

(38) 多孔質結合固定化担体に固定した硝化細菌の分布把握

The inner structure of nitrifying bacteria in biofilm fixed inside porous medium

大迫孝輔*, 鈴木智順**, 出口浩***

Kosuke OSAKO*, Tomonori SUZUKI**, Hiroshi DEGUCHI***

ABSTRACT: The biomass fixed inside the porous medium, for example sponge cube, has the biofilm characteristics from the results of kinetic experiment. In this investigation, the biomass fixed inside the porous medium is nitrifying bacterium cultivated in autotrophic medium. Then characteristics of biomass fixed inside the porous medium was investigated by using Oxygen Utilization Rate (OUR). Furthermore the inner structure of nitrifying bacteria in biofilm fixed inside porous medium and biofilm thickness were investigated by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). Consequently The biofilm thickness by OUR was different from that by FISH.

KEYWORDS: nitrifying bacteria, FISH, OUR

1. はじめに

生物学的硝化脱窒法については、これまでも多くの研究が行われている¹⁾²⁾。2004年4月の下水道法施行令の一部改正により窒素および磷についても排水基準が設けられた³⁾。安定して窒素除去を行うためには、生物学的硝化脱窒法が有効であると筆者らは考え、硝化反応の安定した維持という点に着目して多孔質結合固定化担体(スポンジキューブ)への硝化細菌の固定について取り組んできた。硝化細菌は独立栄養細菌であり増殖速度が小さく、汚泥滞留時間が5日を下回ると硝化反応は期待できなくなる。その他にも硝化反応はpHや水温などの外的要因の影響を受けることが知られている⁴⁾。中村らは、し尿脱離液を用いた接触酸化法の実験において、種汚泥なしの条件で実験を開始し、硝化反応が安定するまでに約2ヶ月の期間を要したことを報告している⁵⁾。硝化細菌を固定することで少なくとも汚泥滞留時間の問題は解決されるものと考えられる。

出口らはスポンジキューブに脱窒細菌を固定し、ラボスケールの実験において最大 $58\text{gN/m}^2/\text{d}$ の速度を得ている。非多孔質結合固定化担体(アクリルキューブ)に脱窒細菌を固定した場合、脱窒速度は約 $3\text{gN/m}^2/\text{d}$ であったことから、スポンジキューブを用いた時、きわめて高い脱窒速度を得ることができた。理由としては担体が多孔質であるという物理的構造を挙げ報告している⁶⁾。筆者らは、硝化細菌に対してこの多孔質担体を適用することで、類似の効果が期待できるものと考えた。予備実験として、無機の人工基質を用いたベンチスケールの反応槽を運転し多孔質担体に硝化細菌を固定し、この固定した硝化細菌を用いたラボスケールの動力学実験を行ったところ、最大で $9.7\text{gN/m}^2/\text{d}$ の硝化速度を観測したことを報告してきた⁷⁾。いわゆる生物膜の硝化速度として報告されている文献値は $0.12\text{--}4.8\text{gN/m}^2/\text{d}$ である⁸⁾。筆者らの実験と文献値との差異も多孔質担体を用いたことによって導かれた

* 東京理科大学大学院理工学研究科 土木工学専攻 (Dept. of Civil Engineering, Graduate School of Science and Technology, Tokyo University of Science)

** 東京理科大学理工学部 応用生物科学科 (Dept. of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science)

*** 東京理科大学理工学部 土木工学科 (Dept. of Civil Engineering, Faculty of Science and Technology Tokyo University of Science)

結果であると推察できる。

筆者らは多孔質担体へ硝化細菌を固定することがどのようにして高い硝化速度をもたらしてきたのかを調査するため、本研究を展開した。本論文において、調査・解明しようとしている点は次の3点に整理した。

- 1) 固定された細菌の種類の特定
- 2) 固定状況・分布の把握
- 3) 生物膜の厚み

本論文では、これらの実験結果について解析を行い得られた知見について報告する。

2. 多孔質結合固定化担体に固定した細菌の菌叢解析

2. 1 実験方法など

(1) 使用した担体

本研究では、多孔質結合固定化担体としてスポンジキューブを用いた。スポンジキューブは、ポリウレタン樹脂にポリエーテルを混合して作られたもので、セル数 27 個/25mm、サイズは 15×12×12mm である。

(2) 硝化細菌固定のための反応槽の運転

培養槽は直径 30cm の円筒型で約 10.7L の容積を有している。底面から槽内水を循環ポンプにより抜き出し、培養槽の上部に返送するようにした。返送水の流量は約 10.5 m³/d であり、流入ポンプにより供給されている人工下水（組成は Table 1 を参照）の流入量 0.173m³/d の約 60 倍に設定した。この循環流量を設けることにより、培養槽内に死水部が形成されるのを防ぎ、培養槽内を完全混合に保つようにした。培養槽内をエアレーションし、好気条件を維持した。処理水は、上部に設けた排水口より排水した。また、ナイロン製の網を用いて反応槽内を 6 層に分け、各層に担体を 250 個ずつ敷き詰めた。各層の担体の個数を等しくすることで、各担体が槽内水と同条件で接触するようにした。

Table 1 Composition of synthetic wastewater.

NH ₄ Cl	95 mg
NaHCO ₃	188 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	23 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.25 mg
Water	1000ml

使用した人工下水 (Table 1 に示す) は、アンモニアを主成分とした無機栄養のものを使用した。アンモニア性窒素の負荷は 2.1gN/m²/d とし、槽内の水温は 28～34℃ を保つようにした。なお、種汚泥は使用しておらず、培養槽の水面が気と接触していることから固定した細菌群の由来は大気中である。すべての培養装置を 1N 塩酸で殺菌したあと、運転を開始した。培養槽の運転は 2000 年の 9 月に運転を開始しており、実験のサンプリング時 (2002 年以降) にはアンモニア性窒素の除去率は 90% 以上を達成し安定を維持していた。

(3) 細菌叢解析

スポンジキューブに固定した細菌の種類を把握するため、細菌叢解析を行った。この解析は結合固定した微生物群の担体内部での空間分布を調べる基礎情報を得るために実施するものである。ここでは、DGGE 法と純粋分離法の 2 法を採用した。

1) DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法

サンプルは培養槽内からスポンジキューブを取り出し、それを絞ることで細菌懸濁液として採取した。得られた懸濁液から染色体 DNA の抽出を行った。DNA 抽出は Isoplant II (Nippon Gene) を用いて行い、さらに RNase 処理、フェノール/クロロホルム

Table 2 PCR primer set for DGGE

primer	Sequence (5'-3')
GC-341F	CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGG
	GGCACGGGGGGCCCTACGGGAGGCAGCAG
920R	CCGTCAATTCATTTGAGTTT

処理をして精製した。得られた染色体 DNA を基にタッチダウン PCR により 16S rRNA 遺伝子を増幅し、PCR では GC クランプの付いた GC-341F と 920R を用いた (Table 2)。複数の塩基配列を持った増幅断片の分離には DGGE (BIORAD DCode) を用いた。単一の塩基配列となった増幅 DNA の塩基配列の解読は、シーケンサー (Beckman Coulter CEQ8000) により解読した。Ribosomal Database Project II 及び Blast を用いて、DGGE バンドの塩基配列と近縁な 16S rRNA 遺伝子を持った細菌の検索を行った。得られた配列は Clustal X によりアライメントし、PHYLP の DNADIST, NEIGHBOR により系統樹を作成した。

2) 純粋分離法

培養槽内からスポンジキューブを取り出し、スポンジ内にある細菌懸濁液をゲランガム平板培地上に採取した。このゲランガム培地は高橋らの手法⁹⁾を参考にした。その後、ゲランガム平板培養と液体培養を繰り返して純粋分離を行った。培地の組成はリアクター内で使用している人工下水と同様とした。ゲランガム濃度は 1% とした。純粋分離した細菌は培養後、集菌・洗浄をし、染色体 DNA の抽出は DGGE の時と同様に行った。16S rRNA 遺伝子の増幅は PCR によりほぼ全長を増幅するプライマー (Table 3) を用いて行った。PCR によって得られた増幅断片を精製した後、DGGE の時と同様にシーケンスを行い、系統樹を作成した。

Table 3 PCR primer set for pure isolated strain

primer	Sequence (5'-3')
10F	AGTTTGATCCTGGCTC
1540R	AAGGAGGTGATCCAGCC

2. 2 細菌叢解析の結果および考察

反応槽は 2000 年 9 月から運転を開始した。反応槽の $\text{NH}_4\text{-N}$ の硝化率は、2002 年以降は 90% を維持し、安定している状態であった。細菌叢解析用のサンプリングはこの良好に硝化が進行している状態で行った。

得られた塩基配列から分子系統樹を作成した (Fig.1)。培養開始時には種汚泥を使用していないため、固定された細菌は空气中由来で固定した細菌群である。また、人工下水が無機栄養であることから主に独立栄養細菌が固定されていると考えられた。しかし、実際には多様性が高いことが細菌叢解析により分かった。硝化細菌は溶解性微生物代謝産物 (SMP) を多く産出するといわれている¹⁰⁾。このことから無機栄養の培地を使用しているにもかかわらず、この硝化細菌由来の有機物を利用することで、従属栄養細菌が生育しているのではないかと推察できた。そのほかに、大気から混入した埃や培養槽のプラスチック成分の僅かに溶出したものが有機物源となった可能性も考えられる。

DGGE 法からは硝化細菌はアンモニア酸化細菌の *Nitrosomonas* に属するものと、亜硝酸酸化細菌の *Nitrospira* に属するものが DGGE

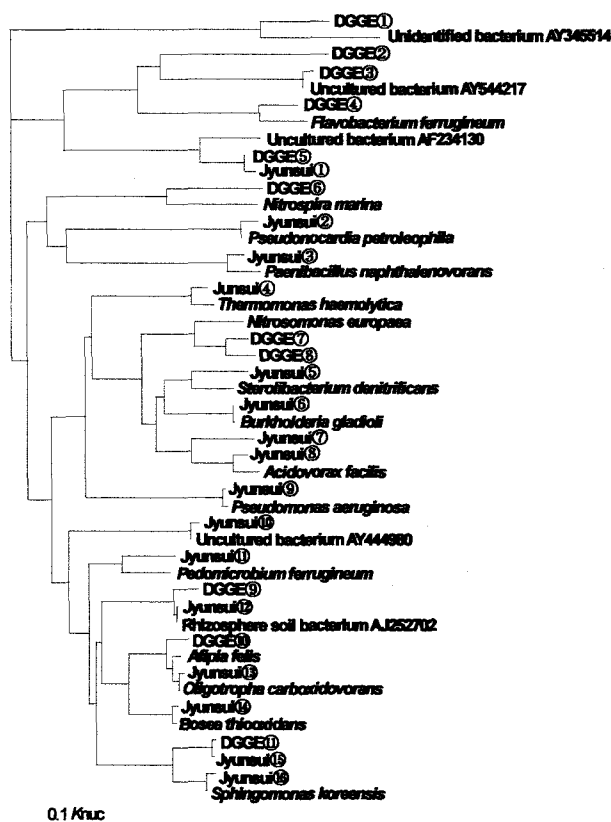


Fig.1 Phylogenetic tree of bacterial flora

法により確認できた(Fig.2)。しかし、純粋分離法では硝化細菌の確認はできなかった。存在が確認できた細菌の中には *Pseudomonas aeruginosa* などの従属栄養細菌も含まれていた。

DGGE 法の結果から培養槽内ではアンモニア酸化細菌の *Nitrosomonas* がアンモニアの酸化を行うことで亜硝酸を生成し、生成した亜硝酸を *Nitrospira* が酸化して硝酸を生成していることが示唆された。この結果は、培養槽内の水質測定で亜硝酸イオンと硝酸イオンが検出されていることも整合性がとれた。また、系統樹から新規の細菌種の *Nitrosomonas* 属細菌が存在することも示唆された。

純粋分離法とDGGE法に用いたサンプルは、同じ培養槽内から取り出したスポンジキューブに固定されていた細菌群である。しかし、本研究ではどちらか一方で検出された細菌が多く見られ、両方法で検出できたのは *Sphingomonas* 属に近縁な細菌 Rhizosphere soil bacterium に比較的近縁な細菌および Uncultured bacterium AF234130 に近縁な細菌であった。また、純粋分離法では *Bosea thiooxidans* に近縁な細菌株などを検出したのに対して、DGGE 法では検出できなかった。このことは、純粋分離法では、培養槽内にいる細菌の中で優先種であるかどうかは関係なく、分離に用いた培地に対してコロニーを作りやすい細菌が検出されやすいことが示され、DGGE 法では DNA の抽出効率や PCR の増幅効率によって細菌の検出が左右されてしまうことを示していると考えられる。

3. 担体内細菌の空間分布

細菌叢の解析結果に基づいて硝化細菌の *Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌に標的をしぼり FISH 法を用いてこれらの細菌が担体のどの位置に存在しているのかを調査した。

3. 1 実験方法など

(1) FISH 法を適用するにあたっての検討項目

1) 使用プローブ

DGGE 法による細菌叢解析により硝化細菌として *Nitrosomonas* 属のアンモニア酸化細菌と *Nitrospira* 属の亜硝酸酸化細菌の存在が確認できた。また、新規の細菌種(遺伝子でのみ確認ができていない細菌)の *Nitrosomonas* 属細菌が存在することも示唆された。このことから、FISH 法によるアンモニア酸化細菌の検出には、*Proteobacteria* β グループのアンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas* 属細菌全般を検出する DNA プローブの Nso1225 プローブ¹¹⁾を用いた。このプローブには蛍光標識として Cy5 を付した。亜硝酸酸化細菌の検出には NSR826 プローブ¹²⁾を使用した。このプローブには蛍光標識として Cy3 を付した。また、ポジティブコントロールでは全細菌グループが検出できる EUB338 プローブ¹³⁾を使用し、ネガティブコントロールとして NON338 プローブ¹⁴⁾を使用した。両者には Cy5 を付したものと Cy3 を付したものの合計 4 種のプローブを用意した。Table 4 に使用

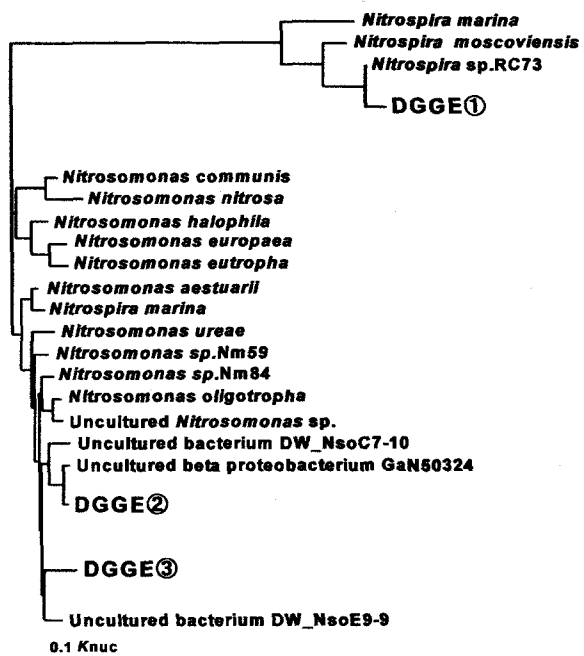


Fig.2 Phylogenetic tree of nitrifying bacteria.

したプローブと使用条件の一覧を示す。

Table 4 Oligonucleotide probes and hybridization conditions

Probe name	Sequence (5'-3')	Target site (16S rRNA positions)	% of formamide	Conc. of NaCl Washing buffer (mM)	Specificity
Nso1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	1225-1244	35	80	Ammonia-oxidizing β -Proteobacteria
NSR826	GTAACCCGCGACACTTA	826-843	20	225	Nitrospira spp.
EUB338	GCTGCCTCCGATGAGAT	338-355	20	225	Bacteria
NON338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	355-338	—	—	Negative control

2) スポンジの自家蛍光

スポンジは、蛍光顕微鏡で観察するとスポンジ自体も光を発するという自家蛍光が生じる。スポンジによる自家蛍光の影響を少なくするため、蛍光標識の違いによるスポンジの自家蛍光の大きさについて検討を行った。その結果、Cy5を使用した場合に最も自家蛍光の影響が小さく良好な画像を得られた (Fig.3a)。また、Cy3 はスポンジの自家蛍光が比較的大きいが、蛍光輝度が高かったため採用した (Fig.3b)。以上のことから本研究では FISH 法には蛍光標識として Cy5 と Cy3 を選定し、自家蛍光の影響を最小限に抑えることとした。

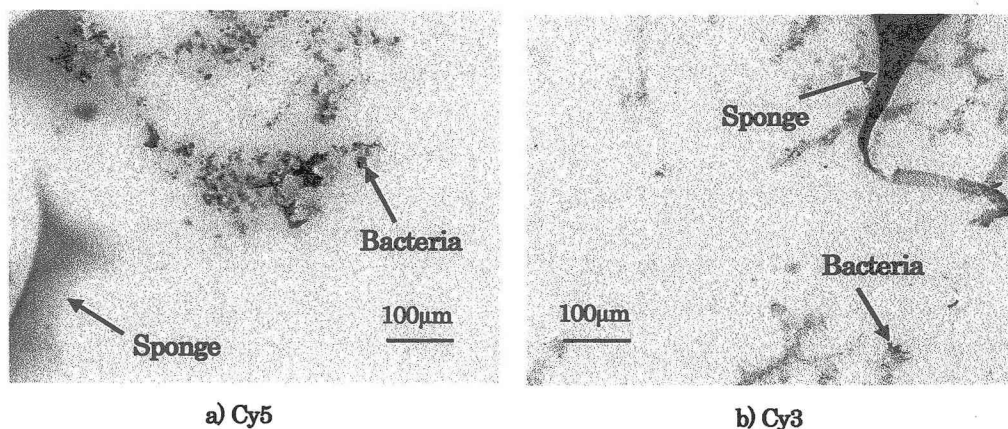


Fig.3 Autonomous fluorescence of sponge

(2) 分布把握の実験方法

1) ハイブリダイゼーション

培養槽内からスポンジキューブを取り出し、パラホルムアルデヒド溶液 (4% paraformaldehyde in PBS, pH7.2, 4℃) で 24 時間固定した。その後、OCT compound (SAKURA) で包埋した。試料に十分包埋剤をしみわたらせ、-20℃で急激に凍結した。凍結後クライオスタットを用いて試料を薄切して 5µm の厚さの切片を作成した。薄切はスポンジキューブの中心部分を通り、かつキューブの辺に水平または垂直に交わるようにした。薄切した切片はゼラチンコートしたスライドガラス上に移し、5µm にスライスしたサンプルのエッジをガラスカッターでマーキングした。これを観察の基線とした。

アルコール溶液 (30%, 50%, 80%, 99% の順) で脱水し、最後に風乾したものを FISH 法に供した。FISH 法は Amann¹⁵⁾ らの方法に準じて行った。ハイブリダイゼーションは、Hybridization Buffer 160 µl (0.9M NaCl,

20mM Tris-HCl pH7.2, 0.01% SDS, formamide)を切片上に滴下し、さらに20 μ lのプロープ溶液を加えてハイブリダイズした。Formamide の濃度はプロープによって変更した。ハイブリダイゼーション温度は 46℃とし、未付着プロープの洗浄は Wash Buffer を用いて 48℃で 20 分間行った。洗浄後、蛍光顕微鏡で観察を行った。励起波長は Cy3 のとき 550nm 付近を使用し、Cy5 のとき 630nm 付近を使用した。

2) 顕微鏡観察と画像解析

顕微鏡観察はスライドガラス上にある切片の辺と平行に行った。基線から 6mm 内部にステージを移動させ、観察は Fig.4 に示すように切片の中心から開始した。約 700 μ m おきに連続的に写真撮影した。画像は更にコンピュータ上で 240 μ m のシーンに切り分けて解析した。

得られた画像は Photoshop (Adobe) を使用し、二値化処理を行った¹⁶⁾。二値化処理では NON338 プロープ (Table 4) を用いて FISH 法をおこなった場合の値を閾値として使用した。スポンジの自家蛍光がある画像については、画像の全ピクセル数からスポンジの自家蛍光により蛍光を発しているピクセル数を引くことにより補正をおこなった。

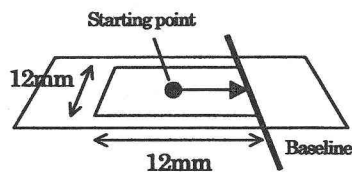


Fig.4 Section for FISH

3. 2 分布把握の結果および考察

(1) 硝化細菌の存在状態

FISH 法による観察結果を Fig.5 に示す。これは培養槽から取り出したスポンジをそのまま包埋剤で包埋し、切

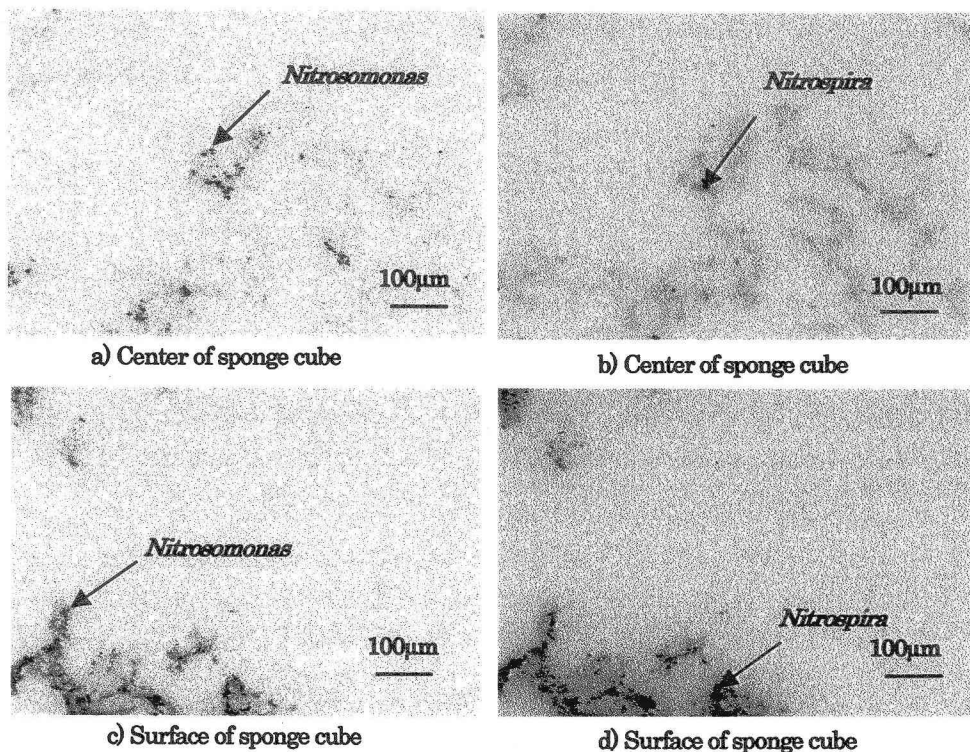


Fig. 5 FISH image of biofilm section.

a and c: *Nitrosomonas* detected by the probe Nso1225-Cy5

b and d: *Nitrospira* detected by the probe NSR826-Cy3

片状にしたサンプルについて FISH 法を施したものである。In situ で FISH 法を行っているため、この図からスポンジキューブ内の中心および表層部での硝化細菌の存在の違いが確認できる。スポンジの中心部では硝化細菌の *Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌ともに存在は確認された (Fig.5a,b)。スポンジ表層では同時に *Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌が中心部に比べると高い割合で存在することが確認された (Fig.5c,d)。一方、*Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌の関係をしてみると *Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌には明確な棲み分けは確認できなかった。これは、培養槽内でアンモニア酸化細菌がアンモニアを酸化し生成された亜硝酸を亜硝酸酸化細菌が硝酸に酸化しているためだと考えられ、互いに近い位置で共生関係をもつことで有利に生育しているものと考えられる。

(2) 画像解析から得た硝化細菌の空間分布

FISH 法を行い連続的に得た画像を解析することで硝化細菌の空間分布の調査を行った。解析した結果を Fig.6,7 に示す。図の縦軸は蛍光標識の輝度が閾値をこえたピクセル数を示す。これは、直接の細菌数すべてではないが、存在する細菌数に密接な比例関係があると考えられるので、この輝度の分布が標識を付した細菌の分布を表すものと考えた。横軸はスポンジの中心からの位置を示している。

Fig.6 および 7 から *Nitrosomonas* 属細菌、*Nitrospira* 属細菌ともに表面付近に多く存在し、スポンジ内部に進むにつれて少なくなっていることが分かった。最も多く存在したのは *Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌ともにスポンジの基線から内側に 1-2mm のところであった。基線はスポンジキューブの形状としての端部を示しているにすぎず、必ずしも生物膜の表面を表してはいない。基線から 2 mm 以内では硝化反応を行うのに十分量の DO が存在しているが、スポンジ中心部に進むにつれて DO が減少していくため、スポンジの中心部では硝化細菌が存在しにくい環境になっているからだと考えられた。また、*Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌の分布が同様の傾向を示していることから、*Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌は互いに密接して生物膜内に存在していたと言える。

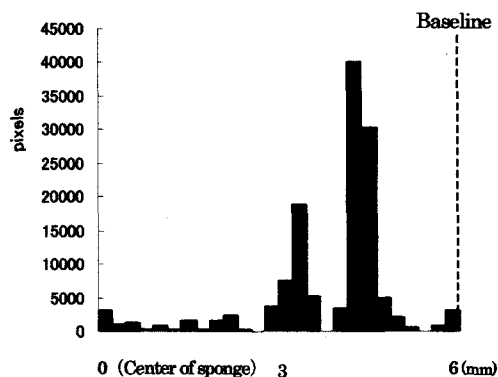


Fig.6 Distribution of *Nitrosomonas* strain

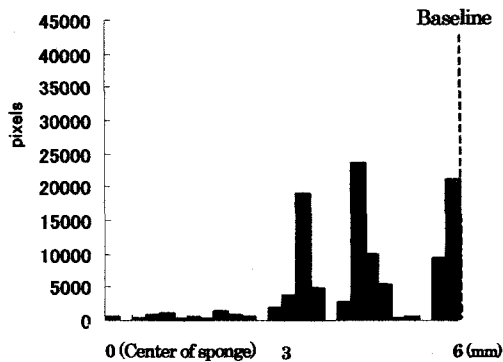


Fig.7 Distribution of *Nitrospira* strain

4. 動力学実験

4. 1 実験方法など

(1) 硝化反応における生物膜の動力学理論

生物膜内への基質輸送は、分子拡散によって行われている。生物膜は、基質の生物膜内への浸透が十分に生じていない場合では反応速度が制限される拡散律速状態となる。この状態を不完全基質浸透という。一方、基質が生物膜全体に十分にいきわたり、反応速度が制限されていない状態を完全基質浸透という。

アンモニア性窒素が十分に存在し、アンモニア性窒素量によって硝化反応が律速されないような生物膜を考える。不完全基質浸透の状態では溶存酸素が生物膜内のある位置で消費尽くされる。液相の溶存酸素が低いために、それよりも内部の生物膜に酸素が行かない。したがって、溶存酸素が消費尽くした位置より内部の生物膜では硝化反応は生じない。このため、この位置より内部の生物膜ではアンモニア性窒素は消費されることない。すなわち、不完全基質浸透の状態とは、拡散律速のために生物膜全体が有効に機能していない状態をいう。完全基質浸透の状態では、生物膜全体にわたって溶存酸素とアンモニア性窒素がともに浸透している。この状態では生物膜のすべての領域において硝化反応が生じていると考えられる。

生物膜の動力学理論を展開し、溶存酸素が反応を律速する硝化反応にその理論を適用すると、不完全基質浸透条件下での酸素消費速度は、液相中の溶存酸素濃度の $1/2$ 乗に比例する。完全基質浸透の条件下では、液相中の溶存酸素濃度にかかわらず酸素消費速度は一定になる⁸⁾。

$$\text{不完全基質浸透の条件下: } r_A = k_{1/2A} \cdot S^{1/2} \quad \dots (1)$$

$$\text{完全基質浸透の条件下: } r_A = k_{0A} \cdot S^0 \quad \dots (2)$$

r_A : 単位表面積あたりの酸素消費速度 ($\text{gO}/\text{m}^2/\text{d}$)

$k_{1/2A}$: 不完全基質浸透条件下での速度係数 ($\text{g}^{1/2}/\text{m}^{1/2}/\text{d}$)

S : 液相中の溶存酸素濃度 (gO/m^3)

k_{0A} : 完全基質浸透条件下での速度係数 ($\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$)

溶存酸素の浸透深さが生物膜厚以下である不完全基質浸透条件下では、単位生物膜表面積あたりの酸素消費速度は溶存酸素の浸透深さとともに増加する。しかし、溶存酸素の浸透深さが生物膜厚に達すると単位生物膜表面積あたりの酸素消費速度は一定となる。生物膜厚は硝化反応に密接に関係しているといえ、以下の式(3)で表すことができる⁸⁾。

$$L_0 = (2 \cdot D \cdot S / k_{0r})^{1/2} \quad \dots (3)$$

L_0 : 生物膜厚 (m)

D : 拡散係数 (m^2/d)

S : 液相中の溶存酸素濃度 (gO/m^3)

k_{0r} : 完全基質浸透条件下における反応速度係数 ($\text{g}/\text{m}^3/\text{d}$)

r_A は k_{0r} と L_0 とを用いて $r_A = k_{0r} \times L_0$ として整理されるため、式(3)の k_{0r} に $k_{0r} = r_A / L_0$ を代入し、 L_0 について整理すると、式(4)を得る。

$$L_0 = 2 \cdot D \cdot S / r_A \quad \dots (4)$$

(2) 動力学実験の方法

動力学実験装置の概要を Fig.8 に示す。動力学実験装置は、反応槽、人工下水流入ポンプ P_1 、循環用ポンプ P_2 、DO メーターから構成される。この反応槽は細菌を固定した担体を設置する部分として、縦 600mm、横 150mm、深さ 20mm のサイズを有している。反応槽に担体を敷き詰めた後、ふたをして反応槽を密閉すると担体の上面とふたの間には 5mm の空間が形成される。動力学実験に使用する人工基質は、この空間を下流することになる。この装置に、酸素ポンプで十分にばっ気した人工下水をポンプ P_1, P_2 にて装置内全体に行き渡らせた。ばっ気は純酸素で行っているため、人工下水の DO 値は通常のリアクターより高い値となっている。流量は流入水量が 300ml/min、循環水量が 120ml/min である。十分に人工下水を流した後、ポンプ P_1 を止め、ポンプ P_2 だけで

系内を循環(流量は 120ml/min)させた。このとき溶存酸素の測定を開始した。測定は PC と DO メーターで連続的に行った。

4. 2 動力学実験の結果および考察

計測した溶存酸素濃度から求めた酸素消費速度(OUR)と $DO^{1/2}$ の関係を Fig.9 に示す。動力学実験で使用した人工下水には有機物が含まれていないため、硝化細菌の硝化反応での酸素消費が主に動力学実験に反映して来ると考えられる。したがって、OUR は主に硝化によってもたらされたものと考え、以下考察を行う。

$DO^{1/2}$ が $5gO^{1/2}/m^{3/2}$ 以上では、OUR は $9.72 g/m^2/d$ にほぼ一定値を示した(図中に B 点と記す)。 $DO^{1/2}$ が $5gO^{1/2}/m^{3/2}$ 以下では、OUR は $DO^{1/2}$ に比例していることが分かる。また、同図より、 $DO^{1/2}$ が 1.71(図中に A 点と記す)において、カーブが折れていることが分かる。このように人工下水中の溶存酸素濃度が約 $25g/m^3$ 以下においては、OUR が $DO^{1/2}$ に比例していることから、これらの条件では、不完全基質浸透の状態にあることが確認された。また、溶存酸素濃度が約 $25g/m^3$ にまで高くなると完全基質浸透になることがデータから読み取れた。このことから、本実験で使用しているスポンジキューブに固定した硝化細菌群は生物膜としての扱いが可能であるといえる。文献⁸⁾によると、一様な生物膜であれば図中スロープ部分は拡散律速を表す箇所となる。この場合、データの折れ曲がりが生じないと説明されている。本研究ではスロープ部に折れ曲がりが生じたのでこれを A 点と付した。また、不完全基質浸透と完全基質浸透の境界線を B 点と付した。以上の理由からこれら 2 点に対し生物膜厚を算出した。培養条件に相当する DO 条件(約 $2.4gO^{1/2}/m^{3/2}$)は Fig.9 において直線状であるとみなされる位置(A 点と B 点の間)にあることから、培養時の DO 濃度条件においては、解析しなかった。

生物膜厚の算出には、 $(DO^{1/2}, OUR) = A(1.71, 1.08)$, $B(5.24, 9.72)$ を使用し、生物膜内における溶存酸素の拡散係数 D ⁸⁾ は 1.7×10^{-4} を使用した。その結果、B 点までの反応から、生物膜厚は $962\mu m$ と算出できた。また A 点までの反応は生物膜表面から $921\mu m$ の間で行われていることが計算から求められた。この計算からは、スポンジの表面から深さ $921 \sim 962\mu m$ までの厚さ $41\mu m$ の部分において、OUR が 1.08 から 9.72 にまで上昇していたことになる。

EPA のレポートによると硝化細菌の $K_s(O_2)$ 値(基質が O_2 の場合の飽和定数)は $2.0mg/l$ となっている⁴⁾。本研究で使用した培養槽内の DO 濃度は $5mg/l$ 前後であるため、培養時には硝化細菌の比活性は高い状態を保っていると考えられる。しかし、スポンジ内部の DO 濃度は $K_s(O_2)$ 値よりも小さいと考えられる。このことから、培養時の

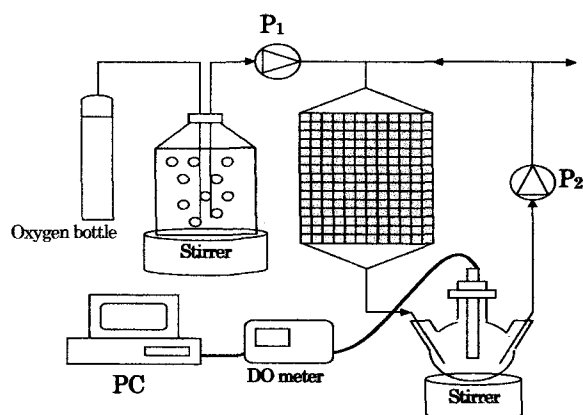


Fig.8 Kinetic experimental setup

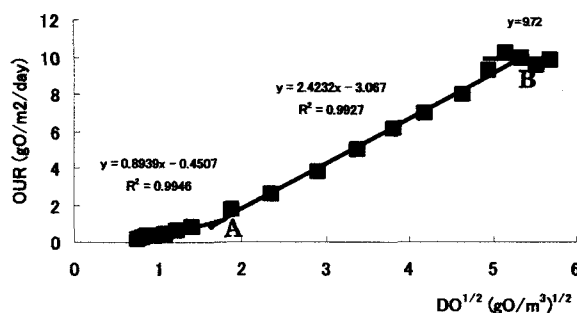


Fig.9 OUR as function of square root of DO concentration in bulk water

DO 濃度よりも動力学実験を行った時の高い DO 条件の場合に、培養の時よりも硝化細菌の比活性が高まったことが高い硝化速度を得た要因の1つであると考えられる。

一方、今井らは休眠状態菌の存在を実験的に示している¹⁷⁾。この休眠状態菌は「基質が供給されずに休眠状態にあるが、基質の再供給とともに活性化する菌」と定義されており、本研究で使用しているスポンジキューブに固定した硝化細菌群にも休眠状態菌の存在が考えられる。この休眠状態菌が動力学実験を行った場合に活性化し、硝化に関わる細菌数が増加したことも高 DO 濃度のとき高い硝化速度を得る要因の1つとなったと考えられる。これらの点については、調査を継続している。

5. 動力学実験と FISH 法との比較

生物膜の評価を行う際には、その膜厚というものは重要な指標の1つであるといえる。本研究では生物膜に対し、FISH 法による可視化と動力学実験の両面からその菌体の空間分布を調べようとしている。これは、前者がミクロ的観点からの調査であるのに対し、後者はマクロ的観点からの解析である。動力学実験の結果は FISH 法の観測対象視野となった部分を集積して得られるものと筆者はとらえている。

FISH 法で得られた硝化細菌の空間分布はスポンジキューブの表面近傍に 1mm 以上の幅を持って偏在していた。また動力学実験結果により算出された生物膜厚は 962 μm だった。Fig.9 にある溶存酸素濃度が 2.92gO/m³ 以下での反応は、生物膜表面から 921 μm 以内で生じていることが計算から言える。この反応は Fig.6 の *Nitrospira* 属細菌の分布と対応している。このことから動力学実験の溶存酸素濃度が 2.92gO/m³ 以下の場合、酸素消費が主に *Nitrospira* 属細菌によって行われているといえる。

Fig.9 において溶存酸素濃度が 2.9gO/m³ 以下 (Fig.9 の点 B までの範囲) では、Fig.6, 7 には対応する硝化細菌の分布は見られなかった。この点において、FISH 法による観察と動力学実験から得た計算上の情報とは食い違いがある。実際には FISH 法で観察した更に内部 (表面から 2mm 付近) の硝化細菌が機能していたものと推察される。Fig.6, 7 を見ると硝化細菌はスポンジの表面から 1-2mm の間に最も多く存在していることが分かった。多孔質担体では、いわゆる板状の担体とは違い、担体と固定した生物膜との境を明確には示すことが困難である。顕微鏡による観測では凍結サンプルのスライスをもとに観察用試料を作成している。このとき試料片は正方形となっており、この正方形の任意の辺を便宜上生物膜の開始する点として整理している。顕微鏡観察では便宜上決めた生物膜の表面から 1mm 以上内部に入ったところ硝化細菌の存在が多数認められたという結果となった。しかし、ここで示した便宜上の生物膜開始位置はあくまでスポンジキューブの物理的形状をもとにプレパレートに付した基線からの位置を示しているものである。Fig.6, 7 にある分布のピークの位置が生物膜だとしての最深部だと考えると、生物膜表面はスポンジ表面より約 1mm 内側から始まると推察できる。これは EUB338 についても解析した結果、表面から物理的に 1mm 以内の部位にはほとんど生物は認められなかったことから表面より約 1mm 内側から始まると推察できた。

6. まとめ

1. 細菌叢解析の結果、無機栄養の人工下水を用いたがスポンジキューブには独立栄養細菌だけではなく従属栄養細菌も固定されていた。
2. 固定された硝化細菌はアンモニア酸化細菌の *Nitrosomonas* に属するものと、亜硝酸酸化細菌の *Nitrospira* に属するものであると DGGE 法により確認できた。
3. 純粋分離法では硝化細菌の単離はできなかった。
4. FISH 法により *Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌ともに表面から 1-2mm 付近で最も多く存在しスポンジ内部に進むにつれて少なくなっていることが分かった。

5. *Nitrosomonas* 属細菌と *Nitrospira* 属細菌は互いに密接して生物膜内に存在していたといえる。
6. スポンジキューブに固定された硝化細菌群は生物膜としての特徴を示し、その生物膜厚は動力学実験により 962 μ m と算出された。
7. FISH で得られた分布と動力学実験で得られた生物膜厚には約 1mm のずれが生じた。

謝辞: 本研究を遂行するにあたり、産業技術総合研究所の川原崎守先生には FISH で使用した顕微鏡をお借りさせていただきただけでなく、ディスカッションもしていただいた。ここに記して深甚の謝意を表すものであります。東京理科大学土木工学科の西村司教授、佐藤慶太氏(当時本学博士課程3年、(現)株式会社ドーコン)、加藤祐一氏(本学大学院修士2年)には画像解析について貴重なアドバイスをいただいた。また、佐藤孝太氏(当時本学卒研究生、(現)東京工業大学大学院修士2年)には動力学実験の実施において多大な協力を得た。ここに記して深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 田中和博.(1981) 循環式硝化脱窒プロセスの解析的研究。(学位論文)。
- 2) 活性汚泥循環変法研究会.(1982) 循環式窒素除去プロセスの運転管理に関する技術調査。
- 3) 下水道協会誌.(2004) 下水道法施行令の改正と新たな展開 41, 496, 4-41.
- 4) EPA.(1975) Process design manual for nitrogen control.
- 5) 中村玄正, 設楽裕, 金成淳, 杜茂安.(1986) 接触エアレーション法における硝化機構に関する基礎的研究, 下水道協会論文集 23, 268, 31-44.
- 6) 出口浩, 松井康弘, 森直道, 柏谷衛.(1999) 完全混合反応槽で多孔質結合固定化担体に固定した微生物群の特性に関する基礎的研究, 下水道協会論文集 36, 438, 105-115.
- 7) 大迫孝輔, 鈴木智順, 出口浩.(2004) 多孔質担体に固定した硝化細菌群に対する FISH 法によるアプローチ, 第38回日本水環境学会年会講演集, 547.
- 8) Henze M., Harremoës P., Jansen J. and Arvin E. (1995) Wastewater Treatment Springer-Verlag.
- 9) Takahashi, R., Kondo, N., Usui, K., Kanehira, T., Shinoara, M. and Tokuyama, T. (1992) Pure isolation of a new chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium on gellan gum plate, J. Ferment. Bioeng., 74, 52-54.
- 10) 金田一 智規, 伊藤 司, 岡部 聡, 渡辺 義公.(2004) MAR-FISH 法を用いた硝化細菌生物膜内における硝化細菌由来有機物の追跡, 第38回日本水環境学会年会講演集, 380.
- 11) B.K. Mobarry, M. Wagner, V. Urbain, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 62:2156-2162.
- 12) Andreas Schramm, Dirk de Beer, Johan C. van den Heuvel, Simon Ottengraf, and Rudolf Amann. (1999) Microscale Distribution of Populations and Activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a Macroscale Gradient in a Nitrifying Bioreactor: Quantification by In Situ Hybridization and the Use of Microsensors. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3690-3696.
- 13) Amann, R. I., B.J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56:1919-1925.

- 14) Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions, *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
- 15) Amann, R.L. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. (1995) *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6, 1-15.
- 16) 田中邦一, 青島正和, 山本哲司, 磯部邦昭. (2003) フォトショッパによる衛星画像解析の基礎, 64-65.
- 17) 今井剛, 楠田哲也, 古米弘明. (1993) 嫌気性流動床における生物膜のモデル化に関する研究, *環境工学研究論文集*, 30, 209-217.