

(5) 還元硫黄化合物を用いた自栄養性微生物脱窒に関する研究

大阪大学工学部 橋本 奨
 " " 〇塩山 昌彦
 " " 原田 直樹

緒 言

現在、メタノールを水素供与体とする他栄養性細菌による生物学的脱窒法に代り、還元態硫黄を水素供与体とする自栄養性脱窒硫黄細菌による脱窒法が、注目されている¹⁾²⁾³⁾。

ここでは、各種植種材料を用いて脱窒硫黄細菌の集殖培養を試み、本菌の分布と実験室内淘汰培養における、その増殖活性化の模様と、窒素除去特性を調べたので、その実験結果を報告する。

実 験 方 法

1. 集殖培養

最初の1代培養には、第1表の各種種源、容量にして1%を、50mℓの培地B(第2表)を入れたL型管(第1図)に加え、2代目以後には、1代前の培養菌を容量にして5%に加え、10代まで継代培養を行った。尚、4代目以後は、第3表の微量金属成分を1/25濃度で添加した培地B₁を用いた。何れも30℃で嫌氣的に振盪培養を行い、ガス発生量と白濁の観察によって増殖を調べた。

2. 培養試験

200~300mℓの培地を入れたひだ付き三角フラスコ(第1図)に、前期集殖培養菌を容量にして5%に加え、30℃で嫌氣的に振盪培養を行い、培地Bを基礎培地にして、培地の微量金属成分濃度、S₂O₃²⁻-S/N比、アルカリ度/N比を種々変化させ、増殖に及ぼす培地成分の影響を検討した。この時、培養菌の

第1表 植種材料

No.	場 所
①	水遠池底泥(吹田市)
②	当大学内沈殿池底泥
③	平野川底泥(上城見橋)
④	寝屋川底泥(北橋)
⑤	神崎川底泥(大吹橋)
⑥	神崎川底泥(榎木橋)
⑦	下水処理場プラント汚泥
⑧	下水処理場余剰汚泥
⑨	下水処理場消化汚泥

Biomass 濃度は、混合液の

OD₆₅₀ を測定した。また、

培地B₁を用いて10代目培養

菌について、その増殖及び脱

窒の機能を各種種源別に比較

した。この時、Biomass 濃

度は、OD₆₅₀と超遠心沈殿物

のTOC濃度を測定した。

3. 脱窒試験

1ℓの培地を入れた第2図

の培養装置に、脱窒活性の強

い前記培養菌(5000rpm

15分間の遠心分離で収菌し

た)を加えて、硫黄源として

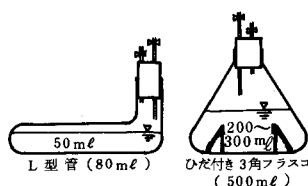
S₂O₃²⁻(Na₂S₂O₃・5H₂Oを

含む培地B₁)と、S°(単体硫

黄を含む培地S)を用いて回

分培養(28℃)し、両者の場

合の脱窒機能を調べた。この



第1図 培養容器

第2表 培 地

組 成	培地 B ₁ *	培地 S
Na ₂ S ₂ O ₃ ・5H ₂ O	5.0 g	—
S°	—	5.0 g
KNO ₃	2.0	0.722
NH ₄ Cl	0.5	0.5
MgCl ₂ ・6H ₂ O	0.5	0.5
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.01	0.01
NaHCO ₃	1.0	1.0
KH ₂ PO ₄	2.0	2.0
微量金属 (第3表)	40 ml	40 ml
水道水	1.0	1
NaOHでpH=7.0に調整		

*: 培地B₁は、培地Bから微量金属成分を除いたもの

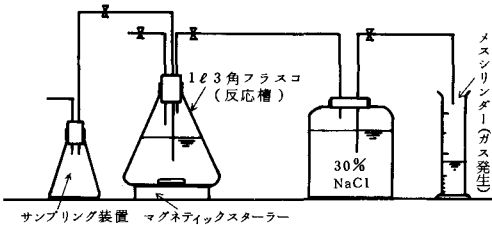
第3表 微量金属成分⁵⁾

EDTA	500.0 mg
CaCl ₂	55.4
CuSO ₄ ・5H ₂ O	15.7
CoCl ₂ ・6H ₂ O	16.1
MnCl ₂ ・4H ₂ O	50.6
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	220.0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ・4H ₂ O	11.0
FeSO ₄ ・7H ₂ O	49.9
イオン交換水	1.0 l
KOHでpH=6.0に調整	

時、単体硫黄は、市販のS°を粉砕し粒径74~105μに調整して用いた。培地Sを用いたS°添加の培養は、培地Sに適量のNa₂S₂O₃・5H₂Oを加え、培地のS₂O₃²⁻/N比を段階的に低下させながら順次S°に馴応させて試験した。

4. 分析法

混合液を遠心分離で上澄液と沈殿物に分け、前者については、NO₃⁻、NH₄⁺、NO₂⁻、pH、アルカリ度、S₂O₃²⁻、SO₄²⁻を分析した。また、後者については、沈殿物を超音波破砕機で処理して、そのTOCを測定してBiomass濃度とした。尚、混合液のMLSSとS°も測定した。



第2図 培養装置

実験結果及び考察

1. 集殖培養

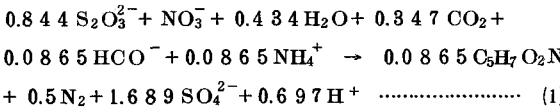
ガス発生が終了するまで要した培養日数は、1代目が11日間、2代目と3代目がともに5日間であった。3代目を種汚泥として、増殖に及ぼす微量金属成分の影響を、培養試験(後述)によって調べたところ、微量金属成分が、増殖速度を高めるとい結果を得たので4代目からは、微量金属成分を第3表の1/25濃度で添加した培地B₁を用い、10代目まで継代培養を行った。

継代培養を重ねるごとに、ガス発生終了までの培養日数は短くなり、5代目では培養2日間で、8代目からは培養1日で、ガス発生はほぼ停止した。

4代目以後、第1表の各植種源①~⑨の集殖培養菌は、何れも同程度のガス発生、白濁を示した。

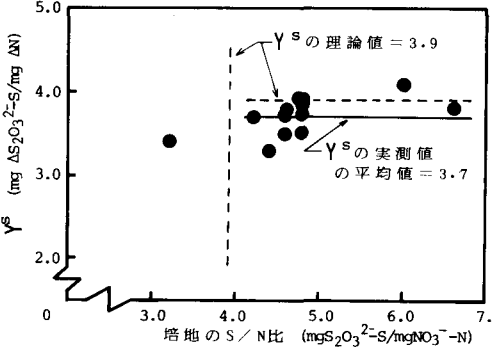
2. 培養試験

○脱窒反応の化学量論： 除去NO₃⁻-N(mgΔN)あたりの消費S₂O₃²⁻-S(mgΔS)をY^S，除去NO₃⁻-N(mgΔN)あたりの消費アルカリ度(mgΔALK)をY^{alk}として、培養試験で得られたY^Sの実測値と培地の初期S/N比との関係を第3図に、またY^{alk}の実測値と培地の初期アルカリ度/N比との関係を第4図に示した。図中のY^S，Y^{alk}の理論値は、BisogniとDriscollがenergetics法によって求めた次式²⁾によった。

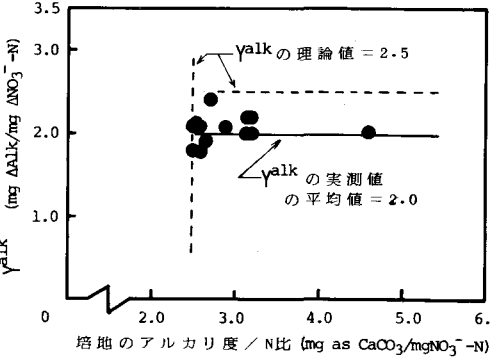


Y^Sの実測値の平均値は、3.7で理論値3.9より幾分低い値となり、またY^{alk}の実測値の平均値は2.0で理論値2.5より低い値となった。これは、本研究の培養が純粋培養ではなく、自栄養性脱窒硫黄細菌と、少数の他栄養性脱窒菌との混合培養であるためだと考えられる。しかし、Y^SとY^{alk}の実測値が、理論値に近い値となったことは、本研究の集殖培養菌による脱窒が、大部分脱窒硫黄細菌によるものであると言える。

○培養菌のOD₆₅₀： 培養試験(増殖と脱窒機能の植



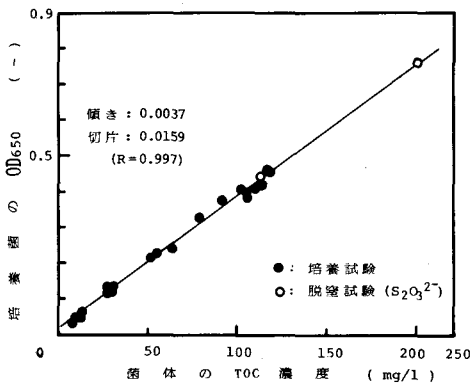
第3図 培養試験における培地のS/N比(初期値)とY^Sの関係



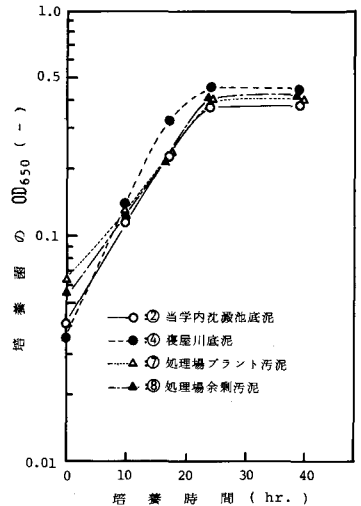
第4図 培養試験における培地のアルカリ度/N比(初期値)とY^{alk}の関係

種源別比較)で、Biomass の指標として菌体の TOC 濃度と培養菌の OD₆₅₀ を測定し、両者の関係を第 5 図に示した。両者には極めて高い相関関係が得られた。このことから、培養菌の OD₆₅₀ による増殖曲線は、真の増殖を示すと言える。

増殖曲線の典型的な例として、培養試験(植種源別比較)の増殖曲線を第 6 図に示した。この図から明らかに、培養菌の増殖は対数増殖となりこの直線部の傾きから比増殖速度(μ)を求めた。



第 5 図 培養試験(植種源別比較)における培養菌の OD₆₅₀ と菌体 TOC の関係



第 6 図 培養試験(植種源別比較)における培養菌の増殖曲線(OD₆₅₀)

○ 増殖に及ぼす培地成分の影響: 各実験の培地成分と OD₆₅₀ の増殖曲線から得られた比増殖速度(μ)を、第 4 表に示す。微量金属添加によって μ の増大がみられた。培地の $S_2O_3^{2-}$ S/N 比が 4.2 以上、アルカリ度/N 比が 2.9 以上であれば、培地に過剰の $S_2O_3^{2-}$ 、アルカリ度を与えても増殖速度に好影響を及ぼさなかった。

第 4 表 脱窒硫黄細菌の増殖に及ぼす培地成分の影響

影響項目	種汚泥 (L型管 培養液)	培地 (pH:7.0-7.3 Temp:30°C)				比増殖速度 μ (1/d)
		S/N ratio (mg $S_2O_3^{2-}$ -S/mgN)	Alk./N ratio (mg asCaCO ₃ /mgN)	NO ₃ ⁻ -N (mg/l)	微量金属濃度 (第 3 表)	
微量金属濃度	3代目 ② ④	4.6	2.6	270	無添加	1.4
					1/100濃度	1.7
					1/25濃度	1.7
					1/5濃度	1.8
S/N比	8代目 ⑤	3.2	2.6	272	1/25濃度	2.1
		4.2				2.6
		6.0				2.5
		6.6				2.3
アルカリ度/N比	9代目 ⑥	4.6	2.9	420	1/25濃度	3.2
			4.6			3.0

以上のことから、脱窒硫黄細菌の培養には、Baalsrud⁴⁾ の培地に微量金属成分を加えた培地 B₁ が適切であることが、明らかとなった。

○ 増殖及び脱窒機能の各植種源別比較: 第 1 表の植種源②, ④, ⑦, ⑧ の L 型管 10 代目培養菌について、脱窒硫黄細菌の増殖とその脱窒機能を調べ第 7 図のデータを得た。このデータの動力学的解析を以下のように試みた。

前記したように、培養菌の増殖は対数増殖となるので、(2)式が成立する。

$$X = X_0 e^{\mu t} \dots \dots \dots (2)$$

脱窒が Michaelis model に従うとすると(3)式が成立する。

$$-\frac{1}{X} \frac{dN}{dt} = \frac{k N}{K_m + N} \dots \dots \dots (3)$$

ここで、X: 菌体の TOC 濃度 (mg/l), N: NO₃⁻-N 濃度 (mg/l), μ : 比増殖速度 (1/日),
k: 単位微生物当りの最大脱窒速度 (mgNO₃⁻-N/mg TOC/日), K_m: 飽和恒数 (mg/l)

(2)式, (3)式より得られた(4)式を、t=0, N=N₀, X=X₀ から t=t, N=N, X=X の範囲で積分すると(5)式が得られる。

$$-\frac{dN}{dt} = \frac{k N}{K_m + N} \cdot X_0 \cdot e^{\mu t} \dots \dots \dots (4)$$

$$N_0 - N - K_m \cdot \ln \frac{N}{N_0} = \frac{k}{\mu} \cdot (X - X_0) \dots \dots (5)$$

今、(5)式の0→tの時間経過で、 $N = N_0/2$ 、 $X = X_0$ になるようにNの半減プロット法⁶⁾を行う。
(5)式に $N = N_0/2$ を代入すると(6)式が得られる。

$$N_0 = 2 \cdot \frac{k}{\mu} (X - X_0) - 1.386 K_m \dots \dots (6)$$

NO_3^- 減少曲線及び増殖曲線上で、 N_0 、 X_0 、 t_0 、 N 、 X 、 t を $N/N_0 = 1/2$ となるように若干個の場合をとって、各種 N_0 値と $(X - X_0)$ 値を求めグラフ上にプロットすれば、直線の傾斜から $2k/\mu$ が求まり、片対数表示の増殖曲線の直線部傾斜から得た μ を用いて k が求まる。また、縦軸切片から K_m が求まる。

第7図に示した培養試験(植種源別比較)の増殖と NO_3^- -Nの時間経過のデータを用いて、(6)式に従いNの半減プロットを行い、 k 、 K_m 値を求めた(第8図)。

植種源②、④の場合には、脱窒はMichaelis model に従い K_m 値は、それぞれ72.1、69.7(mg/ℓ)となった。しかし、植種源⑦、⑧の場合には、 K_m 値はほぼ0に近い値となったことから、脱窒は0次反応に従うことがわかった。

比増殖速度(μ)、最大比脱窒速度(k)は何れも、寝屋川底泥を植種源とした④の培養菌が、最も高い値となった。当学内沈殿池底泥や余剰汚泥を植種源とした②や⑧も、比較的高い μ 、 k の値をとった。

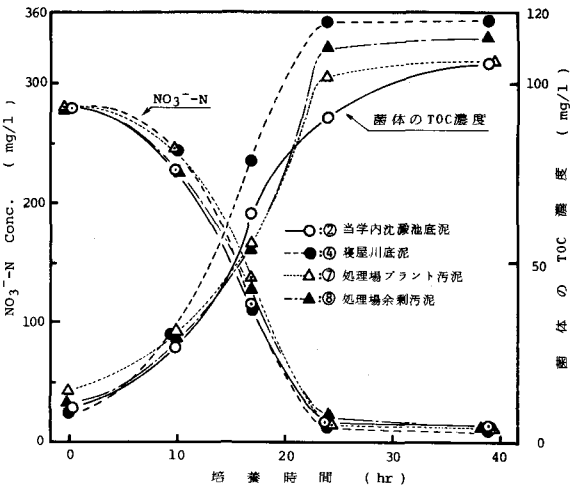
第7図に示したように培養24時間後に、②、④、⑦、⑧の培養菌は、何れも95(%)以上の脱窒率を示した。

また、L型管の集殖培養でガス発生、白濁が植種源①～⑨を通して同程度であったということからも、自栄養性脱窒硫黄細菌は、都市域において広く分布しているということが判明した。

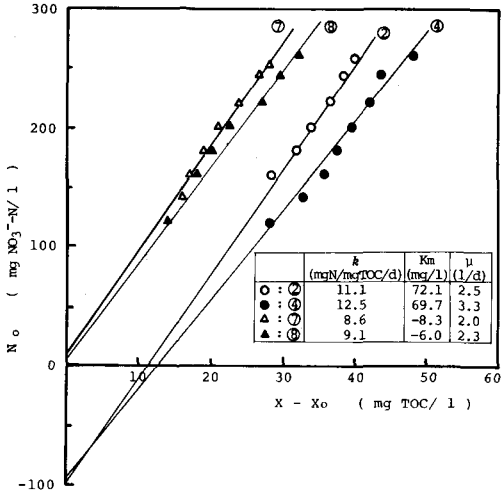
3. 脱窒試験

硫黄源として $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ を用いた場合と、 S^0 を用いた場合(No. 1～4)の培養条件を一括して第5表に示した。第9図に、硫黄源として $S_2O_3^{2-}$ を用いた場合の脱窒及びガス発生挙動を、第10図に培養菌の OD_{660} と $S_2O_3^{2-}$ -Sの経時変化を示した。

NO_3^- -Nと $S_2O_3^{2-}$ -Sの減少、またガス発生の増大は、何れも培養時間に対して直線的に変化することから、硫黄源として $S_2O_3^{2-}$ を用いた脱窒硫黄細菌による脱窒が、0次反応に従うことが明らかである。この直線部の傾きから求めた比脱窒速度(K)は、9.4(mg NO_3^- -N/mg TOC/日)



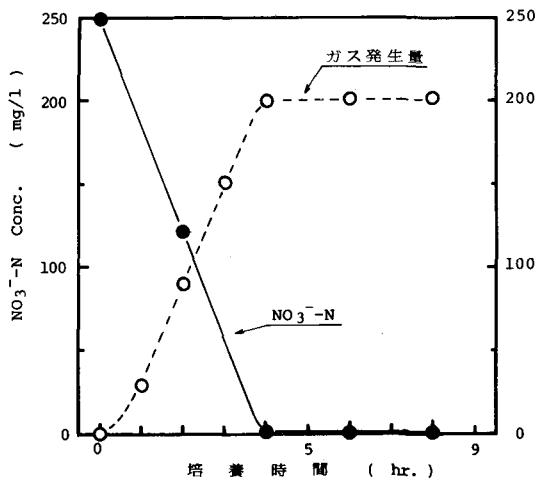
第7図 培養試験(植種源別比較)における増殖と NO_3^- -Nの時間変化



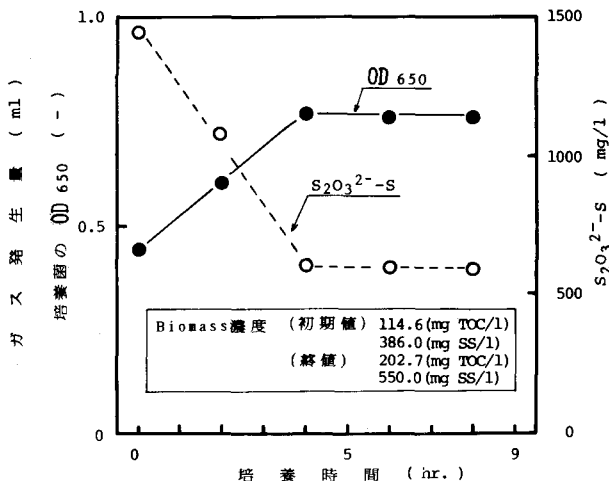
第8図 半減プロット法による k と K_m 値の決定

第5表 脱窒試験の培養条件

硫黄源	$S_2O_3^{2-}$ -S/N	S^0	NO_3^- -N	pH	Alkalinity	Temp.
No.	(mg S/mg N)	(mg/l)	(mg/l)	(-)	(mg asCaCO ₃ /l)	(C°)
S^0	1	0	5207	106.4	7.0	1297.0
	2	0	4451	62.6	7.0	1512.8
	3	0	4369	89.2	7.1	1533.3
	4	0	3917	106.8	7.1	1653.3
$S_2O_3^{2-}$	5.8	0	249.4	7.1	1444.4	28



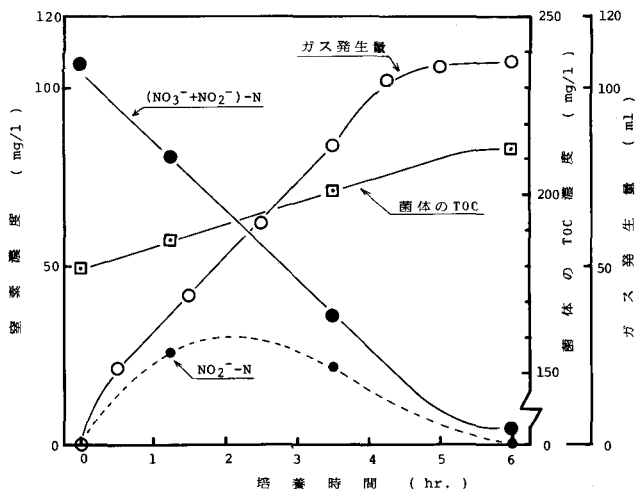
第9図 脱窒試験（硫黄源： $S_2O_3^{2-}$ ）における NO_3^- -N 及びガス発生量の経時変化



第10図 脱窒試験（硫黄源： $S_2O_3^{2-}$ ）における 培養菌の OD_{650} 及び $S_2O_3^{2-}$ -S の経時変化

或いは、 $3.2 (mg NO_3^- - N / mg SS / 日)$ となった。尚、培養菌の増殖も培養時間に対して直線的に進行することから、Biomass 濃度は培養菌の初期値と終値の平均値を用いた。 $S_2O_3^{2-}$ から S^0 への硫黄源の切り替えは、培地の $S_2O_3^{2-}$ -S/N 比を順次3段階減少させることによって容易に行えた。硫黄源として S^0 を用いた場合の例として、No. 4 における脱窒と増殖の挙動を第11図に示した。

$S_2O_3^{2-}$ を硫黄源とした場合 NO_2^- は全く検出されなかったものの、 S^0 を硫黄源とした No. 4 では培養途中 $20 \sim 30 (mg/L)$ の $NO_2^- - N$ が検出された。しかし、ガス発生終了時には、No. 1～4 を通して何れも $NO_2^- - N$ は $1 (mg/L)$ 以下であった。また、この時混合液の ORP は $-220 \sim -330 (mV)$ で強い還元状態となっていた。第11図から明らかなように、 $(NO_3^- - N) + (NO_2^- - N)$ の減少、ガス発生ともに培養時間に対して直線的であることから、 S^0 を硫黄源とした場合の脱窒も0次反応に従うことが判明した。また、培養菌の増殖も培養時間に対してほぼ直線的に進行した。比脱窒速度 (K) は、培養菌が S^0 に十分馴養された場合 (No. 3 と 4) で $2.5 \sim 3.7 (mg N / mg TOC / 日)$ となり、硫黄源として $S_2O_3^{2-}$ を用いた場合の約 $1/3$ となった。



第11図 脱窒試験No. 4（硫黄源： S^0 ）における窒素除去及び菌体 TOC 濃度の経時変化

第6表 比脱窒速度 (K) の比較

	比脱窒速度 (K) ($mg NO_3^- - N / mg SS / d$)	水素供与体	水温 ($^{\circ}C$)	文献
活性汚泥	0.60	メタノール	—	Michael et.al. ⁷⁾
Ps.denitrificans	4.08	クエン酸ナトリウム	27	Dawson et.al. ⁸⁾
脱窒硫黄細菌	3.19	チオ硫酸ナトリウム	28	our data
	2.00*	単体イオウ	30	

* No. 3 のデータで微生物組成を $C_5H_7O_2N$ として換算

本実験で得られた脱窒硫黄細菌の脱窒能と既往の研究結果との比較を第6表に示した。これから明らかにように本実験の自栄養性脱窒硫黄細菌の脱窒活性はかなり高いもので、他栄養性細菌の脱窒活性と比肩しうるものであると言える。第7表に硫黄源として $S_2O_3^{2-}$ と S^0 を用いた脱窒試験の結果を一括して示す。尚、比増殖速度(μ)、みかけの収率(Y_{obs})は次式によって求めた。

$$\mu = \frac{1}{X_m} \frac{X_e - X_s}{\Delta t} \qquad Y_{obs} = \frac{\mu}{K}$$

ここで、 X_s , X_e , X_m : それぞれ biomass 濃度の初期値, 終値, 平均値 (mg/l) Δt : 培養時間 (日)
また、 Y_{obs} , Y^s , Y^{alk} , の理論値は硫黄源が $S_2O_3^{2-}$ の場合(1)式より、 S^0 の場合(1)式と同様に得られた(7)式²⁾より求めた。
 $1.114 S^0 + NO_3^- + 0.699 H_2O + 0.337 CO_2 + 0.0842 HCO_3^- + 0.0842 NH_4^+ +$
 $\rightarrow 0.0842 C_5H_7O_2N + 0.5 N_2 + 1.114 SO_4^{2-} + 1.228 H^+ \dots\dots\dots (7)$
化学量論数 (Y_{obs} , Y^s , Y^{alk}) の理論値が Biomass 濃度を $C_5H_7O_2N$ として算出されているにもかかわらず、硫黄源として $S_2O_3^{2-}$ と S^0 を用いた場合とも実測値は、何れも各々の理論値に近い値となった。

第7表 脱 窒 試 験 成 績

No.	培地の S/N 比 ($mg S_2O_3^{2-} S/mg N$)	菌体 TOC の 平均 値 (mg/l)	比 増 殖 速 度 μ (1/day)	比 脱 窒 速 度 K ($mg N/mg TOC/d$)	み か け の 収 率 Y_{obs} ($mg \Delta TOC/mg \Delta N$)	Y^s ($mg \Delta S/mg \Delta N$)	Y^{alk} ($mg \Delta Alk/mg \Delta N$)	脱 窒 率 (%)
1	0	129.6	0.59	1.88	0.31	2.7	3.0	95.2
2	0	121.4	0.72	2.17	0.33	2.6	3.7	87.5
3	0	135.8	1.00	3.70	0.27	2.7	4.6	84.0
4	0	196.3	0.81	2.49	0.33	2.4	3.8	95.5
理 論 値 (S^0)					0.36	2.6	4.4	
	5.8	158.7 (468.0)*1	3.33	9.41 (3.19)*2	0.35 (1.04)*3	3.6	2.0	99.0
理 論 値 ($S_2O_3^{2-}$)					0.37 (0.70)*3	3.9	2.5	

*1: () 印内の数字は, MLSS濃度 (mg/l)
*2: 同じく K の単位は, (mgN/mgSS/d)
*3: 同じく Y_{obs} の単位は, (mg Δ SS/mg Δ N) を示す。

要 約

- (1) 脱窒硫黄細菌の培養には、Baalsrud培地に微量金属成分を添加した培地が適切であることがわかった。
- (2) 自栄養性脱窒硫黄細菌は、増殖と脱窒活性に多少の差はあれ、活性の強い菌が都市域の底泥等に広く分布していることが判明した。
- (3) 硫黄源として $S_2O_3^{2-}$ と S^0 を用いた場合の何れも、自栄養性脱窒硫黄細菌による脱窒は0次反応に従い、 $S_2O_3^{2-}$ を用いた場合の比脱窒速度 (K)は、9.4 (mg NO_3^- -N/mg TOC/日)、 S^0 を用いた場合の K は3.7 (mg N/mg TOC/日)となった。この脱窒速度は、他栄養性微生物脱窒に比肩しうるほど高いものである。

文 献

1) Batchelor, B., and Lawrence, A., : JWPCF, 50, 1986-2001(1978)
2) Bisogni, J.J., and Driscoll, C.T., : Jour. Env. Eng. Div. ASCE, 103, 593-604 (1977)
3) Bisogni, J.J., and Driscoll, C.T., : JWPCF, 50, 569-577 (1978)
4) Baalsrud, K., and Baalsrud, K.S., : Archiv fur Microbiologie, 20, 34-62 (1954)
5) Wolf, V., and Melvin, W.J., : Bacteriological Reviews, 21, 195-213 (1957)
6) Terui, G., and Konno, N., : Technol. Rept. Osaka Univ., 10, 572 (1960)
7) Michael, R.P., and Jewell, W.J., : Jour. Env. Eng. Div. ASCE, 101, 643-657 (1975)
8) Dawson, R.N., and Murphy, K.L., : Advances Wat. Pollut. Res., Proceedings 6th Inter-Conference held in Jerusalem, 671(1972)