

## 海水活性汚泥中、微生物の局在性の検討\*

田邊幾之助・木佐木博・原田元弘・川路博志

(応用微生物学研究室)

昭和56年8月10日 受理

### On the Distribution of Microorganisms in the Sea-Water-Activated Sludge\*

Ikunosuke TANABE, Hiroshi KISAKI, Motohiro HARADA, and Hiroshi KAWAJI

(Laboratory of Applied Microbiology)

#### 緒 言

海水活性汚泥のフロックは、前報の結果から、表在性の細菌と内在性の細菌から成り立っていることがわかった<sup>3,4,5,6</sup>。また、各細菌類は粘質物に包まれて microcolony の形で存在することも明らかになった<sup>5,7</sup>。しかし、今までの結果はフロックの集合体である活性汚泥を技術的に見て全体として取扱うことによって得たものである。従って、個々のフロックをとり上げて、いずれも同様な微生物学的な構成なのか、あるいは特定の微生物種が特定のフロックにのみ局在する、すなわち、極端にいうとフロックごとにそれを構成する微生物種が異なるかどうかについては答えてはいない。この問題を明らかにするためにはフロック個々の微生物相を検討する必要がある。その可能な方法としては個々のフロックを分離してとり、そのフロックについて通常の方法で構成微生物相を明らかにすればよい。技術的に可能で効果的な方法としては、①フロックを洗浄し、②個々のフロックを多少補強した廃

水・処理水培地上に撒き、培養して不均一系のコロニー mixed colony をつくらせる。③mixed colony から同じ組成の培地上に画線して mixed colony の構成微生物を分離し菌株とする。④これらの分離菌株を同定検索し、フロックの微生物相を明らかにするといったところである。

今回はこの方法でフロックの微生物相を明らかにし、活性汚泥中の微生物の局在性の有無を検討した。その結果、活性汚泥中には細菌について局在性はなく、各フロックはいずれも同じような細菌相を有することを証明出来たので報告する。

#### 材料と方法

##### 1. 洗 浄

活性汚泥画分に滅菌水を加えてよく混合し、30分静置して活性汚泥を沈降させ洗液を分離させ、これをくり返すのが活性汚泥本来の洗浄方法であろう。しかし、このやり方では時間がかかりすぎるので、それに代替する洗浄方法として活性汚泥画分に滅菌(海)水を加えてよく混合し、すぐ 400rpm (27×G) 1分間の遠沈を行い洗液を分離させる方法を検討した。何度も洗浄の必要がある場合はこれをくり返し行うものとする。

##### 2. 培 地

この実験で使用した培地は表1にまとめた。

##### 3. フロック微生物相の分離

図1に示した手順、すなわち重層平板・画線平板法で行った。まず、重層平板の作製は予め2%寒天培地 15ml を滅菌ペトリ皿に流し、固めておく。次に洗浄

\* この研究は文部省科学研究費特定研究の研究補助金を受けて行ったものの一部で、昭和51年2月2日の研究成果発表会(特定研究“微生物による環境浄化”研究報告 p. 336-338)で、また昭和51年10月10日の日農化関西支部・西日本支部合同大会(高知大学朝倉校舎, 高知市, 講演要旨集 p. 38)でも口演した。さらに、「環境改善技術の微生物生態学に関するシンポジウム」(北海道大学農学部, 昭和52年8月26日, 講演要旨集 p. 1-2), 日農化西日本支部大会シンポジウム「微生物による難分解物の処理」(熊本工業大学, 昭和54年11月10日, 講演要旨集 p. 23) および「汚染防除技術における微生物の生態」シンポジウム(東京大学農学部, 昭和55年1月8日, 研究報告 p. 109-123)でその一部として口演した。

Table 1. Culture media for isolation from the activated-sludges-ample

	tap-water-form		sea-water-form	
aerobic bacteria-medium	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	75% sea-water	400ml
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g	sea-water-sludge-supernatant	100ml
	tap-water	400ml	basal medium*	500ml
fungi-medium (pH 4.0~4.5)	tap-water-sludge-supernatant	100ml		
	basal medium*	500ml		
microalgae-medium	KNO <sub>3</sub>	2 g		
	basal medium**	1 L		
<i>Sphaerotilus</i> -medium	glycerol	5 g		
	sodium glutamate	0.9g		
	basal medium**	1 L		
<i>Zoogloea</i> -medium	arginine-HCl	0.5g		
	basal medium**	1 L		
*basal medium	glucose	1 g		
	polypepton	3 g		
	slops-supernatant, dil. 1:4	500ml		
**basal medium	Fe-EDTA	10mg	Fe-EDTA	10mg
	thiamine-HCl	500μg	thiamine-HCl	500μg
	biotin	5μg	biotin	50μg
	vitamin B <sub>12</sub>	5μg	vitamin B <sub>12</sub>	5μg
	mineral salt-solution	1 L	75% sea-water	1 L
pH	7.2		7.6~7.8	

した汚性汚泥を 5ml 当りフロック数 10~20 個となるよう 0.2% 寒天に懸濁し、これを先の 2% 寒天培地上に重層し固める。これを培養するとそれぞれのフロックから mixed colonies が生じる。この重層平板上に生じた各 mixed colony について画線平板を行って構成微生物を分離する。画線平板は重層平板と同じ 2% 寒天平板上に mixed colony から三段に画線し、培養して mixed colony 中の各微生物にコロニーをつくらせ分離を行う。ここで mixed colony の段階で混合培養の形態的特徴についてグルーピングを行っておくと労力の節約の上さらに多くの情報も得ることが出来る。なお、グルーピングは純粋培養について行う場合と同じ見方で行うことが出来る。すなわち、コロニーが一種類の微生物からなる時は勿論純粋培養と同じで smooth と rough<sup>1)</sup> の差を示す程度であるが、2 種以上のもが含まれる mixed colony では普通は多くの種がそれぞれセクター sector の形で出現して来る、しかし生育の遅いものは浮洲型コロニー a small floating colony として mixed colony 表面に現れることも多い。次に続く画線平板の操作は純粋分離と全く同じ要領で

行えばよい。なお、重層平板・画線平板法による微生物相の確からしさを証明するため対照として、洗浄活性汚泥を 15 分間のワーリングブレンダー処理した後、通常の稀釈平板法で分離して微生物相を明らかにした。この関係は多分前報で行った分画④と分画⑤の関係に近いものと推定出来る<sup>6)</sup>。

## 結果および考察

### 1. フロックの洗浄

フロックの洗浄は微生物の局在性検討のための試料調製法として行なわれるものではあるが、活性汚泥に関する何らかの情報を得ることを目的に実験を行った。

まず、活性汚泥本来の洗浄方法と考えられる 30 分間静置固液分離の際の上清とそれに代る簡易洗浄法である 400rpm 1 分間遠沈の上清(洗液)との微生物学的な比較を行った。菌数は最少稀釈法で得た結果を McCrady の最確数の表<sup>2)</sup>を用いて求めた。結果は表 2 のとおりであった。この 2 つの方法は細菌についても糸状菌についても菌数がほぼ同じで、微生物学的な試料

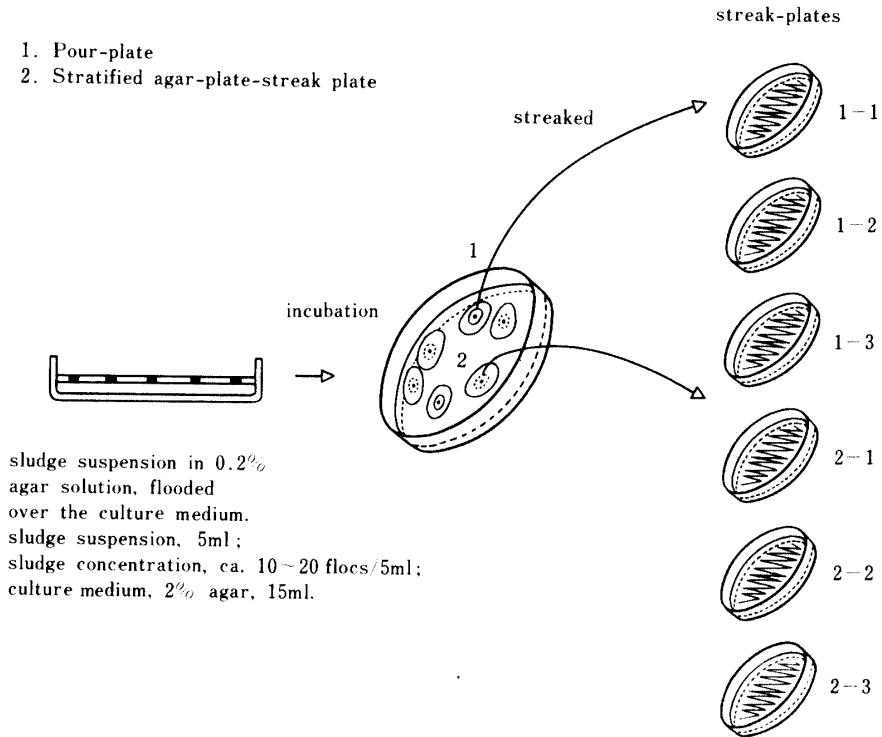


Fig. 1. Isolation technique

Table 2. Microorganisms in washings

treatment	viable counts by minimum dilution method, /ml	
	Supernatant by 30 minutes' settling of sludge	bacteria
	fungi	18
Supernatant by centrifugation of sludge at 400 rpm (27×G) for a minute	bacteria	$8.5 \times 10^4$
	fungi	20

調製方法としてはまず等価とみてよい。

次に、活性汚泥を 400rpm 1 分間遠沈の方法で洗浄するとして何回まで洗浄すれば、試料として適当かという問題に判断を下すため、活性汚泥をこの方法で滅菌（海）水によってくり返し洗浄し、1 回目の洗浄の遠沈上清を洗液①、2 回目を洗液②というように、くり返し行った洗浄の洗液に番号を付し、それぞれを最少希釈法によって菌数の測定を行った。結果は図 2 に水道水活性汚泥での例を示した。洗浄回数が増えると多少のばらつきがあるものの洗液中の細菌数、糸状菌数はほぼ同じ値をとるものと判断してよく、使用した活性汚泥のフロック数のオーダー  $3 \times 10^5$ /ml より低い値をとるようになるので、実験目的から活性汚泥試料としてはこれで充分であると思われた。なお、

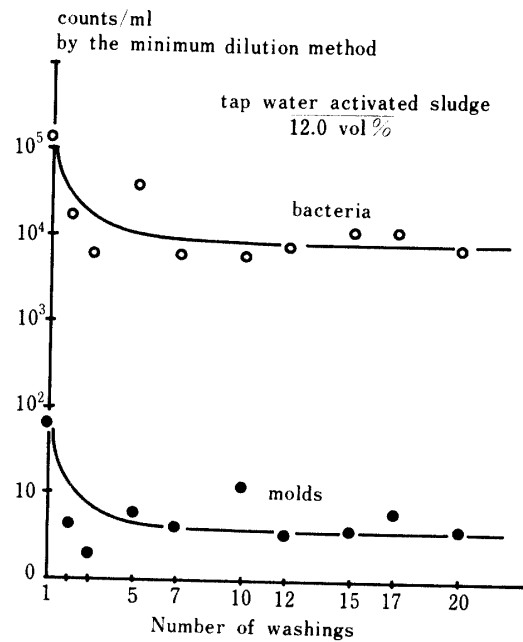


Fig. 2. Preparation of sludge samples by washing.

海水活性汚泥での洗浄も水道水活性汚泥の場合と全く

Table 3. Bacteria in the activated sludge

tap-water-strains		sea-water-strains	
flav. 3	<i>Flav. sp.</i>	flav. 1	<i>Flav. xanthochrus</i>
flav. 5	<i>Flav. sp.</i>	flav. 3	<i>Flav. xanthochrus</i>
		flav. 4	<i>Flav. sp.</i>
<i>Ps. sp.</i>	<i>Ps. stutzeri</i>	ps. 5	( <i>Ps. azotogena</i> )
ps.	<i>Ps. sp.</i>	ps. 7	<i>Ps. sp.</i>
		ps. 8	<i>Ps. sp.</i>
<i>Alc.</i>	<i>Alc. faecalis</i>		
white motile coryneform	coryneform bacteria	white coryneform	coryneform bacteria
pink coryneform		pink coryneform	
yellow coryneform 1		yellow coryneform	
		spiral	<i>Spirillum serpens</i>
<i>Bac. sp. 2</i>	<i>Bac. sp.</i>	<i>Bac. sp.</i>	<i>Bac. sp.</i>

Table 4. Isolates from the mixed colonies of the sea-water-activated-sludge-samples by the streak-plate method

the first isolation medium	bacteria-medium			<i>Zoogloea</i> -medium			<i>Sphaerotilus</i> -medium			viable counts by the pour-plate method ×10 <sup>7</sup> /ml of sludge-sample				
	a	b'	b''	a	b'	a	c							
No.	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<i>flavobacteria</i> 1														30
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
4														4
<i>yellow coryneform</i> 1														9
2											+			2
3														9
<i>white coryneform</i> 1														1
<i>pink coryneform</i>														1
<i>pseudomonad</i> 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
7														3
8														8
others														6
total counts														87

\* bacteria-medium: the culture medium for isolation of bacteria.

*Zoogloea*-medium: the culture medium for isolation of *Zoogloea ramigera*.

*Sphaerotilus*-medium: the culture medium for isolation of *Sphaerotilus natans*.

同じであった。そのため、以下の実験の活性汚泥試料の調製のための洗浄は混合液の遠沈も含めて4回とした。

## 2. フロックの微生物相

まず、分離培地上に生じた mixed colonies を分離培地別にグルーピングを行い、その典型的なものを画線平板によって純粋分離し、必要ならば画線平板による

純粋分離をくり返した後、同定・検索に供した。コロニー型と同定・検索結果との関係は表3に示した。この表3と重層平板・画線平板法の結果とを組合せたものが表4、表5である。まず、海水活性汚泥の場合は表4に示した。この場合、重層平板・画線平板法のデータがどれだけの情報を提供し、また、それが稀釈平板法の結果とどのように対応するかということが重要

Table 5. Isolates from the mixed colony of tap-water-activated-sludge by the streak-plate method

the first isolation medium	bacteria-medium			Zoogloea-medium							Sphaerotilus-medium						viable counts by the pour-plate method $\times 10^7/ml$ of sludge-sample				
	a	b'	b''	a		b			b'		a		b					b'			
type of mixed colony	1	1	1	1	2	3	1	1	2	3	4	1	2	1	2	3	4	1	2		
<i>flavobacteria</i> 3 5	+	+	++	+	+	+++		+	++										++	14 10	
<i>flav.</i> 5+ <i>yel. cor.</i> 4																				2	
<i>yellow coryneform</i> 1 <i>white motile coryneform</i>		+++		+++	+	++	+	+	++	+	++	+	+	++	++			+	+	22 22	
<i>Pseudomonas</i> sp. <i>pseudomonad</i>	+++	+++	++	++	+++			+++	+++	++	+++	+	+++	+++	++	++	+	+++	++	+++	62 2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	++		++	+++			++	+		+++	++	+++	+++	+++	+++	+++					0
<i>Bacillus</i> sp. 2 <i>pink coryneform</i>				++	++	++	+	++	+			++						++	+	2 11	
total counts																					142

である。一応、量的な関係は別にして微生物相の構成をみると、一般細菌用培地では mixed colony の型によって異なるが、a 型は flav 3 と ps 5、b' 型はこれに ps 7、さらに b'' 型は white cor. も含め 4 つのコロニー型が確かめられた。そしてとり上げた mixed colonies は同じ型内では構成が同じであると思われる。従って、方法自体はそれほど問題になるような誤りは認められない。次に、並行して行った稀釈平板法の結果との対応はどうであろうか。この場合稀釈平板法はワーリンブレンダー処理した試料を使っているのので、とくにブレンダー処理でこまかく刻まれ易い microcolony を形成する細菌やフロック表層に microcolony を形成するものは相対的に多く分離される可能性は大である。また、微生物相の minor が分離されることもある。いずれにせよ、この二つの方法にどの程度の対応があるかを表の上で検討すると、*flavobacteria* に関しては flav 1 と flav 3 が色調差に基づくコロニー型、reddish orange と reddish yellow の小コロニーであるが、初分離の一次コロニーと重層平板後の画線平板による二次コロニーとではこの程度の色調差は普通のことであるし、他の性質では全く一致しているため同一種の *Fl. xanthochrus* と同定出来ることなどからほぼ対応しているものと判断出来る。ところが、*pseudomonads* 群では稀釈平板で minor と思われる ps 5 と ps 7 が重層平板・画線平板法では多数分離されているように見える。このことを重層平板で生育の早い ps 5 が増加

し、画線平板でいかにも優占種と見えるものであるという考え方がある。事実、培地組成をさらに貧栄養型にした *Zoogloea* 分離培地、*Sphaerotilus* 分離培地などでは *coryne-form* が分離されていることから、このことを幾分か裏づけているように思われる。しかし、重層平板での培地組成を貧栄養型とするなどの工夫をすれば、稀釈平板法と微生物組成でもほぼ一致し、しかも、この方法の第一目的である個々のフロックの微生物相を明らかにすることが出来る点で優れた方法だと云えよう。事実、表 5 の水道水活性汚泥の場合には、一般細菌用の培地で行っても稀釈平板法の微生物組成とほぼ同じで、しかも、個々のフロックの微生物相も区別出来ている。従って、通常は重層平板・画線平板法の結果は稀釈平板法とはほぼ対応し、しかも個々のフロック微生物も区別出来ているものといえる。

さて当初の目的である、フロック毎の微生物の局在性があるかどうかに関して、個々のフロックの微生物相を見ると、各 mixed colony 間に共通項があって、それらがフロックの基本になる微生物群を構成しており、海水活性汚泥、水道水活性汚泥ともに基本は *flavobacteria-pseudomonads* である。従って、現在までに見て来た範囲内で活性汚泥の優占種は *flavobacteria* と *pseudomonads* で、少なくともこれらには局在性がないし、その他の微生物も mixed colonies の型と関連づけが可能で結局のところ局在性がある証拠は何もないと云ってよかった。

## 要 旨

海水活性汚泥は多種類の微生物から成り立っているが、通常の稀釈平板法などで明らかにした微生物相は活性汚泥の構成単位であるフロックの微生物相の平均値である。ここで個々のフロックの微生物相を明らかにするため、重層平板・画線平板法で検討を行った。これは海水活性汚泥を 400rpm (27×G) 1 分間の遠沈でくり返し洗浄し、フロックが 0.2% 寒天 5ml あたり 10~20 個となるように懸濁した。これを 2% 寒天培地上に重層して培養すると各フロックから mixed colony が生じるので、さらに新しい 2% 寒天培地上に画線して培養し、生じた単一種によるコロニーを分離、各フロックの微生物相を分析した。

以上の結果、①個々のフロックの微生物相が明らかになり、各フロックには共通の構成微生物相 *flavobacteria-pseudomonads* が確かめられたし、各フロックは互に定性的に似た微生物相をもつことも明らかに出来た。②しかも、並行して行った通常の稀釈平板法による微生物相とも質的には同一であると判断出来た。

対照として行った水道水活性汚泥についても同じ結果が得られた。

結論として、活性汚泥の微生物の分布には偏り、すなわち、微生物の局在性は認められなかった。

## 文 献

- 1) Iizuka, H., Tanabe, I., Fukumura, T., and Kato, K.: Taxonomic study on the  $\epsilon$ -caprolactam-utilizing bacteria, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 125-137 (1967)
- 2) Pochon, J.: *Manuel Technique d'Analyse Microbiologique du sol*, Masson et Cie, **34**, (1954)
- 3) Tanabe, I.: Microbiological studies of the sea water activated sludge, *Microbiology for Environment Cleaning*, Scientific reports of the research project, "Environment Cleaning by Microorganisms, 1974-1977", 74-86 (1978)
- 4) 田邊幾之助: 旧式焼酎蒸溜廃液の海水活性汚泥による処理とその微生物生態学的局面, 「環境科学」研究報告, 環境汚染物質の生物変換・汚染防除技術における微生物の生態, 109-123 (1980)
- 5) 田邊幾之助: 海水活性汚泥の微生物学的研究, "微生物による環境浄化" 研究報告, 85-86 (1975)
- 6) 田邊幾之助・上村幸広・吉井右・木佐木博・藤井正範: 海水活性汚泥の微生物相, とくに従来法による常在微生物相について, 鹿大農学術報告 No. **31**, 33-39 (1981)
- 7) 田邊幾之助・木佐木博・原田元弘・川路博志: 海水活性汚泥の微生物相, とくにフロックの構造性について, 鹿大農学術報告 No. **32**. 投稿中.

## Summary

Various kinds of microorganisms are found in the sea-water-activated-sludge, but by the pouring plate-method only an average-microflora of many flocs, of which the sea-water-activated-sludge is made, is collectively obtained. In order to investigate the microflora of a floc of the sea-water-activated-sludge, the stratified-agar-plate-method, followed by the streak-plate-method, was employed: the activated sludge-sample was prepared by washing three times on a centrifuge at 400 rpm (27×G) for one minute. The sludge was suspended in 5 ml of 0.2 percent agar solution, in which 10 to 20 flocs are to be found. This suspension was flooded over a culture-agar-plate for isolation and solidified, and the stratified-agar-plate was incubated. A loopful of the mixed colony developing on the stratified agar-plate was streaked on a 2 percent agar-plate, followed by two subsequent streaks on the other two agar-plates. The colonies, developing on the streak-plates, were isolated for the determination of the microflora of a floc.

It resulted in: ① every single floc is in possession of common constitutive microflora of *flavobacteria-pseudomonads*, and one floc is qualitatively almost similar to the others, and ② the microflora of the mixed colony, derived from a single floc, is qualitatively similar to that determined by the pouring plate-method.

The same results were obtained on the tap-water-activated-sludge for a control as those on the sea-water-activated-sludge.

It is concluded that any localized distribution of microorganisms in the activated sludge was not to be observed.