

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560647

研究課題名(和文) 淡水-海水コラボレートAnammox培養系の構築と窒素除去技術への応用

研究課題名(英文) Application of a collaborative mixed culture with freshwater- and seawater-anammox bacteria to nitrogen removal technology

研究代表者

川越 保徳(Kawagoshi, Yasunori)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：00291211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：温度や塩分濃度の変化に迅速柔軟に対応できる“淡水-海水コラボレートAnammox培養系”を構築し、窒素除去特性と細菌群集構造を明らかにした。淡水性と海洋性Anammox細菌の両培養物を反応槽に接種し、淡水、海水、および中間的な培養条件にて連続培養を実施し、全条件下で約5日間以内にAnammox反応特有のNH₄-NとNO₂-Nの同時除去を確認し、その後0.1g/L/dの窒素容積負荷で安定した窒素除去能を認めた。また、淡水と海水の中間的条件での連絡培養物では、淡水性Anammox細菌と海洋性Anammox細菌の存在比が1:30となり、培養条件の違いによって細菌叢が変化することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have successfully established a collaborative mixed culture with freshwater and seawater anammox bacteria, and revealed nitrogen removal property and bacterial community of it. The biomass of marine anammox bacterial culture and fresh-water anammox bacterial culture were inoculated into a packed bed reactor and continuously cultured under the three kinds of condition of marine, fresh-water, intermediate of marine and fresh-water. A typical anammox reaction was confirmed within 5 days under all the conditions, and stable nitrogen removal performance at 0.1 g/L/d of nitrogen removal rate. The anammox biomass cultured in a continuous stirred-tank reactor under the intermediate condition was used for bacterial community analysis. The abundance ratio of marine- and fresh-water- anammox bacteria was 30:1, suggesting the change of anammox bacterial abundance.

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：環境保全 環境微生物

1. 研究開始当初の背景

水環境への過剰な窒素化合物の流出は、閉鎖性水域での富栄養化問題、硝酸性窒素による地下水汚染等の原因となり、今なお水環境保全上の重要課題となっている。この対策には排出源で窒素を処理、削減することが最も効果的な手段の一つであり、「硝化-脱窒法」に代表される生物学的窒素除去技術がその中核となる。一方、「嫌気性アンモニウム酸化(Anammox)」というユニークな生物化学反応が近年発見され、窒素除去技術への利用が期待されている。これは、Anammox 反応を利用することで、従来技術である硝化-脱窒法に比べ、曝気動力の低減化と有機炭素にかかるコストを削減できるためである。

一方、Anammox を実用化する上での課題の一つは、Anammox 細菌が温度や pH 変化などの環境ストレスに弱いことであり、これが Anammox 細菌の集積培養が難しい原因となる。そのため、Anammox 細菌の高濃度化や包括固定化といった手法にて環境ストレスへの対応が行われている。しかし、これまで主に研究されてきた淡水性 Anammox 細菌は、塩分濃度や低温耐性に限界があり、Anammox の適用が想定される廃棄物処分場浸出水や種々の発酵廃液、海水養殖排水など高濃度の塩成分を含む廃水への利用には困難が予想される。そこで我々は、高い耐塩能や淡水性細菌とは異なる特徴が期待できる海洋性 Anammox 細菌の利用を検討し、その培養系の構築に成功した。海洋性 Anammox 細菌の特筆すべき特徴は、5.0%の塩分濃度でも活性の低下がみられず、10~25 の温度で安定した窒素除去能が維持されることである。しかし一方で、30 を超える温度では活性が低下する傾向を示すなど、淡水性 Anammox 細菌とは異なる特徴を示すことが分かった。

2. 研究の目的

上記背景とこれまでの研究知見を踏まえ、我々は、海洋性と淡水性の Anammox 細菌を混合培養にて組み合わせることによって各細菌の特性を活かし、温度や塩分濃度の変化に対しても大きなダメージを受けずに柔軟に対応できる“コラボレート Anammox 培養系”の構築を着想するに至った。また、「耐塩能の異なる異種の Anammox 細菌が同じ反応槽内で共存し、高い耐塩性と窒素除去能を有した」との報告 (Kartal B., et al.(2006) J. Biotechnol. 126(4), pp.546-53) が本申請研究着想の一因である。本研究では、まずはじめに海洋性 Anammox 細菌の培養物量の確保を目的として、細菌の高密度化と増加速度の向上に適する条件を明らかにし、次に、海洋性細菌と淡水性細菌を同じ反応槽内で共生、機能させ得る可能性を明らかにすることとした。これにより、淡水-海水コラボレート Anammox 培養系が構築できれば、本培養系の塩分や温度に対する耐性、順応性を混合前の培養系と比較解析して差違を評価すると

ともに、微生物(細菌)群集構造との関係を踏まえそれらを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は 図1 のフローに則って遂行した。

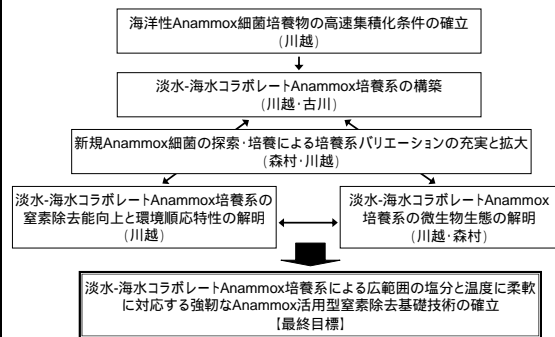


図1 研究方法とスケジュール

課題「海洋性 Anammox 細菌培養物の高速集積化条件の確立」については、研究室にてすでに構築されている、海洋性 Anammox 細菌培養系の培養条件に関する詳細検討を行い、迅速に Anammox バイオマスを増大させ、窒素除去能を向上させる方法や条件を明らかにした。反応槽には図2に示す微生物付着担体を備えたカラム型の反応槽を用い、培養液を上向流にて連続供給/流出させ、特に温度と pH について、窒素除去能との関係を検討した。また、窒素負荷の上昇による海洋性 Anammox バイオマスの増殖については、流入液(培地)中の窒素濃度を上昇させる方法と、水理的滞留時間(HRT)を短縮する方法、およびそれらを組み合わせた方法、さらには、反応槽内の攪拌の有無による影響などを調べた。

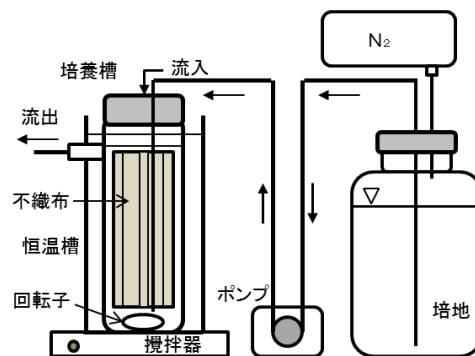


図2 固定床(微生物付着担体)培養装置概要

さらに、海洋性 Anammox 培養系における動力学的解析を行い、Anammox バイオマスと窒素除去能との関係などを明らかにすることとした。

課題「淡水-海水コラボレート Anammox 培養系の構築」、「淡水-海水コラボレート Anammox 培養系の窒素除去能向上と環境順応特性の解明」および「新規 Anammox 細菌の探索・培養による培養系バリエーションの充実と拡大」については、新たな淡水性 Anammox 細菌培養系の構築から始めた。植種源(種細

菌)として、高い有機物と栄養塩を含むし尿を高負荷条件下で処理している嫌気/好気処理汚泥など3種類を用いた。これにより、淡水性 Anammox 細菌培養系を構築後、淡水性 Anammox バイオマスと海洋性 Anammox バイオマスを混合して同一反応槽に接種し、本研究の主課題である淡水-海水コラポレート Anammox 培養系の構築を図った。ここでは、図2の反応槽に加え、特に細菌叢解析を目的として、図3に示す完全混合型の連続培養装置(CSTR:Continuous Stirred-tank reactor)を用いた。また、培養(反応槽運転)条件として、海洋性 Anammox 細菌培養条件、淡水性 Anammox 培養条件、およびその中間の培養条件を設定し、環境順応特性の解明を目的として検討を行った。

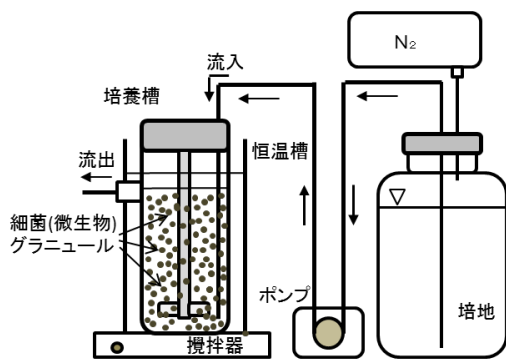


図3 完全混合型連続培養装置概要

課題「淡水-海水コラポレート Anammox 培養系の微生物生態の解明」では、海洋性 Anammox バイオマス、淡水性 Anammox バイオ

マス、および温度と塩分濃度に関する中間的条件にて CSTR で培養した混合 Anammox バイオマスについて、16S rRNA 配列の遺伝子解析により、Anammox 細菌の存在比や共生細菌を推定し、培養条件との関係を考察した。

4. 研究成果

(1) 海洋性 Anammox 細菌培養系に及ぼす温度の影響(論文業績の1)にて発表)

窒素容量負荷 0.3g/L/d の条件下で連続培養を継続しながら、温度を 25 から段階的に変化させて処理水中の各態窒素濃度を測定し、窒素除去能と関係を調べた。結果を図4に示す。

初期設定温度 25 での窒素除去率は約 75%であったが、20 では約 55%にまで低下した。その後も温度の低下に伴って、窒素除去率も段階的に低下し、15 で 45%、10 で 30%、5 で約 12%まで低下した。しかし、温度を上昇させることで窒素除去率は速やかに回復したことから、温度低下による窒素除去能の低下は可逆的であることが分かった。一方、温度を引き上げた場合、30 では窒素除去率に大きな変化はみられなかったが、33 で処理水中のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素がともに緩やかに上昇し、さらに 37 では窒素除去率が 18%にまで急激に低下した。以上から、海洋性 Anammox 細菌培養系の至適温度は 25~30 であることが分かった。またその後、温度を 25 に戻したが、窒素除去能の回復には約 10 日を要し、低温下での除去能低下からの回復とは異なる状況がみられた。

以上の実験結果から得られた温度と窒素

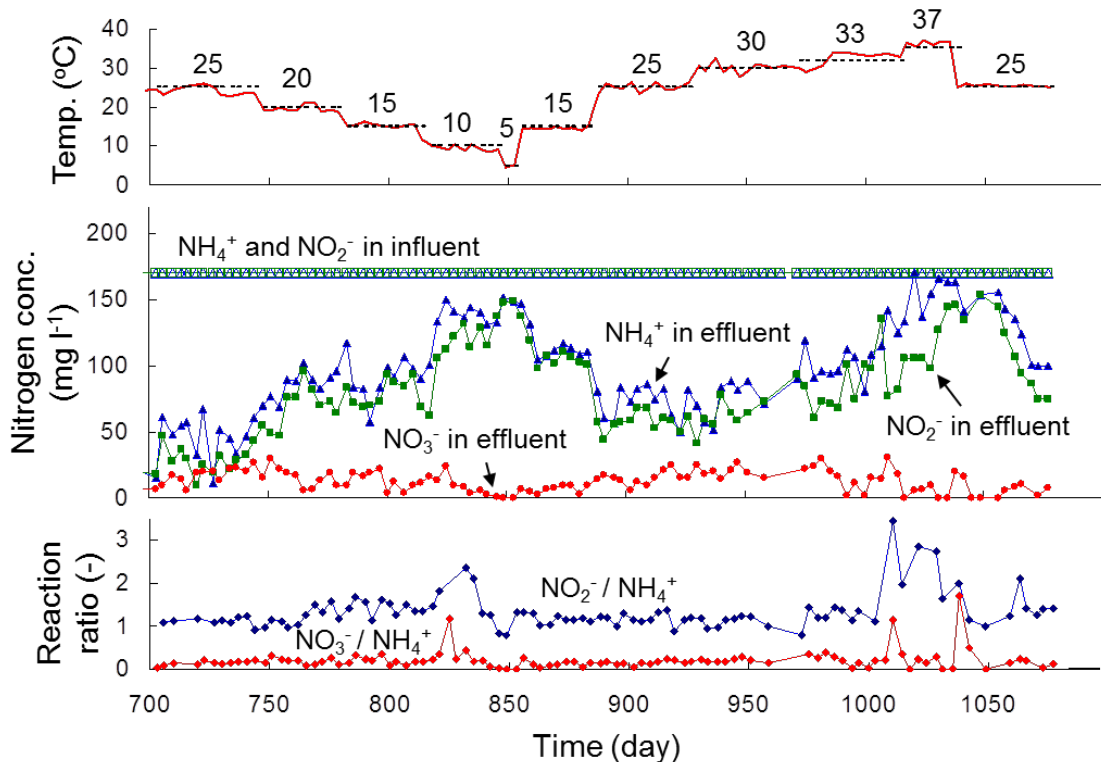


図4 温度と各態窒素濃度および窒素除去能との関係

除去速度との関係を図5に示す。図5をもとに、アレニウスプロットを取り、5~30の範囲における活性化エネルギーを計算したところ 54.6kJ/mol となり、非常に低温下にある極付近の海底底質試料で測定された Anammox 活性の活性化エネルギー値 51kJ/mol に近く、一方で淡水性 Anammox 細菌で報告されている 94kJ/mol 等よりも低い値であることが分かった。以上から、海洋性 Anammox 細菌培養系は淡水性 Anammox 細菌培養系よりも低温下で有利に活動できる可能性が示され、淡水性と海洋性の Anammox 細菌混合培養系を構築することの有意性が示唆された。

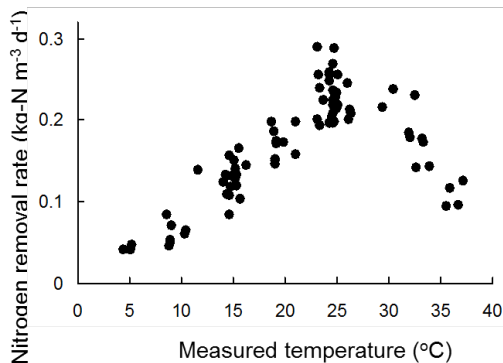


図5 温度と窒素除去速度との関係

また、温度と細菌叢との関係を真性細菌検出用の 16S rRNA を対象とするユニバーサルプライマー、および Anammox に特異的なプライマーの双方を用いて PCR-DGGE 法にて調べた。しかしながら、図6に示すようにいずれのプライマーセットの PCR 増幅物に関して DGGE 上での DNA バンドパターンと温度との間に特段の関係は認められず、温度による共生細菌種への影響は確認されなかった。

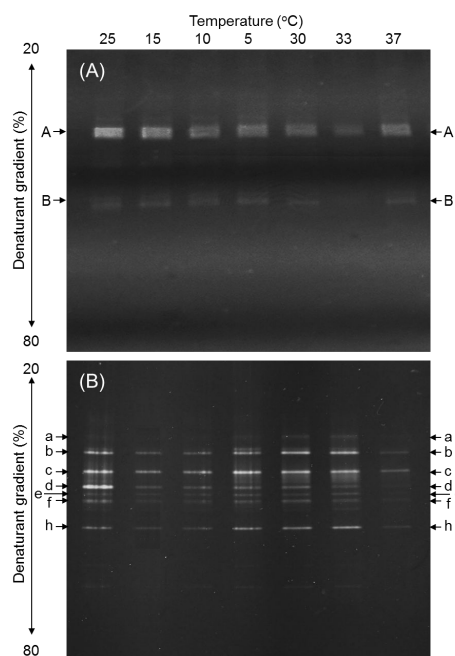


図6 各温度での海洋性 Anammox 培養物から得られた 16SrRNA-PCR-DGGE バンドパターン (A: Anammox 細菌特異的のプライマーによる, B: 一般細菌用プライマーによる)

(2) 海洋性 Anammox 細菌培養系に及ぼす塩分濃度の影響

塩分濃度の海洋性 Anammox 細菌培養系に及ぼす影響については、NaCl 濃度を 0~5%まで変化させても窒素除去能に大きな変化はみられなかった。このことより、海洋性 Anammox 細菌培養系は塩分濃度が 3.5%を超えると窒素除去能の低下がみられる淡水性 Anammox 細菌培養系よりも高い耐塩能を有することが分かった。

(3) 海洋性 Anammox 細菌培養系における動力学的解析 (論文業績2) にて発表

海洋性 Anammox 細菌培養系における窒素除去特性は Monod model, modified Stover-Kincannon model, Grau second-order model によって、各々 0.993, 0.993, 0.991 の高い決定係数が得られるレベルで表現可能であることが分かった。一方, first order model では、決定係数が 0.756 と低い値にとどまった。また, Monod model の適用結果から、基質定数 (K_s) として 0.107 g/L, 比基質除去定数として 0.952 g-N/g-MLVSS/d が各々得られ、淡水性 Anammox 細菌培養系で得られている既往結果に比べて大きな違いは認められなかった。

(4) 淡水-海水コラボレート Anammox 培養系の窒素除去能向上と環境順応特性

固定床型反応槽にて淡水-海水 Anammox 細菌混合培養系の構築を検討するため連続培養を行った結果を、図7~9に示す。

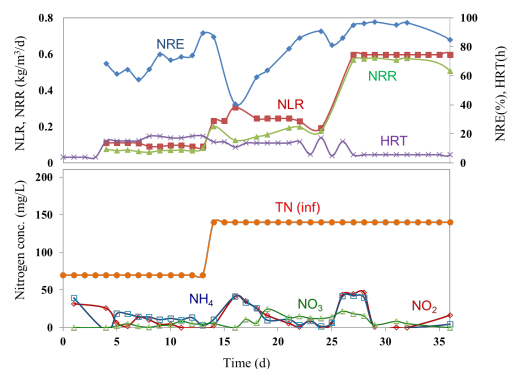


図7 淡水性 Anammox 細菌培養条件での結果

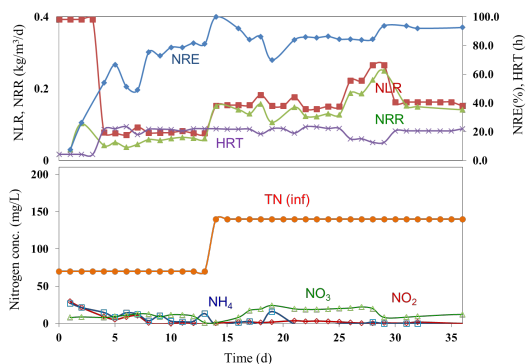


図8 海洋性 Anammox 細菌培養条件での結果

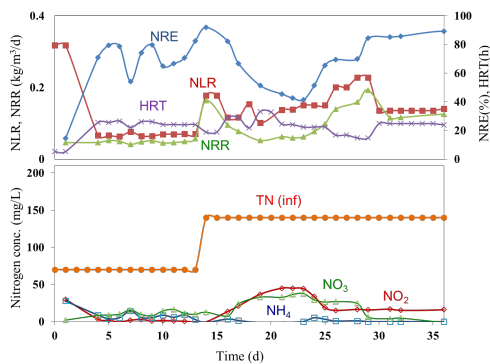


図9 淡水と海水の中間的培養条件での結果

図7~9より明らかなように、淡水、海水、中間的條件のいずれの条件下においても、混合 Anammox 培養物を接種して5日間以内に、窒素容積負荷 0.1g/L/d にて、処理水中窒素濃度の減少がみられ、70%以上の窒素除去率が得られることが分かった。図7から明らかな様に、淡水条件下ではその後約10日間にわたって窒素除去率の上昇(70%~90%)がみられたため、培地(流入水)中窒素濃度を上げることにより窒素容積負荷を0.24g/L/dに上げた。これにより、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素の蓄積による一時的な窒素除去率の低下が認められたものの、その後すぐに処理水中窒素濃度は減少傾向に転じ、約一週間後には85%以上の窒素除去率が得られ安定した。そこで今度は、HRTを短くすることで窒素容積負荷を0.32g/L/dに上昇させたが、窒素除去率の低下は認められず安定した窒素除去能が認められた(窒素除去率:約90%)

海水条件下では、図8から明らかなように、0.7g/L/dの窒素容積負荷において、70~85%の窒素除去率が得られたため、培地中窒素濃度を上げることで負荷を上昇させたところ、処理水中の硝酸性窒素濃度の若干の上昇が約10日間の間認められた。しかしその後は硝酸性窒素濃度も低下して窒素除去率は約90%となり、安定した窒素除去能がみられた。

図9から明らかなように、中間的條件でも窒素容積負荷 0.7g/L/d においては、実験開始後の早い段階で70~85%の窒素除去率がみられたため、培地中窒素濃度を上げることによる窒素容積負荷の上昇を試みた。その結果、処理水中のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素がともに緩やかに上昇し、反応槽内に蓄積することが分かった。また、この現象は淡水条件下で一時的な窒素の蓄積よりも10日程度の長期にわたって起こり、その後、減少傾向に転じた。それ以降は、窒素容積負荷 0.14g/L/d にて、80%以上の窒素除去率で安定な窒素除去能が認められた。

以上の結果から、淡水-海水コラボレート Anammox 培養系は、淡水、海水、中間的條件

のいずれにおいても、窒素除去能を維持可能であることが明らかとなり、本培養系の構築の基礎を確立することができた。

(5) 淡水-海水コラボレート Anammox 培養系の細菌叢解析

CSTRにて淡水と海水の中間的条件下で淡水-海水コラボレート Anammox 培養系の連続培養を行った結果を図10に示す。

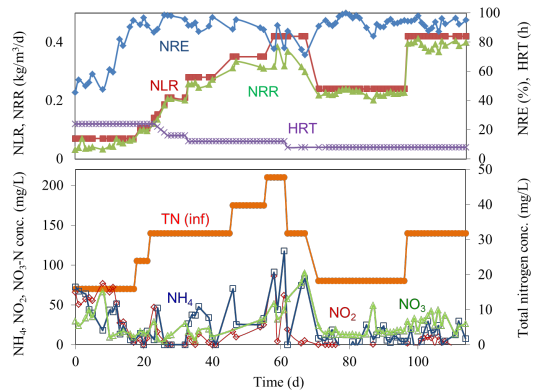


図10 CSRTによる淡水と海水の中間的培養条件での実験結果

CSTRにおいても、窒素容積負荷 0.7g/L/dの条件下で速やかに窒素除去能の上昇がみられ、約90%の窒素除去率が得られた。その後、培地中窒素濃度やHRTを変えることにより窒素負荷を変化させて窒素除去能への影響を検討した。その結果、窒素濃度を上昇させる場合に、一時的な窒素除去能の低下が認められることがあったものの、窒素除去率は概ね80~90%の間で安定推移し、窒素容積負荷 0.4g/L/d にて良好な窒素除去能が得られた。そこで、本反応槽から Anammox バイオマスを採取し、PCRによる16S rRNAの部分配列の増幅物にて大腸菌をホストとする形質転換株の作成を行い、DNA配列の相同性分析による細菌叢解析を行った。また、これと比較するため、植種源に用いた海洋性 Anammox バイオマスと淡水性 Anammox バイオマスについても同様の細菌叢解析を実施した。図11に、各バイオマスにおける結果を示す。

植種源に用いた海洋性 Anammox バイオマスでは、使用プライマーにて増幅されたDNA断片の約75%が我々の研究室で集積培養された海洋性 Anammox 細菌である planctomycete UKU-1 であり、それ以外の Anammox 関連細菌は検出されなかった。また、淡水性 Anammox バイオマスでは、約65%が *Candidatus* "Brocadia carliniensis" と最も高いDNA配列相同性を示し、それ以外の Anammox 関連細菌は検出されなかった。すなわち、本研究で用いた海洋性 Anammox 細菌としては P. UKU-1 が、淡水性 Anammox 細菌としては *Can.* "B. carliniensis" が非常に高い割合で優先していることが分かった。

一方、淡水と海水の中間的条件にて約 100 日間の培養を継続した後の淡水-海水混合 Anammox バイオマスでは、Anammox 細菌が約 88% の割合で検出され、その全てが P. UKU-U、もしくは *Can.* “*B. caroliniensis*” であった。さらに驚くべきことには、図 11 に示すように、Anammox 細菌の 97% が P. UKU-U であり、*Can.* “*B. caroliniensis*” は 3% 程度に過ぎないことが明らかになった。

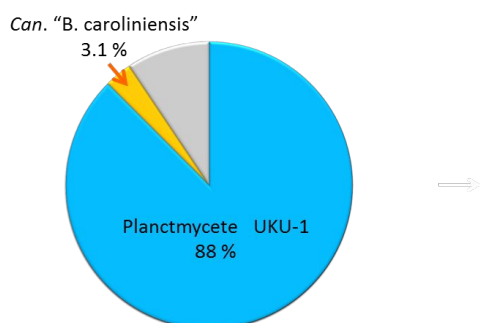


図 11 淡水と海水の中間的条件にて培養した淡水-海水混合 Anammox バイオマスにおいて Anammox 細菌に特異的なプライマーを用いて行った細菌叢解析結果

このことから、塩分濃度を約 1.5% 含み、温度 27.5 の条件は、淡水性 Anammox 細菌である *Can.* “*B. caroliniensis*” よりも海洋性 Anammox 細菌である P. UKU-1 の増殖に有利に働き、P. UKU-1 の占有化につながったものと推定される。一方、割合は小さいながら *Can.* “*B. caroliniensis*” の存在が確認されたことから、このような条件下でも淡水性 Anammox 細菌の共存が確認されたことは、淡水-海水コラポレート Anammox 培養系を構築する上で特筆すべき有用な知見と考えられる。以上から、培養（外的）条件にて、Anammox 細菌の存在比が変化する可能性があることが示されたとともに、両 Anammox 細菌の共存が確認され、淡水-海水コラポレート Anammox 培養系を活用する窒素除去技術の開発に向けた更なる研究を実施する上で極めて有意義な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) XW. Huang, QY. Wei, K. Urata, Y. Tomoshige, XH. Zhang, Y. Kawagoshi, Kinetic study on nitrogen removal performance in marine anammox bacterial culture, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 117 No.3, 285-291, 2014
- 2) Y. Kawagoshi, K. Fujisaki, Y. Tomoshige, K. Yamashiro, and QY. Wei, Temperature effect on nitrogen removal performance and bacterial community in culture of marine anammox bacteria derived from sea-based

waste disposal site, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 113 No.4, 515-520, 2012

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 山下祐貴, 浦田康平, 韋巧艶, 濱武英, 川越保徳, 淡水-海水 Anammox 混合培養系の構築, 第 48 回日本水環境学会年会講演集, p.274 (2014 年 3 月 18 日, 東北大学)
- 2) 山下祐貴, 浦田康平, 黄曉武, 濱武英, 川越保徳, 淡水性-海洋性 Anammox 細菌共生培養系の構築に関する基礎的検討, 平成 25 年度土木学会西部支部研究発表会講演概要集(CD-ROM), VII-026 (2014 年 3 月 8 日, 福岡大学)
- 3) 山下祐貴, 浦田康平, 韋巧艶, 濱武英, 川越保徳, 淡水性-海洋性 Anammox 細菌混合培養系の構築に関する基礎的検討, 平成 25 年度日本水環境学会九州支部研究発表会講演要旨集, pp. 51-52 (2014 年 3 月 1 日鹿児島高専)
- 4) XW. HUANG, QY. Wei, K. Urata, T. Hama, and Y. Kawagoshi, Fast start-up and potential evaluation of marine anammox reactor, *Proceedings of the 5th International Symposium of Gifu University Reading Program for Basin Water Environmental Leaders*, pp.66-67 (2013, 11/8, Gifu Univ.)
- 5) 友重勇気, 山城健人, 韋巧艶, 浦田康平, 佐藤宇紘, 川越保徳, 海洋性 Anammox 細菌培養系における窒素負荷および塩分濃度の影響, 平成 23 年度日本水環境学会九州支部研究発表会講演概要集, p.44, (2012 年 3 月 10 日, 北九州市立大学)
- 6) 浦田康平, 友重勇気, 山城健人, 韋巧艶, 川越保徳, 海洋性 Anammox 細菌培養系における窒素除去速度の向上に関する検討, 平成 23 年度土木学会西部支部研究発表会講演概要集(CD-ROM), pp. 879-880 (2012 年 3 月 3 日, 鹿児島大学)
- 7) 川越保徳, 友重勇気, 山城健人, Wei Qiaoyan, Luong V. Duc, 海洋性嫌気性 Ammonium 酸化細菌の培養系に与える温度の影響, *日本水処理生物学会誌別巻 31 号*, p.49 (2011 年 11 月 18 日, 立命館大学)

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・教授
研究者番号: 00291211

(2) 研究分担者

森村 茂 (MORIMURA SHIGERU)
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号: 20230146

(3) 連携研究者

なし