

## DHS リアクターを用いた完全アンモニア酸化細菌の培養および定量

松江工業高等専門学校 学生会員 ○村上 穂香  
松江工業高等専門学校 正会員 山口 剛士

### 1. 目的

窒素循環における硝化反応は微生物を介して行われており、飲料水および排水処理システムにおけるアンモニア除去に広く用いられている非常に重要なプロセスである。また、硝化反応は従来アンモニアから亜硝酸、亜硝酸から硝酸の2段階の硝化であると考えられていた。しかし、2015年に完全アンモニア酸化 (complete ammonia oxidation : comammox) 細菌が報告され、アンモニアから硝酸の1段階で硝化反応を行う微生物が存在することが明らかとなった<sup>1)</sup>。comammox細菌は、アンモニア基質親和性が高く、貧栄養な環境で窒素循環に大きく関与することが知られている<sup>2)</sup>。このことから、comammox細菌は河川や湖沼などの低濃度のアンモニア除去に対して有効な微生物であると推測され、集積培養を行うことで水処理システムへの適用も可能であると考えられる。しかし、comammox細菌の集積培養に関する報告は未だ少ないのが現状である。そこで本研究では、微生物保持能力が高いと報告されているDown-flow Hanging Sponge (DHS) リアクターを用いて土壌中から採取したサンプルからcomammox細菌の集積培養を試みた。また、Real-time PCR法を用いてcomammox細菌の定量を行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1 機能遺伝子を標的とした微生物の同定

松江高専近辺の畑から採取した土壌サンプル内に存在する comammox 細菌の特定を行った。まず、comammox 細菌の *amoA* 遺伝子を標的としたプライマーA189Y-C576r および CA209E-C576r を用いて2段階PCRを行った<sup>3)</sup>。得られたPCR産物は、大腸菌に形質転換させ、LB培地による培養、PCR産物を含んだプラスミドのM13領域を標的としたPCR法を行った。次に、得られたPCR産物を外注にて塩基配列を解読し、NCBIのblast toolを用いて他の微生物との遺伝子相同性を確認した。

#### 2.2 培養設備

土壌サンプルを3つのポリウレタンスポンジ (8cm<sup>3</sup>/個) に固着させたものをカラムに供し、DHSリアクターを作成した。流入基質は、単離されている comammox 細菌の培地を参考に作成し、送液ポンプを用いて流入させた<sup>1)</sup>。

#### 2.3 水質分析

DHSリアクターの流入部および流出部の水質サンプルを採取し、DHSリアクター内で完全な硝化反応が行われているか確認を行った。分析は、pH、水温、DO値の測定、イオンクロマトグラフィを用いたアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度の測定を行った。

#### 2.4 Real-time PCR法

土壌サンプルおよびDHSリアクター稼働後に二か月に一度ポリウレタンスポンジから採取した汚泥サンプル内の *Nitrospira nitrificans*, *Nitrospira nitrosa* のコピー数の定量を行った。プライマーは、*Nitrospira nitrificans* を標的としたプライマー (Nitrificans-amoA 463F-836R)、*Nitrospira nitrosa* を標的としたプライマー (Nitrosa-amoA 469F-812R) を用いた<sup>4)</sup>。

---

キーワード comammox, *Nitrospira*, nitrification, Down-flow Hanging Sponge reactor, Real-time PCR

連絡先 〒690-8518 島根県松江市西生馬町14-4 松江工業高等専門学校 生産・建設システム工学専攻2年

TEL 0852-36-5261

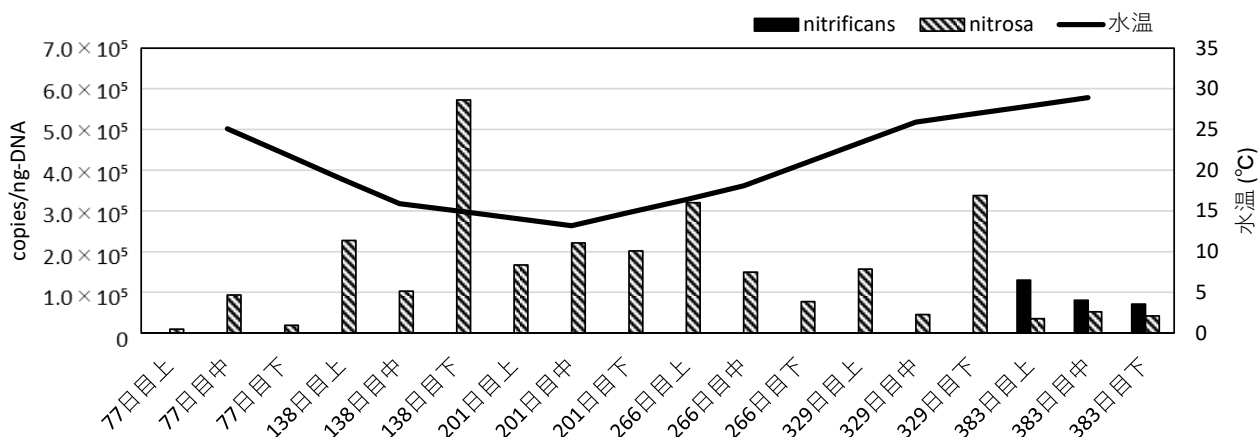


図1 サンプル内における *Nitrospira nitrificans*, *Nitrospira nitrosa* コピー数

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 機能遺伝子を標的とした微生物の同定

LB培地で増殖した組替え微生物のうち、8個のコロニーを選定し、塩基配列を解読した。その結果、6個のコロニーが *Nitrospira nitrificans* が有する cladeA の *amoA* 遺伝子 (遺伝子相同性:98%)、2個のコロニーが *Nitrospira nitrosa* が有する cladeA の *amoA* 遺伝子 (遺伝子相同性:98%) と近縁であることが明らかとなった。このことから、採取した土壌サンプル内には *Nitrospira nitrificans* および *Nitrospira nitrosa* が存在していることが示唆された。

#### 3.2 水質分析

まず、DHSリアクターの流入部および流出部で pH の測定を行った結果、流入部に比べ流出部の pH が低下しており、硝化反応が生じていることが確認された。次に、イオンクロマトグラフィを用いてアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度の測定を行った。その結果、流入部に対して流出部でアンモニアが減少し、硝酸が増加していた。さらに、亜硝酸は流入部および流出部でほとんど検出されず、DHSリアクター内で完全な硝化反応が行われていることが明らかになった。

#### 3.3 Real-time PCR 法

土壌サンプルおよびDHSリアクターから採取した汚泥サンプルにおける 1ng-DNA 中の *Nitrospira nitrificans*, *Nitrospira nitrosa* のコピー数の定量を行った (図1)。その結果、*Nitrospira nitrosa* は201日目(2月)までは増加していたがそれ以降は減少していることが確認された。また、*Nitrospira nitrosa* の減少は、水温の上昇に伴い生じていることから夏場の水温が高い時期においては、*Nitrospira nitrosa* の増殖が困難であることが示唆される。一方で、土壌サンプルの解析で存在していた *Nitrospira nitrificans* は夏場の水温が高い383日目(8月)で検出され、水温が高い場合に増殖が促進されるのではないかと考えられる。

### 4. まとめ

本研究では、土壌中から得られたサンプルを用いて、DHSリアクターでの comammox 細菌の集積培養を試みた。その結果、DHSリアクター内では完全な硝化反応が継続して行われていることが明らかになった。しかし、本実験条件では comammox 細菌の集積培養には至らなかった。今後は pH や流入濃度など培養条件の見直しが必要であると考えられる。

### 参考文献

1) Daims H *et al.*, *Nature*, 528, 504-509 (2015). 2) K. Kits *et al.*, *Nature communications*, 10, (2019). 3) F. Xia *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 84, (2018). 4) N. Beach and D. Noguera, *Frontiers in Microbiology*, 10, (2019)