

スポンジ内における Comammox 細菌の分布

長岡工業高等専門学校 非会員 ○木村天哉 正会員 川上周司
長岡技術科学大学 正会員 渡利高大

1. 背景と目的

従来、硝化反応はアンモニア酸化細菌 (AOB) がアンモニアを亜硝酸に酸化、亜硝酸酸化細菌 (NOB) が亜硝酸を硝酸に変える 2 段階の反応と考えられてきた。しかし 2015 年に NOB の一つである *Nitrospira* 属の中に 2 段階の硝化反応を単独で担う Complete Ammonia Oxidation (Comammox: 完全アンモニア酸化) 細菌の存在が確認された。¹⁾ Comammox 細菌を利用することで亜硝酸の蓄積を抑制しつつ、効率的なアンモニア除去が行えると考えられる。一方で、Comammox 細菌の生態的役割や微生物群集内での空間的局在に関しては依然として不明な点が多い。特に、担体を用いたリアクターにおけるバイオフィーム中での分布を解明することは、効率的で安定した窒素除去システムの構築において重要である。

本研究では、リアクター内のウレタンスポンジ担体に形成されたバイオフィームを対象として、Comammox 細菌の空間分布を解析・可視化することを目的とする。本研究で得られる知見は、Comammox 細菌の生態理解を深めるとともに、将来的な担体サイズの最適化によるリアクターの運転効率向上に貢献すると期待される。

2. 実験方法

2.1. Comammox 細菌の集積培養

Comammox 細菌の集積培養を目的とし、スポンジ担体を使用した Moving Bed Bioreactor (MBBR) を構築した。植種汚泥には *Nitrospira* 属の存在を確認している新潟県刈羽村の年下水を処理する回分式活性汚泥法の汚泥を用いた。容量 6 L のリアクターはアクリル板を加工して作成し、スポンジ担体には 15 mm 角に切断したウレタンフォームを用い、有効容積の 5 % 程度充填した。汚泥を植種したスポンジ担体は、エアレーションの循環流によってリアクター内を回転させた。リアクター内の溶存酸素 (DO) 濃度は、8.2 mg/L に維持した。リアクターは恒温器内に設置し、設定温度は 25 °C とし室温は 20 °C から 30 °C を維持した。連続供給した培地は、アンモニア濃度 33.6 mg-N/L で、アンモニア負荷 0.0047 kg/m³/day で流入させた。また、培地保管時のアンモニア酸化を防ぐために培地交換の際、培地を窒素ガスでパージした。培地の組成は Fujitani らの方法²⁾を参考にし、容量 10 L の容器に KH₂PO₄ (0.5 g), KCl (0.8 g), MgSO₄ · 7H₂O (0.5 g), NaCl (3.0 g), CaCO₃ (1.7 g), Distilled water (9.7 L) を入れてオートクレーブしたのち、NH₄Cl solution: NH₄Cl (10 g/L) を 100 ml, Trace

element solution: FeCl₂6H₂O (0.7 g/L), MnCl₂4H₂O (20 mg/L), CoCl₂6H₂O (4.8 mg/L), NiCl₂6H₂O (4.8 mg/L), CuCl₂2H₂O (3.4 mg/L), EDTA (0.86 g/L), ZnCl₂ (13.6 mg/L), Na₂WO₄2H₂O (6.6 mg/L) 100 ml 混合して作成した。pH は定期的に NaHCO₃ 溶液を滴下することで 6.9 を維持した。培地の流入、流出は定量送液ポンプを用い、1 L/day を維持した。

2.2. バイオフィームを標的とした Comammox 細菌の検出

リアクター内のウレタンスポンジ担体の中央部のパラフィン包埋切片を作成した。パラフィン包埋切片は、外部委託により 2025 年 2 月 25 日に作製した。作成した切片に対し、Nitrospirae 門の rRNA を標的とした Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 法および、*amoA*-mRNA を標的とした Catalyzed Reporter Deposition (CARD)-FISH 法を同スライド上で行うことで多重染色 FISH 法を行った。CARD-FISH 法は Kubota ら^{3), 4)}の方法に準拠し、FISH 法は、Kubota ら⁴⁾の方法に準拠した。多重染色は、まず Ntsp-*amoA*-359r プローブを用いた CARD-FISH 法を行い、その後 Ntspa712⁵⁾プローブを用いた FISH 法を行った。ホルムアミド濃度は、CARD-FISH 法は 60 %, FISH 法は 30 % で行った。

2.3. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

スライドガラスは DAPI による全菌染色後に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, A1) を用いて、観察、撮影を行った。観察には、15 mm 角のスポンジ試料を表面から中心に向かって 3 つの層に区別した。外側から順に、外層 (外側から約 0.0 mm ~ 2.5 mm の領域)、中層 (外側から約 2.5 mm ~ 5.0 mm の領域)、内層 (中央部約 5.0 mm ~ 7.5 mm の領域) とした。各層において、無作為に選んだ複数の視野を撮影した。撮影した各画像について、DAPI で可視化された総細胞数および Cy3, Cy5 蛍光を示す細胞数をカウントし、DAPI 染色細胞総数に対する Cy3 および Cy5 の割合を算出した。

3. 結果

多重染色 FISH 法により、リアクター内ウレタンスポンジ担体に形成されたバイオフィーム中の Comammox 細菌の空間分布を解析した。Ntspa712 プローブで Nitrospirae 門全体を、Ntsp-*amoA*-359r プローブで *amoA*-mRNA をそれぞれ標識した (図 1)。本研究では、これら 2 種類のプローブ由来の蛍光が重なって観察された細胞を Comammox 細菌として同定

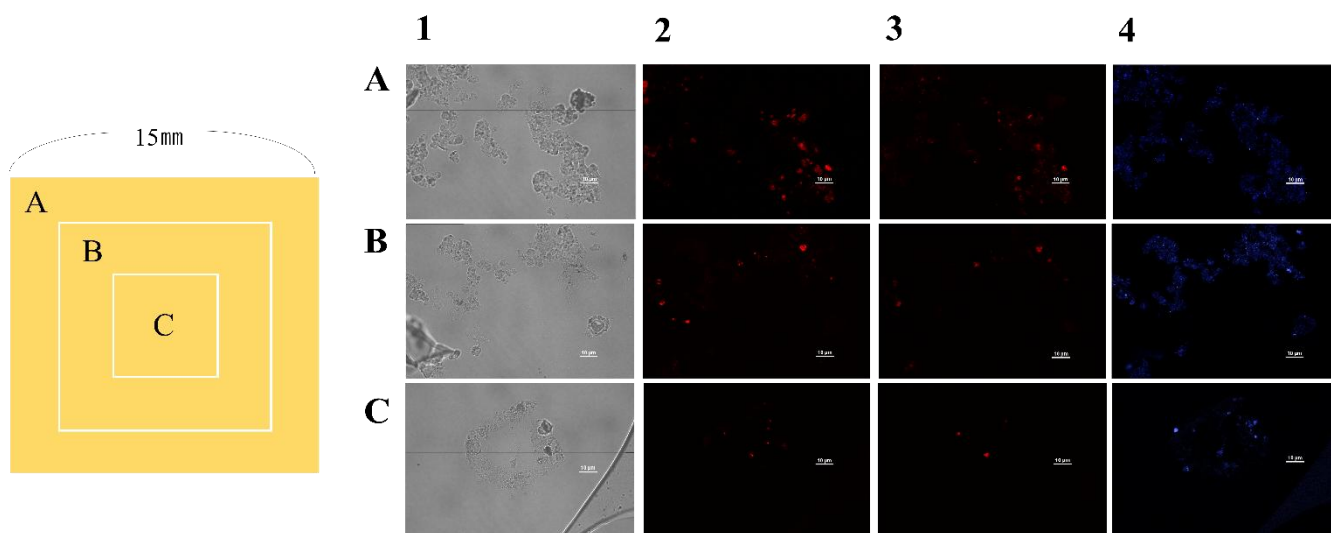


図 1. バイオフィルムを標的とした多重染色 FISH 法による顕微鏡観察画像. 左図: スポンジ中央の模式図. A: 外層. B: 中層. C: 内層. 1: 位相差視野. 2: R 励起視野 (Tyramide-Cy3). 3: R 励起視野 (Tyramide-Cy5). 4: DAPI 染色後視野

した. 各層において無作為に複数の視野を撮影し, 得られた画像中の Comammox 細菌の細胞数を計測した. 観察視野の実測面積で正規化することにより, Comammox 細菌の密度 (cell/mm^2) を算出し, 2 回の実験結果の平均値として示した (図 2). 外層では 2108 ± 136 (cell/mm^2), 中層では 780 ± 99 (cell/mm^2), 内層では 622 ± 310 (cell/mm^2) であり, Comammox 細菌の密度は外層から内層にかけて低下する傾向が見られた. この結果から, Comammox 細菌は担体内部に進むにつれて生育が制限され, 外層において高密度に分布していることが示唆された.

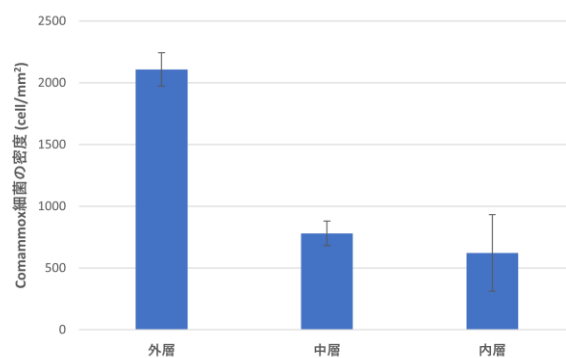


図 2. 各層における Comammox 細菌の密度

4. 考察

本研究の結果, Comammox 細菌は担体外層で高い密度で分布し, 内層に向かうにつれて密度が低下するという不均一な分布が観察された. この現象は, 担体内部に形成される酸素の拡散勾配に起因すると考えられる⁹⁾. すなわち, 外層から内層にかけて酸素濃度が低下することで, Comammox 細菌の生育環境が空間的に限定されたと推察される. また, 本研究のリアクターは, 溶存酸素濃度が 8.2 mg/L という好気条件下かつ低アンモニウム濃度で運転された. 先行研究で, 溶存酸素濃度が約 6 mg/L かつ低アンモニア濃度の条件下で Comammox 細菌が優占する⁷⁾ことが報告されており本リアクターでも同様に外層が好適な生育環境となったと考えられる. 一方, 内層でも Comammox 細菌がわずかに検出されたことから, Comammox 細菌群は高い酸素親和性を有することが知られており⁸⁾, 低酸素環境でも一定の活性を維持できる可能性が示唆される. したがって, 担体内部における酸素の濃度勾配が, Comammox 細菌の空間分布を規定する主要な要因であると考えられる.

5. おわりに

本研究では多重染色 FISH 法により, ウレタンス

ポンジ担体内の Comammox 細菌の空間分布を解析した結果, Comammox 細菌は担体の外層に偏在し, 内層に向かって減少する分布を形成していることを確認した. 今後は, 大きさの異なるスポンジ担体を用いて同様の解析を行い, 担体サイズが Comammox 細菌の分布や窒素除去に与える影響を検討する.

参考文献

- 1) Daims H. *et al.*, *Nature*, Vol.528, No.7583, pp504-509, 2015.
- 2) Fujitani H. *et al.*, *FEMS microbiol. Letters*, Vol. 367, No.1, fnaa025, 2020.
- 3) Kubota K., *Microbes Environ*, Vol.28, No.1, pp.3-12, 2013.
- 4) Kubota K. *et al.*, *J. Microbiol. Methods*, Vol.66, No.3, pp. 521-528, 2006
- 5) Daims H. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.67, No.11, pp.5273-5284, 2001.
- 6) Collins, G. *et al.*, *J. Environ. Eng.*, Vol.131, No.5, pp.798-805, 2005.
- 7) Zhao, Y. *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, Vol.56, No.7, pp.4315-4325, 2022.
- 8) Kits, K.D *et al.*, *Nature.*, Vol.549, pp. 269-272, 2017