

DHS リアクターを用いた Comammox 細菌培養の試み

長岡技術科学大学大学院 非会員 ○佐藤友紀
正会員 山口隆司 幡本将史 渡利高大

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 Oxidizer :Comammox 細菌) の存在が発見された¹⁾。Comammox 細菌は、AOB 及び 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、集積培養を行うことで水処理システムへの適用が可能であると考えられるが、その生態はわかっていない。これまでの研究から、スポンジを微生物保持担体として使用する Down-flow Hanging Sponge (DHS) リアクターにおいても、Comammox 細菌による完全アンモニア酸化が一部、行われている可能性が報告されている³⁾。そこで本研究では、DHS リアクターにより Comammox 細菌の集積培養を試みた。

2. 実験方法

2.1 リアクター概要

本研究で運転した DHS リアクターの概略図を図1に示す。DHS リアクターは 20 L(高さ 0.7 m×幅 0.17 m)を用い、32 °Cに温度調整したインキュベータ内に設置した。

使用したスポンジ担体は、長さ 33 mm×高さ 33 mm×奥行 33 mm の材質がポリウレタン製で、外径が円筒状のポリエチレン製のケーシングを装着させた。DHS リアクター内には、スポンジ担体をランダムに 250 個充填し、スポンジ容積を 5.3 L、水理学的滞留時間(HRT)を 5h として運転した。スポンジ担体への基質の供給は、ポンプを用いてリアクター上部へ流入させた。

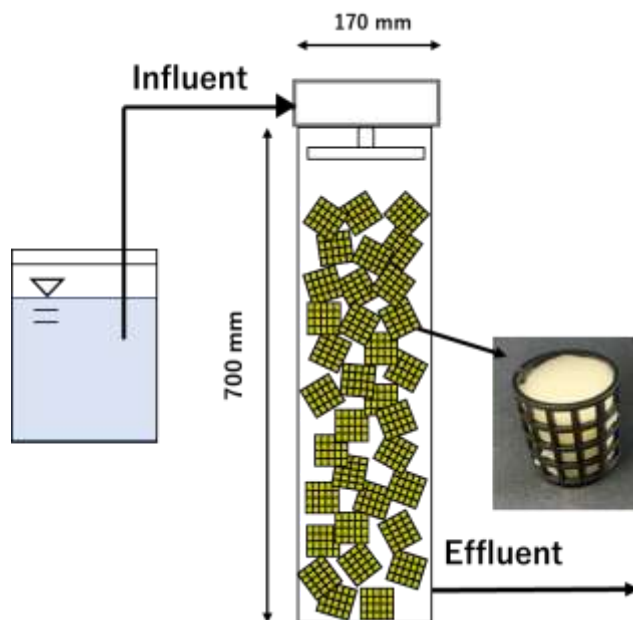


図 1 DHS リアクター概略図

基質の組成は、Van de Graaf ら⁴⁾の研究に基づいた。基質のアンモニア濃度は 30 mg/L になるように調整した。また、基質の pH は 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。種汚泥は、長岡中央浄化センターから採取した活性汚泥を使用した。活性汚泥の汚泥濃度は 3.12 g-MLSS/L と 2.51 g-MLVSS/L であった。リアクター運転前に 300 mL の活性汚泥をリアクター上部から添加することで、スポンジ担体に植種した。

2.2 測定項目

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、水質分析を行った。分析は pH, DO, 水温, アンモニア, 亜硝酸, 硝酸の測定を行った。アンモニアはネスラー法, 亜硝酸と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

スポンジ担体から採取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 Fast spin kit (MP-Biomedicals) 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た。PCR 増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、その後、

iSeq100(イルミナ社) を使用し塩基配列を決定した. 得られた 16S rRNA 遺伝子データは QIIME 2 ソフトウェアにより解析した.

3. 結果および考察

図 2,3 に DHS リアクター内の窒素成分濃度の経日変化を示す. DHS リアクターは, Comammox 細菌が優占したリアクターと同条件のアンモニア濃度で運転を行った. 運転開始から 18 日目に亜硝酸と硝酸の生成が確認された. 運転開始 25 日では, 10%のアンモニア性窒素が除去され, 亜硝酸態窒素が 1.67 ± 0.1 mg/L, 硝酸態窒素が 4.97 ± 0.3 mg/L 検出し, 硝化反応が確認された. DHS リアクターの除去率が低い要因として運転期間が短いことが考えられる. Zhao ら⁵⁾の研究では完全なアンモニア酸化が起こるまで 2 ヶ月の期間を有していたため, 今後も継続して, DHS リアクターを連続運転していく必要がある.

スポンジ担体からサンプルを採取し 16S rRNA に基づいた微生物群集構造解析を行った. 図 4 に得られた細菌の 16S rRNA 配列を科レベルに分類した結果を示す. 担体内では, AOB である *Nitrosomonadaceae* 科に属する微生物が 1.35 % 存在していた. 一方で, *Nitrospiraceae* 科に属する *Nitrospira* 属が 0.69 % 存在した. 検出された *Nitrospira* 属は, NOB として報告されている種と近縁であり, Comammox 細菌として報告されている *Nitrospira* 属細菌ではなかった.

4. 結論

本研究では, 長岡中央浄化センターから採取した活性汚泥を用いて, DHS リアクターでの Comammox 細菌の集積培養を試みた. その結果, 10%の窒素が除去され, 硝化反応が確認できた. しかし, 本研究では, Comammox 細菌の集積培養には至らなかった. 今後は, pH や HRT, アンモニア流入濃度, 種汚泥などの培養条件について検討し, DHS リアクター内の環境を最適化していく必要がある.

参考文献

- 1) DAIMS, Holger, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 2015, 528.7583: 504-509.
- 2) LI, Chaoyu, et al. Niche specialization of comammox *Nitrospira* in terrestrial ecosystems: Oligotrophic or copiotrophic?. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2022, 1-16.
- 3) WATARI, Takahiro, et al. Development of a single-stage

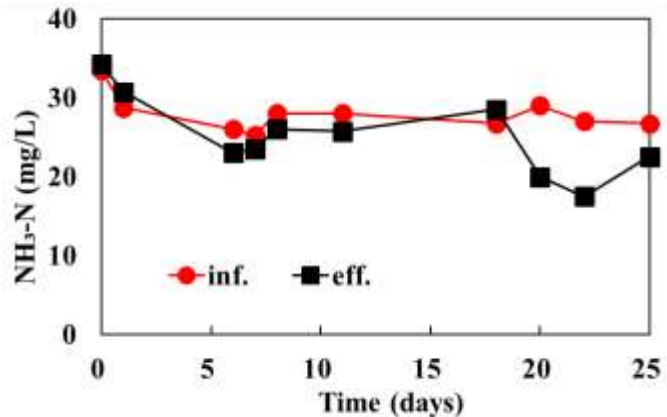


図 2 NH₃-N の経日変化

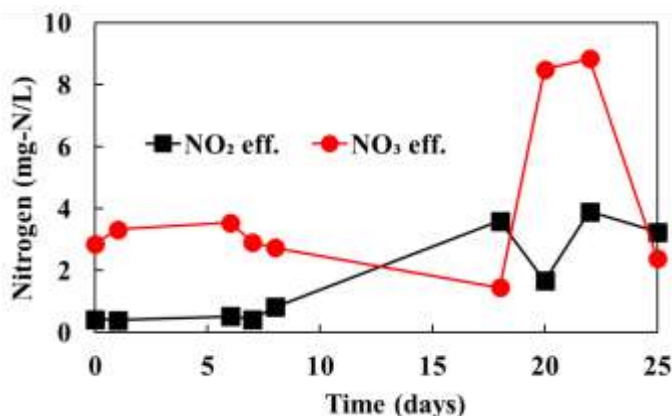


図 3 NO₂⁻-N, NO₃⁻-N の経日変化

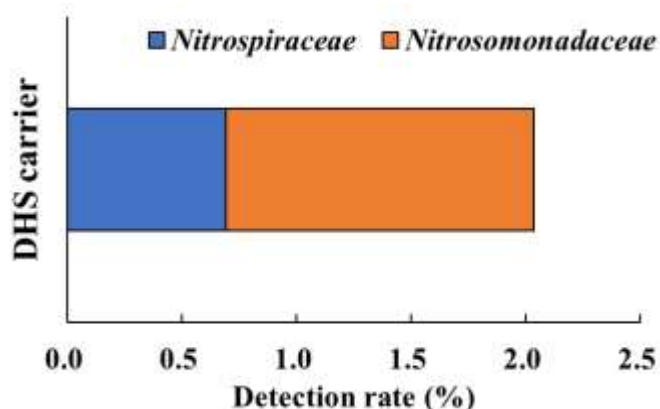


図 4 微生物群集構造解析結果

mainstream anammox process using a sponge-bed trickling filter. *Environmental Technology*, 2021, 42.19: 3036-3047.

- 4) VAN DE GRAAF, Astrid A., et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 1996, 142.8: 2187-2196.
- 5) ZHAO, Jing, et al. "Selective Enrichment of Comammox *Nitrospira* in a Moving Bed Biofilm Reactor with Sufficient Oxygen Supply." *Environmental Science & Technology*, 2022 56, 18, 13338-13346.