

特定有効細菌の海水中有機物分解機構 と海水浄化への活用法

村上仁士¹・伊藤禎彦²・水口裕之³・上月康則⁴・落合道和⁵

¹フェロー 工博 徳島大学教授 工学部建設工学科 (〒770 徳島県徳島市南常三島 2-1)

²正会員 工博 京都大学助教授 大学院工学研究科環境工学専攻 (〒606-01 京都府京都市左京区吉田本町)

³正会員 工博 徳島大学教授 工学部建設工学科 (〒770 徳島県徳島市南常三島 2-1)

⁴正会員 工博 徳島大学講師 工学部建設工学科 (〒770 徳島県徳島市南常三島 2-1)

⁵正会員 工修 日建技術コンサルタント (〒578 大阪府東大阪市稲葉 2-1-10)

海水中有機物の分解に優れた細菌 *Pseudomonas paucimobilis* の分解機構を把握し、その工学的利用性を検討した。まず、*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。その機構として、はじめに *P. paucimobilis* が難分解性の有機物を易分解性に変換し、ついで自然生育の混合細菌群が分解するものと推定した。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。また、*P. paucimobilis* の沿岸の砂利への付着・定着過程、およびその環境水中での生残性について調べた。さらに、砂利およびコンクリートを担体として、これに *P. paucimobilis* を付着させて浄化実験を行い、いずれも有機物分解能が高まることを示した。

Key Words : coastal seawater, rock bed contact purification, *Pseudomonas paucimobilis*, porous concrete

1. 緒言

生態系の機能を活用した水環境の改善に関する調査研究が盛んに行われている。閉鎖性の内湾や海域のような汚濁状態にある海水の水質を直接改善しようとする試みにおいても、主として礫間接触酸化法に着目した調査研究が行われてきた。

ここで浄化すべき物質は対象海域によって異なるものの、一般に、懸濁物質、窒素、リン、有機物などであり、これらを指標とした浄化作用の評価や装置の維持方法などの検討が行われてきている。これまでの研究結果からは、懸濁物質についてはこれを効率良く除去することは可能であるが、特に溶存態の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た^{1) - 3)}。ところで、海水中有機物は、本来、生物分解作用を受け難い有機物で構成されていると考える必要がある⁴⁾。著者らは、AOC (Assimilable Organic Carbon; 同化可能有機炭素) 指標を用いることにより、海水中有機物は、河川水や下水処理水などと比較して生物分解しにくいものの割合が高いことを確認した⁵⁾。

著者ら⁶⁾は、この海水中に存在する生物難分解性

の溶存態有機物に着目し、礫間接触酸化法の弱点を補うものとして、これを積極的に分解・除去する方法を開発しようと試みた。そのためにまず、海水中の難分解性有機物を効率的に分解しうる細菌として *Pseudomonas paucimobilis* を見いだした。沿岸水中あるいは海岸の砂利や構造物上の付着細菌の中に、*P. paucimobilis* がどれくらい存在するかについては明らかではない。しかし、一般にこれらの場における従属栄養細菌のうち *Pseudomonas* 属は数十%存在すると推定される^{7)・8)}。*P. paucimobilis* も一般に存在すると予想され、現時点では、本細菌を人工的に少量添加しても既存生態系に影響しないものと考えている。

本研究では、この *P. paucimobilis* の有機物分解機構を把握した上で、これを実際に利用するための基礎的な検討を行ったもので、主たる検討内容は以下の3点である。

第一に、実際にこの細菌を利用する場を考えると、*P. paucimobilis* 単独では存在し得ず、他の細菌や生物が共存することになる。本研究は、このような自然の海岸環境を考慮して、この細菌が他の細菌との共存下で、いかに有機物分解能を発揮するか、また、

その分解機構について実験的な考察を行った。第二に、この細菌を実際に活用する上での課題点について検討を行った。すなわち、特定の細菌を用いて分解を行わせるためには、細菌をある場所に保持した上で、海水がそこを通過するようにする必要がある。ここでは砂利などを *P. paucimobilis* の担体とし、そこに付着・定着させようかについて検討するとともに、付着した細菌が実際に水環境中で剥離したり、また淘汰されたりすることはないかについて調べた。第三に、*P. paucimobilis* が付着した担体のもつ有機物分解能について調べた。

なお、本研究の一部は既に報告している^{9), 10)}が、本文は、これらに新たな実験的検討を加え、再構成したものである。

2. 実験方法

(1) 特定細菌と他細菌との共存系における有機物分解特性に関する実験

この実験の目的は、種々の細菌群が共存する自然環境を考慮し、*P. paucimobilis* が、他の細菌との共存下で、いかに有機物分解能を発揮するか、およびその分解機構について調べることである。

a) 混合培養系における有機物分解能

表-1に示す炭素化合物利用性試験培地¹¹⁾(表-2に示す人工海水を成分としている)に、炭素源として、あらかじめ作製しておいた濃縮海水⁹⁾をTOC約 $4\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ となるように添加した。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、上記培地に接種し、容量300ml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℃、30分間の加熱処理を行った。試料水は、DOC $4.5\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、pH8.2、実用塩分(または単に塩分)¹²⁾32であった。

分解実験においては、まず容量200mlの三角フラスコに試料水を150ml入れ、ここに、表-3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。細菌数は、沿岸水中の細菌数¹³⁾を考慮して、 $10^4 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ オーダーに調整した。以下、表-3の実験条件について説明する。CASE 1, 5は、それぞれ付着細菌、*P. paucimobilis*のみを $10^4 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ に調整したもの、また、CASE 2, 3は、それぞれ付着細菌 $10^4 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ に対して、*P. paucimobilis*を10、

表-1 炭素化合物利用性試験培地の組成

NH ₄ NO ₃	1.0g
KH ₂ PO ₄	1.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
KCl	0.2g
人工海水	1000ml
pH	7.2

表-2 人工海水の組成

NaCl	23.5g
MgCl ₂	5.0g
Na ₂ SO ₄	3.9g
CaCl ₂	1.1g
KCl	0.66g
NaHCO ₃	0.19g
蒸留水	1000ml

表-3 付着細菌と *P. paucimobilis* の混合割合

実験CASE	混合割合
CASE1	付着細菌のみ
CASE2	付着細菌+ <i>P. paucimobilis</i> (10%)
CASE3	付着細菌+ <i>P. paucimobilis</i> (100%)
CASE4	<i>P. paucimobilis</i> +付着細菌 (10%)
CASE5	<i>P. paucimobilis</i> のみ

100%となるように添加したものである。逆に、CASE 4は、*P. paucimobilis* $10^4 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ に対して、付着細菌10%となるように細菌数を調整したものである。分解は、スターラーで攪拌しつつ、25℃、暗所で行った。有機物濃度(DOC)は、島津製作所製TOC-5000を用いて、1, 2日後に測定した。DOCは3回測定してその平均を求めたが、測定試料は1つである。

b) 有機物分解機構に関する実験

まず、上で行った実験において、分解2日後の試料水のAOC(Assimilable Organic Carbon; 同化可能有機炭素)を測定した^{5), 14)}。AOCは、従属栄養細菌の増殖からみた水質の生物学的安定性の尺度である。すなわち、多種類の有機化合物を低濃度で利用できる細菌として *Pseudomonas fluorescens* を使い、その増殖量から、水中の易分解性有機物の量を推定するものである。

つぎに、*P. paucimobilis*と混合細菌群の有機物分

表-4 高速液体クロマトグラフの分析条件

デュアルポンプ	東ソー CCPS
検出器	東ソー UV-8020
カラム	TSK gel G2500PWXL, 7.8mmID×30cm
排除分子量限界	5000D
空隙体積 (V ₀)	5.0ml
押し出し液	0.02M リン酸緩衝液, pH6.9
流量	0.8ml
試料注入量	100 μl
温度	25℃

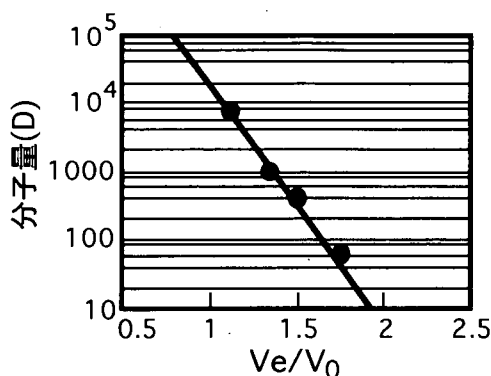


図-1 クロマトグラフの押出位置と分子量の関係

解過程を区別するため、それらの分解順序を変える以下の実験を行った。300ml 三角フラスコに、グラスファイバーフィルター（アドバンテック GS-25）でろ過した海水（DOC 4.2mg・l⁻¹, pH 7.6, 実用塩分 25）300ml 入れ、これに *P.paucimobilis* または自然生育の混合細菌群を、それぞれ 1.5×10³ CFU・ml⁻¹ となるように入れた。これをスターラーで攪拌しつつ、25℃、暗所で培養した。24時間経過した後、試料全体を 0.45 μm メンブランフィルターでろ過して細菌を除去し、今度は逆に、*P.paucimobilis* を添加して培養していた試料には混合細菌群を添加し、混合細菌群を添加して培養していた試料には *P.paucimobilis* を添加した。さらに 24 時間培養を行い、DOC 濃度の変化を測定した。

さらに、*P.paucimobilis* による有機物分解の前線で有機物の分子量がいかに変化しているかを高速液体クロマトグラフを用いて測定した。表-4 に分析条件を示す。流出水中の有機物の分子量は、まず、ポリエチレングリコールの分子量とその流出位置との関係を求め、これを用いて測定した。ポリエチレングリコール(7500, 1000, 400D)とエチレングリコール(62D)を、示差屈折計で検出し、それらの流出位置と分子量との関係を図-1 のように得た。横

軸は、流出液量 (Ve) /空隙体積 (V₀) を示している。この直線関係を用いて、つぎの濃縮海水中有機物の分子量分布を測定した。

この実験における濃縮海水中有機物の濃度は約 500mg・l⁻¹ で、表-1 に示す無機培地に入れた。これに、*P.paucimobilis* を 10⁸ CFU・ml⁻¹ を加え、25℃、暗所で、1 日分解を行わせた。分解後、0.45 μm メンブランフィルターでろ過し、ろ液を分析試料とした。流出液の有機物濃度は、260nm の吸光度によって測定したが、同時に流出液を分画し、DOC 濃度も測定した。有機物濃度が高濃度であるのは高速液体クロマトグラフで測定可能とするためであるが、分解特性に及ぼす影響は明らかではなく、本実験の結果からは実際の分解機構を推定できるととどまる。

(2) 有効細菌の担体付着と生残性に関する検討

この実験の目的は、実際に特定有効細菌を活用するために必要となる検討を行うことである。すなわち、*P.paucimobilis* が担体に付着・定着させることができるか、また水環境中における生残性について調べる。

a) 担体付着特性

実験装置は、図-2 に示した接触酸化模型水路（幅 100mm×長さ 500mm×水深 80mm）を用いた。この中に、徳島県小松海岸沿岸で採取した砂利（粒径 10mm 程度）を敷き詰めた。これにはすでに微生物群が付着しているものとみなした。空隙率は 45% であった。この水路にグラスファイバーフィルター（アドバンテック GS-25）でろ過した海水 3.5 l を循環させ、滞留時間は 4 時間（断面平均流速 0.125m・hr⁻¹）とした。このとき海水が水路内を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 7mm, 20 個）。ここに *P.paucimobilis* を約 10⁴ CFU・ml⁻¹ 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。実験は暗条件、水温 20℃で行った。実験条件をまとめて表-5 に示す。

細菌数は、Anderson 培地を用い、平板培養法で測定した。また、砂利に付着している細菌数は、取り出した砂利に蒸留水を注ぎながらブラッシングして付着物を洗い落とし、この中の細菌数を測定して求めた。

一方、本研究では混合細菌中の *P.paucimobilis* 数だけを測定あるいは推定する技術が必要である。混合細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

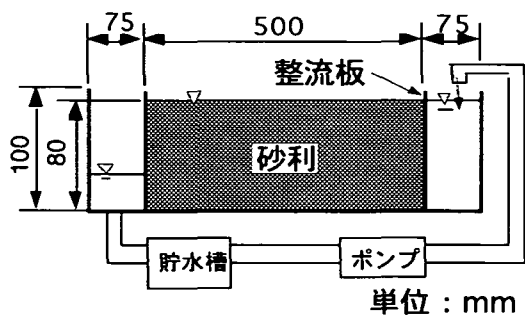


図-2 実験用模型水路

表-5 付着実験条件

試料海水量	3.5 l
pH	8.3
実用塩分	32.0
DOC	3.2mg · l ⁻¹
滞留時間	4時間
断面平均流速	0.125m · hr ⁻¹
水温	20℃
砂利粒径	10mm
水路内砂利空隙率	45%

されているが、ここでは以下のような近似法を検討した。すなわち、表-1の炭素化合物利用試験培地に、濃縮海水を濃度を変えて与え、寒天培地において形成するコロニー数との関係を調べた。その結果、TOCで30mg · l⁻¹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し、コロニーを形成するものと考えられた¹⁰⁾。この検討の結果、混合細菌中の*P.paucimobilis*数は、炭素化合物利用試験培地に濃縮海水をTOCが30mg · l⁻¹となるように添加した寒天培地を用い、この培地上で生育したコロニーを計数することによって近似的に測定した。

b) 生残性

ここでは、上で作製した*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る。

徳島県小松海岸に設置されている離岸堤消波ブロックの間隙中に浸漬することとした。ここには波浪、沿岸流、潮汐流があり、*P.paucimobilis*付着砂利を実際に利用することが想定できる場である。(2)

a) で作製した砂利を、円筒形の金網(直径200mm、高さ200mm、穴の大きさ7mm×7mm)に入れ、

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

ふたをし、消波ブロックの間隙中に浸漬した。浸漬開始は12月で、期間中の水温は7~12℃、また、pH 8.2~8.7、実用塩分35~37であった。浸漬してから14、30、90日後に引き上げて、砂利表面に付着している細菌数、および*P.paucimobilis*数を測定した。

(3) 細菌付着担体を用いた浄化実験

この実験の目的は、*P.paucimobilis*を付着させた担体のもつ浄化能について検証することである。担体としては砂利およびコンクリートを取りあげる。

a) 砂利の場合

実験装置は図-2と同じものを用い、付着実験終了後、水路内の海水を交換して実験を行った。試料海水はグラスファイバーフィルター(アドパテックGS-25)でろ過し、懸濁物質を除去したものを用いた。この試料水のDOCは8.0mg · l⁻¹、pH8.0、実用塩分32であった。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10mm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(混合細菌と*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、(2)a)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。

b) コンクリートの場合

実験に用いるコンクリート担体は、徳島県小松島港内に設置している海水浄化実験プラント¹⁵⁾に充填しているテストピースである。普通コンクリートとポーラスコンクリートのテストピースを浸漬しているが、ともに、直径150mm、長さ300mmの円柱形である。ポーラスコンクリートの条件は、連続空隙を持ち、骨材粒径が5~20mmで空隙率が約25%である。海水中に浸漬して約2ヶ月後のテスト

ピースを引き上げ、実験室に持ち帰り、まず、付着しているSSとVSSの測定を行った。ポーラスコンクリートに付着しているSSとVSSの測定のためには、テストピースを島津製作所製1000kN万能試験機により圧縮破壊し、ハンマーによって砕いた後、ブラッシングして付着物を落としたものを測定試料とした。

浄化実験に際しては、テストピースを図-2に示すのと同じ形の模型水路内においた。ただし、テストピースがちょうど浸漬するように、水深は150mm、海水がコンクリートと接触する部分の長さは300mmとしている。この水路に、グラスファイバーフィルター（アドバンテックGS-25）でろ過した海水7lを循環させ、暗所、20℃の条件で有機物分解を行わせた。この試料水のDOCは $5.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、pH8.0、実用塩分30であった。なお、循環海水の流量は $2\text{l}\cdot\text{hr}^{-1}$ としたが、これは大潮時と小潮時にこの実験プラントに流入する流量の間にあり、小潮時の流量の約2倍に相当する。

普通コンクリートとポーラスコンクリートに、さらに*P.paucimobilis*を付着させて有機物分解を行わせた。*P.paucimobilis*の付着方法は、(2)a)に示した方法と同様である。すなわち、模型水路内で循環している海水中に*P.paucimobilis*を注入した。このときの水路内の滞留時間は2.5時間であり、48時間循環させて付着させた。浄化実験は、この循環させた海水を抜き、新たな海水を注入して行った。

3. 実験結果と考察

(1) 特定細菌と他細菌との共存系における有機物分解特性

a) 混合培養系における有機物分解能

付着細菌と*P.paucimobilis*の共存する割合を変えて有機物分解を行わせた実験結果を図-3に示す。CASE 1～5の条件は表-3に示したものである。試料水と処理水のDOCを表-7に示す。分解後2日後の値を示してある。図-3において、付着細菌のみを接種したCASE 1では、有機物除去率は低いのと比較して、*P.paucimobilis*をそれぞれ10、100%接種したCASE 2、3は高い除去率が得られている。これに対して、*P.paucimobilis*のみのCASE 5、および付着細菌を10%接種したCASE 4では、いずれも有機物の分解活性は低いことがわかる。CASE 1、4、5の除去率は、それぞれ20、23、26%と、低い除去率にとどまっているのに対して、CASE 2、3は、53、57%と高い除去率であることがわかる。

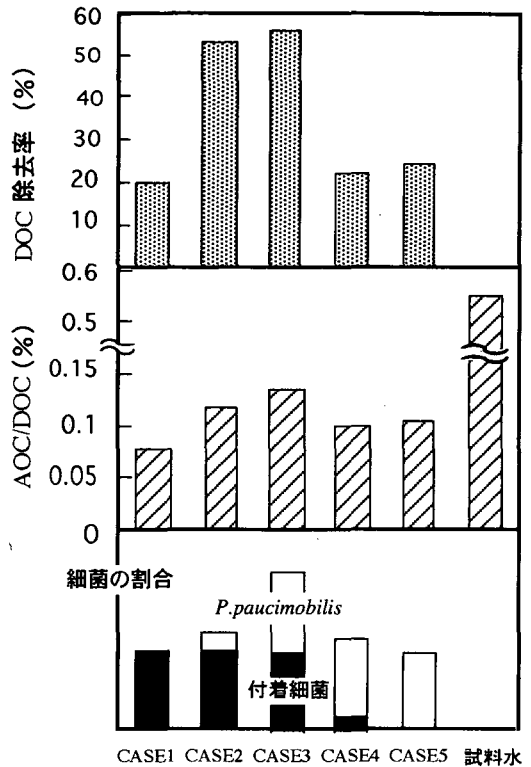


図-3 細菌の混合割合と処理水のAOC、DOC

表-7 混合培養系における有機物分解特性実験結果

実験CASE	処理水DOC($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	処理水AOC($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
CASE1	3.60	2.7
CASE2	2.12	2.5
CASE3	1.95	2.6
CASE4	3.52	3.5
CASE5	3.42	3.5
試料水	4.50	24.8

以上の結果、*P.paucimobilis*には、有機物の分解に直接関与する他に、他の細菌と共同して、混合系全体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10～100%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。

b) 有機物分解機構

図-3に示された共生分解の機構について検討するためさらに検討を行った。

AOCの測定結果を表-7に示し、AOC/DOCの値

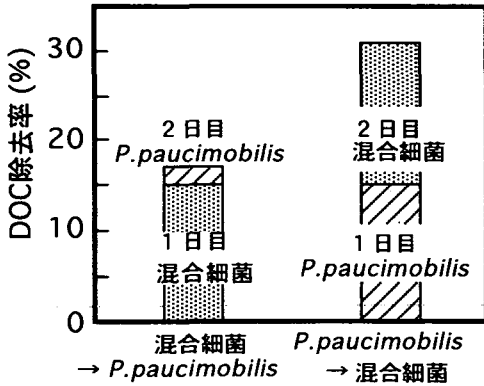


図-4 *P. paucimobilis* および混合細菌の有機物分解特性

を図-3中に示した。AOC指標の意義からみて、AOC/DOCの値は水中の有機物の生物学的安定性の一つの指標と考えることができる¹⁶⁾。CASE 2および3のAOC/DOCが、CASE 1の場合の値よりも大きいことがわかる。CASE 1でAOC/DOC値が小さくなったのは、自然の細菌群によって易分解性の有機物が多く分解されたためであると思われる。一方、CASE 2, 3の場合は、*P. paucimobilis*と自然細菌群が共存しているが、*P. paucimobilis*が難分解性有機物を易分解性有機物に変換した結果、分解後の水においても、AOC/DOC値が大きくなったものと推察できる。

図-3を得た実験は、*P. paucimobilis*と付着物中の混合細菌群が共存する条件である。つぎにこれらの有機物分解過程を区別するため、細菌の分解順序を変えて有機物分解を行わせた。結果を図-4に示す。1日後(24時間後)は、*P. paucimobilis*と混合細菌群を添加したものの両者の間にほとんど差は認められない。しかし、添加する細菌群を変えて培養を行った2日後(48時間後)には、除去率に著しい差が認められた。すなわち、1日目混合細菌群→2日目*P. paucimobilis*としたものでは、2日目に*P. paucimobilis*が除去した有機物量は極めて少ないのに対して、1日目*P. paucimobilis*→2日目混合細菌群としたものでは、2日目に混合細菌群は有機物を効率よく分解している。

前者の場合、まず1日目に混合細菌群が易分解性の有機物を分解、無機化した結果、難分解性有機物だけが残存する状態となる。ついで2日目においては*P. paucimobilis*は、残存する難分解性有機物を易分解性有機物に変換していると推定されるものの、無機化までには至らず、DOC除去率は増大していないと考えられる。一方、後者の場合、1日目に

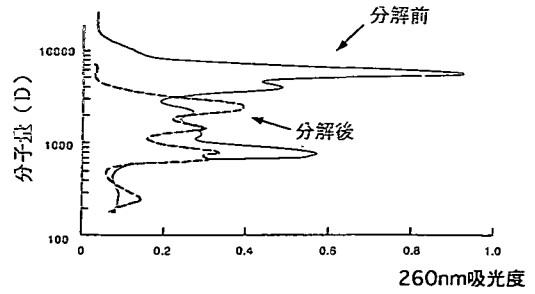


図-5 *P. paucimobilis*による分解にともなう有機物の分子量変化

*P. paucimobilis*は、易分解性の有機物を分解、無機化する一方、難分解性有機物を易分解性のものに変換していることが考えられる。このため、2日目に混合細菌群を添加して培養を行ったとき、これらの易分解性有機物を分解、無機化できたものと考えられる。これらの有機物分解過程を区別せず、*P. paucimobilis*と混合細菌群が同時に分解を行った場合の結果を図-3に示されている。図-4の結果とあわせて考えると、混合培養系であるCASE 2, 3で除去率が高く、かつ処理水のAOC/DOCの値が大きいのは、まず*P. paucimobilis*が難分解性の有機物を易分解性に変換し、ついで自然生育の混合細菌群が分解、無機化した結果であると推定することができよう。

図-5に、*P. paucimobilis*による分解の前後での分子量の分布を示す。縦軸は、図-1を用いて決定した分子量を示している。分子量6000と800にピークをもつ有機物が減少し、分子量2500と250付近にピークをもつ有機物が増大していることがわかる。この結果は、*P. paucimobilis*が、難分解性であると思われる高分子量の有機物を、より低分子の有機物に変換していることを示している。

*P. paucimobilis*による分解の前後での、濃縮海水を分画した流出液中のDOCを測定した結果を図-6に示す。図-5においては、6000にピークをもつ有機物はなくなっているものの、図-6では、DOCとして測定され、有機物としては残存していることがわかる。260nmを吸収する有機物は、主として不飽和結合をもつ化合物である。したがって、これらの結果は、*P. paucimobilis*は高分子の有機物の一部を低分子のものに変えているのみならず、有機物の分子構造を変えていることを示唆している。Ogura¹⁷⁾は、海水の表層水の微生物分解性を調べ、低分子(500以下)の有機物は速く分解が進むため、その後には高分子有機物の割合が高くなる傾向であ

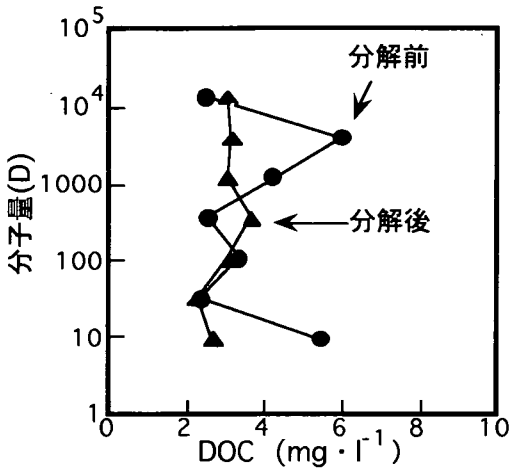


図-6 *P. paucimobilis* による分解前後における分画流出水のDOC

ると報告している。これは、本研究においては通常の細菌群が低分子の易分解性の有機物を分解する場合に相当すると考えられる。

以上3つの実験から、*P. paucimobilis* と混合細菌群との共生分解の機構をまとめると、① *P. paucimobilis* は、難分解性の有機物を易分解性のものに変換し、これを他の細菌群が利用する。②その過程では、*P. paucimobilis* は、高分子の有機物を低分子に変換したり、有機物の構造を変えていることが考えられる。これらが、有機物分解における *P. paucimobilis* の具体的な役割であると考えられることができる。

(2) 有効細菌の担体付着と生残性

つぎに、以上の特性を有する特定有効細菌を工学的に活用するために必要な検討を行った。すなわち、*P. paucimobilis* が担体付着・定着しうるか、また水環境中における生残性について調べた。

a) 担体付着特性

結果を図-7に示す。浮遊細菌数は $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、付着細菌数は砂利表面に対する $\text{CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$ で表してある。●付着 *P. paucimobilis* とは○付着細菌の中の *P. paucimobilis* の数を表している。ただし、この *P. paucimobilis* 数は、実験方法(2)a)に示した近似法によって測定したものである。海水を流し始めて3時間で、付着細菌数が急激に増加していることから、*P. paucimobilis* も初期に付着しうるものと考えられる。また、その後も、水中の浮遊細菌が減少する一方、*P. paucimobilis* を含む付着細菌数が緩やかに増大しており、付着は継続していることがわかる。図-7における浮遊細菌数、付着細菌数、

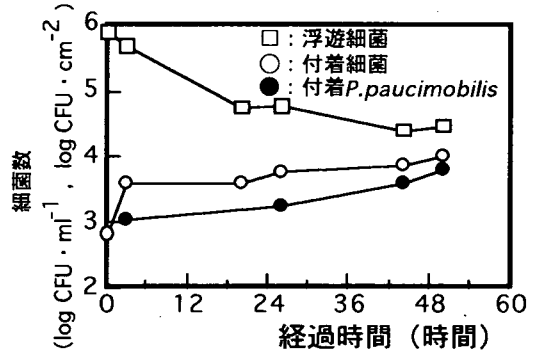


図-7 *P. paucimobilis* の砂利への付着

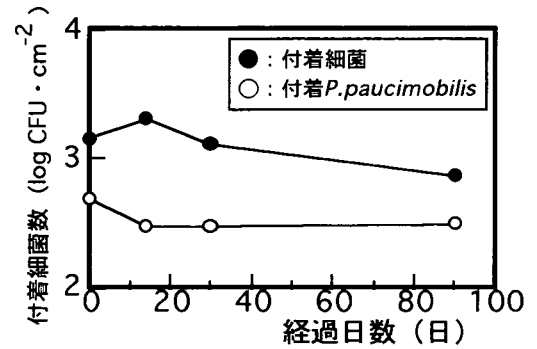


図-8 環境水中における砂利付着細菌の生残性

P. paucimobilis 数はいずれも増殖を含んだものであるが、浮遊細菌の数が大きく減少していることから、付着過程が卓越しているものと考えられる。

また、付着細菌の構成比をみると、この実験条件では、*P. paucimobilis* 以外の混合細菌に対する *P. paucimobilis* の割合は20~70%の範囲であった。これは図-3で示した、*P. paucimobilis* が有効に働きる10~100%の範囲内にあり、*P. paucimobilis* を付着させて新たにつくった砂利は、高い有機物除去能力を有することが期待できる。

この、*P. paucimobilis* を付着させた砂利の有機物分解活性は(3)で調べている。

b) 生残性

結果を図-8に示す。*P. paucimobilis* が14日後までのあいだにやや減少しているようである。砂利表面に弱く付着していた *P. paucimobilis* が脱離したものと推察される。しかし、減り続けるということではなく、その後は安定している。すなわち、この検討からは、*P. paucimobilis* だけが剥離したり淘汰されたりする様子はみられず、他の細菌と同様、定着しているものと考えられた。混合細菌数 (*P. paucimobilis* 除く) に対する *P. paucimobilis* の割合は、約20~50%の範囲であり、*P. paucimobilis* が有効に働く範囲を維持していた。

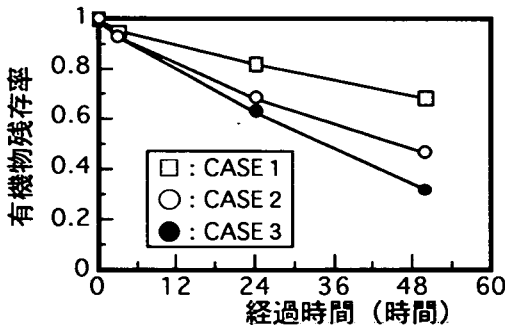


図-9 有機物濃度の経時変化

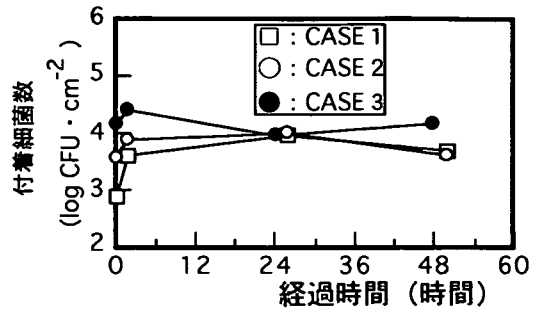


図-11 付着細菌数

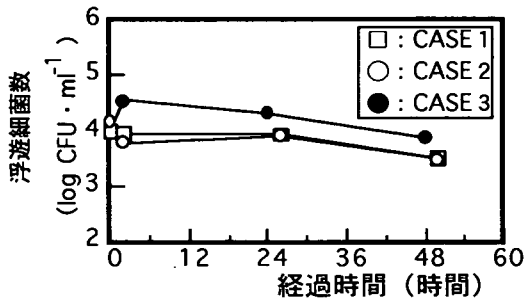


図-10 浮遊細菌数

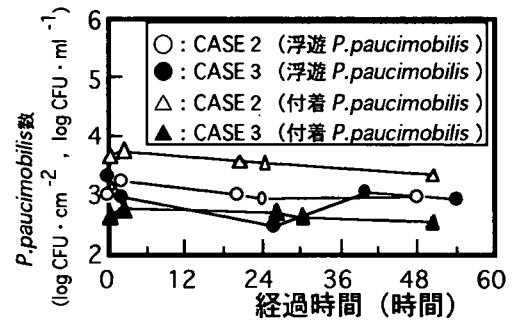


図-12 *P. paucimobilis* 数

図-7, 8の結果, *P. paucimobilis*は担体としての砂利上に付着させることができ, これを実際に水環境中で利用したときも付着状態をある程度保てることわかった. また, このときの *P. paucimobilis* 以外の混合細菌に対する *P. paucimobilis*の割合も, *P. paucimobilis*が有効に働きうる範囲内であった.

(3) 細菌付着担体の浄化能

これまで, *P. paucimobilis*の基本的な有機物分解特性, および砂利担体に対する付着と生残性について検討した. ここでは, *P. paucimobilis*を付着させた担体のもつ浄化能について検討を行った. 担体としては砂利およびコンクリートを取りあげている.

a) 砂利の場合

有機物濃度を経時的に測定した結果を図-9に示す. 各実験ケースの条件は表-6に示した通りである. まず, 滞留時間が4時間のケースで, *P. paucimobilis*が付着しているCASE 2と付着していないCASE 1を比較すると, 50時間後のDOCの除去率は, CASE 1で32%, CASE 2は53%となっている. 担体に *P. paucimobilis*が付着しているCASE 2はCASE 1に比べ1.7倍の分解能を有していた. このように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, 実際に有機物の除去効果が高まることわかった.

また, 滞留時間が4時間(CASE 2)と2時間(CASE 3)のケースの除去率はそれぞれ53, 68%であり, CASE 2よりCASE 3の方が除去率が高いことがわかる. これは, 流速の大きい方が, 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るためであると考えられる. この場合, 比較的遅い流速で実験を行ったためにこのような結果になったが, 実際の海域における流速の範囲でもこのようなことがおきるかについては別途検討が必要である.

水路内の細菌数を測定した結果を図-10~12に示す. 図-10は, 浮遊している全体の細菌数であり, 図-11は, 砂利に付着した全体の細菌数, また, 図-12は, *P. paucimobilis*数を示している. 全体に大きな細菌数の変化はない. 図-10より, 浮遊細菌数がやや減少傾向にあるのに対して, 図-11より, 付着細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. さらに, 図-13に, 循環させている海水3.5lに含まれる細菌数と, 砂利に付着した細菌数を, CASE 2において比較したものを示す. この図より, 水路内の細菌は砂利に付着している細菌数の方がはるかに大きく, この実験で浮遊細菌による有機物除去の影響は少ないと考えられる. CASE 3についても同様であった.

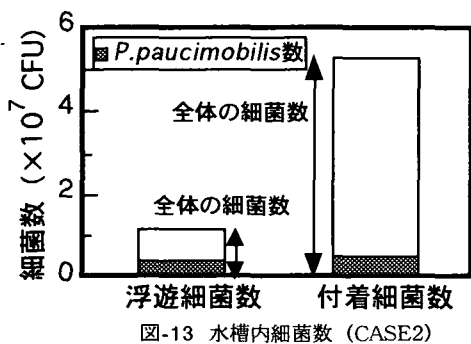


図-13 水槽内細菌数 (CASE2)

また、DO、pHも同時に測定した。pHは全てのケースにおいて8.0前後で一定であった。実験開始時のDOは $9.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、50時間後にはCASE 1が $6.4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、CASE 2が $5.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と低下したが、CASE 3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低下も大きいといえるが、CASE 3ではCASE 1、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。また、本実験ではDOの低下による細菌活性への影響はないものと考えられた。

b) コンクリートの場合

分解実験を行った結果を図-14に示す。実験中のDO、pHに大きな変化はなかった。また、この間の浮遊細菌数、付着細菌数、*P. paucimobilis*は砂利担体の場合に示した図-10、11、12と同様の傾向を示した¹⁸⁾。また、付着していたSSとVSSの測定結果を、単位体積あたりとして表示したものを図-15に示す。図-14から、まず、*P. paucimobilis*が付着していない場合を比較すると、ポーラスコンクリートの方が普通コンクリートと比較して浄化能が高く、約2.2倍の除去率となっている。図-15に示したように、ポーラスコンクリートは普通コンクリートに比べて、多くのSSとVSSを保持することができ、ポーラスコンクリートの方が微生物分解が活発であるといえる。

図-14から、普通コンクリートとポーラスコンクリートともに、*P. paucimobilis*を付着させるとより多くの有機物が分解されていることがわかる。*P. paucimobilis*を付着させれば、その除去率は、普通コンクリートの場合で約1.6倍、ポーラスコンクリートで約1.4倍となっている。以上まとめれば、この実験の場合、普通コンクリートに対してポーラスコンクリートを用いれば、浄化能は2.2倍となり、それに*P. paucimobilis*を付着させて用いればさらに1.4倍の浄化能が得られたことになる。

ここで*P. paucimobilis*の添加効果についてまとめ

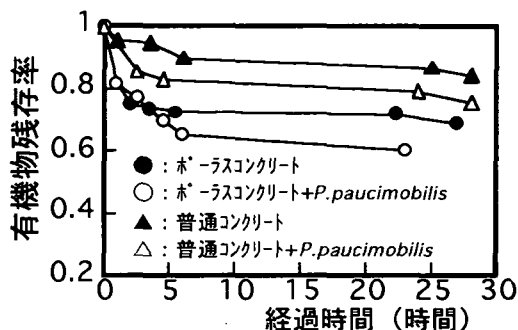


図-14 コンクリート担体による有機物分解

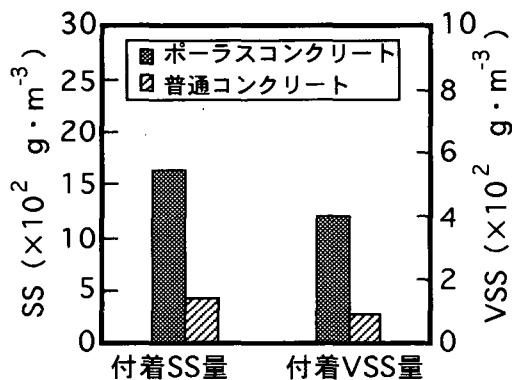


図-15 コンクリート担体に付着したSS、VSS (浸漬2ヶ月後)

てみると、図-3では2~3倍の有機物除去率が得られたのに対して、砂利担体を用いた図-9では1.7倍、コンクリート担体を用いた図-14では1.6倍、1.4倍とやや低下している傾向がある。図-3では三角フラスコで攪拌条件で分解を行わせているのに対して、図-9、14では細菌が付着した条件であるという違いとも考えられるが詳細は不明である。

図-15に示した付着SS量、付着VSS量は浸漬2ヵ月後の瞬間値であり、単位SSまたはVSSあたりの除去能について評価することは難しい。夏季における累積の有機物除去能力を別途試算したところ、海水浄化実験プラントの単位幅当たり、ポーラスコンクリートで $5.6\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (溶存態2.9+懸濁態2.7)、普通コンクリートで $3.5\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (溶存態1.4+懸濁態2.1)であった。これを砂浜の汀線1mあたりの除去速度と比較すると、ポーラスコンクリートの場合で砂浜の15~26%程度であると評価できた¹⁵⁾。この浄化能力に対する*P. paucimobilis*を利用したときの効果を検討することがつぎの課題となる。本実験で*P. paucimobilis*を付着させたコンクリート担体を実際に海水浄化に利用し、短期的にはここで得られたのと同様の浄化効果があることを

認め¹⁵⁾が、その持続性等については今後の課題となっている。

4. 結言

本研究で得られた成果を要約する。

(1) 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。その機構として、まず *P.paucimobilis* が難分解性の有機物を易分解性に変換し、ついで自然生育の混合細菌群が分解するものと推定した。この結果、*P.paucimobilis* は単独で使用するより、むしろ他の細菌との共存系で活用する方が有効であることがわかった。

(2) 微生物がすでに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ところ、初期の付着は3時間以内におこった。混合細菌に対する付着した *P.paucimobilis* の割合も、*P.paucimobilis* が有効に働きうる範囲であった。一方、この砂利を海水中に浸漬して生残性を調べたところ、*P.paucimobilis* だけが剥離したり淘汰されたりすることはなかった。

(3) 砂利およびコンクリートを担体として、これに *P.paucimobilis* を付着させて浄化実験を行い、いずれも有機物分解能が高まることを示した。砂利においては浄化能は1.7倍向上した。また、コンクリートについては、普通コンクリートに対してポーラスコンクリートを用いれば浄化能は2.2倍となり、それに *P.paucimobilis* を付着させることによりさらに1.4倍の浄化能が得られた。

謝辞：本研究の一部は平成7年度文部省科学研究費奨励研究(A) (代表、伊藤禎彦) の補助を受けたことを記し、謝意を表す。また、本研究に際し、杉本朋哉 (徳島大学大学院)、藤井正樹 (大豊建設)、河野通治 (フジタ建設コンサルタント) の諸氏の献身的な協力を得たことを記し、謝意を表す。

参考文献

- 1) 毛利光男, 須田有輔, 上原功, 門倉伸行, 田中裕作, 細川恭史: 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, 1993.
- 2) 門倉伸行, 西原潔, 丹羽千明, 細川恭史: 礫間接触酸化法による海水浄化の設計諸元について, 土木学会第48回年次学術講演会講演概要集, pp.1028-1029, 1993.
- 3) 小田一紀, 貫上佳則, 重松孝昌, 大屋博史, 網潔之, 倉田克彦: 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, 1992.
- 4) 服部明彦: 海洋学講座 第7巻 海洋生化学, 東京大学出版会, pp.141-173, 1982.
- 5) 伊藤禎彦, 村上仁士, 細井由彦, 板東広之: 同化可能有機炭素(AOC)測定による環境水の生物分解性の推定, 第45回土木学会中国四国支部研究発表会講演概要集, pp.110-111, 1993.
- 6) 伊藤禎彦, 村上仁士, 細井由彦, 板東広之: 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, 1993.
- 7) 深見高雄: 有機懸濁物を住み場所とする海洋細菌群; 日本微生物生態学会編, 微生物の生態16, 学会出版センター, pp.7-25, 1988.
- 8) 清水潮: 海産魚類およびプランクトンの微生物相; 日本微生物生態学会編, 微生物の生態2, 学会出版センター, pp.71-86, 1975.
- 9) 伊藤禎彦, 村上仁士, 細井由彦, 板東広之, 落合道和: 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, 海岸工学論文集, 第41巻(2), pp.1076-1080, 1994.
- 10) 伊藤禎彦, 村上仁士, 落合道和, 杉本朋哉: 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, 海岸工学論文集, 第42巻(2), pp.1211-1215, 1995.
- 11) 長谷川武治: 微生物の分類と同定(下), 学会出版センター, pp.133-134, 1975.
- 12) 西篠八東, 奥田節夫編: 河川感潮域, 名古屋大学出版会, 1996.
- 13) 河合章: 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, 1988.
- 14) van der Kooij, D., Visser, A., and Hijnen, W.A.M.: Determining the Concentration of Easily Assimilable Organic Carbon in Drinking Water. *J. of Am. Wat. Wks. Ass.*, Vol.74, pp.540-545, 1982.
- 15) 村上仁士, 伊藤禎彦, 水口裕之, 上月康則, 杉本朋哉, 豊田裕作: 海水浄化実験プラントにおける浄化能の定量化と有効菌の添加効果, 環境工学研究論文集, Vol.33, pp.367-375, 1996.
- 16) G.A.McFeters 編, 金子光美監訳: 飲料水の微生物学, 技報堂出版, pp.67-68, 1992.
- 17) Ogura, N.: Further Studies on Decomposition of Dissolved Organic Matter in Coastal Seawater, *Marine Biology*, Vol.31, pp.101-111, 1975.
- 18) 落合道和: 海水の直接浄化に寄与する細菌の浄化機構とその工学的活用法に関する研究, 徳島大学修士論文,

MECHANISM OF DEGRADATION OF ORGANIC MATTER IN SEAWATER BY EFFECTIVE MICROBES AND ITS UTILIZATION

Hitoshi MURAKAMI, Sadahiko ITOH, Hiroyuki MIZUKUCHI, Yasunori KOZUKI
and Michikazu OCHIAI

A new biological method to improve the quality of enclosed seawater was investigated. First, degradation mechanism of *Pseudomonas paucimobilis* which can degrade refractory organic matter in seawater was examined. *P. paucimobilis* mixed with naturally grown microbes degraded organic matter 2 to 3 times as much as *P. paucimobilis* did by itself. After *P. paucimobilis* changes refractory organic matter to easily utilizable one, natural microbes can degrade the easily utilizable organic matter. *P. paucimobilis* was easily attached to gravels and survived in the environmental seawater. In addition, gravels and concrete to which *P. paucimobilis* had attached could degrade more organic matter.