

(Ⅱ-30) 菌体の計測に関する実験的研究

早稲田大学理工学部 学生員 尾 澤 勲

早稲田大学理工学部 学生員 高木康行

早稲田大学理工学部 正 員 遠藤郁夫

1. はじめに

汚泥消化槽内混合液あるいは活性汚泥中においてどのような微生物がどのような状態で存在しているかを把握することはきわめて困難である。よって従来よりSSやVSS濃度を菌体濃度を代表する指標として用いてきた。しかしながら、微生物濃度をよりの確に把握するための研究は必ずしも十分ではないのが現状である。とくに、嫌気性細菌では使用する培地によって發育速度が異なり、かつコロニーを形成するまでに時間を要する等の問題点が考えられる。本研究では顕微鏡による直接観察と、公定法として2つ採用されているMPN法（水質汚濁に係わる環境基準）および平板培養法（下水の水質の検定方法に関する省令及び環境長官が定める排水基準に係わる検定方法）の相関性について検討を加えたものである。

2. 測定方法

表-1 反応槽内混合液の諸性質

Ph	SS (mg/L)	VSS (mg/L)	Sv (%)	SDI	SVI	BOD-SS (kgBOD/kgSS)	HRT (hour)
7.01	1375	1060	19.0	0.724	138	0.249	12

(1)Hoechst33258を用いて菌体を染色し、落射蛍光顕微鏡にて観察を行ない、Thoma血球計数盤を用いて計数を行なった（以下、直接観察とする）。

(2)JISK0102に示された一般細菌試験に準じて操作を行ない36℃で24時間培養した後、平板上に形成された集落数を計数し、一集落が一個体より発生したものとして個体数を計算した（以下、平板培養法とする）。

(3)MPN（5-5-5）およびMPN（3-3-3）法による計測をおこなった。

3. 実験結果および考察

I. 好気性条件による実験

好気性条件における実験はS処理場より採取した活性汚泥について、初沈流出水で馴養したものを用いた。滞留時間は12時間とし測定時における混合液性質は表-1に示した。平板培養にあたっては、普通寒天培地を用いた。図-1に平板培養法と直接観察法との関係を示した。平板培養法、直接観察法ともに活性汚泥混合液に対して、数段階の濃縮・希釈を行ないそれらを測定サンプルとした。

図-1に示した直線は、36℃・24hr後にコロニー数30~300/mlの場合について得られた関係である。20~300/mlのものを△印で補填した。平板培養法とHoechstを用いた直接観察法との関係には、非常によい相関性が認められたが、平板培養法と直接観察法との間には絶対値では約50倍の差異が認められた。図-2にMPN法とHoechstを用いた直接観察法との関係を示した。測定にあたっては、5-5-5法と3-3-3法を別々の希釈段階でおこなった。図-2に示したように5-5-5法、3-3-3法ともに近い値を得ることができた。従って、5-5-

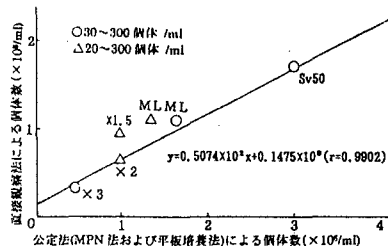


図-1 平板培養法による個体数と直接観察法による個体数との関係（活性汚泥）

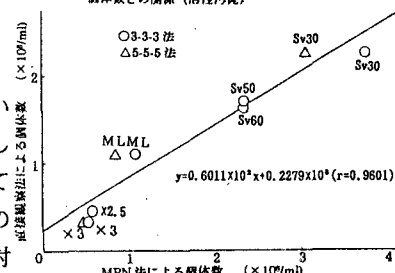


図-2 MPN法による個体数と直接観察法による個体数との関係（活性汚泥）

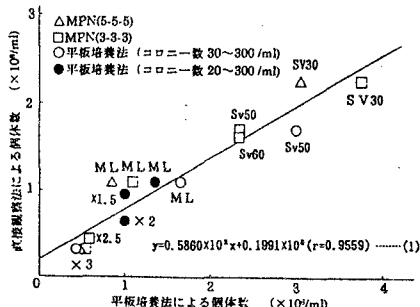


図-3 公定法による個体数と直接観察法による個体数との関係（活性汚泥）

5法と3-3-3法を包括して最小自乗法で直線を求めた。MPN法と直接観察法との間には強い相関性が認められた($r=0.96$)。尚、MPN法と直接観察法との間には、絶対値において約70倍の差異が認められた。図-3はMPNならびに平板培養法と、Hoechstによる直接観察法との関係を示した。MPN法と平板培養法におけるコロニーの計数は本質的差異は認められなかった。1例として直接観察法で 1×10^8 個体/mlの個体数が認められた場合、公定法では(MPN法および平板培養法)では 1.37×10^6 個体/mlであった。すなわち公定法では、直接観察をおこなった場合よりも1/77程度の値となることが認められた。時間を要する一般細菌試験の代わりにHoechst33258により染色し、蛍光顕微鏡下で計数することによって、

(1)式より、公定法による菌対数を知ることができることが認められた($r=0.96$)。また、図-4にSS濃度とHoechstを用いて計測した菌体濃度との関係を示した。両者の間には(2)式で示したように極めて高い相関性が認められた($r=0.96$)。また、SS濃度と公定法(MPN法と平板培養法)との関係は(1)式と(2)式から、(3)式として求めることができた。(3)式の相関性は(1)及び(2)式から高い相関性があるものと考えられる。

$$y = 8.5153 \times 10^{-2} x + 0.2147 \times 10^6 \quad \text{..... (3)} \quad \begin{matrix} y: \text{公定法 (個体数/ml)} \\ x: \text{SS (mg/l)} \end{matrix}$$

II. 嫌気性条件における実験

53℃における嫌気性汚泥消化実験をおこなった。反応槽容積は3ℓ、混合液容量は2.4ℓ、消化日数は12日消化とした。菌体数の測定にあたっては、好気性条件の場合と同様にした。ただし、培養にあたっては36℃で21日間、培地は嫌気性菌選択分離培地「GM加GA M寒天培地(ニッスイ)」を用いた。嫌気性条件における実験は好気性条件における実験結果をふまえ、

MPN法及び平板培養法、すなわち公定法では、いずれの

場合でも計数値に大きな差異が認められなかったため、平板培養法と直接観察法との比較を行った。その結果を図-5に示した。この両者の間には高い相関性($r=0.91$)が認められた。菌体1個体当たりの重量を求めるために濾過操作を行い $5 \mu\text{m}$ のミリポア濾紙を通過して、 $0.45 \mu\text{m}$ のミリポア濾紙上に堆積した重量を秤量した。また、 $5 \mu\text{m}$ のミリポア濾紙を通過した液体中の菌体・微粒子混合体の写真観察を行うと、全個体数に占める菌体の割合は、 $\alpha = 0.667$ (12/18)であった。 $5 \mu\text{m}$ を通過した液体中の菌体数(a)と、 $0.45 \mu\text{m}$ を通過した菌体数(b)の計測を直接観察によって計数すると、(a) = 18.3×10^8 個体/ml、(b) = 0 となった。すなわち、 $0.45 \mu\text{m}$ のミリポア濾紙上に堆積した個体数は、 18.3×10^8 個体/mlであった。(4)式を用いて公定法(MPN法あるいは平板培養法)による菌体数を求めると、 7.21×10^6 個体/mlとなり、菌体比重を $\gamma = 1.19^{1)}$ とすると、 $7.9 \times 10^{-8} \text{mg/個体}$ となった。12日消化の反応槽内混合液中の菌体数は直接観察法では 35×10^8 個体/mlであった。(4)式より公定法による菌体数は 1.5×10^7 個体/mlとなった。一般的に考えられている $10^7 \sim 10^8$ 個体/mlの範囲に入っているものと考えられた。

4. 総括および結論

下水試験法等に定められている公定法とHoechst33258を用いて蛍光顕微鏡下で観察して、計測を行った直接観察法との間には、高い相関性($r=0.91 \sim 0.96$)をもった線形関係が求められた。これらの関係から、比較的容易に直接観察法から公定法の菌体数を求めることができるものと考えられた。

参考文献； 1) 森良一，天児和暢編：戸田細菌学，15～39頁，南山堂 (1987)

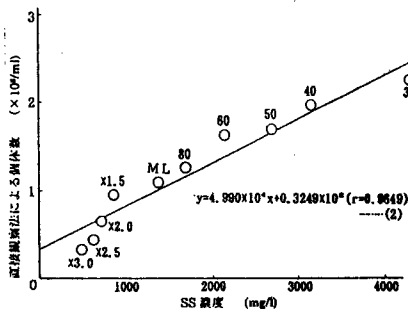


図-4 SS濃度と直接観察法による菌体数との関係 (活性汚泥)

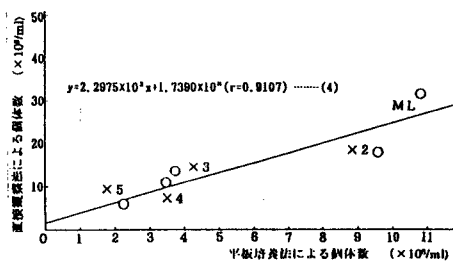


図-5 嫌気性汚泥12日消化における平板培養法による菌体数と直接観察法による菌体数の関係