

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18887

研究課題名(和文) 酸素と光に高い耐性を有する新たなAnammox細菌の探索と土壌浄化技術への展開

研究課題名(英文) Isolation of noble anammox bacteria possessing high tolerance of oxygen and light to develop soil remediation technology

研究代表者

川越 保徳 (Kawagoshi, Yasunori)

熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター・教授

研究者番号：00291211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)： 土壌やオキシデーションディッチ施設(OD)汚泥などを植種源として回分実験、連続実験を行い、耐酸素能に優れるAnammox細菌の集積培養に挑戦した。

その結果、2種類のOD汚泥から、溶存酸素濃度が6.0を超える好気状態の培地導入による連続リアクタにおいて典型的なAnammox反応の化学量論比での窒素除去能を発現し、良好な生育を示すAnammox細菌およびそれを含むバイオマスの集積培養することに成功した。次世代シーケンサーによる細菌叢解析より、2種類のAnammox細菌('Candidatus Anammoxoglobus' と 'Candidatus Brocadia') が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、Anammox細菌は偏性嫌気性の細菌であり、酸素濃度の高い自然環境での利用は困難と認識されてきた。しかし、本研究によって、溶存酸素濃度の高い培地供給下においても増殖して窒素除去能を示すAnammox細菌の集積培養に成功したことから、酸素のAnammox細菌への影響について新たな知見を与える可能性が高い。また、本研究で得られた集積培養バイオマスは、部分亜硝酸化-Anammox法など酸素濃度の比較的高い条件への適用に高いアドバンテージを有し、さらに今後は、人工湿地や土壌・底質の浄化といった汚染現場・現地における環境修復への応用、展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)： We succeeded in the establishment of enrichment culture of Anammox biomass which are highly tolerant to dissolved oxygen concentration (DO) from the sludge of two oxidation-ditch plants through batch and continuous experiments. The enriched anammox biomass showed well growth and high nitrogen removal performance in a continuous reactor supplied with the anammox medium including more than 6.0 mg/L DO. Two kinds of anammox bacteria of 'Candidatus Anammoxoglobus' and 'Candidatus Brocadia' were detected in the reactors from the bacterial community analysis by next-generation sequencing technique.

研究分野：水環境工学

キーワード：Anammox 酸素耐性 集積培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Anammox は、図 1 に示すようにアンモニアと亜硝酸が酸化還元反応を起こして窒素分子と少量の硝酸を生成するユニークな窒素代謝で、1995 年の発見¹⁾以降、水処理分野での Anammox 利用技術の開発は加速的に進んだ。Anammox を触媒する Anammox 細菌についても様々な水環境中での存在が確認され、窒素循環に果たす役割も大きいとされる²⁾。しかし、土壌環境における Anammox 反応や現場・原位置での土壌浄化に Anammox を積極的に応用しようとする研究事例は少ない³⁾。一方、Anammox を自然環境下で活用するには、酸素や光、温度などの自然条件の変化に柔軟に対応でき、土壌・底質環境での生育、増殖に秀でた Anammox 細菌が有利となるが、このような観点で Anammox 細菌の探索や培養を試みた研究例は無い。この理由には、これまでに報告されている Anammox 細菌は全て絶対嫌気性の独立栄養細菌であり、酸素や有機物などの条件が変動する自然環境での利用は困難との既成概念がある。しかし、Anammox 活性は比較的高い酸素濃度下の畑地土壌や沿岸底泥において確認されていることも事実である⁴⁾。

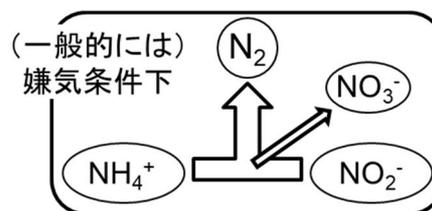


図 1 Anammox 反応の概要

申請者はこれまで海洋性 Anammox 細菌の集積培養系の構築や一槽型の亜硝酸化-Anammox 法など、Anammox に関する先進的な研究を行い、成果を得てきた。その一方で、国際研究交流などを通じ、主に東南アジア諸国の沿岸域におけるえび養殖場底泥の過度の窒素汚染や埋立処分場周辺土壌における窒素汚染、農業活動に起因する土壌への過剰な窒素負荷による地下水汚染の実態などを知るにおよび、“水”だけではなく、“土(壤)”を含む現場での窒素汚染低減手法の必要性を痛感するとともに、汚染土壌の現場(原位置)処理に Anammox を活用できないものかと考えるようになった。また、現在行っている土壌中での Anammox 反応に関する研究成果から、Anammox 細菌は土壌においても生育・増殖できることが明らかになった¹⁾。以上の背景と動機、さらに申請者らが有する Anammox や Anammox 細菌に関する知見の蓄積を最大限に活かすことで、酸素や温度への耐性に優れる自然環境での利用に有利な Anammox 細菌を見出し、汚染現場で Anammox 反応を促進、強化させる新たな窒素汚染低減手法を創出できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、当初、上記の背景や課題を踏まえ、酸素、光、温度の変化に高い耐性を有する新たな Anammox 細菌を見だし、その集積培養の確立を目的としたが、まずは好気条件下でも生育し、Anammox 活性を含む窒素除去能を発揮する、酸素に対して比較的高い耐性を有する細菌群(バイオマス)の集積培養を目的とした。

3. 研究の方法

3.1 回分試験による高酸素耐性 Anammox 細菌のスクリーニング

好気条件下で生育、増殖可能なこれまでに無い Anammox 細菌の発見とその集積培養を目的とすることから、植種源(種汚泥)としては、酸素(大気)に恒常的に晒されている可能性の高い土壌(水田土壌、畜舎近接土壌)、および好気と嫌気条件が流路内で変化するオキシデーションディッチ(OD)法を採用する水処理施設からの汚泥を用いた。

複数試料に対してリアクタ等を用いる連続実験を行うのは困難なことから、各試料について嫌気と好気の2条件を設定し、遠心チューブを用いた回分実験により酸素耐性 Anammox 細菌の

スクリーニングを行った(図2)。

3.2 カラム連続試験による高酸素耐性 Anammox 細菌の集積と窒素除去能の強化

上記のスクリーニングにて、嫌気、好気条件下ともに Anammox 活性が認められた試料については、微生物付着担体として不織布を導入した容積約 120 mL のシリンジ様カラム型リアクタにて連続実験を実施した(図3)。なお、嫌気条件のみで Anammox 様活性がみられた試料は凍結保存し、スクリーニングを継続した。Anammox 培地を上向流で連続流入させ、流出水のアンモニウム塩、亜硝酸塩、硝酸塩を測定して Anammox 活性の経時変化を調べた。実験を開始してしばらくは、硝化反応、アンモニウム塩の土壌粒子への吸着、土壌中有機物などによる硝酸・亜硝酸塩の還元(脱窒)が起こるため、基質濃度を段階的に上昇させて窒素代謝における Anammox 反応の寄与を調べた。また、適時、次世代シーケンサーなどにて細菌叢を明らかにした。

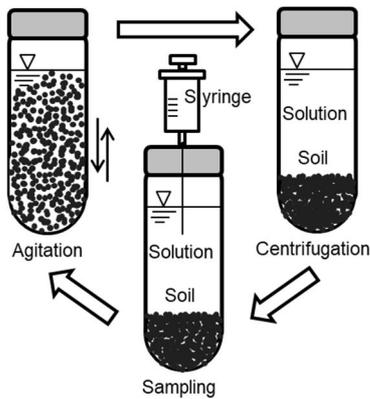


図2 回分試験方法

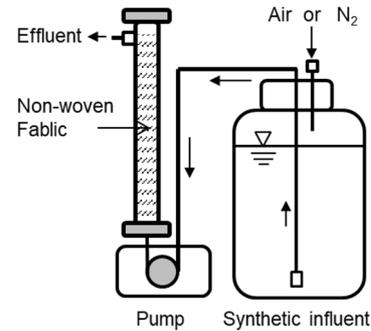


図3 連続試験方法

4. 研究成果

4.1 回分試験による高酸素耐性 Anammox 細菌のスクリーニング

植種源として、7種類の土壌試料(草地、畑地、水田)とOD施設から7種類の汚泥試料をスクリーニングに供し、各々4~12カ月に亘る回分試験を実施した。

その結果、土壌試料では、いずれにおいても好気条件下でアンモニウムイオンと亜硝酸イオンの同時除去は認められなかった。一方、OD施設の汚泥試料では、2カ所の施設汚泥(各々A1,A2とする)で、比較的高い Anammox 反応様の窒素除去を示すものがみられた。図4にA2試料について嫌気と好気条件での回分試験の結果を示す。以上から、この2種類のOD施設汚泥を植種源として不織布導入カラムを用いた連続実験に供し、集積培養と窒素除去能の強化を試みることにした。

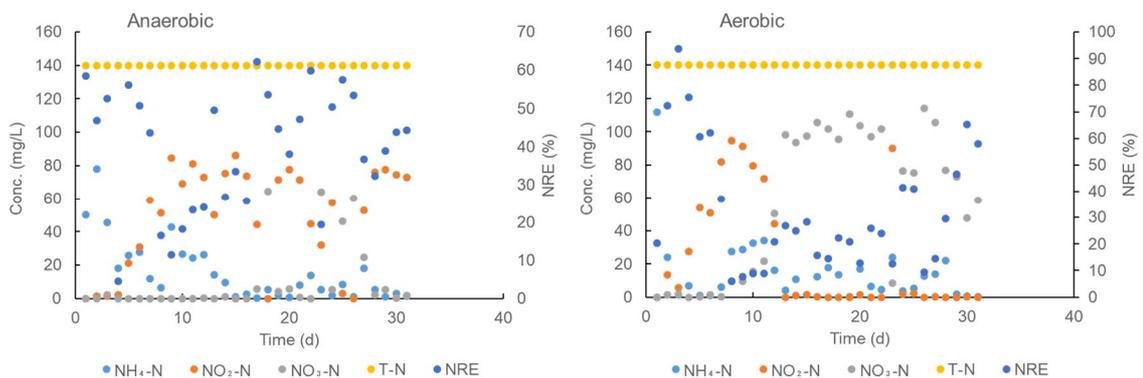


図4 OD施設汚泥試料での回分試験結果

4.2 カラム連続試験による高酸素耐性 Anammox 細菌の集積と窒素除去能の強化

上記 A1 と A2 の試料について約半年に亘る連続実験を行った。連続実験では、各リアクタについて、培地中の溶存酸素濃度(DO)を窒素ばっ気により 0.1 mg/L 未満にした場合と、ばっ気を行わず DO を 6~9 mg/L のままで導入する 2 つの条件を設定し、窒素除去能を比較した。その結果、試料 A1 については培養を開始して約 100 日後より Anammox 反応と思しき亜硝酸とアンモニウムイオン濃度の低下、および硝酸イオン濃度の上昇が認められ、160 日後には 80 % を超える窒素除去率と

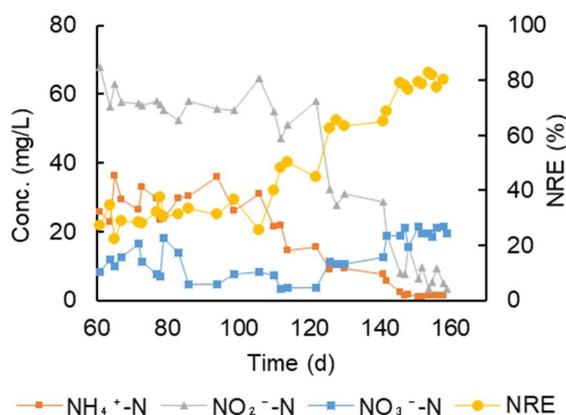


図 5 OD 施設汚泥 A1 試料の連続実験結果

Anammox 反応の典型的な化学量論比での反応が確認された(図 5)。一方、試料 A2 については培養開始後 200 日頃より好気条件の培地を導入するリアクタで Anammox 反応様の窒素除去が確認された。

また、細菌叢解析より、試料 A1 では '*Candidatus Anammoxoglobus*' と '*Candidatus Brocadia*'、試料 A2 では '*C. Anammoxoglobus*' が検出された。以上の結果から、少なくとも窒素ばっ気などによる DO 低減などの処理をしない培地導入においても増殖し良好な窒素除去能を示す Anammox 細菌の培養が可能であることが明らかになった。

以上、約 3 年間の研究期間において、DO が 6.0 を超える状態の培地導入による連続リアクタにおいて、増殖し、良好な窒素除去能と典型的な化学量論比で反応を行う Anammox 細菌およびそれを含むバイオマスの集積培養の構築に成功した。しかしながら、高 DO 培地を導入するリアクタ処理水(流出水)の DO は 1.0 mg/L を下回っていることが確認されたことから、リアクタ内の DO は低く抑えられ Anammox 細菌に有利な条件が形成されていることが推定された。したがって、今後は、さらにリアクタ内の DO を高濃度に維持するなどの条件を設定し、本研究で得られた Anammox 細菌への酸素の影響を詳細に検討、確認し、高(溶存)酸素条件下における競争力を評価する必要がある。

引用文献

- 1) A. Mulder, et al. (1995) FEMS Microbiol. Ecol., 16, 177-183
- 2) J.A. Brandes, et al. (2007) Chem.Rev., 107, 577-589
- 3) B.L. Hu, et al. (2013) Environ. Microbiol. Rep., 5, 483-489
- 4) Y. Sher, et al. (2012) FEMS Microbiol. Ecol., 81, 145-155

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 紘晃 (Ito Hiroaki) (80637182)	熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター・助教 (17401)	
研究分担者	濱 武英 (Hama Takehide) (30512008)	熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター・准教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関