

生物膜形成時における細菌分布特性に関する研究

宮崎大学工学部 正 岡部 聡 渡辺 義公
学 大澤 祐子

1. はじめに

生物学的排水処理の分野において従来、生物処理反応槽をブラックボックスとし、反応槽の流入および流出量から解析する方法が用いられてきた。今後、生物学的高度処理における優占微生物の増殖促進やより安定した処理効率を得るためにも、微生物相の動態を定量化し、微生物群集を制御する事が望まれる。そこで本研究では、半水没型回転円板付着生物膜形成時の微生物相の動態と生物膜深さ方向の各種微生物密度分布および生物膜形成に必要な不可欠な細胞外ポリマーと細菌由来の有機炭素濃度の膜厚方向分布について実験結果に考察を加えて報告する。

2. 実験装置及び実験方法

実験装置は、直径18cmの亚克力製の円板10枚から構成される半水没型回転円板槽（槽容量約2.5 l）である。円板回転速度は約15 rpm、HRT（水理学的滞留時間）は10時間とした。宮崎市木花下水処理場の最初沈殿池流出水を用い約10日間回分状態で馴養し、円板上に薄い生物膜が形成された事を確認後、アンモニア性窒素と無機炭素を主体とする人工基質（ NH_4Cl (76.4), NaHCO_3 (600), K_2HPO_4 (7.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100), NaCl (73), (1 liter当たりのmg)) による連続運転を行い、経時的に槽内の水質（三態窒素）及び生物膜内の微生物濃度を測定した。生物膜はマイクロスライサー（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（4,000 rpm, 40 min.）により集菌した後、高速ホモジナイザー（Polytron）でホモジナイズ（20,000 rpm, 1 min）し、菌数を増田らの¹⁾方法に従って定量した。三態窒素の測定は下水試験法およびイオンクロマトグラフ法により行った。全菌数の測定方法はHobbieらの²⁾方法に従った。スライスされた生物膜断片の全有機炭素濃度は、資料を超音波破砕機で十分に破碎した後、全有機炭素アナライザー（TOC-5000, SIMADZU）で測定した。

3. 実験結果と考察

連続運転開始後の反応槽内の水質変化を図-1に示す。連続運転開始直後よりアンモニア性窒素の酸化は進行し約2週間後、反応は完全な亜硝酸型となり、その後、徐々に硝酸型へと移行し運転開始後約1カ月で安定した硝酸型となった。この水質変化に対応する生物膜厚および生物膜内の各種微生物個数の変化を図-2、3に示す。連続運転開始時の生物膜厚は40 μm 程度で、その構成は他栄養性細菌が主体であった。時間の経過と共にアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌は飛躍的に増加した。アンモニア酸化反応が安定した後、アンモニア酸化細菌数は一定の値で安定した。硝酸型反応が安定化した44日目には、亜硝酸酸化細菌数は他栄養性細菌の値（ 10^7 個 cm^{-2} ）にほぼ等しくなった。また時間の経過と共に全菌数に占める培養可能な細菌の総和の割合は減少した。この実験に用いた人工基質には有機物が含有されておらず、また比較的溶存酸素濃度が高いため脱窒細菌数が最も低かった。しかしながら、他栄養性細菌は依然としてこの生物膜内での優占種であっ

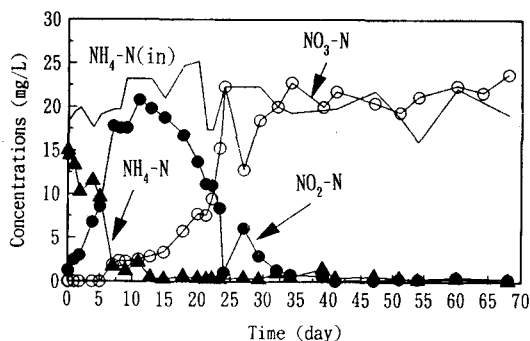


図-1 流出三態窒素濃度の経時変化

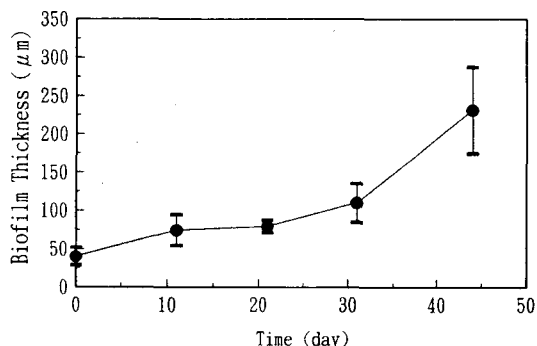


図-2 付着生物膜厚の経時変化

た。アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の動態は水質変化によく対応している。図-4は、55日後に生物膜をスライスし求められた膜深さ方向の各種細菌分布である。全菌数を含め各種細菌密度は、膜深部方向に増加し、膜底部では表層部と比較して約10倍程度高い。この菌密度の増加は表層部の膜の不均一性を考慮しても、膜深部では微生物がより密に存在する事を示唆している。注目すべき点は、各種細菌は生物膜全体に存在する事である。すなわち、この実験条件で増殖速度が遅いと思われる他栄養性細菌が膜表層部にも存在し得る点である。次に、生物膜形成に必要な不可欠な細胞外ポリマーと細菌由来の有機炭素濃度の膜厚方向分布を図-5に示す。細菌由来の有機炭素濃度(Cell-C)は全菌密度に細菌1個当たりの有機炭素含有量($1.25 \times 10^{-13} \text{g個}^{-1}$)を乗じて算出した。また、細胞外ポリマー由来の有機炭素濃度(EPS-C)は全有機炭素濃度から細菌由来の有機炭素濃度を差し引いて算出した。Cell-CとEPS-C濃度は、共に生物膜深部ほど高い。この結果は、生物膜深部では細菌密度が高く細菌を結合し保持する役目を果たす細胞外ポリマーの濃度は細菌密度に依存すると考えられる。最後に、各種細菌の活性度を検討するため、上述の人工基質に酢酸をTOCとして 35mg L^{-1} となるように添加し回分実験を行った。アンモニア性窒素は実験開始直後から消費され、その消費速度は酢酸を添加しない場合の値に等しい。一方、酢酸は消費されているがその消費速度は非常に遅い。これらの結果より、この生物膜内において酢酸を利用する他栄養性細菌の活性は低く酢酸の添加はアンモニアの酸化には影響を及ぼさないと考えられる。これらの実験結果の再現性を検討するため同様の実験を繰り返し行い、同様の結果を得ることができた。

4. おわりに

本研究の結論は以下に示す通りである。(1)反応層内の水質変化と生物膜内の微生物相の動態が対応した、(2)生物膜全体に各種細菌は存在するが、その密度は膜深部ほど高い、(3)Cell-CとEPS-C濃度は、共に生物膜深部ほど高く細胞外ポリマーの濃度は細菌密度に依存する。今後の課題として、本実験に用いた微生物の定量方法では、全菌数の一部しか検出できないため新たな方法の開発および応用が必要である。加えて微生物の定量とそれら微生物の活性を同時に把握する必要がある。

5. 参考文献 1)増田ら、下水道協会誌、Vol. 24, No. 278, Pp. 19-31. 2)Hobbie et al. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 33, Pp. 291-302. 3)増田ら、下水道協会誌論文集、Vol. 27, No. 316, Pp. 34-43.

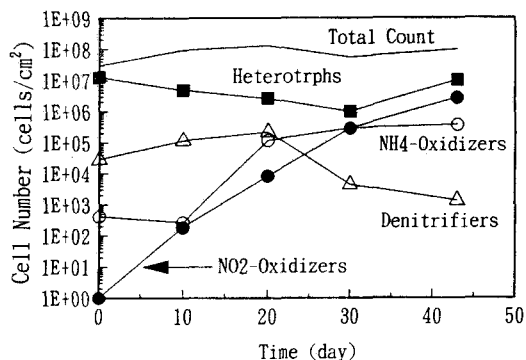


図-3 付着生物膜内の微生物相の変動

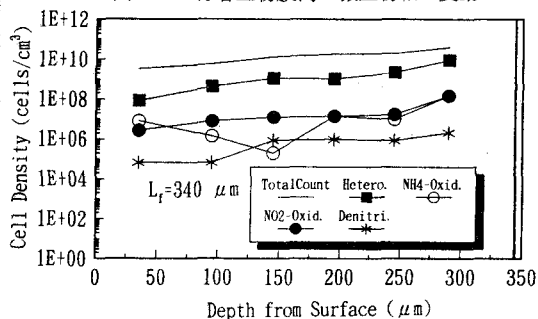


図-4 付着生物膜内の細菌密度分布

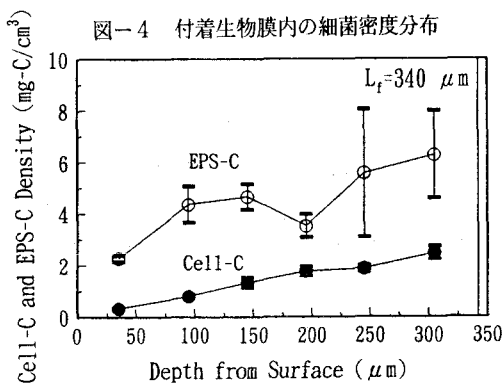


図-5 付着生物膜内のCell-CとEPS-C濃度分布

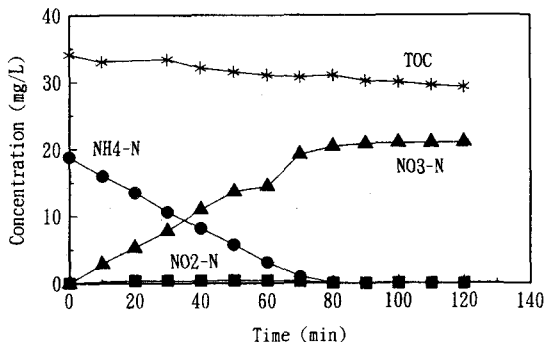


図-6 回分実験におけるTOCと三態窒素濃度の経時変化