

高感度 FISH 法による Comammox 細菌の視覚的検出

長岡工業高等専門学校 非会員 ○ 山田灯乃助, 正会員 川上周司
金沢大学 正会員 松浦哲久, 長岡技術科学大学 正会員 渡利高大

1. はじめに

硝化反応は従来, アンモニア酸化細菌 (AOB) によってアンモニアが亜硝酸に変化し, 亜硝酸酸化細菌 (NOB) によって亜硝酸が硝酸に変化するという二段階に分かれて行われていると考えられてきた. しかし 2015 年に NOB の 1 つである *Nitrospira* 属の中に二段階の硝化反応を 1 種の細菌が担う 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 細菌は硝化反応の課題の一つであった亜硝酸の蓄積が生じないという利点があり, より高速なアンモニア除去技術が開発できると考えられる. 今や Comammox 細菌は水環境分野のトレンドではあるものの, 各々の研究で開発中のバイオリアクター内に Comammox 細菌がどの程度集積されているかを知ることは容易ではない. 現在のところ分離株が得られている Comammox 細菌としては *Nitrospira* 属が挙げられるが, *Nitrospira* 属の中には Comammox 反応を行うものと亜硝酸酸化代謝のみしか持たないものが混在しており, rRNA 遺伝子に基づく細菌種の同定法では Comammox 細菌とそうでないものを区別することは難しいことが知られている. Comammox 代謝能力を知るためには, アンモニア酸化酵素 ammonia monooxygenases (AMO) の遺伝子を保有しているか否かを調べる方法が用いられており, 今のところそれを明らかにするためにはゲノム解析を用いる方法が採用されている. しかし, 時間の面でもコストの面でも煩雑であると言え, こうした現状からも簡易かつ安価な Comammox 細菌の同定技術が望まれている.

本研究では蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて rRNA と amoA mRNA の同時染色技術を用いて, シングルセルレベルで Comammox 細菌を同定できる技術の開発を目的とした. rRNA 遺伝子に基づく *Nitrospira* 属の同定を rRNA-FISH で行い, AMO に基づくアンモニア酸化代謝能力を amoA mRNA を標的とした高感度 CARD-FISH で検出することで Comammox 代謝能力を持つ *Nitrospira* 属を同定できると考えた. 本研究ではこの目的を達成するための準備段階として, まず mRNA を標的とするために生菌状態の Comammox 細菌が容易に採取できる環境を構築するために Comammox 細菌が集積できるリアクターを立ち上げた. 次にこのリアクターに Comammox 細菌が十分に集積できたかを rRNA-FISH と amoA の遺伝子解析から確かめた.

2. 実験方法

2.1 バイオリアクターの作成と運転

FISH に使用するサンプルを得るために, Fig.1 に示すバイオリアクターを稼働した. 水槽の容量は 6L であり, スポンジの充填率は 10%とした. 植種汚泥は, *Nitrospira* 属の存在が確認された都市下水を処理する回分式活性汚泥法の汚泥とし, 汚泥をスポンジ担体に染み込ませ, エアレーションで循環するように動かした. 水温は $22 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で保ち, pH は NaHCO_3 を添加し 6.9 を維持した. 培地の組成は Fujitani *et al.*²⁾ を参考に作成した. アンモニア, 亜硝酸, 硝酸態窒素の濃度は HACH 社の測定キットを用い, 吸光光度計 DR3900 で測定した.

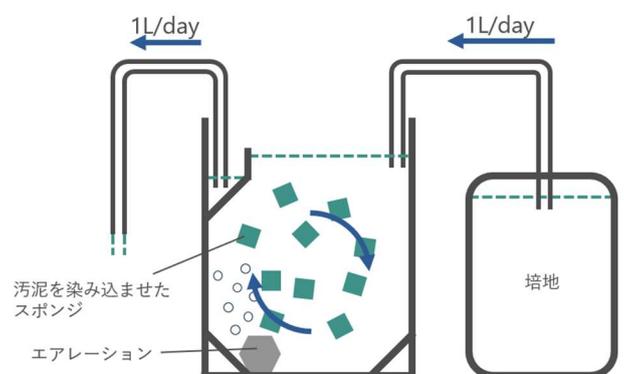


Fig.1 Comammox 細菌を培養するためのバイオリアクター装置の概要. スポンジを充填し, 汚泥の滞留時間を確保した. 流入培地は 1L/day で連続供給した.

2.2 PCR 法による amo 遺伝子の検出

Nitrospira 属由来の amo 遺伝子の存在を確認するためにバイオリアクターから汚泥を採取し PCR 法に供した。プライマーは Fowler *et al.*³⁾を参照し、*Nitrospira* 属由来の amo 遺伝子を標的とした Ntsp-amoA-162F, Ntsp-amoA-359R を用いた。PCR 条件の検討として、サンプルの投入量の希釈倍率とアニーリング温度を変化させを行った。

2.3 rRNA-FISH 法による *Nitrospira* 属の検出

バイオリアクター内に *Nitrospira* 属が集積されているかを確認するためにスポンジ担体から汚泥を取り出し、rRNA を標的とした FISH 法を行った。プローブは Daims *et al.*⁴⁾を参照し *Nitrospira* 属を標的とした Ntspa-662 を使用した。最適なホルムアミド (FA) 条件を見つけるため FA 条件は 30%, 35%, 40%の 3 つを用意し、ネガティブコントロールは 50%とした。

3. 結果と考察

3.1 バイオリアクターによるアンモニア酸化

バイオリアクターにおける流入培地、処理水の水質分析の結果を Table 1 に示す。流入培地には塩化アンモニウムとしてアンモニアが供給されており、処理水中のアンモニア態窒素は検出限界以下まで減少

Table 1 アンモニア，亜硝酸，硝酸態窒素濃度の測定

	NH ₃ -N(mg/L)	NO ₂ -N(mg/L)	NO ₃ -N(mg/L)
培地	29.4	0.018	検出限界以下
処理水	検出限界以下	検出限界以下	23.0

していた。また、亜硝酸態窒素は処理水からは検出はされず、硝酸態窒素は処理水中では 23.0 mg/L まで増加していた。これらの結果から、バイオリアクター内では硝化反応が進行していることが確認でき、また亜硝酸の蓄積がないことも確認された。

3.2 PCR 法による amoA 遺伝子の検出

PCR 法による amoA 遺伝子の検出を試みたところ、全ての反応条件で amoA 遺伝子の特異的な増幅が確認された (データ非表示)。これら結果からリアクター内には Comammox 細菌が存在する可能性が示唆された。

3.3 FISH 法による rRNA の検出

Nitrospira 属を標的とした FISH から FA30%の条件において *Nitrospira* 属と思われる凝集体の細胞から蛍光が得られた (Fig.2)。またネガティブコントロールとして行った FA50%のサンプルからは蛍光が得られなかった。これら結果から、汚泥サンプル中の *Nitrospira* 属の細菌の存在が示唆された。



Fig.2 汚泥サンプル中の *Nitrospira* 属細菌の蛍光顕微鏡による検出画像。A: 位相差視野, B: DAPI 視野, C: B 励起視野。露光時間は 1 sec, 倍率は 1000 倍。

4. 今後の予定

バイオリアクターにおいて亜硝酸の蓄積のない硝化反応が見られたこと、amoA 遺伝子を標的とした PCR 法、FISH 法の結果から、バイオリアクター内に Comammox 細菌が集積されていることが確認できた。今後は amoA mRNA の検出のための CARD-FISH 法の検討を行う予定である。

参考文献

- 1) Daims *et al.*, *Nature*, vol. 528, pp. 504-509, 2015.
- 2) Fujitani *et al.*, *FEMS Microbiology Letters*, vol.367, Issue 1, 2020.
- 3) Fowler *et al.*, *Environmental Microbiology*, vol.20, Issue 3pp. 1002-1015, 2018.
- 4) Daims *et al.*, *Appl Environ Microbiol*, vol. 67, Issue 11, pp. 5273-5284, 2001.