

II-435 高率汚水処理のための凍結乾燥細菌の選別に関する研究

京都大学 学生員 二星幸弘

京都大学 正会員 宗宮 功

京都大学 正会員 藤井滋穂

1. 実験目的 現在の下水道での、汚水を処理場のみに集中させるという発想では、今後、下水管渠はますます長く、その費用の全体に占める割合は増大するものと考えられる。本研究では、上記の発想を逆転させた新しい水処理システムとして、細菌を凍結乾燥粉末化し取扱を容易にした上で、それを排出源にて投入し、汚水排出源での処理あるいは管路内での処理を行わしめる方法を取り上げた。その実用化のための基礎的研究として、活性の高い菌をより高率的に得るための使用細菌種の選別について検討する。

表-1 同定に用いた試験

①グラム染色	⑦O-Fテスト
②抗酸性染色	⑧硝酸塩還元テスト
③芽胞染色	⑨セラム液化テスト
④運動性テスト	⑩イントールテスト
⑤カタラーゼテスト	⑪クレアゼテスト
⑥キシダーゼテスト	

2. 実験方法 実験には、活性汚泥中より単離した35種の細菌を用いた。これらは、表-1に示すような生理実験によって同定を行った。単離菌株は、3/10倍桜井培地(表-2)にて馴致した後、同じ培地で1g細口ビンにて大量培養し、これを元試料液として、元試料液そのものと、これを凍結乾燥の後復水したものとの両方について、生物量と活性度を測定した。生物量は生菌数・SS・波長660nmでの吸光度(E_{660})の3つにより把握した。活性度は、3/10倍桜井培地に試料液が全体の1%となるように添加し、それを振とう培養して E_{660} 、TOC・DOCの経時変化を測定することより求めた。

表-2 10/10倍桜井培地の成分
(蒸留水1gに対して)

ペプトン	2.0g
粉末酵母エキス	1.0g
ブドウ糖	0.5g

3. 実験結果 同定試験の結果、35種の単離

菌株の内訳は表-3のようにBacillusをはじめ9属と推定された。これらについて、誘導期が短く、また、増殖・基質除去の速度が大きい菌種を選出するため、3/10倍桜井培地で

表-3 単離菌株の内訳

菌No	属名	菌No	属名	菌No	属名
B1	Bacillus	B13	Streptococcus	B25	Bacillus
B2	Bacillus	B14	Alcaligenes	B26	Acinetobacter
B3	Bacillus	B15	Pseudomonas	B27	Streptococcus
B4	Bacillus	B16	Bacillus	B28	Moraxella
B5	Bacillus	B17	Micrococcus	B29	Streptococcus
B6	Bacillus	B18	Lactobacillus	B30	Corynebacterium
B7	Bacillus	B19	Bacillus	B31	Micrococcus
B8	Bacillus	B20	Lactobacillus	B32	Bacillus
B9	Bacillus	B21	Streptococcus	B33	Streptococcus
B10	Bacillus	B22	Corynebacterium	B34	Micrococcus
B11	Micrococcus	B23	Micrococcus	B35	Bacillus
B12	Moraxella	B24	Bacillus		

馴致した後、同じ培地で培養した際の E_{660} およびTOC・DOCの経時変化を測定し、各菌種の特性の把握を試みた。各菌種の誘導期の長さ、対数期の比増殖速度定数、100時間後のTOC除去率を算出し、増殖特性と基質除去特性の関係を示したのが図-1である。この図より、誘導期が短く、比増殖速度定数が高いものほどTOC除去率が高いという傾向が見られたが、中でもBacillusは比較的誘導期が短く、比

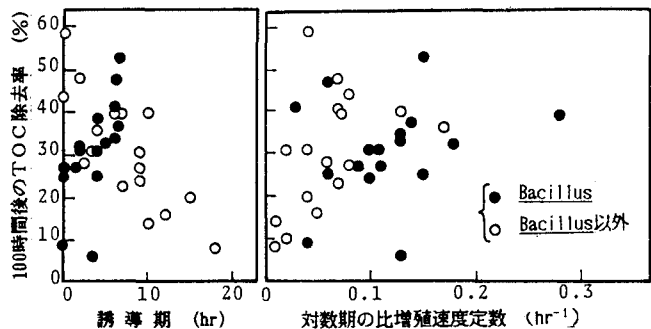


図-1 増殖特性と基質除去特性との関係

増殖速度定数が大きいという結果が得られた。このことと、*Bacillus*が芽胞形成能を持ち凍結乾燥処理に耐えやすいことを考え合わせれば、この菌種は本研究の目的とする処理に有効である可能性が高い。

そこで、次に*Bacillus*を中心にB1～9, B11～15について、改めて馴致を行った後、凍結乾燥処理を行い、その影響を見た。まず、生菌数の変化について図-2に示した。*Bacillus*については生存率が 10^{-5} 程度と低いものもあり、この結果は一見不合理のようだが、芽胞形成菌の非孢子細胞は凍結乾燥などのショックに極めて弱いという報告もあり、元の芽胞の割合が低かったためと考えられる。続いてその誘導期について図-3に示した。*Bacillus*では、すべての菌株で凍結乾燥復水後の誘導期が5～15時間と延びた。これは凍結乾燥後の生菌の大部分が芽胞であり、復水後、その発芽に時間を要したためと考えられる。生菌数、誘導期長さの変化に対応して、基質除去特性も、*Bacillus*ではその除去速度が低下する傾向が見られた。以上の点でB11～15では*Bacillus*ほど顕著な変化は見出されなかった。以上により、*Bacillus*では凍結乾燥処理に際し芽胞の割合を増大させておくこと、および復水後の誘導期を短縮する処理（芽胞の活性化）が重要であると考えられる。

実処理に際しては、栄養摂取性の異なる細菌を混合して用いる方が効果的であると考えられるので、次に菌種を混合した場合の効果について検討した。図-4は各菌種を混合した場合の増殖曲線を示す。この図より、菌種を混合した場合にも各々の菌種はその増殖特性を失うことなく、全体としてその特性が相加的に現れることが示された。この場合、基質除去特性も、刻々の除去速度の大きいものの特性に同調することが見出された。以上より、*Bacillus*を中心に数種の細菌を混合して用いる方が、分解する有機物の種類にも幅を持たせることができ、汚水を高率処理するためには有効であると考えられる。

5. おわりに 本研究では、汚水の排出源処理に、取扱が容易な凍結乾燥細菌を用いることを考え、これに適する使用細菌種の検討を行った。その結果、基質除去能が比較的高く、また、凍結乾燥処理などのショックに強い芽胞を形成する*Bacillus*を中心に数種の細菌を混合して用いることが有効であることが見出された。今後、生存率を高めるための芽胞形成促進処理、および復水後の誘導期を短縮するための芽胞の活性化処理について検討することが重要であると思われる。なお、実験では辻隆正（現東陶機器KK）の御助力を得た。また、一部、科学研究費62750542の補助を受けた。

《参考文献》1) Cowanら『医学細菌同定の手びき』近代出版1985, 2) 長谷川武治『微生物の分類と同定』学会出版センター1978, 3) 武田美文ら『病原細菌の生化学的検査法』医学書院1985, 4) 加藤敏明『活性汚泥における他栄養性細菌の分布に関する研究』京都大学修士論文1986, 5) 根井外喜男編『微生物の保存法』東京大学出版会1977

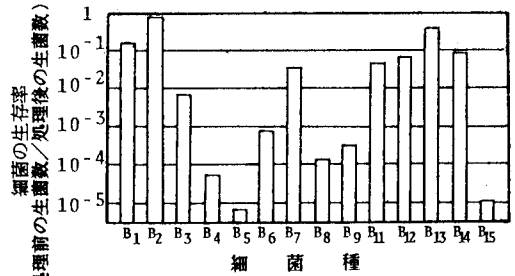


図-2 凍結乾燥処理による生菌数の減少

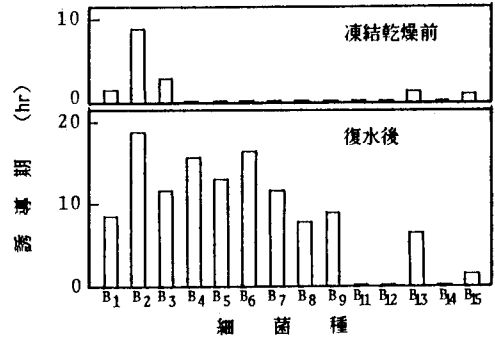


図-3 凍結乾燥処理による誘導期の変化

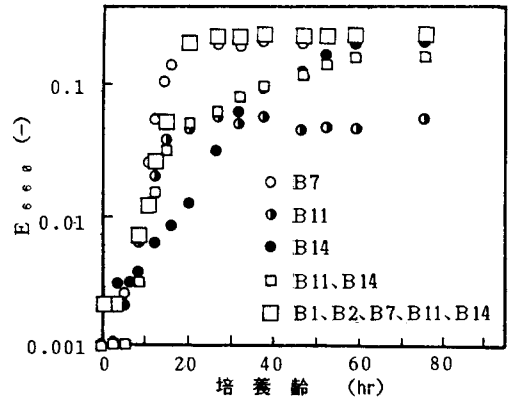


図-4 菌種を混合した場合の増殖曲線