

硝化菌生物膜の生態学的構造解析

北海道大学大学院 ○伊藤 司 乗松 直生子 佐藤 久
岡部 聡 渡辺 義公
(株) 富士電機 境 一澄

1. はじめに

下水処理に用いられる生物膜は多種多様の微生物から構成され、複雑な生態学的構造を有している。生物膜の生態学的構造はその機能及び水環境と密接に関係することより、生物膜の機能を評価し強化するためには目的とする微生物の生態学的構造や活性を *In Situ* で測定することが重要である。特に窒素除去を目的とする生物膜内では、硝化細菌と他栄養性細菌が溶存酸素と空間をめぐる競合関係にあると考えられ、一般に増殖速度や収率係数の小さい硝化細菌はこの競合に敗れ、安定した硝化効率が得られない結果となることが報告されている¹⁾。安定した硝化効率を得るためには、生物膜内の硝化細菌の動態をミクロスケールで把握することが重要である。硝化細菌の検出にあたり、従来の培養に基づく方法 (MPN 法、Plate counting 法) では、*In Situ* での測定が不可能な上、操作手順が煩雑で検出に長期間を要する、計測効率が低い等の問題点が挙げらる。そこで、本研究では、近年進歩がめざましい 16S rRNA 標的蛍光遺伝子プローブを用いた FISH 法と、共焦点走査型レーザー顕微鏡 (CLSM) を組み合わせることにより、生物膜内のアンモニア酸化細菌の空間的分布及びその存在形態に及ぼす流入基質及び C/N 比の影響について検討した。

2. 実験方法²⁾

2.1 生物膜試料 混合培養系生物膜は半水没型回転円板装置を用い、流入基質として a) 札幌市 S 下水処理場の最初沈殿池流出水 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 面積負荷 = $2.6 \times 10^2 [\text{g}/\text{m}^2/\text{h}]$)、b) 人工基質 (C/N=0, 1.0) ($\text{NH}_4\text{-N}$ 面積負荷 = $5.2 \times 10^2 [\text{g}/\text{m}^2/\text{h}]$) を供給し馴養した。

2.2 生物膜試料の前処理 生物膜採取後、4% paraformaldehyde 溶液で固定 (4℃、24 時間)、洗浄 (1×PBS、3 分間×2 回) 後、OCT compound (Tissue-Tek) で包埋した。凍結 (-20℃、5 時間) 後、支持体に対して垂直及び水平方向に Cryomicrotome を用いて 20-40 μm ごとにスライスし、切片をスライドガラスに固定し、エタノール脱水を施した (50、80、95、各 3 分)。

2.3 FISH (蛍光 *In Situ* ハイブリダイゼーション) 今回用いた 16S rRNA 標的蛍光遺伝子プローブは、 β -subclass のアンモニア酸化細菌に特異的な Nso190³⁾ (5'-CGATCCCTGCTTTTCTCC-3'、TRITC ラベリング) である。ハイブリダイゼーションは 46℃ で 3 時間行い、その後、洗浄を 48℃ で 20 分間行なった。hybridization buffer 及び washing buffer の組成は次の通りである。hybridization buffer : 0.9M NaCl、20mM Tris-HCl (pH=7.2)、0.01% SDS、20% formamide。washing buffer : 170mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH=7.2)、0.01% SDS。生物膜試料の観察は共焦点レーザー蛍光顕微鏡 Zeiss LSM410 (Carl Zeiss、HeNe-laser (543nm) 装備) を使用して行なった。

2.4 画像解析 CLSM (対物レンズ 40 倍) により生物膜深さ当たり任意の投影画像 (512×512pixel、1pixel=0.625 μm) を 5 枚作成した。各々の画像より画像解析ソフト (Quantimet 500+ : Leica) を用いてクラスター径を計測し、アンモニア酸化細菌の生物膜深さ方向における存在形態分布を求めた。

3. 実験結果と考察

表-1 にサンプリング時の各生物膜の馴養状況を示す。

(1) 最初沈殿池流出水で馴養した生物膜 アンモニア酸化細菌は生物膜底層部に集中して存在し、直径 5~10 μm 程度の球状で密なクラスターを形成していた (図-1、2)。特に、bulk との境界付近においては 15~20 μm の大きなクラスターであった (図-2)。生物膜表層部においては底層部のようなクラスターではなく single cell として存在していた。

(2) 人工基質で馴養した生物膜 硝化反応は亜硝酸型であり、亜硝酸塩の蓄積が顕著であった。

1) C/N=1.0 生物膜底層部にアンモニア酸化細菌のクラスターは集中していた。クラスター径は 5~15 μm 程度であり、生物膜底層部から中層部まで存在した。底層部ではクラスターのみが分布し、一方、中層部ではバイオマス

表-1 サンプリング時の各生物膜の馴養状況

流入基質	最初沈殿池流出水	人工基質 C/N=1.0	人工基質 C/N=1.0
馴養日数[day]	5	13	5
膜厚[μm]	約500	約700	約300
NH_4^+ 酸化flux[$\text{g-N/m}^2/\text{h}$]	1.8×10^2	2.6×10^2	3.6×10^2
NH_4^+ eff[mg-N/L]	6.2	11.9	9.1
NO_2^- eff[mg-N/L]	1.8	21.3	19.4
NO_3^- eff[mg-N/L]	11.1	5.9	11.6

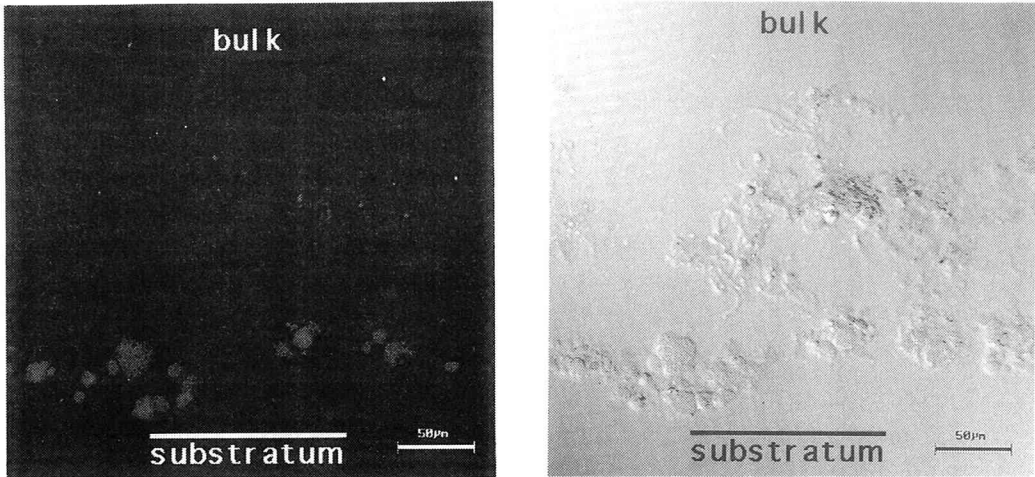


図-1 最初沈殿池流出水で馴養した生物膜のアンモニア酸化細菌 projection&dic image (垂直断面、厚さ 40 μm 、Neo190)

全体に分散した数多くの single cell と、クラスターとが混在していた。表層部は single cell のみが僅かに点在していた。この結果は、最初沈殿池流出水を流入基質とした生物膜と類似していた。C/N 比は共に = 1 であるが、 NH_4^+-N の面積負荷には約 2 倍の違いがあり、クラスター径やクラスター数などに及ぼす影響は、今後さらに検討の余地がある。

2) C/N=0 アンモニア酸化細菌は生物膜底層部から中層部までクラスター、single cell とともに非常に高密度に存在していた。最初沈殿池流出水及び C/N=1.0 の場合と比較して、明らかにクラスターは密集した状態で存在していた。表層部ではクラスターの存在は確認されなかったが、single cell が多数点在し、他の 2 つの生物膜とは性質を異にした。表-2 に示す画像解析の結果から明らかのように、生物膜中底層部では直径 20~50 μm の巨大なクラスターが多数検出された。表層部では 10 μm 以上のクラスターは全く存在せず殆どの細菌は single cell の状態であった。有機物負荷のある他の生物膜では、酸素をめぐるアンモニア酸化細菌と他栄養性細菌は競合するが、C/N=0 の場合は生物膜内に十分な酸素が供給なされ、より大きなクラスターを形成することが可能である。従って、クラスターサイズは酸素輸送に大きく依存すると共に、膜深さ方向の酸素濃度分布とも密接に関係すると考えられる。

しかしながら、本実験では、馴養条件の異なる3種類の生物膜内におけるアンモニア酸化細菌の存在形態は、全てに共通して「生物膜底層部ではクラスターとして、表層部では single cell として存在する」という結果であった。この事実、実測した生物膜内酸素濃度分布と相反する結果である。この理由として図-1 見られるように、生物膜は多くの間隙や水路から構成される非常に不均一で porous な構造をしており、円板の回転により生じる水流及び汚れによって、膜底部への酸素輸送が促進されたためであると考えられる³⁾。増殖速度や収率係数が小さく、競合の強者によって表層を追われたアンモニア酸化細菌が生物膜底層部でクラスターを形成し増殖可能なのは、このような生物膜の物理的構造によるものであると推察される。

また、生物膜の成長は増殖が活発な表層部を中心に進行する。従って、生物膜底層部にクラスターが集中する理由は、膜形成初期に付着増殖したアンモニア酸化細菌が時間の経過と共にクラスターへと成長したものであり、また表層部の single cell は膜底層部や bulk より付着して間もないものであると考えられる。このように生物膜成長の経緯も、膜内での分布を説明するために考慮すべき点である。

4 おわりに

16SrRNA 標的蛍光遺伝子プローブを用いた FISH 法による In Situ での生物膜内におけるアンモニア酸化細菌の生態学的構造を解析した結果以下のような結論に至った。

1. アンモニア酸化細菌に特異的な 16SrRNA 標的蛍光遺伝子プローブを用いた FISH 法は、アンモニア酸化細菌の存在形態をマイクロスケールで把握することが可能であった。
2. 全ての馴養条件でアンモニア酸化細菌は、数百 μm 程度の生物膜内において底層部ではクラスターを形成し、表層部では主に single cell として存在していた。
3. $C/N=0$ で馴養した生物膜内のアンモニア酸化細菌は、 $C/N=1.0$ 及び最初沈殿池流出水で馴養したものに比べて大きなクラスターを形成し、密に存在していた。

<参考文献>

- 1) Rittmann, B. E., Whitman, R. : Bioaugmentation: a coming of age. *Water Quality International* 1:12-16(1994)
- 2) Amann, R. I. : In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Mol. Microbial. Ecol. Manual.* 3, 3, 6:1-15(1995)
- 3) Mobarry, B. K., Wagner, M. et. al. : Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2156-2162(1996)
- 4) 黒田浩文 岡部聡ら: 生物膜の物理的構造と懸濁微粒子の輸送に関する研究 第31回水環境学会年会講演集, 134(1997)

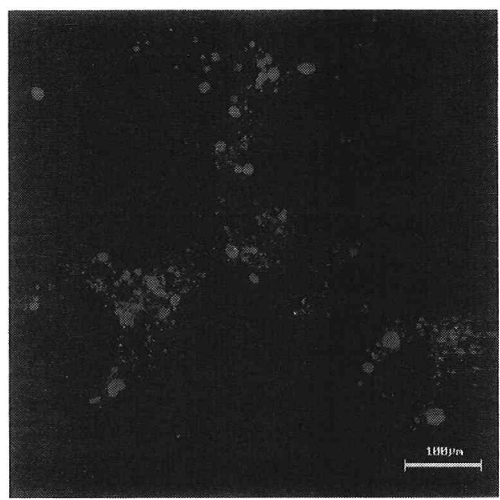


図-2 最初沈殿池流出水で馴養した生物膜のアンモニア酸化細菌 projection image (水平断面、厚さ 20 μm 、Nso190)

表-2 画像解析によるアンモニア酸化細菌の存在形態の生物膜深さ方向分布(画像五枚の合計値を深さごとに示した)

		支持体からの距離(μm)		
		30	130	210
single cell		3855	2886	2254
クラスターの最大直径	2.5~5 μm	388	378	187
	5~10 μm	293	261	30
	10~15 μm	134	126	0
	15~20 μm	55	75	0
	20~30 μm	16	27	0
	30~40 μm	3	4	0
	40~50 μm	0	3	0
	50 μm ~	0	0	0
計		4744	3759	2471

(検出数)