

活性汚泥から分離した細菌の亜ヒ酸酸化能に及ぼす諸条件の影響に関する基礎的研究

岩手大学 学生会員 ○三浦洵一
 岩手大学 瀧口央子
 岩手大学 正会員 伊藤歩 相澤治郎 海田輝之

1. はじめに

種々の環境中から As(III)を生物学的に酸化することができる微生物が分離されている^{1),2)}。また、筆者らは活性汚泥から分離した細菌が *Ensifer adhaerens* 株と 99.9%の相率を示し、独立栄養的に As(III)を As(V)に酸化できることを示した³⁾。

本研究では、種々の環境条件がこの細菌の亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響及び最適条件について検討を行った。

2. 実験方法

細菌は As(III)が 1.33mM(100mg/L)を含有する Weegarらの提唱した培地⁴⁾(乳酸ナトリウムは無添加, pH=7)を用いて、25°Cの恒温槽で 120rpm の往復振盪で継代培養されたものを使用した。

細菌は特に記述が無い限り、25°Cの恒温槽において 120rpm の往復振盪培養で培養し実験を行った。

細菌数はトーマ氏血球計数板と生物顕微鏡で計数した。ヒ素測定用の試料は、採取後速やかに 0.2 μ m のメンブレンフィルター(以下 MF)で濾過し、測定時まで冷蔵保存した。As(III)と As(V)の濃度は HPLC 接続 ICP-MS 法で測定した。

2-1. 窒素濃度が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

上述の細菌を用いて、培地中の窒素濃度を Table 1 の各濃度に調製し培養を行い、窒素濃度が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響について検討した。

Table 1 Nitrogen concentration in culture media.

	A	B	C	D	E
(mg/L)	261.7	52.3	26.2	5.2	2.6
(mM)	18.7	3.74	1.87	0.37	0.19

2-2. pH が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

上述の細菌を用いて、培地中の窒素濃度を 3.74mM、初期 pH を 5, 6, 7, 8 に調製し培養を行い、pH が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響について検討した。

2-3. 水温が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

上述の細菌を用いて、培地中の窒素濃度を 3.74mM、培養水温を 10, 15, 20, 25, 30°C で培養を行い、水温が細菌の亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響について検討した。培養は三角フラスコに入れた培地をマグネティックスターラーで攪拌して行った。

2-4. 有機炭素源が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

上述の細菌を用い、培地中の窒素濃度を 3.74mM、初期有機炭素濃度を乳酸ナトリウムの添加により Table 2 のように調製した培地で培養を行い、有機炭素源濃度が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影

響について検討した。有機炭素は 0.2 μ m の MF で濾過した試料について、TOC-Vcsh(島津製作所)で NPOC(不揮発性有機炭素)を測定した。

Table 2 Organic carbon concentration in culture media.

	blank	A	B	C	D	E
(mg/L)	0	10	20	50	100	500
(mM)	0	0.83	1.67	4.17	8.33	41.7

3. 実験結果及び考察

3-1. 窒素濃度が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

Fig.1 に As(III)酸化率の時間変化を示す。D と E ($N \leq 0.374$ mM) では 18 日間の培養で As(III)が 50%程度しか酸化されなかった。このことから、初期濃度の As(III)と N のモル比 (N/As) で 1.4 (条件 C) 以上であれば十分に酸化可能であることが分かった。

Fig.2 に細菌数の時間変化を示す。条件 C 以下の窒素濃度 ($N \leq 1.87$ mM) では細菌数の増加が鈍くなっている。亜ヒ酸酸化能と細菌数の増加の両方を考慮し、以降の実験では培地中の窒素濃度を B ($N=3.74$ mM) で培養を行うこととした。

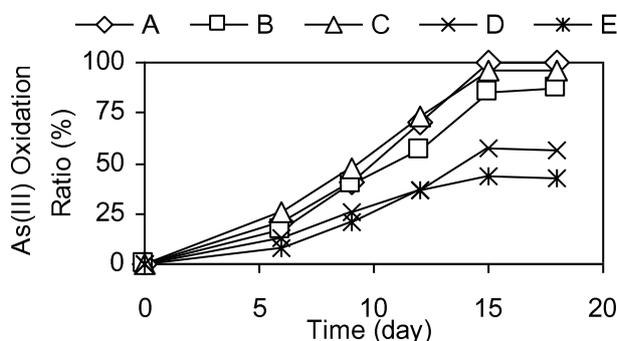


Fig.1 Effect of nitrogen concentration on arsenic oxidation.

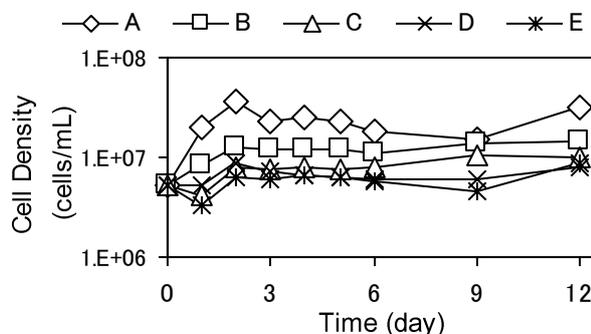


Fig.2 Effect of nitrogen concentration on cell growth.

キーワード：亜ヒ酸酸化細菌、窒素濃度、pH、温度、有機炭素濃度

連絡先：盛岡市上田 4-3-5 TEL:(019) 621-6450 FAX(019) 621-6449

3-2. pHが亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

Fig.3にAs(III)酸化率の時間変化を示す。pH7で最も迅速に酸化が進み、pH6及び8が続いた。これは中性付近で亜ヒ酸酸化活性が大きいという点で、F.Battagliaらの研究における土壌試料から分離された細菌群(CASO1)の最適pH5~7⁵⁾に近い結果となった。

3-3. 水温が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

Fig.4にAs(III)酸化率の時間変化を示す。20℃以上の条件では6日間で酸化が完了している。F.Battagliaらの研究におけるCASO1では25℃で最大亜ヒ酸酸化活性を示し、10℃で最低となっている⁵⁾。本研究では15℃

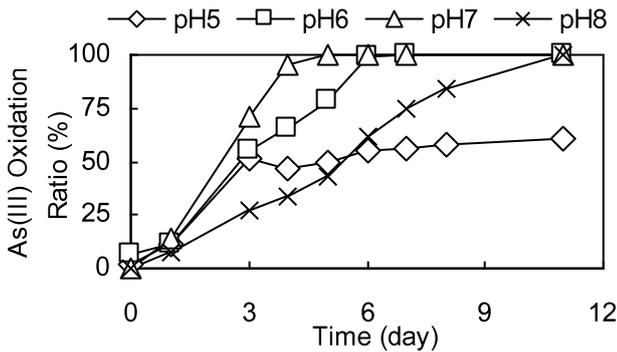


Fig.3 Effect of pH on arsenic oxidation.

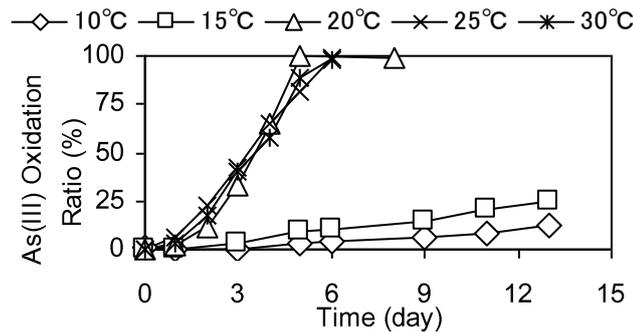


Fig.4 Effect of temperature on arsenic oxidation.

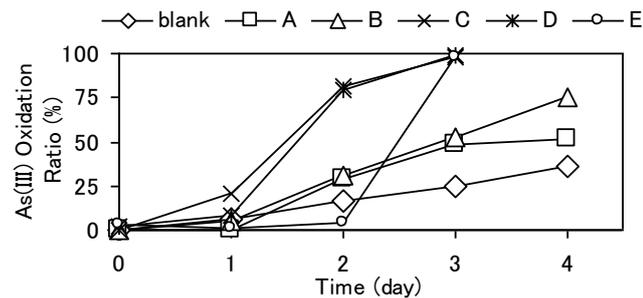


Fig.5 Effect of organic carbon concentration on

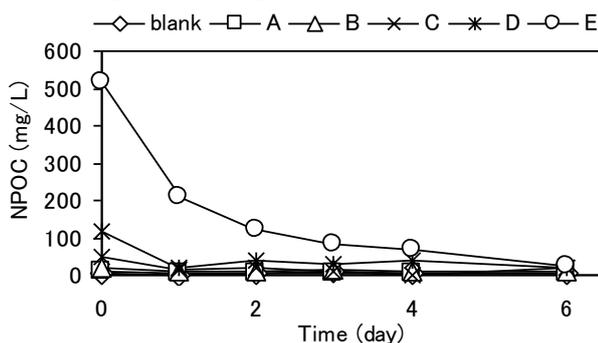


Fig.6 Time course of NPOC consumption.

でも活性がかなり低く、20、25、30℃の条件で同程度の亜ヒ酸酸化を示した点が異なった。

3-4. 有機炭素源が亜ヒ酸酸化能に及ぼす影響

Fig.5にAs(III)酸化率を、Fig.6にNPOCの時間変化を示す。有機炭素が4.17mM以上の条件(C~E)では、3日目にはAs(III)はほぼAs(V)に酸化されている。また、0~2日目ではC、Dは酸化が進行しているのに対し、Eはほとんど酸化が起きていないが、3日目には酸化が完了している。

BlankとEについて、0~2日目における収率を算出すると、blankは3.5E+3cells/As-M、Eは2.3E+4cells/C-Mとなり、有機炭素を基質とした方がAs(III)酸化によるものより10倍ほど大きい値となった。

以上から、この細菌は有機炭素が存在する場合、優先的に有機炭素を消費した後にAs(III)を酸化することが示唆された。

4. まとめ

本研究におけるAs(III)の生物学的酸化の最適条件としては、As(III)1.33mM(100mg/L)に対して、窒素濃度3.74mM以上(As(III)の酸化だけを考慮すると1.87mM)、pH7前後、温度20℃以上となった。

このような結果となったのは、細菌の分離源である活性汚泥を採取した下水処理場のエアレーションタンクの水温とpHの年平均値は18℃と6.8である⁶⁾ことが影響していると考えられる。

また、有機炭素を優先して消費するが、有機炭素が無くなればAs(III)も速やかに酸化する特性を生かし、先に有機炭素で細菌を増殖させた後、短時間でAs(III)を酸化させるという処理方法も考えられる。

<参考文献>

- 1) Santini J. M. et al.: A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies, *Appl. and Environ. Microbiol.*, Vol. 66, No. 1, pp. 92-97, 2000.
- 2) Rhine E. D. et al.: The arsenite gene (aroAB) in novel chemoautotrophic arsenite oxidizers, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 354, pp. 662-667, 2007.
- 3) H. A. ANDRIANISA et al.: Biological oxidation of arsenite by bacteria isolated from activated sludge, *Environmental Engineering Research*, vol.45, pp.219-224, 2008.
- 4) Weeger et al.: Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals*, Vol.12, pp.141-149, 1999.
- 5) F.Battaglia-Brunet et al.: An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.93, pp.656-667, 2002.
- 6) 財団法人 岩手県下水道公社, 維持管理年報 北上川上流流域下水道(都南・花北・胆江処理区) 磐井川流域下水道(一関処理区), pp.69-80, 平成13年度.