

DHS リアクター内の主要微生物群集

松江工業高等専門学校 ○村上 穂香

松江工業高等専門学校 正会員 山口 剛士

1. はじめに

硝化反応は、地球規模の物質循環において重要な役割を果たしている。近年まで硝化反応は、アンモニアから亜硝酸塩への酸化、亜硝酸塩から硝酸塩への酸化の2段階のプロセスであると考えられていた。しかし、2015年にアンモニアから硝酸塩への1段階の酸化が可能である完全アンモニア酸化 (complete ammonia oxidation: comammox) 細菌の存在が報告された¹⁾。また、近年では多くの水処理施設においても comammox 細菌が存在していることが明らかとなっており、工学においても重要な微生物であることが報告されている。さらに、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²⁾。このことから、comammox 細菌は高濃度のアンモニア除去に適用するよりも、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はないかと推測される。しかし、comammox 細菌が優占した水処理装置は報告されていないのが現状である。そこで、本研究では comammox 細菌の集積培養を行うことを目的として、長時間の汚泥滞留時間 (SRT) を確保することが可能な水処理装置である down flow hanging sponge (DHS) リアクターに着目し、comammox 細菌が含まれている土壌サンプルを用いて DHS リアクターを稼働させた。本発表では、本装置におけるアンモニア処理性能と微生物群集構造解析および comammox 細菌の *amoA* 遺伝子に着目し real-time PCR 法を適用した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 培養設備

本研究に用いたサンプルは、松江高専近辺の畑から土壌を採取し、3つのポリウレタンスポンジ (8cm³/個) に充填させた。それらをカラムに供し、DHS リアクターを設置した。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¹⁾。

2.2 水質分析

水質分析に用いたサンプルは、定期的にリアクターの流入部、流出部から採取した。採取したサンプルは、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ウム、亜硝酸塩、硝酸塩濃度を測定した。

2.3 微生物群集構造解析

本研究では、微生物を網羅的に解析可能な 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的としたプライマー (Mi515f-Mi806r)³⁾を選定し、外注により微生物群集を明らかにした。得られた塩基配列は Blast tool を用いて近縁種の推定を行い、サンプル内の微生物叢について分析した。

2.4 Real-time PCR 法

DHS リアクターに用いた土壌サンプルおよび稼働 77 日目のサンプルは、real-time PCR 法を行い、comammox 細菌数を定量した。用いたプライマーは、comammox 細菌の *amoA* 遺伝子を標的としたプライマー (Ntsp-*amoA* 162F-359R)⁴⁾を選定した。

3. 実験結果および考察

3.1 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

キーワード comammox 細菌, 硝化反応, DHS リアクター

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 1 年

TEL 0852-36-5261

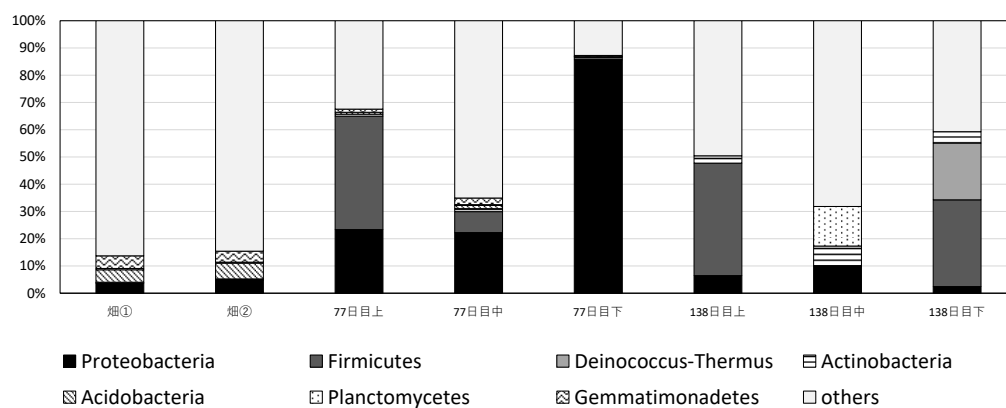


図1 門レベルにおける微生物群集構造解析の結果

ていることが確認された。このことから、DHS リアクター内で硝化反応が起きていることが示唆された。また、アンモニア濃度は、DHS リアクター前後で減少し、硝酸濃度は DHS リアクター前後で増加していた。さらに、亜硝酸塩は、DHS リアクター前後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発生していることが示唆された。

3.2 微生物群集構造解析

DHS リアクターに供した土壌および稼働 77 日、138 日目の汚泥中における微生物群集構造解析を行った結果、comammox 細菌が属する *Nitrospirae* 門は全てのサンプルにおいて 1%未満であった。しかし、稼働 77 日目および稼働 138 日目では、*Nitrospirae* 門の割合が土壌サンプルと比較して微量であるが増加していた。土壌サンプルには *Acidobacteria* 門が優占して存在していたが、DHS リアクターを稼働させることで *Acidobacteria* 門の減少が見られた (図 1)。*Acidobacteria* 門は土壌や堆積物を含む環境中から広く検出されている微生物であるため、今回採取したサンプルにも多く含まれていることが推測された。また、DHS リアクター稼働後は *Proteobacteria* 門に属する微生物の増加が見られた。*Nitrospirae* 門および *Proteobacteria* 門の中には亜硝酸酸化細菌 (Nitrite-Oxidizing Bacteria : NOB) に近縁な微生物が存在している⁵⁾。このことから、バイオリアクター内では comammox 細菌のみではなく、NOB も硝化反応に関わっていることが示唆された。

3.3 Real-time PCR 法

DHS リアクター内で comammox 細菌が増加しているか確認するために、土壌サンプルおよび稼働 77 日目の DHS リアクター内の lng-DNA における comammox 細菌のコピー量を定量した。その後、土壌サンプルでは、平均 1.4×10^4 copies/ng-DNA であったが、稼働 77 日目のサンプルでは、平均 8.6×10^4 copies/ng-DNA であった。以上の結果から、DHS リアクター内で comammox 細菌の増加していることが明らかになった。

4. まとめ

本研究では、DHS リアクターを用いた comammox 細菌の集積培養を試みた。その結果、水質分析により DHS リアクター内で硝化反応が起こっていることが明らかになり、また、微生物群集構造解析および Real-time PCR 法による解析の結果、DHS リアクター内で comammox 細菌が増加していることが確認できた。このことから、DHS リアクターの稼働を継続することで comammox 細菌のさらなる培養が見られる可能性が高いことが示唆された。

参考文献

- 1) Daims, H. et al. *Nature* 528, 504-509 (2016).
- 2) Kits, K. D. et al. *Nat. Commun.* 10, 1-12 (2019).
- 3) Caporaso, J.G. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4516-4522 (2011).
- 4) Susan J. et al. *fed rapid sand filter communities*. 20, 1002-1015. (2018).
- 5) Daims, H. et al. *Trends Microbiol.* 24, 699-712 (2016).