

北海道大学大学院 学○佐藤 久, 正 岡部 聡, 正 渡辺 義公

(株富士電機 正 境 一澄

はじめに

生物膜の硝化効率を決定する要因として、溶存酸素(DO)や基質(アンモニア性窒素($\text{NH}_4^+\text{-N}$)及び亜硝酸)濃度分布、アンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌の菌体分布が挙げられる。硝化機構を解明する上で *In situ* における2者の相互関係を把握することは重要であり、近年、複雑な生態系を有する生物膜内の生態学的解析の結果が数多く報告されている。しかし、基質消費に関与する微生物の分布とその活性に関連づけた情報は少ない。本研究では、微小電極を用いて測定した $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度プロファイルと FISH 法により解析したアンモニア酸化細菌の分布を比較し、生物膜内の *In situ* におけるアンモニア酸化機構を考察する。

実験方法

本研究に用いた生物膜は都市下水の最初沈殿池流出水を用い、ベンチスケールの半没型RBCにより馴養した。形状を変化させずに生物膜を採取するため、円板の一部を抜き取れるように加工した。処理水質が安定した後に生物膜を採取し、基質を循環したフローセル内で微小電極(DO及び $\text{NH}_4^+\text{-N}$)を用いて膜深さ方向の濃度プロファイルを測定した。測定には無機炭素とアンモニア性窒素を主体とした人工基質を用いた。さらに同様の測定を200 μm 間隔で繰り返し2次元(2-D)濃度プロファイルを作成した。

16S rRNA標的蛍光DNAプローブを用いたFISH法により、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて生物膜内のアンモニア酸化細菌の分布を解析した。*In situ hybridization*の手順はAmmanの方法に準じた¹⁾。

結果

a) DO及び $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度プロファイル・・・図.1に、互いに100 μm 離れた地点でのDO及び $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度プロファイルを示す。微小電極により測定した地点は生物膜の構造がわずかに変化するため、互いに100 μm 離れた地点の測定を同地点の測定と考え、両プロファイルと比較した。アンモニア酸化活性は斜線で示した膜中層で高く、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は膜深層(580 μm 以深)において酸素律速のために一定となった。

図.2-1に2-Dの $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度プロファイルを示す。膜深さ方向(1次元)の測定を二次元に拡張することで、微小区間(1000 μm

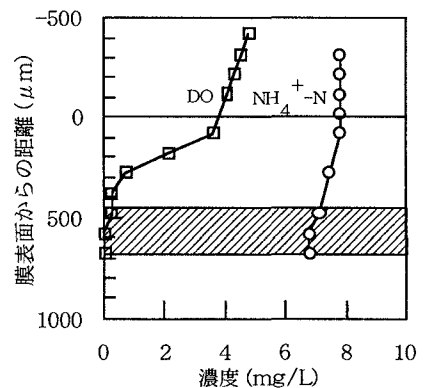


図.1 DO及びアンモニア性窒素濃度プロファイル

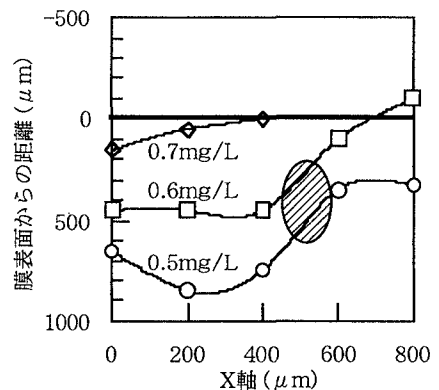


図.2-1 2-Dアンモニア性窒素濃度プロファイル

キーワード：生物膜の構造、アンモニア酸化機構、基質の輸送、微小電極、FISH

連絡先：001 札幌市北区北13条西8丁目 北海道大学工学部 (011)706-6267

m)における濃度プロファイルが部分的に異なることが示された。X=400~600 μm の領域では他の地点より濃度勾配が大きく、斜線部においてアンモニア酸化活性が高いと考えられる。図.2-2に2-DのDO濃度プロファイルと、各測定点のプロファイルから求めたDO消費活性度を示す。好気-嫌気境界線(DO=0mg/Lの線)の高低差は500 μm におよび、最大DO浸透深さは700 μm であった。酸素消費活性が部分的に異なった。X=0~400 μm の活性の高い領域にはbiomassが存在し、X=600~1000 μm の領域は間隙部分に相当すると考えられる。

b)生物膜内アンモニア酸化細菌分布・・・図.3-1, 図.3-2にFISH法により解析したアンモニア酸化細菌の分布図(水平断面)を示す。アンモニア酸化細菌は膜中層及び深層のbiomassとbulkの境界に、直径5~15 μm 程度のクラスターを形成して多く存在したが膜表層では少なかった。

考察

アンモニア酸化活性は膜表層より中層において高い結果を得た。これは、アンモニア酸化細菌が膜中層に多く存在したためである。DO及び基質が豊富に存在する膜表層では、増殖速度の小さい硝化菌は他栄養性細菌との競合に敗れ、他栄養性細菌が優占種になると考えられる。アンモニア酸化細菌は膜深層で多数検出された。図.2-2において他の地点よりも深層にDOが侵入した部分が見られたことから、アンモニア酸化細菌は深層におけるDOを得やすい場所で、DOを獲得できるような直径5~15 μm 程度のクラスターを形成し点在するものと考えられる。DOが深層に侵入する理由として、間隙を介する移流によりDOが深層に輸送されることが考えられる。DO濃度プロファイルが各測定地点で異なった。理由として、水平断面図に見られるように生物膜内には多数の間隙が存在し、生物膜内のbiomass部分と間隙部分において濃度プロファイルが異なることが考えられる。

まとめ

本研究の結論は以下のようになる。(1)アンモニア酸化活性は膜中層で高かった。(2)アンモニア酸化細菌は主に膜中層、及び深層のbiomassとbulkの境界に、クラスターを形成し点在した。

微小電極により測定したDO及び NH_4^+-N 濃度プロファイルと、FISH法によるアンモニア酸化細菌分布の解析の結果が一致し、ある程度の生物膜内のアンモニア酸化機構を解明した。

【参考文献】1)Amman,R.I.(1995)In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Mol. Microbial. Ecol. Manual*. 3.3.6:1-15

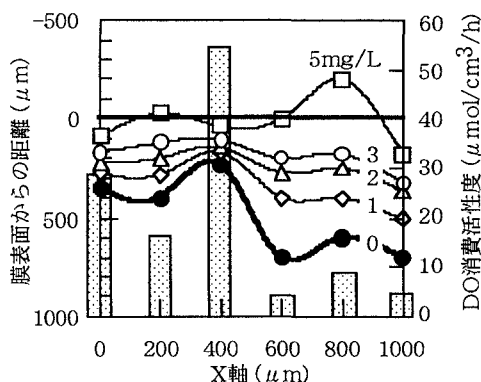


図.2-2 2-D DO濃度プロファイルと消費活性度

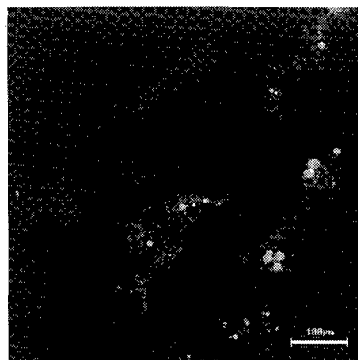


図.3-1 アンモニア酸化細菌の分布(膜表層)

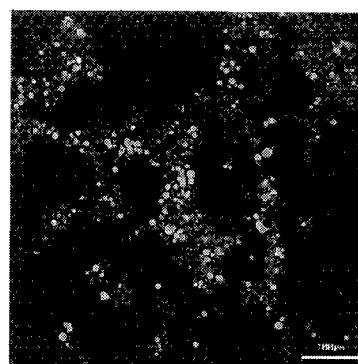


図.3-2 アンモニア酸化細菌の分布(膜深層)