

ANAMMOX 細菌を利用した省エネルギー型窒素除去プロセスの開発



所属名：広島大学大学院工学研究科

発表者：金田 智規

1. はじめに

閉鎖性水域の富栄養化防止、地下水の硝酸塩汚染への対策の観点から、排水・環境水中からの効率的な窒素除去技術の確立が求められている。現在、微生物反応を利用した生物学的窒素除去プロセスが一般的に用いられているが、エネルギーコストや敷地面積の面から、より効率的なプロセスが求められている。近年、嫌気性アンモニア酸化（ANAMMOX）反応という新たな代謝経路を持つ細菌が発見され、その効率の面から ANAMMOX 反応を導入した窒素除去プロセスが注目されている。しかしながら、ANAMMOX 反応を担う細菌は培養が困難であり、現在国内では本研究を含めて 3 例しか培養に成功していない。ここでは、ANAMMOX 反応を利用した省エネルギー型窒素除去プロセスの開発を目的とした ANAMMOX リアクターの立ち上げの経緯と ANAMMOX 細菌群集の解析結果を報告する。

2. 従来の窒素除去方法

生物学的窒素除去プロセスは流入するアンモニア性窒素を硝酸性窒素へと酸化する硝化反応と、それらを窒素ガスへと還元する脱窒反応を組み合わせたものである（図-1）。このプロセスでは、硝化反応においては十分な酸素供給を必要とし、脱窒反応においてメタノールなどの外部炭素源の添加、もしくは、大量の硝化液循環を必要とすることや、一度酸化したものを還元するフローになっているために、多くのエネルギーや資源を投入して達成できるプロセスである。

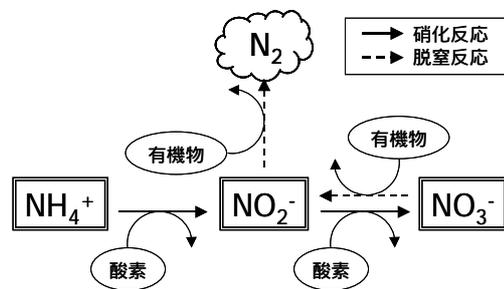


図-1 生物学的窒素除去のフロー

3. ANAMMOX 反応と細菌の特徴

ANAMMOX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窒素ガスへ変換する反応 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) であり、省エネルギーかつ副産物の生成がない微生物反応である（図-2）。酸素のない条件下でアンモニア性窒素を酸化する細菌はそれまで見つかっておらず、嫌気性アンモ

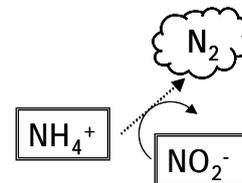


図-2 ANAMMOX 反応

ニア酸化反応（ANaerobic AMMonium OXidation）と命名された。ANAMMOX反応を担う細菌は近年発見されたばかりであり、集積培養の報告例は極めて少ないのが現状である。また、ANAMMOX細菌は比増殖速度が極めて小さく（倍加時間は 11 日）、培養が非常に困難であ

るため、これまでに環境中から分離した事例や窒素除去プロセスの実用化の報告はない。

ANAMMOX反応を担う細菌は現在分離されていないが、16S rRNA遺伝子に基づく系統解析から、*Planctomycetales*目に属する細菌であり、*Candidatus Brocadia anammoxidans*を含めて5属が存在することが示唆されている¹⁾。

ANAMMOX 反応を排水処理に適用する場合、部分硝化（硝化反応を亜硝酸で止める）が必要となる。これは排水中には亜硝酸性窒素はほとんど存在しないためである。したがって、流入するアンモニア性窒素の半分を亜硝酸性窒素に酸化すればよく、コスト的には通常の硝化反応と比べて曝気量が半分で済む計算になる。さらに、従来の脱窒プロセスでは炭素源が必要であり、外部炭素源の添加や、流入水中の有機物を使う場合は硝化液の循環ポンプが必要となる（流入水量の1-2倍程度の循環が必要）。一方、ANAMMOX 反応はアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の共存があれば、脱窒は可能であるため、従来の硝化・脱窒プロセスに比べてはるかに省エネルギー型のプロセスであるといえる。ANAMMOX 反応を利用した窒素除去プロセスは流入水中のBOD成分が少なく、メタノール等の有機物の添加が必要な排水、すなわち、BOD/N が小さい排水からの窒素除去に適している。

4. 植種汚泥の選定

培養が長期間に渡るANAMMOX細菌の培養を成功させるためには、適切な植種源を選定することが不可欠である。適切な植種源はANAMMOX細菌の存在量とその環境によって評価した。まず、様々な下水処理場から採取した汚泥にANAMMOX細菌に特異的なプライマーセットを用いてReal-Time PCR法²⁾を適用し、ANAMMOX細菌由来のDNA濃度を定量することで、存在量の指標とした。さらに、ANAMMOX細菌は有機物による活性阻害の可能性があるので、流入C/N（炭素・窒素比）も植種汚泥の選定の評価項目に加えた。

図-3に汚泥乾燥重量1gあたりに存在するANAMMOX細菌のDNA量と採取した処理場の流入C/Nを示す。解析の結果、広島県A下水処理場のANAMMOX細菌のDNA量が最も大きく、かつ流入C/Nも低かったために広島県A下水処理場の汚泥をリアクターの植種源として用いた。

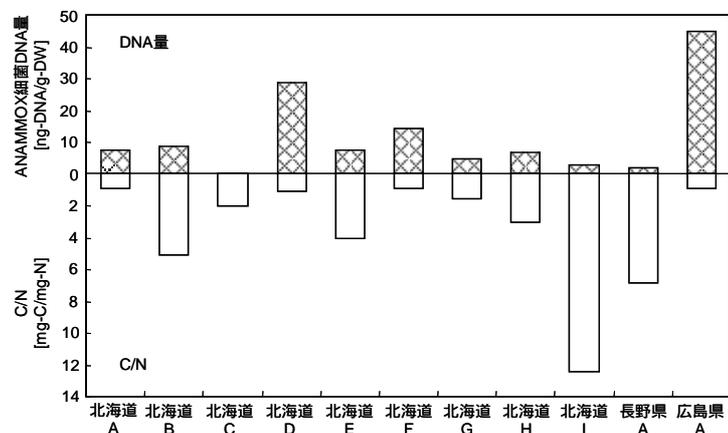


図-3 汚泥中のANAMMOX細菌のDNA量と流入C/N

5. 生物膜リアクターを用いたANAMMOX細菌の集積培養

培養が困難なANAMMOX細菌を窒素除去プロセスとして利用する場合には、効率よくリアクター内に細菌を保持することが重要である。既往の報告ではANAMMOX細菌は浮遊増殖系では培養が困難であり、生物膜系のほうが適しているといわれているため³⁾、本実験においても生物膜リアクターを用いた（図-4）。生物膜リアクターは不織布を生物膜担体とした上向流カラムリアクターを用いた。カラムAは選定した植種汚泥を不織布に付着させて培

地を通水し、カラムBはANAMMOX活性が見られた後のカラムAの流出水（ANAMMOX細菌を含んでいる）を植種源として用いて培養を行った。リアクター容積は0.8 L、生物膜表面積は500 cm²、HRTは3-8 h、担体充填率は14%である。DOを0.5 mg/L以下に保ちながら37°Cで連続通水した。培地はアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素濃度のみを段階的に増加させた。各窒素濃度はイオンクロマトグラフ法により測定した。

選定した植種汚泥を不織布担体に付着させ、基質中のアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素濃度をともに15 mg-N/Lに設定し運転した（図-5）。運転日数が40日を越えたあたりからアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素の同時除去が確認され、60日目の窒素除去率は90%に達した。50日目以降のアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素除去量、硝酸性窒素生成量の比は既往の研究⁴⁾と同様に、1:1.2:0.21であったことや、生物膜の一部が赤褐色に変化したことからANAMMOX細菌の集積が達成されたと考えられる。窒素負荷は70日目から段階的に上げたところ、アンモニア性窒素および亜硝酸性窒素とともに80%以上の除去率を維持しながら窒素除去速度も上昇した。190日目には突然のANAMMOX活性の低下が見られたが、これはリアクター内への酸素の混入等が考えられる。活性の低下後、流入負荷を下げて運転したところ20日程度で回復し、その後順調に除去速度の上昇がみられ、262日目には最大窒素除去速度3.0 kg-N m⁻³ day⁻¹を達成した。

カラムAの96日目の流出水を2 L採取し、カラムBに植種源として通水した（図-6）。運転開始から85日目でANAMMOX反応が確認され、その後徐々に窒素除去速度の上昇が見られ、147日目には

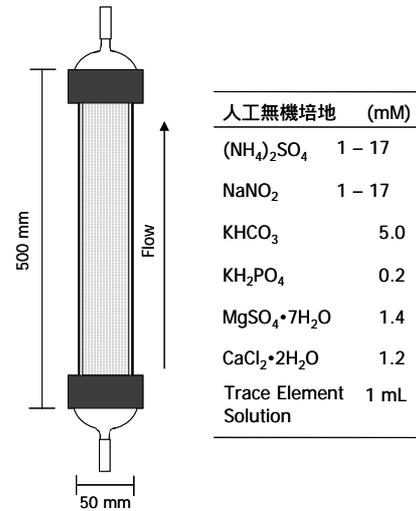


図-4 カラムリアクターの概要

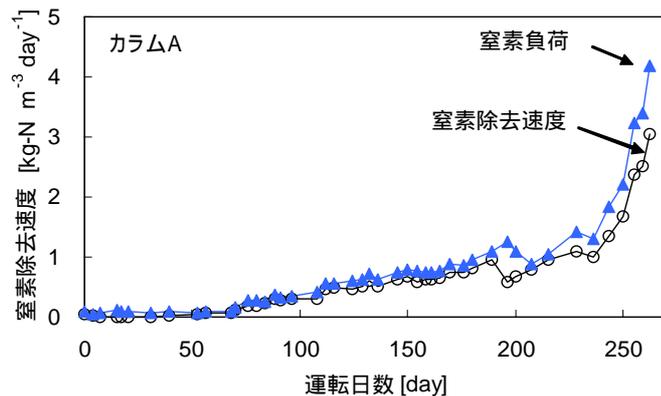


図-5 生物膜リアクターAの窒素除去速度の変化

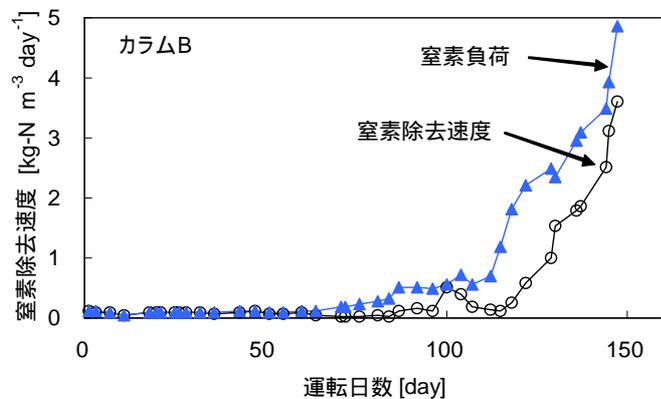


図-6 生物膜リアクターBの窒素除去速度の変化

最大窒素除去速度 $3.6 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成している。カラムBの結果から、ANAMMOX反応が見られたリアクターを植種源として用いた場合でも、ANAMMOXリアクターの立ち上げが可能であることが示された。また、より集積度が高い植種源を用いることで他の細菌の影響を受けにくく、結果として窒素除去能力が高くなったと考えられる。カラムBの立ち上げに時間を要したのは流出水を用いたためにANAMMOX細菌の菌体濃度が低かったためであると考えられる。

6. ANAMMOX 反応に関与する細菌群集の解析

生物膜リアクター内に存在する細菌群集を解析するために、分子生物学的手法を用いた。まず、カラム A の赤褐色に変化した汚泥を採取し、FISH 法により ANAMMOX 細菌の検出を試みた。その結果、ANAMMOX 細菌を対象とする Amx820 プローブで標識される細菌が検出され(図-7)、これらは ANAMMOX 細菌と思われる形態をしていた。なお、結果には示していないが、ANAMMOX 細菌が属する *Planctomycetales* 目に特異的なプローブ Pla46 を用いた FISH においても同様の蛍光を示した。このことから、生物膜内には ANAMMOX 細菌が存在していることが確認された。

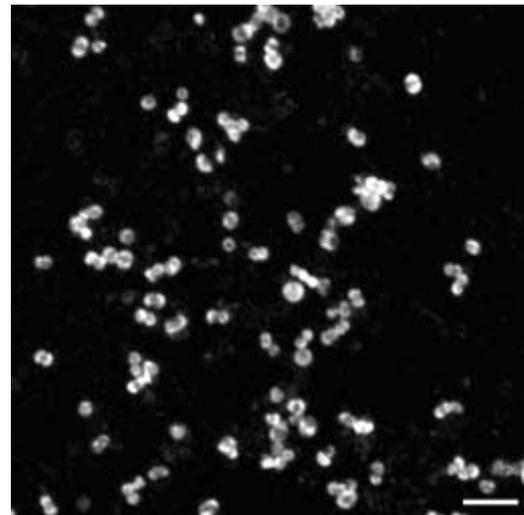


図-7 Amx820 プローブによる FISH 画像
スケールバーは 10 μm

生物膜リアクター内に存在する細菌相を解析するために、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。本研究では全細菌を対象とした Bac11f-1492r と ANAMMOX 細菌が属する *Planctomycetales* 目を対象とした Pla46f-1492r のプライマーセットを用いてクローニングを行い、得られた塩基配列の相同性検索を行うとともに、NJ 法により系統樹を作成した。クローン解析の結果を表-1 に、その系統樹を図-8 に示す。ANAMMOX 細菌に近縁なクローン BU13 とクローン PU1 はお互いに 99%以上の相同性があり、同じ細菌を検出したものと考えられる。これらのクローンは *Candidatus Brocadia anammoxidans* に近縁であったが、その相同性は 95%程度であった。一般に 97%以上の相同性があれば同種であると考えられるため、これらのクローンは排水処理系から報告されている ANAMMOX 細菌とは異なる種である可能性が示唆された。Pla46f-1492r のプライマーセットで検出されたクローン (PU) は全てが ANAMMOX 細菌に近縁なクローンであった。一方、Bac11f-1492r プライマーセットで検出されたクローン (BU) のうち ANAMMOX

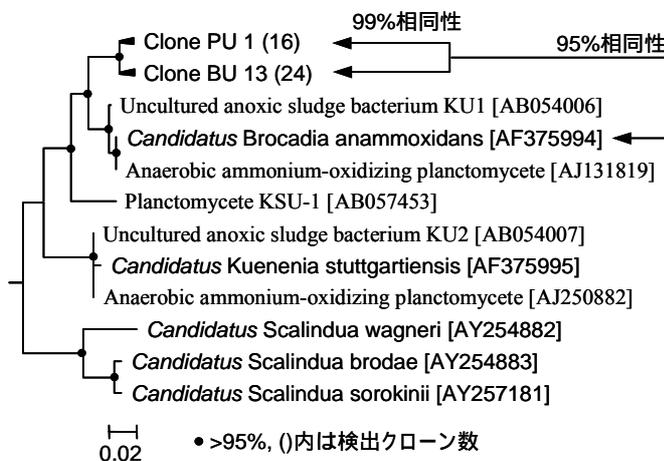


図-8 検出されたクローンの系統樹

細菌に近縁なクローンは全体の 60%を占め、残りは β -Proteobacteria などが占めた。ANAMMOX 細菌以外のこれらの細菌は初期に植種汚泥中に存在していた細菌であり、ANAMMOX 細菌を由来とする有機物（菌体成分や代謝産物）を利用して生物膜内に共存していると考えられる。今後はこれらの細菌の生物膜内での構造や機能を明らかにし、ANAMMOX 細菌との生物膜内の相互作用について解析を行う。

表-1 各プライマーセットで検出された生物膜内の細菌相

primer set	clone	frequency	similarity	species
Bac11f & 1492r	BU11	12/41 (29%)	93-98%	Uncultured anoxic sludge bacterium KU1 (AB054006)
	BU2	5/41 (13%)	94-97%	Uncultured Planctomycetales (AB176696)
	BU13	5/41 (13%)	93-96%	<i>Candidatus</i> Brocadia anammoxidans (AF375994)
	BU14	2/41 (5%)	93%	Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete (AJ131819)
	BU7	4/41 (11%)	98-99%	Uncultured bacterium (AY328574) (beta-proteobacteria)
	BU29	3/41 (8%)	98%	<i>Thauera</i> sp. (AJ315678) (beta-proteobacteria)
	BU44	2/41 (5%)	95%	Uncultured beta proteobacterium (AY118150)
	BU24	1/41 (2%)	98%	Beta proteobacterium (AB194096)
	BU4	1/41 (2%)	89%	Uncultured bacterium (AY328608) (beta-proteobacteria)
	BU25	1/41 (2%)	97%	Uncultured bacterium (AY328712) (beta-proteobacteria)
	BU16	1/41 (2%)	98%	Uncultured soil bacterium (AY699582) (beta-proteobacteria)
	BU18	1/41 (2%)	91%	Uncultured alpha proteobacterium (AJ318133)
	BU33	1/41 (2%)	95%	<i>Bacteriovorax</i> sp. (AY294218) (delta-proteobacteria)
	BU20	1/41 (2%)	88%	Uncultured <i>Hydrogenothermus</i> sp. (AY861789) (Aquificae)
	BU1	1/41 (2%)	84%	Uncultured Acidimicrobiales bacterium (AY882671) (Actinobacteria)
Pla46f & 1492r	PUI	14/16 (88%)	94-97%	<i>Candidatus</i> Brocadia anammoxidans (AF375994)
	PU3	2/16 (12%)	95-97%	Uncultured anoxic sludge bacterium KU1 (AB054006)

7. まとめ

植種汚泥中のANAMMOX細菌の存在量と処理場のC/Nを考慮して適切な植種源を選定し、ANAMMOX生物膜リアクターの立ち上げを試みたところ、運転開始から 50 日ほどでANAMMOX反応が見られた。最大窒素除去速度は $3.0 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ に達した。また、このリアクターの流出水を別のカラムリアクターに植種源として通水した場合、同様のANAMMOX反応が見られ、最大窒素除去速度 $3.6 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ を達成した。

分子生物学的手法によりリアクター内の細菌相の解析を行った結果、ANAMMOX 細菌に近縁なクローンが検出され、これまでに報告されている ANAMMOX 細菌とは異なる種である可能性が示唆された。また、生物膜内には ANAMMOX 細菌と共存する細菌の存在が示唆された。今後はプロセスの実用化を目指して、より安定的な運転方法や更なる処理能力向上について検討する予定である。

参考文献

- 1) 藤井隆夫 (2004) 微生物学的側面からみた anammox, 水環境学会誌, 27, 448-452.
- 2) 對馬育夫ら (2004) ANAMMOX 集積汚泥の微生物構造および機能解析 第 38 回日本水環境学会年会講演集, 370.
- 3) 古川憲治 (2004) 嫌気性アンモニア酸化 (anammox) の発見とその後の研究開発動向, 水環境学会誌, 27, 442-447.
- 4) van de Graaf et al, (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142, 2187-2196.