

活性汚泥からの亜ヒ酸酸化細菌の分離とその集積培養

岩手大学工学部 学生会員 ○三浦洵一 A. H. アンダーソン
 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

下水中の無機態ヒ素は、活性汚泥処理プロセスにおいて好気状態のときは酸化され、無酸素状態のときは還元を受けることを示した^{1),2)}。

本研究では、活性汚泥中に生息していると考えられる独立栄養の亜ヒ酸酸化細菌を分離し、その細菌を用いて各種条件下での亜ヒ酸の酸化について検討した。

2. 実験材料及び実験方法

活性汚泥からヒ素耐性細菌と独立栄養の亜ヒ酸酸化細菌を分離するために、Weeger ら³⁾が提唱した培地を用いた。ただし、有機炭素源である乳酸ナトリウムは添加しなかった。表-1 は培地成分を示しており、最終的な亜ヒ酸の濃度は 100mg/l である。実験に用いた活性汚泥は、ヒ素の汚染の無い下水を受容している岩手県都南浄化センターから採取した。培地に活性汚泥 10mL を加え、pH を 7 に調整した後、ただちに試料を採取し、その後は 24 時間毎に採水した。試料は孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、そのろ液について HPLC-ICP-MS 法により亜ヒ酸 (As(III)) とヒ酸 (As(V)) の濃度を測定した。また、生物顕微鏡とトーマ氏血球計数板を用いて細菌数を測定した。

活性汚泥による As (III) の酸化を確認した後、培

表-1 培地の成分

溶液 A (1L)		溶液 D (0.1L)	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10g	NaAsO ₂	0.1733g
NH ₄ Cl	5g	蒸留水	100mL
Na ₂ SO ₄	5g		
K ₂ HPO ₄	0.05g	培地 (0.5L) (mL)	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.3g	溶液 A	50
蒸留水	1L	溶液 B	1.25
溶液 B (0.1L)		溶液 C	5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.13g	溶液 D	5
蒸留水	100mL	細菌懸濁液	10
溶液 C (0.1L)		滅菌水	428.75
NaHCO ₃	8g		
蒸留水	100mL		

養液 10ml を新しい培地に加えて継代培養を行い、同様の操作を 4 回繰り返した。また、3 回目の継代培養物を平板培地 (上記の液体培地に寒天を 23g/L となるように加えたもの) に植菌し、平板培養を 2 回繰り返した。さらに、液体培地で培養、再度平板培地に植菌し、平板上に形成された 2 種類のコロニーを普通寒天培地に植菌して純粋分離を行った。これらの分離株を用いて As(III)の酸化実験を再度行った。また、有機物の影響を検討するために、上記の培地に乳酸ナトリウムを 0.25、0.5、1g/L となるように加えた条件で実験を行った。

3. 結果及び考察

液体培養での As(III)及び As(V)の濃度変化と細菌数の変化を図-1 に示す。最初に活性汚泥を添加した場合には、As(III)濃度は 6 日目までゆっくりと減少し、その後の 3 日間で As(III)のほとんどが As(V)に酸化された。その後の継代培養では 3 日目から 4 日目にかけて急激に酸化されており、活性汚泥に比べ酸化が速くなっている。また、ブランクについては 9 日間の培養で As(III)はほとんど酸化されなかったため、溶存酸素による化学的な As(III)の酸化は、細菌を加えたものに比べ非常に遅いと言える。これらの結果は、活性汚泥中の細菌が As(III)を生物学的に酸化で

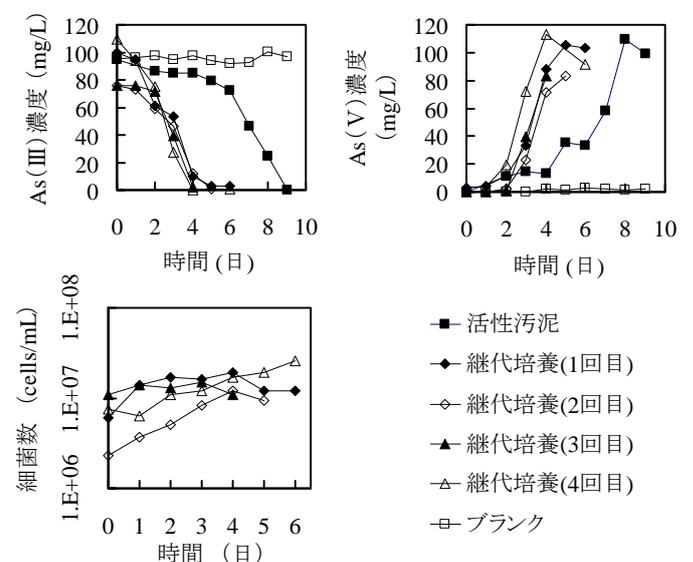


図-1 液体培養におけるヒ素濃度及び細菌数の経時変化

きることを示している。継代培養において、細菌数は培地中に有機炭素源が無くても経時的に増加したので、活性汚泥中に独立栄養の亜ヒ酸酸化細菌が存在することが分かった。

分離された2種類の微生物 (C-1 及び C-2 とする) を用いた As(III)と As(V)の濃度変化及び細菌数の経時変化を図-2 に示す。C-1 は As(III)の酸化が認められたが、C-2 はほとんど酸化が見られなかった。As(III)の酸化が認められた細菌について、16S rRNA 遺伝子による種の同定をテクノスルガ・ラボに依頼した結果、*Ensifer Adhaerens* HAMBI 1631 株 (AJ420774) と比較した結果、相同率 99.9%の相同性を示した。

上述の As(III)酸化細菌を用いて、培地に有機物が含まれるときの As(III)濃度と細菌数の変化を図-3、As(V)濃度と TOC 濃度の変化を図-4 に示す。有機物を添加した条件では、無添加の条件と比べて As(III)の酸化が速まり、細菌数の増加も大きかった。しかしながら、有機物の濃度の違いによる差は生じなかった。これは初期の有機物濃度が高すぎたためであると考えられ、低濃度での影響について検討する必要がある。また、細菌数の増加は As(III)の酸化が進んでいた1~3日目にかけて急激に増加しており、細菌が As(III)を酸化することでエネルギーを獲得して増殖したと考えられる。しかしながら、TOC 濃度は2~3日目にかけて減少を始めている。これはヒ素がほとんど5価に酸化されたため、有機物の消費を細菌が開始したものと考えられる。この結果から、この分離された細菌は独立栄養細菌であると考えられるが、絶対独立栄養であるかという点はさらに検討が必要である。

4. まとめ

高濃度のヒ素を含む無機培地を用いて活性汚泥の継代培養を行った結果、2種類のヒ素耐性細菌が分離され、両方ともヒ素の存在下で生存が認められたが、一方では亜ヒ酸の酸化が確認されなかった。もう一方の分離株は *Ensifer Adhaerens* であり、亜ヒ酸を酸化して増殖し、有機物の存在下では酸化速度が向上する可能性が示された。

参考文献

1)Andrianisa et al. (2006) Behaviour of arsenic species in batch activated sludge process: biotransformation and

removal. Water Science and Technology, 54(8), 121-128, 2006.

2)Andrianisa et al. (2007) Biotransformations of arsenic species in activated sludge process. Environmental Engineering Research 44, 397-405.

3)Weeger et al. (1999) Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. BioMetals 12, 141-149.

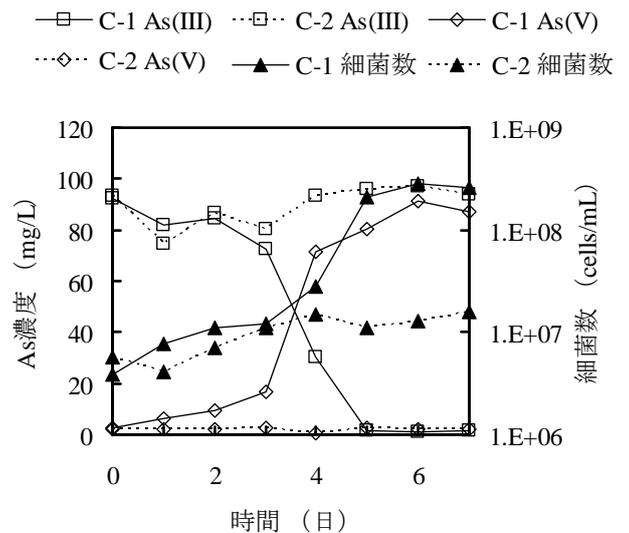


図-2 分離した細菌によるヒ素濃度及び細菌数の経時変化

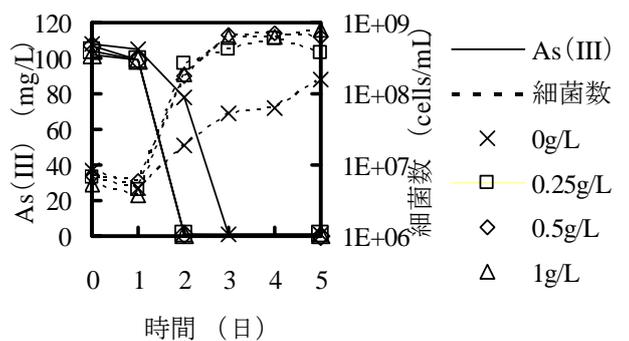


図-3 As(III)濃度及び細菌数の経時変化

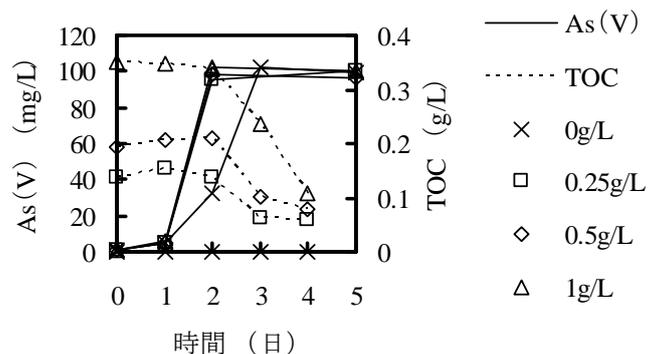


図-4 As(V)濃度及びTOC濃度の経時変化