

学位論文題名

微小電極および FISH 法を併用した生物膜内の
反応機構と生態学的構造の解析

学位論文内容の要旨

近年、下水道の普及により河川や閉鎖性水域の水質は改善されつつある。しかしながら、現在もなお富栄養化の防止および水質の保全等は要求されており、下水の高度処理の必要性が高まっている。このような背景の下、一般的な下水処理法である活性汚泥法の欠点を補える生物膜法が注目されている。現在のところ、生物膜法の高度・効率化に向けた研究の多くは生物膜リアクターをブラックボックスとして扱い、物理化学的因子に着目した入出力操作のみを論じたケーススタディである。しかしながら、生物膜リアクターの効率に、生物膜内の複雑な反応機構および生態学的構造が影響を及ぼすことは明白である。

近年の技術的進歩に伴い、生物膜内を直接、*in situ* で解析可能となったため、生物膜内の反応機構および生態学的構造を明らかにすることにより生物膜リアクターの物質除去能力を高めようとする研究が行われている。例えば、微小電極は生物膜内の被反応物質および生成物の濃度を数マイクロメートル間隔で測定でき、FISH 法を用いることにより系統発生的に異なる微生物を特異的に検出し、*in situ* での存在形態を解析可能となった。これらの手法を生物膜に適用した研究により生物膜内の反応機構および生態学的構造が徐々に明らかにされている。現在のところこれらの手法を単独に用いた研究が多いが、これらの手法を併用することにより生物膜内をより詳細に解析できると考えられる。

そこで本論文では、微小電極および FISH 法を併用し、生物膜内の硝化反応および硫酸塩還元反応の反応機構および生態学的構造を解析することを目的とした。硝化反応は脱窒反応の前段階として重要であり、生物膜法は硝化反応に適しているものの、高度・効率化のためには未解決の問題が残されている。硫酸塩還元反応は、生物にとって有害であり水源水質を悪化させる硫化水素を発生する一方、有機物の分解により環境への負荷を低減する役割を担っている。好気性生物膜内の硫酸塩還元反応は、発生した硫化水素が生物膜内で瞬時に再酸化されてしまうため、生物膜内を解析することなしには詳細を把握できない。

本研究では始めに微小電極の開発を行った。製作および使用した微小電極は、溶存酸素(O₂)、アンモニア(NH₄⁺)、亜硝酸(NO₂⁻)、硝酸(NO₃⁻)、硫化水素(H₂S)、および pH の 6 種類である。これらの先端径は約 50 μm から約 500 μm で、生物膜構造の攪乱を最小限に抑えながら内部の基質濃度分布を定量することが可能であった。

次にこれら微小電極と FISH 法を併用し、都市下水生物膜内におけるアンモニア酸化細菌菌体密度分布および NH₄⁺酸化活性分布を検討した(3章)。定常期において、アンモニア酸化細菌は主に直径 5~20 μm の密集集塊(クラスター)を形成して、または単一細胞として存在していた。菌体密度は膜深さ方向に増大する傾向にあり、表層よりも通常無酸素状態であると考えら

れる深層において高かった。一方、 NH_4^+ 酸化活性は表層にのみ検出された。中層および深層にも O_2 を浸透させた場合、僅か数時間後にこれらの領域にも NH_4^+ 酸化活性が検出された。以上の結果から、通常は表層に存在するアンモニア酸化細菌が主に NH_4^+ 酸化反応に貢献しており、中・深層に存在するアンモニア酸化細菌は NH_4^+ 高負荷時、および生物膜剥離後等に NH_4^+ 酸化反応に貢献することが明らかとなった。4 章においては、定常期の生物膜内のアンモニア酸化細菌分布の形成メカニズムを検討した。流入基質 C/N 比の増大は特に表層におけるアンモニア酸化細菌と他栄養性細菌との O_2 をめぐる競争を激化させ、競争に敗れたアンモニア酸化細菌の活性は低下し、表層のアンモニア酸化細菌菌体密度が減少することが明らかとなった。

5 章においては、 NH_4^+ 酸化機構ならびに NO_2^- 酸化機構について検討した。 NH_4^+ 負荷および有機物負荷が異なる 3 条件で生物膜を馴養したところ、全ての生物膜内の硝化細菌に関して以下の共通点が見られた。亜硝酸酸化細菌はアンモニア酸化細菌と同様に主にクラスターを形成して、または単一細胞として存在していた。亜硝酸酸化細菌はアンモニア酸化細菌の近傍に検出された。アンモニア酸化細菌は好気領域全体に検出されたのに対し、亜硝酸酸化細菌は表面付近には少なく中層および深層に主に検出された。*Nitrospira* 属に属する亜硝酸酸化細菌が優占種であり、*Nitrobacter* 属に属する細菌は検出されなかった。また、硝化活性に関しても、 NH_4^+ 酸化活性は主に好気領域上部に、 NO_2^- 酸化活性は主に好気領域深部に検出されるといった共通点が見られた。 NH_4^+ 酸化活性と NO_2^- 酸化活性の中心間の距離が接近している生物膜ほど NH_4^+ 酸化活性が高く NO_2^- が放出されず、最も効率よく硝化反応が進行しており、活性間の距離が硝化反応の安定化に不可欠な因子であることが明らかとなった。従来のように NH_4^+ と NO_3^- のみの測定では、二段階反応である硝化反応($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)が生物膜内でどのように進行しているか知ることは困難であるが、中間生成物である NO_2^- 濃度を測定できたことにより、窒素化合物の挙動をより詳細に把握できた。

6 章では生物膜の硝化反応の開始を人為的に早めることを試み、(1)初期生物膜形成時に馴養基質に硝化細菌を投入した系(硝化細菌投入系)、(2)馴養基質に NO_2^- を添加した系(NO_2^- 添加系)、および(3)馴養基質に NH_2OH を添加した系(NH_2OH 添加系)の硝化反応の開始時期を、対照系である C/N=0 の基質で馴養した生物膜(C/N=0 系)と比較した。その結果、硝化細菌投入系においてのみ C/N=0 系よりも NH_4^+ 酸化反応および NO_2^- 酸化反応の開始が早まり、 NO_2^- 蓄積期も短縮された。この結果より、馴養初期に槽内に硝化細菌を投入することは硝化反応の開始を早めるのに有効な手段であることが明らかとなった。投入される硝化細菌は対象とする系で優占種となる硝化細菌種であることが不可欠であった。一方、 NH_2OH および NO_2^- は生物膜内の NH_4^+ 酸化反応および NO_2^- 酸化反応にむしろ悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

第 7 章では、液本体中の O_2 濃度および NO_3^- 濃度の変動が微好気性生物膜内の in situ の硫酸塩還元活性に及ぼす影響について検討した。in situ の硫酸塩還元活性は通常中層の嫌気領域において最も高く、好気的な表層では検出されなかった。さらに O_2 および NO_3^- 浸透深さが増加するのに伴い、中層においても硫酸塩還元反応は抑制され、徐々に深層に遷移すると同時に、活性は低下した。一方、硫酸塩還元活性ポテンシャルと硫酸塩還元細菌菌体密度は表層において最も高く、膜深さ方向に減少した。すなわち、硫酸塩還元活性ポテンシャルと硫酸塩還元細菌菌体密度の分布は一致したものの、これらと in situ の硫酸塩還元活性の分布は異なる場合があることがわかった。本研究は硫酸塩還元反応を in situ で解析することが不可欠であることを示している。

以上のように、本研究では微小電極および FISH 法を併用することにより、生物膜内の硝化反応および硫酸塩還元反応の反応機構および生態学的構造をある程度解明することが可能であった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 義 公
副 査 教 授 高 桑 哲 男
副 査 教 授 眞 柄 泰 基
副 査 教 授 棟 方 正 信

学 位 論 文 題 名

微小電極および FISH 法を併用した生物膜内の 反応機構と生態学的構造の解析

最も一般的な下水処理法である活性汚泥法の欠点を補うことが可能となる生物膜法が注目されている。現在のところ、生物膜法の高度化・効率化に向けた研究の多くは、生物膜リアクターをブラックボックスとして扱い、物理化学的因子に着目した入出力操作のみを論じている。しかしながら、生物膜リアクターの効率に生物膜内の極めて複雑な反応機構および生態学的構造が多大な影響を及ぼすことは明白である。分子生物学的手法の進歩に伴い、生物膜内を直接、in situ で解析することが可能となり、生物膜内の反応機構および生態学的構造を明らかにすることにより、生物膜リアクターの汚濁物除去能力を高めようとする研究が行われるようになった。例えば、微小電極は生物膜内の被反応物質および生成物の濃度を数 μm 間隔で測定でき、FISH 法 (Fluorescent In Situ Hybridization) を用いることにより系統発生的に異なる微生物を特異的に検出し、in situ での存在形態の解析が可能となった。これらの手法を生物膜に適用した研究により生物膜内の反応機構および生態学的構造が徐々に明らかにされている。現在のところこれらの手法を単独に用いた研究が多いが、両手法を併用することにより生物膜内をより詳細に解析した研究はない。

以上の背景の下に本学位論文では、微小電極と FISH 法を併用し、生物膜内の硝化反応および硫酸塩還元反応の機構と生態学的構造を解析することを目的とした。本論文は 8 章で構成される。

第 1 章は緒言であり、研究の背景と必要性について言及した。第 2 章では微小電極の開発について記述した。製作し使用した微小電極は、溶存酸素 (O_2)、アンモニア (NH_4^+)、亜硝酸 (NO_2^-)、硝酸 (NO_3^-)、硫化水素 (H_2S)、および pH の 6 種類である。これらの先端径は約 $5\ \mu\text{m}$ から $15\ \mu\text{m}$ で、生物膜構造の攪乱を最小限に抑えながら内部の基質濃度分布を定量することが可能であった。

第 3 章ではこれら微小電極と FISH 法を併用し、都市下水処理生物膜内におけるアンモニア酸化細菌の菌体密度分布および NH_4^+ 酸化活性分布を測定した。定常期において、アンモニア酸化細菌は主に直径 $5\sim 20\ \mu\text{m}$ の密な集塊 (クラスター) を形成して存在していた。菌体密度は膜深さ方向に増大する傾向にあり、表層よりも通常無酸素状態であると考えられる深層において高かった。一方、 NH_4^+ 酸化

活性は表層にのみ検出された。中層および深層にも O_2 を浸透させた場合、僅か数時間後にこれらの領域にも NH_4^+ 化活性が検出された。以上の結果から、通常は表層に存在するアンモニア酸化細菌が主に NH_4^+ 酸化反応に貢献しており、中・深層に存在するアンモニア酸化細菌は NH_4^+ 高負荷時、および生物膜剥離後等に NH_4^+ 酸化反応に貢献することが明らかとなった。

第4章では定常期の生物膜内のアンモニア酸化細菌分布の形成機構を検討した。流入基質 C/N 比の増大は特に表層におけるアンモニア酸化細菌と他栄養性細菌との O_2 をめぐる競合を激化させ、競合に敗れたアンモニア酸化細菌の活性は低下し、表層のアンモニア酸化細菌菌体密度が減少することが明らかとなった。

第5章では、 NH_4^+ と NO_2^- の酸化機構について検討した。 NH_4^+ 負荷および有機物負荷が異なる3条件で生物膜を馴養したところ、全ての生物膜内の硝化細菌に関して以下の共通点が見られた。亜硝酸酸化細菌はアンモニア酸化細菌と同様に主にクラスターとして存在していた。亜硝酸酸化細菌のクラスターはアンモニア酸化細菌に比較して小さく、アンモニア酸化細菌の近傍に検出された。アンモニア酸化細菌は好気領域全体に検出されたのに対し、亜硝酸酸化細菌は表面付近には少なく中層および深層に主に検出された。さらに、 NO_2^- 酸化反応を担う微生物の系統学的な種の特異性を試みた結果、検出された亜硝酸酸化細菌は *Nitrospira* 属に属しており、*Nitrobacter* に属する細菌は検出されなかった。また、硝化活性に関しても、 NH_4^+ 酸化活性は主に好気領域上部に、 NO_2^- 酸化活性は主に好気領域深部に検出されるといった共通点が見られた。両活性の中心間の距離が接近している生物膜ほど、硝化活性が高く NO_2^- が膜外に放出されず、両活性間の距離が硝化反応の安定化に不可欠な因子であることが明らかとなった。

第6章では生物膜の硝化反応の開始を人為的に早めることを試み、(1)初期生物膜形成時に馴養基質に硝化細菌を投入した系、(2)馴養基質に NO_2^- を添加した系、(3)馴養基質に NH_2OH を添加した系、の硝化反応の開始時期を、対照系である C/N=0 の基質で馴養した生物膜(C/N=0 系)と比較した。その結果、硝化細菌投入系においてのみ C/N=0 系よりも NH_4^+ 酸化反応および NO_2^- 酸化反応の開始が早まり、 NO_2^- 蓄積期も短縮された。この結果より、馴養初期に槽内に硝化細菌を投入することは硝化反応の開始を早めるのに有効な手段であることが明らかとなった。

第7章では、液本体中の O_2 濃度および NO_3^- 濃度の変動が微好気性生物膜内の硫酸塩還元活性に及ぼす影響について検討した。膜内の硫酸塩還元活性は通常中層の嫌気領域において最も高く、好気的な表層では検出されなかった。さらに O_2 および NO_3^- 浸透深さが増加するに伴い、表層、さらには中層において硫酸塩還元反応は抑制され、硫酸塩還元領域が徐々に深層に遷移すると同時に、硫酸塩還元活性の低下を引き起こした。一方、硫酸塩還元活性ポテンシャルと硫酸塩還元細菌菌体密度は表層において最も高く、膜深さ方向に減少した。以上のように、硫酸塩還元活性ポテンシャルと硫酸塩還元細菌菌体密度の分布はある程度一致したものの、これらと膜内の硫酸塩還元活性の分布は異なる場合があることがわかった。本研究により硫酸塩還元反応を *in situ* で解析することが不可欠であることが示された。

第8章は結論であり、研究結果のまとめと今後の当該研究分野の課題を提案した。

以上要するに、著者は微小電極と FISH 法を併用することにより、生物膜の生態学的構造と膜内の硝化反応および硫酸塩還元反応の機構を解明し、その成果を応用して生物膜リアクターの機能を向上させる方途を示すことにより、下水処理の新たな展開に向けての有用な情報を提供しており、環境工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。