

VII-77

混合培養系生物膜内のアンモニア酸化機構の遷移

北海道大学大学院 学○佐藤 久 正 岡部 聡 渡辺 義公

東京都 乗松 直生子

1 はじめに

生物膜リアクターの硝化効率を安定させるためには、窒素除去機構に影響を与える硝化細菌の菌体密度及び存在形態やそれらの空間的分布、さらには硝化活性を把握することが重要となる。近年、生物膜内の微生物の存在形態は分子生物学的手法によって、基質及び代謝物の分布形態は各種微小電極によって、*in situ*で測定することが可能となり、生物膜内の硝化機構に関する詳細な情報が得られるようになった。本研究では、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を用いて解析した NH_4^+ 酸化細菌の分布と、微小電極を用いて測定した O_2 及び NH_4^+ 濃度プロファイルをもとに、生物膜内のアンモニア(NH_4^+)酸化機構の遷移を実験的に検討する。

2 実験装置と実験方法

本研究で用いた生物膜は、ベンチスケールの半水没型RBCに都市下水を3日間連続注入し生物膜を付着させた後、 NH_4^+ (50mg-N/L) 及び酢酸 (50mg-C/L) を主体とした人工基質にて馴養した。経日的に円板の一部ごと生物膜を採取し、測定用基質 (NH_4^+ =7mg-N/L, 酢酸=7mg-C/L) を循環したフローセル (1.8L) 内に固定した後、 O_2 及び NH_4^+ 微小電極を用いて膜深さ方向の濃度プロファイルを測定した。得られた濃度プロファイルから基質消費活性(生物膜単位体積当たりの基質消費速度: R, フラックス: J)を算出した¹⁾。

生物膜を支持体と水平に厚さ20 μm でスライスし、16S rRNA標的蛍光DNAプローブ(Nso190)を用いたFISH法により生物膜内のアンモニア酸化細菌を検出し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて画像化した。FISH法の手順はAmmanの方法に準じた²⁾。画像解析により、得られた画像(316 μm ×316 μm)内のアンモニア酸化細菌の形態をマイクロクラスター(面積5 μm^2 以下)、クラスター(面積5 μm^2 以上)、その他(面積5 μm^2 以上ではあるが円形係数が2.7以上の形状の崩れたもの)に分類し、各面積の膜深さ方向分布を求めた。

3 実験結果と考察

3.1 処理水水質の概要・・・図.1にリアクターの処理水水質及び NH_4^+ フラックスの経日変化を示す。 NH_4^+ は馴養開始後から酸化され始め、 NH_4^+ フラックスは17日目以降には定常(0.4 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$)となった。

3.2 膜深さ方向の NH_4^+ 酸化細菌菌体密度分布及びその経日変化・・・図.2-1及び図.2-2に、13日目及び36日目におけるプローブNso190により検出された NH_4^+ 酸化細菌面積の膜深さ方向分布を示す。13日目には約80%の NH_4^+ 酸化細菌はクラスターとして存在し、各深さにおける検出面積は3,500 μm^2 ~7,500 μm^2 程度で膜表層において最も高かった。一方、36日目になると、 NH_4^+ 酸化細菌菌体密度は膜深層に近づくほど高く、検出面積は膜表層で約6,000 μm^2 、膜中層で約14,000 μm^2 、膜深層では約36,000 μm^2 にも達した。膜表層において NH_4^+ 酸化細菌が少なかったのは、基質負荷の高い膜表層では比増殖速度の小さい NH_4^+ 酸化細菌よりも他栄養性細菌が活発に増殖したため、また水流に伴うせん断力により増殖した NH_4^+ 酸化細菌が剥離

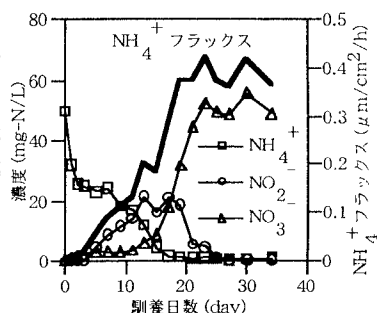
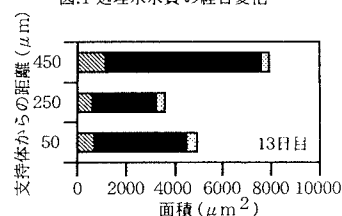
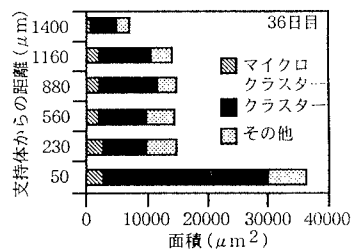


図.1 処理水水質の経日変化

図.2-1 膜深さ方向の NH_4^+ 酸化細菌分布図.2-2 膜深さ方向の NH_4^+ 酸化細菌分布

キーワード：生物膜、アンモニア酸化機構、微小電極、FISH法、共焦点レーザー蛍光顕微鏡

連絡先：001-0813 札幌市北区北13条西8丁目 北海道大学大学院工学研究科 tel&fax：(011)706-6267

したためと考えられる。

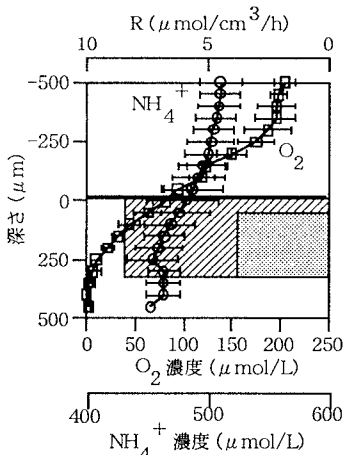


図.3-1 12日目

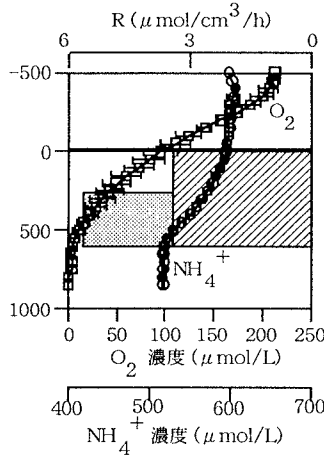


図.3-2 36日目

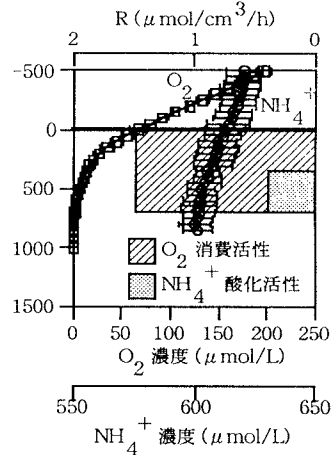


図.3-3 48日目

図.3 生物膜内基質濃度プロファイル

3.3 生物膜内の NH_4^+ 酸化活性・・・図.3-1に12日目の生物膜内の3地点の平均 O_2 及び NH_4^+ 濃度プロファイルと各消費活性を示す。 O_2 は膜厚約500 μm の生物膜内の膜表面から約400 μm の地点まで侵入し、 NH_4^+ 酸化活性は好気領域全体に生じた。この場合の NH_4^+ 酸化速度は $J(\text{NH}_4^+)=0.04 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、 $R(\text{NH}_4^+)=3.4 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$ であった。

36日目には（図.3-2）、 O_2 は膜厚約800 μm の生物膜内の膜表面から600 μm 程度の地点まで侵入した。 NH_4^+ 酸化活性は膜表面から約300 μm ～約600 μm の膜中層のみに生じ、膜表面から約300 μm の膜表層は好気であったにもかかわらず検出されなかった。膜表層には、この時12日目と同程度（約6,000 μm^2 ）の NH_4^+ 酸化細菌が存在したが、生物膜の成長とともに他栄養性細菌が優占種となっていたと推測される。そのため、膜中層よりも酢酸濃度が高い膜表層では他栄養性細菌の活性が高くなり、 O_2 をめぐる競合に敗れた NH_4^+ 酸化細菌は活性を生じなかったと考えられる。図.3-1に比べ NH_4^+ 酸化活性領域の O_2 濃度は低かったものの、 NH_4^+ 酸化細菌菌体密度が2倍以上の約14,000 μm^2 であったために、 NH_4^+ 酸化速度も約2倍の $J(\text{NH}_4^+)=0.07 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、 $R(\text{NH}_4^+)=5.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$ に高まった。これは、12日目から36日目にかけてリアクターの NH_4^+ フラックスが約2倍に高まった結果と一致している。

17日目以降は処理水水質は定常に達したものの膜厚は増加し続け、48日目には約1200 μm に達した（図.3-3）。これに対し、 O_2 侵入深さは700 μm 程度とさほど増加せず、 NH_4^+ 酸化細菌が多く存在する膜深層の約500 μm の領域は嫌気化したために、 NH_4^+ 酸化速度は $J(\text{NH}_4^+)=0.02 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、 $R(\text{NH}_4^+)=0.3 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$ に低下した。

4 結論

本研究では、生物膜内の NH_4^+ 酸化細菌菌体密度及び NH_4^+ 酸化活性の遷移について、図.4に示したような結果を得た。具体的な結論は以下になる。12日目は生物膜全体に NH_4^+ 酸化活性が生じた。36日目には膜表層では他栄養性細菌が優占種となり NH_4^+ 酸化活性が生じなかったものの、 NH_4^+ 酸化細菌菌体密度が増加したために $J(\text{NH}_4^+)$ は高まった。しかし、48日目にはさらに膜厚が増加し、 NH_4^+ 酸化細菌菌体密度が高い膜深層が嫌気化したため、 $J(\text{NH}_4^+)$ は低下した。

【参考文献】1)Nielsen, L. P. et. al. (1990) *Microb. Ecol.*, 19, 63-72

2)Amman, R. I. (1995) *Mol. Microbial. Ecol. Manual.*, 3.3.6, 1-15

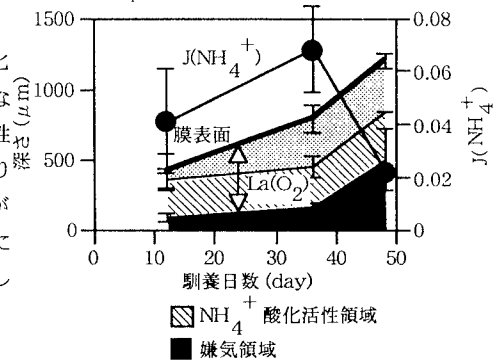


図.4 膜厚、 $\text{La}(\text{O}_2)$ 及び $J(\text{NH}_4^+)$ の経日変化