

日立プラント建設（株） ○ 宇田川万規子

同 上 八 木 康 之

同 上 安 部 直 樹

1. はじめに

窒素肥料等の影響で、硝酸性窒素を含む地下水や井戸水が増えてきている。硝酸性窒素は発癌性物質であるニトロソアミンを形成したり、メトヘモグロビン血症を誘発する危険性があるため、このような原水を取水する浄水場では硝酸性窒素処理の対策が迫られている。硝酸性窒素の除去方法として生物学的脱窒法が幅広く採用されているが、有機物を殆ど含まない地下水に適用するには、別途有機物添加が必要となり残留有機物の問題がでてくる。そのため、水素供与体として有機物の代わりに水素ガスを利用する生物学的脱窒装置の開発が検討されている。この装置では、有機物を利用する従属栄養性の脱窒菌ではなく、水素ガスを利用する独立栄養性の脱窒菌（水素ガス利用脱窒菌）が反応に作用するが、この水素ガス利用脱窒菌の菌数計測方法は確立されていない。本報告では、従来のMPN法による脱窒菌数計測手法を参考として、装置の脱窒性能を評価するために必要な水素ガス利用脱窒菌の計測方法を検討した。

2. 実験方法

2. 1 対象細菌及び供試汚泥

対象とした細菌は、水素ガスを利用した脱窒能を持つ *Alcaligenes eutrophus*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas pseudoflava* の3種類¹⁾、さらに水素ガスを利用する機能を持つ細菌ではあるが、水素ガスによる脱窒能は不明な *Ancylobacter aquatics*, *Azospirillum lipoferum* などの4種類²⁾を加えて合計7種類とした。また供試汚泥は、当社研究所内実験装置の脱窒汚泥を用いた。

2. 2 使用培地の組成

水素ガス利用脱窒菌の計測用培地として2種類を選定した。A培地は通常の有機物利用脱窒菌計測用のGILTAY培地から有機物と硫酸還元菌の影響を除くため硫酸塩を抜いた組成であり、B培地は水素細菌用無機培地³⁾に脱窒菌の基質として硝酸カリウムを添加したものである。両者の培地はpH緩衝性が大きく異なることが特徴である。

2. 3 培養操作

細菌数の計測にはMPN法を用いた。サンプル汚泥を超音波処理（300W，20kHz，1分間）並びに滅菌生理食塩水で希釈調整して培地に接種した。ブチルゴム栓で密栓した後、気相部を水素と窒素の50%混合ガスで置換した。気液接触をよくするため、培養試験管を横置きにして30℃で振とう培養した。

2. 4 判定並びに計数

MPN法の陽性及び陰性の判定は、培養液中の硝酸性窒素濃度と試験管内気相部のガス消費量を指標とした。培養液中に水素ガス利用脱窒菌が生息すると、(1)式のように窒素ガス1molの発生に対して5molの水素ガスが消費され、試験管内が減圧状態となる。



ガス消費量はこの減圧度を定量化したものである。ガス消費量は図1に示す要領で測定した。水素ガス利用脱窒菌数はガス消費量及び硝酸性窒素濃度の判定結果をもとにMPN表から算出した。

3. 実験結果と考察

3. 1 培地組成の選定

対象とした7種類の標準菌及び脱窒汚泥の発現試験を行った。結果を表1に示す。A、Bいずれの培地も全ての細菌を発現させることはできず、また発現してくる細菌種にも有意差は認められなかった。このため、GILTAY培地を含めた全てに発現した*Paracoccus denitrificans*を用いて、培養液中の硝酸性窒素減少量から適用培地を選定した。B培地が6日培養時に硝酸性窒素が完全に分解されるのに対してA培地での減少率は低かった。これは、A培地はpH緩衝性が低いため脱窒反応が進むにつれてpH阻害を受けたものと判断した。そこで、菌数計測にはB培地が適すると判断した。なお、汚泥自体から混入する有機物を評価するため、気相部を窒素ガスのみで置換し培養したが、今回の試験結果からその影響は殆ど無視できた。

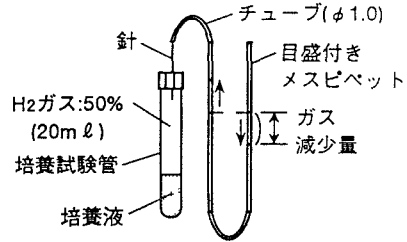


図1 ガス消費量の測定器

表1 標準菌及び脱窒汚泥による各種培地での発現試験結果

(++:発現する, +わずかに発現する, -:ほとんど発現しない)

細菌名	*登録機関・No.	水素ガス利用脱窒菌用		有機物利用脱窒菌用 (GILTAY培地)
		A培地	B培地	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	IAM 12305	—	+	++
<i>Paracoccus denitrificans</i>	IFO 13301	++	++	++
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	ATCC 33668	++	++	—
<i>Ancylobacter aquaticus</i>	IAM 12361	+	+	—
	IAM 12364	—	—	—
<i>Azospirillum lipoferum</i>	IAM 12399	—	—	—
<i>Derrxia gummosa</i>	IAM 13946	+	—	—
<i>Hydrogenophaga teaniospiralis</i>	ATCC 49743	++	++	+
脱 窒 汚 泥		++	++	++

3. 2 陽性・陰性の判定指標

MPN法で菌数を計測するには、1サンプル当り50本の培養試験管について培養後の細菌増殖の有無から陽性・陰性を判定する。本計測では培養液中の硝酸性窒素濃度と試験管内気相部のガス消費量を判定指標に用いた。*Paracoccus denitrificans*を用いて、硝酸性窒素減少量とガス消費量の相関性を検討した。結果を図2に示す。培養試験管内の硝酸性窒素減少量とガス消費量は相関し、硝酸性窒素減少量とガス消費量とともに少ないグループと逆に多いグループとに分類できた。培養液中の硝酸性窒素が全て窒素ガスに分解された場合の理論ガス消費量は(1)式から4mlである。そこで理論ガス消費量の1/2以上を陽性領域、1/2以下を陰性領域とした。この方法は多数のサンプルを短時間でできるため、判定指標として極めて有効であると考えられる。

3. 3 汚泥中の水素ガス利用脱窒菌計測例

実際の脱窒汚泥に生息する水素ガス利用脱窒菌数を計測した。結果を図3に示す。本試験は必要培養日数を同時に検討するため、開始直後から30日培養時までの菌数計測を行った。水素ガス利用脱窒菌は4日以上培養すると計測値に大きな変化がなくなり、汚泥1g当り $1 \sim 5 \times 10^9$ 個生息することが分かった。また、ガス消費量は10日以上培養すると安定し陽性・陰性の判定が容易になる。そこで、水素ガス利用脱窒菌計測の必要培養日数は2週間程度とした。

また、同一汚泥中の有機物利用脱窒菌数は $1 \sim 4 \times 10^{10}$ 個/g-S Sであることから、一般的な脱窒汚泥に生息する水素ガス利用脱窒菌数は全脱窒菌数のおよそ1割と判断できた。

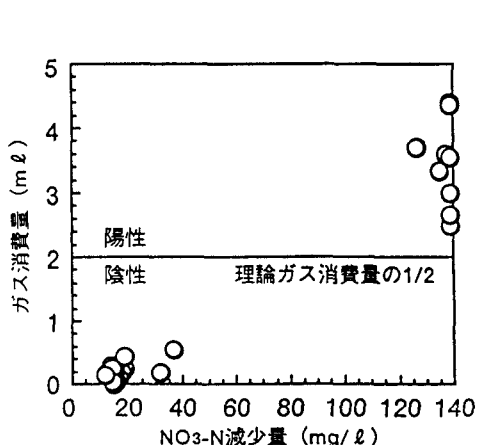


図2 NO₃-N減少量とガス消費量の関係

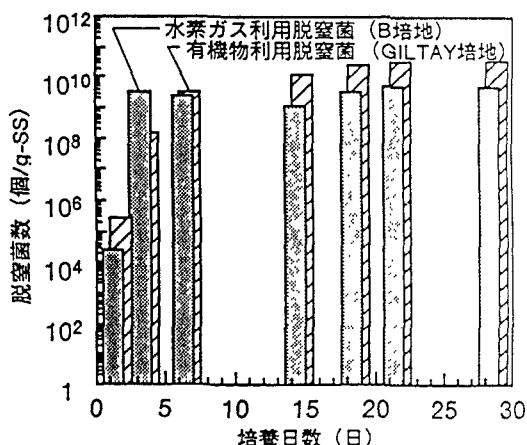


図3 実汚泥を用いた脱窒菌数計測結果

4. まとめ

水素ガスを利用する生物学的脱窒装置を評価するために必要な水素ガス利用脱窒菌の菌数計測方法として、培地組成、培養日数及び陽性・陰性の判定指標を決定した。この方法で計測した脱窒汚泥に生息する水素ガス利用脱窒菌数は、 $1 \sim 5 \times 10^9$ 個/g-S Sであり、全脱窒菌数のおよそ1割に相当することを明らかにした。

<参考文献>

- 1) 明賀ほか：水素酸化脱窒細菌の比脱窒速度に及ぼす諸因子の検討，水環境学会誌，17，10，669-675 (1994)。
- 2) M. Aragho ほか：The Prokaryotes，2，1，364，Springer-Verlag (1992)
- 3) American Type Culture Collection 編：Bacteria & Bacteriophages 18TH Edition，463 (1992)