

## 機能性ゲルの膨潤・収縮が硝化活性にもたらす効果

九州大学大学院 学生会員 ○進藤健治 正会員 久場隆広 フェロー 楠田哲也

1.はじめに 包括固定化法による硝化菌の高濃度化は、アンモニア性窒素の高速処理及び硝化反応槽の省容量化を可能にした。しかしながら、一方で、包括固定化担体内部へのアンモニア性窒素及び酸素の拡散律速により、担体表層部に存在する硝化菌のみが処理に関与していることが知られている。そこで、本研究では包括固定化担体として、温度変化によって不連続な体積変化(体積相転移)を引き起こす温度刺激応答性の機能性ゲルを用い、担体内部への物質輸送の促進を試み、同時に、体積相転移が硝化活性にもたらす効果を検討した。

## 2. 実験方法

2.1硝化活性 固定化担体としては、温度刺激応答性のN-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)ゲルを用いた。ゲル形状は、 $4 \times 4 \times 4\text{mm}^3$ のキューブ型である。硝化菌を包括固定したNIPAAmゲルを3つの反応槽(容積200ml)に投入した。ゲルの添加率は10%(v/v)である。3つの反応槽をそれぞれ25℃、35℃の一定温度条件及び25-35℃の間を繰り返す変温条件下で好氣的に連続回分運転し、その硝化活性を比較した。

2.2長期培養における膨潤率の変化 上述の3種の硝化菌固定ゲルについて、また、別途準備した硝化菌未固定NIPAAmゲルを培養基質中25-35℃で、蒸留水中25℃、35℃、25-35℃で長期間培養したものについて、膨潤率を測定した。膨潤率は、ゲルの重量 $m$ を35℃での重量 $m_0$ で無次元化したものである。ただし、膨潤率の長期的な変化の検討(図3)の際には、25℃での膨潤率を用いた。

2.3FISH (fluorescence *in situ* hybridization)<sup>1)</sup> 反応槽から採取した担体を、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定(4℃、24時間)、洗浄(1×PBS、3分間×2回)後、O.C.T.Compoundで包埋し、凍結させ、小型氷結ミクロトームを用いてゲル薄片を作製した。薄片作製後、エタノール脱水を施し(50%、80%、95%、各3分間)、ハイブリダイゼーションを行った。今回用いた16S rRNA標的蛍光遺伝子プローブは、アンモニア酸化菌に特異的なNso190(5'-CGATCCCCTGCTTTTCTCC-3'、TRITCラベリング)である。ハイブリダイゼーションを46℃で3時間、洗浄を48℃で40分間行った。ハイブリダイゼーション後、ゲル上のある直線に沿って得た7~12枚のCCDカメラ画像よりプローブによる蛍光画像面積を測定し、1視野の面積で除してアンモニア酸化菌の存在量を評価した。

2.4温度パターン変化と硝化活性の関係 25-35℃の変温条件下で約2ヶ月間培養した反応槽のゲルを用いて、25-35℃、25-32℃、27-32℃、30-35℃の変温条件、32℃の一定温度条件下の5つの温度パターンを設定し、回分実験により硝化活性を比較した。

## 3. 結果及び考察

3.1一定・変温条件下での硝化活性の比較 25℃、35℃の一定温度条件下と、図1に示した25-35℃の変温条件下で培養したゲルの硝化活性の経時変化を図2に示す。スタートアップ時には、3つの反応槽においてあまり差が見られなかったが、培養開始7週間後から実験終了時まで変温条件下において硝化活性が高かった。これは、変温条件下においてゲルが膨潤・収縮を繰り返すことによって、あたかもポンプのような働きをし、ゲル内への物質輸送が促進されたためと考えられる。

3.2膨潤率の低下の検討 図3に25-35℃の変温条件下で培養したゲルの膨潤率の経時変化を示す。微生物固定の有無、培養溶液の違いによらず、培養開始5週間まで膨潤率は低下し、それ以降1.6前後で安定しているよう

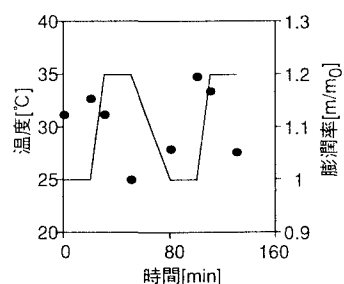


図1 25-35℃の変温条件の温度パターンとそれに沿ったNIPAAmゲルの膨潤率変化

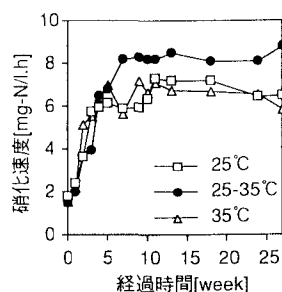


図2 3つの反応槽の硝化活性の経時変化

に見える。また、図示していないが、25℃、35℃の一定温度条件下では、微生物固定の有無によらず膨潤率の低下が見られなかったことから、このゲルの膨潤率の低下の原因は、ゲルが膨潤・収縮を繰り返していたために起こる高分子の劣化であると予想される。

**3.3 アンモニア酸化菌のゲル内空間分布** もし、機能性ゲルの膨潤・収縮により担体深部まで物質が輸送がされているのであれば、アンモニア酸化菌の担体内空間分布は、より内部まで広がっている可能性がある。そこで、FISH法によりゲル内のアンモニア酸化菌の検出を行った。ゲル内のアンモニア酸化菌の1視野あたりの検出率を図4に示す。ゲル薄片の厚さに起因する誤差やゲル内の空洞部に起因する誤差など染色法や計測法には検討の余地があるものの、一定温度条件、変温条件下ともアンモニア酸化菌は担体表層から約100～200  $\mu\text{m}$ までに多く存在し、内部へ行くほど存在比が小さくなっていることが確認された。ゲル担体中心部付近では、アンモニア酸化菌の分布に明確な違いは見られなかったが、変温条件下において、アンモニア酸化菌が多く存在しているような傾向が窺えた。

**3.4 膨潤量と硝化活性の関心の検討** 5つの温度パターンでの硝化活性の比較を図5に示す。それぞれの硝化速度は、16.7 (25-35℃), 11.8 (25-32℃), 10.4 (27-32℃), 19.8 (30-35℃), 14.8 (32℃) [mg-N/l.h]であった。4時間での膨潤量(膨潤による体積増加×膨潤回数)は、それぞれ、5.5、2.7、3.2、8.5、0 [ml]であった。膨潤量の多い30-35℃の温度パターンにおいて活性が高く、ゲルの膨潤量が多いほど硝化活性が高くなる傾向があった。しかし、温度刺激応答性ゲルの体積相転移による硝化作用の促進効果を説明することは容易ではない。つまり、(1) ゲルの膨潤によるゲル内への物質輸送の促進、(2) ゲルの収縮によるゲル内への分子拡散の阻害、(3) ゲルを取り巻くバルクの物質濃度とゲル内の分子拡散の関係、(4) 3次元網目構造を有するゲルの膨潤・収縮に伴う拡散抵抗・拡散距離の変化、(5) 微生物活性及び分子拡散係数の温度依存性等の要因を考慮する必要がある。

今後、より一層膨潤率の大きなゲルを用い、また、DO律速条件下で実験を行うことにより、膨潤量と活性の関係が明確に見いだせるかもしれない。

**4. 終わりに** 長期培養における25℃、35℃の一定条件、25-35℃変温条件下での硝化活性の比較から、ゲルの膨潤・収縮により硝化活性が促進されることが明らかとなった。この理由としては、FISHによるアンモニア酸化菌の空間分布傾向と、ゲルの膨潤量と活性の関係から、変温条件下において担体内の硝化菌が一定温度条件下のものより多く保持されていること、そして、基質・酸素の物質輸送が促進されていることが考えられる。

[参考文献]

- 1) 岡部ら (1998) テトラゾリウム塩還元法を応用した硝化細菌の検出方法の検討, 水環境学会誌, 第21巻 第2号, pp. 88-97

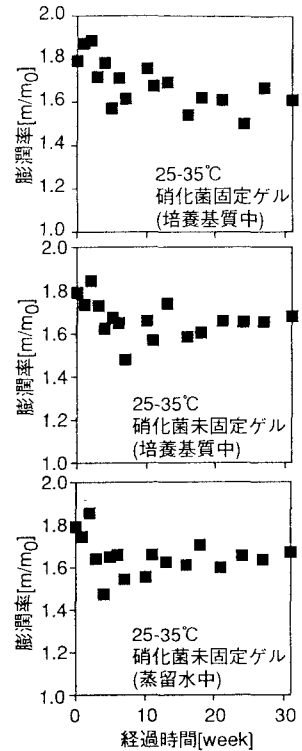


図3 25-35℃の変温運転したゲルの25℃における膨潤率の経時変化

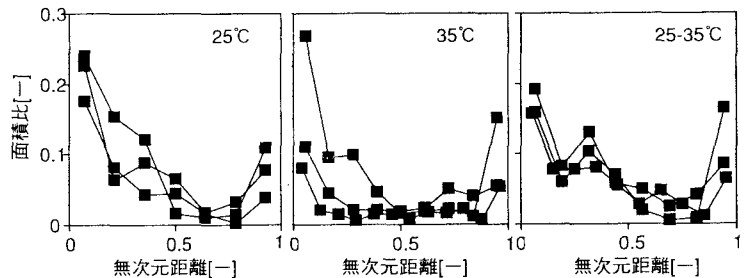


図4 ゲル内のアンモニア酸化菌の検出率  
(無次元距離0及び1はゲルの両端を意味する)

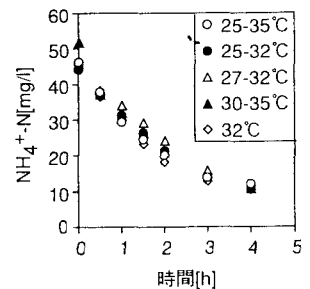


図5 5つの温度パターンの硝化活性の比較