〈論 文〉

好気性バイオフィルターにおけるジメチルホルムアミドの 処理特性と微生物馴致過程の解析

胡 洪 営* 中 込 浩 樹*
藤 江 幸 一* 浦 野 紘 平*

Analysis of Bacterial Acclimation to Dimethylformamide on the Basis of Quinone Profile in Aerobic Biofilter

Hong-Ying HU,* Hiroki NAKAGOME,*
Koichi FUJIE* and Kohei URANO*

* Safety and Environmental Engineering Laboratory, Yokohama National University,
156 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240 Japan

Abstract

The change of microbial phase in the course of acclimation to hard-biodegradable chemicals such as dimethylformamide (DMF), which is widely used as solvent and discharged from chemical industries, was analyzed on the basis of quinone profile in the aerobic biofilter to assure the optimal operating condition for the further improvement of their removal from wastewater. The microbial film cultivated by feeding the artificial wastewater containing glucose and peptone (GP wastewater, hereafter) was acclimated to DMF within 3 weeks after the onset of continuous feeding of DMF, and a remarkable change in the quinone profile was observed along with the acclimation. The predominant quinone of the microbial film cultivated on the GP wastewater was featured ubiquinone (Q)-8, and those on the mixture of GP wastewater and DMF and on DMF as a sole carbon source were MK-9 (H₂) and Q-10, respectively. The predominant bacteria in the film could be changed from the β -group of *Proteobacteria*, generally inhabiting the activated sludge, to the facultative C₁-using bacteria such as *Mycobacterium* and to the obligate C₁-using bacteria such as *Methylobacterium* along with the acclimation. Relationship between the removal efficiency of DMF and the change in quinone profile was clarified in the aerobic biofilter.

Key words: wastewater treatment, quinone profiles, aerobic biofilter, dimethylformamide, bacterial acclimation

1. はじめに

人工的に合成された化学物質には生物的に分解されにくいものが多く、通常の生物排水処理では十分に処理されることなく残留した化学物質あるいは分解過程の中間生成物が水環境中に排出され、様々な汚染を引き起こしている。生物排水処理装置において、生物

に難分解な物質を効率よく処理するには、その物質の高い分解能力を有する微生物を装置内に高濃度に保持しておく必要がある。

特定の微生物を装置内に高濃度に保持するためには、包括的固定化や分離膜の利用などが考えられるが、これらを利用して環境条件の変化にかかわらず特定の微生物を装置内に保持することは、維持管理費など

* 横浜国立大学工学部物質工学科 〒240 横浜市保土ヶ谷区常盤台156

を考慮すると、排水処理においては必ずしも一般的ではない。生物排水処理装置は開放系の混合培養型生物反応装置であると見なすことができるので、特定の能力を持った微生物が優先種となれる最適な環境条件を整えることで、その微生物を装置内に保持する方法が一般的であると考えられる。したがって、生物排水処理装置において難分解性物質の除去を安定して行うためには、環境条件の変化によって、装置内に棲息する微生物の群集構造がどのように変化するかを解析し、処理性能の向上をもたらす微生物群集構造が保持される環境条件、すなわち装置の運転条件を明らかにしておく必要がある。流入する排水の性状および排水処理装置の運転条件と装置内での微生物群集構造との関係を明らかにできれば、処理性能の向上にきわめて有効な知見となる。

しかし、排水処理装置内には多種多様な微生物が棲息しており、個々の微生物を分離・同定する方法で微生物群集構造を解析することは事実上不可能である。最近、細胞を構成する化学物質を指標として微生物の同定に利用する方法が注目されている。このひとつに、微生物の呼吸鎖における電子伝達に関与するキノン分子種を利用する化学分類法が注目されている。絶対嫌気性菌を除いて、呼吸鎖を有する微生物には、その微生物に特有なユビキノン (Q) およびメナキノン (MK) が存在している。同じキノン分子種を有する微生物も存在するので、試料中のキノン分子種から、そこに棲息する微生物種を個々に特定することはできないが、個々の微生物種とその優先キノン種との関係について、ある程度のデータベースが得られているので、試料間での微生物群集構造の違いや、微生物相の変化の追跡に有効な情報を得ることが可能である。菌体キノ

ンの構造、性質および微生物種とキノン分子種の関係などについては原報^{1),2)}を参考されたい。

本研究では、難分解性物質としてジメチルホルムアミド ($(\text{CH}_3)_2\text{-N-CHO}$ 、以下 DMF) を取り上げ、好気性バイオフィルターに DMF を含む排水が流入したときの、バイオフィルター内に棲息する微生物群集構造の変化をキノンプロファイル法を用いて追跡し、微生物群集構造の変化と処理性能の関係を解析することを試みた。

難分解性物質として取り上げた DMF は、無色透明でわずかに粘性のある液体 (融点: -60°C 、沸点 153°C 、比重: 0.94) であり、水とは任意の割合で混合する。多くの無機物や有機化合物に対する溶解能力が強く、熱的および化学的にも安定であるため、ポリウレタン系人工皮革製造用溶剤、ウレタン繊維とアクリル繊維の紡糸溶剤、医薬や農薬等の反応溶剤などに広く利用され、消費量も大きい。また、DMF は催腫瘍性および催奇形性があるとされ、作業環境の許容濃度は 10ppm と定められている³⁾。自動酸素消費量測定装置 (クローメーター) を用いた生分解性試験から、DMF は馴致された微生物によってほぼ完全に分解されるが、分解速度が遅いことが報告されている⁴⁾。

2. 実験

2.1 装置および運転方法

好気性バイオフィルター実験装置の本体には、内径が 11cm、高さが 35cm の透明ポリ塩化ビニール (PVC) 製カラムを用い、ここに対辺間隔が 0.9cm、比表面積が 4.5cm^{-1} の PVC 製ハニコムチューブを充填した。装置の有効容積は $1,900\text{cm}^3$ 、充填体積は $1,700\text{cm}^3$ 、充填空隙率は 95% であった。

Table 1 Experimental conditions

Run		Run-0*	Run-1	Run-2	Run-3	Run-4
Influent concentration ($\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$)	GP**	110	110	0	0	0
	DMF***	0	250	250	500	2,500
Flow rate ($\text{cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$)		390				
Hydraulic retention time (h)		4.7				
Volumetric loading ($\text{kg}\cdot\text{C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)	DOC	0.6	2.0	1.4	2.8	13.8
	DMF	0	1.4	1.4	2.8	13.8
Temperature ($^\circ\text{C}$)		20 ± 2				
Dissolved oxygen concentration ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)		> 4				

* Cultivation of microbial film in the biofilter

** The artificial wastewater composed from glucose and peptone (1:1, W/W).

*** Dimethylformamide

生活排水を処理している活性汚泥ばっ気槽から採取した活性汚泥を、長期間にわたってグルコースとペプトンを主成分とする人工排水（以下、GP 排水）で培養し続け、これを実験装置に植種し、ここに GP 排水を $390\text{cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$ の流量で、装置の底部から連続的に供給した。GP 排水の組成は別報⁹⁾を参照されたい。実験条件をまとめて Table 1 に示した。GP 排水の供給による連続運転を開始してから 2 週間後に、GP 排水に DMF を有機炭素に着目した濃度が $250\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ となるように添加し (Run-1)、ここを運転期間の 0 日目とした。DMF を含む GP 排水の供給を開始してから、DMF および溶解性有機炭素 (DOC) の除去率が安定したところで、DMF だけを含む排水 (DOC 濃度として $250\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$) の供給に切り替えた (Run-2)。さらに DMF 濃度を $500\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ (Run-3) および $2,500\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ (Run-4) に上昇した。実験期間における曝気用空気の流量は毎分 2～4 l とし、溶存酸素濃度を $4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上に維持した。

2.2 分析方法

2.2.1 ジメチルホルムアミドおよびメチルアミン

ジメチルホルムアミド (DMF) 濃度の測定には FID 検出器付きガスクロマトグラフ (島津製作所製, GC-14 A 型, 以下 FID-GC) を用いた。内径 3 mm, 長さ 3 m のガラス製カラムに 60/80 メッシュの Gaskuro-pack-54 (ジーエルサイエンス[®]製) を充填して使用した。キャリアガス (窒素) 流量は毎分 50cm^3 , 注入口温度は 230°C , カラム温度は 200°C , FID 検出器の感度は $2\times 10^{-10}\text{A}$, 注入する試料液量は $4\text{ }\mu\text{l}$ であった。ジメチルアミン (DMA) および (モノ) メチルアミン (MMA) 濃度の測定には、充填剤として Chromosorb

-103 (PEG15%, KOH 1%) を用いた。キャリアガス (窒素) 流量は毎分 60cm^3 , 注入口温度は 200°C , カラム温度は 110°C とした。

2.2.2 溶解性有機炭素 (DOC)

試料を細孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過してから全有機炭素計 (島津製作所製, TOC-500 型) を用いて濃度を測定した。

2.2.3 微生物保持濃度

微生物が付着している担体の乾燥重量と担体のみの乾燥重量の差をもって、担体への付着微生物量とした。これと、装置単位体積当りの担体充填数の積から微生物保持濃度 (X) を決定した。

2.2.4 菌体キノン

菌体キノンの測定は別報⁹⁾の方法にしたがって行った。すなわち、担体から剝離した微生物を遠心分離し、これをクロロホルム・メタノール混合液 (2:1 (v/v)) とヘキサンで抽出してから、カラムクロマトグラフ (担体: 活性アルミナ (酸性), 溶出液: 10% (v/v) ジエチルエーテル・ヘキサン) と薄層クロマトグラフ (シリカゲルプレート, 展開液: 15% (v/v) ジエチルエーテル・ヘキサン) で精製し、高速液体クロマトグラフ (カラム: 三菱化成工業[®]製 ODS-1MUG, 溶離液: 3:1 (v/v) メタノール・イソプロピルエーテル, 検出

Fig.1 Biodegradation path of Dimethylformamide (DMF)

Fig. 2 The time courses of DMF and DOC removal efficiencies, and dissimilarity of quinone profiles (D)

器：日本分光工業(株)製875UV 型(波長：275nm(ユビキノン), 270nm(メナキノン)) および島津製作所製SPD-M6A 型(波長：190~300nm), 温度：30℃)を用いて分子種の同定および定量を行った。

3. 結果と考察

3.1 馴致過程における DMF 処理特性の変化

3.1.1 DMF の分解経路と除去率

既往の報告^{6)~8)}からまとめた DMF の生物分解経路を Fig. 1 に示した。DMF は、まず蟻酸と DMA に分解され、DMA は MMA を経てアンモニアにいたると考えられる。

バイオフィルターに GP 排水を供給して2週間後に $X = 2500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ に達したところで DMF の供給を開始した (Run-0 → Run-1)。DMF の供給開始後の DMF および DOC の除去率の経日変化を Fig. 2 に示した。DMF 供給開始前には (Run-0), 流入する GP 排水および処理水の DOC は、それぞれ約 $110 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ および $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であり、DOC の除去率は90%以上であった。DMF 供給開始直後には流入 DOC が $360 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, 処理水 DOC が $320 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ となり、DOC 除去率はわずか10%まで低下した。流入水中の DMF に由来しない DOC が $110 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であることから、これらがすべて除去されれば DOC 除去率は、30%程度となる。DMF 供給開始直後の約3日間の DOC 除去率が30%を大きく下回ったことは、DMF がグルコース、ペプトン等の易分解性有機物の分解を阻害していたと見なすことができる。その後の約3週間は、DOC 除去率が30%程度であったことから、DMF は除去されなかったが、グルコースおよびペプトンはほぼ分解されたものと判断できる。3週間後から DMF 除去率が急速に上昇し、4週間後には DMF 除去率は約75%に安定した。また、DMF が除去されるようになったところで、処理水にアンモニアが検出され、pH が8.5前後まで上昇した。ただし、硝酸は検出されなかった。

GP 排水の供給を停止して、DMF と無機栄養塩類のみを含む人工排水の供給に切り替えたところ (Run-2) DOC および DMF の除去率は大きく上昇し、それぞれ95%以上に達した。供給 DMF 濃度を $500 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ に上昇したところ (Run-3), DMF 除去率にはあまり変化がなかったが、DOC の除去率は60%以下まで低下した。さらに、供給 DMF 濃度を $2,500 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ まで上昇したところ、DMF および DOC の除去率は、それぞれ20%および10%まで低下した。供給 DMF 濃度の上昇によって、DMF としては検出されない蟻酸や DMA などの中間生成物が、処理水中に高濃度で残留しているものと考えられる。処理水中のアミン類の分析を

行ったら、MMA および DMA が検出され、処理水中に含まれる DMF 以外の DOC は、ほとんど DMA であることが確認された。DMF からカルボニル基を引き抜いた後、DMA を MMA に分解する過程が、微生物による一連の DMF 除去反応を律速していると考えられる。

3.1.2 DMF および DOC の除去速度

担体充填体積当りの DMF 除去速度 ($-r_{\text{DMF}}$) および DOC 除去速度 ($-r_{\text{DOC}}$) の経日変化を Fig. 3 に、 X の経日変化を Fig. 4 にそれぞれ示した。ただし、 $-r_{\text{DMF}}$ については、DMF を構成する有機炭素に着目した除去速度 ($\text{kg} \cdot \text{C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) として表示した。DMF 容積負荷の上昇にともなって (Table 1 参照) $-r_{\text{DMF}}$ も上昇しているが、DOC の除去速度は頭打ちになった。ただし、Fig. 2 に示された除去率の経日変化からも予測されるように、DMF の供給開始直後での $-r_{\text{DOC}}$ の低下は、流入した DMF の阻害によるグルコースおよびペプトン除去率の低下によってもたらされたと考えられる。GP 排水の供給を停止すると (Run-1 → Run-2), $-r_{\text{DMF}}$ および $-r_{\text{DOC}}$ はほぼ一致し、その後供給 DMF

Fig. 3 DMF and DOC removal rates per unit volume of packed materials, $-r_{\text{DMF}}$ and $-r_{\text{DOC}}$

Fig. 4 The time course of the microbial concentration (X) in the biofilter

濃度の上昇によって DMF 負荷が増大すると、前述のような中間生成物の残留によって、 $-r_{DOC}$ が $-r_{DMF}$ を下回った。

DMF の供給開始直後には X の上昇が見られなかったが、DMF の除去が始まるとほぼ直線的に上昇し、 $X=13,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 付近で一定となった。この値はこの形式の装置における X のほぼ上限と考えられる⁹⁾。

$-r_{DMF}$ および $-r_{DOC}$ を X で除した値、すなわち DMF および DOC の比除去速度、それぞれ $-v_{DMF}$ および $-v_{DOC}$ の経日変化を Fig. 5 に示した。DMF 供給開始前の $-v_{DOC}$ は $0.21(\text{g}\cdot\text{C}\cdot\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1})$ 程度であったが、DMF の流入によって約 3 日間ではあるが $0.07(\text{g}\cdot\text{C}\cdot\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1})$ 程度まで低下し、その後ほぼ $0.15(\text{g}\cdot\text{C}\cdot\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1})$ となった。

装置内で $X=13,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に達したところでは、充填担体表面の生物膜厚は平均 $700\sim 800\mu\text{m}$ と推定される。溶存酸素および基質が拡散によって供給されて好気性生物反応に有効に利用される生物膜の厚さは、表面から $100\sim 200\mu\text{m}$ 程度と報告されているので¹⁰⁾、生物膜内の密度が均一であるとするれば、生物膜表面近傍の有効微生物量を基準とした $-v_{DMF}$ および $-v_{DOC}$ は上記した値の 5～6 倍になるものと予想される。

実験室の小型装置における結果であるが、ハニコムチューブを充填したバイオフィルターにおける DMF 除去速度は、 $2(\text{kg}\cdot\text{C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1})$ 程度まで上昇できた。DMF 容積負荷が $1.5(\text{kg}\cdot\text{C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1})$ 以下ならば、DMF および DOC はともに 95% 以上の除去率が得られ、DMF はほぼ完全に分解または微生物に資化される。ただし、易分解性有機物が共存していると DMF の除去率は低下する。一方、DMF 容積負荷が $1.5(\text{kg}\cdot\text{C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1})$ 以上になると、前述のような中間生成物が残留することが明らかになった。

Fig. 5 Specific removal rates of DMF and DOC in the biofilter, $-v_{DMF}$ and $-v_{DOC}$

3.2 馴致過程における微生物群集構造の解析

3.2.1 キノンプロファイルの変化

DMF 供給開始後のキノンプロファイルの変化を、DMF 供給前と対比して Fig. 6 に示した。GP 排水によって培養された生物膜 (Fig. 6, 0 日後) におけるキノンプロファイルの優占キノン種は Q-8 (存在比: 78.0%) であり、つづいて Q-9 (5.3%), Q-10 (4.4%) であった。この生物膜には *Proteobacteria* の β および γ グループの微生物が多く存在し、活性汚泥の微生物群集構造^{11,2)}に類似していると見せる。

DMF の供給開始直後に、DOC 除去速度の大きな低下が見られたが、3 日後のキノンプロファイルでは Q-9 が増大しており、0 日後との差が認められた。Run-1 における 3 日後と 28 日後との間にはキノンプロファイルの大きな差異はみとめられないが、43 日後までに Q-8 を中心としたユビキノンの減少と、これに代わってメナキノン (主に MK-9 (H_2)) の増大があり、この間に DMF 除去率が 70% 程度まで上昇して安定した。

GP 排水の供給を停止してから 13 日後 (DMF 供給開始から 63 日後, Run-2) のキノンプロファイルでは、MK-9 (H_2) が Q-8 を上回って優占キノン種となった。供給 DMF 濃度を $500\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ に上昇しても (86 日後, Run-3) キノンプロファイルには大きな変化は見られなかったが、供給 DMF 濃度を $2,500\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ に上昇したところ (137 日後, Run-4), 優占キノン種は MK

Fig. 6 The change of quinone profiles in the acclimation of microbial film to DMF in the biofilter

-9 (H₂) から Q-10 に変化した。つまり、供給 DMF 濃度を上昇すると、DMF 除去率の変化より 1～2 週間遅れて、優占キノン種は Q-8 から MP-9 (H₂) および Q-10 へと変化した。

3.2.2 DMF 分解微生物

浦上ら^{6)~8)}はメチル化合物の製造プラント周りの土壌から、DMF 分解細菌として *Paracoccus aminophilus* DM-15, *Pseudomonas aminovorans* DM-81 と *Paracoccus aminovorans* DM-82 の 3 株を分離した。水酸化テトラメチルアンモニウム分解細菌である *Methylobacterium* sp. TH-15 および *Mycobacterium* sp. TH-3 も DMF 分解能を有する⁶⁾。*Paracoccus*, *Pseudomonas aminovorans*, *Methylobacterium* はグラム陰性の偏性 C₁ 化合物資化性細菌で、優占キノン種は Q-10 である。一方、*Mycobacterium* はグラム陽性の C₁ 化合物資化性細菌で、優占キノン種は MK-9 (H₂) である。

Fig. 6 のキノンプロファイルから、Q-8, Q-10 および MK-9 (H₂) に着目し、各々の存在比の経日変化を Fig. 7 に示した。バイオフィルター内微生物群が DMF 除去能を獲得すると Q-8 が減少し、MK-9 (H₂) が増大する。さらに、高濃度の DMF が供給されると Q-10 が増大している。この結果から、DMF 分解能力を有する微生物の優占キノン種は MK-9 (H₂) あるいは Q-10 であると考えられる。ただし、前述したように、Q-9 については、DMF による障害を受けにくいグルコースおよびペプトンを分解資化する微生物種に由来していると考えられるが、詳細な検討は行っていない。

馴致過程の MK-9 (H₂) と Q-10 存在比の増大は、DMF 分解能を持つ細菌である *Mycobacterium*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* などの増殖によるものと判断できる。前述したように、Q-10 を優占キノン種とする DMF 分解微生物は偏性 C₁ 化合物

資化性細菌であるため、グルコース・ペプトンが共存する場合には増殖しない。高濃度の DMF だけを供給しているときにこれらが増殖し、Q-10 が優占キノン種になった。さらに、グルコース、ペプトン等の易分解性有機物が共存する場合には、通性 C₁ 化合物資化性細菌である *Mycobacterium* が増殖し、GP 排水の供給を停止しても引き続いて MK-9 (H₂) の存在比が増大したが、DMF 濃度の上昇によって、より DMF 利用速度の大きい *Paracoccus* などの偏性 C₁ 化合物資化性細菌⁶⁾に遷移したものとそれぞれ判断している。

3.2.3 非類似度によるキノンプロファイルの解析

キノンプロファイルの変化を定量的に表示する目的で、非類似度 D が利用されている。異なる 2 つの微生物群 i, j のキノンプロファイル間の比類似度 $D(i, j)$ は次式で定義されている¹¹⁾。

$$D(i, j) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n |P_{ki} - P_{kj}| \quad (1)$$

i, j : 微生物群

P_{ki} : i のキノン分子種 k の存在比 (モル比)

P_{kj} : j のキノン分子種 k の存在比 (モル比)

D が 0.2 以上になると、二つの微生物群の間に微生物相の違いがあると見なすことができる¹¹⁾。

DMF 供給前すなわち GP 排水のみで培養された生物膜のキノンプロファイルを基準として、DMF 供給開始後のキノンプロファイルとの D を計算し、結果を DMF および DOC の除去率と併せて Fig. 2 に示した。DMF の供給開始直後にキノンプロファイルの変化があり、 D は 0.3 に上昇した。微生物群集構造に短期間での変化があったと見なすことができる。3 週間後から DMF 除去率が上昇し始めたが、さらに 2 週間ほど遅れて D が 0.6 付近まで上昇し、DMF 供給開始以前に比較して、微生物群集構造が大きく変化したことが分かった。流入 DMF 濃度を 500 および 2,500 (mg-C/l⁻¹) に上昇したところで、キノンプロファイルには MK-9 (H₂) の減少と Q-10 の増大が見られたが、 D には大きな変化がなかった。前述のように、この D は DMF の供給開始以前のキノンプロファイルとの違いを示しており、キノンプロファイルは変化しても、基準としたキノンプロファイルとの違いは同程度のままであった。DMF の供給開始以前のキノンプロファイルとの違いに加えて、運転条件によってキノンプロファイルが変化する過程での D の検討が必要である。

3.2.4 クラスター分析による微生物群集構造の分類

バイオフィルター内の微生物群が DMF 分解能を獲得する過程におけるキノンプロファイルの変化を、非類似度 D を測度としてクラスター分析を行った結果

Fig. 7 The change of mole fractions of the predominant quinone to the total quinone content in the acclimation of microbial film to DMF

Fig. 8 Classification of the microbial phases based on the dissimilarity of quinone profiles

を Fig. 8 に示した。ただし、グループ間における D は群平均法を用いて算出した。つまり、グループ A およびグループ B から成るグループ C と任意の他のグループ X との間の比類似度 $D_{C,X}$ は次式で与えられる¹²⁾。

$$D_{C,X} = \frac{n_A D_{A,X} + n_B D_{B,X}}{n_A + n_B} \quad (2)$$

ここで、 n_A および n_B はそれぞれ A, B グループに含まれる対象の数で、 $D_{A,X}$ および $D_{B,X}$ はそれぞれ A グループと X グループおよび B グループと X グループ間の比類似度である。

Fig. 8 に示されているように、 D に基づく微生物群集構造は供給排水中にグルコース、ペプトンおよび DMF が共存する Run-1 を中心とする Group-1 と、DMF のみが供給されている Run-2、3 および 4 からなる Group-2 に大別された。式(2)で求めた Group-1 と Group-2 との間の比類似度は 0.53 で、グループ間では相互にまったく異なる微生物群であると思なうことができる。Group-1 はさらに DMF 分解能を獲得する過程 (Group-1A) と、分解能を獲得したあと (Group-1B) に分類でき、このグループ間の D は 0.35 であった。一方、Group-2 は供給された DMF 濃度によってグループ分けが可能である。一つは MK-9 (H_2) を優占キノン種とする微生物群 (Group-2A)、もう一つは Q-10 を優占キノン種とする微生物群 (Group-2B) である。Fig. 7 のように、一連の優先キノン種は Q-8, Q-10 および MK-9 (H_2) であり、43 日目 (Run-1) から 50 日目 (Run-2) にかけて Q-8 と MK-9 (H_2) が、さらに 86 日目から 117 日目 (いずれも Run-3) にかけて MK-9 (H_2) と Q-10 が大きく変化し、それぞれ Group-1 と Group-2 および Group-2A と Group-2B にグループ

化された。Run-3 の開始時と終了直前では、優先キノンが変化しており、別グループに分類された。キノンプロファイル間の D に比較して、各々が分類されたグループ間の D がより大きくなり得ることに注意されたい。以上のことから、キノンプロファイルの比類似度を測度としたクラスター分析は、生物膜が DMF 分解能を獲得する過程における微生物群の動態を把握するために、解析の一手法として利用できることがわかった。

3.3 微生物相と DMF 除去速度

前述したように、MK-9 (H_2) および Q-10 を優占キノン種とする微生物群が DMF の分解および除去に関与していると思なうことができる。そこで、キノンプロファイル中の MK-9 (H_2) と Q-10 の存在比率の和と、すでに Fig. 5 に示されている DMF 比除去速度 ($-v_{DMF}$) との関係を図 9 に示した。MK-9 (H_2) と Q-10 の和が $-v_{DMF}$ とよく相関しており、MK-9 (H_2) と Q-10 を優先キノン種とする微生物群、すなわち *Mycobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas aminovorans*, *Methylobacterium* などの C_1 化合物資化性細菌がバイオフィルター内で増殖し、生物膜内の優先種になることにより、装置の DMF 除去性能が向上したと判断できる。

バイオフィルター内の生物膜が DMF 分解能を獲得した後で、DMF のみを供給したときの $-v_{DMF}$ を、処理水中の DMF 濃度に対してプロットして見ると、 $-v_{DMF}$ は DMF 濃度のほぼ 0 次反応と思なうことができ、最大値はおおよそ $0.2 \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{g} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ であった。前述した生物膜表面近傍での有効生物量を基準にとれば、 $-v_{DMF}$ はこの 5~6 倍となり得る。DMF としての除去速度は上記した有機炭素としての除去速度の 2.03 倍である。一方、単離された *Paracoccus Aminophilus*

Fig. 9 Correlation of the specific DMF removal rate $-v_{DMF}$ and the mole fraction of predominant quinones Q-10 and MK-9(H_2)

DM-15のケモスタット培養条件におけるDMF比除去速度は、 $2 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{g} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ になることが報告されている⁷⁾。DMFの供給時でも生物膜表面には原生動物の棲息が観察されており、原生動物の重量を除いて、生物膜表面近傍でのDMFの比除去速度を考えれば、本研究での $-v_{\text{DMF}}$ は、ケモスタット培養された*Paracoccus Aminophilus* DM-15の $-v_{\text{DMF}}$ にほぼ等しい値となる。

4. ま と め

1) バイオフィルターへのDMF供給開始直後には、易分解性有機物の除去に対するDMFの阻害が見られるが、約3週間で装置内生物膜はDMF除去能力を獲得した。

2) 易分解性有機物の共存や過負荷の状態では、未分解のDMFおよびDMAを主成分とする中間生成物が処理水に残留した。

3) キノンプロファイルの比類似度を指標とし、クラスター分析を加えることで、バイオフィルター内生物膜のDMFへの馴致過程における微生物群集構造の変化を把握できた。

4) MK-9 (H_2) とQ-10を優先キノン種とする*Mycobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas aminovorans*, *Methylobacterium*などの C_1 化合物資化性細菌がバイオフィルターによるDMF除去を担っていると判断できた。

(原稿受付 1992年5月18日)

(原稿受理 1992年8月19日)

参 考 文 献

- 1) 平石明 (1990) キノンプロファイル法による活性汚泥細菌の生態学的研究, 用水と廃水, **32**, 1059-1070.
- 2) Hiraishi, A. (1988) Respiratory quinone profiles as tools for identifying different bacterial populations in activated sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 39-56.
- 3) 日本産業学会 (1986) 許容濃度暫定値の提案理由, 産業医学, **28**, 231-232.
- 4) 窪田清宏, 岩浪洋一, 藤江幸一, 浦野紘平 (1990) アクニロニトリル含有排水の生物分解性と浸漬汙床による処理, 水処理技術, **31**, 253-260.
- 5) 胡洪宮, 中込浩樹, 藤江幸一, 浦野紘平 (1992) キノンプロファイル法によるバイオフィルター内の生物膜を構成する細菌相の解析, 水環境学会誌, **15**, 262-265.
- 6) Urakami, T., Araki, H. and Kobayashi, H. (1990) Isolation and identification of tetramethyl-ammonium-biodegrading bacteria, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 41-44.
- 7) Urakami, T., Araki, H. and Kobayashi, H. (1990) Isolation and identification of N, N-dimethylformamide-biodegrading bacteria, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 45-47.
- 8) 浦上貞治 (1990) C_1 化合物資化性微生物の分類と応用に関する研究, 醸酵工学, **68**, 279-300.
- 9) 藤江幸一, 胡洪宮, 池田康郎, 浦野紘平 (1991) バイオフィルターにおける生物膜の増殖と目詰まり係数, 水質汚濁研究, **14**, 564-573.
- 10) Fujie, K., Furuya, T. and Kubota, H. (1979) Effectiveness factor of microbial film in aerobic reaction, *J. Ferment. Technol.*, **57**(2), 99-106.
- 11) Hiraishi, A., Morishima, Y. and Takeuchi, J. (1991) Numerical analysis of lipoquinone patterns in monitoring bacterial community dynamics in wastewater treatment system, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **37**, 57-70.
- 12) 木下栄蔵 (1987) 多変量解析入門, 啓学出版.