

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560508

研究課題名（和文）海洋性アナモックス細菌の集積化と高濃度塩成分含有水からの窒素除去技術への応用

研究課題名（英文）Enrichment of Marine anammox bacteria and application to nitrogen removal technology in a high-salinity water

研究代表者

川越 保徳（KAWAGOSHI YASUNORI）

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：00291211

研究成果の概要（和文）：海洋性 Anammox 細菌の集積培養系を構築し、温度や塩分濃度などの環境条件の変動にも柔軟に対応する高速・省エネ型の窒素除去法の確立を目指した。その結果、海面埋立型の廃棄物処分場底泥を植種源とする連続培養にて海洋性 Anammox 細菌培養系の構築に成功した。本培養系は、約 5% の塩分濃度、温度 25℃ 未満の環境下でも安定した窒素除去能を示した。細菌叢解析の結果、*Scalindua* 属に近縁な海洋性 Anammox 細菌の存在とイオウ酸化細菌等との共存が確認された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is construction of enrichment culture of marine anammox bacteria for the development of novel nitrogen removal technology which is robust to fluctuation of environmental condition such as temperature or salinity. We succeeded the enrichment cultivation of marine anammox bacteria by using the sediment of a sea-based municipal waste disposal site as the inoculum. The enrichment culture performed stable nitrogen removal ability even under the condition of 5% salinity and less than 25 °C temperature. From bacterial community analysis, marine anammox bacteria closely related to *Canidatus Scalindua* and other bacteria such as sulfur-oxidizers were detected in the culture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：環境衛生工学

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：環境保全，環境微生物

1. 研究開始当初の背景

赤潮被害などの閉鎖性水域での富栄養化問題や、地下水中の硝酸性窒素濃度の上昇による飲料水源への影響が懸念されるなど、窒素対策は、健全で豊かな水環境を保全する上

で今なお重要な課題である。

水環境への窒素負荷の低減には窒素の排出削減が有効であり、排水からの窒素処理には、生物学的窒素除去技術が広く用いられている。図1に、硝化-脱窒法と、Anammox 反応

を利用する部分亜硝酸化-Anammox 法を示す。

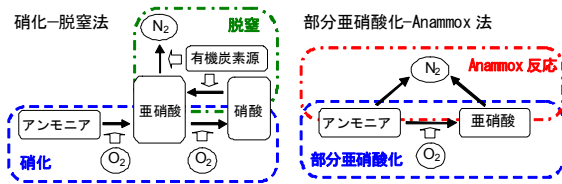


図1 硝化-脱窒法と部分亜硝酸化-Anammox 法

従来の生物学的窒素除去技術は、アンモニアを亜硝酸や硝酸に酸化する硝化反応と亜硝酸を窒素ガスに還元する脱窒反応からなる硝化-脱窒法を基本としてきた。硝化-脱窒法では、硝化に必要な曝気動力コストと脱窒に要する有機炭素源のコスト、さらに残存有機炭素による二次汚染が課題となる。これに対し、1995年に新たに発見された Anammox 反応では、嫌気条件下でアンモニアが亜硝酸で酸化され、ともに窒素ガスに変換されるため、有機炭素源を必要とせず、処理に要する曝気量(酸素量)も約半分に抑えられる窒素処理法の開発が可能となる。そこで現在、Anammox 細菌に関する基礎研究と集積培養法の確立が急がれ、Anammox を利用した省コストで二次汚染の少ない窒素除去技術の実用化研究が進んでいる。しかしながら、Anammox 細菌は、増殖速度が極めて遅く(倍加時間:11日)、いまだ単一菌での培養成功例が無い難培養細菌でもあることから、Anammox 研究の第一歩は、いかに速やかに安定した集積培養系を確立するかにある。

他方、海洋性の Anammox 細菌に関しては、海洋環境中での存在が遺伝子解析手法注によって間接的に確認されているに過ぎない。しかし Anammox 反応は、海洋環境での窒素循環にも大きく寄与すると推定されておりその知見は海域を含む自然界の窒素循環を解明する上で重要である。さらに、海洋性 Anammox 細菌を活用することで、塩分その他無機・有機成分を高濃度を含む排水等に適用可能な、新規な窒素除去技術の開発が期待できる。

2. 研究の目的

窒素を高濃度を含む排水には、鉱業排水や廃棄物処分場浸出水、食品排水等の様に塩分濃度が高い場合があり、生物学的処理が困難となることが想定される。そこで本研究では、海洋環境に生息する Anammox 細菌を活用し、この様な排水にも対応可能な窒素除去技術の開発を最終目的とした。また、学術的には、いまだ世界的にも集積培養の成功例が無い海洋性 Anammox 細菌の生物学的特性に関する知見の集積を目指した。

具体的には、1) 海洋性 Anammox 細菌を探索し、その集積・高濃度化培養系を確立する、2) 海洋性 Anammox 細菌の生物学的諸特性、および集積細菌群の細菌叢を明らかにし、

Anammox 反応に係わる微生物共生系を解明する、3) 集積された海洋性 Anammox 細菌を利用することによる、無機・有機成分を高濃度を含む水からの高速窒素除去法の基礎技術の確立、を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、図2に沿って遂行した。

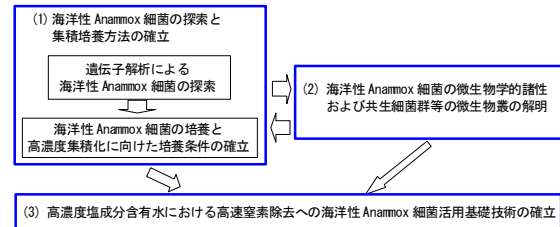


図2 研究方法とスケジュール

課題(1)の「海洋性 Anammox 細菌の探索と集積培養法の確立」では、Anammox 細菌の生育に好適な、anoxic な環境で数十ミリグラム濃度レベルのアンモニア性窒素を含み、かつ硫化水素等の発生がみられない環境試料に種菌を求めた。具体的には 1) 海面埋立廃棄物処分場の底泥・海水、2) 海水系廃水の嫌気性処理汚泥、3) 干潟や海産養殖場の底泥・海水、等を検討した。これら種菌となる環境試料は、あらかじめ Anammox 細菌を検出可能な DNA プライマーを用いた PCR 法などの遺伝子解析手法によってその存在を確認し、以降の検討に供する種菌の優先順位を決め、研究の効率化を図ることとした。次に、集積培養系の確立にあたっては、増殖速度の遅い Anammox 細菌の流出を避けるため、培養は微生物付着担体を備えたリアクタで行うこととし。担体には、淡水性 Anammox 細菌の集積に実績のあるアクリル製不織布を用いた。液体培地には、実海水をろ過滅菌したものを用いた。

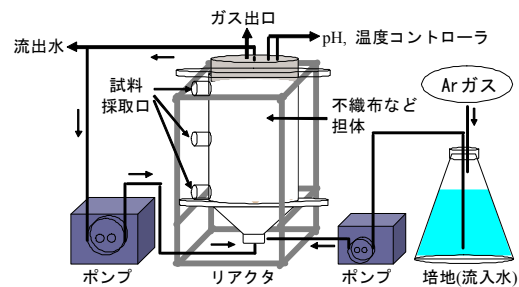


図3 連続培養装置概要

図3に示した培養装置にて連続培養を行い、窒素負荷を段階的に増加させて Anammox 細菌の集積を図った。Anammox 反応は、アンモニアと亜硝酸の減少量、および硝酸の生成量との量比(窒素量として約 1.0: 1.2: 0.3)によって判断し、適宜、遺伝子解析によって Anammox 細菌を確認した。Anammox 反応は、アンモニアと亜硝酸の減少量、および硝酸の

生成量との量比（窒素量として約 1.0: 1.2: 0.3）によって判断し、適宜、遺伝子解析によって Anammox 細菌を確認した。

課題(2)「海洋性 Anammox 細菌の微生物学的諸性質および共生細菌群等の微生物叢解明」では、集積された海洋性 Anammox 細菌を用いて窒素代謝能等の諸特性や生育条件を明らかにするとともに微生物叢とその変化を遺伝子解析等で明らかにした。

課題(3)「海洋性 Anammox 細菌を活用する高濃度塩成分含有水からの高速窒素除去基礎技術の確立」では、高濃度塩成分、およびその他溶存成分存在下における安定で高速な窒素除去を達成するための条件の最適化を行いながら、高濃度多種成分存在下での高負荷・高速窒素除去の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 海洋性 Anammox 細菌の探索と集積培養方法の確立

入手可能な試料として、最終的に 1) 海面埋立型廃棄物処分場の底泥、2) 有明干潟域の底泥、3) 海水を希釈水に用いている廃水処理施設の脱窒処理汚泥の 3 種類を海洋性 Anammox 細菌培養用の植種源候補とした。各試料について、既知の Anammox 細菌検出用プライマーおよび一般細菌検出用プライマー、さらには、海洋性 Anammox 細菌検出用として本研究で新たにデザインしたプライマーを用いた PCR を行い、Anammox 細菌を探索したが、明確な結果は得られなかった。

次に、上記 3 種類の植種源を用い、海洋性 Anammox 細菌の集積培養を図ることにした。スタートアップのための回分培養では、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ を含む人工海水培地をリアクタ内に循環供給し、馴養を図った。回分培養を繰り返すにつれ、全てのリアクタにおいて、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の減少が認められた。また、海面埋立型処分場底泥および干潟底泥を植種源としたリアクタにて $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ の同時減少が確認されたが、廃水処理汚泥については $\text{NO}_2\text{-N}$ の減少のみが観察されるに留まった。図 4 に、処分場底泥を植種源としたリアクタでの結果を示す。

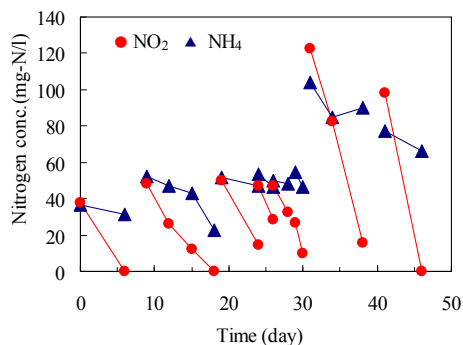


図 4 回分実験結果（海面埋立処分場底泥）

これら窒素の減少への Anammox 反応の寄与は否定できないが、内生脱窒など複数の要素が組み合わさって起こっている可能性が高いものと推定された。結局、計 5 回の回分培養を経た後、全てのリアクタを連続的に切り替え、約 1 年間に亘る連続培養を実施し、海洋性 Anammox 細菌の集積培養を図った。その結果、干潟底泥および廃水処理汚泥を植種源としたリアクタでは Anammox 反応の特徴である $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NH}_4\text{-N}$ の同時消費と $\text{NO}_3\text{-N}$ の生成は認められず、海洋性 Anammox 細菌の培養は困難と判断した。一方、海面埋立型処分場底泥を植種源としたリアクタでは、Anammox 反応と考えられる窒素濃度の変化が確認された。

図 5 に、海面埋立型処分場底泥を植種源とした連続培養実験における各態窒素濃度（下段）、窒素除去率（中段）、窒素負荷速度と窒素除去速度（上段）の経時変化を示す。本連続培養実験では水理的滞留時間を 12h とした。連続培養実験開始当初から $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ の同時除去が確認された。そこで窒素濃度を段階的に増やし窒素負荷を上げていった。この間、流出水中に若干の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の残存が見られたが、概ね良好に消費された。連続培養開始後 112 日目に流入窒素濃度を 60mgN/L に増やしたところ、残存窒素が増加し窒素除去率も 40% に低下したため、一旦窒素濃度を下げ、窒素除去率の回復を確認した後、再度窒素濃度を段階的に増加させた。またこれ以降、流出水中の pH が 8.0 を超えないように pH を制御した。これらにより、順調に負荷を上げていくことができた。時折、窒素負荷の増加で流出水中の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が増加する場面があったが、比較的速やかに窒素は消費され $\text{NO}_2\text{-N}$ が蓄積することはなかった。結局、窒素負荷 0.8g/L/day にて窒素除去（転換）速度 0.6g/L/day が得られた。

図 6 に連続培養期間中の窒素反応比を示す。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 消費速度 : $\text{NO}_2\text{-N}$ 消費速度 : $\text{NO}_3\text{-N}$ 生成速度は、1 : 1.19 : 0.13 となり、既知の Anammox 反応比（1 : 1.32 : 0.26）に近い値が得られた。

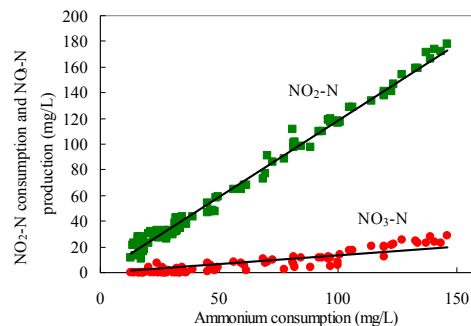


図 6 連続培養時における窒素反応比

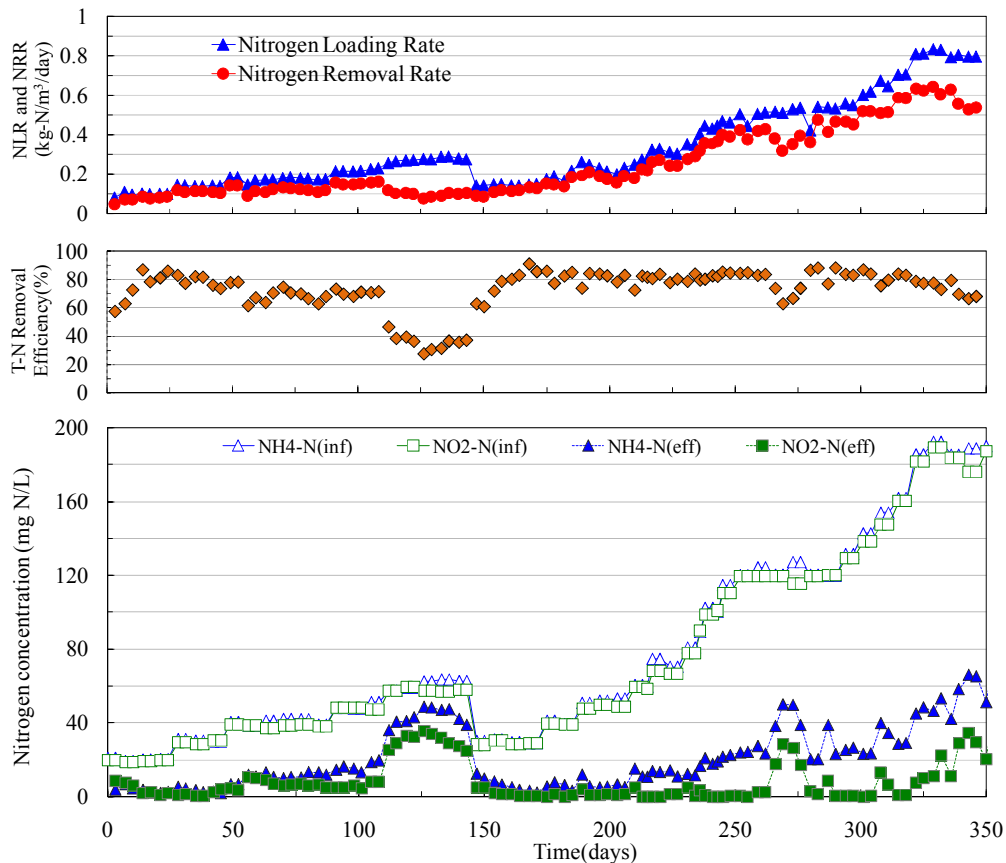


図5 連続培養における各態窒素および窒素負荷・窒素除去率の経時変化

図7に連続培養開始時と窒素負荷 0.8g/L/day時のリアクタの様子を示す。担体へのAnammox細菌の付着が認められ、リアクタ内部には赤色をしたグラニュールの形成も見られた。

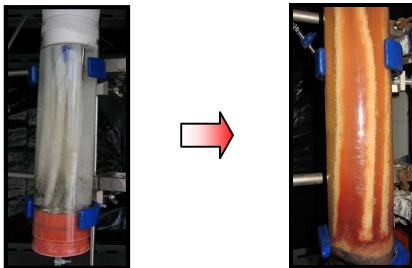


図7 連続培養におけるリアクタ内の変化

(2) 海洋性 Anammox 細菌の微生物学的諸性質および共生細菌群等の微生物叢解明

海洋性 Anammox 細菌培養系の構築に成功したため、次に海洋性細菌の特徴と考えられる耐塩能、および温度特性を調べた。耐塩能については、培地中の NaCl 濃度を 3.0~5.0%の間で変化させ、窒素除去能に与える影響を調べ、温度については 23~37°Cの範囲について調べた。

その結果、海洋性 Anammox リアクタでは 4.7%の塩分濃度環境下においても窒素除去

能の低下は認められず、3.5%以上の塩分濃度で顕著な活性低下が見られるとされる淡水性 Anammox 細菌よりも高い耐塩能を有することが分かった。また、温度に関しては、23~30°Cの範囲では安定した窒素除去能が見られたが、32°Cを超えると不安定となり、さらに 36°Cでは著しい窒素除去能の低下が認められた。ただし、これらの結果については現在、再現性の確認も含めて詳細検討を継続しているところである。

担体に付着しているバイオマスについて、PCR-DGGE 法による細菌群集構造解析を実施した。プライマーには、一般細菌用のユニバーサルプライマー (GM5f-DS907r) と本研究でデザインした海洋性 Anammox 検出用プライマー (UKf1-UKr1) を用い、いずれについてもフォワード側に GC クランプ配列を結合した。図8にPCR-DGGE法により得られたDGGE泳動像を、表1に相同性検索の結果を示す。これらのDNA配列を調べた結果、Anammox細菌検出用プライマーにてPCR増幅産物が得られた。その中でも最も濃いDNAバンド(図8中のバンド1)のDNA配列を調べた結果、Anammox細菌である可能性が高いことが分かった。本DNAバンドの塩基配列は、*Candidatus "Scalindua wagneri"*、および英虞湾の海底からの馴養バイオマス中での

検出が報告されている Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete JMK-2 と高い相同性を示した。

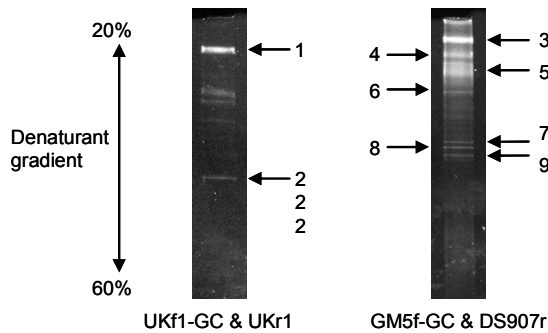


図 8 担体付着バイオマスの PCR-DGGE 結果

表 1 DNA バンドの塩基配列相同性検索結果

Primer	Band no.	Closest candidate by homology search	% similarity
UKf1 & UKr1	1	<i>Candidatus</i> "Scalindua wagneri"	98
		Anammox planctomycete JMK-2	98
	2	planctomycete GMD15D02	78
GM5f & DS907r	3	<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium "BSD RB 42"	94
	4	<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	80
	5	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	97
	6	<i>Mariaculis maris</i> MCS10	82
	7	<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114	96
	8	<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	99
	9	mixed culture isolate kol13	91
	10	<i>Azoarcus</i> sp. EBN1	97

また、他の DNA バンド (バンド 2) については、Anammox 細菌ではない Planctomycete 属細菌と推定された。一般細菌用ユニバーサルプライマーで増幅された DNA バンド (図 8 中のバンド 3~9) の配列については、*Nitrosomonas*, *Roseobacter*, *Mesorhizobium*, *Azoarcus*, *Flavobacteriaceae*, および嫌気性糸状細菌などと相同性が高いものが得られ、これらの細菌との共生が推定された。

図 9 に、海洋性 Anammox 細菌と判断されたバンド 1 の塩基配列をもとに、既知の Anammox 細菌との関係について作成した系統樹を示す。

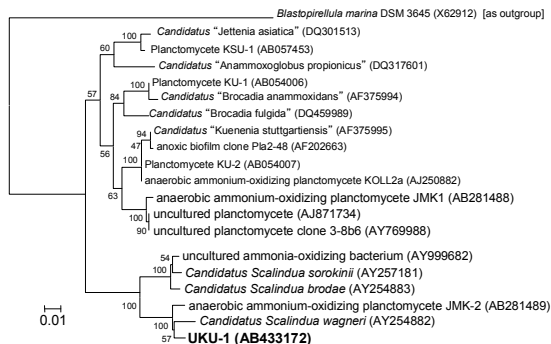


図 9 DNA バンド 1 の塩基配列にもとづく系統樹

系統樹は、neighbor-joining method (NJ 法) を用いて作成し、bootstrap value に関しては、70%以上を表記した。これまでの海

洋性 Anammox に関する研究では、そのほとんどが海水や海底泥を試料とする遺伝子解析や Anammox 活性測定であり、培養に関する研究事例は本報告書作成時点でもいまだ 3 例しかない。しかし、Anammox 細菌の種類については知見の充実が図られてきており、現在のところ、海洋性 Anammox 細菌や高い耐塩能を有する Anammox 細菌は *Candidatus Scalindua solokinii* や *Candidatus Scalindua wagneri* のような *Scalindua* 属に属している。本研究で培養に成功した海洋性 Anammox 細菌についても、*Candidatus* " *Scalindua wagneri* " の近縁種である可能性が高く、本属に属する海洋性 Anammox 細菌は世界的に広く海洋環境中に生息するものと推定される。以上から本研究で培養に成功した海洋性 Anammox 細菌として DNA バンド 1 を有する細菌を、marine anammox planctomycete UKU-1 (accession number: AB433172) と命名した。

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 2 件)

- 1) Kawagoshi Y., Nakamura Y., Kawashima H., Fujisaki K., Furukawa K. and Fujimoto A., Enrichment of marine anammox bacteria from seawater-related samples and bacterial community study. *Water Sci. Technol.*, 61(1), 119-26 (2010)
- 2) Kawagoshi Y., Nakamura Y., Kawashima H., Fujisaki K., Fujimoto A., Furukawa K., Enrichment culture of marine anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria from sediment of sea-based waste disposal site. *J. Biosci. Bioeng.*, 107(1), 61-63 (2009)

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 山城健人, 友重勇氣, Luong Van Duc, 韦巧艳, 川越保徳, 海洋性 Anammox 培養系における温度と塩分濃度の影響, 平成 22 年度日本水環境学会九州支部研究発表会講演概要集, p.9, 2011 年 3 月 14 日, 福岡大学
- 2) 山城健人, 川越保徳, 友重勇氣, 海洋性 Anammox 培養系への温度と塩分濃度の影響, 平成 22 年度土木学会西部支部研究発表会講演概要集 (CD/ROM), VII-12, 2011 年 3 月 5 日, 九州工業大学
- 3) 友重勇氣, 朱文呈, 藤崎幸一郎, 川越保徳, 海洋性 Anammox 細菌の集積培養系における窒素除去能と細菌叢の温度特性, 日本水処理生物学会第 47 回大会, 日本水処理生物学会誌, 別巻 30 号, p. 16, 2010 年 11 月 19 日, つくば大学

- 4) 友重勇氣, 糸密尚貴, 佐藤宇紘, 川越保徳, 海洋性 Anammox 細菌を用いた窒素除去の高速化に向けた培養条件の検討, 第44回日本水環境学会年会講演集, pp.15-17, 2010年3月16日, 福岡大学
- 5) 藤崎幸市郎, 野村太一, 藤本綾, 川越保徳, 海洋性 Anammox 細菌の集積培養に対する温度及び培地条件の影響, 第43回日本水環境学会年会, 第43回日本水環境学会年会講演集, p.425, 2009年3月17日, 山口大学
- 6) 野村太一, 藤崎幸市郎, 藤本綾, 川越保徳, 海洋性 Anammox 細菌の集積培養条件に関する研究, 平成20年度土木学会西部支部研究発表会, 平成20年度土木学会西部支部研究発表会講演概要集, pp.997-998, 2009年3月7日, 九州大学
- 7) Kawagoshi Y., Nakamura Y., Kawashima K., Fujisaki K., Furukawa K., and Fujimoto A., Enrichment of marine anammox bacteria from seawater-related samples and bacterial community study, 6th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, CD-ROM, June, 24, 2009, Singapore, Suntec Singapore International Convention and Exhibition Centre

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川越 保徳 (KAWAGOSHI YASUNORI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号: 00291211

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

古川 憲治 (FURUKAWA KENJI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 60029296