



Title	硫黄脱窒菌の集積と単体硫黄への馴養
Author(s)	橋本, 奨; 古川, 憲治; 塩山, 昌彦
Citation	水質汚濁研究. 1989, 12(7), p. 431-440
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/3375
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

〈論 文〉

硫黄脱窒菌の集積と単体硫黄への馴養

橋 本 奨* 古 川 憲 治* 塩 山 昌 彦*

Enrichment of Sulfur Denitrifying Bacteria and its Acclimation to Elemental Sulfur

Susumu HASHIMOTO*, Kenji FURUKAWA* and Masahiko SHIOYAMA*

* Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1, Yamada-Oka, Suita-shi, Osaka 565 Japan

Abstract

In order to utilize the denitrifying capability of sulfur denitrifying bacteria for nitrogen removal of wastewater, the preparation method of enrichment culture with high denitrification activity and the acclimation method of this enriched culture to elemental sulfur were investigated.

Isolation of *Thiobacillus denitrificans* was carried out in order to evaluate the denitrifying capability of *T. denitrificans*. The enrichment cultures of *T. denitrificans* were easily established from various inoculating sources, such as activated sludge and the bottom mud of polluted river, in a medium wherein HCO_3^- was used as the inorganic carbon source and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ and S^0 were used as the reduced sulfur source. Plating cultures of these enriched microorganisms were conducted and the single yellow colony, in which the deposit of sulfur particles was observed, was obtained. A pure single isolate was obtained through repeated plating cultures, and was identified as *T. denitrificans*.

The medium which was defined by K. Baalsrud was found to be a suitable medium for the enrichment culture of sulfur denitrifier. The stoichiometric values of autotrophic sulfur denitrification reaction such as Y_s , Y_{alk} , Y_{ob} and C_R for enriched microorganisms were in fair agreement with the theoretical values, so that the nitrogen removal capability of the enriched culture was proved to be mainly governed by the denitrification capability of sulfur denitrifier. The sulfur denitrifier which were acclimated to $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ could be successfully acclimated to elemental sulfur by the gradual stepwise replacement of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ to elemental sulfur. Denitrification reaction by the enriched sulfur denitrifier followed the zero order kinetics. The specific denitrification rates of enriched microorganisms were $9.4 \text{ mg-N} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ TOC} \cdot \text{d}^{-1}$ in case of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ and $2.5 \text{ mg-N} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ TOC} \cdot \text{d}^{-1}$ in case of S_0 , respectively, which were comparable with that of heterotrophic denitrifiers.

Key words: *Thiobacillus denitrificans*, denitrification, sulfur oxidation, enrichment culture, isolation, elemental sulfur, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, acclimation

1. 緒 言

自然界には、脱窒反応の電子供与体として有機物を要求する他栄養脱窒菌 (heterotrophic denitrifier) の

ほかに、 S^{2-} 、 S^0 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ 、 SO_3^{2-} などの還元硫黄化合物を脱窒反応の電子供与体として、これを酸化するときに発生するエネルギーを利用して生育できる自栄養脱窒菌 (autotrophic denitrifier) の *Thiobacillus*

* 大阪大学工学部環境工学科 〒565 大阪府吹田市山田丘2-1.

denitrificans が存在する。他栄養脱窒菌を利用する場合、有機物として高価なメタノールを使用したり、汚泥循環を頻繁に行うなど、経済面で強く制約され、それが本法の普及を妨げている。しかし、コストの安い粉末あるいは粒状硫黄を電子供与体とする硫黄脱窒細菌の脱窒反応を下 wastewater 処理に活用できれば、極めて安価に硝化二次処理水の脱窒や、電子供与体の不足する脱窒槽の脱窒能力の向上が図れるので、生物学的窒素除去法の普及が期待でき、水質汚濁防止に果たす役割は極めて大きい。しかし、硫黄脱窒細菌の脱窒反応条件や最適生育条件など、実施へ適用するための基礎的知見は極めて少ない。そこで、*T. denitrificans* の純粋分離を行い、本菌の特性について検討するとともに、自然界から硫黄脱窒能の高い混合菌を集積し、さらに集積菌の単体硫黄(S⁰)への馴養について種々検討を加え、有用な知見が得られたのでその研究結果を報告する。

2. *T. denitrificans* の特性について

2.1 *T. denitrificans* の一般的性質

T. denitrificans は、還元硫黄化合物の SO₄²⁻ への酸化時に、NO₃⁻ を N₂ に脱窒できる孢子形成のない自栄養性グラム陰性桿菌で、その細胞の大きさは 0.5×1.0 μm である。この細菌は、O₂, NO₃⁻, NO₂⁻, NO, N₂O を硫黄酸化の最終電子受容体として用い、SO₄²⁻ が最終生産物である。ただし、本菌の生育には、最終電子受容体として、NO₃⁻ より O₂ を好むが、脱窒反応は O₂ がなく、NO₃⁻ の存在するいわゆる anoxic 環境条件でのみ起こり、生育最適 pH は、6~8 の中性域にある。

T. denitrificans による NO₃⁻ から N₂ への還元反応は、NO を還元中間体とする次のような経路で進行する¹⁾。



NO₃⁻ を最終電子受容体として生育する *T. denitrificans* には、チトクローム系の電子伝達系が存在するが、NO₃⁻ の還元反応が O₂ により阻害を受けることから、*T. denitrificans* には、互いに関連する 2 つの電子伝達系、または、分岐した電子伝達系が存在する²⁾とされている。*T. denitrificans* は、絶対化学独立栄養細菌 (obligate chemoautotrophic bacteria) で、CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻ などの無機炭素を炭素源として利用して生育する。

2.2 *T. denitrificans* に利用される還元硫黄化合物

T. denitrificans は、前述のように還元硫黄化合物を O₂, または、NO₃⁻ によって SO₄²⁻ に酸化する際に発生するエネルギーを利用して生育する。硫黄は -2 か

ら +6 の酸化数をとるが、そのうち還元硫黄化合物は、-2, 0, +2, +4 の酸化数をもつもので、S²⁻, S⁰, S₂O₃²⁻, S₄O₆²⁻, SO₃²⁻ が利用される。*T. denitrificans* による脱窒反応では、これら還元硫黄化合物は電子供与体として働くので、酸化数の低い硫黄化合物の方が脱窒の効率は高くなる。

Bisogni と Driscoll³⁾ は、*T. denitrificans* の脱窒反応における硫黄化合物のコストを電子当量当たりの薬品コストで比較し、単体硫黄(S⁰) が最も経済的な電子供与体であることを明らかにしている。

S⁰ の特徴として、資源的に豊富、安価で、貯蔵が容易な上に取り扱い性が良く、毒性がないなどが挙げられる。S₂O₃²⁻ は、溶解度が高い上、毒性も少なく、取り扱い性も良いことから、*T. denitrificans* による脱窒反応の電子供与体として多用されてきたが、単位重量当たりの電子含有量が低い上、高価であることから下 wastewater 処理に応用する際の電子供与体としては適していない。Na₂S などの S²⁻ は、単位重量当たりの電子含有量が一番高く、還元力の強い硫黄化合物であるが、薬品としてのコストが S⁰ に比べて高い上、毒性、臭気があり、取り扱い性、貯蔵の容易さなどの点で S⁰ に劣る。

3. 実験材料および方法

3.1 集積培養の方法

培地 B₁ (Table 1 の組成) 50ml を、ガス交換装置付きの 80ml 容の L 字管 (Fig. 1) に入れて、これに約 1% 容の植種源 (大阪府下の汚濁河川の底泥、池底泥、下水処理場の余剰汚泥、消化汚泥など) を加えて、30℃ の嫌気条件下で振盪培養することにより硫黄脱窒細菌を集積した。ガス発生と培養液に白濁のみられた試料について、10代までの継代培養を重ねて、脱窒活性の高い硫黄脱窒細菌の集積をはかった。

3.2 *T. denitrificans* の純粋分離法

集積培養において、最も生育のよかった培養液を生理食塩水で希釈し、2% 寒天を含む培地 B₁ の平板培地に表面塗抹した後、気相を N₂ ガスで置換したデシケーター内で、30℃ で培養した。デシケーター内に残存する微量の酸素は BBL Gas Pak (Becton Dickinson 社製) で完全に除去するとともに、メチレンブルー指示薬にてデシケーター内部の嫌気度をチェックしながら培養した。単一コロニーを釣菌後、同様の手法で平板培養を 5 回以上繰り返し、菌の純化をはかった。

3.3 回分培養試験の方法

集積培養液を種汚泥とし、ガス交換装置を装着した 500ml 容のヒダ付きフラスコ (Fig. 1) に、200~300 ml の培地 B₁ を入れ、これに約 5% 容の前記集積培養液を加え、30℃ の嫌気条件下で振盪培養を行い、集積

Table 1 Composition of medium B₁.

Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	5.0 g
KNO ₃	2.0 g
NH ₄ Cl	0.5 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g
NaHCO ₃	1.0 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
Trace metal solution (see Table 2)	40 ml
Tap water	1.0 l

* pH was adjusted to 7.0 by 1.0 N of NaOH.

** Medium which lacks trace metal solution was termed medium B.

Table 2 Composition of trace metal solution.

EDTA	500.0mg
CaCl ₂	55.4mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	15.7mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	16.1mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	50.6mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	220.0mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	11.0mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	49.9mg
Deionized water	1.0 l

* pH was adjusted to 7.0 by 1.0 N of NaOH.

Table 3 Composition of medium S.

S ⁰	5.0 g
KNO ₃	0.722g
NH ₄ Cl	0.5 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
NaHCO ₃	1.0 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
Trace metal solution (see Table 2)	40 ml
Tap water	1.0 l

* pH was adjusted to 6.0 by 0.1 N of KOH.

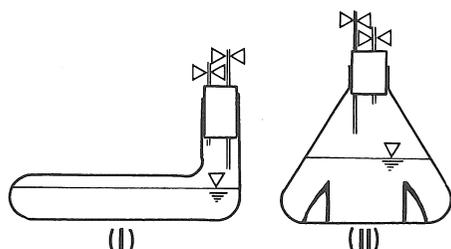


Fig. 1 Culture vessels.

(I) L shape tube (80 ml)

(II) Myerflask with baffle (500 ml)

培養菌の増殖に及ぼす培地成分の影響を検討した。また、集積培養菌の回分培養特性は、**Fig. 2**の回分培養装置を用いて水温28℃で調べた。

3.4 集積培養菌のS⁰馴養方法

適量のNa₂S₂O₃を添加した培地S(**Table 3**)にNa₂S₂O₃添加培地B₁による集積菌を懸濁させ、**Fig. 2**の培養装置を用いて28℃で回分培養した。

NO₃-Nが消費され、ガス発生が停止した段階で培地に補填するKNO₃とNa₂S₂O₃の量を調整して、培地中のS₂O₃-S/S⁰比およびS₂O₃-S/NO₃-N比を段階的に低下させながら回分培養を9回繰り返し、集積菌をS⁰に馴養させた。なお、S⁰は市販の硫黄を粉砕し、粒径をフルイで74~105μmに調整して使用した。

3.5 分析方法

培養混合液を遠心分離(5,000rpm, 15分間)して、上澄液と沈殿物に分け、上澄液についてはNH₄-N, NO₂-N, NO₃-N, S₂O₃²⁻, SO₄²⁻, pHおよびアルカリ度を測定した。NH₄-N, NO₃-Nはコーンウェイ微量拡散法⁴⁾で、その他の項目は下水試験方法⁵⁾によりそれぞれ分析した。培養混合液中のS⁰濃度は、S⁰をNa₂

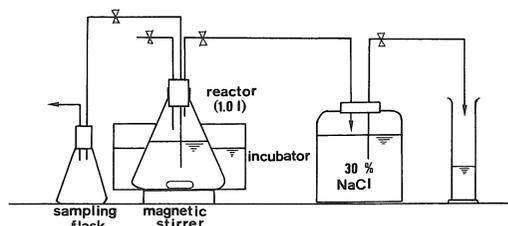


Fig. 2 Experimental setup for batch denitrification experiment.

SO₃でS₂O₃²⁻に変えた後、ヨウ素滴定法⁶⁾で分析した。また、OD₆₅₀の吸光度測定では菌体とS⁰の区別がつかない恐れがあるため、遠心分離後の沈殿物を超音波破砕機で処理し、そのTOC濃度から菌体濃度を評価した。

4. 実験成績ならびに考察

4.1 T. denitrificans の純粋分離

集積培養液を寒天平板培地に塗抹後、完全嫌気条件下のデシケーター中で培養を行ったところ、約1週間白色を帯びたコロニーが発生した。このコロニーは、その後培養を続けるにつれ白色から黄色に変化した。このようにコロニーの色が黄変するのは、細胞内に硫黄塊が蓄積したことを示している。S₂O₃²⁻を硫黄源と

して培養した際に細胞内に蓄積される硫黄塊は、 $S_2O_3^{2-}$ とその酸化中間体である polythionate との純粋な化学反応により生成すると考えられている⁷⁾。この黄変したコロニーを生理食塩水で希釈後、再び平板培養して単一コロニーを得た。この操作を7回繰り返すことにより純粋分離株を得た。

この分離株の菌学的諸性質を検討し、Table 4の結果を得た。また、Fig. 3には、分離株の生理特性を調べるために行った試験成績の一例を示した。ここで、前培養は嫌気条件下で培地 B₁にて行い、これを同じ培地と $Na_2S_2O_3$ をグルコースに置き換えた無機塩培地に植種し培養した。培地 B₁を用いて好気条件下で培養すると、分離株は100時間もの長いラグ期の後、ゆっくりと生育を始めたが、嫌気条件下では、50時間のラグ期の後急速に増殖した。このことは、*T. denitrificans* は硫黄酸化の最終電子受容体として、 O_2 と NO_3^- の両者を利用することができるが、本実験のように培養条件を嫌気から好気に変えた場合、最終電子受容体が NO_3^- から O_2 に変換するのに、かなりの時間がかかることを意味している。また、*T. denitrificans* の脱窒活性は、好気状態で植え継ぎを繰り返した場合消失した例⁷⁾もあることから、分離株は嫌気条件下で保存する必要がある。一方、Fig. 3から明らかなように、分離株はグルコース培地では全く生育することができなかった。また、普通寒天培地でも生育できなかったのも、通性嫌気性の自栄養細菌であると判定した。

以上、分離株の菌学的諸性質をもとに、Bergey's Manual 第8版⁸⁾から、分離株を *T. denitrificans* と同定した。次に、分離株 *T. denitrificans* を培地 B₁で振盪培養し、その生育、脱窒挙動を調べたところ、200 mg・l⁻¹の NO_3^- -N を完全に脱窒するのに150時間も要した。これは50時間もの長いラグ期による。そこで、培地 B₁に酵母エキスを0.1%添加して同様に振盪培養したところ、0.1%の酵母エキス添加により、ラグ期なしに *T. denitrificans* の生育と脱窒反応が起こり、対数増殖期の比増殖速度も高くなった。その結果、200 mg・l⁻¹の NO_3^- -N を完全に脱窒するのに要する時間も33時間と大幅に減少した。

Table 4 Bacteriological properties of isolated strain.

Shape	short-rod
Motility	(+)
Gram staining	negative
Strict autotrophic	
Facultative anaerobic	
Elemental sulfur is oxidized, but its oxydation rate is slowly than that of $S_2O_3^{2-}$.	

以上のように、*T. denitrificans* の分離株について、その生理的諸性質および脱窒能力を種々検討し、硫黄脱窒が下処理に適用可能であることが明らかとなった。しかし、本菌は非凝集性で、しかも、培養生理特性が極めて特異的であることから、これを下処理において純粋な状態で用いることは難しいと判断された。そこで、硫黄脱窒細菌の下処理処理での実用化のため、純粋菌にこだわらず、広く自然界から硫黄脱窒能の高い混合菌を集積し、さらに集積菌の単体硫黄(S^0)への馴養について種々検討を加えた。

4.2 硫黄脱窒細菌の集積培養

今回、9種類の植種源から硫黄脱窒細菌の集積を図ったが、すべての植種源からガス発生と培養液の白濁を認めた。ガス発生が終了するのに要した培養日数は、1代目が11日間であったのに対し、2代目、3代目がともに5日間と大幅に短縮された。活性の高い硫黄脱窒細菌を集積するには、電子供与体としての $Na_2S_2O_3$ 濃度、無機炭素濃度、それに微量元素濃度によって硫黄脱窒細菌の生育が律速を受けないような最適な培地を使用する必要がある。そこで、S都市下水処理場の余剰汚泥を植種源として3代植え継いだ集積菌を用いて、その比増殖速度(μ)に及ぼす培地成分の影響を検討した。

Fig. 4に、集積培養菌の OD_{650} と菌体 TOC 濃度の関係を示した。両者の間には極めて高い相関関係が存在したので、ここでは OD_{650} の経時変化の直線部傾きをもとに、集積菌の比増殖速度(μ)を求めた。

Table 5に各種培地成分での比増殖速度(μ)を一括表示した。表示したように、微量金属成分の添加によって μ が増加したことから、すべての植種源の4代目

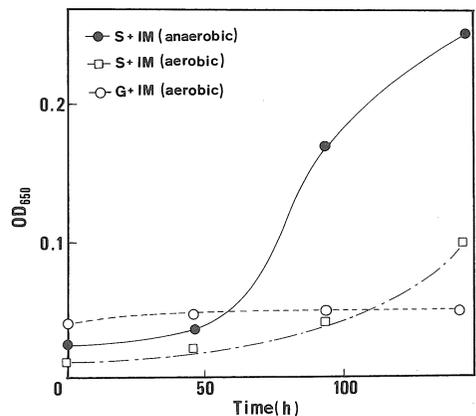


Fig. 3 Growth curves of isolated strain under various cultivating conditions.

* S; sulfur, G; glucose, IM; inorganic medium.

降の培地に、Table 2 に示す組成の微量金属成分濃度を25倍希釈して培地 B に加えた培地 B₁ (Table 1) を使用した。次に、S 都市下水処理場の余剰汚泥を植種源として、8 代、9 代植え継いだ集積菌を用いて、μ 値に及ぼす培地の S₂O₃-S/NO₃-N 比、アルカリ度/NO₃-N 比の影響を検討した。この時、Table 1 に示したように、培地 B₁ (pH=7.0) は、リン酸バッファーを含むため、培養液の pH 変化は小さく、培養終了時の培養液 pH は6.5~7.0であった。ただし、S₂O₃-S/NO₃-N を6.0以上とした時、培養液 pH は6.1まで低下した。Table 5 に示すように、培地の S₂O₃-S/NO₃-N 比が4.2以上、アルカリ度/NO₃-N 比が2.9以上であれば、これら培地成分によって硫黄脱窒菌の増殖が律速を受けないことがわかった。以上のことから、硫黄脱窒菌の自然界からの集積培養の培地としては、Baal-srud・Baalsrud⁷⁾の培地に微量金属成分を加えた培地 B₁ が最適であることが明らかとなった。

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 日でガス発生は終了し、硫黄脱窒菌の集

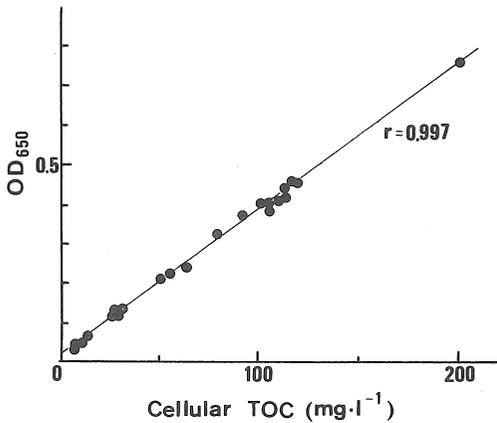


Fig. 4 Relationship between OD₆₅₀ and the cellular TOC concentration for enrichment culture.

Table 5 Effect of medium composition on the growth of sulfur denitrifier.

Factor	Seed culture*	S/N ratio (mg S ₂ O ₃ ²⁻ -S · mg ⁻¹ N)	Alkalinity/N ratio (mg alkalinity · mg ⁻¹ N)	NO ₃ -N (mg · l ⁻¹)	Trace metal conc. (see Table 2)	Specific growth rate (μ) (d ⁻¹)
Trace metal concentration	3rd	4.6	2.6	270	no addition	1.4
					100 times dilution	1.7
					25 times dilution	1.7
					5 times dilution	1.8
S/N ratio	8th	3.2	2.6	272	25 times dilution	2.1
		4.2				2.6
		6.0				2.5
		6.6				2.3
Alkalinity/N ratio	9th	4.6	2.9	420	25 times dilution	3.2
			4.6			3.0

* Numbers indicate the transfer number of enriched culture.

積効果が認められた。9 種類の植種源のうち生育の良かった O 大学構内雨水沈殿池底泥②、寝屋川底泥④、S 都市下水処理場混合生汚泥⑦、同余剰汚泥⑧を植種源として、10 代植え継いだ集積菌の回分脱窒試験成績を Fig. 5 に示した。培養24時間後には、いずれの集積培養菌も95%以上の脱窒率を示した。培養終了時の培養液 pH はいずれも6.7であった。また、L 字管を用いた集積培養試験では、いずれの植種源を用いた場合でも、ガス発生量や菌の増殖に伴う培養液の白濁の度合いが同程度であったことから、自栄養性の硫黄脱窒菌は都市域において広く分布していることが確認された。

集積培養菌は、ラグ期なしに植え継ぎ直後から対数増殖するので、対数増殖期の部分をとって解析すると以下のようなになる。対数増殖では次式が成立する。

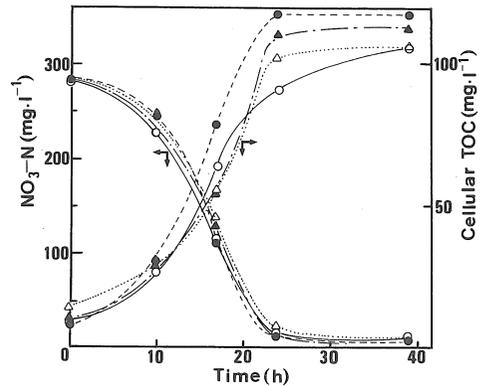


Fig. 5 Sulfur denitrification by various batch enrichment cultures vs. time.

- bottom mud of sedimentation tank of Osaka University
- bottom mud of Neya river
- △ activated sludge of domestic wastewater treatment plant
- ▲ excess sludge of domestic wastewater treatment plant

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \dots \dots \dots (1)$$

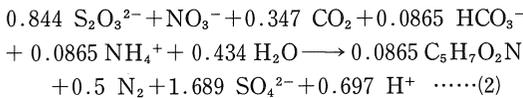
ここで、 X : 菌体 TOC 濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)
 X_0 : 初期菌体 TOC 濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)
 μ : 比増殖速度 (d^{-1})

(1)式の両片の対数を取り、 $\ln(X/X_0)$ に対し、培養時間 t をプロットすると直線が得られ、直線の傾きから μ が求まる。このようにして求めた対数増殖期における μ を Fig. 6 に示した。

比増殖速度 (μ) は、寝屋川底泥を植種源とした集積培養菌が最も高い値となったが、植種源による大きな差異はみられなかった。

4.3 集積培養菌による脱窒反応の化学量論

$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を電子供与体とする硫黄脱窒反応の化学量論式は、Bisogni と Driscoll³⁾ が energetics 法により次式のように決定した。



(2)式に基づいて計算した $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を電子供与体とする硫黄脱窒反応の化学量論値、 Y_s (単位除去 NO_3^- -N 量当たりの消費 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ -S 量)、 Y_{alk} (単位除去 NO_3^- -N 量当たりの消費アルカリ度量) および C_R (消費比³⁾ : 還元除去される NO_3^- の単位電子当量当たり消費される $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の電子当量) の理論値と、集積培養菌の回分培養によって得られた実験値の比較を、Fig. 7~Fig. 9

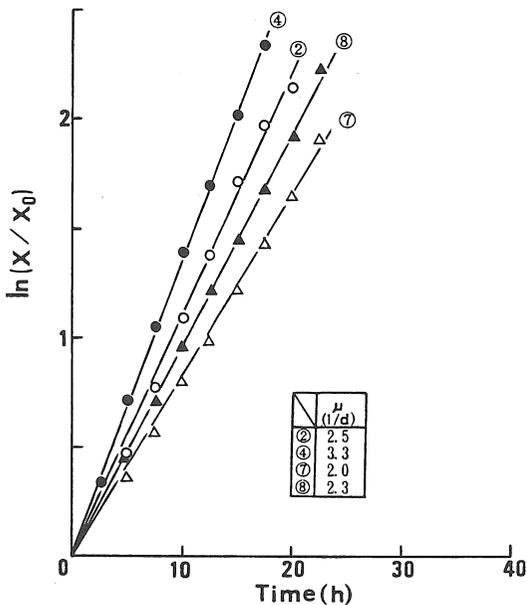


Fig. 6 Relationship between $\ln(X/X_0)$ and time. Numbers in figure indicate the number of inoculating source

にそれぞれ示した。なお、Fig. 9 の横軸 C_R 値³⁾ は、培地中の NO_3^- の単位電子当量当たりの $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の電子当量を示す。

Y_s の実測平均値は、 $3.67 \text{mg S}_2\text{O}_3\text{-S} \cdot \text{mg}^{-1} \text{NO}_3\text{-N}$ で理論値 $3.86 \text{mg S}_2\text{O}_3\text{-S} \cdot \text{mg}^{-1} \text{NO}_3\text{-N}$ より若干低い値となり、また、 Y_{alk} の実測平均値も 1.96mg アルカリ度 $\cdot \text{mg}^{-1} \text{NO}_3\text{-N}$ と理論値の 2.49mg アルカリ度 $\cdot \text{mg}^{-1} \text{NO}_3\text{-N}$ より低い値となった。 C_R 値も同様に実測平均値の方が理論値より低くなった。これは、供試集積培養菌が純粋菌でないことから、集積培養菌中にいくらかの他栄養脱窒細菌が存在していたためと考えられる。しかし、 Y_s 、 Y_{alk} 、 C_R の各化学量論値の実測値が

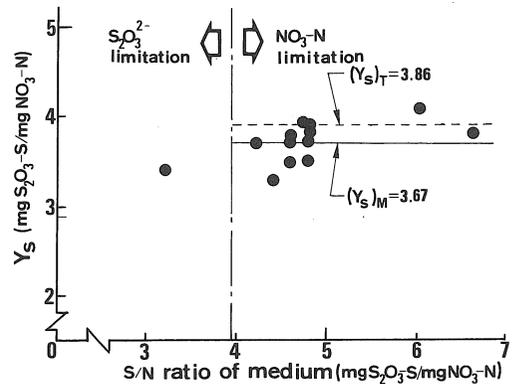


Fig. 7 Relationship between S/N ratio of the medium and Y_s value for enrichment culture of sulfur denitrifier. $(Y_s)_T$ is the theoretical value of Y_s . $(Y_s)_M$ is the measured value of Y_s .

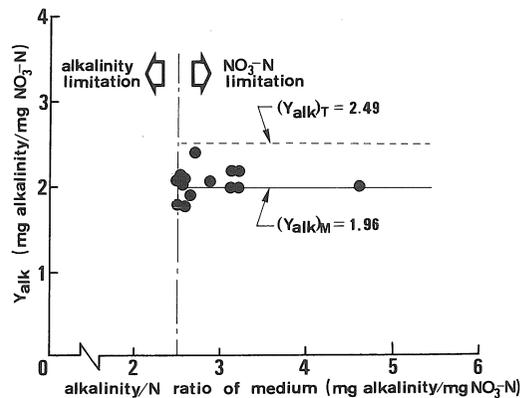


Fig. 8 Relationship between alkalinity/S ratio of the medium and Y_{alk} value for enriched sulfur denitrifier. $(Y_{alk})_T$ is the theoretical value of Y_{alk} . $(Y_{alk})_M$ is the measured value of Y_{alk} .

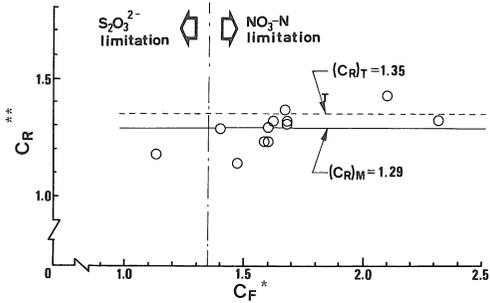


Fig. 9 Relationship between C_R value and C_F value for the sulfur denitrifier in enriched culture.

* Feed ratio(C_F) is defined as the ratio of electron equivalents of $S_2O_3^{2-}$ in the medium to electron equivalents of NO_3^- in the medium.

** Consumptive ratio(C_R) is defined as the ratio of electron equivalents of $S_2O_3^{2-}$ consumed to electron equivalents of NO_3^- reduced.

(C_R) $_T$ is the theoretical value of C_R .

(C_R) $_M$ is the measured value of C_R .

理論値に近い値になったことは、集積培養菌の脱窒能のほとんどが硫黄脱窒細菌に依存していることを示唆している。

次に、集積硫黄脱窒細菌を用い、 $S_2O_3^{2-}$ を硫黄源とした場合の、回分培養における脱窒の経時変化の一例を Fig. 10 に示した。これは、前述の集積培養において強い脱窒活性を示した大学構内雨水沈殿池底泥、寝屋川底泥、それに S 都市下水処理場混合生汚泥を植種源として得られた各々の10代目の集積菌を等量ずつ混合した後、遠心分離 (5,000rpm, 15分間) により濃縮して、初発菌体 TOC 濃度を約110 $mg \cdot l^{-1}$ とした実験結果である。250 $mg \cdot l^{-1}$ の NO_3^-N が4時間培養で直線的に脱窒除去され、これに対応して、ガス発生量もほぼ直線的に増加した。また、 NO_3^-N 濃度の減少に伴い、 S_2O_3-S 濃度も直線的に減少していることは、培養期間中一定の Y_s 値を保って脱窒反応が進行したことを示唆している。ここで、本回分培養での Y_s 値は3.39 $mgS_2O_3-S \cdot mg^{-1}NO_3^-N$ であり、理論 Y_s 値の3.86 $mgS \cdot mg^{-1}N$ よりも少し低い。また、脱窒終了後は、ガス発生、 S_2O_3-S 濃度の減少、菌体の増殖のいずれも完全に停止した。 NO_3^-N 減少曲線の直線部の傾きから求めた比脱窒速度(k)は、9.4 $mgNO_3^-N \cdot 菌体^{-1}mg^{-1}TOC \cdot d^{-1}$ 、または、3.2 $mgNO_3^-N \cdot mg^{-1}SS \cdot d^{-1}$ であった。なお、集積培養菌の増殖も培養時間に対し直線的に増加していることから、 k 値を求める際の菌体 TOC 濃度としては、培養初期値と終了値の平均値を用いた。また、培養終了時の培養液 pH は6.6であった。

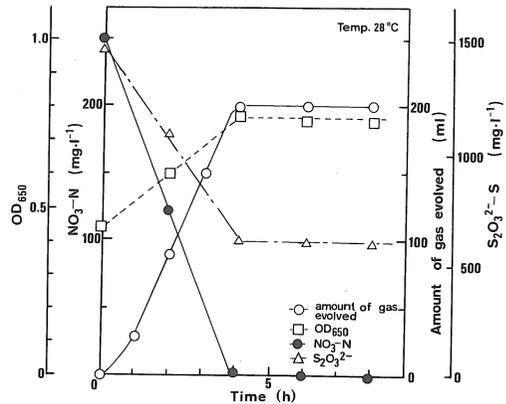


Fig. 10 Denitrification profile of enriched microorganisms by using $S_2O_3^{2-}$ as the reduced sulfur source.

培養終了後、攪拌を停止して、24時間静置し集積培養菌の沈降性を調べたが、沈殿する集積菌は非常に少なく、集積菌が凝集性に乏しく、固液分離が困難なことが判明した。

4.4 集積培養菌の硫黄馴養経過

下廃水処理に硫黄脱窒反応を活用する場合、硫黄源としては、 S^0 が最も経済的である。ここでは、前述の回分脱窒試験に用いた混合集積培養菌を、硫黄源 S^0 に徐々に置換していく方法により S^0 に馴養させた。 S^0 馴養過程における各回分培養 (1~9回目) のガス発生量の経時変化を Fig. 11 に示した。

1回目の回分培養では、培養4時間を境としてガス発生速度が明らかに低下したが、これは培養4時間までは $S_2O_3^{2-}$ 利用による脱窒であることを示している。継代培養の2回目と3回目にも同様の傾向がみられたが、硫黄源が S^0 のみとなる継代培養4回目と5回目においては、ガス発生量が培養時間に対して直線的に増加し、しかもその発生速度は馴養を重ねるにつれて大きくなるのがわかる。5回目の継代培養終了後、培養混合液を3,000rpm, 30分間の遠心分離で集菌し、再び培地の S_2O_3-S/NO_3^-N 比が2.1となるように $Na_2S_2O_3$ を添加した培地 S に懸濁させた。次に、先と同様に、培地の S_2O_3-S/N 比を徐々に減少させながら6回目から9回目の回分培養を行った。

$S_2O_3^{2-}$ と S^0 の共存する6回目と7回目の継代回分培養においては、1回目から3回目でみられた二段階のガス発生はみられなかったが、 S_2O_3-S/N 比を減らすにつれてガス発生速度が低下した。

硫黄脱窒細菌による S^0 , $S_2O_3^{2-}$ の酸化経路については、多くの研究者により検討されてきたが、現在のところ Fig. 12 に示す経路で反応が進行すると考えられ

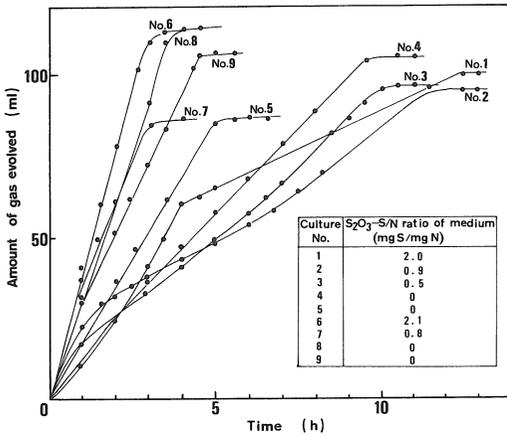
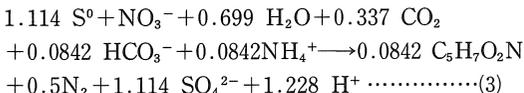


Fig. 11 Gas evolution of each consecutive culture in the acclimation process of enriched sulfur denitrifier vs. time.
* Culture number indicate the consecutive numbers of batch culture in the acclimation process.

ている^{9),10)}。

1回目から3回目の継代培養では、(i)の酵素系を誘導するのに時間がかかり、二段階のガス発生を示したが、継代培養6回目以降の培養では、集積菌が(i)の酵素系をすでに完成させていることから、S₂O₃²⁻系とS⁰系の両酵素系の作用で脱窒が行われ、その結果、S₂O₃²⁻-S/NO₃⁻-N比が高い6回目の継代培養が一番高いガス発生速度を示したと考えられる。S₂O₃²⁻無添加の8回目と9回目の継代培養でガス発生速度が低下したのは、反応(i)が反応(iii)より遅いことを示唆している。

Fig. 13には、S⁰馴養回分培養の進行に伴う化学量論値 Y_s, Y_{alk}, Y_{obs} (単位除去 NO₃⁻-N 量当たりの生成菌体 TOC 量) の変化を示した。S⁰を電子供与体とする硫黄脱窒反応の化学量論式は前述のように次式で示される³⁾。



(3)式に基づいて算出した硫黄脱窒反応の化学量論値とS₂O₃²⁻を電子供与体とした場合のそれをTable 6に示した。両者の化学量論値の差は、Y_s, Y_{alk}で顕著であるが、Y_{obs}, C_Rでは差のないことがわかる。S₂O₃²⁻添加量を減らし電子供与体をS⁰に変えていくとY_s値が低下し、Y_{alk}値が増加する様子は、Fig. 13から明らかである。以上より、硫黄脱窒反応の硫黄源をS₂O₃²⁻から徐々にS⁰に置き換える方法によりS₂O₃²⁻集積培養菌を、S⁰に馴養させることに成功した。

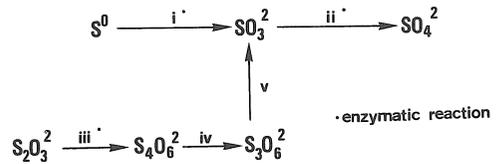


Fig. 12 Oxidative pathway of S⁰ and S₂O₃²⁻ using sulfur denitrifier^{9),10)}.

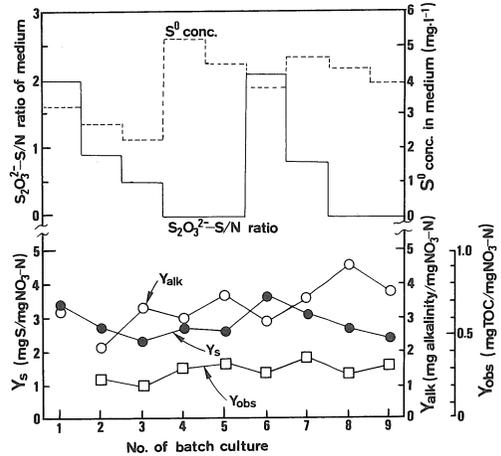


Fig. 13 Changes in stoichiometric values for the batch S⁰ acclimation cultures.

Fig. 14には、S⁰を硫黄源とした回分培養の一例として、継代培養9回目の脱窒経時変化を示した。Fig. 10に示したS₂O₃²⁻を硫黄源とする回分脱窒試験の場合と同様に、(NO₃⁻+NO₂⁻)-Nは直線的に減少したが、S⁰を用いた場合、培養の途中で20~30mg・l⁻¹のNO₂⁻-Nが検出された。また、図より比脱窒速度は、2.5mgNO₃⁻-N・菌体mg⁻¹TOC・d⁻¹でS₂O₃²⁻を用いた場合の1/3以下の低い値となった。S⁰を用いた場合の比脱窒速度が低くなった理由として、① Fig. 12の反応(i)より(iii)のほうが速い、② S₂O₃²⁻は溶解度が高く、硫黄脱窒細菌に利用されやすいのに対し、S⁰は水に不溶性で利用されにくい、③ S⁰を硫黄源とした回分脱窒試験では、20~30mg・l⁻¹のNO₂⁻-Nが蓄積したことから、このNO₂⁻により硫黄脱窒細菌のNO₃⁻還元酵素系が阻害された⁷⁾、などの理由が考えられる。また、培養終了時の培養液pHは6.5であった。培養終了後、24時間静置してS⁰に馴養した集積培養菌が固液分離能を有するかどうかを検討した。S₂O₃²⁻を用いた回分脱窒試験の場合と同様に、ほとんど沈殿は見られず、硫黄源をかえても集積培養菌は凝集沈殿性を獲得しないことがわかった。S⁰のみを硫黄源とした場合、集積培養菌がS⁰の表面に付着生育して固液分離能を示すことも考え

Table 6 Theoretical stoichiometric values for sulfur denitrification reaction.

Species of reduced sulfur source	Y_s (mg S · mg ⁻¹ NO ₃ -N)	Y_{alk} (mg alkalinity · mg ⁻¹ NO ₃ -N)	Y_{obs} (mg TOC · mg ⁻¹ NO ₃ -N)	C_R (electron equivalents of reduced sulfur source/electron equivalents of NO ₃ -N)
S ₂ O ₃ ²⁻	3.86	2.49	0.371	1.35
S ⁰	2.55	4.39	0.361	1.34

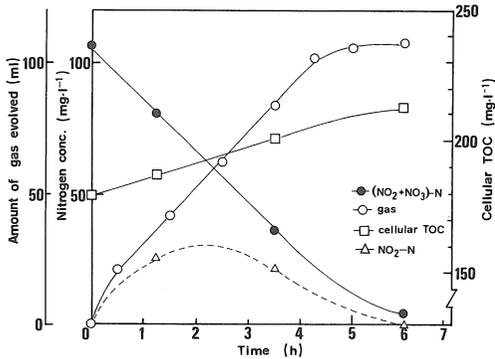


Fig. 14 Batch sulfur denitrification using elemental sulfur as H-donor vs. time.

られるが、顕微鏡観察からはこの点を確認することはできなかった。

4.5 集積培養菌の脱窒能

自然界から集積培養法により得た集積硫黄脱窒細菌の脱窒能と他の脱窒細菌の脱窒能の比較を Table 7 に示した。本実験で得た集積培養菌の脱窒能は、他栄養脱窒細菌である *Pseudomonas denitrificans* の脱窒能に及ばないものの、脱窒反応の遅い S⁰を硫黄源とした場合でも、集積培養菌は 1.3mgNO₃-N · mg⁻¹SS · d⁻¹ の脱窒速度を示し、メタノールを電子供与体とした場合の活性汚泥の脱窒能に比べて、高い脱窒能を有することが明らかである。回分培養の結果ではあるが、硫黄脱窒能を有する集積培養菌の脱窒活性はかなり高く、他栄養脱窒菌と比肩しうるほど高いものである。

5. 要 約

硫黄脱窒細菌の脱窒能を下废水处理に活用することを目的として、硫黄脱窒活性の高い集積菌を S₂O₃²⁻を用いて自然界から集積し、得られた集積菌の脱窒挙動を回分脱窒試験によって明らかにするとともに、集積菌の S⁰への馴養をはかり、次の知見を得た。

- 1) 完全嫌気条件下で、S₂O₃²⁻、HCO₃⁻、NO₃⁻、NH₄⁺を含む無機寒天培地上で集積菌の平板培養を行い、*T. denitrificans* に特有の硫黄の沈着粒の見られる黄色コロニーを得た。平板培養を繰り返して得た純粋菌につき分類試験を行い、分離菌を *T. denitrificans* と同定した。
- 2) 硫黄脱窒細菌の集積分離用の培地としては、Baal-srud・Baalsrud の培地に微量金属成分を加えた培地が適していた。
- 3) 下水処理場活性汚泥、汚濁河川の底泥などを植種源に、炭素源として HCO₃⁻、硫黄源として S₂O₃²⁻をそれぞれ用いた培地により、嫌気条件下で脱窒能のある菌の集積をはかった結果、すべての植種源から *T. denitrificans* が得られ、本菌は自然界に普遍的に存在することがわかった。
- 4) S₂O₃²⁻を硫黄源とした場合の、集積培養菌の硫黄脱窒反応に関する化学量論値 (Y_s , Y_{alk} , Y_{obs} , C_R) が理論値にほぼ一致することから、集積培養菌の脱窒能のほとんどが硫黄脱窒細菌に由来していることがわかった。
- 5) S₂O₃²⁻を硫黄源として集積した硫黄脱窒集積菌を、硫黄源を徐々に S⁰に置き換える方法により S⁰に馴養させることができた。

Table 7 Comparison of denitrification capabilities for various kinds of denitrifiers.

Kinds of denitrifier	H-donor	Temp. (°C)	Specific denitrification rate (mg N · mg ⁻¹ SS · day)	References
Activated sludge	CH ₃ OH	27	0.60	Michael, R.P. <i>et al.</i> ⁽¹⁰⁾
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Sodium Citrate	27	4.08	Dawson, R.N. <i>et al.</i> ⁽¹¹⁾
Enriched sulfur denitrifier	Na ₂ S ₂ O ₃ S ⁰	28	3.2	This work
		28	1.32*	

* This value was calculated from the batch denitrification experiment shown in Fig. 13 based on the assumption of cellular composition as C₅H₇NO₂.

6) 硫黄源として $S_2O_3^{2-}$, S^0 のいずれを用いても集積培養菌の脱窒反応は 0 次反応に従った。 $S_2O_3^{2-}$ を用いた場合の集積菌の比脱窒速度は, $9.4 \text{mgNO}_3\text{-N} \cdot \text{菌体}^{-1} \text{TOC} \cdot \text{d}^{-1}$, S^0 を用いた場合の比脱窒速度は, $2.5 \text{mgNO}_3\text{-N} \cdot \text{菌体}^{-1} \text{TOC} \cdot \text{d}^{-1}$ となり, 他栄養脱窒菌に比肩し得るほど高い脱窒能であった。

(原稿受理 1989年 3月13日)

参 考 文 献

- 1) Ishaque, M. and Aleem, M.I.H. (1972) Intermediates of Denitrification in *Thiobacillus denitrificans*, *Bacteriol. Proc.*, **72**, 175.
- 2) Peeters, T. and Aleem, M.I.H. (1970) Oxidation of Sulfur Compounds and Electron Transport in *Thiobacillus denitrificans*, *Arch. Mikrobiol.*, **71**, 319-330.
- 3) Bisogni, J.J.Jr. and Driscoll, C.T.Jr. (1977) Denitrification using Thiosulfate and Sulfide, *J. Env. Eng., Am. Soc. Civ. Eng.*, **103**, 593-604.
- 4) 土壤養分測定法委員会編(1971)土壤養分分析法, 広川書店.
- 5) 下水試験方法—1974年版—(1974)日本下水道協会.
- 6) Lawrence, A.W. (1978) Autotrophic Denitrification using Sulfur Electron Donors, U.S. EPA-600/2-78-113.
- 7) Baalsrud, K. and Baalsrud, K.S. (1954) Studies on *Thiobacillus denitrificans*, *Arch. Mikrobiol.*, **20**, 34-62.
- 8) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company, 456-461.
- 9) 今井和民著(1984)独立栄養細菌, 化学同人.
- 10) Vishniac, W. and Santer, M. (1957) The Thiobacilli, *Bacteriological Review*, **21**, 195-213.
- 11) Michael, R.P. and Jewell, W.J. (1975) Optimization of Denitrification Process, *J. Env. Eng., Am. Soc. Civ. Eng.*, **101**, 643-657.
- 12) Dawson, R.N. and Murphy, K.L. (1972) Factors Affecting Biological Denitrification of Wastewater, *Advances Water Pollut. Res., Proceedings 6th Inter. Conference held in Jerusalem*, 671-680.

論 文 要 旨

燧灘海域の底層環境における酸素消費速度

星加 章* 谷本 照巳* 川名吉一郎*

* 通産省工業技術院中国工業技術試験所

〈水質汚濁研究 Vol.12 No.7 (1989) pp.423~430〉

瀬戸内海の燧灘において、1986年9月および1987年7月と9月に、ベルジャーシステムを用いて堆積物と直上水を含む底層環境の酸素消費速度を現位置で測定した。3回の測定結果の平均酸素消費速度は、燧灘の中央部と西部海域でそれぞれ650および410 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ であった。東部海域では底層水中で光合成が行われていることが示唆されたため、その影響を補正することにより、950 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ 程度と推測された。酸素消費速度は堆積物中の有機物含有量が高い東部海域で速く、濃度が低い西部海域で遅い傾向があることを認めた。

硫黄脱窒菌の集積と単体硫黄への馴養

橋本 奨* 古川 憲治* 塩山 昌彦**

* 大阪大学工学部環境工学科 ** 同 (現在久保田鉄工(株)環境研究部)

〈水質汚濁研究 Vol.12 No.7 (1989) pp.431~440〉

Thiobacillus denitrificans の硫黄脱窒能力を下廃水の窒素除去に応用することを最終目的として、自然界から *T. denitrificans* を純粋分離し、その脱窒特性につき検討した。また、硫黄脱窒活性の高い菌の自然界からの集積と集積菌の単体硫黄(S^0)への馴養につき検討した。

無機炭素源として HCO_3^- 、還元硫黄源として $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を用いた無機合成培地により、活性汚泥、汚濁河川の底泥などの植種源から、完全嫌気条件下で硫黄脱窒菌の集積培養を行った結果、すべての植種源から硫黄脱窒能のある集積菌を得ることができた。この集積培養菌を完全嫌気条件下で平板培養することにより、硫黄沈着粒のみられる黄色の単一コロニーを得た。平板培養を繰り返して得られた純粋菌につき分類試験を行い、分離菌を *T. denitrificans* と同定した。

$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を還元硫黄源とする集積菌の回分試験成績をもとに硫黄脱窒反応に関する化学量論値 (Y_s , Y_{aik} , Y_{obs} , C_R) を計算した結果から、集積培養菌の脱窒能のほとんどが硫黄脱窒細菌に由来していることを明らかにした。還元硫黄源を $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ から、 S^0 に徐々に置き換える方法によって、集積菌が S^0 を利用できるような馴養することができた。硫黄脱窒反応は、0次反応に従い、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 S^0 を脱窒反応の H-donor とした場合の比脱窒速度は、それぞれ9.4 $\text{mgN} \cdot \text{mg}^{-1}\text{TOC} \cdot \text{d}^{-1}$ 、2.5 $\text{mgN} \cdot \text{mg}^{-1}\text{TOC} \cdot \text{d}^{-1}$ と硫黄脱窒菌は他栄養脱窒菌に劣らぬ脱窒能を有することがわかった。