

**1. はじめに** 著者らは、回転円板(RBC)付着生物膜内には硝化細菌と通性嫌気性の脱窒細菌および好気性の他栄養性細菌が混在する事を確認し、膜内の環境条件によつていずれの場所においても硝化、脱窒、有機物酸化(硝化、脱窒)同時反応が十分起こり得ることを報告した。ただし、細菌数については最適条件で培養測定したものであり、生物膜内の潜在的細菌数を示したものにすぎない。したがつて、付着生物膜内の各種細菌活性がどのような分布状態で共存するかは生物膜法の浄化機構を明らかにするうえで重要である。本論文ではRBC付着生物膜の成長過程と生物膜内における他栄養性細菌、硝化細菌、脱窒細菌の深さ方向の活性度分布および電子顕微鏡による生物膜内部の観察結果に考察を加えて報告する。

**2. 実験装置および実験方法** 実験装置は図-1に示すような実水容量 2.65 l の槽と直径16 cmのアクリル製円板より構成されている。流向は中心軸と直角方向、円板回転速度は7rpmとした。円板は図に示すように付着生物膜採取時に一部分(10x60mm)ごとと抜き取れるように加工してある。実験方法は都市下水を回転円板装置へ供給し約一ヶ月間の馴養期間を置き、円板上に生物膜が充分付着生育した時点で生物膜を支持体の一部分ごとと抜き取り、そのままマイクロスライサー(D.S.K Microslicer Model DTK-1000)で表面から20~100 μmの厚さにスライス状に切断以下、Cuttingと呼ぶ)した。Cuttingした膜片を3グループに分けて、それぞれのグループをホモジナイザーで均一化した後回分実験を行った。付着生物膜を電子顕微鏡で写真撮影するための試料作成は支持体の一部分ごと4%のグルタルアルデヒド液中に2時間冷暗所で浸した後、pH 0.2 Mの緩衝液でグルタルアルデヒドを洗い流した。その後、イソプロピルアルコール中に浸し、臨界点乾燥(Critical Point Drying; CPD)器で乾燥後、エポキシ樹脂で包埋した。その膜断面と固定だけ行った試料を走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope; SEM)と透過型電子顕微鏡(Techniques Electron Microscope; TEM)により写真撮影した。TEM試料については、ミクロトームにより超薄切片(50nm)を作製し、電子線照射に対する補強のためカーボン蒸着、SEM試料は金蒸着を行った。電子顕微鏡用の試料作製は電子顕微鏡実験法によつた。

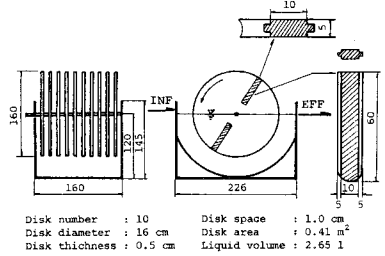


図-1 回転円板実験装置

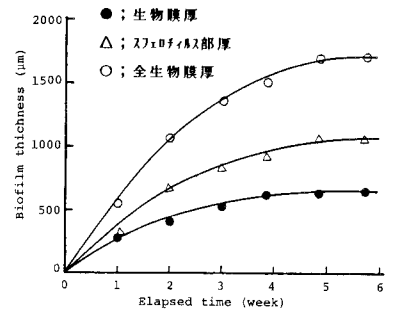


図-2 付着生物膜厚と経時変化の関係

**3. 結果と考察** **3-1. 生物膜の成長過程** 宮崎市終末処理場の初沈流出水を原水とした場合の付着生物膜厚の経時変化を図-2に示す。運転条件はNH<sub>4</sub>-N負荷; 2.16 g/m<sup>2</sup>d, TOC負荷; 4.2 g/m<sup>2</sup>d, 水温; 11~17°Cの範囲で冬期の1月~2月に行ったものである。膜厚測定は運転開始後一週間ごとに付着生物膜を3枚円板体から抜き取りマイクロスライサーでCuttingした。なお、膜厚は3回Cuttingした平均値で示した。付着生物膜の外観は糸状細菌(スフェロチルス部)が絡み合っている部分とその下の膜状部から成り、膜のCuttingは生物膜を水に浮かせた状態でを行った。スフェロチルス部、膜状部とも表面に凹凸がありこの凸部にマイクロスライサーの刃が最初に接触した所を膜表面とした。Cuttingされた生物膜片は次のような外観を呈した。①掻取られた状態で膜状とはならない表面の凹凸部(表層部

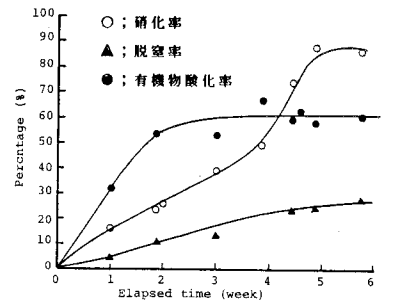


図-3 RBC処理効率と経時変化の関係

と呼ぶ)。②膜状になつているが均一な密度となつていない膜片(中層部と呼ぶ)。③膜状となりほぼ全体が均一な密度となつている膜片(底層部と呼ぶ)。図ではスフェロチルス部より下の膜状になつている部分を膜厚とし、それにスフェロチルス部厚を加えたものを全厚とした。ただし、スフェロチルス部は水に浮かせた状態であるため実際よりはかなり厚く測定されていると考えられる。膜厚は一週間目で $300\mu\text{m}$ , 4週間目で $620\mu\text{m}$ まで成長しその後ほぼ一定となっている。図-3は図-2の膜厚測定時における有機物酸化率, 硝化率, 脱窒率の経時変化を示す。有機物酸化率は運転開始後2週間目でほぼ定常状態となつたが硝化率が定常になるには5週間程度を要した。脱窒率は付着生物膜厚の増加に伴って増大し, 最大30%の脱窒率となつている。

**3-2. 電子顕微鏡による生物膜内部の観察** 写真1~3に都市下水で馴養した場合の付着生物膜のTEM, SEM写真を示す。写真1はエポキシ樹脂で包埋した付着生物膜断面のSEM写真であり, 写真からも生物膜表面は凹凸があることがわかる。写真から生物膜厚を測定すると $700\mu\text{m}$ となり, マイクロスライサーによる膜厚測定値とほぼ一致する。このことより試料作製による固定, CPD, 包埋の影響が少ないこと分かる。写真2~3は樹脂で包埋した生物膜断面をマイクロトームで $50\text{nm}$ 程度にCuttingしたTEM写真を示す。生物膜断面には写真2に見られるように,  $1\times 2\mu\text{m}$ 程度のかん菌が多数確認される。また, 別の断面(写真3)では原生動物が多数存在しており, その一部は細胞膜内に多数の球菌を補食している。

**3-3. 生物膜内の細菌活性度分布** 付着生物膜内の硝化, 脱窒, 有機物酸化活性を調べるため, 表層, 中層, 底層部の膜片をそれぞれホモジナイザーで均一化した後, 都市下水を $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した下水を基質として回分実験を行った。DOは充分存在する状態で,  $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{TOC}$ の経時変化を追跡した。図-4, 5は生物膜の表層, 中層, 底層部における $\text{NH}_4\text{-N}$ と $\text{TOC}$ の減少速度である。同種の実験を3回行い, その平均値を求め比活性度と単位微生物量当たりの基質除去速度を計算した。その結果生物膜内の表層, 中層, 底層部の有機物酸化活性度はそれぞれ $700, 616, 580\text{g}/\text{m}^3\text{h}$ , 硝化活性度は $217, 186, 219\text{g}/\text{m}^3\text{h}$ , 脱窒活性度は $188, 174, 204\text{g}/\text{m}^3\text{h}$ となった。また, 表層, 中層, 底層部の生物膜の平均厚はそれぞれ $400, 200, 130\mu\text{m}$ で, 膜密度は $37\text{mg}/\text{cm}^3, 98\text{mg}/\text{cm}^3, 102\text{mg}/\text{cm}^3$ となり, 底層部ほど密度は大きく膜構造が密な状態となつていた。

**4. おわりに** RBC付着生物膜内の細菌活性度と膜の形成速度を測定し, さらに, 電子顕微鏡により生物膜内を観察した結果次のような事が明らかとなった。1) 付着生物膜は最初比増殖速度の大きい有機物酸化細菌が増殖し, その後硝化菌が増殖し始める。2) 生物膜の密度は底層部ほど大きく, SEM写真からも底層部の方が細菌は多いことが観察された。3) 付着生物膜内の硝化, 脱窒活性はほぼ一定であったが, 有機物酸化活性は表層部ほど大きいことが判明した。今後は生物膜内の細菌活性について, さらに詳しく検討する予定である。

参考文献 1)小濱哲朗, 増田純雄, 渡辺義公, 石黒政儀; 生物膜内の細菌分布に関する研究, 土木学会西部支部講演概要集 PP, 198~199, 2(1985).  
2)増田純雄, 渡辺義公, 石黒政儀; 回転円板法における硝化, 脱窒, 有機物酸化同時反応のシミュレーション, 下水道協会誌, Vol. 23, No. 262, 3(1986).  
3)遠山益; 電子顕微鏡実験法(植物試料のための超薄切片法), 学会出版センター, 8(1983).

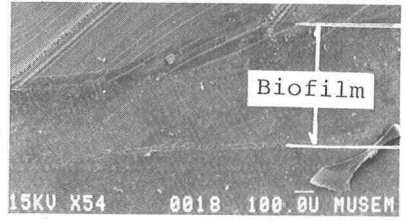


写真1 生物膜断面のSEM写真  
(倍率; 54, G.A固定, CPD, 14°包埋)

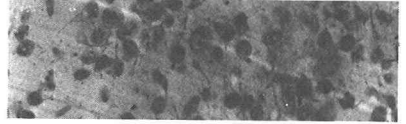


写真2 生物膜断面のTEM写真

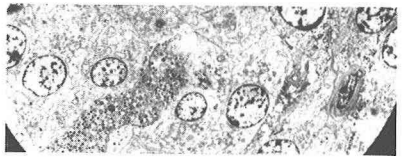


写真3 生物膜断面のTEM写真

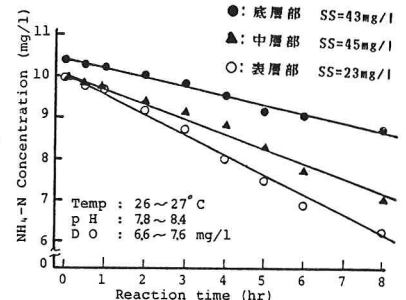


図-4  $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度と反応時間の関係

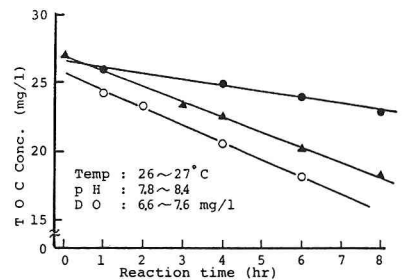


図-5  $\text{TOC}$ 濃度と反応時間の関係