

活性汚泥中の有用枯草菌と硫酸塩還元細菌との相互関係の検討

群馬工業高等専門学校 学生会員 ○野沢和穂, 野口直希
群馬工業高等専門学校 学生会員 金澤推, 町田舟津輝
群馬工業高等専門学校 正会員 青井透, 宮里直樹

1. はじめに

1.1. 研究背景

現在, コンクリート製下水道管の硫酸劣化が深刻な問題となってきた。国土交通省によると, 全国の下水道管の延長は約 45 万 km である¹⁾。そのうち, 供用開始から耐用年数である 50 年を越えたものは約 1 万 km であり, 今後, 大幅に増えることになる。また, 硫酸劣化によって耐用年数に達する前に, 早い場合には供用開始から 15 年程で既に鉄筋まで腐食している下水管も報告されている²⁾。下水道管の腐食劣化は機能障害を引き起こすだけでなく, 道路陥没などによって日常生活や社会活動に重大な影響を及ぼすことも考えられる。実際に, 平成 24 年には, 下水道管の老朽化に起因した道路陥没が約 3,900 箇所では報告されている。

コンクリート製下水道管の腐食劣化の過程は, まず, 嫌気条件下で硫酸イオンが硫酸塩還元細菌によって還元され硫化水素となり, 気中に拡散する。次に, 硫化水素が結露中に取り込まれ, 硫黄硝酸細菌により硫酸に変化する。そして, 硫酸がコンクリート中の水硝酸カルシウムと化学反応を起こし, 腐食が発生する。一般的な腐食対策としては, 表面被覆工法が用いられているが, 腐食因子を完全に遮断することができないため, 現在, より効果の高い腐食対策の開発が求められている。

私達の研究室では, 有用枯草菌 (以下 *Bacillus* 属細菌) が優占化した活性汚泥の特徴について調査している。これまでの研究結果から *Bacillus* 属細菌が優占化した活性汚泥では, ①バルキングが抑制されている³⁾, ②汚泥特有の硫化水素臭が抑えられている⁴⁾, ③硫酸塩還元細菌数が 1/5~1/3 程度である⁵⁾, ということを報告している。一方で, 硫酸塩還元細菌は, 汚泥の悪臭の原因である硫化水素を生成することに加え, 糸状性バルキングの重要因子の一つで

ある。また, 生方ら⁶⁾が *Bacillus* 属細菌有占化曝気槽での *Bacillus* 属細菌による大腸菌の抑止効果について研究した結果, *Bacillus* 属細菌優占化活性汚泥では大腸菌数が少なく, 「*Bacillus* 属細菌が生産した抗生物質が大腸菌の増殖を抑えた」と考えられた。

Bacillus 属細菌の増殖した汚泥では硫化水素の臭いが少ないということから, 私達は, *Bacillus* 属細菌が硫酸塩還元細菌にも何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えた。

1.2. 研究目的

予備実験として, 回分式を用いた活性汚泥へのミネラル添加を行った結果, *Bacillus* 属細菌のコロニー数は塩化第二鉄を添加した活性汚泥では約 9 倍, ケイ酸ナトリウムを添加したものでは約 3 倍に増えた。また, 鉄は好気呼吸に必要な要素であり⁷⁾, ケイ素は *Bacillus* 属細菌の芽胞の形成に必要な要素であることがわかっている⁸⁾。これらのことから, *Bacillus* 属細菌を増殖させ, 安定的に維持させるためには鉄とケイ素が重要なのではないかと考えている。

そこで, 下水管腐食防止を目指すため, まずは *Bacillus* 属細菌を増殖させることを目的とした。*Bacillus* 属細菌の増殖因子をさらに詳しく検討するため, 都市下水処理施設を模した装置を作成し, それを用いて活性汚泥に鉄を添加した場合の *Bacillus* 属細菌のコロニー数の変化を調査した。

1.3. *Bacillus* 属細菌

Bacillus 属細菌は, 細胞形状が棒状で, 芽胞を形成し, 好気性または通性嫌気性で, 生菌は主にグラム陽性菌である。水中や土壌中に存在するだけでなく空中にも飛散し, 自然界に広く分布している。

Bacillus 属細菌の一種である *Bacillus subtilis* は枯草菌と呼ばれている。枯草菌は, 有機物に対する

分解力の強さから、農業や生活の中で、有害な微生物の殺滅や分解に利用されるようになってきている。*Bacillus* 属細菌には多くの種類があるが、詳しく分類されていない細菌群であるものを *B.sp.R3* とした。本研究では、特に *B.subtilis* の増殖を目的とした。*B.subtilis* 及び *B.sp.R3* のコロニー形状を図-1 に示す。

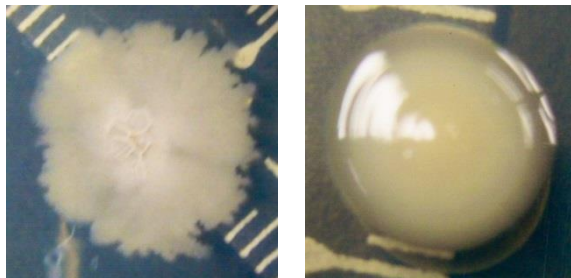


図-1 コロニー形状 (*B. subtilis* (左), *B.sp.R3* (右))

1.4. 硫酸塩還元細菌

硫酸塩還元細菌 (Sulfate Reducing Bacteria) は、低分子の有機物を電子供与体とし、硫酸塩を電子授与体として異化的硫酸塩還元を行う偏性嫌気性細菌である。通常、水田の土壌、川の底土などの嫌気的な環境に生息する。硫酸塩還元細菌により硫酸塩は硫化水素に還元されるので、自然界の硫黄サイクルの重要な経路の一つを担っている。硫酸塩還元細菌の生育に適する pH は 6 から 9 程度であり、最適温度は 28 から 30℃ 付近とされている。

2. 実験概要

2.1. 都市下水処理施設を模した装置を用いた *Bacillus* 属細菌増殖因子の検討

都市下水処理場を模した装置で活性汚泥にミネラルを添加し、*Bacillus* 属細菌のコロニー数と硫酸塩還元細菌数 (MPN 個) の変化を調査した。

本実験で用いた実験装置を図-2 に示す。それぞれ容量 2L の曝気槽と沈殿槽からなる、都市下水処理場を模した装置に、MLSS が 2000mg/L となるように調整した活性汚泥 (高崎市の A 処理場より採取) を 4L 入れて稼働させ、人工廃水 (組成は表-1 に示す) を 1 日に 1L の速さで添加した。4 日に一度 *Bacillus* コロニー数、硫酸塩還元細菌数を測定し、その他に、水温、pH、MLSS、アンモニア態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$)、硝酸態窒素 ($\text{NO}_x\text{-N}$) を測定した。今回の

実験では、鉄を添加した場合の菌数の変化を調査するため、塩化第二鉄を添加したもの (Fe あり) と、添加していないもの (Fe なし) を用意した。

表-1 人工廃水組成

組成	濃度 [g/l]
ケイ酸ナトリウム	0.13
硫酸マグネシウム	0.46
酢酸カリウム	0.10
ポリペプトン	0.20
炭酸水素ナトリウム	0.07
塩化カルシウム (2水塩)	0.05
リン酸二水素カリウム	0.09
(※) 塩化第二鉄	0.15

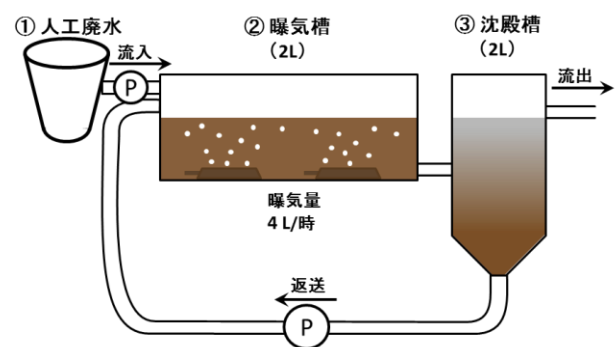


図-2 実験装置概要

2.2. 分析方法

Bacillus 属細菌のコロニー数は、活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌を培養して計測した。液体培地 (組成は表-2 に示す) をオートクレーブにて滅菌し、これをシャーレに各 20ml 注入して冷蔵庫で 2 日間以上保管し、寒天平板培地 (以下、培地と記す) を作成した。10² 倍希釈した試料水をハンドホモジナイザーで 2 分間攪拌し、その後クリーンブースで、滅菌した生理食塩水 (0.85% 塩化ナトリウム溶液) で 10³, 10⁴, 10⁵ 倍の希釈試料水を作った。培地に希釈試料水を 0.1ml 滴下し、コンラージ棒で表面に均等に塗り広げ、一つの希釈試料水に対して 2 枚ずつ培地を作成した。32℃ に設定した恒温槽で 48 時間培養後、培地上に現れたコロニーを観察した。東京農工大学工学部細見研究室での DNA 解析により現在明らかになっている *Bacillus* 属細菌のコロニー形状と種名の関係から各コロニーを区分し、*B.subtilis* と *B.sp.R3* のコロニー数を測定した。

表-2 *Bacillus* 属細菌培地組成

組成	濃度[g/l]
トリプトン	10.0
乳酸ナトリウム溶液(70%)	5.0
亜硫酸ナトリウム	0.5
硫酸マグネシウム7水和物	2.0
硫酸第二鉄7水和物	0.5
クエン酸鉄アンモニウム	0.5

硫酸塩還元細菌数(MPN 個)の測定には、下水道試験法の MPN 法を用いた。培地は Mara と Williams の改編 ISA 培地を使用した。試料を 10^3 から 10^7 ままで希釈したものを用いて、硫酸塩還元細菌を培養した。10 日後に黒変したものを数え、MPN 法によって硫酸塩還元細菌数を求めた。

MLSS は下水道試験法のガラス繊維ろ紙法に基づいて測定した。pH、アンモニア態窒素及び硝酸態窒素はそれぞれ、携帯用測定器、オートアナライザ(ブランルーベ社 AACS-II)、分光光度計(SHIMADZU UV-1240)を用いて計測した。

3. 結果・考察

Bacillus コロニー数及び硫酸塩還元細菌数の計測結果を表-3、表-4 に示す。また、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、MLSS、pH の測定結果を図-3、図-4、図-5 に示す。

実験開始から約一か月後の *Bacillus* コロニー数は、鉄を添加した場合では 1.64×10^9 (個/gMLSS)、添加しなかった場合では 2.34×10^9 (個/gMLSS)となり、実験開始時と比較して *Bacillus* 属細菌全体は増殖した。しかし、*B.subtilis* と *B.sp.R3* で分けると、時間の経過とともに、増殖を目的としていた *B.subtilis* ではなく、*B.sp.R3* が増えていた。このことから、活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌の菌相が変化することが考えられる。また、鉄を添加したものは、添加していないものと比べると *B.subtilis* のコロニー数に大きな変化はないものの、*B.sp.R3* のコロニー数の増加が抑えられていた。硫酸塩還元細菌数を比較すると、鉄を添加した活性

汚泥は添加していないものより少なかった。これらのことから、鉄を添加することにより、活性汚泥中の細菌の増殖抑制が起きたと推察された。

村上らは、アルミニウムイオン・鉄 ($3+$) イオンは 30mg/L 付近で菌体の生育を完全に阻害することを明らかにしている⁹⁾。今回の実験の、鉄添加濃度は 30mg/L であり、生育阻害が起こる濃度であった。したがって、鉄添加濃度を変更する必要があると考えられた。

また、アンモニア態窒素と、硝酸態窒素の変化では、アンモニア態窒素が減少する一方で硝酸態窒素が増加しているため、硝化反応が進んでいることが確認できた。しかし、アンモニア態窒素濃度の急激な減少もみられたため、より安定的な装置の運転管理が求められる。

表-3 *Bacillus* コロニー数の変化

	<i>Bacillus</i> コロニー数(個/gMLSS)			
	Feあり		Feなし	
	<i>B.subtilis</i>	<i>B.sp</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.sp</i>
11月3日	1.04E+07	0.00E+00		
11月6日	2.63E+07	1.05E+08		
11月9日	0.00E+00	2.89E+09		
11月13日	7.91E+07	1.30E+07		
11月18日			1.69E+03	2.97E+07
11月21日	8.93E+08	1.45E+09	1.89E+07	1.42E+08
11月25日	8.26E+07	0.00E+00	3.85E+08	0.00E+00
11月29日	0.00E+00	2.84E+09	4.55E+07	1.52E+09
12月3日	2.83E+07	1.47E+09	3.85E+07	7.04E+09
12月7日	0.00E+00	1.64E+09	0.00E+00	2.34E+09

表-4 硫酸塩還元細菌数の変化

	SRB(MPN個/gMLSS)	
	Feあり	Feなし
10月30日	4.6E+05	
11月6日	1.9E+04	
11月9日	5.7E+04	
11月13日	1.0E+04	
11月18日		6.8E+05
11月17日	2.1E+04	
11月21日	2.1E+05	2.3E+05
11月25日	9.1E+05	1.1E+06
11月29日	6.2E+03	1.1E+05
12月3日	1.4E+04	3.3E+05
12月7日	3.9E+04	6.5E+04

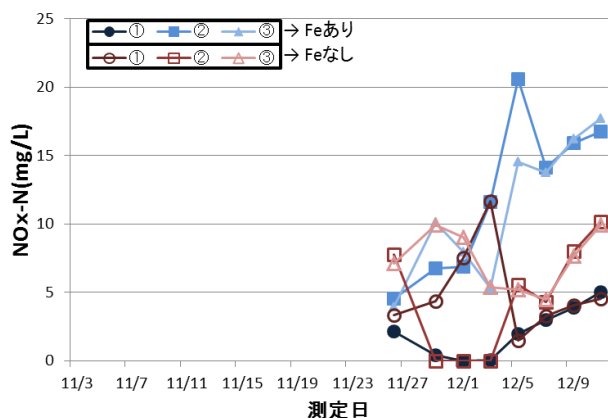


図-3 硝酸態窒素の経日変化

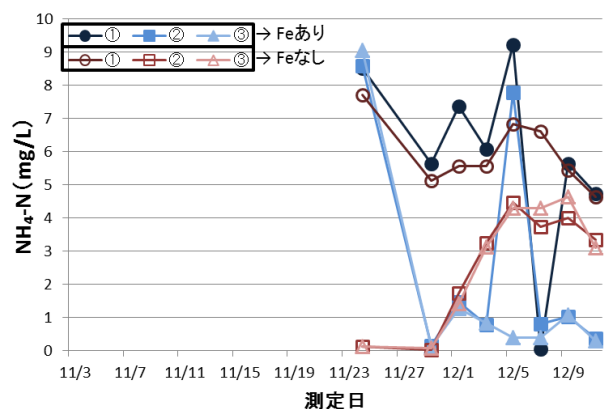


図-4 アンモニア態窒素の経日変化

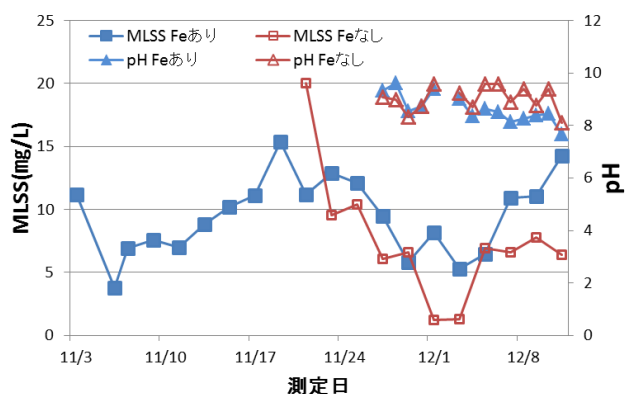


図-5 MLSS・pHの経日変化

4. まとめ

都市下水処理場を模した装置を用いて活性汚泥に鉄を添加したところ、*B.sp.R3* は増殖したが、*B.subtilis* は増殖しなかった。また、鉄を添加した場合には、添加していない場合と比較して、*Bacillus* 属細菌と硫酸塩還元細菌がどちらも減少しており、鉄の添加濃度が細菌の増殖を抑制する 30 mg/L 付近であったことから、両細菌の増殖が抑制されたと考えられた。

5. 今後の方針

Bacillus 属細菌優占化実験について、鉄による菌体の増殖抑制を考慮し、鉄の濃度を変えて実験を行うとともに、ケイ素を添加する場合としない場合の、*Bacillus* 属細菌数の変化を調査する。また、処理水の TOC や COD を測定することで、装置が安定的に運転できているのか確認する。

参考文献

- 1) 国土交通省「下水道・計画的な改築・維持管理」
http://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/crd_sewerage_tk_000135.html
(2013 年 10 月 14 日)
- 2) 須賀雄一, 稲毛克俊「下水処理施設におけるコンクリート腐食対策への取り組みについて」衛生工学シンポジウム論文集, 2004, pp.93-96
- 3) 河野亮太, 齋田圭太「し尿処理場と下水処理場でのミネラル投入によるバチルス菌優占化試験」卒業研究発表予稿集, 2006, pp.49-52
- 4) 黒岩和貴「バチルス菌と触媒を併用した脱臭方法の検討」卒業研究発表予稿集, 2008, pp.53-54
- 5) 大澤良実, 長田真輝「有用枯草菌優占化活性汚泥中の微生物群調査」卒業研究発表予稿集, 2007, pp.37-38
- 6) 生方明日香, 荻野修大, 宮里直樹, 青井透「バチルス菌優占化活性汚泥反応槽でのバチルス菌と糞便性大腸菌の挙動, 第 47 回環境工学研究フォーラム講演集, 2010, pp.88-90
- 7) 種村公平「絵とき「生物化学工学」基礎のきそ」
- 8) 池田丈「生物によるシリカの形態制御」生物工学会誌 Vol 89, 第 6 号, 2011, pp.343
- 9) 村上弘毅, 土井幸夫, 青木満, 入江鎌三「好気性し尿処理槽における *Bacillus* spp. の優占化とそれらの生化学的性質」水環境学会誌, Vol 18 第 2 号, 1995, pp.97-108