

海水浄化細菌の担体付着特性と水環境中における生残性

伊藤 禎彦*・村上 仁士**・落合 道和***・杉本 朋哉***

1. 緒 言

海水交換性の悪い閉鎖性内湾などにおける汚濁海水を直接浄化する方法として礫間生物膜法が着目され、研究開発が進められてきた。浄化の対象となっているのは、濁質、窒素、リン、有機物などであるが、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いる（小田ら、1992；毛利ら、1993）。

著者らは、これまでに海水中の有機物を積極的に分解・除去する方法を探ってきた。まず、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* を見出した上で（伊藤ら、1993）、これを活用するための基礎的検討を行った。その結果、*P. paucimobilis* には、有機物分解に直接的に関与しているほかに、他の細菌群と共同して有機物分解活性を促進、増強する働きを持つことを明らかにした（伊藤ら、1994）。すなわち、自然に生育している細菌に対し、細菌数の割合として10～100％程度の *P. paucimobilis* を添加することができれば、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た。

本研究は、以上の知見をふまえ、*P. paucimobilis* を工学的に活用する際の実際的な課題について系統的な検討を行ったものである。すなわち、*P. paucimobilis* をいかに担体に付着・定着させるか、また付着した菌が剥離したり、実際の水環境中で淘汰されたりすることはないかなどについて検討した。

2. *P. paucimobilis* 数の測定法に関する検討

本研究は、*P. paucimobilis* が自然に生育した細菌群と共存しつつ、いかに付着し、生残するかを調べることに主眼がある。しかし、この検討のためには多種類の細菌が混合している試料において、その中の *P. paucimobilis* 数だけを測定できる技術が必要である。混合菌中の特定細菌だけを測定するためには、免疫学的方法や遺伝子工学を応用した方法がすでに開発されている。しかし、こ

れらは必ずしも簡便な方法ではないため、本研究では、以下に示すような近似法を開発することとした。

まず、自然生育の混合菌群と *P. paucimobilis* の菌液をそれぞれ作製するが、このときの菌数は、表-1に示すAnderson培地に生育するコロニー数としてほぼ同数となるようにする。この2つの菌液を混ぜた混合菌群中の *P. paucimobilis* 数を測定するためには、表-2に示す炭素化合物利用性試験培地に濃縮海水（伊藤ら、1993）を加えたもの（以下、濃縮海水培地という）を用いて、近似的に測定する方法を採った。このとき濃縮海水培地で *P. paucimobilis* のみがコロニーを形成するように、濃縮海水培地に添加する有機物量について検討した。

P. paucimobilis と混合菌は、それぞれ単独でAnderson培地により菌数を測定した。一方、両者を混合させて作製した菌液について、濃縮海水によってTOC量を、40, 30, 20, 10, 0 mg/lに調整した濃縮海水培地を用いて菌数を測定した。結果を図-1に示す。寒天培地中に有機物が含まれない場合（TOC 0）、細菌は有機物を利用できないのでコロニーを形成する細菌は少ない。有機物が10, 20 mg/lと増大するにしたがって、細菌は有機物を利用して増殖し多くのコロニーを形成することがわかる。しかし、有機物濃度をさらに増大させ30, 40 mg/lとすると逆にコロニー数は少なくなっている。本研究の場合、その濃縮海水の作製方法から、濃縮海水中的有機物は、難分解性のものが主体である。したがって、その濃度が高いと細菌の活性を阻害することが考えられる。TOC＝

表-1 Anderson 培地の組成

ペプトン	2.5 g
酵母エキス	2.5 g
FePO ₄	0.1 g
蒸留水	1000 ml
寒天	15 g

表-2 炭素化合物利用性試験培地の組成

NH ₄ NO ₃	1.0 g	蒸留水	1000 ml
KH ₂ PO ₄	1.0 g	寒天	15 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5 g		
KCl	0.2 g	pH	7.2

* 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

*** 学生会員 徳島大学大学院 工学研究科建設工学専攻

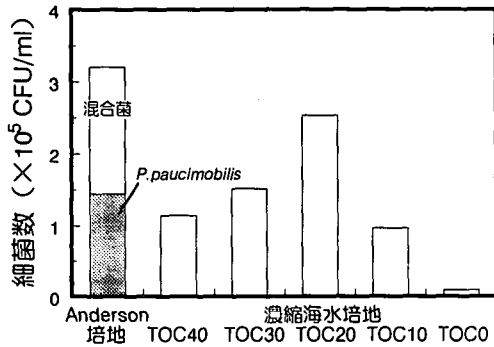


図-1 濃縮海水培地による *P. paucimobilis* の測定
(TOC 10 とは、TOC 10 mg/l の濃縮海水を含む寒天培地を示す。)

30 mg/l の濃縮海水培地で培養した場合の *P. paucimobilis* 数が Anderson 培地で培養した場合の *P. paucimobilis* 数に最も近い。つまり、TOC で 30 mg/l の濃縮海水を含む寒天培地では、*P. paucimobilis* 数にほぼ相当する数の細菌がこの濃度の有機物に対して耐性を持ち、有機物を利用して増殖することができたと推測できる。さらに、TOC を 40 mg/l としてしまうと今度は、*P. paucimobilis* の中でも活性が阻害されるものが現れ、それらを測定することができなくなる。以上の結果、炭素化合物利用性試験培地に添加する濃縮海水の TOC を 30 mg/l として、そこに形成されるコロニー数を計測することにより、混合菌中の *P. paucimobilis* 数を近似的に測定できるものと考えられる。

3. 分解細菌の担体付着実験

3.1 実験方法

試料水は、徳島県小松海岸の海水を採水し、グラスファイバーフィルター（アドバンテック GS-25）でろ過したものを用いた。実験装置は、図-2 に示した隙間接触酸化模型水路（幅 100 mm × 長さ 650 mm × 水深 80 mm）を用いた。水路内には粒径 10 mm 程度の砂利を敷き詰めた。この砂利は小松海岸沿岸より採取したものであるが、これにはすでに自然に生育した微生物群が付着しているとみなした。定量ポンプにより、3.5 l の試料海水を水路内に循環させ、滞留時間は 4 時間（断面平均流速 0.125 m/hr）とした。このとき実海水が水路内に均等に流れるように上流側の整流板には、縦横均等に穴をあけてある（直径 7 mm, 20 個）。この穴は整流板面積に対して 10 % 程度である。試料海水に *P. paucimobilis* を約 10^4 CFU/ml となるように注入して、これが砂利に付着、定着するかを調べた。水路は暗条件とし、水温は 20°C とした。実験条件をまとめて表-3 に示す。

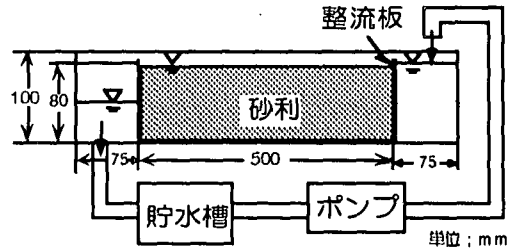


図-2 実験装置

表-3 付着実験条件

試料海水量	3.5 l
pH	8.3
実用塩分	32.0
DOC	3.2 mg/l
滞留時間	4時間
平均断面流速	0.125 m/hr
水温	20°C
砂利粒径	10 mm
水路内砂利空隙率	45%

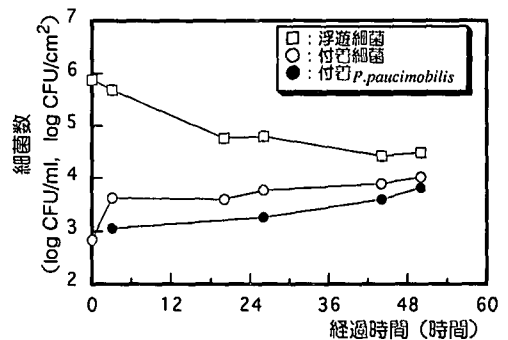


図-3 *P. paucimobilis* の砂利への付着

3.2 実験結果

結果を図-3 に示す。浮遊細菌数は CFU/ml、付着細菌数は砂利表面に対する CFU/cm² で表してある。●付着 *P. paucimobilis* 数とは、○付着細菌の中の *P. paucimobilis* の数を示す。海水を流し始めて 3 時間ほどで、付着細菌が急激に増加していることから、*P. paucimobilis* も初期の段階に付着するものと考えられる。また、その後も浮遊細菌数は減少する一方、付着細菌数は緩やかに増加しており、付着が続いていると考えられる。また、付着細菌数の構成比をみると、*P. paucimobilis* 以外の混合菌に対する *P. paucimobilis* の割合は 30~100 % の範囲であった。この割合は、*P. paucimobilis* が効率的に働く範囲である 10~100 % (伊藤ら, 1994) 内にあり、*P. paucimobilis* を付着させて作製した砂利には高い有機物除去効果が期待できる。

3.3 カルシウムイオンの影響

上述の実験では、菌体が担体に物理的に捕捉されることの他に、細菌が分泌する菌体外高分子により、菌体が担体上に定着することを期待している。一方、菌体外に分泌された多糖やタンパク質のような高分子は、カルシウムなどの多価の金属の架橋作用により、凝集することが報告されている(宮ら, 1991)。そこで、金属イオンが細菌の担体付着に対してどのような影響を与えるか検討を行った。ここでは、金属イオンとして塩化カルシウム(CaCl_2)を用いた。

a) 実験方法

200 ml 三角フラスコにろ過済み海水を 100 ml 入れ、砂利を 10 個程度入れた。砂利は、粒径 10 mm 程度で高圧蒸気滅菌を行い細菌群が付着していないものを使用した。ここに *P. paucimobilis* と混合菌(海岸構造物より採取した細菌群)を約 10^4 CFU/ml ずつ添加した。CASE 1 では塩化カルシウムを 3.3 g/l 添加し、CASE 2 では添加しなかった。実験条件を表-4 に示す。培養はスターラーで攪拌しつつ、25°C、暗所で行った。

b) 実験結果

結果を図-4、図-5 に示す。図-4 は砂利に付着した全体の細菌数、図-5 は付着した菌のうちの *P. paucimobilis* のみの数を示す。図-4 から、全体の細菌数を比

表-4 担体付着実験の条件

CASE 1	混合菌 + <i>P. paucimobilis</i> (CaCl_2 3.3 g/l 添加)
CASE 2	混合菌 + <i>P. paucimobilis</i>

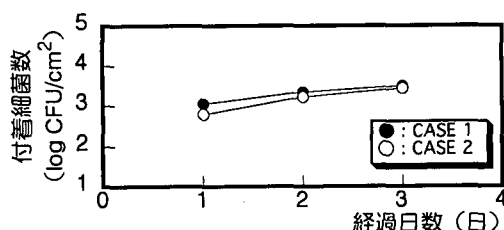


図-4 担体付着した細菌数

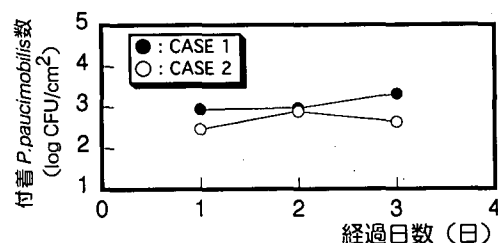


図-5 担体付着した *P. paucimobilis* 数

較すると、カルシウムイオンが共存する CASE 1 の方が CASE 2 の 2~1.3 倍多く付着しており、カルシウムイオンを添加することにより細菌の付着、定着性をやや改善できることがわかる。しかし、その効果が顕著でないのは、海水中にはすでにカルシウム 0.42 g/l、マグネシウム 1.3 g/l などが金属イオンの形で含まれている(小山ら, 1972) からであると考えられる。

付着した細菌の割合をみると、カルシウムの含まれていない CASE 2 は、混合菌と *P. paucimobilis* は 4:1 程度であり、CASE 1 は 1:1 程度である。図-5 から 1 日後の *P. paucimobilis* 数をみると CASE 1 は、CASE 2 の 3 倍の *P. paucimobilis* が付着しており、これらのことからカルシウムには *P. paucimobilis* の付着を促進させる効果があると考えられる。

4. 細菌付着担体を用いた浄化実験

つぎに、前節で使用した細菌群の付着した担体を用いて海水の有機物分解に対する効果について調べた。

4.1 実験方法

実験装置は第 3 節で用いた模型水路を使用し、付着実験終了後、水路内の海水を交換して実験を行った。試料海水を表-5 に示すが、これは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。また、実験条件を表-6 にまとめて示す。CASE 1 で用いた砂利は、小松海岸から粒径 10 mm 程度のものを採取したものであり(現地砂利)、CASE 2, 3 は付着実験で用いた砂利(混合菌と *P. paucimobilis* が付着している)を用いた。本実験では浄化効果がいかに発揮されるかを調べるのが第一の目的であるため、滞留時間はまず第 3 節の実験と同じ 4 時間(CASE 1, 2)とし、CASE 3 はその 1/2 の 2 時間とした。

4.2 実験結果

有機物濃度を経時的に測定した結果を図-6 に示す。

表-5 試料海水の条件

試料海水量	3.5 l
pH	8.0
実用塩分	32.0
DOC	8.0~9.0 mg/l
水温	20°C

表-6 浄化実験の条件

CASE 1	現地砂利 滞留時間 4 時間 (断面平均流速 0.125 m/hr)
CASE 2	現地砂利 + <i>P. paucimobilis</i> 滞留時間 4 時間 (断面平均流速 0.125 m/hr)
CASE 3	現地砂利 + <i>P. paucimobilis</i> 滞留時間 2 時間 (断面平均流速 0.250 m/hr)

すべてのケースにおいて、有機物濃度の減少がみられる。まず、滞留時間が4時間のケースで、*P. paucimobilis*が付着しているCASE2と付着していないCASE1を比較すると、50時間後のDOCの除去率は、CASE1で32%、CASE2は53%となっている。担体に*P. paucimobilis*が付着しているCASE2はCASE1に比べ1.7倍の分解能を有することがわかった。このことから、自然に生育した細菌群が付着している担体に*P. paucimobilis*を加えることにより、有機物の除去効果が高くなることがわかった。

また、滞留時間が4時間(CASE2)と2時間(CASE3)のケースの除去率はそれぞれ53%、68%であり、CASE2よりCASE3のほうが除去率が高いことがわかる。これは、流速が大きい方が、砂利表面の境膜が薄くなる結果、砂利表面の細菌への物質の供給が効率よく行われているためであると考えられる。

水路内の細菌数を測定した結果を図-7~9に示す。図-7は浮遊している全体の細菌数であり、図-8は、砂利に付着した全体の細菌数、図-9は、*P. paucimobilis*数を示している。全体的に大きな菌数の変化はない。図-7より、浮遊菌数がやや減少傾向にあるのに対して、図-8より、付着菌数がやや増加あるいは一定数を保っている。すなわち、細菌は担体上に定着しつつ、有機物を分解していると推察できる。

また、溶存酸素(DO)、pHも同時に測定した。その結果、pHはすべてのケースにおいてpH 8.0前後で一定であった。また、DO消費量は50時間後において、CASE1で2.8 mg/l、CASE2は3.9 mg/lであったが、CASE3ではほとんど変化がなかった。有機物除去率が大きい方がDO消費量も大きいといえるが、CASE3ではCASE1、2に比べて流速が大きいため再曝気の効果が大きく、DO変化がみられなかったと考えられた。

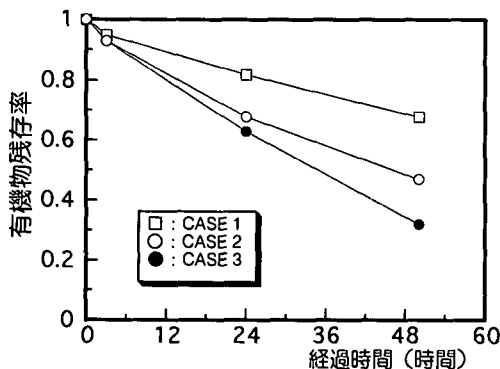


図-6 有機物濃度の経時変化

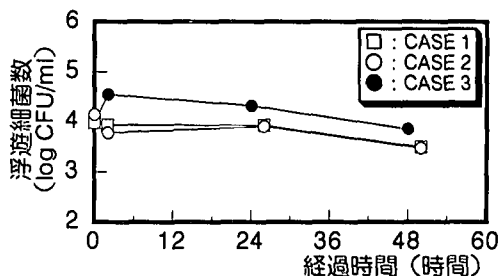


図-7 浮遊細菌数

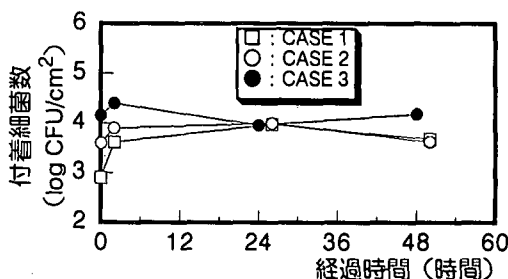


図-8 付着細菌数

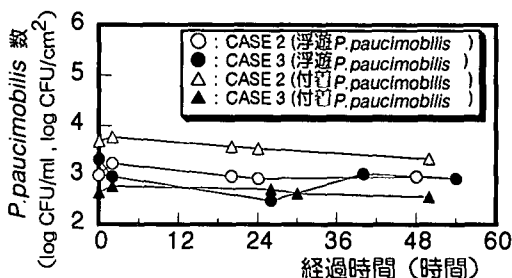


図-9 *P. paucimobilis* 数

5. 担体付着細菌の剝離、生残性に関する検討

細菌群を付着させた担体を速い流れの中におき、その剝離特性を調べた。また、*P. paucimobilis*付着砂利を実際の沿岸水に対して利用した場合、*P. paucimobilis*がどの程度、生残するかについて調べた。

5.1 実験方法

混合菌と*P. paucimobilis*が付着している砂利(粒径10 mm)を用いた。本実験でも第3節で用いた模型水路(図-2)を使用した。試料水はろ過済み海水を用いた。滞留時間を1分(断面平均流速30 m/hr)とし、暗所、水温20°Cの条件とした。

また、海水中での生残性を調べる実験では、細菌群(*P. paucimobilis*を含む)が付着した担体を円筒系の金網(直径200 mm、高さ200 mm、穴7 mm×7 mmの正方形)に、ふたをし、消波ブロックの間隙中に浸漬した。浸

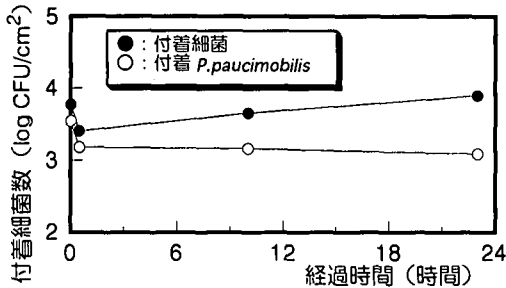


図-10 剝離性実験における菌数変化

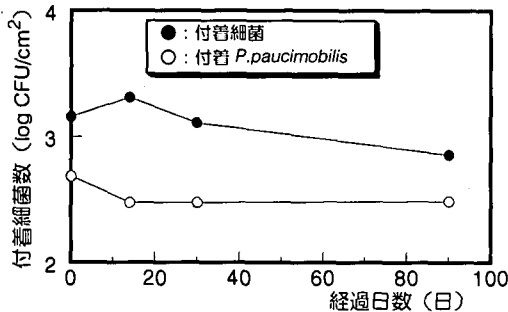


図-11 環境水中における砂利付着細菌の生残性

漬期間は1995年1月～1995年4月で、期間中の水温は7～12℃、pHは8.2～8.7、実用塩分35.0～37.0であった。浸漬を始めて14日、30日、90日後に引き上げて、砂利表面に付着している菌数、*P. paucimobilis*数を測定した。

5.2 実験結果

細菌の剝離性実験結果を図-10に示す。混合菌および*P. paucimobilis*は、速い流れのため、付着の力が弱いものは初期に剝離する。しかし、付着の力が強いものは剝がれず、また、再び付着する菌も存在すると考えられ、この流速条件では菌数はそれ以上減少することはなかった。減少した*P. paucimobilis*数は50％程度であった。本実験では、流速条件は1ケースのみであるが、今後は摩擦速度などを定量化し、菌体の定着・剝離との関係を明らかにする必要がある。

海水中での付着細菌の生残性を図-11に示す。*P. paucimobilis*が14日後までの間に6割程度に減少している。しかし、減少し続けることはなく、その後は安定している。この結果、*P. paucimobilis*だけが剝離したり淘汰されたりすることはなく、付着させた*P. paucimobilis*は、他の細菌群と同様に定着していると考えられる。砂利への*P. paucimobilis*の付着割合は混合菌数に対

して、約20～70％の範囲であり、*P. paucimobilis*が有効に働く範囲を維持していた。

6. 結 言

本研究は、混合菌中の*P. paucimobilis*を測定する方法を確立した上で、有効菌*P. paucimobilis*を実際に活用する際に課題となる点について検討を行ったものである。以下、得られた成果を要約する。

1) 自然に生育した微生物が付着している沿岸の砂利に対して*P. paucimobilis*を付着させる実験を行った結果、初期付着は3時間以内に起こり、その後も付着は継続していた。また、混合菌に対する付着*P. paucimobilis*の割合は、*P. paucimobilis*が効果的に働く範囲にあった。

また、*P. paucimobilis*の付着性を高めるためには、水中にカルシウムを添加することが有効であることがわかった。

2) 礫間接触酸化模型水路において、有機物の分解性を調べた結果、現地砂利だけのものより、現地砂利に*P. paucimobilis*を付着させた担体の方が、1.7倍の有機物分解能を有していた。また、滞留時間が2～4時間の範囲内では、滞留時間が短い方が有機物除去に有効であった。

3) 速い流れを与えて細菌の剝離性を調べた結果、実験に用いた流速条件下では、50％程度の*P. paucimobilis*が定着していた。また、付着細菌の環境水中での生残性を調べた結果、*P. paucimobilis*だけが剝離したり淘汰されたりすることはなかった。

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.
- 伊藤禎彦・村上仁士・細井由彦・板東広之・落合道和 (1994): 海水中有機物に対する効率の分解菌の活用方法に関する研究, 海岸工学論文集, 第41巻 (2), pp. 1076-1080.
- 小田一紀・貫上佳則・重松孝昌・大屋博史・網 潔・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.
- 小山忠四郎・半田暢彦・杉村行勇 (1972): 湖水・海水の分析, 講談社, pp. 259-261.
- 宮 晶子・安井智子・三島浩二・栃久保英二 (1991): 好気性上向流式汚泥床法 (AUSB法) における菌体外高分子の挙動—菌体外高分子の機能を活用した排水処理—, 水質汚濁研究, Vol. 14, No. 10, pp. 665-673.
- 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.