

北海道大学大学院工学研究科

岡部 聡

東京都水道局

乗松直生子

北海道大学大学院工学研究科

渡辺 義公

1. はじめに

廃水処理分野において窒素成分の生物学的な除去プロセスの第一段階は硝化であるが、硝化を担う硝化細菌の増殖速度は遅く、水質・pH・温度等の変動に敏感であることから、実際の処理施設において安定して硝化を維持することは困難な場合が多い。効果的に硝化効率を高めるためには、生物膜内での硝化細菌による処理のメカニズムを解明し、その機能を安定化・強化することが必要であると思われる。硝化細菌は増殖速度が低いために従来のMPN法や平板計数法といった検出法では培地の選択性や検出効率の低さといった問題点が指摘されてきた。しかもこれらの手法では原位置 (*in situ*) での検出は不可能であった。しかし、近年 16SrRNA を標的とする蛍光遺伝子プローブを用いた FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) 法により、活性汚泥フロックや生物膜内の *in situ* における硝化細菌の特異的検出が可能となってきた。そこで本研究では、アンモニア酸化細菌に特異的な 16SrRNA を標的とする蛍光遺伝子プローブを用いた FISH 法と画像解析を併用することにより、生物膜の形成過程におけるアンモニア酸化細菌の存在形態、空間分布、及び優占種の変化を解析した。また、生物膜内のアンモニア酸化細菌の動態と処理特性の関係についても検討を加えた。

2. 実験方法

本研究では半没の RBC 装置を用いて生物膜を馴養した。創成川下水処理場の最初沈殿池流出水で 3 日間生物膜を馴養した後、C/N=0.1(w/w) ($\text{NH}_4^+\text{-N}=50\text{mg/l}$) の二系列の人工基質による連続運転に切り替え、経日的に生物膜試料を採取した。採取した生物膜を支持体に垂直または水平方向に 20~50 μm の厚さに凍結切片化し、FISH 法を Amann らの方法に準拠して行った。FISH 法には、*Proteobacteria* 綱の β -subclass に含まれる全てのアンモニア酸化細菌に特異的なプローブ Nso190²⁾、その中の *Nitrosomonas europaea* / *eutropha*, *Nitrosococcus mobilis* に特異的なプローブ NEU²⁾を用い、共焦点レーザー走査型顕微鏡によりそれぞれのプローブで検出された細菌の画像を取り込んだ。得られた画像から、検出面積が 0~5 μm^2 のものを“マイクロクラスター”、5 μm^2 以上かつ円形度係数が 1~2.7 までのものを“クラスター”、5 μm^2 以上かつ円形度係数が 2.7 以上のものを“その他”と定義し、存在形態別の空間分布の経日変化を解析した。アンモニア酸化細菌の優占種についての検討は、プローブ Nso190 のみで検出されたものを G-1(*Nitrosomonas* C56, *Nitrospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis*, *Nitrosolobus multiformis*)、Nso190 と NEU で同時に検出されたものを G-2(*Nitrosomonas europaea* / *eutropha*, *Nitrosococcus mobilis*)として分類し、それぞれの変遷を追跡した。また、Nsm156²⁾, Nsv443²⁾, NmV³⁾, Nsp0³⁾のグループ又は属に特異的なプローブを併用し、アンモニア酸化細菌の優占種の詳細についても検討を行った。

3. 実験結果・考察

3-1 アンモニア酸化細菌の空間分布 Bulk 水中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が 5mg/l 以下にまで減少する時期は、C/N=1 の系のほうが C/N=0 の系よりも約 10 日間程度遅かった。この時期は、それぞれの系において直径 10~15 μm ほどのクラスターの増加が顕著になる時期とはほぼ一致し、局所的には直径 40 μm 以上にも達するクラスターも観察された。また、画像解析により Nso190 による総検出面積を求めたところ、人工基質による運転を開始してからほぼ同時期の試料では C/N=0 の方が総検出面積は大きく、水質が完全な硝酸型に移行すると C/N=0 で $5 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、C/N=1 では $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ となった。これは、C/N=0 の系の方が他栄養性細菌の増殖が抑制されるために増殖速度の遅いアンモニア酸化細菌も生育しやすく、C/N=1 の系と比較してアンモニアの酸化、菌体数の増加、クラス

ターの形成が促進されたためと考えられる。

画像解析を用いて Nso190 による検出面積の深さ方向分布の経日変化を求めたのが図-1, 2 である。C/N=0 の生物膜では運転後期における膜厚は約 300 μm に達し、総検出面積・クラスター検出数は表層で減少する傾向がみられるが、C/N=1 と比較するとはほぼ全層にわたって高密度に分布していた。C/N=1 では糸状性細菌の発達が著しく膜厚は約 1500 μm に達し、総検出面積・クラスター検出数共に最底層で最も高く、表～中層で激減した。深さ方向にこのような分布の差がみられるものの、C/N=0・1 共にアンモニア酸化細菌の総検出面積・クラスター検出数のピークは支持体から約 200 μm の部分に集中していた。これは最初沈殿池流出水で馴養された初期生物膜には人工基質による運転開始時に既にアンモニア酸化細菌が付着しており、それらが増殖したこと、人工基質による運転を開始し

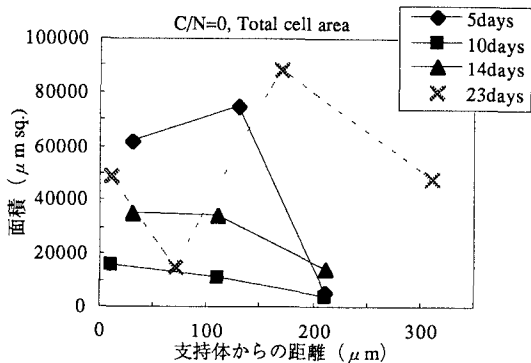


図-1 Nso190 による総検出面積の深さ方向分布の経日変化 (C/N=0)

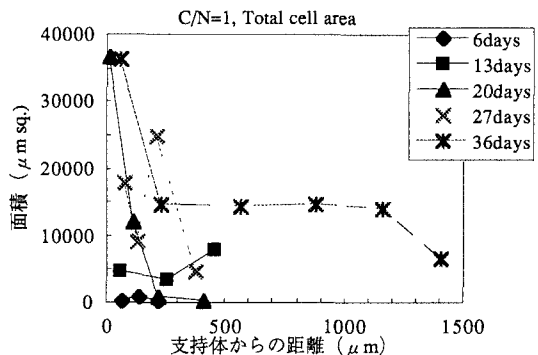


図-2 Nso190 による総検出面積の深さ方向分布の経日変化 (C/N=1)

てから C/N=1 の系で著しく発達した糸状性細菌からなる表層部では、水流による剥離力の影響が大きく、硝化細菌が増殖できなかったと考えられる。

次に、画像解析によって検出した面積をその存在形態（クラスター、マイクロクラスター、その他）によって分類した結果を図-3 に示す。C/N=0、23 日目では総検出面積の膜深さ方向分布にばらつきがみられるが、これは生物膜の間隙率が深さ方向により異なるためであり、総検出面積が低いところでは間隙率は高くなっていた。膜底部ではクラスターの存在比が約 45%、表層部では約 30% であり、その他の占める割合が 40~60% と他に比べて高くなっているが、これは生物膜内のアンモニア酸化細菌の密度が非常に高かったため、投影画像を作成する際に個々のクラスターが重なり合い、クラスターに分類されなかったものが多数含まれているため、実際のクラスターの割合は更に高いもの

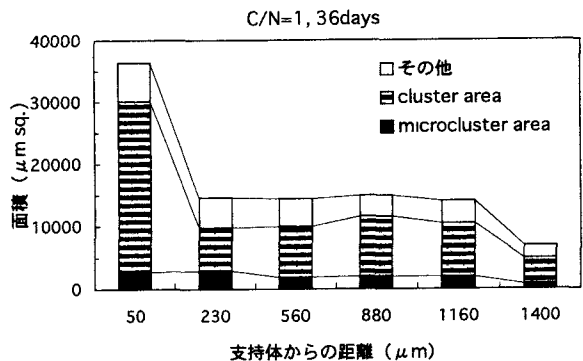
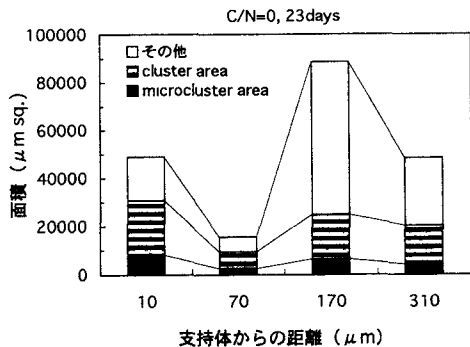


図-3 画像解析による存在形態別検出面積の生物膜深さ方向分布

と思われる。一方、C/N=1 では6日目は全層にわたり60~70%がマイクロクラスターであったのに対し、20日目では、底層でクラスターの割合が70~80%にまで増加した。27、36日目になると全層でクラスターの占める割合が60~80%になった。両系においてアンモニア酸化細菌の大部分はクラスターを形成して存在していることが示された。

3-2 アンモニア酸化細菌の優占種の遷移 Nso190とNEUの二種類のプローブを同時に用いることにより、生物膜形成過程におけるアンモニア酸化細菌の優占種の遷移について検討した。

C/N=0：人工基質による運転開始時にはG-1のシングルセルのみであったことより、下水中に存在するアンモニア酸化細菌はG-1に属する種が優占種であると予想される。時間の経過に伴いG-1グループが徐々に成長し、約1週間後には直径10~15 μm のクラスターが検出されたのに対し、G-2グループは10 μm 程度のクラスターが若干見られる程度であった。12日目には、アンモニア性窒素濃度は5mg/l以下にまで減少し、亜硝酸性窒素濃度が40mg/l以上になった。G-1は全体としては減少したのに対し、G-2はマイクロ及びクラスター(20 μm 程度)の増加が顕著であった。17日目においては、G-1は局所的に存在するものの全体的には非常に少なく、G-2のシングルセル・クラスターの密度が更に増加した。23日目以降では、亜硝酸濃度の低下に伴いG-1グループが再び増加に転じた。G-2は全体的にクラスター径は10 μm 程度とG-1よりも小さかったが、マイクロ及びクラスター数はG-1よりも多く、その密度も水質が完全な硝化型に移行した後まで増加続け、アンモニア酸化細菌の優占種となった。

C/N=1: C/N=0の系と同様に0日目においてはG-1グループのシングルセルしか検出されなかった。馴養2週間目まではアンモニア酸化活性の向上に従って、膜底層においてG-1グループが徐々に増加したが、G-2グループは殆ど検出されなかった。しかしながら、亜硝酸性窒素の蓄積に伴い、20日目ではG-1グループの減少、G-2グループの増加が確認され、膜表層・中層に存在する糸状性細菌の層内にG-1と同程度のG-2グループのクラスター(10~15 μm 程度)が検出された。膜底層部ではG-2グループのクラスター(10 μm 程度)の増加が顕著であり、G-2グループが優占種となった。その後、G-2グループにはさほど変化が見られなかったが、再びG-1の増殖が顕著となり全層にわたってマイクロクラスター及びクラスター共に非常に高密度で分布し、明らかにアンモニア酸化細菌の優占種はG-1であった。水質が完全な硝化型に移行した後はこの細菌相に変化は無く安定していた。

二つの系で共通している点は、亜硝酸性窒素の蓄積に伴いG-1の増殖は抑制され、それを補うようにG-2の増殖が活発となり、亜硝酸性窒素濃度の低下に伴いG-1の増殖が再び活発となったことが挙げられる。この理由として、アンモニア酸化細菌の中でもG-1はG-2よりも亜硝酸に対する耐性が低いためであると考えられる。また、全体的に糸状性細菌の層にはアンモニア酸化細菌は分布していないことが多く、局所的に糸状性細菌の層にみられるアンモニア酸化細菌はほとんどがG-1でありG-2は検出されなかった。このことから、G-2に分類されるアンモニア酸化細菌は糸状性細菌によってなんらかの阻害を受けるのではないかと推察される。一般的に、*Nitrosomonas* 属から構成されるG-2グループの増殖速度はG-1グループ (*Nitrospira* 属等)より比較的速いため、C/N=0の生物膜内では優占種となったが、酢酸が存在するC/N=1の系では糸状性細菌との基質をめぐる競合、酢酸による阻害等によってG-2は優占種になることができなかったのではないかと考えられる。いずれの系においても、運転期間中の水質の変化に対応してアンモニア酸化細菌の菌相が変化し、その結果としてアンモニア性窒素の酸化が進行した。

4. 結論

Bulk 水中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の減少、アンモニア酸化細菌の検出面積の増加、クラスター形成の速さはC/N比に大きく影響されており、従属栄養性細菌の増殖が制限されるC/N=0の系において、アンモニア酸化細菌の増殖は促進された。生物膜内には異なる生理特性を持つ様々なアンモニア酸化細菌が混在しており、生息環境の変化(水質の変化)に対応して菌相も入れ替わり、結果として生物膜のアンモニア酸化は安定的に維持されていた。アンモニア酸化細菌の多様性が硝化効率の安定性に関与していることが示唆された。

5. 参考文献 1) Amann, R. I. (1995) *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.3.6 : 1-15. 2) Mobarry, B., et al. (1996) *Applied Environmental Microbiology* 62: 2156-2162. 3) Pommerening-Roser, A., et al. (1996) *Systematic Applied Microbiology* 1: 344-351.