



Title	生物活性炭の硝化細菌計数法における培地の検討
Author(s)	海老江, 邦雄; 萩下, 隆; 末広, 誠一
Description	第2回衛生工学シンポジウム (平成6年11月10日 (木) -11日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 7 測定・評価 . 7-3
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 2, 270-274
Issue Date	1994-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7626
Type	departmental bulletin paper
File Information	2-7-3_p270-274.pdf



7 - 3

生物活性炭の硝化細菌計数法における培地の検討

海老江 邦雄(北見工業大学) 萩下 隆(北見市企業局) 末広 誠一(水道機工)

1. はじめに

近年、水道水源の汚濁の進行に伴い、オゾン、粒状活性炭処理の導入が多くの自治体で検討されている。前段に塩素を注入しない粒状活性炭処理では活性炭表面に繁殖した微生物が処理に貢献することが知られている。硝化細菌によるアンモニア性窒素の除去は微生物の重要な機能のひとつであり、硝化細菌の動態の調査は生物活性炭を評価する上で重要と考えられる。現在のところ、硝化細菌の計数には主にMPN法が用いられているが、菌数に強く影響すると考えられる培地については報告ごとにその種類が異なっており一定していない^{1) 2)}。そこで今回は、北見市の高度浄水処理実験³⁾ (常呂川表流水、オゾン、粒状活性炭処理) で使用の生物活性炭を対象に、数種類の硝化細菌計数培地における計数値の比較および培地成分が菌数に及ぼす影響について検討した結果を報告したい。

2. 実験方法

各培地の計数値の比較 硝化細菌数の測定にはMPN5本法を用いた。使用した硝化細菌計数培地の成分を表1に、その特徴を表2に示す。この中で、レーニス改変培地はレーニス培地から塩基性炭酸マグネシウムを除き、リン酸1水素カリウムとリン酸2水素カリウムを加えることによってアルカリ度を補うとともにpHを7.5付近に調整し、さらに塩化カルシウムを加えた培地である。なお、レーニス培地および亜硝酸酸化細菌用のSB培地については表面積を増やすために石英砂(和光純薬)を各試験管に約0.15g(表面積は2~3倍に増える)入れたものについても試験を行った。

表1. 培地の成分 (蒸留水1ℓ中)

	アンモニア酸化細菌用培地					亜硝酸酸化細菌用培地		
	レーニス培地 ⁴⁾ (1/30)	レーニス改変培地	諏訪 ⁵⁾ L培地 (H培地)	土壤微生物実験法培地 ⁶⁾	SB培地 ⁷⁾	レーニス培地 ⁴⁾ (1/30)	土壤微生物実験法培地 ⁶⁾	SB培地 ⁷⁾
(NH ₄) ₂ SO ₄	30mg	30mg	0.1g (5.0g)	0.5g	0.5g			
NaNO ₂						30mg		
KNO ₂							6mg	8.5mg
K ₂ HPO ₄	30mg	270mg	0.2g	1.0g		15mg	1.0g	140mg
KH ₂ PO ₄		30mg			0.2g			27mg
Na ₂ CO ₃						10mg		
NaCl	60mg	60mg		0.3g		15mg	0.3g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15mg	15mg	50mg	0.3g	40mg	10mg	0.1g	0.2g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	12mg	12mg	1mg	30mg			30mg	
EDTA-Fe					1.0ml			1.0ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O		13.4mg	20mg		13.4mg		0.3g	13.4mg
CaCO ₃			(2)	7.5g			1.0g	
培地量	5 ml	5 ml	5 ml	3 ml	4 ml	5 ml	5 ml	4 ml
備考No	(1)		(2)		(3)(4)			(3)

備考: (1)滅菌した塩基性炭酸Mgを培地5mlに対して、0.3mg添加。
(2)約35mgのCaCO₃を入れて乾熱滅菌した試験管にろ過滅菌して分注。
(その他の培地は121℃で15分間蒸気滅菌)
(3)EDTA-FeはFeSO₄ 0.246g, NaEDTA 0.331g を100mlの蒸留水に溶かす。
その他に1ℓ中に、微量元素として、Na₂MoO₄·2H₂O 0.1mg, MnCl₂ 0.2mg,
CoCl₂·6H₂O 0.002mg, CuSO₄·5H₂O 0.02mg, ZnSO₄·7H₂O 0.1mgを加える。
CaCl₂·2H₂OとMgSO₄·7H₂Oは別に蒸気滅菌して加える。
(4)その他に1ℓ中にBromothymol blue 2mgを加え、蒸気滅菌前にNaOHでpHを7.4にする。

生物活性炭は高度処理実験装置³⁾の3系(凝集沈澱-粒状活性炭ろ過)および4系(凝集沈澱-オゾン処理-粒状活性炭ろ過)の活性炭ろ過塔から採取した。これらの活性炭から10ml(かさ容量)を分取し、滅菌希釈水⁴⁾50mlで5回緩やかに洗浄し、抑留されているフロックを除いた。その後、滅菌希釈水を加えて100ml(200ml容のビーカー)とし、超音波洗浄器(50KHz, 120W)で処理して細菌を剝離した。この場合の超音波処理時間は、処理時間と従属栄養細菌数の関係(図1)から20分間とした。この処理液を10倍ずつ希釈して行

き、その都度培地の入った試験管に1mlずつ植え付けた。培養は25℃(静置)で行い、時間経過に伴う硝化細菌の増殖を調べた。またSB培地については振とう培養(試験管を水平から20度の角度に傾け、振とう幅25mm、振とう回数160回/分)をも行い、菌数に及ぼす振とうの効果調べた。

硝化細菌の増殖の有無に関しては、各試験管から無菌的に0.2mlの試料を取り、2mlの蒸留水で希釈した。その後、

アンモニア酸化細菌については硫酸ヒドラジン法⁹⁾による亜硝酸または硝酸の生成、亜硝酸酸化細菌についてはスルファニルアミド・ナフチルエチレンジアミン法による亜硝酸の消失で確認した。硫酸ヒドラジン法ではマグネシウムやカルシウムによる妨害や亜硝酸の分解が知られている⁹⁾が適用に際しては事前に検討を行い問題がないことを確認しておいた。

アンモニア性窒素濃度の影響 諏訪培地については、培地中のアンモニア性窒素濃度の影響を調べるために窒素濃度を2から500mg/lまで8段階に変化させてアンモニア酸化細菌数を測定した。また土壤微生物実験法培地(土壤培地)についてはアンモニア性窒素濃度を10mg/lとした培地と原法通りの100mg/lの培地の比較を行った。

微量元素の効果 微量元素(Mo, Mn, Co, Zn, Cu)を含む培地でアンモニア酸化細菌がかなり高く計数されると報告¹⁰⁾があるため諏訪培地(アンモニア性窒素濃度10mg/l)で微量元素添加の効果調べた。微量元素濃度はSB培地に従った。

3. 結果と考察

アンモニア酸化細菌用培地および培養法を比較した結果について菌数と培養期間の関係を図2(3系)、図3(4系)に示す。諏訪L培地でかなり高い菌数が得

表2. 硝化細菌計数用培地の特徴

	アンモニア酸化細菌用培地					亜硝酸酸化細菌用培地		
	レーニ培地(1/30)	レーニ改変培地	諏訪L培地(H培地)	土壤微生物実験法培地	SB培地	レーニ培地(1/30)	土壤微生物実験法培地	SB培地
窒素濃度(mg/L)	6.4	6.4	21 (1060)	106	106	6.1	1.0	1.4
pH実測値	8.6	7.5	7.9 (7.7)	7.9	7.3	7.3	7.6	7.1
7%加度(mg/L)	72	73	7200	7800	65	-	-	-
成分の有無								
Na	+	+	(+)注1	+	+	+	+	(+)注1
K	+	+	+	+	+	+	+	+
Mg	+	+	+	+	+	+	+	+
Ca		+	+	+	+		+	+
Fe	+	+	+	+	+		+	+
微量元素注2					+			+

注1) : (+), 希釈水(上水試験方法1982)にNaが6mg/l含まれている。
注2) : Mo, Mn, Co, Zn, Cu

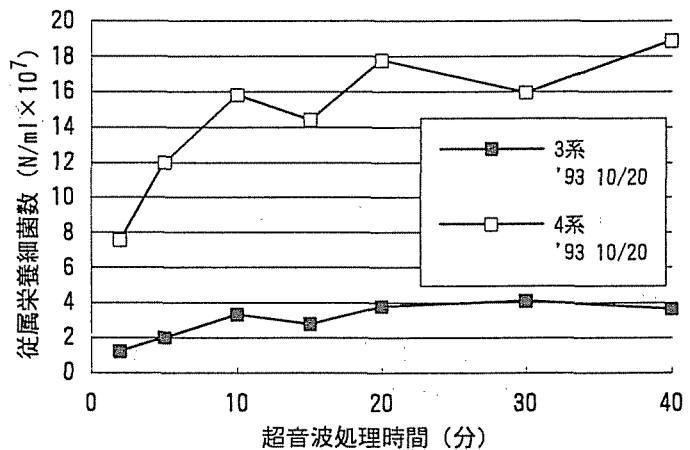


図1. 超音波処理時間と従属栄養細菌数の関係

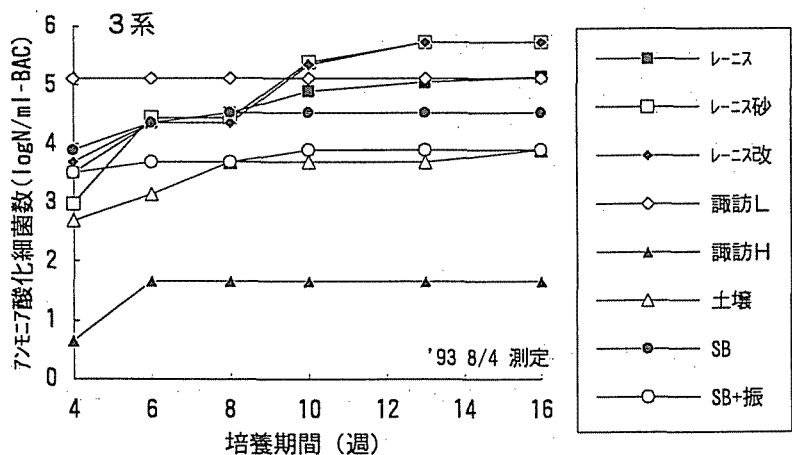


図2. アンモニア酸化細菌計数用培地の比較(3系)

られ、しかも4週間の培養で最大値となった。ただし、3系では培養期間を長くした場合にレーニス+砂培地およびレーニス改変培地で諏訪L培地におけるよりも高い菌数が得られた。諏訪H培地の菌数は他の培地よりも極端に低かったが、これは高濃度のアンモニア性窒素による硝化細菌の増殖阻害が起こった結果と考えられる⁵⁾。

レーニス培地については石英砂添加の効果を調べたが、石英砂を入れた培地の方が菌数が高かった。

振とうの効果についてはSB培地で比較したが、振とう効果は殆ど認められず静置培養の方が高い菌数を示した。

亜硝酸酸化細菌培地の比較を図4(3系)、図5(4系)に示す。土壌培地で最も高い菌数が得られた。レーニス培地の菌数は培養初期は他の培地よりかなり低かったが、8週間目以降では差が小さくなり、13週間目以降はSB培地とほぼ等しくなった。これはレーニス培地では亜硝酸性窒素濃度が高いため亜硝酸が消失するまでに時間がかかった結果と考えられる。

石英砂添加の効果についてはレーニス培地およびSB培地で比較したが、効果は明確には確認できなかった。また、培養時の振とうの効果もSB培地で比較したが、効果は認められなかった。

土壌培地を用いた場合、硝酸の生成を伴わない亜硝酸の消費があることが知られている¹¹⁾。このため培養後、亜硝酸が消失した最大の希釈倍率の培養液について亜硝酸および硝酸濃度をイオンクロマトグラフ法で測定したところ、消失した亜硝酸性窒素はすべて硝酸性窒素となっており、亜硝酸酸化細菌の増殖が確認された。

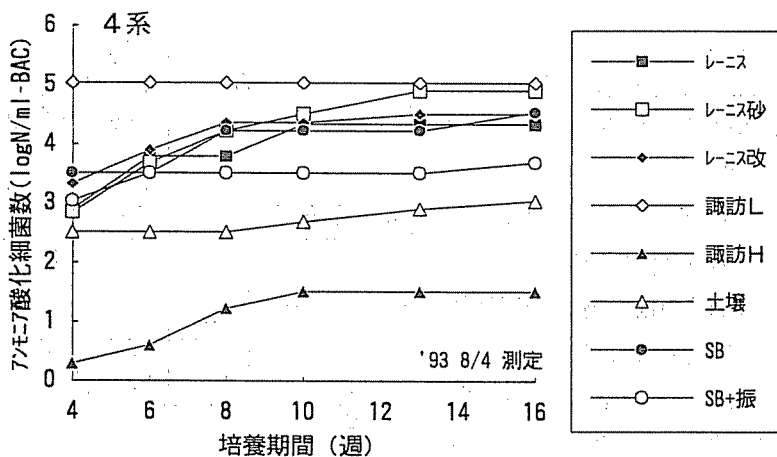


図3. アンモニア酸化細菌計数用培地の比較(4系)

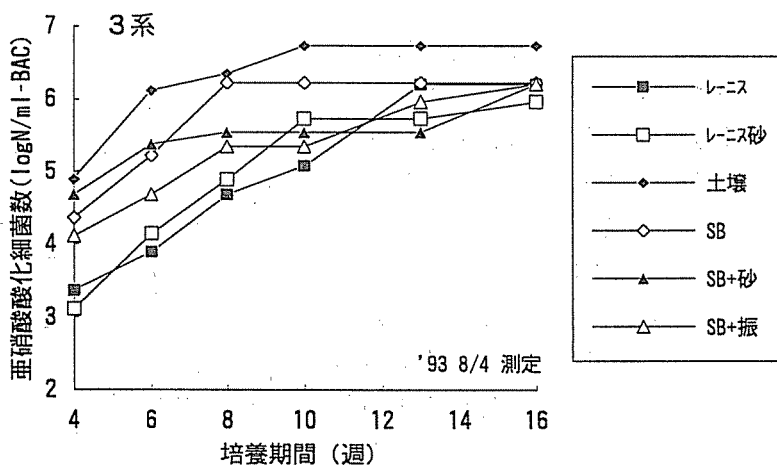


図4. 亜硝酸酸化細菌計数用培地の比較(3系)

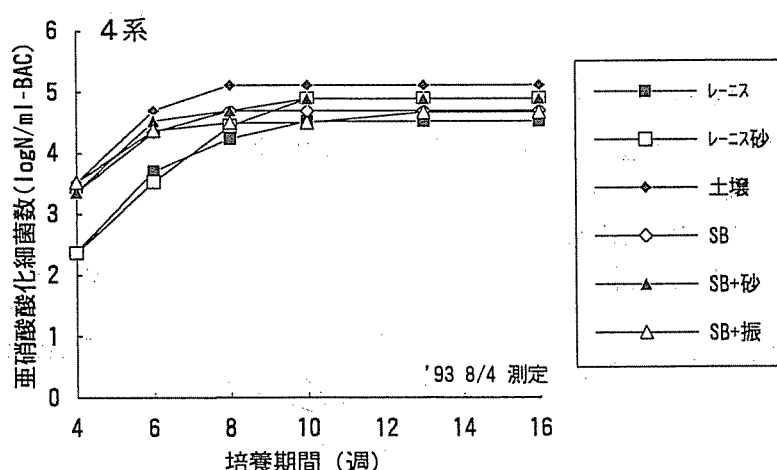


図5. 亜硝酸酸化細菌計数用培地の比較(4系)

諏訪培地のアンモニア性窒素濃度がアンモニア酸化細菌数に及ぼす影響については、3系の結果を図6に、4系の結果を図7に示す。3系では20mg/ℓ以上で窒素濃度が高いほど菌数が低くなった。4系では窒素濃度100mg/ℓ以上で菌数が顕著に低下した。このように菌数が顕著に低下するアンモニア性窒素濃度は試料によって異なっていたが、いずれも10mg/ℓ以下の濃度では菌数の差が少なかった。最大の菌数に達するまでの培養期間はアンモニア性窒素濃度が低い培地で長くなる傾向が認められた。

土壌培地を用いてアンモニア性窒素濃度の影響を調べた結果を図8に示す。窒素濃度を10mg/ℓとした場合(土壌10培地)、原法の100mg/ℓの培地に比べて約1桁高い計数值が得られた。ただし、アンモニア性窒素濃度を10mg/ℓとした諏訪培地(諏訪10培地)より菌数は低く、特に培養初期の差が大きかった。

微量元素の効果を調べた結果を図9に示す。諏訪10培地と微量元素を添加した諏訪10T培地間の明確な差は認められなかった。この結果は石本ほかの報告¹⁰⁾と異なっているが、試料や基本となる培地の成分の違いが原因と考えている。

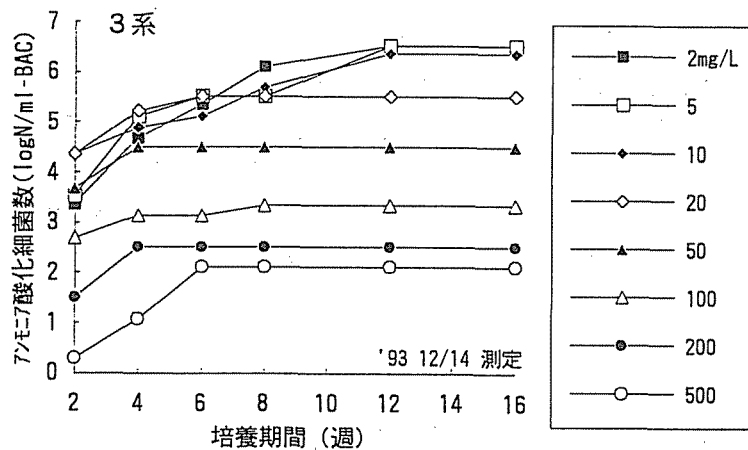


図6. アンモニア性窒素濃度の影響 (3系)

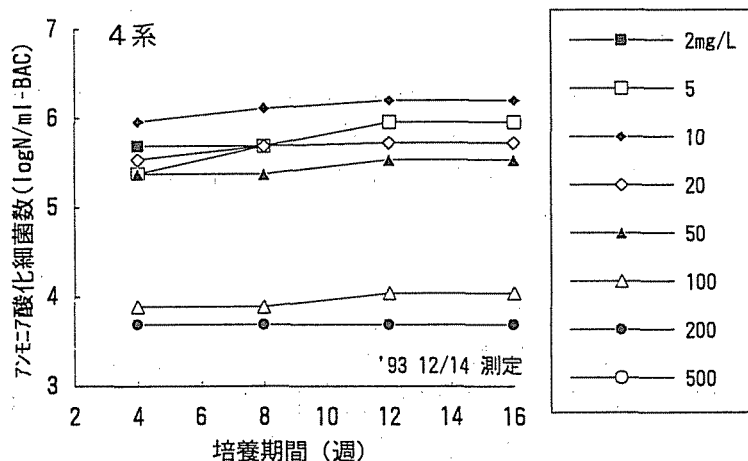


図7. アンモニア性窒素濃度の影響 (4系)
500mg/ℓは検出限界(2×10³/ml-BAC)以下

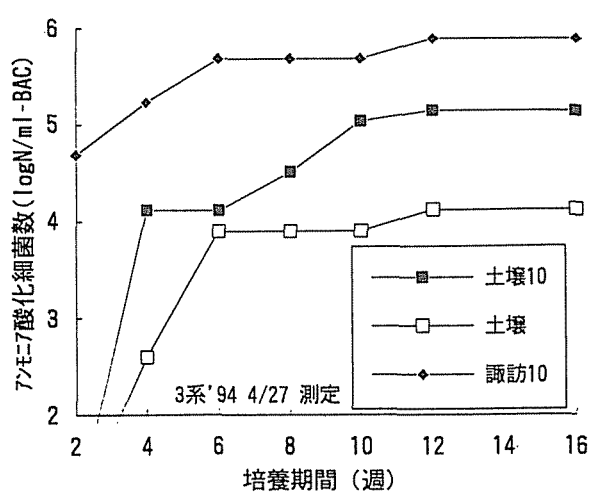


図8. アンモニア性窒素濃度の影響 (土壌培地)

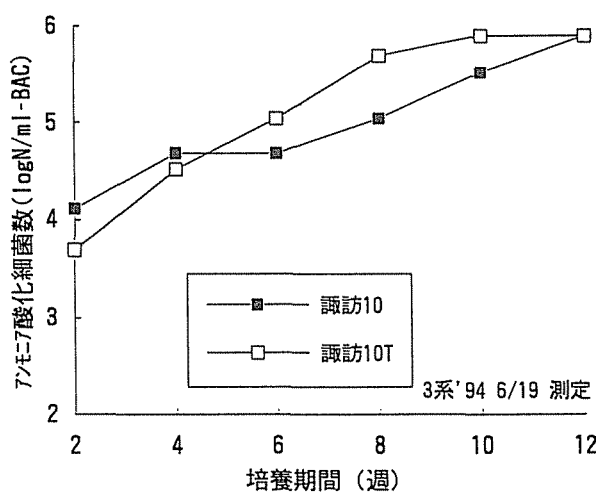


図9. 微量元素の効果

4. おわりに

今回は、既存の培地を比較し、培地成分によって菌数が異なることを示した。アンモニア酸化細菌用の培地では諏訪L培地が短い培養期間で多くの菌数が得られる点で優れており、亜硝酸酸化細菌用の培地では土壤微生物実験法培地で高い菌数が得られた。またアンモニア酸化細菌用の培地において、アンモニア性窒素濃度が高くなると検出される菌数が減少するため培地中の窒素濃度が10mg/l以下が望ましいことが明らかになった。今後は培地の各成分の濃度と菌数の関係をさらに検討し、より多くの菌数を検出できる培地組成を明らかにしたいと考えている。

《参考文献》

- 1)小川ほか(1991) 第42回全国水道研究会発表会講演集, pp. 641~643
- 2)大西ほか(1993) 第44回全国水道研究会発表会講演集, pp. 201~203
- 3)海老江ほか(1993) 第44回全国水道研究会発表会講演集, pp. 189~191
- 4)上水試験方法(1985)
- 5)諏訪ほか(1991) 水質汚濁研究, Vol. 14, No4, pp. 261~265
- 6)土壤微生物実験法(1975) 養賢堂
- 7)Schmidt & Belser(1982) Nitrifying bacteria. in Method of soil analysis(2nd ed.) American Society for Agronomy, Madison, Wis.
- 8)Strickland & Parsons(1968) A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Bd. Can. Bull. 167
- 9)北村ほか(1982) 水質汚濁研究, Vol. 5, No1, pp. 35~42
- 10)石本ほか(1994) 第45回全国水道研究会発表会講演集, pp. 632~633
- 11)木村ほか(1980) 土肥学会講演要旨集, 26, p. 46