

VII-2 下水汚泥中に存在する独立栄養細菌の特性について

岩手大学工学部 学生会員 ○佐藤優子 北田久美子
岩手大学工学部 正会員 伊藤歩 相澤治郎 海田輝之

1.はじめに

下水汚泥を再利用するためには、汚泥中の重金属濃度を低減させることが望ましい。著者らは下水汚泥からの重金属の除去方法として鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌を用いた生物学的方法について検討してきた。その結果、汚泥への硫黄添加により汚泥中の硫黄酸化細菌が増殖し、pHの低下に伴い汚泥中の重金属が溶出し、さらに汚泥に鉄酸化細菌のみを添加すると、汚泥中の硫化銅からの銅の溶出が促進されること等を明らかにした。下水汚泥からの生物学的重金属除去において、その除去機構を解明するために、鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌の汚泥中での挙動を明らかにし、それぞれの役割を個別に把握する必要がある。そこで本研究では、下水汚泥中に存在する鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌の MPN 法²⁾による計数を検討した。また、硫黄酸化細菌の硫黄酸化、鉄酸化細菌の鉄酸化あるいは硫黄酸化を個別に阻害する薬剤を用いれば、両細菌が下水汚泥からの重金属除去に及ぼす効果を特定することができる。そこで本研究では、まず、硫黄酸化細菌の硫黄酸化に対する阻害剤として NEM（N-エチルマレイミド）及びアジ化ナトリウムによる阻害作用を検討した。

2.実験材料及び実験方法

2.1 鉄酸化細菌および硫黄酸化細菌の MPN 法による計数

菌数を MPN 法で計数するにあたり、実験方法を確立させる必要があるため、培養液中の細菌と汚泥中の細菌の計数実験を併せて行った。

2.1.1 実験材料

鉄酸化細菌は岩手県旧松尾鉱山跡新中和处理施設の酸化槽から採取し、また硫黄酸化細菌は岩手県内の下水処理場から採取した消化脱水汚泥から分離し、実験室で継代培養したものである。鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌の培養液試料としては、十分に増殖した培養液から、遠心分離とろ過により、細菌の代謝物を除去したものを用いた。下水汚泥試料としては、蒸留水と汚泥を混合し、十分振とうしたもの及び 30 秒間超音波破碎したものを用いた。MPN 法に用いた培地の組成を表-1 に示す。鉄酸化細菌の計数には 9K 培地、硫黄酸化細菌の計数には硫黄培地を用いた。全ての器具、培地、希釈水を乾熱滅菌あるいは高圧蒸気滅菌した後、クリーンベンチに入れて紫外線殺菌した。ただし、9K 培地は高圧蒸気滅菌による硫酸第一鉄の酸化を防ぐために、表-1 に示したように 2 つに分けて調製し、別々に滅菌した。

表-1 培地組成

9K培地		硫黄培地	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0g	S ⁰	10.0g
KCl	0.10g	KH ₂ PO ₄	3.0g
K ₂ HPO ₄	0.50g	MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.50g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3g
Ca(NO ₃) ₂	0.01g	CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.25g
H ₂ SO ₄ ,10N	1.0mL	FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.02g
蒸留水	700mL	蒸留水	1L
pH9.0に調整		pH4.8～5.0に調整	
FeSO ₄ ・7H ₂ O	44.22g		
蒸留水	300mL		
pH1.0に調整			

2.1.2 接種操作

菌を接種する以外の全ての作業を無菌状態のクリーンベンチ内で行った。培地 9ml を分注した試験管 5 本に、同一希釈の接種試料を 1ml ずつ添加し、35℃の恒温槽中で培養した。鉄酸化細菌は培地が赤褐色に変色した試験管、硫黄酸化細菌は 10 日おきに pH を測定しブランクより pH が低下した試験管を陽性とし、陽性のものは鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌が存在するものとした。

2.2 NEM 及びアジ化ナトリウムによる阻害作用

表-2 に実験条件を示す。乾熱滅菌した振とうフラスコに pH を 4.8～5.0 に調整した ONM 培地を 1L 添加し、硫黄酸化細菌の培養液を 20mL ずつ添加した。Run1 には阻害剤を添加せず、Run2～Run4 に NEM（N-エチルマレイミド）、Run5～Run7 にアジ化ナトリウムを表-2 に示したように添加し、25℃、120rpm で

振とうした。経日的に採水し、pH、硫酸イオン濃度を測定した。

3.実験結果及び考察

3.1 鉄酸化細菌と硫黄酸化細菌の MPN 法による計数

鉄酸化細菌の培養液をトーマの血球板を用いて顕微鏡により直接計数した菌数は 8.1×10^6 cell/mL であった。試験管培地は 14 日目

で変色し始め、19 日目で陰性、陽性の区別が明確になり、培養 27 日目で終了とし、最確値表による鉄酸化細菌数は 2.2×10^6 cell/mL であった。また、硫黄酸化細菌の培養液の直接計数は 2.6×10^8 cell/mL であった。試験管培地は 10 日目で pH が低下したものと全く変化しなかったものと顕著に差が現れたので、10 日目

で終了とした。最確値表による硫黄酸化細菌数は 2.8×10^6 cell/mL であった。下水汚泥試料においては、前処理で振とうした汚泥中の硫黄酸化細菌は、10 日目で pH に変化はなく、20 日目で pH が低下し始め、30 日目で陰性、陽性の区別が明確になった。最確値表による菌数は 2.6×10^6 cell/g-dry sludge であった。また、超音波破砕した汚泥も同様に pH が変化し、30 日目で終了とした。菌数は 1.4×10^6 cell/g-dry sludge で、振とう汚泥とほとんど変わらなかった。

3.2 NEM 及びアジ化ナトリウムによる阻害作用

図-1 に pH の経日変化、図-2 に硫酸イオン濃度の経日変化を示す。阻害剤を添加しない Run1 では 1 日目以降硫酸イオン濃度が増加し、それに伴い pH が低下した。NEM を添加した Run2~4 では、pH の低下と硫酸イオン濃度の増加は見られなかった。アジ化ナトリウムを 10^{-3} M 添加した Run5 及び 10^{-4} M 添加した Run6 では、pH の低下と硫酸イオン濃度の増加は見られなかった。アジ化ナトリウムを 10^{-5} M 添加した Run7 では若干の阻害作用があるものの、硫酸イオン濃度の増加に伴い pH が低下した。このことから、NEM は 10^{-4} M、アジ化ナトリウムは 10^{-4} M で硫黄酸化細菌の硫黄酸化を阻害することが明らかになった。

4.おわりに

本研究では、下水汚泥中に存在する鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌の MPN 法による計数を検討した。また、NEM 及びアジ化ナトリウムの、硫黄酸化細菌の硫黄酸化に対する阻害作用を検討した。本研究で得られた結論を以下にまとめる。

(1)下水汚泥中には硫黄酸化細菌が存在し、その菌数は 2.6×10^6 cell/g-dry sludge である。

(2)硫黄酸化細菌の硫黄酸化は、 10^{-4} M の NEM または 10^{-4} M のアジ化ナトリウムで阻害される。

なお、本研究の一部は、科学技術振興事業団、戦略的基礎研究推進事業の補助を受けた。ここに謝意を表します。

〈参考文献〉

- 1)北田, 伊藤, 相澤, 海田, 下水汚泥中に生息する鉄酸化細菌による下水汚泥からの重金属の除去, 環境工学研究論文集, Vol.36, 105-112, 1999
- 2)土壤微生物研究会編, 土壤微生物実験法, 1979

表-2 実験条件

Run No	溶液	初期pH	細菌	NEM	NaN ₃
1	ONM培地 1L (10g-S/L)	4.8~5.0	植種	Not added	Not added
2				10^{-2} M	Not added
3				10^{-3} M	Not added
4				10^{-4} M	Not added
5				Not added	10^{-3} M
6				Not added	10^{-4} M
7				Not added	10^{-5} M

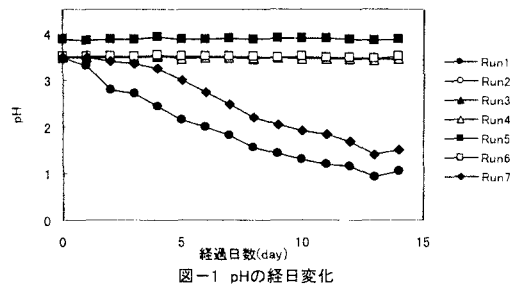


図-1 pHの経日変化

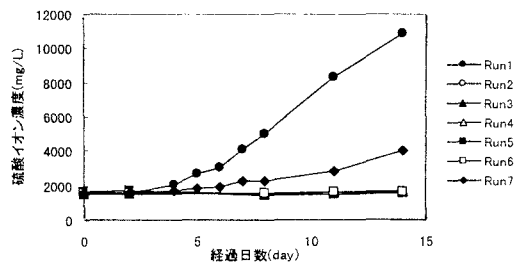


図-2 硫酸イオン濃度の経日変化