

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22510085  
 研究課題名（和文） 海洋性アナモックス細菌の高濃度集積培養系の確立とリアクター化への展開  
 研究課題名（英文） Establishment of enrichment culture of marine anammox bacteria and development of anammox bio-reactor  
 研究代表者  
 金田一 智規 (KINDAICHI TOMONORI)  
 広島大学・大学院工学研究院・助教  
 研究者番号：10379901

研究成果の概要（和文）：広島湾底泥を植種源としたカラムリアクターにより海洋性アナモックス細菌を集積培養し、高い窒素除去速度を達成した。リアクター内の微生物相を解析した結果、二種類の”Candidatus Scalindua”に属する海洋性アナモックス細菌が存在した。さらに、それぞれを対象とした FISH プローブを設計し、可視化することができた。このうち一方の種に対して、回分試験により最適培養温度、塩分濃度、pH を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A higher nitrogen removal rate was attained by using column reactor enriched marine anammox bacteria inoculated with coastal sediment in Hiroshima bay. Microbial community structure revealed that at least two anammox species belonging to “Candidatus Scalindua” was present in the column reactor. The newly designed two probes could be used. We also designed two oligonucleotide probes specific to each dominant “Candidatus Scalindua” species were designed and could visualize two species. The optimal temperature, salinity, and pH ranges for the one species were determined by batch experiments.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：排水処理工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：アナモックス、窒素除去、集積培養

#### 1. 研究開始当初の背景

アナモックス（嫌気性アンモニア酸化）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直接窒素ガスへ変換する微生物反応であり、省エネルギーかつ高効率の窒素除去技術として注目されている。アナモックスプロセスは従来の硝化・脱窒プロセスと比べて、酸素曝気コス

ト・エネルギーが最大 62%削減、外部炭素源は 100%削減、余剰汚泥の発生量も最大 70%までに削減が可能であることから、富栄養化および地下水の硝酸塩汚染を解決しうる技術として期待されている。

アナモックス反応を担う細菌は海洋、湖沼、下水処理場など様々な環境中に広く存在しており、これまでに 5 属 9 種が提案されてい

るが、その培養の困難さから純粋培養株は得られていない。特に海洋性アナモックス細菌は2003年に黒海で発見され、海洋における窒素循環のおよそ50%を担っているとも言われているが<sup>2)</sup>、その生理生態は依然として不明な部分が多いのが現状である。これまでに集積培養に成功した事例は国内外で3件のみであり、集積のための最適温度、pH、基質濃度といった詳細な培養条件、共存する細菌の有無等についてはほとんど明らかになっていない。これまでに試行錯誤的に行われている海洋性アナモックス細菌の集積技術を確立し、高濃度保持リアクターが構築できれば、河川感潮域や汽水湖での直接窒素除去や高塩分含有産業排水の窒素処理も可能となり、アナモックス細菌を用いた窒素除去プロセスの導入拡大に発展すると考えられる。閉鎖性海域である広島湾では赤潮が毎年発生しており、図-1に示すように河川が多く存在する北部で溶存酸素が低い傾向がある。このように溶存酸素濃度が低く、かつ、赤潮が発生する海域は海洋性アナモックス細菌の生息に適していると考えられる。予備的検討の結果、既に実験室内で海洋試料からアナモックス活性を確認できている。

申請者はこれまでに活性汚泥からアナモックス細菌の集積培養に成功し、これまでの5年間の研究期間中に得た集積培養ストラテジーやリアクター運転ノウハウ、アナモックス細菌群集の構造に関する知見は海洋性アナモックス細菌を集積培養する場合にもそのまま適用できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では広島湾の溶存酸素濃度、窒素濃度、炭素濃度、水温、pHなどの測定結果とPCR法によるアナモックス細菌由来のDNAの存在から植種源にふさわしい底泥を決定し、海洋性アナモックス細菌の集積培養を行うことを目的とする。集積培養が達成された後は、海洋性アナモックス細菌を利用したリアクターを構築する上で必要となる設計パラメータや最適運転条件(温度、pH、流入濃度等)の決定を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では海洋性アナモックス細菌の高濃度集積培養系の確立およびリアクター化に必要な設計パラメータの決定を目的とし、三年計画で実施し、以下の4項目に分けられる。

### (1) 植種源の選定

最初に海洋性アナモックス細菌が多く存在する植種源を選定するために河川感潮域や汽水湖の底泥、内湾の底泥などを採取し、アナモックス細菌に特異的なプライマーセットを用いてPCR法によりアナモックス細菌由

来のDNAバンドの確認をするとともに、サンプル採取地点の各態窒素濃度、水温、C/N等を参考に総合的に植種源を選定する。

### (2) 集積培養装置と培養方法

本研究では集積培養はフラスコなどの回分培養は採用せず、図-5に示すように初めから連続式で培養を行う。

これは申請者の過去の経験から、低濃度の基質を供給するには回分培養は不適切であることと、アナモックス細菌の倍加時間を考慮してHRTを数日に設定すると、他に共存する細菌がリアクター系外へ排出されにくくなり、結果としてアナモックス細菌の増殖が困難となるという経験があるからである。海洋性アナモックス細菌の集積培養の場合、他に共存している海洋細菌もまた、貧栄養細菌であり増殖速度がそれほど速くないことが予想されるため、このHRTの設定が成功のカギを握ると考えられる。

### (3) 集積された優占種の特定

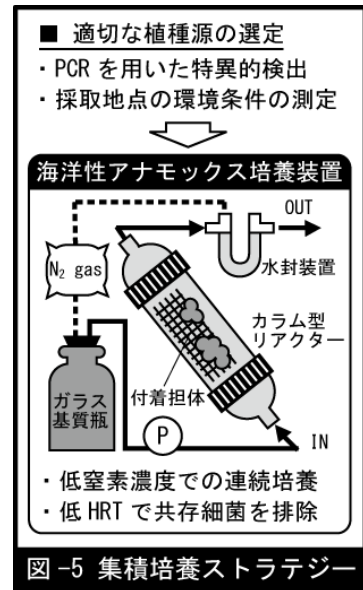
数ヶ月間カラムリアクターを運転し、十分なアナモックス反応(窒素除去速度 $0.5 \text{ kgN m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ 以上)が確認できた場合、バイオマスからDNAを抽出し、アナモックス細菌が属する*Planctomycetales*目に特異的なプライマーセット(Pla46f & Univ1390r)を用いてPCR増幅、クローニングを行い、アナモックス細菌の系統樹を作成し、優占種の系統学的位置関係を把握する。この時、集積された海洋性アナモックス細菌を特異的に検出するFISHプローブをARBプログラムにより設計し、可視化を行う。

### (4) リアクター化に必要な設計パラメータの決定および運転の最適化

培養条件を最適化するためにリアクター内のバイオマスを取り出し、温度(10-40℃)、pH(4.0-9.0)、アンモニア性窒素および亜硝酸性窒素濃度(5-100 mg-N/L)等の条件に設定した回分培養系を用いてアナモックス活性が最大となるような条件を探索する。

## 4. 研究成果

22年度は海洋性アナモックス細菌の集積培養系の確立を目的として、広島湾から採取



した底泥を植種源とした上向流カラムリアクターを運転した。底泥は各態窒素濃度や水温、溶存酸素濃度などの測定結果から判断して、湾奥部と湾中央部から採取し、それぞれ別のリアクターに植種した。リアクターには不織布を担体として用い、人工海水に窒素成分を加えた人工排水を通水し 20°C で運転した。その結果、湾奥部から採取した底泥を用いたリアクターでアナモックス反応を確認できた。リアクター内のバイオマスも徐々に茶色から赤色に変化した。リアクター運転開始から 114 日目に亜硝酸性窒素除去率が 97% に達し、流出水の亜硝酸性窒素が枯渇し始めた。そのため、流出水の亜硝酸性窒素濃度が 1.0 mgN L<sup>-1</sup> 以下となるのを目安に、流入アンモニウム性窒素・亜硝酸性窒素濃度を上げることで流入窒素負荷を上昇させた。さらに HRT を短縮させた結果、最大窒素除去速度 2.06 kgTN m<sup>-3</sup> day<sup>-1</sup> を達成した。アナモックス細菌を対象とした系統解析の結果、海洋性アナモックス細菌である *Candidatus Scalindua* 属に近縁なクローンが多く検出された。得られた塩基配列に基づき、ARB プログラムにより FISH プローブを設計し、可視化を試みた。その結果、系統学的に異なる細菌グループを検出できる二種類の FISH プローブを設計することができた。本集積培養系には少なくとも系統学的に異なる二種類の海洋性アナモックス細菌が存在していることが明らかとなった。

23 年度は前年に設計した本集積培養系に存在する二種類の“*Candidatus Scalindua*” に属する海洋性アナモックス細菌を検出する FISH プローブ (Scal129a, Scal129b) の使用条件の最適化後、二種類の海洋性アナモックス細菌を個別に検出することができた。これらのプローブを用いて、二種類のアナモックス細菌の変遷を蛍光面積比に基づいて調べたところ、それぞれのアナモックス細菌の構成比は変化するものの、長期間に渡って二種類が共存していることが明らかになった。そこで塩分濃度、温度条件などを変化させて種ごとの変遷を調査したところ、温度による優占種の変化が観察された。また、本集積培養系に共存する細菌および古細菌の特定を試みた。全細菌を対象とした系統解析では、アナモックス細菌が 17 クローン、Gammaproteobacteria が 32 クローン、Bacteroidetes が 25 クローン、その他の細菌が 15 クローンに分類された。また、古細菌を対象とした系統解析では、10 グループに分けることができた。このうち 9 グループが、機能が未知の Euryarchaeota 門、1 つが Crenarchaeota 門に分類された。Crenarchaeota に分類されたものは、アンモニウム酸化古細菌に近縁な種であった。リアクターからバイオマスを採取し、古細菌に特異

的なプローブを用いて FISH 法を試みたが、蛍光シグナルを得ることができなかった。細胞壁処理を行った後でハイブリダイゼーションを試みたが、同様に蛍光シグナルは得られなかった。そこで CARD-FISH 法を試みたところ、古細菌と考えられる蛍光シグナルは得られたが、優占化しているアナモックス細菌の内在性ペルオキシダーゼ活性が強く、古細菌の蛍光シグナルと区別することは困難であった。

24 年度は海洋環境中から集積された“*Ca. Scalindua* sp.” に対し、浮遊状のバイオマス (シングルセル) を得るためにメンブレンバイオリアクターを運転した。シングルセル化が確認されたあと、生理学的特性の把握を行った。メンブレンバイオリアクターの運転開始から 330 日程度で“*Ca. Scalindua* sp.” 属の細菌がシングルセル化した。このバイオマスを用いて増殖温度、塩分、pH 範囲の測定を行ったところ、10-30° C、pH6.0-8.5、塩分濃度 0.8-4.0% で活性が確認された。温度に関して 20-30° C で比較的高い活性が確認された。塩分濃度が 0.8-2.0% の範囲で増加するに連れて活性が高くなり、好塩性微生物であることが明らかとなった。亜硝酸及びアンモニウムによる高濃度阻害試験の結果、亜硝酸濃度が 7.5 mM において 50% の活性減少が確認されたが、アンモニウムにおいては試験濃度範囲 7-16 mM において阻害影響は確認されなかった。亜硝酸に対する K<sub>s</sub> 値は 0.45 μM、アンモニウムに対する K<sub>s</sub> 値は 3.0 μM であった。菌体収率は 0.030 [mol C (mol N)<sup>-1</sup>] であり、淡水のアナモックス細菌の半分程度であった。連続リアクター試験によって得られた最大アンモニウム酸化速度と菌体収率から最大増殖速度を算出したところ、0.0020 h<sup>-1</sup> であり、これは倍加時間 14.4 day に相当した。他のアナモックス細菌と比較しても非常に倍加速度が小さく、これは菌体収率の小ささが要因であることが明らかとなった。一方で、最大アンモニウム酸化速度は他のアナモックス細菌と大差が無いことから、実際の処理にも適用できる可能性が示唆された。

## 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 6 件、全て査読あり)

- ①. Takanori Awata, Mamoru Oshiki, Tomonori Kindaichi, Noriatsu oZaki, Akiyoshi Ohashi, and Satoshi Okabe., Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium belonging to the “*Candidatus Scalindua*” group. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 79(13), pp. 4145-4148. (2013 July)

DOI:10.1128/AEM.00056-13

- ②. Tomonori Kindaichi, Shota Yuri, Noriatsu Ozaki and Akiyoshi Ohashi., Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor. *Water Science & Technology*, Vol.66(12), pp. 2556-2561. (2012 December)  
DOI:10.2166/wst.2012.479
- ③. Takanori Awata, Katsuichiro Tanabe, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki and Akiyoshi Ohashi., Influence of temperature and salinity on microbial structure of marine anammox bacteria Treatment., *Water Science and Technology*, Vol.66(5), pp. 958-964. (2012 July)  
[DOI:10.2166/wst.2012.234](https://doi.org/10.2166/wst.2012.234)
- ④. Kosuke Matsunaga, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi, Yoshihito Nakahara and Manabu Sasakawa., Development of anammox reactor equipped with a degassing membrane to improve biomass retention., *Water Science & Technology*, Vol. 66(2), pp 451-456. (2012 Feb.)  
[DOI:10.2166/wst.2012.222](https://doi.org/10.2166/wst.2012.222)
- ⑤. Tomonori Kindaichi, Takanori Awata, Katsuichiro Tanabe, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi., Enrichment of marine anammox bacteria in Hiroshima Bay sediments., *Water Science & Technology*, Vol. 63(5), pp.965-970. (2011 May)  
[DOI:10.2166/wst.2011.277](https://doi.org/10.2166/wst.2011.277)
- ⑥. Tomonori Kindaichi, Takanori Awata, Katsuichiro Tanabe, Yuji Suzuki, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi. Enrichment using up-flow column reactors and community structure of marine anammox bacteria from coastal sediment. *Microbes and*

*Environments*, Vol. 26(1), pp. 67-73. (2011 March) [DOI:10.1264/jsme2.ME10158](https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10158)

[学会発表] (計 24 件)

1. Takanori Awata, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi, Mamoru Oshiki, Satoshi Okabe  
Physiological characteristics of marine anammox bacteria enriched from sea sediments, Hiroshima, Japan.  
14th International Symposium on Microbial Ecology (ism14), 19-24 Aug., 2012, PS09.457A (Copenhagen), Denmark
2. Takanori Awata, Katsuichiro Tanabe, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi  
Microbial community composition of marine anammox bacteria under different condition.  
International Conference on Civil and Environmental Engineering ICCEE 2011, 14-15 Nov., 2011, pp.80-81. (Taipei)
3. Takanori Awata, Katsuichiro Tanabe, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi  
Influence of temperature and salinity to microbial structure of marine anammox bacteria.  
The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, 2-6 Oct., 2011, 14-2-4. (Tokyo)
4. Tomonori Kindaichi, Shota Yuri, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi  
Ecophysiological role and function of uncultured *Chloroflexi* in an anammox reactor.  
The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, 2-6 Oct., 2011, 14-8-2. (Tokyo)
5. Takanori Awata, Katsuichiro Tanabe, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi  
Microbial community structure of marine anammox bacteria in different temperature and salinity. First International Anammox Symposium., 19-20 May, 2011, pp.179-184. (Kumamoto)
6. Takanori Awata, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi  
Increases in anammox activity under the existence of acetate and nitrate.  
International Conference on Civil and

Environmental Engineering ICCEE 2010,  
1-3 Nov, 2010 pp.142. (Dalian)

7. Tomonori Kindaichi, Takanori Awata, Katsuichiro Tanabe, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi  
Enrichment of marine anammox bacteria in Hiroshima Bay sediments.  
Proceedings of IWA World Water Congress and Exhibition, 19-24 Sept. 2010, (Montreal), France
8. Takanori Awata, Tomonori Kindaichi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi  
Evaluation of anammox activity and dissimilatory nitrate reduction in the presence of acetate or propionate.  
13th International Symposium on Microbial Ecology (isme13), 22-27 Aug., 2010, (Seattle), USA
9. 栗田貴宣、金田一 智規、尾崎則篤、大橋晶良  
広島湾より集積された *Scalindua* 属アナモックス細菌の生理学的特性  
第 47 回水環境学会年会(2013.3.11-13)  
(1-E-16-3) (大阪)
10. 後藤由実子、金田一 智規、尾崎則篤、大橋晶良  
膜を導入したアナモックス membrane bioreactor の性能と比活性評価  
第 47 回水環境学会年会(2013.3.11-13)  
(大阪)
11. 栗田貴宣、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良  
海洋性アナモックス細菌“*Candidatus Scalindua wagneri*”の生理学的特性の把握  
第 46 回水環境学会年会(2012.3.14-16)  
(東京)
12. 成田佳子、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良  
*Scalindua* 属アナモックス菌の最適培養条件  
第 45 回日本水環境学会年会講演集(2011) (札幌)
13. 栗田貴宣、金田一智規、尾崎則篤、大橋晶良  
温度及び塩分が海洋性アナモックスリアクター内の群集構造に与える影響解析  
第 45 回日本水環境学会年会講演集(2011) (札幌)

[その他]

ホームページ等

<http://www.civil-hu.jp/sanitary/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

金田一 智規 (KINDAICHI TOMONORI)

広島大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：10379901

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：