

VII-214

混合培養系生物膜内の硝化機構

北海道大学大学院 学O佐藤 久 正 岡部 聡 フェロー 渡辺 義公

1 はじめに

生物学的硝化反応はアンモニア (NH_4^+) 酸化細菌による NH_4^+ 酸化反応と、これに続く亜硝酸 (NO_2^-) 酸化細菌による NO_2^- 酸化反応により達成される。従って、生物膜を下・廃水処理装置に適用する場合、その内部に存在する硝化細菌の分布形態や優占種、基質濃度分布から決定される *in situ* の活性等を明らかにすることが不可欠である。近年、分子生物学的手法により、生物膜内の硝化細菌の分布形態および動態が明らかにされている一方、これら硝化細菌の *in situ* の活性に関する情報は不足している。微小電極は硝化細菌の *in situ* の活性を測定する目的にはきわめて有効な手段であり、 NH_4^+ 微小電極および硝酸 (NO_3^-) 微小電極に加え近年 NO_2^- 微小電極¹⁾が開発されたことにより、生物膜内の3態窒素の測定が可能となった。そこで本研究では、溶存酸素 (DO)、 NH_4^+ 、 NO_2^- および NO_3^- 微小電極を用いて生物膜内の硝化活性を測定した。また、硝化活性と硝化細菌の関係を検討するため、FISH法により NH_4^+ および NO_2^- 酸化細菌の空間的分布を解析した。

2 実験装置と実験方法

本研究では、 NH_4^+ (平均約2.9mM) および酢酸 (0mMまたは平均約7.3mM) を主体とした人工下水 (C/N比=0または約2.5) を流入基質として、ベンチスケールの半水没型RBCを用いて生物膜を馴養した。採取した生物膜をフローセル (約1.8L) 内に固定し、測定用基質 (酢酸=0 μM または300 μM 、 NH_4^+ =300 μM 、 NO_2^- =100 μM および NO_3^- =300 μM を添加したリン酸バッファー溶液) を満たし、DO、 NH_4^+ 、 NO_2^- および NO_3^- 微小電極を用いて生物膜深さ方向の基質濃度分布を測定した。さらに、測定した基質濃度分布から生物膜単位体積当たりの基質消費活性度 (R [$\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{h}$]) 分布を算出した。

生物膜内基質濃度分布測定後、生物膜の凍結切片を作成し、16S rRNA標的蛍光DNAプローブを用いたFISH法を施し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて生物膜内の硝化細菌を検出した。使用したプローブは NH_4^+ 酸化細菌に特異的なNso190、および NO_2^- 酸化細菌である *Nitrospira* spp. に特異的なNtspa1026である。

3 実験結果と考察

3.1 生物膜内の硝化活性・・・図.1aにC/N比=0で馴養した硝化菌生物膜内のDO、 NH_4^+ 、 NO_2^- および NO_3^- 濃度分布を示した。 NH_4^+ および NO_2^- 濃度はともに膜深さ方向に減少し、これに伴う NO_3^- 濃度の増加が検出された。 NO_2^- 濃度が減少したことは NO_2^- 酸化活性が NH_4^+ 酸化活性に比べて高いことを示している。図.1bに基質濃度分布から算出した硝化菌生物膜内の活性度分布を示した。 NH_4^+ 酸化活性は膜表面～膜深さ約75 μm において、 NO_2^- 酸化活性は膜深さ125 μm 付近において高く、 NH_4^+ 酸化反応と NO_2^- 酸化反応が生物膜深さ方向の異なる領域において生じていたことが明らかとなった。

図.2aにC/N比=約2.5で馴養した生物膜内のDO、 NH_4^+ 、 NO_2^- および NO_3^- 濃度分布を示した。 NH_4^+ 濃度は膜深さ約100 μm の地点まで減少したのに対し、 NO_2^- 濃度は膜深さ約100 μm の地点まで増加しており、 NH_4^+ 酸化領域において NO_2^- が生成されていた様子がうかがえる。 NO_2^- 濃度は NH_4^+ 酸化領域以深において減少したものの、

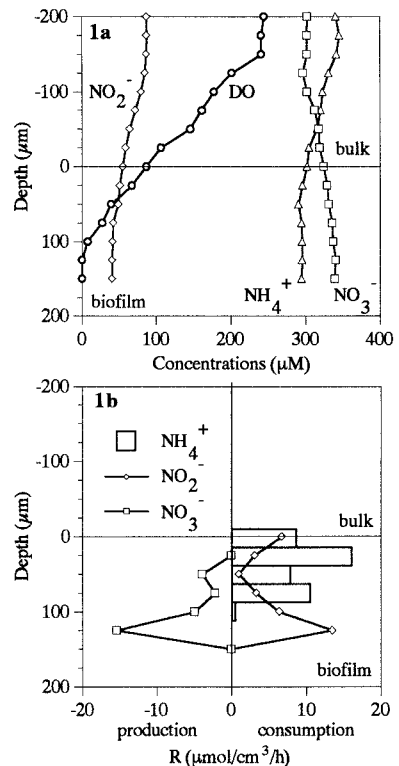


図.1 硝化菌生物膜内基質濃度及びR分布

キーワード：生物膜、硝化反応、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

これに伴う NO_3^- 濃度の増加は検出されなかった。図.2bに基質濃度分布から算出した生物膜内の活性度分布を示した。 NH_4^+ 酸化活性は主に膜表面～深さ約200 μm の領域に、 NO_2^- 酸化活性は膜深さ約200 μm ～約500 μm の領域に検出され、硝化菌生物膜と同様に NH_4^+ 酸化反応と NO_2^- 酸化反応が膜深さ方向の異なる領域において生じていたことが明らかとなった。 NO_2^- 酸化領域に NO_3^- 生成活性が検出されたにもかかわらず NO_3^- 濃度が増加しなかったのは、生成した NO_3^- が微小電極で測定されなかった支持体付近において脱窒反応により消費されたためである。この生物膜内では NH_4^+ 酸化領域と NO_2^- 酸化領域が硝化菌生物膜よりも顕著に分離していたため、生物膜内に NO_2^- 濃度のピークが検出された。

3.2 生物膜内の硝化細菌の検出・・・硝化菌生物膜は膜厚が200 μm 程度と非常に薄かったにもかかわらず、その内部においては NH_4^+ 酸化細菌は生物膜全体に検出されたものの、 NO_2^- 酸化細菌は表面には検出されず深層のみに検出され、膜深さ方向に硝化細菌の菌体密度分布が異なることが明らかとなった。このため、硝化菌生物膜内の NH_4^+ 酸化活性が表層に、 NO_2^- 酸化活性が深層においてより高かったと考えられる。また、C/N比＝約2.5で馴養した生物膜内においては、 NH_4^+ 酸化細菌は生物膜全体に検出されたが、 NO_2^- 酸化細菌は微小電極の測定により検出された NO_2^- 酸化領域にさえも検出されなかった。この理由として、 NO_2^- 酸化細菌菌体数が非常に少なかったこと、プローブ1026では検出されない種の NO_2^- 酸化細菌が存在していたこと等が考えられる。

NO_2^- 酸化細菌は NH_4^+ 酸化細菌により生成される NO_2^- を利用するため、両者が近接していることは NO_2^- 酸化細菌にとって有利であると考えられている。本研究において NO_2^- 酸化細菌は集塊を形成して、または単一細胞として、 NH_4^+ 酸化細菌に密接して中層および深層に存在していた。しかしながら、これらの領域では NH_4^+ 酸化活性は生じず NO_2^- 酸化活性のみが生じた。一方、表面付近には NO_2^- 酸化細菌が存在しなかったため NH_4^+ 酸化活性のみが生じた。従って、本研究で検討した2種類の生物膜に限っては、膜表面付近で生成された NO_2^- が NO_2^- 酸化領域に輸送されたのち消費されており、 NH_4^+ 酸化細菌と NO_2^- 酸化細菌の間の NO_2^- の授受が効率的に行われていなかったことが明らかとなった。高い NH_4^+ 酸化活性が生じるために NO_2^- 濃度は高く、DO濃度も高い表面付近に NO_2^- 酸化細菌が存在しなかった理由、また、DOおよび NH_4^+ が存在し NH_4^+ 酸化細菌が分布する中層および深層に NH_4^+ 酸化活性が生じなかった理由については不明であり今後の研究課題である。

4 結論

本研究では、今までに生物膜内の硝化機構を解明するために用いてきたDOおよび NH_4^+ 微小電極に加え NO_2^- および NO_3^- 微小電極を使用したことにより、生物膜内の硝化機構に関してより詳細な情報を得ることが可能となった。C/N比＝0で馴養した硝化菌生物膜およびC/N比＝約2.5で馴養した生物膜において、硝化反応は生物膜内の好気領域のみに生じ、共に膜表面付近において NO_2^- 酸化活性よりも NH_4^+ 酸化活性が、その直下において NH_4^+ 酸化活性よりも NO_2^- 酸化活性が卓越していた。このため、生物膜内に中間生成物である NO_2^- のピークが検出された。また、 NH_4^+ 酸化細菌は生物膜全体に検出されたものの、 NO_2^- 酸化細菌は表面には検出されず深層のみに検出され、硝化細菌の菌体密度分布は膜深さ方向に異なっていた。このため、生物膜内において NH_4^+ 酸化活性と NO_2^- 酸化活性が分離したものと考えられる。 NO_2^- および NO_3^- 微小電極は、同じL.I.X.タイプである NH_4^+ 微小電極と同様に応答時間は数10sec.程度で数 μM 程度までの濃度を検出可能であり、生物膜内 NO_2^- および NO_3^- 濃度の測定に有効であった。

【参考文献】 1) deBeer, D. et al. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(3), 973-977

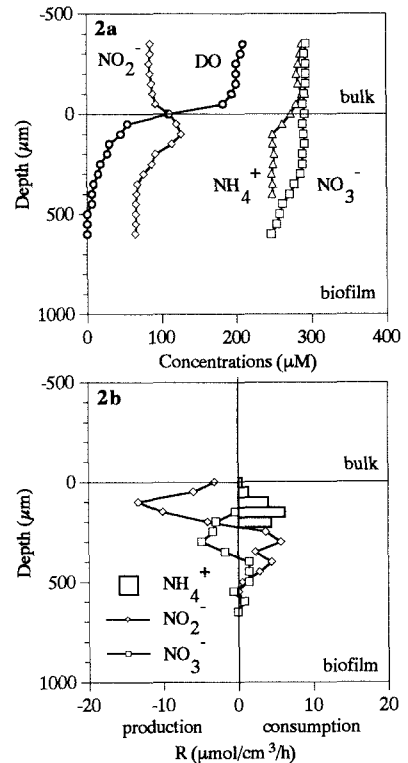


図.2 生物膜内基質濃度及びR分布