FISH 法を適用した包括固定化担体内での アンモニア酸化細菌の動態解析

荒 木 信 夫* 矢 澤 賢一郎** 原 田 秀 樹***

Quantitative Monitoring of Ammonia Oxidizing Bacteria in PVA-immobilized Pellets by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH)

Nobuo ARAKI*, Kenichiro YAZAWA** and Hideki HARADA***

* Department of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology, 888 Nishi-Katakai, Nagaoka 940-8532 Japan

** Sanki Engineering Co., Ltd., Environmental System Administration Division, 1742-7 Shimotsuruma, Yamato 242-0001 Japan

*** Department of Environmental System Engineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka 940-2188 Japan

Abstract

Dynamic behavior of *Nitrosomonas* cells immobilized in PVA gel pellets was investigated by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of oligonucleotide probes. Two laboratory-scale reactors were seeded with PVA-immobilized *Nitrosomonas* cells, and then operated for 160 days by feeding with either a synthetic wastewater containing ammonium solely or a synthetic wastewater composed of ammonium and organic source (acetate). The nitrogen loading on the first reactor (organic-free) was varied from 0.2 up to 0.6 kgN·m⁻³·d⁻¹ by stepwise reducing hydraulic retention time, while the second reactor was operated by varying the C/N ratio of the feed from 0 to 0.8.

The first reactor (organic-free) achieved 99% of ammonia removal at 300 mg-N·l⁻¹·d⁻¹, and ammonia-oxidation activity per unit pellet volume remained unchanged above 4.5 mg-N·m⁻¹·d⁻¹ throughout 160 days operation. On the other hand, a severe deterioration in ammonia oxidation was observed in the second reactor (organic-fed) when the feed C/N ratio was increased to 0.8. For the both reactors, the presence ratio of *Nitrosomonas* cells to DAPI-stained total cells decreased to below 2% within the initial 90 days operation, regardless of the presence of organic source in the feed.

Nitrosomonas cells were present only up to 50 μm-depth of the pellets in the form of large cell clusters. The cluster-forming growth of *Nitrosomonas* tended to break the lattice-structure of PVA gel material, causing the disappearance of these bacteria from the pellets.

Key words: ammonia oxidizing bacteria, *Nitrosomonas*, PVA pellets, immobilized cells, fluorescent *in-situ* hybridization

1. はじめに

下排水処理における窒素化合物の除去は大きな課題であり、嫌気-好気法や生物膜法等の生物学的な硝化脱窒法が開発されている。しかし、いずれのプロセスにおいてもアンモニアを酸化するいわゆる硝化反応がその律速段階となっている。この問題を解決するために、増殖速度の小さい硝化細菌を高分子ゲルに包括固定したり¹⁻³⁾、ゲル表面に結合固定した担体を適用し⁴⁾高効率に硝化反応

を進行させるプロセスが考案されている。このような固定化微生物担体を用いたプロセスでは固定化した微生物が長期間担体内に留まり、その活性を保持しながら処理に貢献するかがプロセスの鍵となる。

硝化細菌の検出や菌数評価には MPN 法や抗原抗体法が用いられてきた。しかし、MPN 法では測定に長時間を要することや計測効率が極めて小さいことが報告されている⁵⁻⁷⁾。また、抗原抗体法では硝化細菌が比較的大きな血清多様性を有していることから、活性汚泥のような

* 長岡工業高等専門学校環境都市工学科 〒940-8532 長岡市西片貝町888

** 三機工業(株)環境システム事業部企画開発部開発課 〒242-0001 大和市下鶴間1742-7

*** 長岡技術科学大学工学部環境システム工学系 〒940-2188 長岡市上富岡町1603-1

複合微生物系に適用する場合は多くの労力を要すること^{8,9)}やフロックや生物膜のような細胞外ポリマーを含む試料に適用する場合はこれらの物質に非特異的に吸着し、微生物の検出を妨害するとされている⁹⁾。蛍光遺伝子プローブの FISH (fluorescent *in-situ* hybridization) 法は、微生物の培養を伴わずに検出が可能であることや検出の目的に応じて科、属、種レベルといった任意の系統学的な範囲で微生物の検出が可能であることから注目を集めている¹⁰⁾。特に硝化細菌は検出や菌数計測が困難であり、FISH 法の適用が進んでいる^{7,11~13)}。

これまで高分子担体に固定化した硝化細菌の消長は、もっぱら担体から回収した微生物試料の MPN 値や比活性試験から評価されてきた。また、担体内部の様相は走査電子顕微鏡による観察が行われてきたが、この方法では硝化細菌を特定することはできなかった。本研究は Polyvinyl alcohol (以後 PVA と略す) ゲルに硝化細菌 *Nitrosomonas* を包括固定した担体を用いて人工排水の連続処理実験を行い、担体内の硝化細菌 *Nitrosomonas* の菌数の推移や担体内での空間分布の変化を硝化細菌を特異的に検出する FISH 法を適用して評価したものである。

2. 実験装置と方法

2.1 固定化担体

PVA 固定化担体は、アンモニアを主成分とする無機培地を用いて新たにスクリーニングしたアンモニア酸化細菌を担体容積あたり 10^5 – 10^6 cell·mL⁻¹ となるように PVA モノマーに混入し、凍結融解法でゲル化したものである¹⁴⁾。その後、一辺が 5 mm の立方体に切断した。このアンモニア酸化細菌の形態は、Bergey's Manual¹⁵⁾ に記された *Nitrosomonas* 属に類似しており、また、後述する *Nitrosomonas* 属に特異的な合成 DNA プローブ Nsm156¹⁶⁾ や Nmn657¹⁷⁾ によって検出されることから *Nitrosomonas* 属に分類されるものと判断される。

2.2 実験装置と運転条件

Fig. 1 に実験に用いたリアクターの概要を示す。リアクターは幅 16cm、高さ 60cm、奥行き 5 cm のアクリル製で容積は約 3.2 l である。リアクターには実容積換算で 6 % の PVA 担体を投入し、エアレーション (約 2.0 l·min⁻¹) によって浮遊循環状態に保った。リアクターは 20

Fig. 1 Schematics of experimental set-up.

Table 1 Composition of the synthetic wastewaters.

Composition	g·100L ⁻¹
NH ₄ Cl	15.28
NaHPO ₄ ·12H ₂ O	2.31
NaCl	1.01
KCl	0.47
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.47
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.67
NaHCO ₃	93.72
Fe-EDTA	0.03
CH ₃ COONa·3H ₂ O*	0-18.13

* added to only ammonia plus acetate containing wastewater

Table 2 Reactor operational conditions

NH ₄ Feeding Reactor C/N=0: constant	NH ₄ + HAc Feeding Reactor 200mg-N·L ⁻¹ ·d ⁻¹ :constant
Run 1 200mg-N·L ⁻¹ ·d ⁻¹	Run 1' C/N=0
Run 2 300mg-N·L ⁻¹ ·d ⁻¹	Run 2' C/N=0.4
Run 3 400mg-N·L ⁻¹ ·d ⁻¹	Run 3' C/N=0.8
Run 4 600mg-N·L ⁻¹ ·d ⁻¹	Run 4' C/N=0
	Run 5' C/N=0.8

°C に制御した恒温室内に設置した。実験は 2 系列の装置を用意し、アンモニアを主成分とした無機性人工排水と無機性人工排水に炭素源として酢酸ナトリウムを添加した有機性人工排水を供給した (それぞれを無機系リアクター、有機系リアクターと呼ぶ)。各人工排水の組成を Table 1 に示す。

Table 2 にリアクターの運転条件を示す。無機系リアクターでは、窒素容積負荷を 200~600mg-N·l⁻¹·d⁻¹ まで段階的に上昇させ、それぞれ Run 1~4 として運転を行った。有機系リアクターでは有機炭素源の添加量の調整により人工排水の C/N 比を 0~0.8 まで段階的に変化させ、それぞれ Run 1'~5' として運転を行った。

2.3 全菌数計測

リアクター内の細菌数の計測は担体 1 個 (0.125cm³) の内部、担体 1 個の表面 (1.5cm²) に形成した生物膜および浮遊汚泥 (1 ml) 中に含まれる DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色細胞数 (硝化細菌も含まれる) を落射蛍光顕微鏡を用いて直接菌数計測法により評価した。生物膜を構成する菌数は、担体数個をリアクターから取りだし、PBS (Phosphate Buffered Saline) 緩衝液中で生物膜をヘラと超音波 (Branson Sonifier250, Output Control=1, 1 min) によって剥離し、10ml に懸濁させて超音波によって再分散 (9 min) したものを原試料とした。担体内部の菌数は、生物膜を剥離した担体を PBS 緩衝液中でメスを用いて細分化し、超音波を照射する (10min) ことによって回収した細胞懸濁液の計測菌数とした。リアクターの浮遊汚泥試料と細胞懸濁液は、10倍希釈法を用いて希釈し、適当な希釈試料の既知量 (1~5 ml) 中の細胞をフィルター (Millipore, Polycarbonate Nucleopore Membrane, 0.2 μm, 13mmφ) に集菌し、DAPI 染色を行った (6.25mg-DAPI·l⁻¹, 1 M NaCl, 0.1M Tris, pH7.2, 5 min)。

Table 3 Oligonucleotide probes and hybridization conditions applied in this study.

Probe	Specificity	Probe sequence(5'-3')	Target Site	Hyb.Temp.°C	% F A
Nsm156	<i>Nitrosomonas</i> spp.	TATTAGCACATCTTTTCGAT	653-670	42	10
Nso190	Ammonia-oxidizing β -Subclass <i>Proteobacteria</i>	CGATCCCCCTGCTTTTCTCC	190-208	46	20
NIT3	<i>Nitrobacter</i> spp.	CCTGTGCTCCATGCTCCG	1035-1048	46	0
Ntb1169	<i>Nitrobacter</i> spp.	TTGCTTCCCATTGTACC	1169-1186	42	10

染色細胞は落射蛍光顕微鏡 (Olympus BX60-FLA) と Olympus フィルターセット WU を用いて観察した。直接菌数計測法では任意の10視野以上において細胞数を計測し、その平均細胞数から試料内の細胞数 (cells $\cdot$ ml $^{-1}$ -微生物試料) を評価した。

2.4 FISH 法

硝化細菌の FISH 法による検出には *Nitrosomonas* 属を検出する Nsm156 プローブ¹⁶⁾、*Proteobacteria* の β -subclass に属する独立栄養性アンモニア酸化細菌を検出する Nso190 プローブ¹⁶⁾および *Nitrobacter* 属を検出する NIT3 プローブ¹³⁾と Ntb1169 プローブ⁷⁾の4種の合成オリゴヌクレオチド DNA プローブを用いた。すべてのプローブの5'末端には Tetramethylrhodamine-isothiocyanate を蛍光標識として付加した。FISH 法に供する試料はまずパラホルムアルデヒド溶液 (4% Paraformaldehyde, PBS Buffer, pH7.2, 4°C, 24h) で固定した。FISH 法は Amann らの方法¹⁷⁾に準拠して行った。分散試料を集菌したフィルターに Hybridization Buffer 300 μ l (0.9M NaCl, 20mM Tris, pH7.2, 0.01% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), different amount of Formamide) をスポットし、さらに 5 μ l (250ng のプローブを含む) のプローブ溶液を加えて2時間ハイブリダイズした。各プローブのハイブリダイゼーション条件を Table 3 に示す。また、未付着プローブの洗浄は Hybridization Buffer を用いてハイブリダイゼーション温度より 2°C 高い条件で20分間行った。

2.5 固定化担体内の硝化細菌の空間分布の観察

パラホルムアルデヒドで固定した PVA 担体の一部をメスを用いて切り出し、80°C に溶解させたパラフィン (Paraplast, Sherwood Medical) に浸して固定した。氷冷後マイクロトームを用いて 1~2 μ m の厚さの切片を作成した。割段した切片はゼラチンコートしたスライドガラスに移し、パラフィンを除去した後、脱水、空気乾燥させたものを FISH 法に供した。ハイブリダイゼーションは、Hybridization Buffer 16 μ l (0.9M NaCl, 20mM Tris pH7.2, 0.01% SDS, 25% Block Ace (雪印乳業), different amount of Formamide) に 2 μ l (100ng のプローブを含む) のプローブ溶液を加えてハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション条件は2.4と同じである。

2.6 比活性試験

固定化担体のアンモニア酸化比活性はバッチ試験から評価した。100ml の容器に担体10ml (実容積) を投入し、アンモニア性窒素濃度が40mg $\cdot$ l $^{-1}$ となるように培地 (連続実験の無機性人工排水と同一組成) を添加し、エアレーションにより浮遊状態に保った。エアレーション開始後10分を初期値として1時間ごとにアンモニア性窒素の濃

度を測定し、3~5時間での平均アンモニア酸化速度から比活性を評価した。比活性試験は20°Cで行った。また、比活性試験時の溶存酸素濃度は 5 mg $\cdot$ l $^{-1}$ 以上であった。

2.7 分析方法

アンモニア性窒素の測定は HACK 比色法 (DR/2000, ネスラー法) およびインドフェノール法を用いて測定した。亜硝酸性窒素および硝酸性窒素は HACK 比色法 (DR/2000, NO $_2^-$ -N:ジアゾ化法 AccuVac アンプル, NO $_3^-$ -N:カドミウム還元法 AccuVac アンプル) およびイオンクロマトグラフィー (Shimadzu HIC-6A, Shim-pack IC-A1) を用いて測定した。有機系リアクターの有機物濃度は COD $_{cr}$ 濃度として評価した。

3. 実験結果および考察

3.1 リアクターの処理性能について

Fig. 2 に無機系リアクターと有機系リアクターの運転結果を示す。本実験では担体内にアンモニア酸化細菌だけを包括固定化したため、両系ともに Run1 ではアンモニアは亜硝酸で酸化が停止し、処理水中に蓄積している。しかし、約30日の運転で完全に硝酸にまで酸化が進行するようになった。無機系リアクターでは Run2 (300 mg $\cdot$ N $\cdot$ l $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$) の負荷においてアンモニア酸化率が99%と硝化反応は良好に進み、アンモニアは全て硝酸にまで酸化された。Run4 (600mg $\cdot$ N $\cdot$ l $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$) ではアンモニア、亜硝酸の蓄積が始まり、アンモニア酸化率は58%にまで減少した。一方、有機系リアクターでは人工排水の C/N 比を0.4 (Run2') に上昇させると当初アンモニアの蓄積が認められたが、その後アンモニア酸化率は93%に回復した。しかし、この条件で運転を継続するとアンモニア酸化率は徐々に減少し80%程度に低下した。Run3' (C/N 比=0.8) においてもアンモニア酸化率は徐々に低下する傾向を示し、44%にまで減少した。Run4' では担体の活性改善を目的に基質の C/N 比を 0 に戻して運転を行ったところ、アンモニア酸化率は最大74%まで回復したが、Run5' (C/N 比=0.8) では再び酸化率は43%まで急激に低下した。本実験におけるリアクターの設定条件では、無機性基質の供給ではアンモニア負荷が400mg $\cdot$ N $\cdot$ l $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 以上、または基質の C/N 比が0.8以上になると処理性能は維持できなくなることが分かった。また運転30日目以降から亜硝酸がほぼ硝酸に転換されており、亜硝酸酸化細菌は植種しなくてもリアクター内に発生するものであった。

無機系リアクターでは実験期間を通じて窒素の物質収支は各 Run の平均値で96~101%と100%に近い値を示したものの、有機系リアクターでは Run2', Run3' において窒素回収率は平均で85.3%と88.6%であった。硝化反応を行うリアクターでの窒素回収率の低下はリアクター

Fig. 2 Time courses of the influent ammonia, COD and the effluent ammonia, nitrite, and COD; (a): the organic-free reactor, (b): the nitrate organic-fed reactor.

内の無酸素域で発生する脱窒素反応、亜硝酸による無酸素アンモニア酸化反応¹⁸⁾および微生物細胞への固定が考えられる。本研究では硝酸が蓄積した有機系リアクターで窒素回収率が大きく低下していることから、リアクター内の嫌気域において有機物を電子供与体とした脱窒素反応が進行していたものと考えられる。

3.2 固定化担体のアンモニア酸化比活性試験について

Fig. 3に固定化担体のアンモニア酸化比活性試験の結果を示す。無機系リアクターでは負荷を上昇させたRun2で急激な比活性の上昇がみられた。しかし、その後Run3, 4と負荷上昇を行っても比活性はほとんど上昇することはなかった。運転139日目(Run4)に本実験における最大値である $5.2 \text{ mg-N} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ を示した。角野ら¹⁹⁾はポリエチレングリコール(以後PEGと略す)で包括固定化した硝化細菌担体(3 mm-cube)を高濃度のアンモニアを含むガススクラバ排水の処理に適用した結果、固定化担体のアンモニア酸化比活性は20°C換算で $3.6 \text{ mg-N} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ であったと報告している。また、Matsumuraら⁴⁾は多孔性のセルロース担体(1 mm-particle)に硝化細菌を固定したところ、25°Cにおいて $12 \text{ mg-N} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ を得ている。3.4で後述するが、固定化担体の比活性は比表面積の影響を大きく受ける。したがって、固定化担体の活性を評価するには担体の体積よりも表面

Fig. 3 Changes in ammonia oxidation activity per unit pellet volume.

積あたりの活性が重要である。本実験で用いた担体(5 mm-cube)と角野ら(3 mm-cube), Matsumuraら(1 mm-particle)の担体の比表面積は5.4, 20, 30 cm²·cm⁻³となり、担体の体積あたりの比活性の値を担体の比表面積で除すとそれぞれ0.96, 0.18, 0.4 mg-N·cm⁻²·d⁻¹となる。本実験の無機系リアクターで得られた担体の表面積

あたりの比活性は角野らや Matsumura らが得た値よりも数倍大きいものであった。

有機系リアクターでは運転56日目 (C/N 比=0.4) に本実験期間における比活性の最大値 $3.5\text{mg-N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ を示すが, C/N 比の上昇に反比例して比活性は下降し, 運転111日目 (C/N 比=0.8) には最小値の $1.1\text{mg-N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ に低下した。また C/N 比を 0 に戻した人工排水を供給することにより, 125日目以降は比活性の上昇が認められたが, 再び C/N 比を 0.8 に戻すと比活性はもとのレベルまで短期間のうちに低下した。

3.3 リアクター内の計測菌数について

Fig. 4 は担体 1 個の内部, 表面およびリアクター浮遊汚泥 1 ml に存在する DAPI 染色細胞と担体 1 個の内部の Nsm156 プローブで検出された *Nitrosomonas* の計測菌数の経日変化を示したものである。生物膜および浮遊

Fig. 4 Changes in cell countings by DAPI-staining and by Nsm 156 probe present at three different locations of PVA pellet; inside pellet (per a single pellet), pellet-coating biofilm (per a single pellet), and the bulk liquid (per ml).

汚泥内の硝化細菌の菌数計測も行ったが, いずれの系においても DAPI 染色細胞に対する硝化細菌の存在割合が極めて小さく, 菌数を計測することはできなかった。無機系リアクターでは, 実験期間を通じて担体 1 個内に $10^6\text{cells}\cdot\text{pellet}^{-1}$ レベルの *Nitrosomonas* が保持されていた。運転90日目以降の *Nitrosomonas* の平均菌数は $4.1\times 10^6\text{cells}\cdot\text{pellet}^{-1}$ であり, 担体単位容積あたりでは $3.2\times 10^7\text{cells}\cdot\text{m}^{-1}$ であった。*Nitrosomonas* 以外の DAPI 染色細胞は担体表面の生物膜や浮遊汚泥内だけでなく, 担体内部においても増殖し, 運転の経過とともにその菌数は増加する傾向にあった。これらの細胞は活性の低下したアンモニア酸化細菌の他に亜硝酸酸化細菌や硝化細菌の有機性代謝産物を資化する従属栄養細菌^{20,21)}と考えられる。一方, 有機系リアクターでは, Run3' において急激に担体内部の *Nitrosomonas* は減少し, DAPI 染色細胞が急増した。運転120日目以降は低希釈率の試料に FISH を適用しても菌数計測ができるほどの *Nitrosomonas* が顕微鏡視野に得られなくなった。無機系リアクターでは担体のアンモニア酸化比活性はわずかに上昇する傾向にある (Fig. 3) が, 菌数計測値はやや低下している。また, 有機系リアクターでは比活性の低下に比較して計測菌数の減少が著しい。これは FISH 法で検出した細胞の直接菌数計測法では精度の高い計測が困難であることを示している。特に, 全細胞数に対する検出目的細菌の存在割合が 1% 以下に低下するとその傾向は著しい。

角野ら¹⁹⁾は固定化担体内の硝化細菌数を担体の断面の SEM 観察結果から推算し, $1.67\times 10^{11}\text{cells}\cdot\text{m}^{-1}$ としている。また, Matsumura ら⁴⁾は多孔性のセルロース担体内には $3.14\sim 4.27\times 10^9\text{cells}\cdot\text{m}^{-1}$ のアンモニア酸化細菌が存在していたことを MPN 法から評価している。固定化担体内の細胞数の評価は担体からの菌体の回収方法によって大きく変化する。担体内部の微生物細胞を FISH に供することのできる状態のまま PVA ゲルを溶解させることは困難であり, 担体を切断した後に超音波を照射して回収する方法を採用した。しかし, この方法

Fig. 5 Time courses of the presence ratio of *Nitrosomonas* cells to DAPI-stained cells in PVA gel pellets.

では、回収率を高め、回収時の誤差を小さくするようにできる限り細かく分割しても細胞回収後の PVA 分割片には DAPI 染色細胞が残存していた。そこで、本実験で採用した担体内の細胞の回収方法では *Nitrosomonas* 以外の DAPI 染色菌と *Nitrosomonas* の回収率に違いはないと考え、担体内の DAPI 染色細胞に対する *Nitrosomonas* の割合を算出した。その結果を Fig. 5 に

示す。両リアクターにおける担体内部の *Nitrosomonas* の割合は運転開始当初から急激に減少し、運転90日目にはいずれも2%以下にまで低下した。これは担体内の *Nitrosomonas* が減少したことよりも、むしろ *Nitrosomonas* 以外の細菌が担体内に増殖したことのほうが大きく影響している (Fig. 4)。また、この *Nitrosomonas* の割合が減少する速度は両リアクターで

Fig. 6 In situ identification of *Nitrosomonas* cells in PVA gel pellets; *Nitrosomonas* detected by the probe Nsm 156, and DAPI-stained cells exhibit red and blue colors, respectively.

(a), (c), and (e): sections of pellets taken from the organic-free reactor on the day 30, 90 and 120, respectively. (b), (d), and (f): sections of pellets taken from the organic-fed reactor on the day 30, 90 and 120, respectively. Dotted lines indicate the surface boundary of the pellet.

ほぼ同等であった。これは、有機系リアクターにおいても酢酸を資化する従属栄養菌が担体に浸入することよりも、硝化細菌の代謝物を資化する従属栄養菌や亜硝酸酸化細菌が担体内部で増殖したものと判断できる。

担体内に固定化した *Nitrosomonas* 属以外のアンモニア酸化細菌の増殖の有無を検証するために独立栄養性アンモニア酸化細菌の大部分の属を検出する Nso190 プローブを無機系リアクターの運転145日目に採取した試料に適用した。Nso190 で検出される担体内のアンモニア酸化細菌数は $3.2 \pm 2.9 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{pellet}^{-1}$ であり、プローブ Nsm156 を用いた菌数計測値 $4.1 \pm 2.5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{pellet}^{-1}$ とほぼ同レベルの結果であった。したがって、無機系リアクターには *Nitrosomonas* 属以外のアンモニア酸化細菌は増殖しなかったものと判断できる。亜硝酸酸化細菌の検出については、NIT3 プローブと Ntb1169 プローブ (運転145日目の試料に適用) を用いたが、両リアクターともにこの2種のプローブを用いて検出される細胞はほとんど存在しなかった。これは、本実験系では *Nitrobacter* 属以外の亜硝酸酸化細菌が系内に優先していたことを示唆している。

3.4 担体内の硝化細菌の空間分布について

Fig. 6 は運転30日、90日および120日目における無機系リアクターと有機系リアクターの固定化担体表面近傍の切片に FISH 法を適用した観察結果である。実験開始時の担体内には固定化した *Nitrosomonas* だけがほぼ一様に分散して存在していた (データ非表示)。無機系リアクターの Run1, C/N 比が 0 の有機系リアクターの Run1' では約30日の運転によって *Nitrosomonas* が細胞同士の融合したクラスターを形成し、担体表面から約50 μm の深さの表層に密集して存在するようになった。大型化したクラスターは PVA の高分子格子構造を解裂し、クラスターの一部は担体外に張り出すように増殖している様子が観察できる (Fig. 6(a), (b))。Wagner ら¹¹⁾ や Schramm ら²²⁾ も排水処理装置内の *Nitrosomonas* や *Nitrospira* はクラスターを形成して増殖することを報告している。また、約30日の運転で担体中央部からはすべての DAPI 染色細胞が消失していた (データ非表示)。運転を継続すると担体の表層には *Nitrosomonas* のクラスターの数次第に少なくなり、*Nitrosomonas* 以外の DAPI 染色細胞が増加している (Fig. 6(c), (d))。これはクラスターが浮遊汚泥内に流亡することによって表面近傍から順に *Nitrosomonas* が減少し、代わりにクラスターの抜け出た空間に DAPI 染色細胞が増殖したものと考えられる。運転120日目ではすでに固定化担体の表面の一部に *Nitrosomonas* のクラスターがわずかに存在しているに過ぎない (Fig. 6(e), (f))。

無機系リアクターでは担体内の *Nitrosomonas* の割合が2%以下になった以後も担体の比活性は低下することはない (Fig. 3)。これは、担体内部に留まった *Nitrosomonas* に十分な酸素とアンモニアが供給され、担体から抜け出す細胞量に匹敵する細胞が担体内で生産されたことを示している。無機系リアクターでは担体内に増殖した従属栄養細菌の基質がわずかに分泌する代謝物や死滅細胞の成分だけであり、酸素消費も小さいものと考えられる。したがって、担体内の従属栄養細菌は硝化細菌の増殖に必要な酸素の供給を妨害しなかったと推

測できる。一方、有機系リアクターでは担体内の *Nitrosomonas* の減少と担体の比活性の低下が連動して発生した。これは、硝化細菌の代謝物によって増殖した担体内の従属栄養細菌に浮遊汚泥内の細菌だけでは分解しきれなくなった酢酸が供給されるようになり、酢酸分解菌の増殖とともに大量の酸素が消費されたことが原因と考えられる。これは本実験では有機炭素源として溶解性の酢酸を用いているためであり、このような現象は下水処理などの溶解性有機成分濃度が低い場合には緩和されるものと判断される。

硝化細菌を包括固定化した担体を適用する場合、固定化した菌体は50 μm 程度の担体表層だけに存在した。これと同様な現象は角野ら¹⁹⁾が硝化細菌を固定化した PEG 担体でも観察されている。したがって、固定化担体は小さく成形し、担体の比表面積を大きくすることが、担体比活性の増大をもたらす。有機系リアクターにおいて担体の内部にわずかに存在した *Nitrosomonas* は、人工排水の C/N 比を 0 に戻した Run4' に担体の比活性を回復する役割を担った (Fig. 3)。これは固定化担体の比活性が低下しても、アンモニア酸化細菌にとって良好な環境が整えば短時間に比活性を回復する、いわば植種源の役割を果たすことを示している。

4. 結 論

Nitrosomonas を包括固定化した PVA 担体を用いてアンモニアを主成分とする無機系人工排水および酢酸を有機炭素源として添加した有機系アンモニア人工排水の処理を行い、担体内の硝化細菌の菌数と空間分布を FISH 法を用いて評価し、その挙動を追跡した。その結果、以下の結論が得られた。

1) 無機系リアクターではアンモニア負荷 $300 \text{ mg-N} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ において良好な硝化性能 (酸化率: 98.6%) を示した。160日間の連続運転後も担体のアンモニア酸化比活性は $4.5 \text{ mg-N} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ を維持した。

2) 有機系リアクターでは C/N 比を上昇すると固定化担体のアンモニア酸化比活性が $1.1 \text{ mg-N} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ にまで徐々に低下し、アンモニア負荷 $200 \text{ mg-N} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ において C/N 比が 0.4 ではアンモニア酸化率が 93% であったが、C/N 比が 0.8 に上昇すると酸化率は 43% に低下した。

3) 担体内の DAPI 染色細胞に対する *Nitrosomonas* の割合は、基質の組成に関わりなくリアクターの運転の継続に伴って減少し、運転90日後には2%以下に低下した。この現象は担体内に *Nitrosomonas* 以外の細胞が大量に増殖したことが大きく影響した。

4) 包括固定化した *Nitrosomonas* は約30日の運転によってクラスターを形成し、表面から約50 μm の担体表層だけに遍在した。運転を継続すると、大型化したクラスターは担体の高分子格子構造を解裂して担体表面から流亡した。クラスターの抜け出た空間には DAPI 染色細胞が増殖し、*Nitrosomonas* は担体の表層にわずかに存在するだけであった。

謝 辞

本研究の実験結果は当時長岡工業高等専門学校の学生であった有坂祐一君、小林淳君、榎木治君の多大な協力によって得られた。深甚なる謝意を表します。

(原稿受付 1998年11月25日)

(原稿受理 1999年 4 月 5 日)

参 考 文 献

- 1) Tramper, J. and Grootjen, D. R. J. (1986) Operating performance of *Nitrobacter agilis* immobilized in carrageenan, *Enzyme and Microbial Technology*, **8**, 477-480.
- 2) Turk, O. and Mavinic, D. (1989) Stability of nitrite build-up in an activated sludge system, *Journal of Water Pollution Control Federation*, **61**, 1440-1448.
- 3) Sumino, T., Nakamura, H., Mori, N. and Kawaguchi, Y. (1992) Immobilization of nitrifying bacteria in porous of urethane gel for removal of ammonium nitrogen from wastewater, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 556-560.
- 4) Matsumura, M., Yamamoto, T., Wang, P., Shinabe, K. and Yasuda, K. (1997) Rapid nitrification with immobilized cell using macro-porous cellulose carrier, *Water Research*, **31**, 1027-1034.
- 5) Jones, D. D., Gauthier, J. J., Martin, R. H., Wilson, Jr. L. W. and Majors, C. R. (1982) Relationship between level of nitrifying bacteria and ammonia removal in the biological treatment of coke-plant wastewater, *Proceedings of the Industrial Waste Conference*, **36**, 92-102.
- 6) Belser, L. W. (1979) Population ecology of nitrifying bacteria, *Annual Review of Microbiology*, **33**, 309-333.
- 7) Araki, N., Ohashi, A., Machdar, I. and Harada, H. (1998) Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site, *Proceedings of Microbial Ecology of Biofilm : Concepts, Tools and Applications*, Lake Bluff, Illinois, 36-43.
- 8) Ward, B. B. and Perry, M. J. (1980) Immunofluorescent assay for the marine ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas oceanus*, *Applied and Environmental Microbiology*, **39**, 913-918.
- 9) Swerinski, H., Gaiser, S. and Bardtke, D. (1985) Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria : interference of the test in biofilm reactors, *Applied and Environmental Microbiology*, **21**, 125-128.
- 10) Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. -H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, **Mar.**, 143-169.
- 11) Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. -P. and Schleifer, K. -H. (1995) In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, **18**, 251-264.
- 12) 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 the use of microelectrodes, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 4641-4647.
- 13) Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J. and Amann, R. (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, *Water Science and Technology*, **34**, 237-244.
- 14) 高井智丈, 吉松慎一, 藤本茂 (1998) 有用微生物固定化担体による高効率処理, 第 1 回水環境学会シンポジウム講演集, 103-104.
- 15) Watson, S. W (1974) Bergey's manual of determinative bacteriology (Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. Ed.), 450-471, Waverly Press, Baltimore.
- 16) Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E. and Stahl, D. A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 2156-2162.
- 17) 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, Kluwer Academic Publishers in the Netherlands.
- 18) Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R. and Zart, D. (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor, *Archives of Microbiology*, **163**, 16-20.
- 19) 角野立夫, 江森弘祥, 森直道, 川口幸男, 中村芳男, 田中和博 (1991) 固定化微生物ペレットの長期安定性と高濃度アンモニア性窒素の除去, 水質汚濁研究, **14**, 755-762.
- 20) Rittmann, B. E., Regan, J. M. and Stahl, D. A. (1994) Nitrification as a source of soluble organic substrate in biological treatment, *Water Science and Technology*, **30**, 1-8.
- 21) Holben, W. E., Noto, K., Sumino, T. and Suwa, Y. (1998) Molecular analysis of bacterial communities in a three-compartment granular activated sludge system indicates community-level control by incompatible nitrification processes, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 2528-2532.
- 22) Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M. and Amann, R. (1998) Identification and activities in situ of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3480-3485.