

〈第54回静岡県学生科学賞 県科学教育振興委員会賞〉

7 土着の脱窒紅色細菌を用いた Bioremediation によってホティアオイの異常繁殖を阻止する

1 はじめに

ホティアオイ(英語名が Water Hyacinth より以降は WH)は南米ブラジル原産の多年草であり、7カ月で200万倍に増殖するという異常繁殖が報告¹⁾されている。本校付近の麻機遊水地(以降は麻機池)で WH が大繁殖した。WH が異常繁殖している水域で、植物プランクトン濃度が低く、溶存酸素濃度(以降は DO)が 0 mg/L という特異な現象に遭遇した。私たちは、この現象が WH から溶出する溶存有機物に含まれるアミノ酸が従属栄養細菌の呼吸を促進し、急激な溶存酸素の消費によって起きることを示し、WH の異常繁殖のメカニズムを解明した。この検証過程において、WH の密集域に脱窒細菌が存在することが示唆されたため、WH から溶出する溶存有機物などを用いて集積培養を行い、*Rhodobacter sphaeroides* の近縁種である脱窒紅色細菌の単離に成功した。単離した細菌をポリエチレングリコール系のゲルで包括固定した担体(以降は PEG 担体)を用いて、WH よりも高い速度で水中の窒素を除去することに成功した。更に、この担体を用いて WH 密集域で使用できる脱窒バイオリアクター(以降はリアクター)を開発した。本稿では、抽出した細菌を用いた脱窒実験に絞って報告する。

2 脱窒バイオリアクターの開発目標設定

リアクターの脱窒能力の開発目標を定めるために、WH が消費する窒素量を測定した。イオン交換水 1 L に硝酸カリウムとリン酸二水素カルシウムを用いて栽培水の窒素とリンの比を 10 : 1 に調整し、2 L ビーカーに WH を 1 株入れ、栽培期間中の硝酸態窒素(以降は NO₃-N)濃度を測定した。WH の栽培水の NO₃-N 濃度は 5 日間で 33% 減少した。1 日あたりに換算すると 20.6 mg/L/day だった。文献²⁾によると WH による窒素除去量は(Fig.1)、23.8 kg/m²/day であり、麻機池での繁殖状況をもとに、水深 1 m の水域に 1 m² あたり、WH が 100 株、280 日間繁殖していると仮定し、これを換算すると 85 mg/L/day だった。以上より、およそ 100 mg/L/day 以上の窒素除去能力があれば、WH が大繁殖した水域で、WH よりも高い効率で窒素除去が計画できると考えた。

3 土着の脱窒細菌の包括固定化

麻機池から抽出した紅色細菌をリアクター化する手段として、包括固定化法³⁾を選択した。その理由は、現地でリアクターを使用した際に、紅色細菌が優位な水深に設置できることと、異常が観測された場合に担体ごと細菌を直ちに引き抜けるからである。15 g/L のアルギン酸ナトリウム溶液に赤い懸濁液の孔径 7 μm フィルタによる濾液を添加し、混合した後、10 g/L の塩化カルシウム溶

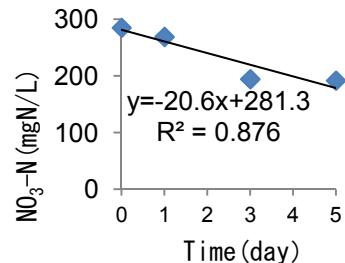


Fig. 1 ホティアオイ栽培水中の NO₃-N 濃度の変化.

液に滴下し、直径3~5 mm（平均4.1 mm）の球形の担体（約5,000個）を得た。WH密集域の還元的な状況下における窒素除去能力を確認するために、培地は無機合成液体培地⁴⁾を用いた。培地の組成をTable 1に示す。WH密集水域での使用を想定し、pHは7.5に調整した。反応容積は1,000 mLであり、内部に180 mLの担体が充填されている（担体充填率18%）。夏季のWH密集域の底質付近の水温である27°Cとなるように保温し、連続的に80 rpmで攪拌した。培養期間中の水質変化と気体発生量を測定した。気体発生量は、リアクター上部のゴム栓にチューブを取り付け、チューブの先にシリジンを取り付け、シリジン内に滞留したガスの量とした。その結果、DOが2 mg/L未満になった18時間後から急激にアンモニア、亜硝酸、全窒素（以降はTN）の濃度の減少が起き、リアクター内で泡が発生した。気体の発生が活性化してからの6時間（18~24時間後）の窒素除去効率は、Fig.3のTNの減少量を1日あたりに換算すると135.4 mg/L/day (5.64 mg/L/h)であった。この値はWHが大繁殖した水域において1日あたりに1L中から消費される窒素量(85 mg/L/day)を上回っている。安定してこの6時間の窒素除去効率が実現できれば、WHの異常繁殖を阻止できる可能性が認められた。

Table 1 窒素除去実験用の無機合成培地の組成。

Substrates	Concentration	unit
NaNO ₂	280	mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	280	mg/L
NaHCO ₃	420	mg/L
KH ₂ PO ₄	27	mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300	mg/L
CaCl ₂	133	mg/L
Trace Element	1	mg/L
Trace Element		
EDTA	2,000	mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,000	mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100	mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	100	mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	100	mg/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	20	mg/L
H ₃ BO ₄	100	mg/L
MnSO ₄ ·6H ₂ O	100	mg/L



Fig. 2 アルギン酸カルシウム担体による脱窒実験のセット。

前述した脱窒実験では、NO₃-Nが必要であることが示唆された。また、懸濁液をペプトンだけを添加した寒天培地で嫌気培養した結果、赤いコロニーを形成したため、この脱窒紅色細菌はアミノ酸を炭素源にしている可能性を得た。そのため、前述の脱窒実験と同様にアルギン酸カルシウムによる担体固定を行い、Table 1の培地の組成から、亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素を除き、硝酸態窒素と有機物（ペプトン）を加えた培地（Table 2）によって、窒素除去実験を行った。その結果がFig.4である。1~3回目という表現は、培地のNO₃-N濃度が0 mg/Lになった後、新しい液体培地に担体を移し、同様の実験を繰り返したという意味である。1回目は約80時間後、2回目は48時間後にNO₃-N濃度が0 mg/Lになった。各直線の傾きは窒素除去速度を表す。窒素除去速度は1回目が1.8 mg/L/hour、2回目が2.8 mg/L/hourを得た。3回目はTable 2の硝酸態窒素濃度を2倍にして、72時間の濃度の変化を測定した。その間の窒素除去速度は2.6 mg/L/hourであり、2回目とほぼ等しい除去速度を得たことから、アルギン酸カルシウム担体固定による窒素除去速度の最大値を引き出すには、担体固定をしてから、Table 2の液体培地を用いて100時間以上培養すれば良いことが

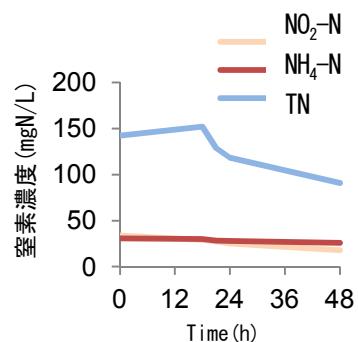


Fig. 3 窒素濃度の変化。

Table 2 脱窒実験用ノバソリ培地の組成。

Substrates	Concentration	unit
KNO ₃	1,000	mg/L
NaHCO ₃	420	mg/L
KH ₂ PO ₄	27	mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300	mg/L
CaCl ₂	133	mg/L
peptone	1,000	mg/L
Trace Element	1	mg/L
Trace Element		
EDTA	2,000	mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,000	mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100	mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	100	mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	100	mg/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	20	mg/L
H ₃ BO ₄	100	mg/L
MnSO ₄ ·6H ₂ O	100	mg/L

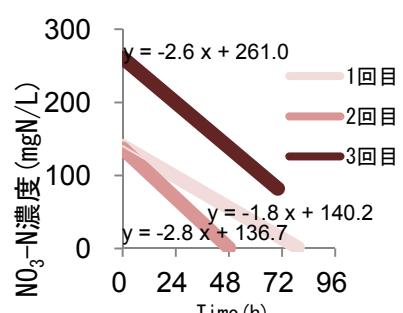


Fig. 4 アルギン酸カルシウム担体による脱窒実験の結果。

分かった。しかし、問題点が2つ明らかになった。1つは開発目標値である100 mg/L/dayを上回るために、2倍の体積の担体が必要になることである。もう1つはこの実験中にアルギン酸カルシウム担体が溶解した傾向が観察されたことである。これは、液体培地中のリン酸イオンによりCa²⁺が外れ、ゲルが溶解したものと考えられる。WH密集域では水質が還元的になっており、他の水域と比較してリン酸濃度が上昇することをすでに観測しているため、リン酸イオンによって溶解しにくい担体材料を検討した。同時に、固定化時および固定化後ともに脱窒紅色細菌に対し毒性がなく、浄化の際に菌体の漏れが少なく、耐久性が優れた素材であることも条件として付加した。その結果、脱窒紅色細菌の懸濁液をPEG(Poly Ethylene Glycol系のゲル)により包括固定化した。各薬剤の組成は、Poly Ethylene Glycol Diacrylate(分子量700)18%、重合促進剤2%、重合開始剤0.3%、脱窒紅色細菌の懸濁液3%である。

PEG担体を用いた脱窒実験を以下のように行った。Fig.5の反応容積は1,000 mLであり、内部にネットに包まれたPEG担体(Fig.6)が3個充填されている(担体充填率6%)。担体をネットに包み、反応装置の中央部分に設置したのは、現地での使用を想定したためである。アルギン酸カルシウム担体での実験と同様に、Table 2の液体培地を用い、27°Cに保温し、連続的に80 rpmで攪拌した。培養期間中の水質変化の測定結果がFig.7である。1~5回目という表現は、培地のNO₃-N濃度が0 mg/Lになった後、新しい液体培地に担体を移し、同様の実験を繰り返したという意味である。窒素除去速度は4回目が7.6 mg/L/hour(183.3 mg/L/day)、5回目が7.9 mg/L/hour(189.4 mg/L/day)を得た。4回目と5回目にはほぼ等しい除去速度を得たことから、PEG担体による窒素除去速度の最大値を引き出すには、担体固定後に300時間以上培養すれば良いことが分かった。そして、この窒素除去速度は開発目標値(WH密集域における1日あたりの1L中からの窒素消費量)の約2倍に達したことが確認できた。



Fig. 5 PEG 担体による脱窒実験のセット。

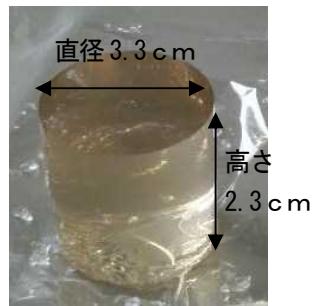


Fig. 6 PEG 担体。

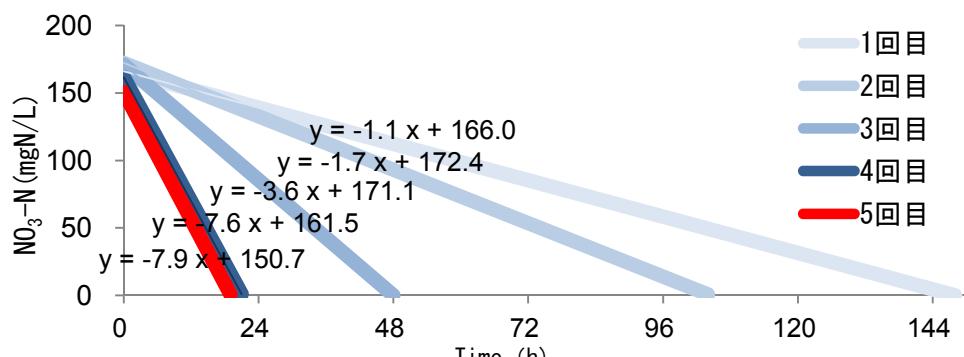


Fig. 7 PEG 担体による脱窒実験の結果。

PEG担体表面には際立った溶解の跡はなく、目立った培地への流出もなかったため、アルギン酸カルシウム担体よりも耐久性が高いことが確認できた。PEG担体の充填率はアルギン酸カルシウム担体の3分の1であったが、PEG担体による窒素除去速度はアルギン酸カルシウム担体を使用した際の2.8倍であった。担体の同体積あたりのPEG担体の窒素除去速度はアルギン酸カルシウム担体の8.5倍であった。PEG担体の方がアルギン酸カルシウム担体よりも総表面積が小さいにも関わらず、この窒素除去速度が実現できたのは、PEG担体の方が、液体培地の透過率が高く、担体内部に *Rhodobacter sphaeroides* を固定する能力が高かったからであると考えられる。また、担体が窒素除去速度の最大値を得るまでの時間はアルギン酸カルシウム担体の方が短かったのは、PEG担体と比較して、硬度が低いために細菌の増殖速度が高くなつたからであると考えられた。

4 現地で使える脱窒リアクターの考案

Fig.8 は、麻機池の流入から放流までの水の流れと WH 密集域の位置関係を表している。麻機池は、晴天時は閉鎖性水域となるが、降雨後は、周囲の土地からの流入がある。流入地点 A と B は、WH 密集域の付近に位置する。矢印は、水の流れを表している。流入地点 A と B で流れ込んだ水が中州の連結地点 C を通り、放流地点 D から麻機池の外部へ出て、河川（巴川）へ流入する。私たちは、これらの 4 地点を定点観測地点としている。

WH 密集域から 200 m 離れた水域（連結地点 C）で $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を測定した結果である。麻機池では、4~12 月に WH の繁殖がある。この期間に外部から流入したあるいは底質等から溶出した $\text{NO}_3\text{-N}$ が WH 密集域で消費されていたと仮定すると、WH の大規模な繁殖がなかった 1~3 月の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を参考に、WH が大繁殖した水域には 10~20 mg/L の濃度で $\text{NO}_3\text{-N}$ が供給されていることが推理できる。

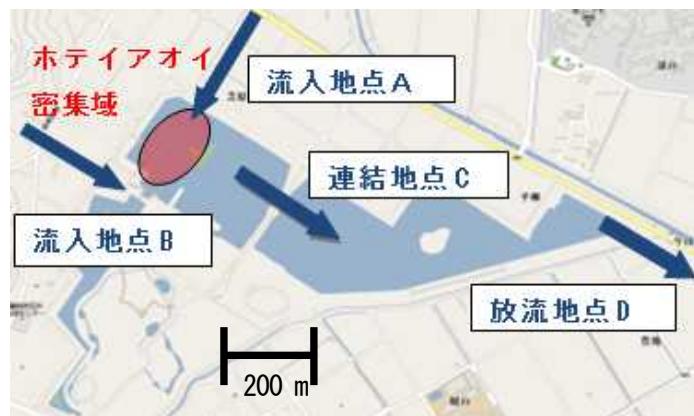


Fig.8 麻機池の水の流れとホティアオイ密集域の位置関係

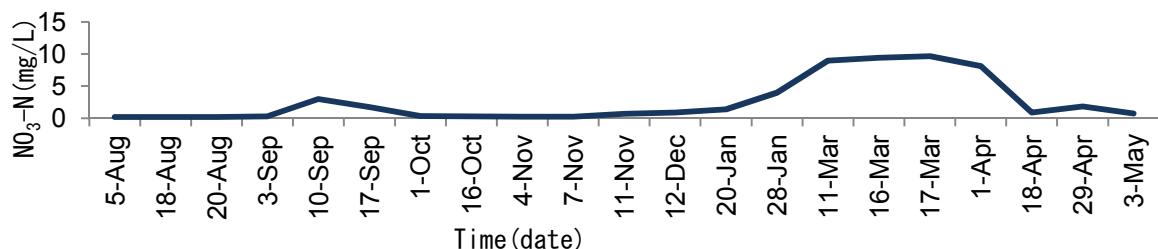


Fig.9 ホティアオイ密集域付近の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の変化。

開発した PEG 担体がこの濃度で窒素除去できることを確認するために Table 2 の液体培地の濃度を 10 倍、12 倍、15 倍、20 倍に希釈した。実験開始時の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度はそれぞれ 16.4 mg/L、13.6 mg/L、11.6 mg/L、8.9 mg/L であり、麻機池における WH 密集域付近の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度に近い濃度を再現できた。この培地を用いて他の条件は変えずに実験を行った。培養期間中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の変化を Fig.10 に示す。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が 10 mg/L 以上のときは、安定した窒素除去速度が期待できることが分かった。 20 倍希釈の培地では、窒素除去速度が低下することが分かった。この結果から、他の希釈倍率では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が 0 mg/L になっていることから、窒素制限的になったのではなく、培地中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 以外の濃度が低下したことにより脱窒速度が低下したと考えられ、アミノ酸濃度が制限要因になった可能性が高いと考えている。

窒素除去速度と耐久性の面から *Rhodobacter sphaeroides* を PEG で包括固定した担体は麻機池での窒素除去に使用できると判断し、研究の最終段階である WH 密集域で使えるリアクターの考案に入った。WH 密集域で脱窒させる上で最も重要なことは、担体内に固定した脱窒紅色細菌は、嫌気的な条件下において $\text{NO}_3\text{-N}$ とアミノ酸が存在すれば、安定した窒素除去を行うことである。

Fig.11 は WH 密集域における脱窒リアクターの設置計画図である。ネット状の容器に脱窒紅色細菌を固定した担体を入れる。リアクターは Buoy と Weight にワイヤーでつなぎ、担体を入れた容

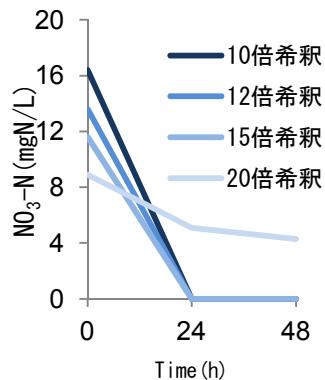


Fig.10 低濃度の培地による脱窒実験の結果。

器が一定の水深を保つように調整する。容器は好気層と嫌気層が接する Interface (境界) の水深を保持する。麻機池の WH 密集域では水深 10~15 cm 以下が貧酸素であることを確認しているため、WH 密集域の Interface は浅い水深に存在する。この水深では、好気層から NO_3 と嫌気層からアミノ酸を獲得できる。

これらの仮説に基づいて屋外実験を行った。Fig.12 左図にリアクターを示す。Buoy はペットボトル、Weight はステンレス製ネジを用いた。深さが 60 cm、容積が 45 L の 2 つの水槽に麻機池から採取した WH、水、底質を入れ、屋上で 1 ヶ月栽培した(Fig.12 右図)。水槽内が無酸素化し、水深 20 cm 付近に Interface が形成されたことを確認した後、実験を開始した。2 つの水槽の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が等しくなるように調整後、一方の水槽にはリアクターを設置した。水槽を屋外に設置し、雨水が入らないように透明なビニールをかけ、期間中の水質の変化を測定した。その結果を Fig.13 に示す。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 減少量は濃度が減少した差分に栽培水の体積 40 L を掛けて算出した。リアクターを入れた水槽の方が $\text{NO}_3\text{-N}$ 減少量が 200mg 大きかったことから、開発した脱窒リアクターが WH 密集域において窒素除去を行えることが確認できた。



Fig. 12 脱窒リアクターの屋外実験。

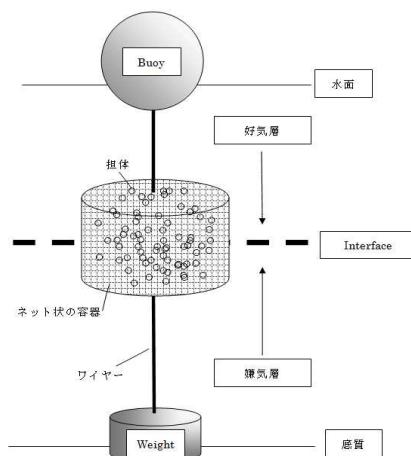


Fig. 11 脱窒リアクターの設置計画図。

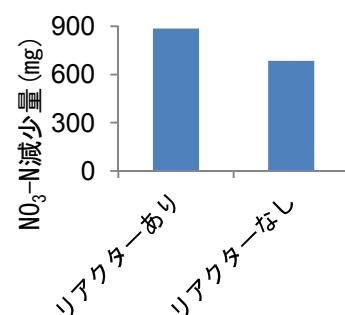


Fig. 13 脱窒リアクターの屋外実験の 48 時間後の比較。

5まとめ

WH 密集域から単離した脱窒紅色細菌を PEG 等で包括固定した担体による窒素除去実験を行い、WH が大繁殖した水域において 1 日あたりに 1 L 中から消費される窒素量以上の窒素除去効率を得ると共に、WH 密集域における窒素除去方法を案出した。

6 今後の課題

現在、脱窒リアクターの屋外テストを継続し、WH が大繁殖した水域で使用する際に必要な情報(浄化に必要なリアクターの個数、設置する場所、維持管理方法等)を収集すると共に、麻機池に関する流入から流出までの水質データを蓄積している。

7 参考文献

- 1) 石井猛.ホティアオイは地球を救う.増補 1 版.内田老鶴園.1996,126p.
- 2) 藤田正憲,池道日彦.バイオ環境工学.第 1 版.シーエムシー出版.2006,146p.
- 3) 須藤隆一.微生物固定化法による排水処理.3 版.産業用水調査会.1995,284p.
- 4) 北村博,森田茂廣,山下仁平,光合成細菌.4 版.学会出版センター.1984,351p.