

海水中有機物に対する効率的分解菌の活用方法に関する研究

伊藤 禎彦* ・村上 仁士** ・細井 由彦***
板東 広之**** ・落合 道和*****

1. 緒 言

閉鎖性海域における海水の直接浄化に礫間生物膜法が注目され、研究開発が進められてきた。除去対象となっているのは、懸濁物質、窒素、リン、有機物などであるが、現在までに得られた研究成果からは、特に有機物に対する除去効果が低い点が特徴であることが明らかになってきている(小田ら, 1992; 毛利ら, 1993)。

筆者らは、海水中の有機物は、本来、生物分解を受け難いものの割合が高いことを指摘するとともに、これを積極的に分解・除去するための研究を行い、これまでに海水中難分解性有機物を効率的に分解しうる細菌として *Pseudomonas paucimobilis* を海域環境より見出している(伊藤ら, 1993)。本研究は、この効率的な分解菌の分解特性を把握した上で、これを実際に活用するための基礎研究を行ったものである。

まず、海水中有機物に対する *P. paucimobilis* の基本的な分解特性を把握する実験を行った。すなわち、環境要因として塩分濃度、pH、水温を変化させ、海水中有機物の分解能力に対する影響を検討した。また、本研究では特に、*P. paucimobilis* を単独で使用するよりも、むしろ実際の水環境のような、他の細菌や生物が共存する条件下で *P. paucimobilis* を活用する方法を探ることに重点をおいた。すなわち、自然の海岸環境を考慮して、この菌が他の細菌との共存下(混合培養系)で、いかに有機物分解能を発揮するか、および細菌群全体に及ぼす影響について検討した。さらに、ここでみられる現象を利用して、海水を効率的に浄化するため、プラント実験も試みた。

2. 有機物分解特性に対する影響要因

P. paucimobilis の有機物分解活性に影響を与える要因として、塩分濃度、pH、および水温をとりあげ、分解

活性に対する影響について調べた。

2.1 実験方法

まず、徳島県小松海岸沿岸水を採水し濃縮海水を作製した(伊藤ら, 1993)。これを無機培地(長谷川ら, 1975)で希釈し、有機物濃度(DOC)を約 5 mg/l に調整したものを試料水として、この 19 ml を容量 20 ml の L 型試験管に入れた。ここに *P. paucimobilis* の菌液 1 ml を、最終的に 4×10^6 CFU/ml となるように接種した。*P. paucimobilis* の菌液は、Anderson 寒天培地上で 48 時間以上培養した菌体を、遠心分離により濃縮して作製した。分解は、暗所、振とう条件下(30 回/min)で 3 日間行われた。

他の実験条件は、以下のように設定した。

a) 塩分濃度は、NaCl で 0%, 1%, 3% と変化させて、分解実験は 20°C で行った。

b) pH は、pH 6, 7, 8, 9 と変化させて、分解実験は 20°C で行った。

c) 水温については、インキュベーター内の温度を 10~30°C の間で段階的に変化(10°C, 12°C, 15°C, 20°C, 30°C)させて分解実験を行った。

なお有機物濃度(DOC)は、1日後、3日後に、島津製作所製 TOC-5000 を用いて測定した。

2.2 実験結果

塩分濃度、pH、水温を変化させて海水中有機物の分解活性を調べた結果を図-1、図-2、図-3 に示す。分解速度は、1 菌体あたり 1 日あたりの有機物分解量で表し、結果は平均値および標準偏差を示している。

図-1 から、分解速度に対する塩分濃度の影響は顕著にみられないことがわかる。図-2 から、pH については中性域でよく分解が進行することがわかる。特に海域の pH に近い pH 7~8 で分解速度は最大となることが推察される。また、水温の影響を調べた図-3 から、20°C 以上で、有機物の分解が活発であることがわかる。一方、水温が、15°C 以下では、分解はほとんど期待できないことがうかがえる。すなわち、冬期には生物分解作用は期待しにくく、礫間接触酸化法における除去は、沈澱、ろ過作用のみに頼ることになると予想できる。

* 正会員 工博 徳島大学助教授 工学部建設工学科

** 正会員 工博 徳島大学教授 工学部建設工学科

*** 正会員 工博 鳥取大学教授 工学部社会開発システム工学科

**** 正会員 工修 徳島県庁

***** 学生会員 徳島大学大学院 工学研究科建設工学専攻

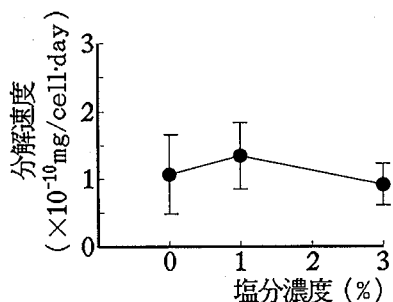


図-1 塩分濃度の影響

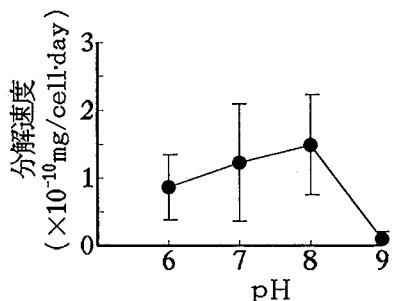


図-2 pHの影響

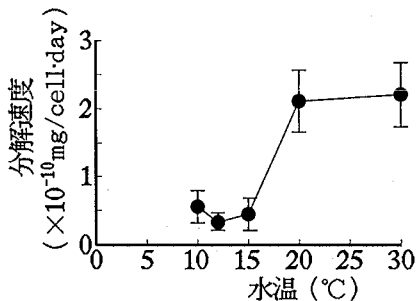


図-3 水温の影響

3. 分解細菌の混合培養系における有機物分解特性

ついで、種々の細菌群が共存する自然環境を考慮し、*P. paucimobilis* が、他の細菌群との共存の中で、いかに有機物の分解・除去に関与するか、また他の細菌群に及ぼす影響について検討した。

3.1 実験方法

混合培養系を形成する細菌群は、海岸構造物より採取した付着細菌を、無機培地に炭素源として濃縮海水を添加した培地に接種し、容量 300 ml の三角フラスコ中で攪拌条件で培養しておいたものを用いた。実験に用いる

試料水は、沿岸海水を、懸濁物質除去のためグラスファイバーフィルター（アドバンテック GS-25）でろ過し、また、水中に存在する細菌を不活化させるために、60~70°C、30 分間の加熱処理を行った。

実験は、容量 200 ml の三角フラスコに試料水を 150 ml 入れ、ここに、表-1 に示すような細菌の割合となるように、付着細菌と *P. paucimobilis* の割合を調整して接種した後、スターラーで攪拌しつつ、25°C、暗所で分解を行わせた。

実験に際して、細菌数は、沿岸水中の細菌数（河合、1988）を考慮して、 10^4 cells/ml オーダーに調整した。以下、表-1 の実験条件について説明する。CASE 1, CASE 7 は、付着細菌、*P. paucimobilis* のみを 10^4 cells/ml に調整したもの、また、CASE 2, CASE 3, CASE 4 は、それぞれ付着細菌 10^4 cells/ml オーダーに対して、*P. paucimobilis* を 10%, 50%, 100% となるように添加した。逆に、CASE 5, CASE 6 は、*P. paucimobilis* 10^4 cells/ml オーダーに対して、それぞれ付着細菌を 10%, 50% となるように細菌数を調整したものである。

有機物濃度 (DOC) の測定は、1 日後、2 日後に行った。

3.2 実験結果

CASE 1~CASE 7 における有機物分解実験結果を図-4~図-10 に示す。

図-4~図-10 より、付着細菌のみを接種した CASE 1 では、有機物が緩やかに減少しているのに対し、*P. paucimobilis* (10%, 50%, 100%) を接種した CASE 2, CASE 3 および CASE 4 では、有機物が急激に減少する傾向にあることがわかる。一方、*P. paucimobilis* のみを接種した CASE 7, および付着細菌 (10%, 50%) を接種した CASE 5, CASE 6 では、いずれも有機物の分解活性が低下していることがわかる。図-11 は、各 CASE の結果を 2 日後の有機物除去率で表示したものである。CASE 1, CASE 5, CASE 6, CASE 7 の除去率は、それぞれ 20%, 21%, 23%, 26% と、低い除去率にとどまっているのに対して、CASE 2, CASE 3, CASE 4 は、53%, 44%, 57% と高い除去率であることがわかる。

以上の結果、*P. paucimobilis* には、有機物の分解に直接的に関与する他に、他の細菌と共同して、混合系全体

表-1 付着細菌と *P. paucimobilis* の割合

| | |
|--------|-------------------------------------|
| CASE 1 | 付着細菌のみ |
| CASE 2 | 付着細菌+ <i>P. paucimobilis</i> (10%) |
| CASE 3 | 付着細菌+ <i>P. paucimobilis</i> (50%) |
| CASE 4 | 付着細菌+ <i>P. paucimobilis</i> (100%) |
| CASE 5 | <i>P. paucimobilis</i> +付着細菌 (50%) |
| CASE 6 | <i>P. paucimobilis</i> +付着細菌 (10%) |
| CASE 7 | <i>P. paucimobilis</i> |

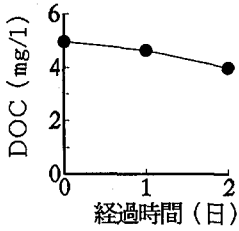


図-4 CASE 1における有機物分解

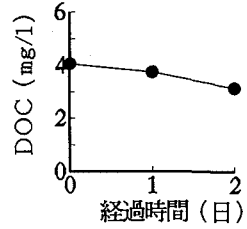


図-8 CASE 5における有機物分解

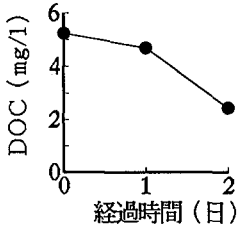


図-5 CASE 2における有機物分解

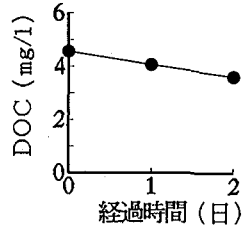


図-9 CASE 6における有機物分解

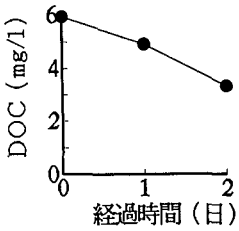


図-6 CASE 3における有機物分解

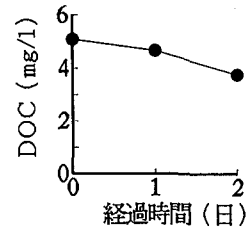


図-10 CASE 7における有機物分解

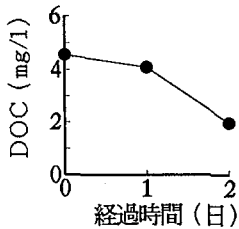


図-7 CASE 4における有機物分解

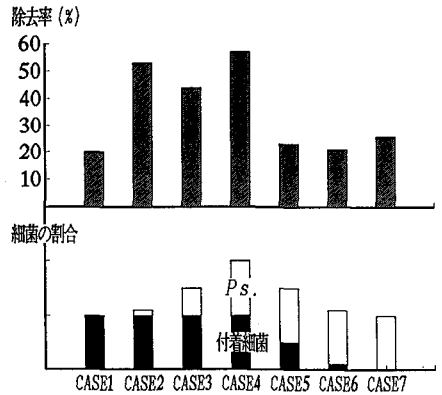


図-11 細菌の混合割合と有機物除去率

の細菌群の有機物分解活性を促進，増強する働きをもつことが明らかとなった。本実験結果は，自然に増殖した細菌群に対し，細菌数の割合として10%程度の *P. paucimobilis* を添加することで，有機物の除去率を2~3倍に増大させることが可能であることを示している。

このように特定の細菌と他の細菌が共存する環境下での目的物質に対する生分解性，資化性が促進される現象は，異なる細菌同志の共生分解として報告されている

(Skryabinら, 1980)。ここで得られた知見は，海水中の有機物に対する *P. paucimobilis* と混合培養系内の他の細菌との共生分解として理解することができる。一方，単一の細菌の挙動を見極めつつ，その混合培養系全体を

把握するという考え方は、ポピュレーションダイナミクス“個体群の動態”として、生物処理の分野で注目され、研究が進められている(森, 1992)。今後はこうした視点で研究を進めることが課題となろう。

この現象を仮に、何らかの方法で活用できるとすれば、礫間生物膜法などの浄化法では十分な浄化効果が期待できなかった海水中の有機物の分解・除去を効率的に行わせることが可能となる。そこで、つぎのようなプラント実験を試みた。

4. 分解菌を活用した砂層浸透実験

P. paucimobilis の海水浄化への利用性を検討するために、*P. paucimobilis* を砂に付着させ、その付着細菌を利用する礫間生物膜法に類似した室内砂層浸透実験を行った。ここで砂層を用いたのは、実験装置内に細菌を確実に保持しておくためである。

4.1 実験方法

実験装置は、図-12 に示すような、直径 5 cm、高さ 100 cm のアクリル製縦型円筒水槽を用い、貯水槽にはサーモスタット付属のヒーターを設置し、水温を $24 \pm 1^\circ\text{C}$ に保持した。

実験は、砂層(砂層厚 70 cm)における海水の滞留時間を約 2.8 時間として、海水 12 l を貯水槽底部の流量調整コックより一定流量で 24 時間かけて流入(約 560 ml/h)させた。実験条件をまとめて表-2 に示す。ここで用いた現地砂は、潮間帯に小松海岸の汀線付近より持ち帰った直後の沿岸砂であり、自然に生育した細菌群を含むものである。ひとつはこれをそのまま用いている。一方、滅

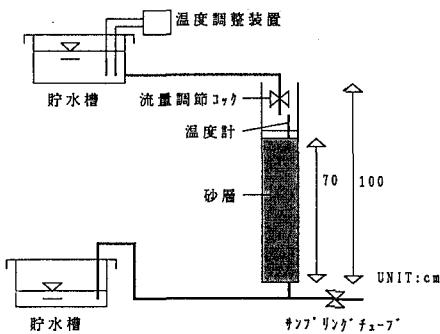


図-12 実験装置

表-2 実験条件

| | |
|-----------|--------------------------|
| 処理水量 | 12l |
| 試料水の有機物濃度 | DOC 4.5~5.0mg/l |
| 砂層内の流速 | 0.25m/h |
| 砂層内の滞留時間 | 2.8h |
| 砂層温度 | $24 \pm 1^\circ\text{C}$ |

菌 (175°C , 3.5 時間の乾熱滅菌) した現地砂に、*P. paucimobilis* を実験室内で十分に定着させたものを他のケースとし、現地砂のみの場合と比較した。

また、実験に用いた海水は、沿岸海水を、グラスファイバーフィルター(アドバンテック GS-25) でろ過し、懸濁物質を除去したものである。

4.2 実験結果

有機物濃度を通水開始から経時的に測定した結果を図-13 に示す。2つのケースともに実験開始直後から有機物の減少が認められる。本実験は一過性の通水実験であり、浄化能力の比較は除去率がほぼ安定した 24 時間時点で行う必要がある。24 時間後の DOC の除去率は、現地砂のみの場合が 29%、現地砂+*P. paucimobilis* で 44% となっており、後者の有機物の除去率が、5 割程度大きな値となった。このことから、*P. paucimobilis* を定着させた砂礫を接触材として、砂層浸透実験を行った場合においても、前節と同様に、*P. paucimobilis* が共存することによって、砂層内における他の細菌群の有機物分解活性が増強されたことがわかる。

24 時間時点における流出水の DO と pH の値を、流入水の値とともに表-3 に示す。また、このときの砂層内の

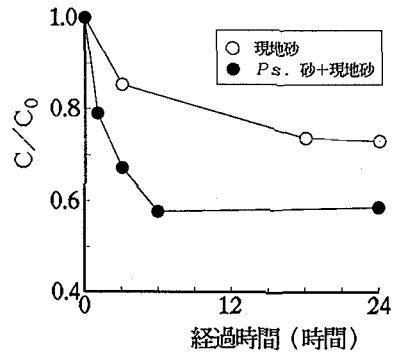


図-13 砂層浸透実験における有機物濃度の経時変化

表-3 24時間時点における DO 値と pH 値

| | DO (mg/l) | pH |
|---------|-----------|-----|
| 流入水 | 9.4 | 8.0 |
| 現地砂 | 7.8 | 7.7 |
| Ps.+現地砂 | 8.0 | 7.8 |

表-4 24時間時点における砂層内細菌数と流出水中の細菌数

| | 砂層内細菌数 (CFU/g) | 流出水中細菌数 (CFU/ml) |
|---------|-------------------|-------------------|
| 現地砂 | 1.5×10^5 | 8.0×10^4 |
| Ps.+現地砂 | 1.4×10^5 | 5.8×10^4 |

細菌数および流出水中の細菌数を表-4に示す。砂層内細菌数は、砂の乾燥重量1gあたりの付着細菌数を表している。本実験においては、DO値およびpH値はわずかに低下したが、その量は小さく、現地砂のみの場合と現地砂+*P. paucimobilis*の場合との差も明瞭ではなかった。また表-4から、砂層内に付着している細菌数および流出水中細菌数で両者を比較しても大きな差は認められなかった。特に、現地砂に*P. paucimobilis*を付着させたケースにおいて、*P. paucimobilis*の漏出がそれほどおきっていないことがわかった。

本実験は、*P. paucimobilis*を混合系で活用することが有効な手段であることを示し、礫間生物膜法では、分解・除去が困難とされる溶存態有機物に対する分解性を大きく改善できることを示したものと重要な意味をもつ。今後は、実規模に近い装置、また粒径の大きな礫などを用いた実験を行うことが課題である。

5. 結 言

本研究で得られた成果を要約する。

1) 環境要因の変化による*P. paucimobilis*の有機物分解活性に与える影響を調べた結果、塩分濃度の変化による顕著な差異はみられなかったが、pHについては、pH 7~8で、また、水温については、20°C以上において、有機物の分解が活発であることがわかった。

2) 混合培養系における*P. paucimobilis*の有機物分解特性を調べた結果、*P. paucimobilis*には、直接有機物

を分解する他に、他の細菌群の有機物分解活性を著しく増強させる作用があることがわかった。

3) 沿岸砂に*P. paucimobilis*を定着させた砂礫を接触材として、室内砂層浸透実験を行った結果、*P. paucimobilis*が砂層内で積極的に有機物の分解に関与し、砂層内における他の細菌群の有機物分解性が著しく増強された。この結果、*P. paucimobilis*は単独で使用するより、むしろ混合培養系で活用する方が有効であることがわかった。

参 考 文 献

- 伊藤禎彦・村上仁士・細井由彦・板東広之 (1993): 海水中難分解性有機物の分解微生物の探索に関する研究, 海岸工学論文集, 第40巻(2), pp. 1056-1060.
- 小田一紀・貫上佳則・重松孝昌・大屋博史・綱 潔之・倉田克彦 (1992): 礫間生物膜の海水浄化効果と現地へのその応用に関する研究, 海岸工学論文集, 第39巻(2), pp. 991-995.
- 河合 章 (1988): 内湾水域における底質の有機汚濁と浄化, 海洋科学, Vol. 20 No. 2, pp. 117-123.
- 長谷川武治 (1975): 微生物の分類と同定(下), 学会出版センター, pp. 133-134.
- 毛利光男・須田有輔・上原 功・門倉伸行・田中裕作・細川恭史 (1993): 汚濁海水浄化における礫間接触水路内の抑留物の分布と閉塞について, 水環境学会誌, Vol. 16, No. 7, pp. 516-525.
- 森 忠洋 (1992): ポピュレーションダイナミクスと環境浄化, 水環境学会誌, Vol. 15 No. 9, 557 p.
- Skryabin, G. K., L. A. M. Golovleva 著, 福井三郎監訳 (1980): 微生物による有機化合物の変換, 学会出版センター, 389 p.