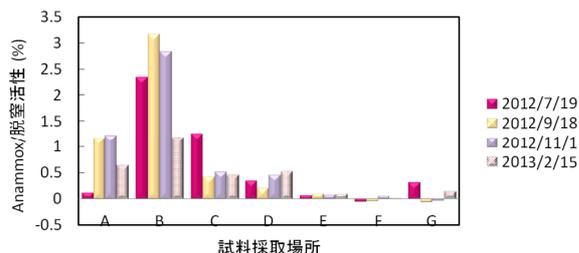


図7. サイト別のANAMMOX活性と脱窒活性の比率

(5)マコモの中心から10cm、20cm、40cmの距離の湿地土壌のANAMMOX活性を調べたところ、顕著な差は無かったが、外側の方が高い傾向が認められ、ANAMMOX活性と脱窒活性の比も同様な傾向であった。根の分布密度(重さ)は内側の方が高く、根量とANAMMOX活性の関係は明瞭でなかった。一般的にマコモの根圏は60cm程度まで分布していることから、外側の方が若い根が分布している可能性もあり、その影響も想定される。今後根の長さ密度や根活性との関係の検討の検討も必要と考えられる。

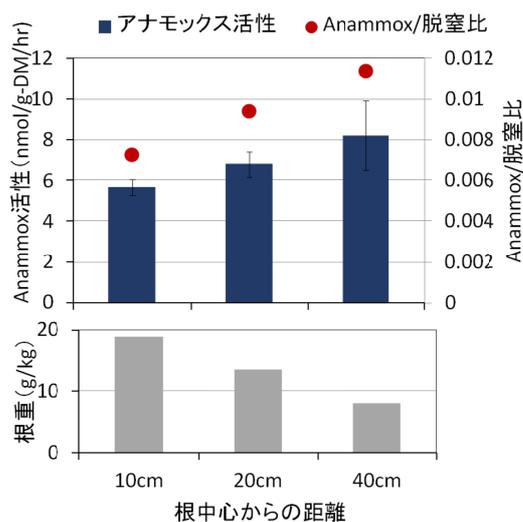


図8. マコモの中心からの距離と土壌のANAMMOX活性の分布

(6)サイトBおよび流入水についての系統解析の結果、各々について4つおよび3つのOTUが得られ、いずれも、水田、湖沼底泥、湿地などの淡水環境のアナモックスクローンと98-100%の相同性を示した。しかし、サイトBの土壌の主要なOTUと流入水の主要なOTUは93-94%の相同性しか示さず、土壌中では

浄化槽と異なるアナモックス菌が定着していると考えられた(図9)。

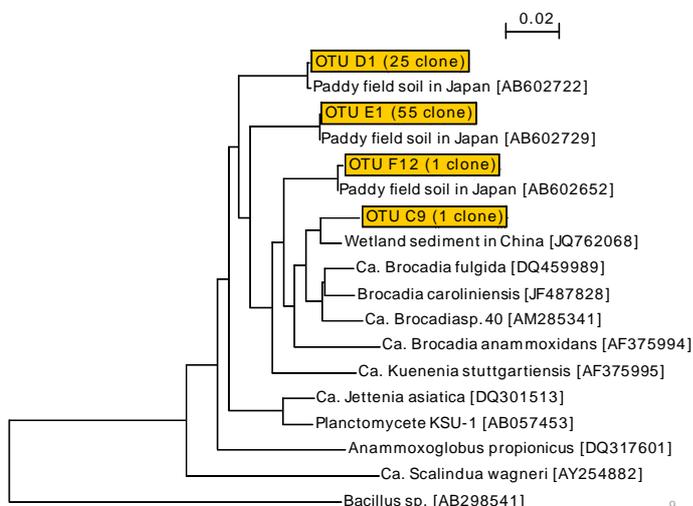


図9. 湿地土壌中のANAMMOX菌の系統解析

(7)定量解析の結果、アナモックス菌の16S rRNA遺伝子のコピー数はアナモックス活性の分布と概ね同様の傾向が得られ、サイトB(11月)において最大 1.42×10^{13} (copy/g-DNA)、 3.46×10^8 (copy/g-dry soil)であった(図10)。

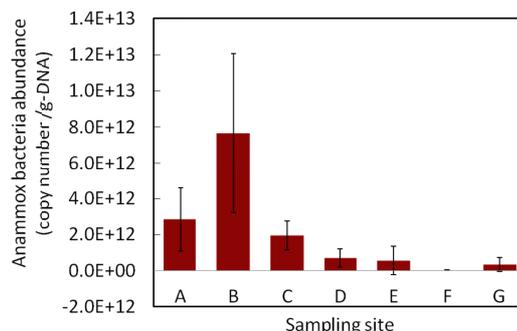


図10. リアルタイムPCRによるANAMMOXの定量解析

<引用文献>

- Cooper PF: A review of the design and performance of vertical flow and hybrid reed bed treatment systems. *Water Sci Technol*, 40 (3), 1-9 (1999).
- Abe K, Kato K and Ozaki Y: Vegetation-based Wastewater Treatment Technologies for Rural Areas in Japan. *JARQ*, 44 (3), 231-242 (2010).
- Vymazal J: Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 380, 48-65 (2007).
- Abe K, Komada M, Ookuma A: Efficiency of removal of nitrogen, phosphorus and zinc from domestic wastewater by a

constructed wetland system in rural areas: a case study, *Water Science and Technology*, 58(12), 2427-2433 (2008)
Mulder, A., Van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G.: Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(3), 177-184(1995).
Waki M et. al.: Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater, *Bioresource Technology*, 101, 2685-2690. (2010)
Yoshinaga I, Amano T, Yamagishi T, Okada K, Ueda S, Sako Y, and Suwa Y: Distribution and Diversity of Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) Bacteria in the Sediment of a Eutrophic Freshwater Lake, Lake Kitaura, Japan. *Microbes Environ.* 26, No. 3, 189-197(2011)
Erler D V, Eyre B D, and Davison L: The Contribution of Anammox and Denitrification to Sediment N₂ Production in a Surface Flow Constructed Wetland. *Environ. Sci. Technol.* 42, 9144-9152(2008).
Zhu G, Jetten MSM, Kusch P, Ettwig K, Yin C: Potential roles of anaerobic ammonia and methane oxidation in the nitrogen cycle of freshwater wetland ecosystems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 1043-1055(2010).

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 4 件)

Miyoko Waki, Tomoko Yasuda, Kazuyoshi Suzuki, Michio Komada, Kaoru Abe (2015) Distribution of Anammox Bacteria in a Free-Water-Surface Constructed Wetland with Wild Rice (*Zizania latifolia*) *ECOLOGICAL ENGINEERING*, 査読あり, 81, 165-172
DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.04.005
和木美代子 (2015)窒素を除去するアナモックス菌-畜産における可能性-、畜産環境情報、査読なし、56, 1-14.
Kaoru Abe, Michiko Komada, Akihito Ookuma, Sunao Itahashi, Kennji Banzai (2014) Purification performance of a shallow free-water-surface constructed wetland receiving secondary effluent for about 5 years, *ECOLOGICAL ENGINEERING*, 査読あり, 69, 126-133

DOI:10.1016/j.ecoleng.2014.03.040
和木美代子. (2014). 畜産廃水処理施設に存在するアナモックス菌とその利用の可能性. *水環境学会誌*、査読なし 37(9), 325-328.

〔学会発表〕(計 6 件)

和木美代子, 安田知子, 鈴木一好, 駒田充生, 阿部薫 (2014.3.17-19, 宮城県, 東北大学川内北キャンパス) 浄化槽放流水が流入する人工湿地における ANAMMOX 菌の分布, 第 48 回日本水環境学会年会 2014 講演集, 325
阿部薫, 和木美代子, 駒田充生 (2013.9.11-13, 愛知県, 名古屋大学) マコモ人工湿地における植生や排水流入の状況と ANAMMOX 活性, 日本土壌肥料学会 講演要旨集, 59, 169
阿部薫, 和木美代子, 駒田充生 (2013.3.11-13, 大阪府, 大阪工業大学) 浄化槽放流水が流入する人工湿地における ANAMMOX 活性の分布と環境条件, 日本水環境学会年会講演集, 314
和木美代子, 安田知子, 鈴木一好, 駒田充生, 阿部薫 (2013.9.2-5, 東京都, 中央大学) Anammox activity and 16S rRNA genes in a constructed wetland, 3rd International conference on nitrification, 81
和木美代子, 安田知子, 鈴木一好, 駒田充生, 阿部薫 (2013.6.11-12, Korea Seoul) Rate Determination of ANAMMOX Activity in a Constructed Wetland, The 2nd International Anammox symposium Proceedings, 63-64
阿部薫, 和木美代子 (2012.8.27-28, 宮城県, 東北大学フィールドセンター) 表面流型人工湿地における ANAMMOX 活性の分布について, 第 7 回人工湿地ワークショップ in 仙台 研究事例発表会, 2-4 3.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕 出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

Best Presentation Award 受賞和木美代子, 安田知子, 鈴木一好, 駒田充生, 阿部薫 (2013) Rate Determination of ANAMMOX Activity in a Constructed Wetland, The 2nd International Anammox symposium Proceedings, 63-64

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 薫 (ABE KAORU)

(独) 農業環境技術研究所 物質循環研究
領域 領域長

研究者番号：70355551

(2) 研究分担者

和木美代子 (WAKI MIYOKO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究
機構 畜産草地研究所 浄化システム研究
チーム 主任研究員

研究者番号：10355092

(3) 連携研究者

()

研究者番号：