

II-21

生物膜内の細菌分布に関する基礎的研究

宮崎大学工学部 学生員 小湊哲郎 正 員 増田純雄
宮崎大学工学部 正 員 渡辺義公 正 員 石黒政義

1. はじめに 固定生物膜法(回転円板法)では、一般に付着生物膜表面積当りの処理効率による検討が行われているが、生物膜厚さ方向の各種菌濃度分布までは考慮されていないのが現状である。付着生物膜の厚さ方向の各種菌濃度分布を測定することは、生物膜内での反応機構、処理効率を知るうえで重要なことである。本文では、回転円板の付着生物膜を厚さ方向にCuttingし、生物膜内の各種菌濃度分布の測定を行った結果について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0.7ℓの槽とアクリル製円板からなり、円板直径16cm、円板枚数3枚、回転数7rpm、円板厚0.5cm、円板間隔1.0cm、全円板有効表面積0.12m²である。流向は中心軸と直角方向、円板浸漬率は約50%である。円板は図に示すように、付着生物膜採取時に一部分(10×65mm)ごと抜き取れるように加工してある。実験方法は、実廃水(し尿脱離液; T-N 1500ppm, TOC 650ppm)を25倍希釈(アンモニアの7倍の重炭酸ナトリウムを添加)したものを常温で運転し、2週間、4週間、10週間後にそれぞれ付着生物膜を支持体の一部分ごと抜き取り、そのままマイクロスライサーで表面から生物膜をスライス状に切断(以下Cuttingと呼ぶ)し、生物膜の表層部、中層部、底層部の3つに分けた後、ホモジナイザーで均一化し、他栄養性細菌、嫌気性細菌、通性嫌気性細菌、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、脱窒細菌の定量を行った。他栄養性細菌、嫌気性細菌、通性嫌気性細菌は希釈平板法により

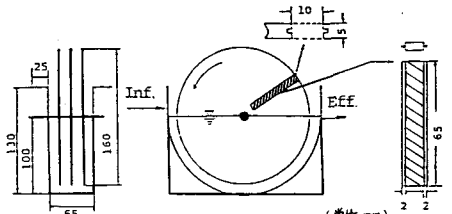


図-1 実験装置

行い、嫌気性細菌の培養はガスパック嫌気システムを用い槽内の空気を全部ヘリウムガスで置換後、嫌気の状態をDisposable anaerobic indicatorで確認しながら行。嫌気的培养後、好氣的に1週間培養して出現したコロニー数から嫌気的狀態で出現したコロニー数を差し引いた値を通性嫌気性細菌数とした。アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、脱窒細菌はMPN(Most Probable Number)法で行い、培養期間は脱窒細菌が14日間、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌が28日間である。細菌の培養温度はすべて30±1℃で行い、培地、実験法は土壤微生物実験法¹⁾によった。

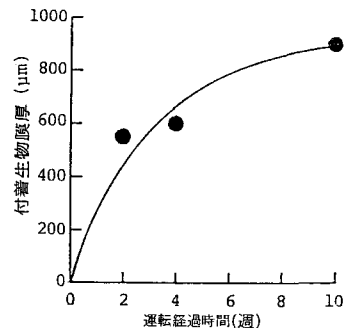


図-2 付着生物膜厚の変化

3. 結果と考察 図-2に運転開始後の付着生物膜厚の変化を示す。

1~2週間で生物膜が形成され始め、流出水の基質濃度が安定した状態では900μm程度まで生長した。表-1に運転開始後2週間、10週間および人工下水による硝化菌(約1ヶ月間馴養後、有機源としてメタノールを添加)の場合の生物膜内の平均的な各種菌濃度を示す。1~2週間で生息しているのは増殖速度の大きい他栄養性細菌であり、流出水の基質濃度が安定してくると硝化菌(アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌)が生息する。写真-1, 2, 3は生物膜表面およ

表-1 回転円板生物膜の細菌

Bacteria	day	14	73	人工基質
他栄養性細菌		2.6×10 ⁹	3.3×10 ⁹	4.9×10 ¹⁰
通性嫌気性細菌		2.8×10 ⁹	1.3×10 ⁹	1.2×10 ¹⁰
アンモニア酸化細菌		2.6×10 ⁴	3.0×10 ⁶	1.4×10 ⁶
亜硝酸酸化細菌		—	5.1×10 ⁶	1.7×10 ⁶
脱窒細菌		—	4.8×10 ⁴	2.1×10 ⁸

(個/Biomass 1 ml)

び生物膜底部から $200\mu\text{m}$ の生物膜片の走査型電子顕微鏡写真である。生物膜の表面と底層部とでは明らかに密度が異なり、直径 $0.5\mu\text{m}$ 程度の球菌、桿菌が存在していることが判明した。図-3に4週間後の付着生物膜厚さ方向の各種細菌数の変化を示す。生物膜厚は $600\mu\text{m}$ である。

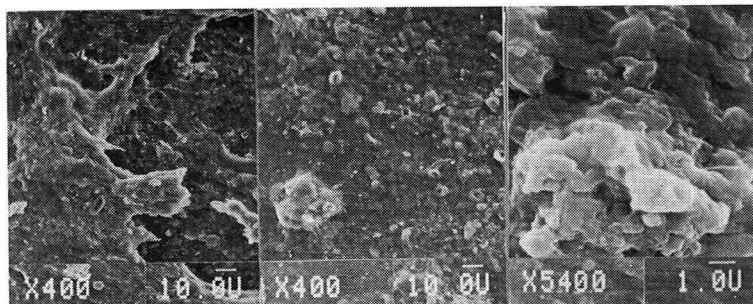


写真-1 生物膜片の電顕写真 (生物膜表面) 写真-2 生物膜片の電顕写真 (底層部) 写真-3 生物膜片の電顕写真 (底層部)

生物膜表面には凹凸があり、マイクロスライサーの刃が凸面に最初に接触した時点を表面とした。この場合の凹凸面は $300\mu\text{m}$ 程度であり、 $350\mu\text{m}$ から生物膜片が形成された。生物膜の $300\mu\text{m}$ を表層部、 $300\sim 450\mu\text{m}$ を中層部、 $450\sim 600\mu\text{m}$ を底層部とした。図から、他栄養性細菌、通性嫌気性細菌は生物膜全体を通してほぼ一定して生息している ($10^7\sim 10^8$ 個/バイオマス 1mL) が、硝化菌は表層部では生息数が少ない ($10^2\sim 10^4$ 個/バイオマス 1mL)。これは他栄養性細菌と硝化菌とでは増殖速度がそれぞれ、 $4\sim 7\text{day}^{-1}$ 、 0.5day^{-1} と異なり、硝化菌は増殖、剥離を繰り返す表層部では生息しにくいと考えられる。また、図に示す破線は人工下水による硝化菌の細菌数の変化を示している。混合基質（し尿脱離液）、人工基質ともに生物膜深部では増殖速度の小さい硝化菌でも十分生息でき、菌濃度分布がほぼ固定されと考えられる。筆者らは先に、生物膜内には間欠的に酸素の浸入する通性嫌気性ゾーンが形成され、そのゾーン内で有機物、アンモニアの酸化および脱窒反応が行われると報告した²⁾。したがって、図の細菌分布から生物膜内の環境条件（酸素、窒素、有機物の有無）によって、通性嫌気性ゾーンが好氣的で有機物やアンモニアがある場合には有機物、アンモニアの好氣的酸化が行われる。一方、そこが嫌氣的で硝酸や有機物がある場合には脱窒反応が行われる。付着生物膜内の菌濃度分布をさらに詳しく調べるためには、生物膜を薄く Cutting ($10\mu\text{m}$ 程度) し培養するとともに、生物膜内で実際に菌体数（活性度）を測定する必要がある。

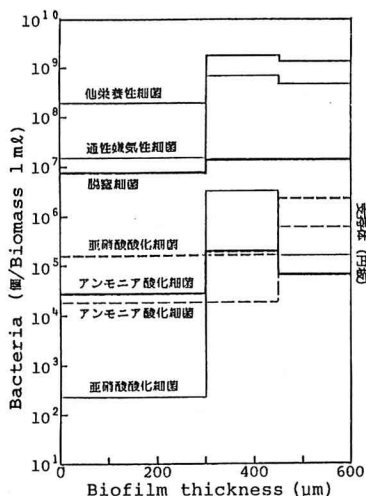


図-3 生物膜内の細菌数の変化 (28日目)

4. おわりに 付着生物膜厚さ方向の各種菌濃度分布の測定を行い、次のような結果が得られた。

- (1) 生物膜が安定した状態の生物膜内の平均的な菌濃度はそれぞれ、他栄養性細菌 3.3×10^8 、通性嫌気性細菌 1.3×10^9 、アンモニア酸化細菌 3.0×10^4 、亜硝酸酸化細菌 5.1×10^6 、脱窒細菌 4.8×10^4 個/バイオマス 1mL である。
- (2) 人工基質、混合基質ともに他栄養性細菌、通性嫌気性細菌は生物膜全体を通してほぼ一定して生息している。硝化菌は増殖速度が小さいために表層部ではほとんど生息していないが、生物膜深部では十分生息でき、菌濃度分布がほぼ固定される。したがって、硝化、脱窒、有機物酸化反応が生物膜内のそれぞれの環境条件に応じて行われる。
- (3) 走査型電子顕微鏡による生物膜の写真から生物膜の表面と底層部とでは密度が異なることが判明した。

今後は、生物膜の Cutting、細菌の活性度等について検討を行う予定である。なお、本研究は鹿児島学術振興財団の助成金により遂行された事を付記して関係各位に謝意を表する。

参考文献 1) 土壤微生物実験法、土壤微生物研究会編、養賢堂発行 (1975)。

- 2) 増田純雄、渡辺義公、石黒政儀；回転円板法における付着微生物膜内の細菌について、第5回回転円板法研究シンポジウム論文集、環境技術研究会、PP48~53、(1983)11。