

FISH 法を用いた硝化細菌の実処理施設における挙動調査

横浜市 ○神南みよ子
北谷道則
井上 智

1 はじめに

下水処理において、BOD 除去と硝化促進を行うことは、処理を良好に維持するために必要不可欠な条件である。BOD 除去は従属栄養細菌が有機物を吸収・分解することで、アンモニア性窒素の酸化は硝化細菌が硝酸性窒素まで酸化することで機能が維持される。

活性汚泥処理では、従属栄養細菌に比べ硝化細菌は菌体数が少なく増殖速度も遅いことから、反応タンク内で安定した硝化能を維持するには、硝化細菌の菌体数が常に確保されていることを定常的に把握できることが重要である。しかし、実施設の硝化細菌の同定には、菌の培養法の煩雑さや菌体数の測定の困難性があることから、硝化細菌に対する十分な情報が得られていないのが現実である。

横浜市では実施設の活性汚泥に対して、FISH 法を用いて硝化細菌を蛍光染色することで、活性汚泥中の硝化細菌の棲息状況、菌体数などを顕微鏡観察することができた。この方法を用いることで、反応タンク内の硝化反応の状態を把握する手段として有効であることがわかったので報告する。

2 調査対象処理場の処理能力

調査対象は合流式下水処理場の横浜市南部下水処理場である。平成 14 年度の処理状況を表-1、流入水質等を表-2 に示す。反応タンクの処理能力は、標準的な処理施設に比べると滞留時間、SRT が短いため、冬期に硝化促進を維持していくのが難しい処理場である。合流式下水道のため流入水質は低めであり、空気倍率は 2.7 倍と低くなっている。また、流入水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が高い処理場に比べると、最初沈殿池流出水の $\text{NH}_4\text{-N}$ が 13mg/l と低いために、硝化細菌の増殖に必要な基質濃度が低いことになる。SRT の短さ、低基質濃度などから、反応タンク内の硝化細菌の菌体数は少ないものと推察される。

3 FISH 法の試験方法

1) 硝化細菌の測定

FISH 法(Fluorescent in situ hybridization)は目的とする微生物のリボソーム RNA(r-RNA)の特定部位に、蛍光で標識した 1 本鎖 DNA プローブを結合(ハイブリダイズ)させ、蛍光顕微鏡下で微生物を検出する方法である。目的とする微生物の特異的な塩基配列に対応した DNA プローブを用いることで、目的の個体のみを検出することができる。また試料をそのままスライドに固着させた状態で検出できるため、微生物の分布等も同時に観測することができる。

今回、測定には vermicon 社 Nitri-VIT Kit (硝化細菌検出キット)を使用し、反応タンク内の活性汚泥に対し、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の検出を試みた。この Kit ではアンモニア酸化細菌と

表-1 処理状況(平成14年度平均)

反応タンク	流入水量 (m3/日)	188,000
	高級処理水量 (m3/日)	175,000
	滞留時間 (時間)	4.9
	BOD負荷 (kg/MLSS・日)	0.29
	SRT (日)	4.9
	空気倍率 (倍)	2.7
	MLSS (mg/l)	1,400
	DO (mg/l)	3.4

表-2 流入水質(平成14年度平均)

流入下水	SS (mg/l)	140
	BOD (mg/l)	120
	T-N (mg/l)	18
	T-P (mg/l)	2.4
最初沈出池水	SS (mg/l)	48
	BOD (mg/l)	83
	T-N (mg/l)	20
	NH4-N (mg/l)	13
	T-P (mg/l)	2.1

して *Nitrosomonas* 属、*Nitrosococcus* 属、*Nitrosospira* 属を、亜硝酸酸化細菌として *Nitrobacter* 属、*Nitrospira* 属を対象とした DNA プローブを使用している。測定は以下の手順で行った。

- ① サンプルの滴下と固定 : サンプルをスライド上に $10\mu\text{l}$ ずつ 3 ヶ所に滴下し、 46°C のふらん器で 15 分乾燥させる。その後サンプル上に試薬 A を滴下し、再び乾燥させる。さらに試薬 B2 についても同様に行う。
- ② DNA プローブの結合 : 3 ヶ所のサンプルにそれぞれポジティブコントロール(全ての細菌を赤色に標識)、ネガティブコントロール(いずれの細菌にも結合しない、バックグラウンド)、VIT(アンモニア酸化細菌を赤色に、亜硝酸酸化細菌を緑色に標識)の DNA プローブ液を滴下し、試薬 C1 上にて 46°C のふらん器内でハイブリダイズさせる。
- ③ 未反応のプローブの洗浄 : 試薬 D1 を蒸留水で 10 倍に希釈して 46°C に温めたものを洗浄試薬とし、スライドを洗浄試薬中、 46°C で 15 分静置し、洗浄を行う。
- ④ 検鏡 : スライドに Finisher 試薬を滴下しカバーガラスをかけ、100 倍油浸対物レンズ使用の蛍光顕微鏡 (Nikon 製 Eclipse E800 を使用) にて検鏡する。アンモニア酸化細菌は G 励起光(菌は赤色に発光)、亜硝酸酸化細菌には B 励起光(緑色に発光)を照射して蛍光を発光させる。

2) 硝化細菌数の判定

スライド上の菌数を全てカウントすることは時間がかかる上、困難である。また日常の水処理の管理には、菌の絶対数を求めるよりも、相対的な菌数の増減や菌の分布状況等を観測できる方法が好ましい。そのため、菌数の概数計算方法を採用したのでその方法を以下に示す。

- ① 活性汚泥を含む任意の 20 以上の視野を選び、撮影する。
- ② 撮影した 20 以上の画像を菌数に応じて 5 段階に分類する。(group1-very few cells・group2-few cells・group3-some cells・group4-many cells・group5-a huge number of cells)
- ③ group1~5 をそれぞれ 1~5 点として全ての画像の平均点を求める。この平均点は、サンプルの菌数の増減を測る目安となる。

4 結果と考察

(1) 処理場の運転状況

本処理場の SRT と水温の関係を示したのが図-1 である。80%以上の硝化を維持できる SRT と水温の関係式(下水道施設・設計指針参照)と比較して、本処理場の SRT が全般に低いことがわかる。特に、水温が低下する冬期においては、十分な SRT が確保できないため、反応タンク内で硝化を維持できる硝化細菌の菌体数を確保することは難しい状況

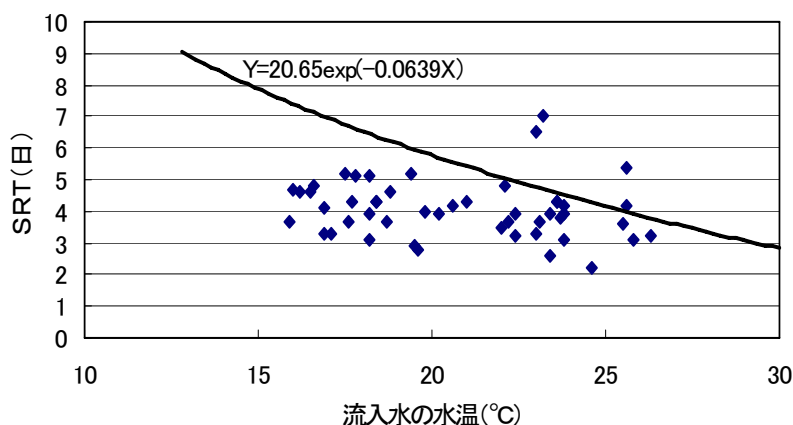


図-1 水温と SRT の関係 (平成15年度)

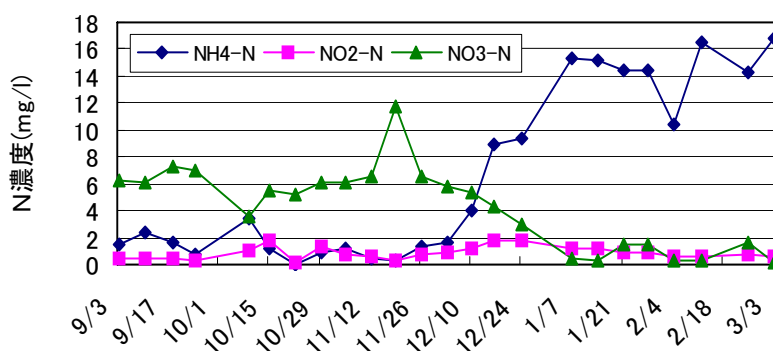


図-2 処理水中の窒素濃度の経日変化状況

にある。

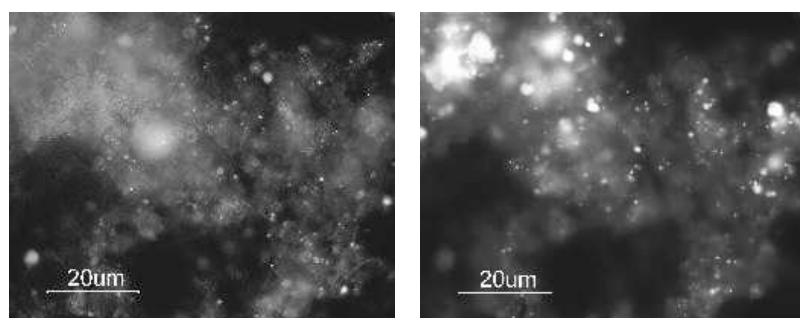
さらに、冬期に硝化反応が後退する状況を示したのが図－２である。処理水のアンモニア性窒素が 12 月に入り上昇を始め 1 月の中旬には硝化が停止したことがわかる。硝化が停止したため、硝酸性窒素が反応タンクで脱窒しなくなったことが原因で溶解性窒素の合計量が上昇していることもわかる。

（２）硝化細菌の棲息分布

図－３が本処理場の反応タンク内の活性汚泥について FISH 法で検出したときの画像の一例である。図－３は処理悪化以前の 11/19 に分析したものであり、多数の亜硝酸菌、硝酸菌が観測された。表－３に硝化細菌数の判定法で求めた FISH 法における菌数の平均点を示す。処理悪化後の 12 月中旬以降では大幅に菌数(平均点)が低下した。図－２の処理水の窒素濃度変化と比較しても、細菌の減少傾向と硝化の後退状況がよく一致している。

表－３ FISH 法での菌数の平均点

月/日	アンモニア酸化細菌	亜硝酸酸化細菌
11/19	3.2	2.2
12/16	2.2	1.6
1/7	2.7	1.5
3/10	2.6	1.3



図－３ 左.アンモニア酸化細菌(赤色) 右.亜硝酸酸化細菌(緑色)

図－３では、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌は必ずしも同一箇所に棲息しているわけではなく、同じフロック内でもある程度の住み分けをしているように見受けられる。また、アンモニア酸化細菌ばかりが多く棲むフロック部位やあるいは亜硝酸酸化細菌が多く棲む部位なども観測された。処理悪化後には図－３のような硝化細菌が多く棲む(*group4～5* と判定できるような)フロックが大幅に減少し、細菌はまばらに棲息している状況であった。

（３）硝化細菌の測定の活用とまとめ

これまで横浜市では処理水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度をイオンクロマトグラフィー等で分析した結果から活性汚泥中の硝化細菌の存在を間接的に判断していた。しかし、この方法では硝化が後退してはじめて硝化細菌の減少と判断されるため、すでに手遅れとなっている場合もあり、処理悪化を予防することは難しい。FISH 法は硝化細菌を直接測定できるため、硝化が後退する以前に硝化細菌の菌体数の減少を把握できると思われる。それにより SRT を長く保持する等の適切な処理を早期に行うことも可能になる。

今回の FISH 法の実験では水処理の悪化の前・後を測定しており、残念ながら悪化に至る過程を測定することができなかった。今後、季節ごと等のバックグラウンドデータを収集していく必要があると思われる。また、硝化細菌の棲息分布状況は非常に興味深いものであり、菌体数が変化していく過程で、棲息分布がどのように変化していくかが捉えられれば、FISH 法をより有効な手段として水処理に反映させていくことができると期待される。

FISH 法は操作が簡便であり、数時間で微生物群集の立体的な配置や構造が直接観察できるなどの利点があり、専門的な知識が少ない者でも簡単に測定することができる。

問合せ先：〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-6-8

横浜市下水道局北部第二下水処理場内 水質管理課 TEL 045-503-0894