

# 高度廃水処理用担体に付着する硝化細菌群の解明

Nitrifying Bacteria Adhered on Resinous Carriers Used in Advanced Sewage Treatment System



AT研究所  
(海洋バイオテクノロジー研究所出向)  
田中淳一  
Junichi  
Tanaka

## Summary

KP Pearl beads composed of photo-crosslinkable resins have been used as biomass carriers for immobilization of nitrifying bacteria in an advanced sewage treatment system. Certain nitrifying bacteria have a nature to colonize on solid carriers, and this nature is used to retain these organisms in a treatment tank that uses solid carriers. It has been reported that the nitrification activity of a biofilm on these resinous carriers is more efficient than that of the ordinary activated sludge. However, quantitative analysis on the attached bacteria has not been achieved due to difficulty in identifying species. In this study, we tried to assess contribution of the immobilized bacteria on the resinous carriers to the nitrification efficiency in a continuous nitrifying reactor by quantitative analysis. The analysis was carried out with chemical and molecular methods (denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH)).

## 要 旨

光硬化性樹脂を主成分としたKPパールは、その表面に硝化細菌を固定化する担体として高度廃水処理における窒素除去に対する適用化が進められている。硝化細菌は固形担体に付着する性質を有しており、このため処理槽内に固形担体が存在する場合にはそれらの細菌が保持されやすい。この樹脂担体においても微生物膜が形成され、通常の活性汚泥法より硝化速度が向上することが以前から報告されている。しかしながら、どのような硝化細菌がどれくらい担体に付着しているかについては明らかにされていなかった。本研究では、この樹脂担体を硝化処理槽に投入し、アンモニア態窒素負荷を徐々に上昇させる連続硝化処理実験を行った。この連続処理実験において担体に付着した硝化細菌の定量及び同定を化学的及び分子生物学的手法 (DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) and FISH (fluorescent *in situ* hybridization)) により行い、硝化処理に対する樹脂担体の効果を検証した。

## 1. 背 景

私達の生活の営みから生み出される多くの窒素化合物 (主にアンモニア、亜硝酸及び硝酸など) は地下水、河川、湖沼及び内湾などの周辺環境へ排出され、重大な環境問題を引き起こすことがある。その対策技術として活性汚泥を使った生物学的硝化・脱窒法が開発され、現在でも様々な廃水処理場で利用されている。この処理法の中で硝化工程においては、活性汚泥中に存在する硝化細菌が重要な役割を担っている。一般的にこれらの細菌は独立栄養細菌であり、増殖速度が極めて遅く<sup>(19) (29)</sup>、pH、水温などの処理条件の影響を受けやすく、従来の活性汚泥法のような硝化細菌が反応槽内で浮遊する方式では、処理槽内に硝化細菌を保持する工夫が必要となる。連続処理のように常に廃水の出入りのある状態にすると、活性汚泥中の微生物には廃水

中の栄養源を利用して増殖をするものや、水流によって処理槽から流出する微生物もある。微生物が処理槽内に維持される時間はこの二つの要因に依存しているため、可能な限り微生物の流出量を少なくすることが必要である。この微生物が維持される時間は細胞滞留時間と呼ばれているが、活性汚泥を用いた場合、汚泥滞留時間(以降、SRT)をその目安とするのが一般的である。SRTを硝化細菌の増殖速度より長くするためには、処理槽の拡大や廃水量を制限することが必要となる。しかしながら、都市部などの人口密集地では限られた敷地に処理施設を設置し、膨大な廃水を処理しなければならない状況を余儀なくされている。

以上の問題点を解決する有効な手段の一つとして処理槽内に硝化細菌を高密度に保持する担体投入型硝化・脱窒法が開発されている。この方法では硝化細菌を支持体に固定化する手法が主に採られているが、ホローファイバーのような人工膜法<sup>30)</sup>、回転体接触法<sup>4)</sup>や流動床法などで様々な形態及び材質を有したものが研究されている。

Kokufuta<sup>12)</sup>、Santos<sup>27)</sup>及びUemoto<sup>26)</sup>は硝化細菌及び脱窒細菌を同一の担体内に包括固定し、担体の外側に好気的な硝化細菌を、内側に嫌気的な脱窒細菌を生育させ、硝化・脱窒処理を同時に試みた研究を行っている。このような包括固定化法は直ちに活性化できる長所をもつ反面、固定化操作や固定化後の貯蔵条件に制約が多い<sup>1)</sup>。微生物の固定化には、担体表面に微生物が付着する性質を利用した付着固定化法もあり、本研究は樹脂を担体の主成分としている。Mishimaら<sup>16)</sup>は担体が付着したバイオフィームの硝化活性は通常の活性汚泥と比べて高いことや、処理条件の変動に対しても硝化処理が安定していることを報告している。このように担体の効果はシステムのインプット及びアウトプットの解析により実証されているが、その内部はこれまでブラックボックスとして取り扱われており、付着した硝化細菌の保持、SRTの維持に関する定量的な解析が行われていなかった。

近年、このようなバイオフィーム内における硝化細菌の多様性及び優占種を同定し、処理プロセス中での動態を微生物レベルから明らかにすることや、バイオフィーム内の*in situ*で、硝化活性分布と硝化細菌分布の関係を明らかにすることなどが試みられている。特定の微生物細胞を蛍光顕微鏡で検出可能なFISH法を用いて硝化細菌の検出を行い、バイオフィーム内での分布を見ること<sup>10) 17)</sup>や、バイオフィーム内での硝化活性の変動と硝化細菌の分布との相関についてはマイクロセンサーを用いて論じた研究<sup>6) 14) 17) 18) 20) 21)</sup>も進められている。

本報では、高度廃水処理用担体を活性汚泥に投入して連続硝化処理実験を実施した。この実験から、担体が付着した硝化細菌の同定をPCR-DEEG法により行い、またその

定量をFISH法とDAPI染色の併用により行った。樹脂担体の投入によって得られる硝化細菌の保持を定量的に評価し、担体の効果を化学的手法及び分子生物学的手法により検証した。

## 2. 実験材料及び方法

### 2.1 微生物固定化用担体

本研究では、硝化菌固定化担体としてKPパール(粒径: 4.2mm)を用いた。KPパールはポリエチレングリコールを主骨格とする光硬化性樹脂から成る含水ゲル担体で、表面に硝化菌を安定でかつ大量に付着させることができる。また、粒径や比重を調整することができ、既に実用プラントによる量産技術が確立されている<sup>1)</sup>。

### 2.2 連続硝化処理実験

人工下水(COD<sub>Cr</sub>=120~300mg/L, NH<sub>4</sub>-N=20~50 mg/L, COD<sub>Cr</sub>/NH<sub>4</sub>-N=6/1)の連続処理実験には、含水樹脂担体を20%(v/v)の割合で投入した容量5L(好気槽3L 汚泥沈降槽2L)のラボスケールリアクターを用いた。し尿処理場より採取した活性汚泥を2000mg-SS/Lとなるように投入し、アンモニア負荷0.02kg/m<sup>3</sup>/d(HRT=24h)で運転を開始した(連続処理実験中活性汚泥濃度は上記濃度一定となるように適宜汚泥の引き抜きを行った)。図1及び表1にフローシート及び人口下水組成を示した。この場合下水組成の影響をなくすために、COD<sub>Cr</sub>/NH<sub>4</sub>-N比(濃度比COD<sub>Cr</sub>/NH<sub>4</sub>-N=6/1)を一定にした。アンモニア態窒素容積負荷の上昇による影響を検討するため、各成分の濃度をアンモニア態窒素濃度と同様に増加させた。

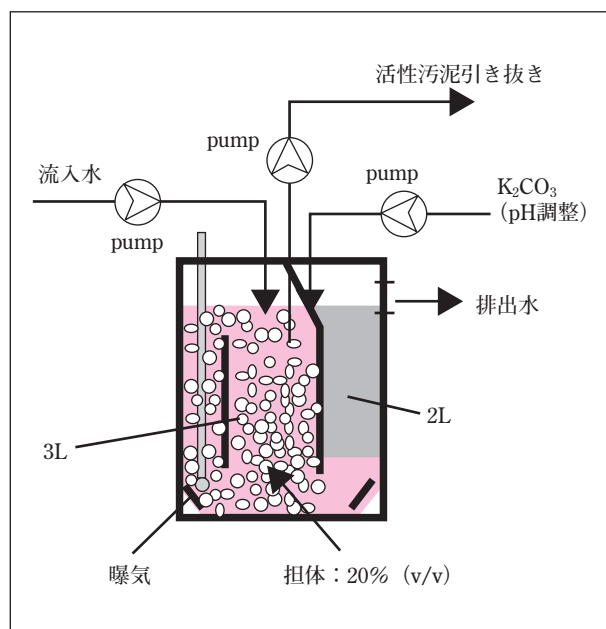


図1 連続硝化処理実験フローシート

表1 人工下水組成（水道水1L）に対する濃度

(有機物)	
ペプトン	20-50mg/L
酵母エキス	20-50mg/L
肉汁エキス	20-50mg/L
グルコース	60-150mg/L
(アンモニア塩)	
塩化アンモニウム	76.4-191mg/L
(無機塩)	
塩化カリウム	10-25mg/L
塩化ナトリウム	5-12.5mg/L
硫酸マグネシウム・7水和物	3-7.5mg/L
塩化カルシウム・2水和物	3-7.5mg/L
リン酸二水素カリウム	14-35mg/L
炭酸水素ナトリウム	200-500mg/L

(COD<sub>Cr</sub>/NH<sub>4</sub>-N=6/1に固定) pH: 7.5

### 2.3 硝化活性測定

各アンモニア態窒素容積負荷においてリアクターから浮遊汚泥及び担体を一部採取し、PBSバッファー（130mM NaCl, 90mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2）で洗浄後、回分試験によりそれぞれの硝化速度を測定した。回分試験で用いた培地組成は、連続処理実験で用いた人工下水から有機物を除いたものとした（NH<sub>4</sub>-N:20mg/L）。その他の条件については表2に示した。ここでの硝化速度は硝酸及び亜硝酸態窒素の生成速度である。

### 2.4 水質及び汚泥分析

アンモニア、硝酸及び亜硝酸態窒素濃度はHach kit（HACH社製）またはイオン分析器（東亜電波工業社製）を用いて測定した。リアクターから一定量の浮遊汚泥を採取し、105℃で一晩（約16時間）乾燥した後、浮遊汚泥の重量の測定を行った。その結果に基づいて活性汚泥濃度（MLSS）を算出した。所定の粒数の乾燥重量を定期的に測定し、投入前の担体の乾燥重量との差から担体に付着した汚泥量（以降、担体付着汚泥量）を算出した。

表2 回分試験条件（硝化速度測定）

DO	temperature	pH	MLSS	carrier	liquid volume
4-6mg/L	20℃	7.0-8.0	1.5-2.0 g/L	20mL	0.1L

### 2.5 DNA抽出用サンプル及び抽出法

浮遊汚泥は適量採取した後、遠心分離によりサンプルを収集した。担体を採取した後、TEバッファー（10mM Tris・HCl, 1 mM EDTA pH 8.0）で洗浄した。収集した汚泥及び担体を使用まで-20℃で冷蔵保存した。DNA抽出はMarmur<sup>15)</sup>の方法に準拠した。

### 2.6 PCR-DGGE

菌種によって特異的な配列を有する16S rDNA V3領域をPCRにより増幅後、DGGE解析を行った。DGGEでは、電気泳動装置としてD-Code system（Bio-Rad Laboratories社製）を用いた。35-65%の変性剤濃度勾配を施した10%ポリアクリルアミドゲルを作成し、200V, 58℃, 3.5時間電気泳動を行った。その後、ゲルをSYBR Gold（FMC Bioproducts社製）で染色し、Gel Doc 2000 system（Bio-Rad Laboratories社製）を使ってDGGEプロファイル作成を行った。

### 2.7 DGGEバンドからのDNA抽出及びその配列解析

DGGEプロファイルで確認したDNAバンドを切り出し、TEバッファーに浸すことで、ゲルからDNAを抽出した。DNA溶出液にエタノールを加え、DNAを沈殿させた。遠心分離後、さらに70%エタノールで沈殿したDNAを洗浄した。遠心分離後、沈殿したDNAを乾燥させ、TEバッファーに溶解させた。このようにして得られたDNA溶液から、PCRによって細菌の16S rDNA V3領域部の増幅を図った。DNA増幅液を0.8%アガロースゲルで電気泳動後、得られたDNAバンドを切り出した。切り出したバンドからQIAquick gel extraction kit（QIAGEN社製）を使ってDNAを抽出した。このDNAをシーケンサー（Perkin-Elmer社製）によって配列決定し、得られた配列をGenBank databaseのBLAST program<sup>11)</sup>で菌種の同定を行った。

### 2.8 FISH

#### 2.8.1 細胞固定

硝化活性測定と同様にリアクターから浮遊汚泥及び担体を一部取り出し、超音波ホモジナイザー（Branson社製）により凝集または担体に付着した細胞を分散させた。分散した細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞をPBSバッファーで洗浄し、保存液（PBSバッファー:96%エタノール=1:1）1mlを加え、-20℃にて保存した。

### 2.8.2 ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションはAmann<sup>2)</sup>の方法に準拠して行った。用いたプローブは、アンモニア酸化細菌に特異的な配列を持つオリゴヌクレオチド (Nso190: 5'-CGATCCCCTGCTTTTCTCC-3') 及び亜硝酸酸化細菌に特異的なオリゴヌクレオチド (NSR826: 5'-GTAACCCGCCGAGACTTA-3') である。これらプローブには5'末端に蛍光物質であるCy3をラベルした。ハイブリダイゼーションの条件はそれぞれのプローブについてMobarry<sup>17)</sup>及びSchramm<sup>22)</sup>の方法に従った。これらプローブのハイブリダイゼーション後、全菌数測定のためDAPI染色を行った。落射型蛍光顕微鏡 (BX-60, オリンパス社製) による観察を行い、全菌数 (1000以上) に対する硝化細菌の割合を測定した<sup>24)</sup>。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 人工下水の連続硝化処理実験

アンモニア態窒素容積負荷は、0.02から0.096kg-N/m<sup>3</sup>/dまではHRTの段階的な短縮 (24時間から5時間まで) によって、それ以降は基質濃度の増加によって上昇させた。その結果を図2-1に示す。アンモニア態窒素容積負荷0.216kg-N/m<sup>3</sup>/dまでは硝化率95%以上の良好な除去性能を示した。容積負荷0.24kg-N/m<sup>3</sup>/dで硝化率の低下が確認されたので、再度容積負荷を0.216kg-N/m<sup>3</sup>/dに戻した。HRTの短縮に伴い徐々にSRTが減少していくのが確認された。SRTは当初20日程度だったが、容積負荷0.096kg-N/m<sup>3</sup>/d、運転開始後56日目を以降は5~7日間で安定的に推移し、最終的には約3日弱にまで減少した。SRTは減少したが硝化率

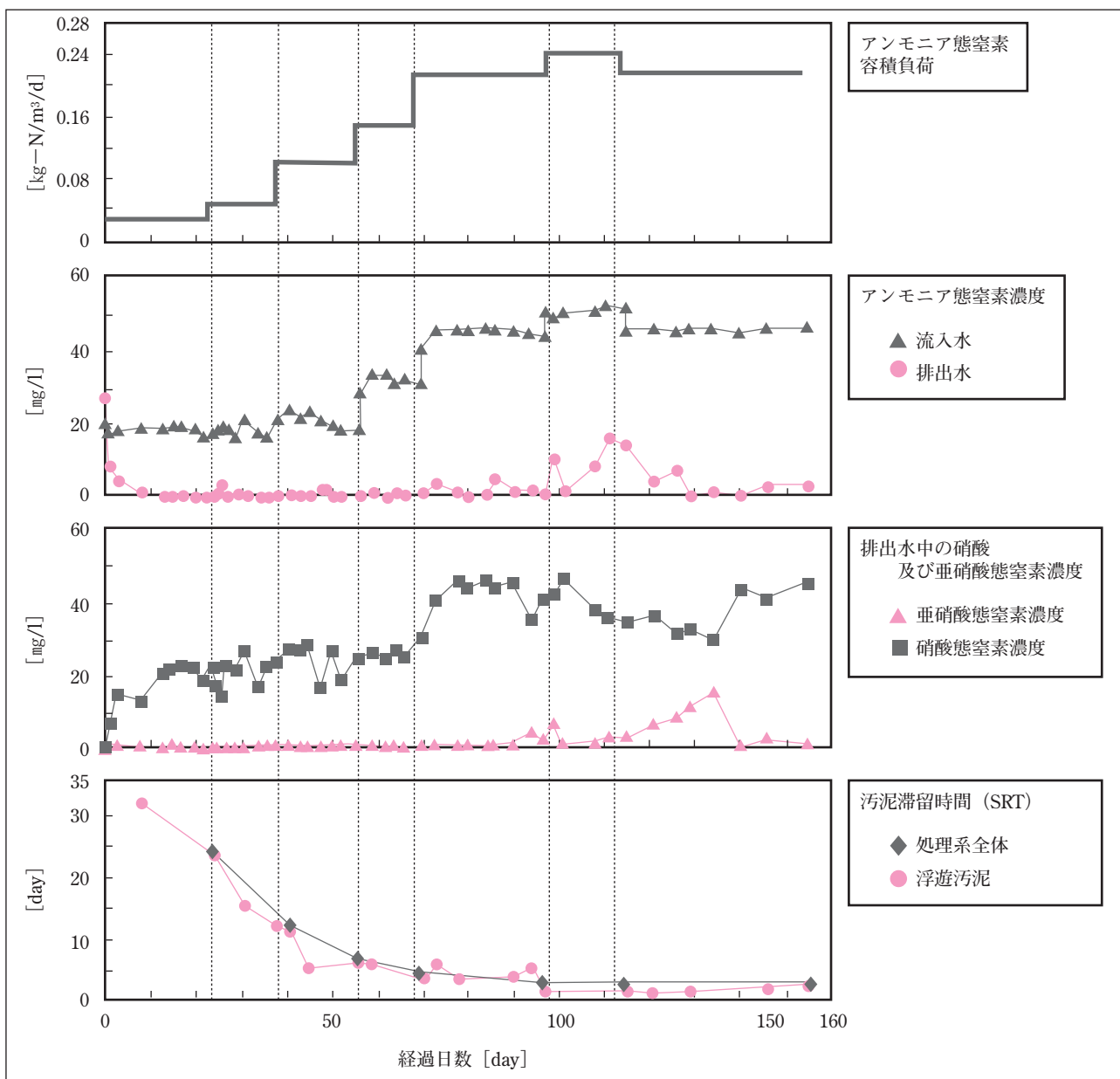


図2-1 連続処理実験における水質分析結果

の著しい低下は確認されなかったことから、実験期間の後半では、主に担体に付着した硝化細菌が硝化反応を担っていることが示唆された。汚泥引き抜きにより、MLSSは約1600~2500mg/Lに維持された。担体付着汚泥量はリアクター1L当たりのSSに換算したものであるが、SRTの減少とは反対に徐々に増加し、微生物の付着が起っていたと考えられる。図2-2にその結果を示す。

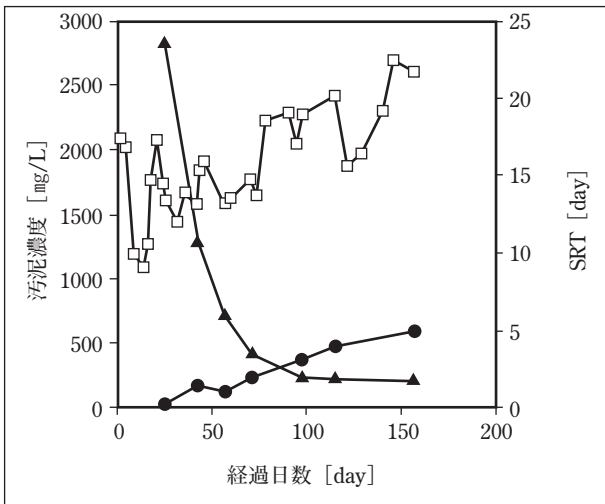


図2-2 連続硝化処理実験における活性汚泥濃度(□)、汚泥滞留時間(SRT;▲)及び担体付着汚泥濃度(●)の経時変化

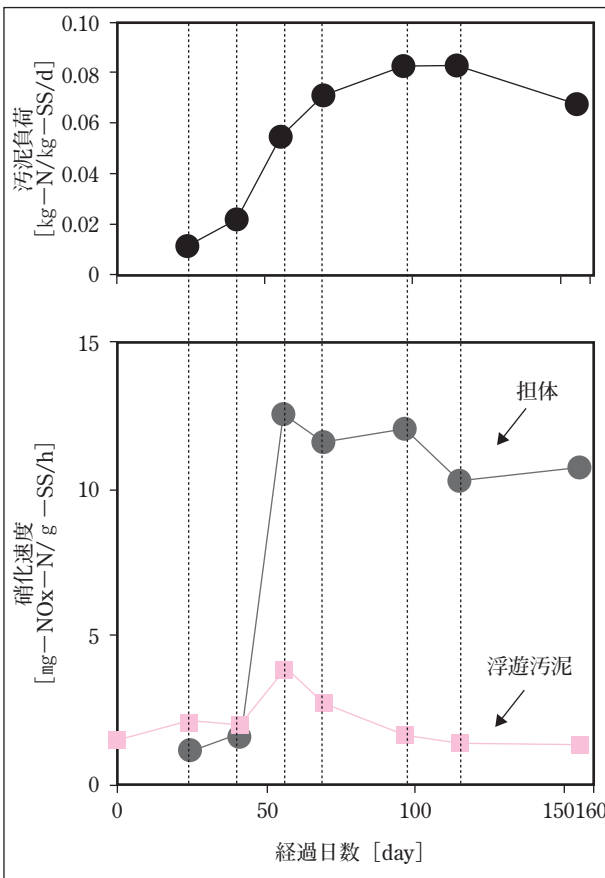


図3 連続硝化処理実験における汚泥負荷及び回分試験によって得られた硝化速度の経時変化

### 3.2 硝化活性

各アンモニア態窒素容積負荷において(図2-1上図の実線で示した。)リアクターから浮遊汚泥及び担体を一部採取し、PBSバッファーで洗浄後、回分試験によりそれぞれの硝化速度を測定した。図3は汚泥負荷(上側のグラフ)と浮遊汚泥及び担体の硝化速度の経時変化(下側のグラフ)を示す。

アンモニア流入量の増加に伴い、それぞれの汚泥負荷も上昇し、その上昇率が大きい43日から56日では担体付着汚泥の硝化速度が著しく上昇した。その後さらに汚泥負荷が上がると、浮遊汚泥の硝化速度は減少傾向にあったが、担体の速度は浮遊汚泥に比べて高く維持された。系全体の汚泥に対する負荷が低い時期は浮遊汚泥中の硝化細菌の流出は少なく、その硝化速度は担体に比べ速かったが、汚泥負荷が高くなるとSRTの短縮により浮遊汚泥中の硝化細菌は系外へ流出し、硝化速度の低下が起っていることが推察される。

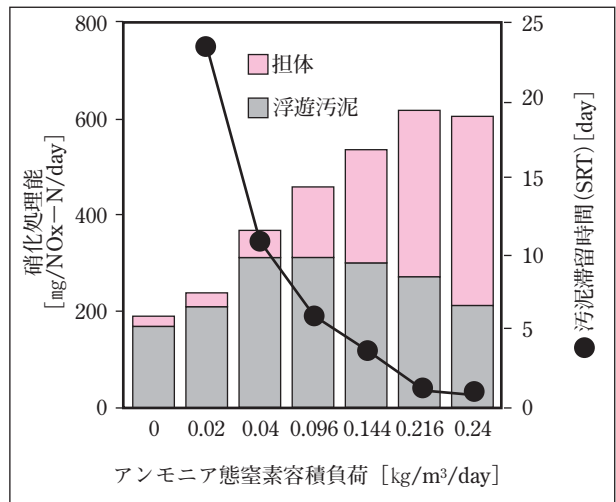


図4 担体及び浮遊汚泥の硝化処理に対する寄与率の変化

連続処理実験における保持汚泥濃度(図2-2)及びバッチ試験による硝化活性の測定結果(図3)から、浮遊汚泥及び担体のリアクター内での硝化処理能を算出し、系全体の硝化処理に対するそれぞれの寄与率を検討した。図4には担体及び浮遊汚泥の硝化処理に対する寄与率の変化を示す。容積負荷上昇とともに系全体の硝化能は向上した。低負荷条件ではSRTがある程度長く保たれ、浮遊汚泥による処理で十分処理されていたが、負荷が高くなっていくとSRTが短縮され、浮遊汚泥による処理では不十分になっていくことが確認された。一方、担体による処理能は低負荷条件では、浮遊汚泥より低かったが、負荷の上昇とともに徐々に高くなった。特に汚泥負荷の上昇が大きかった、容積負荷0.096kg/m³/dのところから担体の寄与が目立つようになり、最終的には系全体の75%以上の寄与率を示した。

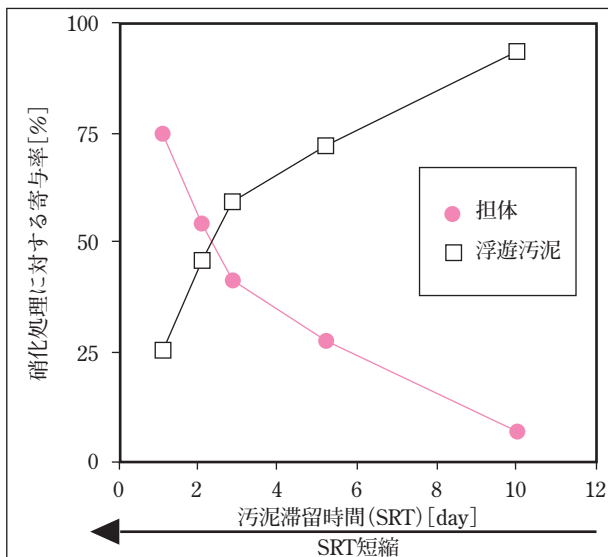


図5 連続硝化処理実験における汚泥滞留時間（SRT）と担体及び浮遊汚泥の硝化処理に対する寄与率との関係

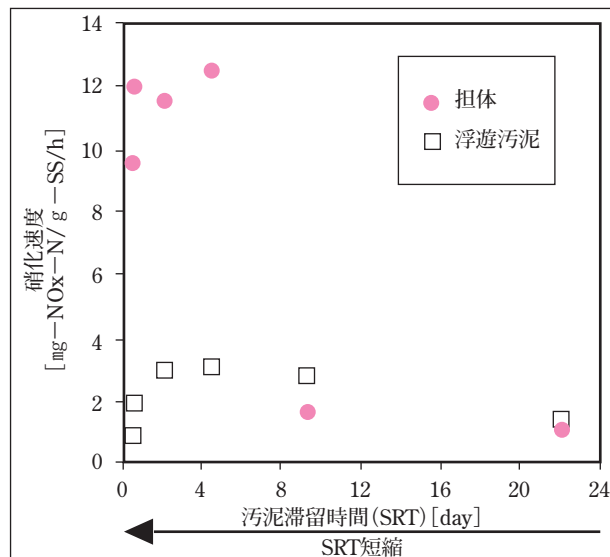


図6 連続硝化処理実験における汚泥滞留時間（SRT）と担体及び浮遊汚泥の硝化速度との関係

図5は浮遊汚泥及び担体の硝化処理に対する寄与率と連続実験におけるSRTとの関係を示す。SRTの短縮に伴い浮遊汚泥の寄与率は減少しているが、それに反して担体の寄与率は上昇した。特にSRTが3日より短縮された条件では担体の効果が明瞭に現れている。図6は浮遊汚泥及び担体の硝化速度とSRTとの関係を示す。SRTが長く維持された条件では浮遊汚泥の硝化速度が担体のそれより高くなっており、連続処理実験の結果と合わせると浮遊汚泥による処理で十分硝化処理が可能であったと考えられる。しかし、SRTが3日より短縮されていくと浮遊汚泥の硝化速度

は低下傾向にあり、負荷上昇によって硝化細菌の流出が起こったとみられる。一方、担体ではSRTが8日より短縮されると硝化速度の顕著な上昇が確認され、浮遊汚泥のそれを大きく上回り、SRTが短縮された高速処理条件下では硝化細菌付着担体の効果が発揮されたと考えられる。

以上のように化学的な分析手法によって、硝化細菌が担体へ付着したこと、さらに、その付着量が増加していったことが現象面で示唆された。そこで、担体に付着した硝化細菌の同定及びその定量を分子生物学的な手法により解析することとした。

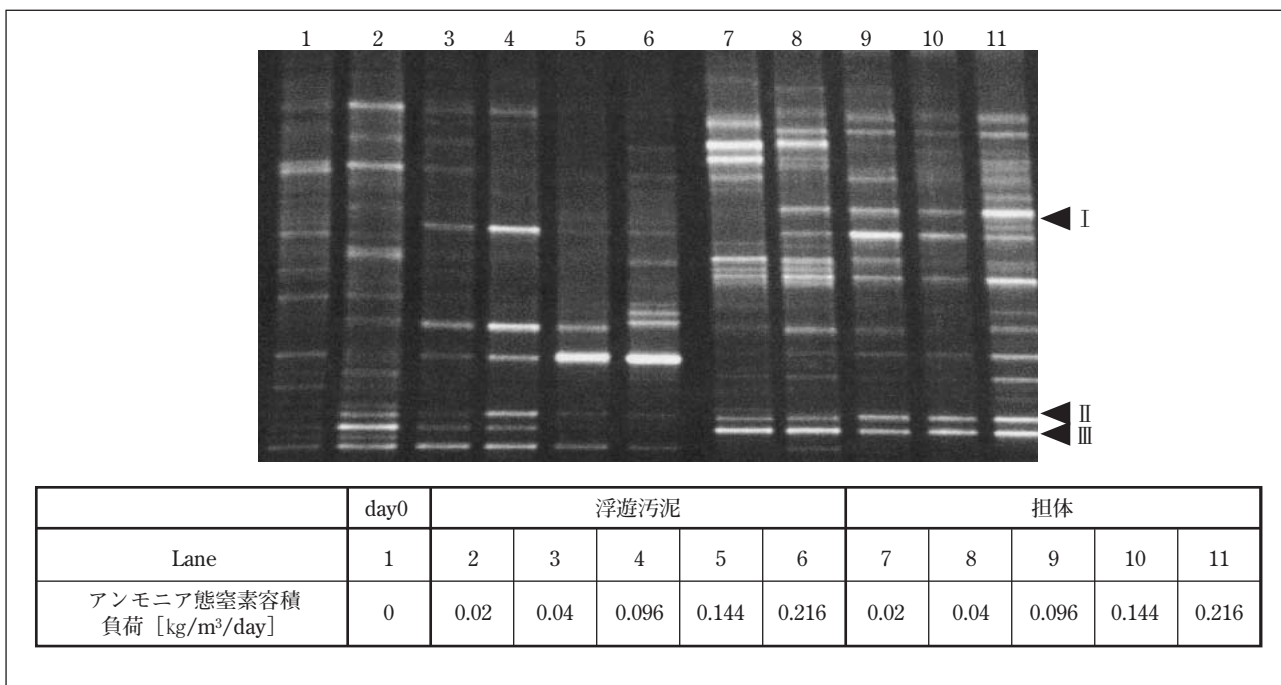


図7 16S rDNA V3領域（341 to 534 in *E. coli*）をターゲットとしたPCR-DGGE解析によって得られたDGGEプロファイル

表3 DGGE解析結果

band	length	phylogenetically related organism	Gen Bank accession No.	%identity
I	194bp	<i>Nitrosomonas</i> sp.	AF272424	95%
II	183bp	<i>Nitrospira</i> sp.	Y14644	99%
III	184bp	<i>Nitrospira</i> sp.	Y14640	99%

3.3 DGGE

浮遊汚泥及び担体から抽出したDNAを用いてPCR-DGGE法により菌叢解析を行った。この実験により得られたDGGEプロファイルで確認されたバンドを切り出し、ゲルからのDNA抽出を行った。図7にはそのDGGEプロファイルを示す。これら抽出されたDNAの配列を解析したところ、3種の硝化細菌が検出された。表3にDGGE解析結果を示す。1種は*Nitrosomonas* sp.で、2種は*Nitrospira* sp.に属するものであった(表3)。浮遊汚泥については低負荷条件でこれら硝化細菌のバンドが確認されたが、負荷上昇に伴い検出が困難となった。担体付着汚泥についても硝化細菌が検出されているが、負荷上昇に伴い、これらバンドがより鮮明となり、硝化細菌が優占種となったことが確認された。浮遊汚泥中の硝化細菌は系外への流出が激しくなり連続処理実験の後半ではマイナーとなったのに対して、担体には硝化細菌が付着し、維持されていたことが示唆された。

環境中(主に水環境)から検出されるアンモニア酸化細菌はその多くが*Nitrosomonas*や*Nitrosospira*(共にβ-Proteobacteria)に属するものと報告されている<sup>6)</sup>。一方亜硝酸酸化細菌は系統学的に多様性を有しており、*Nitrobacter*(α-Proteobacteria)、*Nitrosococcus mobilis*(γ-Proteobacteria)、*Nitrospina gracilis*(δ-Proteobacteria)や*Nitrospira*(*Nitrospira*)などが知られている<sup>25)</sup>。従来は*Nitrosomonas*や*Nitrobacter*がそれぞれアンモニア酸化及び亜硝酸酸化に重要な役割を果たしていると考えられてきたが、最近ではそれらの細菌よりも*Nitrosospira*<sup>8)13)23)</sup>や*Nitrospira*<sup>3)8)9)17)22)28)</sup>がさまざまな環境中及び処理場などで生息しているケースが報告されている。Okabeら<sup>18)</sup>は実際の廃水処理場から得られたバイオフィーム内の硝化細菌の分布を調べているが、pH7.0、水温20℃付近の条件ではアンモニア酸化細菌として*Nitrosomonas* sp.が優占種となることや、連続処理実験のようにリアクター中の

溶存酸素濃度及び基質濃度が低い条件下では*Nitrospira* sp.が亜硝酸酸化細菌として優占種となることを論じている。

人工下水流入量を増加させた結果、SRTが徐々に短縮され、浮遊汚泥中の硝化細菌が減少した。これはSRTが硝化細菌の平均世代時間(doubling time)より短くなり、細胞が増殖する前に処理槽から流出したためと考えられる。回分試験から得られた結果において高容積負荷条件では浮遊汚泥の硝化処理に対する寄与率は低下しており、この現象はDGGE解析でも確認された。これとは対照的に担体の寄与率は増加傾向にあり容積負荷の上昇に伴い付着硝化細菌量が増加したのではないかと考えられる。

3.4 FISH実験による担体付着硝化細菌の定量

DGGEの結果及び考察から担体付着硝化細菌を定量するためFISH実験を行った。図8は浮遊汚泥中及び担体に付着した硝化細菌(アンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化

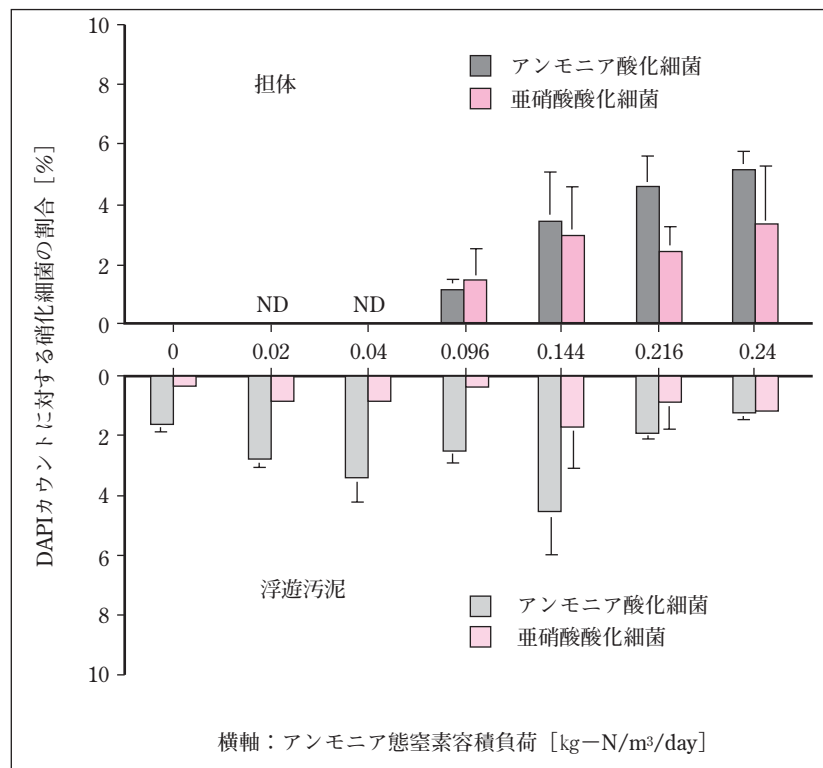


図8 アンモニア態窒素容積負荷と担体及び浮遊汚泥のDAPIカウントに対する硝化細菌の割合との関係

化細菌)の全菌数に対する割合を容積負荷毎にどのように変化するか表したものである。低容積負荷条件では浮遊汚泥中の硝化細菌の割合は増加し、その後徐々に負荷が上昇するとその割合は低下した。一方担体については、低負荷条件では硝化細菌の検出自体が困難であり割合を算出できなかった。その後、負荷上昇とともにその検出が可能となり、硝化細菌の割合は増加傾向をとった。この結果は図4に示される回分試験の結果と相関していた。担体付着汚泥から検出されたアンモニア酸化細菌の割合は容積負荷上昇に伴い増加し、浮遊汚泥のそれを上回るようになった。硝化細菌の割合及びDAPI染色による全菌数計測から、浮遊汚泥中及び担体付着汚泥中の硝化細菌数を算出し、容積負荷との関係を検討した。その結果を図9に示す。容積負荷上昇に伴い担体付着細菌数は増加し、最終的には浮遊汚泥の約60倍にまで達した。

担体付着汚泥中の硝化細菌割合の増加は以下のように推察される。今回の連続処理実験では人工下水の組成を一定(濃度比COD<sub>Cr</sub>/NH<sub>4</sub>-N比=6/1)にし、単にアンモニア態窒素容積負荷の影響を検討するため、アンモニア態窒素濃度と同様に有機物濃度も上昇させている。そのため浮遊汚泥内ではSRTの短縮(人工下水流入量増加)によって硝化細菌の系外への流出が起こると同時に比較的増殖が速い従属栄養性の微生物が優占種となり、従属栄養性微生物は人工下水中の有機物を優先的に基質とした。一方で、担体表面に付着したアンモニア酸化細菌はリアクター内での流入及び流出の影響を受け難く、浮遊汚泥中の硝化細菌に比べ流出量が少なかったと考えられる。担体に残存したアンモニア酸化細菌は人工下水中のアンモニアを優先的に基質とすることで増殖し、さらにアンモニア酸化によって

生じた亜硝酸により亜硝酸酸化細菌の増殖が起こった。このように連続処理実験中において徐々に負荷を上昇させることで浮遊汚泥と担体との間で微生物の住み分けが進行し、担体では硝化細菌が優占種となり、その割合が増加したのではないかと考えられる。

#### 4. 結 論

本研究では活性汚泥に樹脂担体を投入し、段階的にアンモニア態窒素容積負荷を上昇させる連続硝化処理実験を行った。この実験において、担体の硝化活性及び担体付着汚泥に存在する硝化細菌について化学的及び分子生物学的手法を用いて検討し、以下の結論を得た。

1. 容積負荷上昇とともに汚泥負荷の上昇とSRTの短縮が確認された。このような状況の中で、処理系全体の硝化処理は終始安定していた。
2. 連続処理実験において担体の硝化処理に対する寄与率は増加し、浮遊汚泥のそれを上回るようになった。最終的には処理系全体の75%以上の寄与率を示した。
3. 高容積負荷条件では、担体付着汚泥中で硝化細菌が優占種となり、菌数の割合が増加していた。
4. 化学的手法及び分子生物学的手法により得られた結果は同様な傾向を示しており、互いに相関していることが明らかとなった。

今回の検討で、KPパールはSRTが短縮された状態でも硝化細菌を高濃度に保持でき、高速処理条件下で、より優位性を発揮することが確認できた。担体をさらに有効なものとするためには、硝化細菌の付着性を検討し、スタートアップまでの時間を短縮するなどの改良が求められる。このような高分子材料に微生物を付着させる要因解明が今後の課題であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 菊田真人、泉田仁、牧野隆、平間敏郎:塗料の研究、127,p.35-39(1996)
- 2) Amann, R.I. (1995) In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers, 3.3.6: 1-15.
- 3) Burrell, P.C., J. Keller, and L.L. Blackall. (1998) Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. Appl Environ Microbiol 64: 1878-1883.

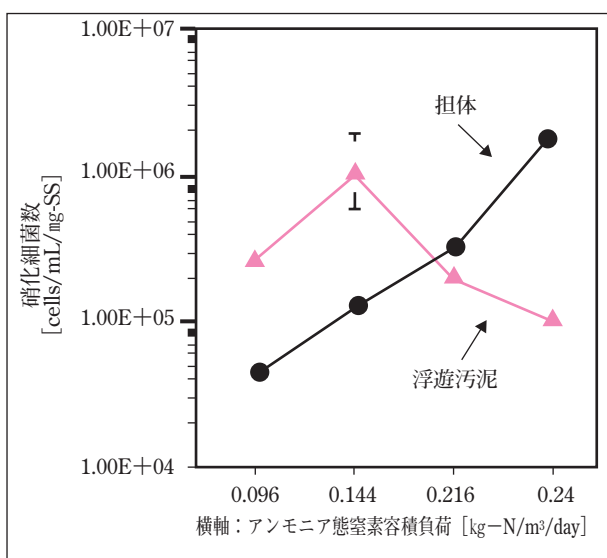


図9 アンモニア態窒素容積負荷と担体付着汚泥及び浮遊汚泥中の硝化細菌数との関係



- 4) **Christine, H., and Sabine, K.** (1998) Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. *Wat Sci Tech* 37: 183-187.
- 5) **Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., and Bock, E.** (1995) A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* 164: 16-23.
- 6) **Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., and Schramm, A.** (2001) Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl Environ Microbiol* 67: 1351-1362.
- 7) **Head, I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy, and J.R. Saunders.** (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* 139:1147-1153.
- 8) **Hiorns, W.D., Hastings, R.C., Head, I.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R., Pickup, R.W., and Hall, G.H.** (1995) Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrospiras in the environment. *Microbiology* 141: 2793-2800.
- 9) **Hovanec, T.A., L.T. Taylor, A. Blakis, and E.F. Delong.** 1998. Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:258-264.
- 10) **Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Andreas, P.-R., Koops, H.-P., and Wagner, M.** (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3042-3051.
- 11) **Karlin, S., and S.F. Altschul.** (1990) Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2264-2268.
- 12) **Kokufuta, E., Shimohashi, M., and Nakamura, I.** (1987) Simultaneously occurring nitrification and denitrification under oxygen gradient by polyelectrolyte complex-coimmobilized *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* cells. *Biotech Bioeng* 31: 382-384.
- 13) **Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., de Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., and Woldendorp, J.W.** (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$ -subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1489-1497.
- 14) **Lee, N., P.H. Nielsen, K.H. Andreasen, Juretschko, S., J.L. Nielsen, Schleifer, K.-H., and Wagner, M.** (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 65: 1289-1297.
- 15) **Marmur, J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208-218.
- 16) **Mishima, K., Nishimura, T., Goi, M., and Katsukura, N.** (1996) Characteristics of nitrification and denitrification of the media-anareobic-anoxic-oxic process. *Wat Sci Tech* 34: 137-143.
- 17) **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. *Appl Environ Microbiol* 62: 2156-2162.
- 18) **Okabe, S., Satoh, H., and Watanabe, Y.** (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3182-3191.
- 19) **Prosser, J.I.** (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 30: 125-181.
- 20) **Schramm, A., de Beer, D., Gieseke, A., and Amann, R.** (2000) Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environ Microbiol* 2: 680-686.
- 21) **Schramm, A., Larsen, L.H., N.P. Revsbech, 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. *Appl Environ Microbiol* 62: 4641-4647.
- 22) **Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M., and Amann, R.** (1998) Identification and activity in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl Environ Microbiol* 64: 3480-3485.

- 23) **Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., and Embley, T.M.** (1996) Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to (-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 4147-4154.
- 24) **Syutsubo, K., Kishira, H., and Harayama, S.** (2001) Development of specific oligonucleotide probes for the identification and in situ detection of hydrocarbon-degrading *Alcanivorax* strains. *Environ Microbiol* 3: 1-10.
- 25) **Teske, A., E. Alm, J.M. Regan, S.Toze, B.E. Rittman, and D.A. Stahl.** (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* 176:6623-6630.
- 26) **Uemoto H., and Saiki, H.** (2000) Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* immobilized in tubular polymeric gel for nitrogen removal. *Appl Environ Microbiol* 66: 816-819.
- 27) **V.A.P.M. dos Santos, Bruijnse, M., Tramper, J., and Wijffels, R.H.** The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized micro-organisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 447-453.
- 28) **Wagner, M., G.Rath, H.-P.Koops, J.Flood, and R.Amann.** (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat Sci Tech* 34: 237-244.
- 29) **Watoson, S.W., E. Bock, H.Harms, H.-P. Koops, and A.B.Hooper.** (1989) Nitrifying bacteria. p.1808-1834. *In* J. T. Staley, M.P.Bryant, N.Pfennig, and J.G. Holt(ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol.3. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- 30) **X.J. Fan, V.Urbain, Y.Qian, J.Manem, W.J. Ng and S.L.Ong.** (2000) Nitrification in a membrane bioreactor (MBR) for wastewater treatment. *Wat Sci Tech* 42: 289-294