

II-536

混合系生物膜内のポピュレーションダイナミクス

北海道大学工学部 正 岡部 聡 正 渡辺 義公  
宮崎大学工学部 正 増田 純雄  
パシフィックコンサルタンツ(株) 〇 正 平田 貴紅子

1. はじめに

混合系生物膜内には多種の微生物が混在し、生物学的処理の対象となる下廃水中には、多種の電子供与体及び受容体が存在する。そのため生物膜内では、共通する電子供与体または受容体と空間をめぐって微生物種間で競合が生じる。硝化を目的とする生物膜内では、硝化菌（自栄養性細菌）は他栄養性細菌と酸素と空間を競合する。両者の動力学的及び化学量論的特性により、生物膜深さ方向に細菌密度分布が形成される。生物膜の処理効率は生物膜への基質fluxで決定されるため、生物膜内の各種細菌分布は非常に重要である。一般的に、硝化菌の最大比増殖速度と収率係数は他栄養性細菌の値に比べ小さいため、硝化菌はしばしばその競合に破れ処理の失敗を招く。このように生物膜内における硝化菌の動態は他栄養性細菌を含め多くの要因に支配され、ポピュレーションダイナミクスを把握することは、安定した硝化を達成するためにたいへん重要である。本研究では、有機物とアンモニア性窒素負荷の変化による、膜深さ方向の硝化菌密度分布の変化について実験結果に考察を加えて報告する。

2. 実験装置と方法

実験装置は、半水没型完全混合RBC装置（実水容量2.35L、円板直径18cm、円板枚数10枚）である。円板は生物膜採取のために1部分（10×60mm）が抜き取れるように加工してある。生物膜の培養には種汚泥として、宮崎市木花下水処理場の最初沈殿池流出水を用いた。最初の1週間は回分式で運転し、基質補充のため2～3回液相の半分を新しい基質と交換した。円板表面に数μmの生物膜が付着したことを顕微鏡で確認後、アンモニア性窒素（ $\text{NH}_4\text{-N}$  = 20mg/L）と無機炭素を主体とする人工下水<sup>1)</sup>（C:N=0）を用いて、HRT=5時間で約2カ月間培養した。生物膜は約300μm程度に増殖し定常状態に達した。この生物膜を用いて、人工下水に酢酸をC:N=0.25、0.5となるように加え、HRT=1時間となるように流量を調節した後、経時的に液本体の三態窒素、TOC濃度と生物膜内の膜深さ方向の細菌密度分布を測定した。抜き取った生物膜はマイクロサイザー（D.S.K. DTK-1000）により膜表面から深さ方向にスライスした後、遠心分離（4000rpm, 40min.）により集菌し、高速ホモジナイザーによりホモジナイズした後、他栄養性細菌、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、脱窒細菌数の測定を土壌微生物実験法<sup>2)</sup>に従って行った。全菌数はHobbie等<sup>3)</sup>の方法によって測定した。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の測定はイオンクロマトグラフ、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の測定は下水試験法によって行った。TOCは全有機炭素アナライザー（TOC-5000, SHIMADZU）で測定した。

3. 実験結果と考察

図-1(a, b)には、流量を変化させた後の槽内三態窒素濃度の経時変化を示す。急激な有機物及びアンモニア性窒素負荷上昇による一次的な流出 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の上昇が見られたが、その後は3 mg/L程度で安定した。図-1(b)の初期9日間はポンプ操作の誤りのため、有機物負荷（CLR）は3.54 mg-C/cm<sup>2</sup>/hで所定の有機物負荷ではなく、9日目に4.72 mg-C/cm<sup>2</sup>/hになるように調節した。このため $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は

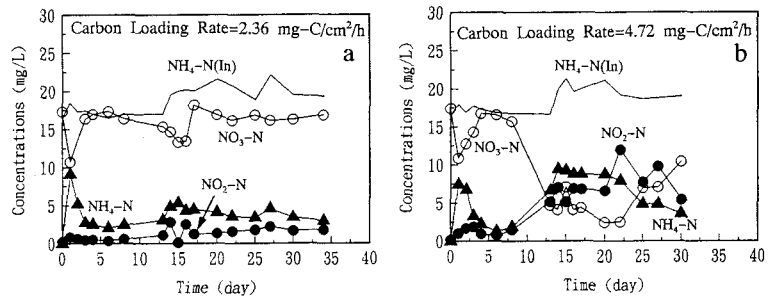


図-1 槽内三態窒素濃度の経時変化

一次的に増加した後、減少し流量調節後再び上昇した。処理は1カ月を経ても安定せず流出水中にはまだ5 mg/L程度の $\text{NH}_4\text{-N}$ が残留した。図-2は有機物負荷を2.36 mg-C/cm<sup>2</sup>/hに変化させた時の生物膜内の膜方向の細菌密度分布の経時変化である。T=0時の生物膜厚は約300μm、アンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌はそれぞれ $10^6\text{--}10^7$  cells/cm<sup>3</sup>、 $10^5\text{--}10^6$  cells/cm<sup>3</sup>程度で膜全体に様に存在した。31日後には生物膜は510μmに増殖し、表層部約200μmは軟弱な白い生物膜で覆われていた。表層部で他栄養性細菌及び脱窒細菌密度は増加し、亜硝酸酸化細菌及びアンモニア酸化細菌密度は表層部と底層部の間に密度勾配が生じる傾向にあった。脱窒細菌密度が膜中央部で減少した理由は現在明かではない。図-3は有機物負荷を4.72 mg-C/cm<sup>2</sup>/hに変化させた時の生物膜深さ方向の各種細菌密度分布の経時変化である。C:N=0で培養された生物膜(T=0)は、膜厚310μmであり黒褐色で堅固で、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌は $10^6\text{--}10^7$  cells/cm<sup>3</sup>程度膜全体に様に分布していた。他栄養性細菌は $10^8$  cells/cm<sup>3</sup>程度存在し優占種であった。7日後には、有機物負荷の増加に伴い、他栄養性細菌及び脱窒細菌の密度は膜全体で増加したが、硝化菌の密度には余り変化が見られなかった。30日後には、膜厚が2420μmに増殖し表層部900μmは白い羽毛状の生物膜で覆われ底層部300μmは黒褐色の堅固な生物膜であった。亜硝酸酸化細菌の密度は表層部から中層部で減少し、底層部では $10^6$  cells/cm<sup>3</sup>程度まで増加した。アンモニア酸化細菌も亜硝酸酸化細菌と同様に表層部で $10^7$ から $10^6$  cells/cm<sup>3</sup>に減少したにもかかわらず、底層部では $10^8$  cells/cm<sup>3</sup>と高い密度を保持した。

このように最大比増殖速度の遅い微生物は早い微生物との間に空間を競合するため、表層部で密度は減少するが、底層部では基質濃度の減少に伴い両者の増殖速度の差は小さくなり、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌はその密度を保持できる。本実験では、HRTは1時間であり液本体中のアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌濃度は無視できるオーダーであり、両者の液本体から生物膜への付着も無視できるので、生物膜内での硝化菌の動態を正しく評価できる。膜全体に硝化菌は存在するにもかかわらず、有機物負荷は $4.72\text{mg-C/cm}^2/\text{h}$ の場合、安定した硝化が得られなかった理由は他栄養性細菌が優先的に酸素を消費するためである。

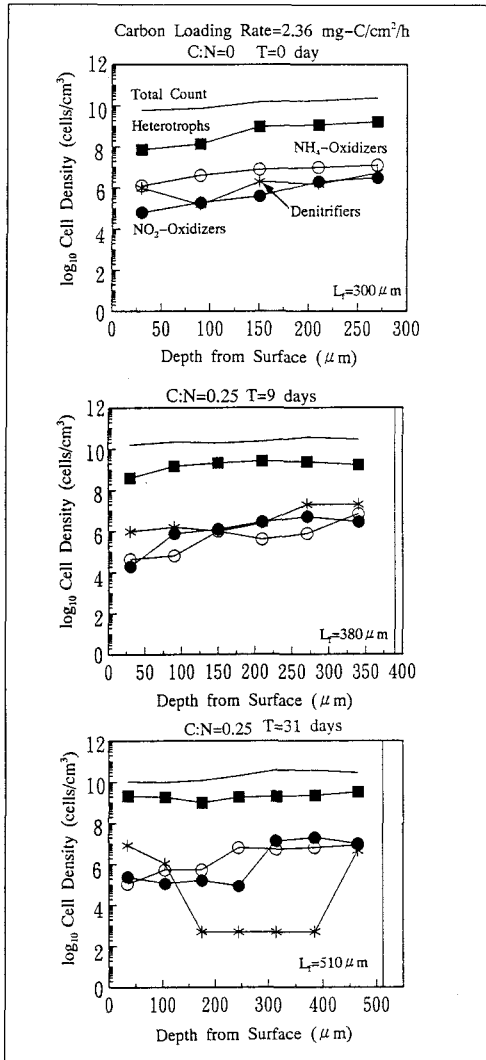


図-2 生物膜深さ方向の各種細菌分布  
(有機物負荷 =  $2.36\text{mg-C/cm}^2/\text{h}$ )

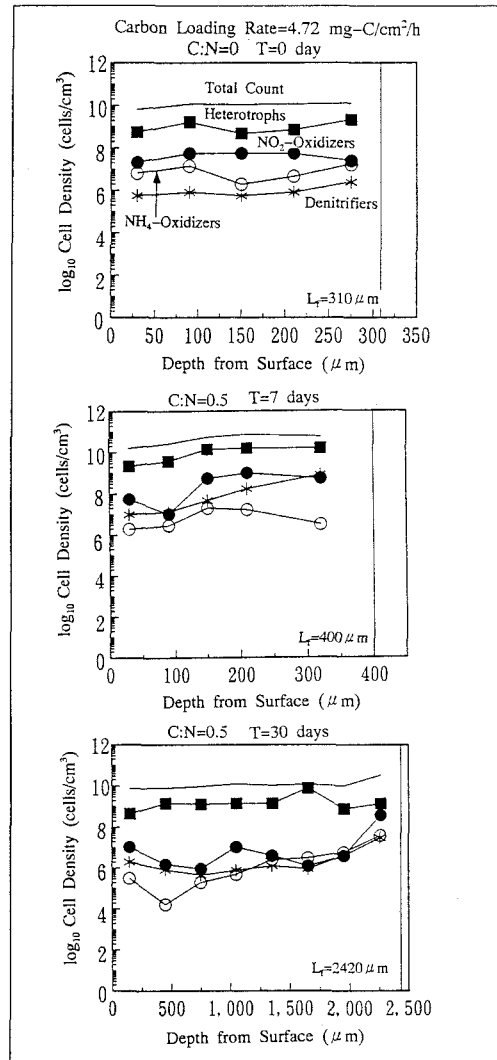


図-3 生物膜深さ方向の各種細菌分布  
(有機物負荷 =  $4.72\text{mg-C/cm}^2/\text{h}$ )

#### 4. おわりに

本研究の結論は、(1)有機物負荷に伴いアンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌は表層部から底層部へ移行した、(2)高有機物負荷では各種細菌は膜全体に分布するが、安定した硝化が得られなかった。今後の課題として、実験結果を評価するために、既存の生物膜モデルを用いたシミュレーションを行う予定である。また、硝化菌の測定は1ヶ月間ほど培養しなければならず、迅速な測定方法の開発が望まれる。

#### 5. 参考文献

- 岡部ら、生物膜形成時における細菌分布特性に関する研究、(1994) 西部支部研究発表会概要集
- 土壤微生物実験法、(1975) 土壤微生物研究会編、養賢堂
- J.E.Hobbie *et al.*, Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy, (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 33, Pp.1225-1228.