

## 土壌中から得られた完全アンモニア酸化細菌の培養の試み

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

窒素は地球上の生物にとって不可欠な栄養素である。しかし、ほとんどの生物は窒素をそのまま利用することができないため、微生物によって窒素循環が行われている。窒素循環のうち硝化反応は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。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段階の反応であると考えられてきたが、2015年に完全アンモニア酸化 (complete ammonia oxidation : comammox) 細菌の発見によりアンモニアから硝酸の1段階での硝化が可能であることが明らかになった<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>。また、低DO下において効率的な硝化が可能であると考えられている<sup>3)</sup>。これらのことから comammox 細菌は低濃度の窒素除去に有効な微生物であると考えられる。Comammox 細菌を水処理システムに適用するには培養が必要であるが、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される Down-flow Hanging Sponge (DHS) リアクターを使用し、環境中から得られた土壌サンプルからの comammox 細菌の培養を試みた。

### 2. 実験方法

#### 2.1 機能遺伝子を標的とした微生物の同定

DHS リアクターに用いたサンプルは松江高専近辺の土壌から採取し、サンプル内に存在する comammox 細菌の種の特定を行った。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>4)</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 リアクター内で完全な硝化反応が行われているか確認するために、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た。その後、pH、水温、DO 値の測定および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 nitificans*, *Nitrospira nitrosa* のコピー数の定量を行った。プライマーは、*Nitrospira nitificans* 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) を選定した<sup>5)</sup>。

---

キーワード comammox, nitrification, cultivation, Down-flow Hanging Sponge reactor

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

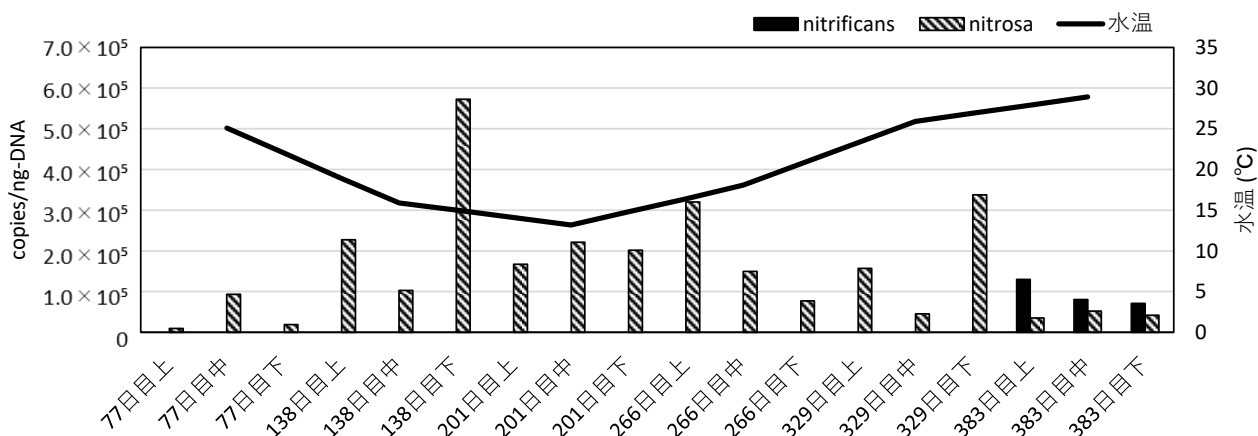


図1 サンプル内における *Nitrospira nitrificans*, *Nitrospira nitrosa* コピー数

### 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, 流出部で 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, アンモニア除去率は平均 36.9%, 硝酸濃度は流入部で平均 0.58%, 流出部で平均 25.1%であった。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 *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た。Comammox 細菌の培養には 25°C が適していることが報告されていることから, 夏季は, *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 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, 環境中から得られたサンプルからの 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ため, pH や流入濃度など培養条件の見直しが必要である。

### 参考文献

- 1) Daims H *et al.*, *Nature*, 528, 504-509 (2015).
- 2) K. Kits *et al.*, *Nature communications*, 10, (2019).
- 3) P. Roots *et al.*, *Water Research*, 157, 396-405 (2019).
- 4) F. Xia *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (2018).
- 5) N. Beach and D. Noguera, *Frontiers in Microbiology*, 10, (2019)