

# 生理機能解析を目指した海洋性 anammox 細菌の大量培養

長岡工業高等専門学校 永井孔明 押木守 荒木信夫  
長岡技術科学大学 山口隆司

## 1. 背景

Anammox (嫌気性アンモニウム酸化) 細菌とは、無酸素条件下においてアンモニウムを電子供与体、亜硝酸を電子受容体としてエネルギーを得る独立栄養性の嫌気性細菌である<sup>1)</sup>。これらの微生物は、酸素の代わりに酸化剤として亜硝酸を用いてアンモニウムを酸化し、最終生成物として窒素を生成する<sup>2)</sup>。最近の研究では、anammox 反応において一酸化窒素とヒドラジンが中間代謝物質として生成することが知られている<sup>2)</sup>。Anammox 細菌は系統分類学的には *Planctomycetes* 門に属し、*Candidatus* “*Kuenenia*”, *Candidatus* “*Brocadia*”, *Candidatus* “*Anammoxoglobus*”, *Candidatus* “*Jettenia*”, *Candidatus* “*Scalindua*”の5属が提案されている<sup>3)</sup>。Anammox 細菌は海洋、河川、湖沼、土壌、淡水および海洋の堆積物、酸素極小地帯などの幅広い環境に生息していることが分かっている<sup>1,4)</sup>。海洋環境中から検出される anammox 細菌の16S rRNA 遺伝子配列の大半が “*Candidatus Scalindua*” へ分類されることから、“*Candidatus Scalindua*” に属する anammox 細菌は、しばしば海洋性 anammox 細菌とみなされる<sup>5)</sup>。

海洋性 anammox 細菌は、海洋から発生する N<sub>2</sub> ガス生成の最大 67%を担っているとされているが<sup>6)</sup>、淡水性 anammox 細菌と比べ、その生理機能は殆ど解明されていない<sup>7)</sup>。本研究では、海洋性 anammox 細菌 “*Candidatus Scalindua japonica*” からタンパク質(酵素)を精製・同定し、生理機能を明らかにすることを最終目標とした。本発表ではタンパク質精製に必要となる菌体を確保するために“*Candidatus Scalindua*”を大量培養した結果を報告する。

## 2. 実験方法

“*Ca. S. japonica*”を培養するために 30 L スケールの膜分離型リアクター(MBR)(図1)を運転した。MBR 立ち上げ時には本研究室で運転する小型 MBR から引き抜いた“*Ca. S. japonica*” 培養液 3 L を接種した。MBR へ供給した人工海水培地の組成を表1

に示す。亜硝酸・アンモニア濃度は 0.2 mM から徐々に引き上げ、最終的に 1.5 mM とした。MBR は温度 22 °C, pH 7.5-7.7 で運転し、N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> 混合ガスを 0.45 mL/min で供給することで嫌気状態を保った。また、フロー式の水位センサーを用いて水位を 30 L に保った。水理的滞留時間(HRT)は 1 日から運転を開始し、徐々に短縮することで、窒素負荷を 5.6 mg-N・m<sup>-3</sup>・day<sup>-1</sup> から 42 mg-N・m<sup>-3</sup>・day<sup>-1</sup> に設定した。リアクター内の亜硝酸濃度はナフチルエチレンジアミン法で測定した。

表1. 人工海水培地組成<sup>8)</sup>

per 200L			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	adjustable	MgSO <sub>4</sub>	19.80g
NaNO <sub>2</sub>	adjustable	CaCl <sub>2</sub>	25.27g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.88g	TES1*	100ml
KHCO <sub>3</sub>	100g	TES2*	100ml
yeast extract	0.2g	Sealife	5000g

\*: Trace Element Solution

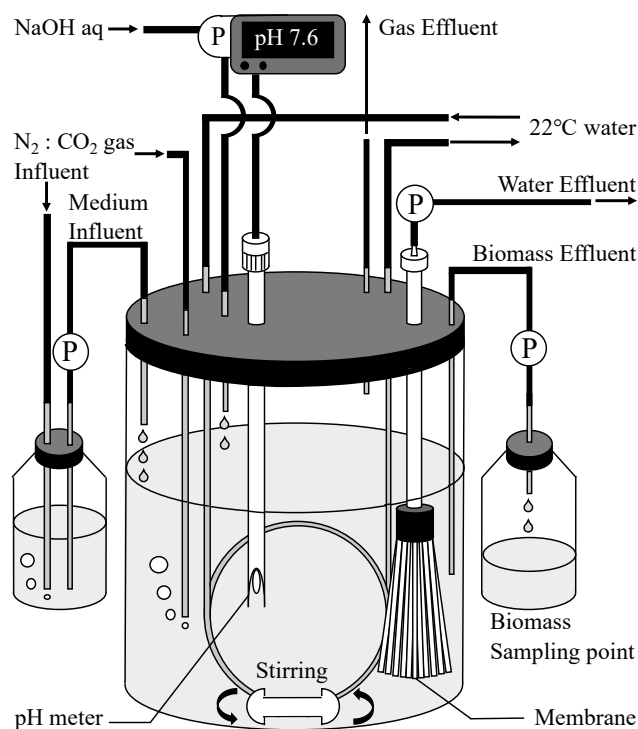


図1. 30L 容膜分離バイオリアクター概略図

### 3. 実験結果および考察

これまでに247日運転を行った。リアクター内における亜硝酸濃度の推移を図2に示す。0～50日目において窒素負荷  $5.6 \text{ mg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  の条件で運転したところ、流入及び流出水の亜硝酸濃度に差が認められなかった。この原因は流入基質の亜硝酸濃度が低い(0.5 mM)のために菌体の活性が増加しなかったためだと考え、50日目以降から窒素負荷を  $11.2 \text{ mg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  に引き上げて運転を行った。その結果、80～120日目において、流出水の亜硝酸濃度が低下し、菌体活性が上昇した。130日目からは窒素負荷をさらに  $28 \text{ mg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  に引き上げたが、流出水の亜硝酸濃度は安定して低濃度であった。そこで140日目から窒素負荷  $42 \text{ mg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  で運転を開始したが、流出水中の亜硝酸濃度が増加し、安定して運転を行うことができなかった。140日目以降から亜硝酸消費が停滞した原因として、リアクター内における攪拌の不備が挙げられる。140日目以降から槽内を攪拌するためのマグネットスターラーが度々停止してしまう現象が起きてしまい、流入した培地や pH 調整溶液が攪拌されずに濃度が局所的に高い箇所が生じてしまった。このため、高濃度の基質・NaOH 溶液に菌体が耐えきれずに死滅してしまい亜硝酸が消費されなかったと考えられる。この問題を解決するために、槽内を攪拌羽で攪拌する方式に変更することとし、図3のように改造を行なった。現在は引き続き運転を行い、亜硝酸の消費をモニタリングしている。

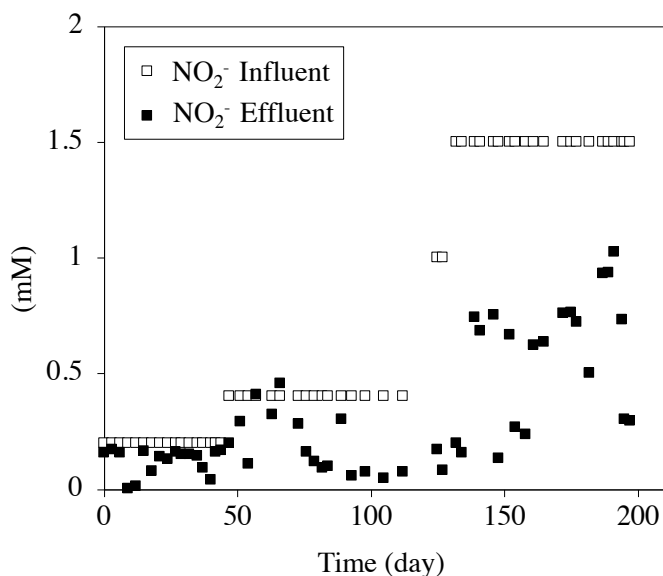


図2. リアクター内における亜硝酸濃度の推移

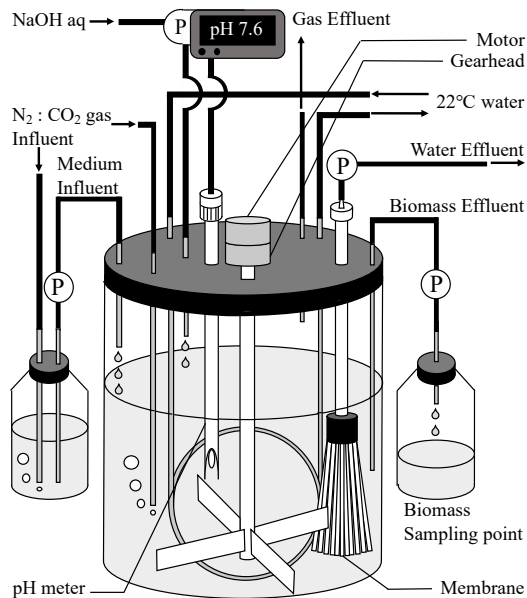


図3. 改造したリアクターの概略図

### 文献

- 1) 野村太一ら (2009), 海洋性 anammox 細菌の集積培養条件に関する研究, 土木学会西部支部研究発表会, VII-058:997-998
- 2) B. Kartal and J. T. Keltjens (2016), Anammox biochemistry: a tale of heme c proteins. Trends Biochem. Sci., **41**:998-1011.
- 3) 栗田貴宣ら (2014), 海洋性 anammox 細菌の重金属および硫酸塩代謝活性, 土木学会論文集 G(環境), **70**:III\_251-III\_256.
- 4) B. Kartal et al. (2013), How to make a living from anaerobic ammonium oxidation, FEMS Microbiol., Rev., **37**:428-461.
- 5) M. Oshiki et al. (2015), Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, Environ. Microbiol., **18**:2784-2796
- 6) G. Qian et al. (2018), Diversity and distribution of anammox bacteria in water column and sediments of the Eastern Indian Ocean, Int. Biodeterior. Biodegradation, **133**:52-62
- 7) T. Awata et al. (2013), Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium belonging to the "Candidatus Scalindua" group, Appl. Environ. Microbiol., **79**:4145-4148.
- 8) 増間智郎 (2018), 機能解析を目的とした海洋性 anammox 細菌の連続大量培養, 長岡高専環境都市工学化卒業論文.