微小電極および FISH 法を用いた都市下水生物膜内のアンモニア酸化機構の検討

佐 藤 久* 岡 部 聡* 渡 辺 義 公*

Ammonium Oxidation in Mixed-population Biofilms Determined with the Use of Microelectrodes and *in situ* Hybridization

Hisashi SATOH*, Satoshi OKABE* and Yoshimasa WATANABE*

* Department of Urban and Environmental Engineering Hokkaido University, North 13, West 8, Kita-ku, Sapporo 060-0813 Japan

Abstract

Ammonium oxidation in wastewater biofilms grown on rotating biological contactors (RBCs) was investigated by using microelectrodes and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique. The density of ammonia-oxidizers which formed dense cell cluster was about 5 times higher in the innermost biofilm than in the middle and surface of the biofilm. Due to the presence of ammonia-oxidizers throughout the biofilm, ammonium oxidation zone was expanded with increasing in oxygen penetration depth, which consequently resulted in an increase of the overall ammonium flux into the biofilm. Specific ammonium oxidation rate was dependent upon the density of ammonia-oxidizers. Although more ammonia-oxidizers were detected in the innermost layer, they might be in the dormant state and not contribute ammonium oxidation during the RBC operation because of substrate transport limitation. Furthermore, the fraction of O₂ consumption for nitrification to total O₂ consumption was in the range of 35%–53% in a medium with ammonium as the sole electron donor, indicating the biofilm consumed a significant amount of oxygen for other than nitrification. It implied that heterotrophs would grow and outcompete nitrifiers in biofilms even though there was no organic carbon source in the medium. In conclusion, the combination of microelectrode measurements and FISH technique made it possible to relate the spatial organization of ammonia-oxidizers with their *in situ* ammonium oxidation rates in biofilms, which obviously providing more insight into the nitrification process in wastewater biofilm systems.

Key words: mixed-population biofilms, ammonium oxidation, ammonia oxidizers, microelectrodes, FISH technique

1. はじめに

硝化反応は廃水処理において重要なプロセスであるが、スタートアップに長期間を要する、処理の安定性に欠ける等の解決すべき問題を含んでいる。これらの問題の主な原因として、硝化細菌はそのほとんどが独立栄養性細菌であり、増殖速度および菌体収率が極めて小さいうえ、pH、水温、有機物負荷等の影響を受け易い点が挙げられる。

特に都市下水のように有機物を含む廃水処理において、硝化細菌は溶存酸素 (DO) をめぐる他栄養性細菌との競合に敗れ、生物膜表層は他栄養性細菌が優占種となり、硝化細菌は主に底層部に存在するという層状化した菌体分布を示すと考えられる¹⁾。この場合、表層部の他栄

養性細菌層は主に底層部に存在する硝化細菌に対し、DO およびアンモニア性窒素 (NH₄⁺) の輸送抵抗として働くため、硝化効率は低下すると考えられる¹⁾。このことは、生物膜内の硝化活性が溶解性基質濃度分布と硝化細菌の生態学的構造 (菌体の存在形態、集塊の菌体密度等) およびその空間的分布の相互作用により決定されることを示唆している。従って、両者の関係を生物膜内 *in situ* で把握し生物膜内の硝化機構を解明することは、より安定した効率の高い硝化プロセスを確立するために重要である。

僅か数 mm の生物膜内の溶存基質濃度分布の測定には高い分解能が要求されるため、本研究では先端径が数 μm の各種微小電極²⁻⁵⁾を用いた。また、特定の細菌群の生態学的構造解析には従来の培養に基づく手法 (MPN

* 北海道大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 〒060-0813 札幌市北区北13条西8丁目

法及び平板希釈法等)では不十分であるため、16S rRNA 標的蛍光 DNA プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法^{3,6)}を用いた。これらの手法はその空間的分解能および特異性から、生物膜内の硝化機構を把握するために非常に強力な手段であり、生物膜への応用例が報告されつつある²⁻⁶⁾。

例えば Schramm ら³⁾は、微小電極と FISH 法を養鰻廃水 (高 NH_4^+ 負荷) を対象とした散水汙床生物膜に適用し、アンモニア酸化細菌は膜表層に密に集塊の層を形成して存在しており、硝化活性も膜表層約 $100\mu\text{m}$ に限られていたと報告している。また、de Beer ら⁴⁾は、流動床リアクターを用いて無機炭素と NH_4^+ を主体とする人工基質で馴養した微生物集塊内の硝化機構を微小電極を用いて検討し、硝化活性は膜表層僅か $100\mu\text{m}$ 程度に限られていたと報告している。しかしながら、この研究では微生物集塊内の硝化細菌分布は測定されていない。両者の研究は、ともに有機物負荷が非常に低く NH_4^+ 負荷が高い硝化細菌の増殖に適した条件で 3~4 ヶ月間以上馴養された生物膜であるため、膜表層に硝化細菌が高密度に存在する層状化構造を呈し、硝化活性も表層部のみ検出されたと思われる。しかし、都市下水処理のように NH_4^+ および有機物負荷が比較的低い系では、前述したように生物膜内の硝化細菌および硝化活性分布は異なるものと考えられる。

そこで本研究では、都市下水処理を目的とする生物膜に関し、微小電極を用いて求めた NH_4^+ 酸化活性分布と FISH 法から求めたアンモニア酸化細菌菌体分布との関係を検討した。さらに、DO 侵入深さが NH_4^+ 酸化活性分布に与える影響を検討した。

2. 実験装置および実験方法

2.1 リアクターと生物膜の馴養条件

生物膜は、ベンチスケールの半水没型回転円板装置 (RBC) (反応槽容積 = 1400ml , 円板回転速度 = 14r.p.m. , $\text{HRT} = 6\text{h}$) を用いて、札幌市創成川下水処理場の最初沈殿池流出水を流入基質として馴養した。定期的に流入水および流出水水質を測定し、硝化反応が硝酸型に移行した後、円板に挿入したスライド¹⁾ ($1\text{cm} \times 6\text{cm}$) に付着した生物膜を形状を崩さぬよう採取し、以下の実験に供した。

2.2 微小電極の製作

生物膜内の DO および NH_4^+ 濃度分布を測定するために本実験室において DO および NH_4^+ 微小電極を製作した。DO 微小電極は Revsbech and Jorgensen⁷⁾の方法に準拠して製作した。先端直径は $10\mu\text{m}$ 程度、90%応答時間は 2~3s であった。キャリブレーションには、DO 濃度が一定である測定用培地中および生物膜内の嫌気部分での検出値を用いた。測定用培地中の DO 濃度は DO メーター (YSI DISSOLVED OXYGEN METER MODEL 58) により定量した。

NH_4^+ 微小電極は deBeer ら⁸⁾の方法を参考にし製作した。ガラス管 (株式会社内盛栄堂, リングキャップス) をコイルで熱しながらマイクロピペットテンション (島津, MPT-1) で引き、先端直径を約 $5\mu\text{m}$ に調整した。毛管力にて先端にシラン溶液を満たした後、 110°C のオーブンで15分間シラン処理した。シリンジにて後部から内部

Table 1 The medium composition used concentration profile measurements by microelectrodes.

Components	Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
NH_4Cl	170-400
Na_2HPO_4	570
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	84
CaCl_2	200
EDTA	270

Adjusted to pH 7

液を注入した後にイオン交換液膜 (LIX) を吸引した。LIX には *o*-nitrophenyl octyl ether (株式会社同仁化学研究所) に 10% (w/v) ammonium-selective ligand (Fluka) および 1% (w/v) sodium tetraphenylborate (株式会社同仁化学研究所) を混合したものを用いた。キャリブレーションには、 NH_4^+ 濃度を $10\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ~ $1000\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ の範囲内で 5 段階に調整した測定用基質を用いた ($r^2 \geq 0.99$)。 NH_4^+ 微小電極の測定限界値は約 $50\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 90%応答時間は 30sec. 程度であった。 NH_4^+ 濃度はイオンクロマトグラフ (DIONEX QIC analyzer, カラム: IonPac CS3) により定量した。

2.3 生物膜内基質濃度分布の測定

採取した生物膜を測定用培地 (Table 1) を満たしたフローセル (容積: 約 1800ml) 内に固定した。膜面流速を変化させる場合には、容積約 150ml のフローセルに連続的に測定用培地を流入し、膜面流速は流量から算出した。生物膜内基質濃度分布は微小電極を $50\mu\text{m}$ ピッチで生物膜内に貫入することにより測定した⁵⁾。いずれの場合も測定は DO および NH_4^+ 各々について生物膜内の異なる 3 地点で繰り返し行い、得られた 3 地点の基質濃度分布を膜表面を膜深さ方向の基準点として平均し、これを基質濃度分布とした。

測定した 3 種類の基質濃度分布が (正味の) 基質消費活性及び濃度拡散のみによって決定されると仮定することで、生物膜単位体積当たりの基質消費活性度 (R , [$\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$]) および活性を有する領域の深さ (L_a , [μm]) を、Fick の第 1 法則に基づいて基質消費速度 (J , [$\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]) を算出した^{6,9)}。ここで、 20°C における酸素及び NH_4^+ の拡散係数はそれぞれ $2.09 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $1.38 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ とした¹⁰⁾。また、濃度拡散層厚さ (Z_0 , [μm]) は測定用培地中および膜表面の DO 濃度の差を濃度勾配で除することにより算出した¹¹⁾。

2.4 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法

微小電極による基質濃度分布の測定後、生物膜を直ちに 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定 (4°C , 12-24 時間), 洗浄, OCT-compound (Tissue-Tek) で包埋後、 -20°C で凍結した。凍結した生物膜ブロックをクライオミクロトーム (Cryocut 1800, Leica) を用いて、支持体に対して垂直に厚さ $20 \sim 40\mu\text{m}$ 毎にセクションングを行い、得られた切片をスライドガラスに貼り付けた。この切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*in situ* ハイブリダイゼーションに用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、フルオレスセインイソチオシアネート (FITC) で修飾した真正細菌に特異的な

Table 2 Average influent and effluent water qualities during an experimental period.

	Average concentrations ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	
	Influent	effluent
NH_4^+	1070(± 490)	50(± 40)
NO_2^-	0	30(± 40)
NO_3^-	70(± 40)	1600(± 430)
DOC	1260(± 280)	740(± 110)
DO		150(± 30)
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)		16.8(± 2.0)
pH		6.8(± 0.3)
$\text{J}(\text{NH}_4^+)$	0.13 [$\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]	
$\text{J}(\text{DOC})$	0.07 [$\mu\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]	

Values within parentheses indicate standard deviations

EUB338¹²⁾と、イソチオシアン酸テトラメチルローダミン (TRITC) で修飾したプロテオバクテリア綱-ベータ亜綱に属するアンモニア酸化細菌に特異的な Nso190¹³⁾である。in situ ハイブリダイゼーションの手順は Schramm ら³⁾および Amann¹⁴⁾の方法に準拠した。ハイブリダイゼーションした生物膜試料は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510, 488nm (Ar ion レーザー) と 543nm (HeNe レーザー) : フィルターセット No. 9 と 15 を装備) を用いて観察した。得られた投影画像よりアンモニア酸化細菌の集塊面積を画像解析を用いて求めた。

3. 結果と考察

3.1 リアクターの水質概要

Table 2 に実験期間中の流入水および流出水の平均水質を示す。測定用培地中の DO 濃度は約 $150\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、生物膜は好気条件で馴養されていた。流入水中に含まれた無機態窒素はほとんどが NH_4^+ で、平均濃度は約 $1070\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。運転初期には NO_2^- の蓄積が見られたが、10日目以降には流入した NH_4^+ の90%以上が NO_3^- まで酸化され、処理水質は定常に達した。水質が定常に達した後のリアクターの平均流入水および流出水水質から求めた生物膜表面積当たりの NH_4^+ 酸化速度 ($\text{J}(\text{NH}_4^+)$) は平均で約 $0.13\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。また、約 $1260\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ で流入した溶解性有機炭素 (DOC) は約 $740\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ に減少し、10日目以降の DOC 消費速度は約 $0.07\mu\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。

3.2 FISH 法によるアンモニア酸化細菌の検出

Fig. 1 に、定常生物膜の膜表面から $500\mu\text{m}$ の領域 (Fig. 1. a から Fig. 1. c) および膜表面から $1200\mu\text{m}$ ~ $1700\mu\text{m}$ の領域 (Fig. 1. d から Fig. 1. f) の垂直断面図を示す。生物膜は空隙とバイオマスとから構成される多孔体 (平均空隙率は約76%から約84%) であった。都市下水生物膜のため、EUB338プローブで染色された糸状細菌やアンモニア酸化細菌以外の集塊も確認され、多種多様の微生物相から構成されていることがうかがえる (Fig. 1. a および Fig. 1. d)。アンモニア酸化細菌 (Fig. 1. b および Fig. 1. e) は、主に直径 $5\sim 20\mu\text{m}$ の密な球状の集塊を形成し、膜表面から $500\mu\text{m}$ の領域に比べ膜表

面から $1200\mu\text{m}\sim 1700\mu\text{m}$ の領域により多く存在していた。アンモニア酸化細菌の生物膜内分布をより定量的に評価するため、画像解析により全バイオマス面積 (DIC 画像, Fig. 1. c および Fig. 1. f) に対するプローブ Nso190により検出されたアンモニア酸化細菌の集塊面積の比率を求めた。アンモニア酸化細菌の検出面積は膜表面から $1200\mu\text{m}\sim 1700\mu\text{m}$ の領域で約 $7200\mu\text{m}^2$ 、面積比率は14%であり、他の層の値 ($1000\sim 1700\mu\text{m}^2$, 面積比率 2~4%) と比較して非常に高かった。同様の菌体分布は採取したすべての生物膜試料について認められた。これは、アンモニア酸化細菌は他栄養性細菌と DO を競合するうえ、比増殖速度および菌体収率が小さく、せん断力による硝化細菌の集塊の剥離が激しい膜表層部では菌体量を維持できず、膜深層に集積したためと考えられる。

3.3 生物膜内の NH_4^+ 酸化活性

3.3.1 膜表層 (膜表面から約 $500\mu\text{m}$ の領域) の NH_4^+ 酸化速度

アンモニア酸化細菌菌体密度分布と NH_4^+ 酸化活性分布を関連づけるために、微小電極を用いて生物膜深さ方向の DO および NH_4^+ 濃度分布を測定し、この濃度分布曲線より各基質消費速度 (R) および活性領域 (La) を求めた (Fig. 2, 膜厚は $2,300\mu\text{m}$ 程度)。測定に用いた培地 (Table 1) は NH_4^+ および無機塩類で構成されており有機物は含まれていない (C : N = 0)。測定用培地中に約 $200\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 存在した DO は膜深さ方向に減少し、膜表面から約 $430\mu\text{m}$ の地点で枯渇した。また、測定用培地中に約 $170\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 存在した NH_4^+ は、膜表面から約 $450\mu\text{m}$ の地点では約 $100\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ にまで減少したが、これ以深では DO の枯渇のため濃度の減少は見られなかった。以上の結果より、アンモニア酸化細菌は膜表層に比べ膜深層により高密度に存在するものの、 NH_4^+ 酸化活性は膜表層のみに生じることが明らかとなった。この場合の NH_4^+ 酸化速度は $\text{R}(\text{NH}_4^+) = 1.9\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, $\text{J}(\text{NH}_4^+) = 0.07\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。

また、DO および NH_4^+ 濃度分布は生物膜内の3点をランダムに選び測定したものであるが、膜表面を基準にした場合、各濃度分布の形状は非常に類似していた。従って、本研究の測定条件 (生物膜の構造、膜面流速および微小電極の測定間隔等) においては、生物膜内の3地点の基質濃度分布を平均したものをその生物膜の代表的な基質濃度分布とみなすことが可能であると考えられる。

3.3.2 NH_4^+ 酸化活性に対する DO 濃度および NH_4^+ 濃度の影響

前節で活性が得られなかった膜中層および膜深層 (膜表面から約 $500\mu\text{m}$ 以深の領域) の NH_4^+ 酸化活性を求めするため、測定用培地表面に純酸素を吹き付けることで培地中の DO 濃度を約 $600\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ に調整し、DO および NH_4^+ 濃度分布を再度測定した (Fig. 3, 膜厚は $1400\mu\text{m}$ 程度)。この結果、DO 侵入深さは Fig. 2 の約2倍の約 $1000\mu\text{m}$ に増大し、膜中層 (膜表面から約 $500\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ の領域) にも NH_4^+ 酸化活性が生じたことから、Fig. 2 の条件では DO 侵入深さが $\text{J}(\text{NH}_4^+)$ を律速していたことが明らかとなった。しかしながら、依然として膜表面から約 $1000\mu\text{m}$ 以深は嫌氣的であり NH_4^+ 酸化活性は検出できなかった。

この場合、 $\text{R}(\text{NH}_4^+)$ は膜表面から約 $250\mu\text{m}$ の領域で

Fig. 1 *In situ* hybridization of vertical biofilm sections (scale bar, 100 μ m). (a) Hybridization with a FITC-labelled EUB338 probe, (b) Hybridization with a TRITC-labelled Nso190 probe and (c) DIC image in the upper layer of a biofilm (100 μ m~550 μ m from surface) and Hybridization with a FITC-labelled EUB338 probe, (e) Hybridization with a TRITC-labelled Nso190 probe and (f) DIC image in the bottom layer of a biofilm (1200 μ m~1650 μ m from surface).

Fig. 6 *In situ* hybridization of the vertical basefilm section (scale bar, 200 μ m). (a) Hybridization with a FITC-labelled EUB338 probe. (b) Hybridization with a TRITC-labelled Nso190 probe. (c) DIC image.

Fig. 8 Photograph of the vertical biofilm section after measurement of Figure 7, showing the biofilm interior structure.

Fig. 2 The average concentration profiles of DO and NH_4^+ in a biofilm incubated in synthetic medium without organic substrates. Open and filled boxes indicate specific O_2 respiration rate and NH_4^+ oxidation rate, respectively. Values are means of triplicate measurements and error bars represent their standard deviations.

Fig. 3 The average concentration profiles of DO and NH_4^+ in a biofilm incubated in oxygen-saturated medium with $250 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ of NH_4^+ . Open and filled boxes indicate specific O_2 respiration rate and NH_4^+ oxidation rate, respectively. Values are means of triplicate measurements and error bars represent their standard deviations.

は $1.7 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ であったのに対し、約 $250 \mu\text{m}$ から約 $950 \mu\text{m}$ の領域では $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ と明らかに低かった。この理由として、膜中層においては NH_4^+ 酸化速度が NH_4^+ 濃度により律速されていることが考えられたため、測定用培地中の NH_4^+ 濃度を約 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (DO は約 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) に調整した後、膜深さ方向の DO および NH_4^+ 濃度分布を測定した (Fig. 4, 膜厚は $1200 \mu\text{m}$ 程度)。その結果、 $R(\text{NH}_4^+)$ は $2.8 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ 程

Fig. 4 The average concentration profiles of DO and NH_4^+ in a biofilm incubated in oxygen-saturated medium with $400 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ of NH_4^+ . Open and filled boxes indicate specific O_2 respiration rate and NH_4^+ oxidation rate, respectively. Values are means of triplicate measurements and error bars represent their standard deviations.

Fig. 5 The average concentration profiles of DO and NH_4^+ in a basefilm incubated in synthetic medium without organic substrates. The surface biofilm (about $1000 \mu\text{m}$) was cut off by using the Microslicer. Open and filled boxes indicate specific O_2 respiration rate and NH_4^+ oxidation rate, respectively. Values are means of triplicate measurements and error bars represent their standard deviations.

度で膜深さ方向に一様となった。Fig. 3と比較すると、膜表面から約 $250 \mu\text{m}$ ~ $950 \mu\text{m}$ の領域の DO 濃度は約 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ~ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ とほぼ同じレベルであり、 NH_4^+ 濃度は約 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上と2倍以上高かった。従って、Fig. 3の条件においては、膜中層における NH_4^+ 酸化速度 ($R(\text{NH}_4^+)$) が NH_4^+ 濃度により律速されていたこと

Table 3 A summary of reaction zones (La), specific consumption rates (R), fluxes (J) and $J(\text{DO})_N/J(\text{DO})$.

Measuring condition	La (μm)		R ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)		J ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)		$J(\text{DO})_N/J(\text{DO})$
	DO	NH_4^+	DO	NH_4^+	DO	NH_4^+	
Fig.2 Air saturated	430(± 130)	420(± 140)	8.4(± 5.1)	1.9(± 1.6)	0.35(± 0.12)	0.07(± 0.008)	0.35
Fig.3 O_2 saturated ($\text{NH}_4^+=250\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1000(± 70)	950(± 50)	5.5(± 0.6)	1.7(± 0.7) ^{a)} 0.7(± 0.2) ^{b)}	0.79(± 0.12)	0.16(± 0.05)	0.36
Fig.4 O_2 saturated ($\text{NH}_4^+=400\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	990(± 110)	970(± 60)	8.2(± 2.9)	2.8(± 1.2)	0.61(± 0.14)	0.13(± 0.05)	0.39
Fig.5 Air saturated ^{c)}	250 ^{d)}	250 ^{d)}	17.6(± 1.5)	4.3(± 0.09)	0.44(± 0.04)	0.13(± 0.002)	0.53
Fig.9 Air saturated (Acetate= $350\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	400(± 90)	350(± 130)	9.7(± 4.2)	2.3(± 1.5)	0.46(± 0.20)	0.05(± 0.02)	0.21
Average reactor performance				2.6		0.13	

Values within parentheses indicate standard deviations of triplicate measurements.

a) ; A region of $0\mu\text{m}\sim 250\mu\text{m}$ from the surface.

b) ; A region of $250\mu\text{m}\sim 950\mu\text{m}$ from the surface.

c) ; The surface layer of biofilm (about $1000\mu\text{m}$) was cut off by Microslicer.

d) ; Concentration profiles were measured by only $250\mu\text{m}$ from the surface.

が明らかとなった。この結果は、アンモニア酸化細菌 (*Nitrosomonas europaea*) の酸素に対する半飽和定数 (基質消費速度が最大基質消費速度の $1/2$ になる基質濃度) が約 $15\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, NH_4^+ に対する半飽和定数が約 $70\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ¹⁵⁾ であることと一致する。

3.3.3 膜深層 (膜表面から約 $1000\mu\text{m}$ 以深の領域) の NH_4^+ 酸化速度

測定用培地中の DO 濃度を約 $600\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ に調整した場合においても膜深層は依然として嫌氣的であり、膜深層の NH_4^+ 酸化活性は測定できなかった。そこで、膜深層への基質輸送抵抗となっている膜表層を削除し膜深層へ基質を供給することで膜深層の NH_4^+ 酸化速度を定量することを試みた。実験に供した生物膜は膜厚約 $1300\mu\text{m}$ であり、マイクロスライサー^{TM1)}を用いて膜表層の約 $1000\mu\text{m}$ を削除し、残った約 $300\mu\text{m}$ の膜深層について同様の測定を行った (Fig. 5)。DO は削除面 (生物膜と液相の境界面) から約 $250\mu\text{m}$ の地点においても約 $40\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 存在し、膜底部まで完全に侵入した結果、 NH_4^+ 酸化活性は膜深層全体に生じ、 $R(\text{NH}_4^+)$ は膜表層 (Fig. 2 から Fig. 4) よりも高い約 $4.3\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ に達した。

基質濃度分布測定後、FISH 法により膜表層を削除した後の生物膜深層部の垂直断面についてアンモニア酸化細菌の検出を行った (Fig. 6)。Fig. 6 から明らかなように、Fig. 1 と同様に膜深層において、アンモニア酸化細菌は高密度 (検出面積は約 $4200\mu\text{m}^2$, 面積比率は約 15%) に存在した。以上の結果から、アンモニア酸化細菌菌体密度が高い領域ではより高い $R(\text{NH}_4^+)$ が得られることが確認された。生物膜内の NH_4^+ 酸化速度を容易に比較できるよう、Fig. 2 から Fig. 5, および Fig. 9 における DO 消費および NH_4^+ 酸化領域の深さ (La), 生物膜単位体積当たりの基質消費速度 (R), 生物膜単位面積当たりの消費速度 (J) および $J(\text{DO})_N/J(\text{DO})$ の平均値 ($n=3$) をまとめて Table 3 に示した (Fig. 9 および $J(\text{DO})_N/J$

(DO) の算出方法は以降に記述した)。

通常無酸素状態であったと考えられる膜深層に、リボゾーム RNA を標的とした FISH 法によりアンモニア酸化細菌が検出された理由として、(1)馴養初期には好氣的であった層が他栄養性細菌等の増殖により埋没し嫌気化した後も、休眠および飢餓状態でその場に留まっていた¹⁶⁾, (2) RBC リアクター運転時の生物膜近傍の水理学的条件はフローセル内に比較して非常に複雑であるため、膜深層に微小電極による測定では確認できなかった局所的な好気部分が存在していた、等が考えられる。また、これらのアンモニア酸化細菌が好気条件下で 3 時間程度馴養した後に活性を生じたことより、一時的に負荷が高くなった時、または膜表層の剝離が生じた時等、基質供給がなされれば直ちに活性を取り戻すことが示唆された。このことは、生物膜リアクターが負荷変動に対して比較的安定した処理能力を発揮することを裏付けていると思われる。

3.4 RBC リアクターの NH_4^+ 酸化活性

以上の結果から、RBC リアクター内の生物膜の NH_4^+ 酸化活性を検討した。前節で明らかとなったように、一般的な都市下水 (Table 2) では NH_4^+ 酸化反応は NH_4^+ 濃度よりも DO 濃度により律速され、 NH_4^+ 酸化活性領域は DO 侵入深さによって決定される。DO 侵入深さは膜面流速が高いほど増大するので¹⁷⁾, まず膜面流速が DO 侵入深さに与える影響を検討した。膜面流速が約 $4, 11$ および $15\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ の場合の DO 濃度分布を Fig. 7 に (膜厚は $1000\mu\text{m}$ 程度), Fig. 2 および Fig. 7 の DO 濃度分布から算出した La (DO), 濃度拡散層厚さ (Z_δ), 膜表面 DO 濃度 (Cs), $R(\text{DO})$ および $J(\text{DO})$ を Table 4 にまとめて示す。膜面流速を約 $2\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ から約 $15\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ に増大させた場合にも、La (DO) の増加はわずか $100\mu\text{m}$ 程度であった。膜面流速の増大に伴い、 Z_δ は $1/2$ 程度にまで減少し Cs は増加し、この結果 $J(\text{DO})$ は約 1.6

倍に増大した。

de Beer ら¹⁸⁾が間隙を介して輸送される DO が全 DO 消費量の約50%を占めたことを報告しているように、DO の生物膜内への輸送は生物膜表面の形状および内部構造に大きく影響される。そこで、微小電極による測定後、この生物膜をクライオミクロトームにより支持体と垂直方向にスライスし生物膜の構造を観察した (Fig. 8)。膜表面は比較的凹凸が少なく、流れを乱す要因となるストリマー(streamer)¹⁹⁾はほとんど見られず、内部は格子状構造を呈していた。このために、本研究で用いた生物膜では生物膜深部への溶存基質の輸送は表面流速の増大によりさほど増加しなかったと考えられる。以上の結果から、通常の RBC 運転時 (円板回転速度: 14r.p.m.) における円板最外端 (円板直径: 19cm) の周速は約 $14\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ であり、膜面流速が $15\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ 程度であると仮定しても、Table 4 から DO 侵入深さは膜表面から $500\mu\text{m}$ 程度であると推測される。

次に、測定用培地には有機物が含まれておらず、流入都市下水には C: N=1.2程度 (モル比) で有機物が存在するので、有機物濃度が DO 侵入深さに与える影響も検討した。測定用培地に有機物 (酢酸ナトリウム: 約 $350\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) を添加した場合 (Fig. 9, 膜厚は $900\mu\text{m}$ 程度)、DO 侵入深さは Fig. 2 と同程度の約 $400\mu\text{m}$ であっ

Fig. 7 The average concentration profiles of DO in a biofilm incubated in synthetic medium without organic substrates at flow velocities of $4\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, $11\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, and $15\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, respectively. Values are means of triplicate measurements.

Table 4 A summary of reaction zones (La), diffusion boundary layers (Z_δ), DO concentrations at the biofilm surface (Cs), specific consumption rates (R) and fluxes (J) at various flow velocities of $2\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, $4\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, $11\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ and $15\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, respectively.

Average flow velocity ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	La (μm)	Z_δ (μm)	Cs ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	R ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	J ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)
2 (Fig.2)	430(±130)	270(±60)	120(±14)	8.4(±5.1)	0.35(±0.12)
4	450(±100)	250(±40)	146(±23)	8.9(±1.3)	0.40(±0.17)
11	500(±50)	200(±20)	133(±29)	7.9(±1.9)	0.49(±0.06)
15	530(±130)	130(±50)	160(±19)	10.0(±2.2)	0.58(±0.24)

Values within parentheses indicate standard deviations of triplicate measurements.

たことから、有機物が DO 侵入深さに与える影響は小さいことがわかった (Table 3)。

さらに、RBC リアクター運転時では生物膜が気相および液相を交互に通過するため膜表面の流れはフローセル内のように単純ではなく常に乱れている。また、生物膜が直接気相に接するため付着水膜の DO 濃度はより高くなるものの、Fig. 3 および Fig. 4 ほどの DO 侵入深さの増大は期待できない。従って、本研究の RBC リアクター運転時においては、膜深層は DO が枯渇しており硝化反応に貢献していないものと考えられる。ここで、DO 侵入深さを $500\mu\text{m}$ と仮定すると、リアクターの平均流入水および流出水水質から求めた $J(\text{NH}_4^+)$ が $0.13\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であるので、生物膜単位体積当たりの NH_4^+ 酸化速度 ($J(\text{NH}_4^+)/\text{La}(\text{NH}_4^+)$) は約 $2.6\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ となる。この値が Fig. 9 の $R(\text{NH}_4^+)$ と同程度であることから、 NH_4^+ 酸化反応が膜表層のみで生ずると仮定した場合でも、十分に実測されたリアクター全体の硝化活性が得られることが示された。

3.5 生物膜の DO 消費活性

ここで、生物膜の DO 消費活性を定量的に評価するため、 $J(\text{NH}_4^+)$ から NH_4^+ 酸化反応による DO 消費量 (以降 $J(\text{DO})_N$ と記す)、および全 DO 消費量 ($J(\text{DO})$) に対する NH_4^+ 酸化反応による DO 消費量の比 (以降 $J(\text{DO})_N/J(\text{DO})$ と記す) を求めた。 $J(\text{NH}_4^+)$ は Nso190 プローブで染色されたアンモニア酸化細菌およびこれ以外のアンモニア酸化細菌により酸化された NH_4^+ 、さらには窒素源として消費された NH_4^+ の総量であるが、本研究の実験結果のみからはこれらの内訳を明確にすることはできない。そこで、窒素源として消費された NH_4^+ は微量であり、 NH_4^+ は NO_2^- を経て完全に NO_3^- まで酸化されると仮定し、 $J(\text{DO})_N$ は以下の化学量論式(1)⁴⁾より $J(\text{NH}_4^+)$ の 1.83 倍 (モル比) とした。

Fig. 2 から Fig. 5 の $J(\text{DO})_N/J(\text{DO})$ が 0.35 から 0.53 であったことから、 NH_4^+ のみを電子供与体とした場合でも硝化反応以外の反応によって多量の DO が消費されることが明らかとなった (Table 3)。そこで、 NH_4^+ 酸化活性を特異的に阻害するアリルチオ尿素(ATU)⁶⁾を用いて生物膜の NH_4^+ 酸化活性を阻害し、生物膜の DO 消費活性を測定した (Fig. 10, 膜厚は $800\mu\text{m}$ 程度)。まず、測定用培地内において DO および NH_4^+ 酸化速度を算出したところ、それぞれ $J(\text{DO}) = 0.46\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$,

Fig. 9 The average concentration profiles of DO and NH_4^+ in a biofilm incubated in synthetic medium with $260 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of NH_4^+ and $350 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of acetate. Values are means of triplicate measurements and error bars represent their standard deviations.

Fig. 10 The average concentration profiles of DO (□) and NH_4^+ (○) in a biofilm incubated in synthetic medium with ATU and DO (■) and NH_4^+ (●) without ATU. Values are means of triplicate measurements and error bars represent their standard deviations.

$J(\text{NH}_4^+) = 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であり、 $J(\text{DO})_{\text{N}}$ は $0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ と算出された (Table 5)。次に、この生物膜を ATU 濃度を $15 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に調整した測定用基培地内に移し約 1 時間後に $J(\text{DO})$ (以降 $J(\text{DO})_{\text{ATU}}$ と記述する)を測定した。この場合、 NH_4^+ 酸化活性が完全に阻害されたにもかかわらず、硝化反応以外の反応によって $0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ にも達する DO が消費された。この結果から硝化反応によって消費された DO 量 ($J(\text{DO}) - J(\text{DO})_{\text{ATU}}$)を求めたところ、ATU 無添加時の $J(\text{DO})_{\text{N}}$ と同程度の $0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であったことから、減少した NH_4^+ は全て NO_3^- まで酸化されたという仮定は妥当であったと思われる。

硝化細菌に有利な条件で馴養した生物膜は硝化細菌菌体密度が非常に高かったため、全 DO 消費量は硝化反応により消費された DO 量とほぼ一致していた⁴⁾。これに対し、本研究の生物膜内にはアンモニア酸化細菌は 2%~15%程度しか存在しなかったために、 NH_4^+ を唯一の電子供与体とする基質を用いた場合においても硝化反応以外の反応によって、全体の 60%以上の DO が消費された。この理由として、(1)微生物の菌体内に蓄積していた貯蔵物質を利用した内生呼吸、(2)試料採取後、測定時まで生物膜内に残存した有機物、生物膜を構成する細胞外高分子、さらには微生物の自己分解により細胞外に放出された有機物 (多糖類、タンパク質、核酸等)等を利用した酸素呼吸²⁰⁾、(3)硝化細菌の代謝産物および菌体由来の有機物を利用した酸素呼吸¹⁵⁾、(4)さらに、生物膜内に存在する還元性硫黄化合物等の生物学的および化学的な酸化²¹⁾、等が考えられる。以上の結果は、例え NH_4^+ のみを電子供与体とした基質で馴養した生物膜内にも硝化細菌以外の細菌が増殖し、硝化細菌と DO をめぐり競合する可能性を示唆している¹⁾。

4. 結 論

本研究では、微小電極を用いて都市下水生物膜内の DO および NH_4^+ 濃度を測定し、得られた濃度分布から基質消費速度を算出した。これに並行して、アンモニア酸化細菌に特異的な蛍光遺伝子プローブを用いた FISH 法により、*in situ*における膜深さ方向のアンモニア酸化細菌の分布形態を解析し、 NH_4^+ 酸化活性分布との関係を検討した。得られた結果より具体的に以下のような結論を導くことができる。

1) 本研究で検討した都市下水生物膜内において、アンモニア酸化細菌菌体密度は膜表層よりも通常無酸素状態であると考えられる膜深層において高かった。しかしながら、 NH_4^+ 酸化活性は通常の RBC リアクター運転

Table 5 Comparison of fluxes (J), $J(\text{DO})_{\text{N}}$ and $J(\text{DO}) - J(\text{DO})_{\text{ATU}}$ in a medium with or without ATU.

Measuring condition	$J (\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$		$J(\text{DO})_{\text{N}} (\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$J(\text{DO}) - J_{\text{ATU}}(\text{DO}) (\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$
	DO	NH_4^+		
Without ATU	$0.46(\pm 0.09)$	$0.06(\pm 0.02)$	0.11	—
With ATU	$0.31(\pm 0.04)$	—	—	0.15

Values within parentheses indicate standard deviations of triplicate measurements.

時には、膜表層約500 μ mに限られており、深層部に存在するアンモニア酸化細菌は NH_4^+ 酸化に貢献していないと思われる。

2) 生物膜内のDO侵入深さを増大させた結果、通常無酸素状態である膜中層および膜深層にも NH_4^+ 酸化活性が生じ、 NH_4^+ 酸化速度は増大した。さらに、アンモニア酸化細菌菌体密度が高い膜深層ではより高いR(NH_4^+)が得られた。

3) NH_4^+ のみを電子供与体とした場合にも約60%のDOが硝化反応以外の反応によって消費されたことから、有機物が負荷されない生物膜内でも硝化細菌以外の細菌と硝化細菌がDOを競合する可能性が示唆された。

謝 辞

実験データの採取には、本学大学院工学研究科の修了生乗松直生子君の協力を得た。また、微小電極の製作にあたり長岡技術科学大学環境システム工学科の大橋晶良助教授に貴重な意見を賜ったことをここに記し、感謝致します。本研究の一部は文部省科学研究費補助金(課題番号08750661)および科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業(CREST)の「環境低負荷型の社会システム」プロジェクトの援助を受けて行われた。ここに記して謝意を表します。

(原稿受付 1998年4月30日)

(原稿受理 1998年10月7日)

参 考 文 献

- 1) Okabe, S., Hirata, K., Ozawa, Y. and Watanabe, Y. (1996) Spatial microbial distribution of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 24-35.
- 2) 原田秀樹, 大橋晶良, 珠坪一晃, 菊池香枝, 山崎慎一, (1997) 微小電極を用いた生物膜中の栄養塩・有機物濃度の測定手法の開発, 用水と廃水, **39** (8), 701-708.
- 3) Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R. and Schleifer, K. H. (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridization and use of microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(12), 4641-4647.
- 4) de Beer, D., van den Heuvel, J. C. and Ottengraf, S. P. P. (1993) Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (2), 573-579.
- 5) 佐藤久, 岡部聡, 伊藤司, 渡辺義公, (1998) 微小電極を用いた微好気性生物膜内の硫酸塩還元反応の検討, 水環境学会誌, **21**, 367-375.
- 6) 岡部聡, 境一澄, 渡辺義公, (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, **21**, 88-97.
- 7) Revsbech, N. P. and Jorgensen, B. B. (1986) Microelectrodes: Their use in microbial ecology, *Adv. Microb. Ecol.*, **9**, 293-352.
- 8) de Beer, D. and van den Heuvel, J. C. (1988) Gradients in immobilized biological systems, *Anal. Chim. Acta*, **213**, 259-265.
- 9) Larsen, T. A. and Harremoës, P. (1994) Combined reactor and microelectrode measurements in laboratory grown biofilms, *Wat. Res.*, **28** (6), 1435-1441.
- 10) Perry, J. H. (1963) Chemical engineers' handbook, Fourth edition, McGraw Hill, New York.
- 11) Jorgensen, B. B. and Revsbech, N. P. (1985) Diffusive boundary layers and the oxygen uptake of sediments and detritus, *Limnol. Oceanogr.*, **30** (1), 111-122.
- 12) Amann, R. I., Krumholz, L. and Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology, *J. Bacteriol.*, **172**, 762-770.
- 13) Mobarry, B., Wagner, M. and Stahl, D. A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2156-2162.
- 14) Amann, R. I. (1995) *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual*, **3.3.6**, 1-15.
- 15) Furumai, H. and Rittmann, B. E. (1992) Advanced modeling of mixed populations of heterotrophs and nitrifiers considering the formation and exchange of soluble microbial products, *Wat. Sci. Tech.*, **26** (3-4), 493-502.
- 16) Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. P. and Schleifer, K. H. (1995) *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, **18**, 251-264.
- 17) de Beer, D. and Stoodley, P. (1995) Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena, *Wat. Sci. Tech.*, **32** (8), 11-18.
- 18) de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. and Lewandowski, Z. (1993) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1131-1138.
- 19) Lewandowski, Z. and Stoodley, P. (1995) Flow induced vibrations, drag force, and pressure drop in conduits covered with biofilm, *Wat. Sci. Tech.*, **32** (8), 19-26.
- 20) Namkung, E. and Rittmann, B. E. (1986) Soluble microbial products (SMP) formation kinetics by biofilms, *Wat. Res.*, **20** (6), 795-806.
- 21) Okabe, S., Matsuda, T., Satoh, H., Itoh, T. and Watanabe, Y. (1998) Sulfate reduction and sulfide oxidation in aerobic mixed population biofilms, *Wat. Sci. Tech.*, **37** (4-5), 131-138.