

DHS リアクター運転による完全アンモニア酸化細菌の培養

長岡技術科学大学大学院 学生会員 ○佐藤 友紀
 長岡技術科学大学大学院 正会員 渡利 高大
 長岡技術科学大学大学院 正会員 幡本 将史
 長岡技術科学大学大学院 正会員 山口 隆司

1. はじめに

硝化反応は、地球規模の窒素循環に必須プロセスであり生物学的廃水処理においても極めて重要な役割を担っている。硝化反応は従来、アンモニア酸化細菌 (Ammonia oxidizing bacteria :AOB)によってアンモニアが亜硝酸へ、亜硝酸酸化細菌 (Nitrite oxidizing bacteria :NOB)によって亜硝酸が硝酸に酸化される、2段階の反応であると考えられていた。しかし、2015年にアンモニア酸化と亜硝酸酸化を単独個体で担う完全アンモニア酸化細菌 (Complete ammonia oxidization :Comammox 細菌) の存在が発見された¹⁾。Comammox 細菌は、AOB や NOB と比較して増殖速度が遅いが、増殖収率が高く、アンモニア濃度が低い条件下において優位性があると推測されている²⁾。そのため、Comammox 細菌は低濃度のアンモニア除去において有効な微生物と考えられており、集積培養を行いその生態を明らかにすることによって水処理システムへの適用が可能であると考えられる。これまでの研究からスポンジ担体中ではバイオフィームが容易に形成でき、Comammox *Nitrospira* の集積が非常に有利であると報告されている³⁾。そこで我々の研究グループでは、Down-flow Hanging Sponge (DHS) リアクターにより Comammox 細菌の集積培養を試みた。

2. 実験概要

2.1 リアクターの運転条件

リアクターは 20 L のカラムを使用し、32 °C に温度調整したインキュベータ内に 2 基 (R1, R2) 設置した。微生物担体は、一辺が 33 mm の材質がポリウレタンスポンジを使用した。リアクター内に、担体をランダムに 250 個充填し、スポンジ容積を 7.0 L とした。窒素負荷を R1 で 2.5 mg-N/L/day, R2 で 1.2 mg-N/L/day とし、水

理学的滞留時間 (HRT) をそれぞれ 3.5 h, 7.5 h とした。R2 のみ処理水を循環させ、リアクター内部の乾燥を防止ともに硝化反応を促進した。

運転は、アンモニア濃度を 30 mg-N/L に調整した基質を連続的に供給して行った。また、基質の pH が 7.5-8.5 になるように KH_2PO_4 と NaHCO_3 の添加により調整した。長岡中央浄化センターから採取した活性汚泥を、リアクター上部から 300 ml 添加することで、担体に植種した。

2.2 測定項目

DHS リアクターの流入部と流出部の水質サンプルを採取した。アンモニアは吸光度計 (HACH DR 3900)、亜硝酸、硝酸はオートアナライザ (QuAAtro39, BLTEC) を用いて測定を行った。

2.3 微生物群集構造解析

植種した汚泥とスポンジ担体から抽出したサンプルに対し、16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物群集構造解析を行った。DNA 抽出は FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Bio) を用いて行った。PCR による増幅は Univ.515F-806R のプライマーセットを用い 95°C: 3min [95°C: 45 s, 50°C: 1min, 72°C: 1.5 min] ×22, 72°C: 10 min の条件で行った。PCR 増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。その後、iSeq100 (イルミナ社) により塩基配列を取得し、Qiime2 により解析した。

解読した塩基配列については、相同性検索プログラム BLAST⁴⁾を使用して、近縁な既知配列を検索した。それをもとに MEGA11 ソフトウェアによって系統解析を行い、R2 内で検出された *Nitrospira* 属の系統樹を作成した。Bootstrap values は 1000 回の系統樹作成において再現された値を使用した。

キーワード Comammox, DHS リアクター, *Nitrospira* 属

連絡先 s203261@stn.nagaokaut.ac.jp 〒940-2136 新潟県長岡市上富岡 2-22-4

TEL03-3355-3442

3. 結果および考察

図1にDHSリアクター内の窒素成分濃度の経日変化を示す。R1で $23.8 \pm 23\%$, R2で $90.6 \pm 22\%$ のアンモニアが除去された。亜硝酸態窒素はR1で 2.28 ± 1.8 mg-N/L, R2で 0.65 ± 0.37 mg-N/L, 硝酸態窒素はR1で 2.91 ± 1.8 , R2で 19.54 ± 10.8 mg-N/L検出した。R2は、長いHRTによって効率的なアンモニア除去が行われた。

植種した汚泥とスポンジ担体から抽出したサンプルに対し、16S rRNAに基づいた微生物群集構造解析を行った。植種した汚泥では、R1で1.2%, R2で0.4%の*Nitrospira*属が検出された。リアクター運転中の担体内では、R1で1.8%, R2で46.1%の*Nitrospira*属が検出された。検出された*Nitrospira*属の内R1で0.3%, R2で13.9%が未培養種であった。*Nitrosomonas*属の存在割合がR1で1.2%, R2で4.4%であったことから、R2では、*Nitrospira*属が優占して存在したことが確認された。

検出した*Nitrospira*属の16s rRNA遺伝子を標的とした分子系統解析結果を図2に示す。解析の結果、R2内の*Nitrospira*属が4つの種(ASV1, ASV2, ASV3, ASV4)に分類された。全てのComammox細菌は亜系統IIに属する*Nitrospira*であることが確認されており、本研究では4種の内2種が亜系統IIに属する*Nitrospira*種であった。ASV1とASV3が亜系統IIの*Nitrospira nitrosa*と最も近縁でありComammox *Nitrospira*だと考えられた。ASV1は12%, ASV3は1.5%の存在割合を示した。R2内では、亜系統Iの*Nitrospira defluvii*に最も近縁であるASV4の存在割合が32%であり、優占していることがわかった。

4. おわりに

本研究は、DHSリアクターを運転することでComammox細菌の集積培養を試みた。その結果、R1で $23.8 \pm 23\%$, R2で $90.6 \pm 22\%$ のアンモニアが除去され、硝化反応が確認できた。また、*Nitrospira*属がR1で1.8%, R2で46.1%検出された。R2リアクターでは、Comammox *Nitrospira*である*Nitrospira nitrosa*と近縁な種が1.5% (ASV3), 12% (ASV1) 存在した。しかし、Comammox細菌として報告されている種ではない*Nitrospira defluvii*が最も優占した。そのため、pHやHRT、アンモニア濃度などの培養条件について検討し、リアクター内の環境を最適化することでComammox細菌の培養確率向上を目指す。

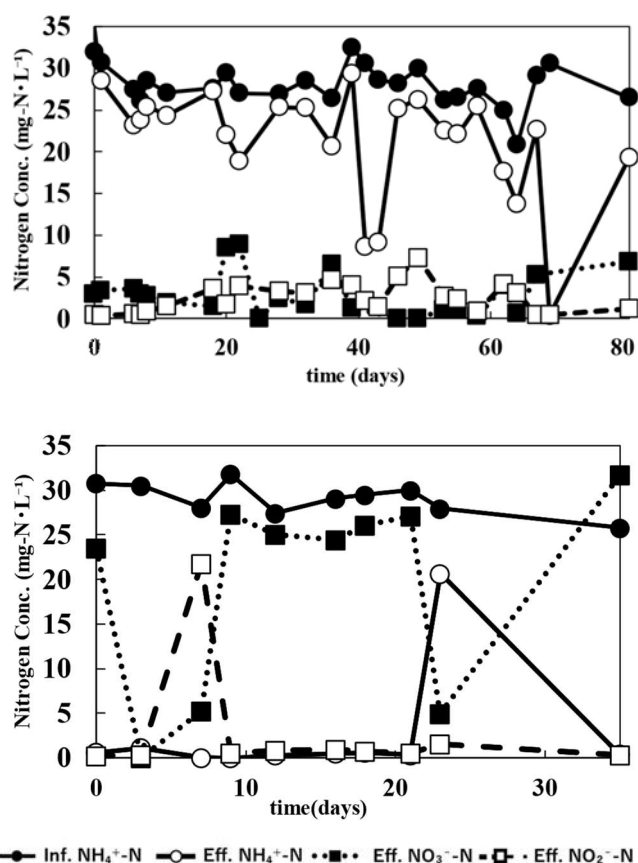


図1 窒素成分濃度の経日変化

: 上図がR1, 下図がR2の窒素成分濃度の経日変化

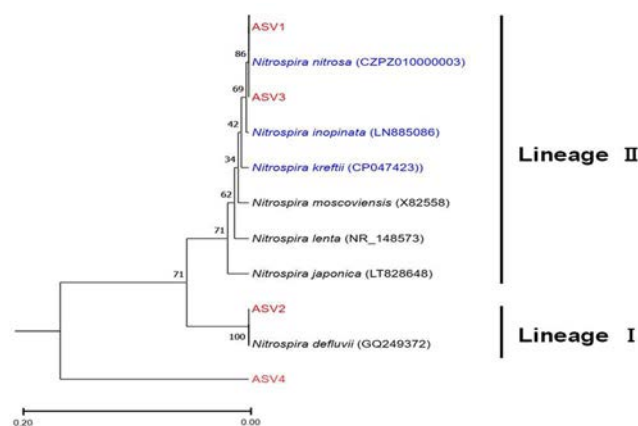


図2 *Nitrospira*属の16S rRNA遺伝子を標的とした分子系統解析

参考文献

- 1) DAIMS, Holger, et al. *Nature*, 2015, 528.7583: 504-509.
- 2) LI, Chaoyu, et al. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2023, 53.2: 161-176.
- 3) HUANG, Tuo, et al. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56.17: 12584-12591.
- 4) Schäffer, Alejandro A., et al. *Nucleic acids research* 29.14, (2001): 2994-3005.