

シリカ (Si) 添加による活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌の優占化と窒素除去性能の検討

群馬工業高等専門学校 学生会員 ○石井 敦大
群馬工業高等専門学校 正会員 青井 透

群馬工業高等専門学校 学生会員 岡田 幸
群馬工業高等専門学校 正会員 宮里 直樹

1. はじめに

現在, *Bacillus* 属細菌は, 芽胞形成時にケイ酸を取り込むこと^{1), 2)}やし尿処理の分野でミネラル成分を定期的に投入することで曝気槽内での *Bacillus* 属細菌が増加 (*Bacillus subtilis* が優占化) しているという報告がされている. *Bacillus* 属細菌とは, 自然界に広く分布しており, 好気性環境で活発化して, 過酷な条件下では芽胞を形成することが知られている³⁾. しかし, *Bacillus* 属細菌が増殖するメカニズムは解明されていない. 試料の基質の条件を Si+Mg にすることで, *Bacillus subtilis* の個体数が増加することも報告されている. 本研究では *Bacillus* 属細菌の増殖条件を検討するとともに Si に着目して行った回分式による活性汚泥の馴養試験を行った結果を報告する.

2. 実験方法

2.1 *Bacillus* 属細菌の測定方法

培養は 1 週間ごとに *Bacillus* コロニー培養を行った. 培地の組成は, ニュートリエントブロス 0.8%, グルコース 0.8%, 塩化ナトリウム 0.6%, 寒天 1.7% 水溶性デンプン 1.0% である. これらを蒸留水に投入して加熱溶解後, この液体培地をオートクレーブで滅菌し, シャーレに各 20ml 注入して冷蔵庫で 2 日間以上保管し, 寒天平板培地を作成した. 次に攪拌した試料水を滅菌した生理食塩水 (0.85 塩化ナトリウム溶液) で希釈倍率は 10^3 , 10^4 , 10^5 として希釈試料水を作成した. 培地に希釈試料水 0.1ml 滴下し表面に均等に塗り広げ, 1 つの希釈試料水に対して 2 枚ずつ培地を作成し, 30°C に保った恒温槽に 48 時間培養後, 培地上に現れたコロニー数のカウントを行った.

2.2 回分式による活性汚泥の培養試験

前橋市の R 系汚泥は, *Bacillus* 属細菌が高崎市の A 処理場活性汚泥 (以下 A 系汚泥) に比べて優占的に検出されている. しかし, R 系汚泥の 16S rRNA 遺伝子によるシーケンス解析 (MiSeq 解析) では,

キーワード *Bacillus* 属細菌, 硝化, 脱窒, シリカ

表 1 基質の組成

	好気条件 (mg/L)	嫌気条件 (mg/L)
Polypeptone	0	200
CH ₃ COOK	0	100
Yeast extract	0	20
NaHCO ₃	71	71
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0	157
KH ₂ PO ₄	44	44
CaCl ₂ · 2H ₂ O	39	39
NA ₂ S · 9H ₂ O	122	0

Bacillus 属細菌が 0.02% という結果であり少なめであった. この活性汚泥にペプトンを有機源とした基質に, Si を添加した条件と活性汚泥と基質のみのブランクの条件で 20°C の恒温槽内にて馴養を行った. 寒天培地を用いて *Bacillus* 属細菌を培養し, コロニー数をカウントした. 馴養汚泥を用いて, 硝化脱窒に着目した好気条件と嫌気条件の回分試験を行った. 基質の組成を表 1 に示す. 表 1 の基質に, 炭酸水素アンモニウム, 硝酸カリウム, 硫酸マグネシウムを加えて行った. 好気の試料採取は 0h, 1h, 3h, 6h, 嫌気は 0h, 24h, 48h とする. 回分試験で採取した試料はオートアナライザーで各窒素態濃度とリン濃度を分析した.

3. 実験結果と考察

3.1 *Bacillus* 属細菌コロニー培養

馴養開始から約 2 週間後の基質のみのブランクと Si を添加した条件の *Bacillus* 属細菌 (*Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sp.*, *Bacillus megaterium* 以下それぞれ *B.sub.*, *B.th.*, *B.sp.*, *B.th.* と示す) と雑菌のコロニー数計測結果を表 2, 表 3 に示す.

表 2, 表 3 より 2 週間後の培養結果を基質のみと基質+Si の条件のもので比較すると希釈倍率が 10^{-3} のときでは差はほとんどみられなかったが 10^{-4} で比較すると多少の差がみられたことから Si を添加することによって *Bacillus* 属細菌が増殖したと考えられる.

表 2 2週間後の基質のみの *Bacillus* 属細菌の
コロニーカウント数

	B.sub	B.th	B.sp	B.meg	雑菌
10 ⁻⁵ ①(個)	0	0	0	0	×
10 ⁻⁵ ②(個)	0	0	0	0	×
10 ⁻⁴ ①(個)	2	0	0	0	○
10 ⁻⁴ ②(個)	2	0	0	0	○
10 ⁻³ ①(個)	44	1	0	0	○
10 ⁻³ ②(個)	42	1	2	0	○
ブランク①(個)	0	0	0	0	×
ブランク②(個)	0	0	0	0	×

表 3 2週間後の基質+Si の *Bacillus* 属細菌の
コロニーカウント数

	B.sub	B.th	B.sp	B.meg	雑菌
10 ⁻⁵ ①(個)	0	0	0	0	○
10 ⁻⁵ ②(個)	0	0	0	0	×
10 ⁻⁴ ①(個)	8	0	0	0	○
10 ⁻⁴ ②(個)	6	0	0	0	○
10 ⁻³ ①(個)	49	2	0	0	○
10 ⁻³ ②(個)	32	3	0	0	○
ブランク①(個)	0	0	0	0	×
ブランク②(個)	0	0	0	0	×

3.2 活性を用いた回分試験結果

好気回分試験結果を図1、図2に示し、嫌気回分試験の結果を図3に示す。図1よりSiを添加し馴養した汚泥を用いた条件のほうがNH₄-N濃度の低下が多少早く、アンモニア酸化活性が高いことが推察される。また、図2よりNO₃-N+NO₂-N濃度はSiなしの条件で傾きが小さく濃度上昇が緩やかであることから、脱窒活性が良好であることが推察される。図3の嫌気回分試験は24時間でNO₃-N濃度が0に近い値となったことからSiありとなしでの判断はできないと推察される。

4. まとめと今後の課題

以上の結果より、R系汚泥におけるコロニー培養試験ではSiを添加した条件のほうで*Bacillus*属細菌が多少増加することがわかった。また、回分試験の結果からSiを添加することでNH₄-N濃度低下速度が変化すると推察された。しかし、今回の回分試験だけでは、Siとの関係性があるか判定できない。

今後も同様な回分試験を継続していき、窒素除去に及ぼす影響について検討していく予定である。また、PCR法などの分子生物学的手法を用いた調査も行っていく予定である。

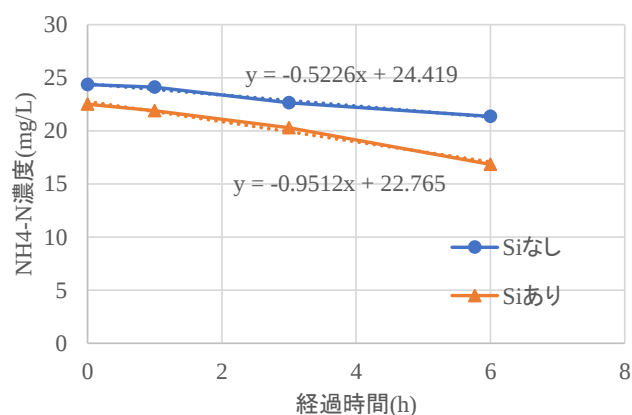


図1 回分試験(アンモニア酸化活性)

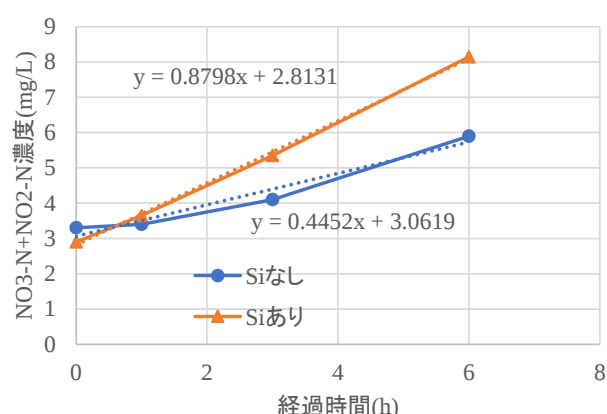


図2 回分試験(脱窒活性)

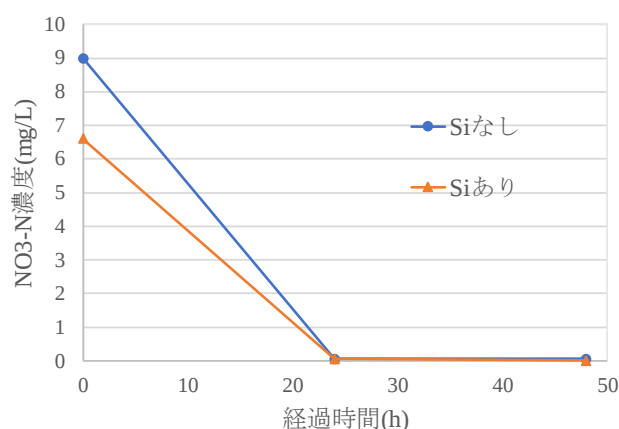


図3 回分試験(嫌気)

参考文献

- 1) Ryuichi Hirota et al.: Journal of Bacteriology, pp.111-116, 2010.
- 2) 池田丈: ケイ酸添加による活性汚泥中の *Bacillus* 属優占化ならびに余剰汚泥低減メカニズムの解析, IFO Research Communications, No.29, pp.15-23, 2015.
- 3) 青井他: 枯草菌優占化メッシュ型回転円盤による低CN比環境の優れた窒素除去性能, 下水道研究発表会講演集, 54th, pp.13-15, 2017.