

VII-76

FISH 法を用いた都市下水生物膜内のアンモニア酸化細菌の存在形態

北海道大学大学院 学 内藤初夏 佐藤 久
正 岡部 聡 渡辺義公
東京都 乗松直生子

1.はじめに

硝化細菌によるアンモニア性窒素の酸化は廃水処理において重要なプロセスである。一般に都市下水生物膜は複雑な生態学的構造を有しており、硝化効率は硝化細菌の存在形態（他の細菌群との共生関係を含む）及びその膜内分布に密接に関係している。故に、硝化細菌生物膜の機能を強化し安定した処理プロセスを確立するためには、反応器への入出力操作だけでなく、硝化細菌の存在形態や活性を *in situ* で測定し、生物膜内における硝化機構を解明する必要がある。そこで、本研究では硝化細菌に特異的な蛍光 DNA プロープを用いた Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡(CLSM)、及び画像解析を併用し、都市下水で馴養した生物膜を経日的に採取し、アンモニア酸化細菌の存在形態（クラスター径分布及びクラスター内の菌体密度）を測定し、アンモニア酸化細菌の動態と硝化効率の関係を検討した。

2.実験方法

生物膜は札幌市S下水処理場最初沈殿池流出水を基質として（面積負荷 $0.03 \text{ mgNH}_4^+-\text{N}/\text{cm}^2/\text{d}$ ）、半水没型回転円板装置を用いて馴養した。運転開始後、生物膜試料を経日的に採取した。試料採取後、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し(4℃,24h)、 $1\times\text{PBS}$ で洗浄、OCT-compound に一晚浸した後、 -20°C で凍結した。試料を支持体に対して垂直・水平方向に $20\text{--}40 \mu\text{m}$ ごとにミクロトームを用いてスライスし切片をスライドガラスに固定後、エタノール脱水(50,80,95%、各3分)を施した。

プローブは β -subclass のアンモニア酸化細菌に特異的な Nso190、domein bacteria に特異的な EUB338¹⁾を用いた。FISH は Amann らの方法²⁾に準拠した。生物膜試料の観察は CLSM(Zeiss LSM510, 488nm, 543nm 装備)を用いて行った。任意の生物膜深さから水平切片を3枚選択しプローブにより染色を行い、各試料につきランダムに5枚の投影画像を CLSM を用いて作成した。この合計15枚の画像について画像解析ソフト(Quantimet 500+;Leica)を用い、アンモニア酸化細菌の存在形態を検出、分類した。アンモニア酸化細菌の存在形態の経日変化及び膜内分布を定量的に評価するため本研究では、面積 $5 \mu\text{m}^2$ 以上かつ円形度係数2.7以下のものをクラスター、面積 $5 \mu\text{m}^2$ 以下のものをマイクロクラスター、また球状のクラスターを作らない（円形度係数2.7以上）アンモニア酸化細菌群をその他と定義した。クラスターの面積・最大径及びその内部の菌体数も併せて計測した。

3.実験結果及び考察

3.1 生物膜内におけるクラスターの粒径分布

馴養開始後、約10日で硝化反応は亜硝酸型となり、約2週間後には完全な硝酸型へと推移した。図-1には生物膜内に存在するアンモニア酸化細菌のクラスター径の経日変化を示す。図-1より明らかなように、硝化率が95%以上となった15日目以降も、馴養日数に伴いアンモニア酸化細菌のクラスター数は徐々に増加した。クラスター径もアンモニア酸化細菌の増殖に伴い増大し、馴養22日目以降では直径 $20 \mu\text{m}$ 以上のクラスターも僅かではあるが検出された。馴養初期(6日目)の生

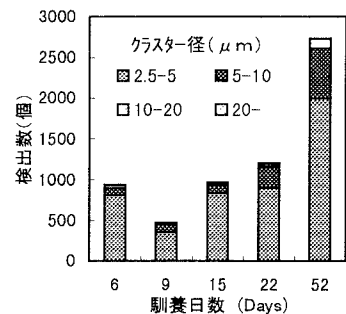
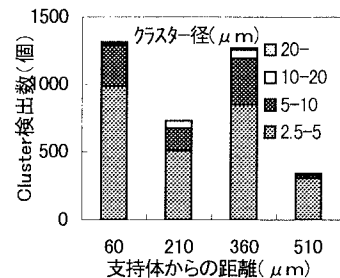


図1 生物膜内におけるクラスター径分布



クラスター径(μm)

クラスター径(μm)	20-	10-20	5-10	2.5-5
20-	3	1	14	0
10-20	23	53	63	4
5-10	302	164	340	26
2.5-5	985	508	849	308

図2 クラスター数の深さ方向分布(52Day)

キーワード：都市下水生物膜、アンモニア酸化細菌、FISH、CLSM、ポピュレーションダイナミクス

連絡先：060-0813 札幌市北区北13条西8 北海道大学大学院工学研究科, Tel&Fax:011-706-6267

物膜表面に直径 $30\mu\text{m}$ 以上のクラスターが付着しているのが確認されたが、このようなクラスターは都市下水由来のものであり、時間の経過に伴って脱離し検出されなくなった。その結果、9 日目にはアンモニア酸化細菌のクラスター面積は減少した。水質が定常に達した 15 日目以降の生物膜内に存在するアンモニア酸化細菌の 50% 以上は小さなクラスター（その内訳は、約 30% がクラスター径 $=2.5\sim5\mu\text{m}$ 、約 62% がクラスター径 $=5\sim10\mu\text{m}$ ）を形成しており、 $5\mu\text{m}^2$ 以下（クラスター径 $\leq 1.25\mu\text{m}$ 以下）のマイクロクラスターを加えると検出されたアンモニア酸化細菌全体の 80% 程度を占めた。小さなクラスターとして存在する利点としては、クラスター内部のアンモニア性窒素及び溶存酸素濃度を比較的高いレベルに維持できることである。

次に、生物膜内には基質濃度分布が存在するため、クラスター径の膜深さ方向の分布に影響を及ぼすものと考えられる。そこで、52 日目の生物膜深さ方向のクラスター径分布を図 2 に示す。直径 $10\mu\text{m}$ 以下の小さなクラスターは生物膜の深さ方向に関わらず全層にわたって非常に多く検出された。しかし、直径 $10\mu\text{m}$ 以上のクラスターは、支持体から $210\sim360\mu\text{m}$ の中層部に多く検出されたが、支持体近傍及び膜表層ではほとんど検出されなかった。この理由として、膜表層では水流によるせん断力により直径 $10\mu\text{m}$ 以上のクラスターは剥離し、膜底部では基質及び溶存酸素濃度が律速しクラスター内部の細菌が死滅し、クラスターが分裂・溶解したものと考えられる。

生物膜の深さ方向マイクロクラスターの存在比率は、全層にわたりほぼ一様に分布し経目的な変化も見られなかった（図 3）。これは、馴養基質である都市下水中には $10^4\sim10^5\text{cells/mL}$ 程度のアンモニア酸化細菌がシングルセルとして存在し、間隙（水路）とバイオマス（微生物集塊）から成る生物膜内へ水流により輸送され、付着したものと思われる。その後、付着したアンモニア酸化細菌は増殖しマイクロクラスター及びクラスターを形成すると考えられる。一方、全クラスターの存在比は表層に近づくにつれ明らかに減少した（図 4）。表層部では基質獲得の面で有利であるが、水流によるせん断力が強いいため、大きなクラスターまで増殖する以前に剥離したためと思われる。

3.2 クラスター内における菌体密度

クラスターが点在する生物膜内のアンモニア酸化細菌数を定量することは煩雑であるために、検出したクラスター面積から菌数へ換算することが必要となる。図-5 にはクラスター面積と菌数の関係を示す。球状のクラスターを形成するアンモニア酸化細菌の菌体数とその面積には非常に高い正の相関がみられた。面積 $100\mu\text{m}^2$ 以下（直径約 $6\mu\text{m}$ 以下）のクラスターの菌体密度は $1.2\text{cell}/\mu\text{m}^2$ であるのに対し、面積 $100\mu\text{m}^2$ 以上のクラスターの菌体密度は $0.9\text{cell}/\mu\text{m}^2$ 程度であった。

4. 結論

FISH 法と画像解析の併用することにより都市下水生物膜内のアンモニア酸化細菌の存在形態の時間的及び空間的变化を検討した結果を以下に示す。(1)アンモニア酸化細菌は主に直径 $10\mu\text{m}$ 以下の球状の密なクラスターとして存在した。(2)クラスター径の膜深さ方向分布は溶存基質濃度分布と水理学的せん断力に大きく依存する。(3)クラスター内のアンモニア酸化細菌密度は $0.9\sim1.2\text{cell}/\mu\text{m}^2$ であった。

- 【参考文献】 1) A. Schramm *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, No. 12, pp. 4641-4647 (1996).
2) R. Amann; *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6, 1-15 (1995)

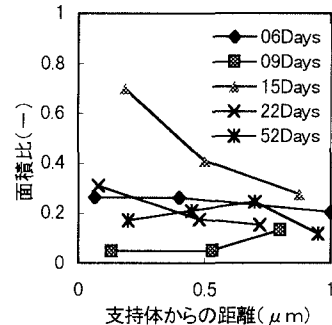


図3 膜深さ方向のマイクロクラスター検出率

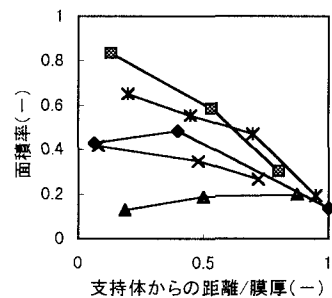


図4 膜深さ方向のCluster検出率

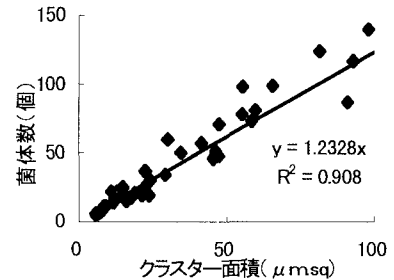


図5 クラスター面積と菌体数の関係