

研究報告

微生物の機能を利用した水質浄化(第3報)

- 担体付着微生物群集による有機物分解および窒素除去 -

市岡高男、佐来栄治、加藤 進、澤 智代\*、木村俊夫\*\*、菅原 庸\*\*\*

有機物で汚染された水域の生物環境を微生物により改善するため、脱窒細菌を中心とした窒素ガス化による窒素除去のための微生物系の構築を試みた。内湾から分離した脱窒細菌 C8-2 株は淡水および海水環境で生育可能な脱窒能の高い菌株で、Pseudomonas であると考えられる。脱窒細菌 C8-2 株の脱窒能は 30 付近で最大となり、20 でかなり活性が低下するが、10 でも 20 のときの約 13%の活性が残存していた。

本株による脱窒速度を種々の硝酸塩濃度のもとで測定した結果、30 における最大脱窒速度  $V_{max}$  は  $3.74 \mu\text{mol/L/hr}$ 、硝酸塩に対する  $K_m$  値は  $40.0 \mu\text{mol/L}$  であった。

現場底泥に脱窒細菌 C8-2 株を散布して環境を改善するための現場小型モデル系を設定し、底泥のみの場合と C8-2 株付着担体を底泥に添加した場合の脱窒ポテンシャルを比較した結果、C8-2 株の添加により脱窒ポテンシャルの増強が認められた。脱窒ポテンシャルは C8-2 株が  $10^5 \text{ cells/mL}$  のレベルの場合、泥コントロールの 2 倍に、 $10^7 \text{ cells/mL}$  のレベルの場合、泥コントロールの約 3 倍となった。

現場底泥に散布した担体中の脱窒細菌は  $10^4 \sim 10^6 \text{ cells/g(wet)}$  のレベルを、また、アンモニア酸化細菌は  $10^2 \sim 10^4 \text{ cells/g(wet)}$  のレベルを長期間にわたって維持していた。微生物散布による現場環境改善試験の結果、有機物分解量は  $1 \text{ m}^2$  1 日あたり、冬季で 26.4g、夏季で 81.1g となり、窒素除去量は底泥表層では  $1 \text{ m}^2$  1 日あたり冬季で 30.7mgN、夏季で 59.4mgN となり、微生物による有機物分解および窒素除去が確認され、環境改善効果が認められた。

脱窒細菌が周辺に生息する生物に及ぼす影響を検討するため、他種細菌・他種プランクトンとの共存条件下における挙動を調べた結果、Bacillus、Alteromonas、Gymnodinium mikimotoi、Skeletonema costatum および Heterosigma akashiwo などは脱窒細菌の共存下ではほとんど影響を受けていないように思われた。

1. はじめに

微生物は自然界において有機化合物の分解・無機化および無機化合物の酸化・還元に関与し、また微生物細胞そのものが他の生物の餌となって取り込まれるなど、それぞれの水域の物質循環に大きな役割を担っている。近年、微生物

あるいは生物の多様な機能を利用した環境の修復(バイオリメディエーション bioremediation)が注目されており、物理化学的手段のみでは解

---

\* 三重大学生物資源学部水産微生物学研究室  
\*\* 農学博士 三重大学生物資源学部助手  
\*\*\* 農学博士 三重大学生物資源学部教授

決が困難な環境の修復・改善に有効な手段として考えられるような情勢となっている<sup>1,2)</sup>。

わが国の海洋環境では、生物機能を利用した環境改善の研究は開始されたばかりであり、アナオサによるN、Pの吸収除去<sup>3)</sup>、イトゴカイによる汚泥浄化<sup>4,5)</sup>、細菌性浄化剤による底質改善<sup>6,7)</sup>などの報告がある。これまでの細菌性浄化剤の場合、有機物の分解除去がその主作用であるため、底泥から溶出した無機態N、Pが水中で富栄養化の原因物質となり、根本的な解決にいたっていない。しかしながら、微生物の機能を利用した環境改善・修復は、微生物が本来、自然界で担ってきた役割を人為的に強化・促進させるものである。そのためには、環境修復微生物の選別、機能特性・機能発現維持条件の解明、修復機能の増強などが重要であり、環境にやさしくかつ調和した方法で水質・底質の浄化あるいは環境の修復・改善が可能と考えられ、微生物利用技術は、今後ますます重要になってくるものと思われる。

これまでに、細菌の機能を水質浄化に開発・利用するため、さまざまな環境から低窒素同化細菌の分離を試み、代表菌について生育特性を明らかにした<sup>8)</sup>。さらに、脱窒能を有する低窒素同化細菌の機能をバイオリクターとして利用するため、低窒素同化細菌を固定化してその特性を明らかにするとともに、環境からの窒素の完全除去に有効な方策を探り、応用への基礎的知見を得た<sup>9)</sup>。

本研究は有機物で汚染され、生産性の低下した水域環境から有機物の分解除去および窒素除去に有効な微生物機能利用策を探り、応用への基礎的知見を得るために実施した。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用培地

PYN 液体培地：ポリペプトン 5g, 酵母エキス 3g, 90%海水あるいは水道水 1,000mL, pH 7.0。

PYN 寒天培地：PYN 液体培地に 1.5% (終濃度)の寒天を添加したもの。

硝酸還元・脱窒液体培地：ポリペプトン 5g,

酵母エキス 2g, KNO<sub>3</sub> 1g, 人工海水または蒸留水 1,000 mL, pH 7.0。

アンモニア酸化細菌培地：硫酸アンモニウム 30mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mg, EDTA-Fe 6mg, CaCO<sub>3</sub> 少量, 人工海水または蒸留水 1,000mL, pH 7.0。

SWM-III液体培地：NaNO<sub>3</sub> 2mmol, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1mmol, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 0.2mmol, NaSeO<sub>3</sub> 10 μmol, FeCl<sub>3</sub> 2 μmol, Na<sub>2</sub>EDTA 30 μmol, TRIS 500mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1mmol, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 35 μmol, ZnCl<sub>2</sub> 4 μmol, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 μmol, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01 μmol, ビタミンB<sub>1</sub> 塩酸塩 0.5mg, パントテン酸カルシウム 0.1mg, ニコチン酸 0.1mg, p-アミノ安息酸 10 μg, ビオチン 1 μg, イノシトール 5mg, 葉酸 2 μg, チミン 3mg, ビタミンB<sub>12</sub> 1 μg, 海水 1,000 mL, pH 7.5。

### 2.2 硝酸還元・脱窒能およびアンモニア酸化能の判定

硝酸還元・脱窒液体培地 5mLを添加した小試験管に分離菌株の一白金耳を接種後、25~30にて2週間培養した。ダーラム管中にガスの蓄積が認められたものを脱窒能陽性と判定した。硝酸還元能は、GR 試薬と Zn 粉末を使用し、培地中の硝酸塩の消失あるいは亜硝酸塩の生成が認められたものを陽性と判定した。

一方、アンモニア酸化細菌培地 10ml を添加した試験管に試料を接種後、25~30にて6週間培養した。アンモニア酸化能は、GR 試薬と Zn 粉末を使用し、培地中に亜硝酸塩あるいは硝酸塩の生成が認められたものを陽性と判定した。

### 2.3 脱窒細菌 C8-2 株の培養と細胞懸濁液の調製

硝酸還元・脱窒液体培地で振盪培養した 12 時間目の細胞を 7,000rpmで 15分間の遠心分離により集菌し、滅菌人工海水に懸濁して洗浄し、再び遠心分離で集菌した。この洗浄操作を 2 回行い、集菌して得られた細胞に20 μM KNO<sub>3</sub> 含有人工海水を少量加え、濃厚細胞懸濁液を作製

した。

#### 2.4 脱窒細菌 C8-2 株細胞による脱窒活性に及ぼす温度の影響

脱窒細菌 C8-2 株細胞による脱窒活性に及ぼす温度の影響を調べるため、あらかじめ 10、20、30 に保温した 20  $\mu$ M  $\text{KNO}_3$  含有人工海水 500mL に濃厚細胞懸濁液を加えて、 $\text{OD}_{580}$  が 0.5 (細胞数約  $10^8$  cells/mL) になるように調製した。調製した細胞懸濁液を各温度に予温した 100mL 密栓ビンに加えて各温度にて反応させた。一定時間毎に、上澄液中に残存している硝酸塩・亜硝酸塩量を測定した。活性は最大活性を示した温度における値を 100 としたときの相対値にて表示した。

#### 2.5 脱窒細菌 C8-2 株細胞による脱窒活性に及ぼす硝酸塩濃度の影響

脱窒細菌 C8-2 株細胞による脱窒活性に及ぼす硝酸塩濃度の影響を調べるため、 $\text{KNO}_3$  濃度がそれぞれ 5、10、20、40、80 および 200  $\mu$ mol/L の人工海水に、細胞数が  $10^7$  cells/mL となるように懸濁した。それぞれの細胞懸濁液を 100 mL 密栓ビンに加えて 30 にて反応させた。一定時間毎に、上澄液中に残存している硝酸塩・亜硝酸塩量を測定した。

#### 2.6 脱窒細菌 C8-2 株細胞付着担体の調製

脱窒細菌 C8-2 株を環境改善に利用するため、細菌付着担体を調製した。振盪培養した脱窒細菌を遠心分離機にて集菌し、滅菌海水で 2 回洗浄操作を繰り返した後、得られた洗浄細胞の湿重量を測定した。一定重量の細胞を一定量の滅菌海水に懸濁させて濃厚細胞懸濁液を調製した。乾燥状態の担体(多孔性焼成珪藻土)の一定量に濃厚細胞懸濁液を添加すると、多孔内部に細胞懸濁液が吸収されるとともに細胞が担体内部に移送されるようになる。孔内部にある程度懸濁液が充満すると、担体表面に細胞が付着するようになる。担体に保持させる細胞濃度は、調製時に添加する濃厚細胞懸濁液の量あるいは濃度により調整した。

#### 2.6 小型モデル系における脱窒ポテンシャル

内湾の現場底泥に脱窒細菌 C8-2 株を散布して底質改善の可能性を探るため、小型モデル系を設定した。内湾より採取した底泥を 1mm メッシュの篩で処理した後、得られたスラリー状の泥 30g (湿重量) を 300mL 密栓ビンの底に入れた。つぎに、脱窒細菌を付着させた担体 5g を滅菌ピンセットにて泥スラリー中に添加し、90  $\mu$ mol/L の  $\text{KNO}_3$  を負荷させた内湾海水を静かにビンの口まで加え、空気が入らないように密栓して 20 にて反応させた。一定時間毎に密栓ビン中に残存する硝酸塩・亜硝酸塩の合計量を測定した。

#### 2.7 微生物付着担体中の有用微生物の維持

内湾などの水域の底泥に微生物を投与した場合、微生物の活動を有効に長期的に保持させるためには、微生物群を散逸させることなく担体に付着させた状態が必要である。このため、担体として多孔性焼成珪藻土を用い、これに脱窒細菌などの有用微生物を付着させ、底泥中に散布して有用微生物がどの程度担体に保持されているかを調べた。すなわち、現場内湾海底に散布した微生物付着担体を定期的に現場より回収し、担体中に残存している脱窒細菌などの有用細菌数を MPN 法で計数した。

#### 2.8 脱窒細菌と他種細菌との共存条件下における挙動

98mL の滅菌海水を入れたマイヤーフラスコに、終濃度が  $10^5$  cells/mL あるいは  $10^6$  cells/mL となるように脱窒細菌 C8-2 株細胞懸濁液 1mL を添加し、現場内湾底泥から分離した *Bacillus* 株あるいは *Alteromonas* 株の細胞懸濁液 1mL を添加した。混合懸濁液を 20 にて静置し、一定期間毎に混合懸濁液中のそれぞれの細菌数を PYN 寒天平板培地によるコロニー計数法にて計数した。

#### 2.9 脱窒細菌と赤潮プランクトンとの共存条件下における挙動

脱窒細菌を現場水域に散布した場合、周辺環

境に生息する植物プランクトンに対する影響を評価するための基礎的な試みを実施した。植物プランクトンの無菌株は研究室にて保有している赤潮プランクトンを使用した。PYN 液体培地で 24時間培養した脱窒細菌を滅菌海水で洗浄後、終濃度が  $10^5$  cells/mL,  $10^7$  cells/mL および  $10^8$  cells/mL となるように調製した。

SWM-III 培地で培養した植物プランクトンとして *Gymnodinium mikimotoi*, *Heterosigma akashiwo*, *Skeletonema costatum* の培養液 3 mL に脱窒細菌の細胞懸濁液 1 mL を添加し、照射条件で 20 にて静置培養した。混合培養開始日からプランクトン生育量をターナー蛍光光度計にて測定した。脱窒細菌細胞懸濁液無添加のものをコントロールとして、同様の実験を行った。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 脱窒細菌 C8-2 株の分類学的性質

脱窒細菌は海洋環境の海水および海底泥中にかなり普遍的に分布していることが知られている<sup>10,11)</sup>。海洋環境において、*Pseudomonas* に属する菌株がもっとも多く、海洋における窒素循環に重要な役割を果していると考えられている。内湾から分離した脱窒細菌 C8-2 株は海水および淡水環境でも生育可能で、脱窒能の高い菌株である。本菌株はグラム陰性の端在性鞭毛を有する桿菌であり、グルコースを発酵することができない。

本菌株はタンパク質・デンプンなどの分解能

が陽性で、強い硝酸塩還元能・脱窒能を有し、DNA の GC 含量は 59.0 mol % であり、*Pseudomonas* に属するものと考えられた (表 1)。

#### 3.2 脱窒細菌 C8-2 株による窒素除去

富栄養化した内湾底泥から窒素成分を除去することにより環境修復を試みるため、脱窒細菌 C8-2 株細胞の脱窒能を基質無添加の条件で検討した。内湾底泥付近の温度を 10~30 と想定して脱窒活性に及ぼす温度の影響を調べた結果、C8-2 株の脱窒能は 30 付近で最大となり、20 でもかなりの活性がみられた (図 1)。また、10 でも 20 のときの値の約 13% の活性が残存していた。したがって、冬季の低温期においても脱窒を行なう潜在能力を有しているものと考えられた。

脱窒細菌 C8-2 株による脱窒速度を種々の硝酸塩濃度もとで測定した結果、30 における最大脱窒速度  $V_{max}$  は  $3.74 \mu\text{mol/L/hr}$ 、硝酸塩に対する  $K_m$  値は  $40.0 \mu\text{mol/L}$  であった (表 2)。100 mL の密栓ビン中では  $10^9$  細胞の脱窒細菌が存在し、エネルギー 源無添加の場合、1 日で約  $125 \mu\text{g}$  の窒素を除去するポテンシャルを有していることになる。内湾底泥中にはエネルギー源となる有機物がかなり存在しているので、これよりも多い量の窒素除去が期待されることになる。

#### 3.3 小型モデル系における脱窒ポテンシャル 現場底泥に脱窒細菌 C8-2 株を散布するため

表 1 脱窒細菌 C8-2 の分類学的性質

形状	桿菌	硝酸塩還元能	+
グラム染色	-	脱窒能	+
鞭毛	端在性	デンプン分解能	+
胞子	-	カゼイン分解能	+
グルコース発酵性 (Hugh & Leifson)	-	ゼラチン分解能	+
オキシダーゼ	+	DNA 分解能	+
色素生産性	-	リンゴ酸利用能	+
		DNA の GC 含量	59.0 mol %

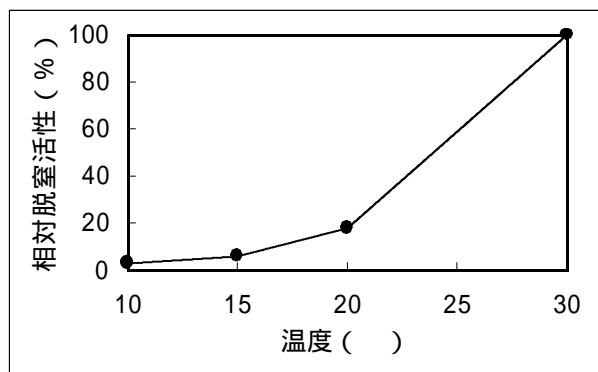


図1 脱窒細菌C8-2株の脱窒活性に及ぼす温度の影響

表2 脱窒細菌C8-2株の脱窒速度に及ぼす硝酸塩濃度の影響

KNO <sub>3</sub> 濃度 S (μmol/L)	1/S	脱窒速度V (μmol/L/hr)	1/V	
5.5	0.1818	0.447	2.237	
10.2	0.0980	0.768	1.302	V <sub>max</sub> 3.74 μmol/hr
20.9	0.0478	1.373	0.728	
41.4	0.0242	2.087	0.479	K <sub>m</sub> 40.0 μmol/L
83.0	0.0120	2.427	0.412	
221.9	0.0045	2.600	0.385	

30 , 細胞濃度 10<sup>7</sup>cells/mL

の現場小型モデル系を設定し、底泥のみの場合と担体に付着させたC8-2株を底泥に添加した場合の脱窒ポテンシャルを比較した。その結果、現場底泥中には脱窒細菌がかなり存在していたため、泥のみのコントロールでも0.419 μmol/L/hr程度の脱窒ポテンシャルを有していたが、C8-2株の添加により脱窒ポテンシャルの増強が認められた。脱窒ポテンシャルはC8-2株が10<sup>5</sup>cells/mLのレベルの場合、泥コントロールの2倍に、10<sup>7</sup>cells/mLのレベルの場合、泥コントロールの約3倍となった(表3)。このことはNO<sub>3</sub><sup>-</sup>が充分であれば、窒素除去能が脱窒細菌数に依存することを示しており、底泥環境における脱窒細菌の高レベル維持が重要であるものと思われる。

表3 小型モデル系における脱窒ポテンシャル

	脱窒ポテンシャル (μmol/L/hr)
コントロール(底泥のみ)	0.419
底泥 + C8-2株細胞 10 <sup>5</sup> cells/mL	0.992
底泥 + C8-2株細胞 10 <sup>7</sup> cells/mL	1.252

20 , KNO<sub>3</sub>濃度 90 μmol/L

### 3.4 環境修復のための有用微生物系の構築

有機物で汚染された水域の生物環境を微生物により改善するため、脱窒細菌を中心とした窒素ガス化による窒素除去のための微生物系の構築を試みた。窒素除去のためには、汚染有機物の分解・無機化によって生じたアンモニアを酸化させ、さらに生成した亜硝酸塩・硝酸塩をガ

ス化(脱窒)することが必要となる。脱窒細菌は好気的環境では、分子状酸素を利用して有機物を分解・無機化するが、嫌気的環境では、硝酸塩・亜硝酸塩を利用して有機物を酸化分解する従属栄養細菌であり、有機物分解機能と脱窒機能を併せもっている。アンモニア酸化能を有する硝酸化成細菌は  $\text{NH}_4^+$  を分子状酸素により酸化して生育のためのエネルギーを獲得している独立栄養細菌であり、自然界における窒素循環に重要な役割を果たしている。水域におけるアンモニア酸化細菌は純粋分離操作そのものも容易ではない。そのため、水域から採取したアンモニア酸化能の強い試料を循環濾過式飼育水槽にて維持し、濾過砂上に付着した微生物群をアンモニア酸化細菌源とした。また、脱窒細菌は水域から分離・選別した有能菌株を大量培養した。

図2は担体に付着させた有用微生物系を模式的に示したものである。担体として珪藻土を  $1,000^\circ\text{C}$  以上で焼成した多孔性の粒子を用い、粒子の内部および表面に脱窒細菌を付着させた。つぎに、粒子表面にアンモニア酸化細菌を含む濾過砂表面微生物群集を付着させた。粒子表面で脱窒細菌とアンモニア酸化細菌が好気的に活動し、汚濁有機物を分解・酸化して  $\text{NH}_4^+$  を経て  $\text{NO}_2^-$  にまで変換させる。 $\text{NO}_2^-$  は孔の内部に拡散して、嫌気的条件下で脱窒細菌により窒素ガスにまで変換され、系外に放出されることになる。また、底泥環境は酸素不足・嫌気的になりやすく、酸素を必要とする反応すなわち  $\text{NO}_2^-$  の供給が窒素除去微生物反応系の制限因子となるので、粒子表面に酸素供給者として微細藻類の付着も考えられる。一方、嫌気的条件下で  $\text{NO}_3^-$  が存在すれば、 $\text{NH}_4^+$  を酸化しうるアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas* の存在が知られている<sup>12,13,14)</sup>。アンモニア酸化細菌の場合、独立栄養で電子受容体として分子状酸素の存在が必須である。しかし、電子受容体として硝酸が存在すればアンモニアを独立栄養的に酸化してエネルギーを獲得することができるという新規のエネルギー代謝の存在である。海底泥では酸素の供給が微生物機能を利用した環境改善の制

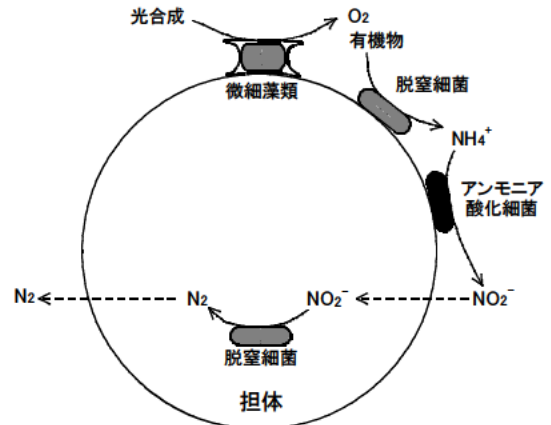


図2 担体付着微生物群集による窒素の除去

限因子となっており、海底泥表層では底層水からの酸素の供給が可能で、これらの浄化機能が期待できる。しかし、嫌気的な海底泥層下部では、酸素の供給を期待することが困難であり、むしろアンモニア酸化細菌の嫌気的代謝を活用した方がよいのかもしれない。

### 3.5 微生物付着担体中の有用微生物の維持および活性

微生物付着担体を1月中旬と7月上旬の2回内湾海底に散布した。担体中の脱窒細菌は  $10^4 \sim 10^6 \text{ cells/g (wet)}$  のレベルを長期間にわたって維持していた(表4)。一方、アンモニア酸化細菌は  $10^2 \sim 10^4 \text{ cells/g (wet)}$  のレベルで推移していたが、とくに夏季散布の場合、細菌数が変動し、かなりのアンモニア酸化細菌が周辺泥中に脱落したと思われる。今後、アンモニア酸化細菌の安定維持を計ることが必要であろう。

現場環境改善のために構築した微生物系を用いて試験した結果、有機物分解量は  $1 \text{ m}^2$  1日あたり、冬で  $26.4 \text{ g}$ 、夏季で  $81.1 \text{ g}$  となり、窒素除去量は底泥表層では  $1 \text{ m}^2$  1日あたり冬季で  $30.7 \text{ mgN}$ 、夏季で  $59.4 \text{ mgN}$  となり、微生物による有機物分解および窒素除去が確認され、環境改善効果が認められた(表5)。このことは、冬季でも夏季の約半分の窒素除去が期待できることを示している。



表4 内湾海底泥上に散布した担体付着細菌数の変動

	散布後 回収週	脱窒細菌数 (cells/g)	アンモニア酸化細菌数 (cells/g)
冬季散布	0	$>2.4 \times 10^7$	$1.7 \times 10^3$
	2	$1.1 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$
	4	$2.6 \times 10^4$	$>2.4 \times 10^4$
	8	$1.1 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$
	12	$1.3 \times 10^4$	$>2.4 \times 10^4$
	20	$9.5 \times 10^5$	$>2.4 \times 10^4$
夏季散布	0	$3.3 \times 10^6$	$4.3 \times 10^3$
	2	$6.4 \times 10^5$	$4.7 \times 10^3$
	4	$1.8 \times 10^6$	$3.2 \times 10^3$
	8	$8.1 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$
	12	$1.8 \times 10^3$	$2.1 \times 10^2$
	20	$1.0 \times 10^4$	$2.8 \times 10^2$

冬季散布日：1月18日，夏季散布日：7月5日

表5 微生物系による底泥有機物分解および窒素除去

	冬季 (0~2週)	夏季 (0~2週)
全窒素除去速度 (mgN/m <sup>2</sup> /day) (底泥表層 0~3 cm)	30.7	59.4
有機物分解速度 (灼熱減量 g/m <sup>2</sup> /day) (底泥柱 0~21 cm)	26.4	81.1

### 3.6 脱窒細菌と他種細菌との共存条件下における挙動

図3に示したように，脱窒細菌は単独の場合も *Bacillus* と共存した場合でも初期菌数のレベルを維持していた。一方，*Bacillus* は単独の場合，初期菌数を維持することができず，1オーダー程度減少するが，その後ほぼ同レベルで推移した。この傾向は脱窒細菌と共存したときもほぼ同じであった。

脱窒細菌が *Alteromonas* と共存した場合，脱窒細菌は初期菌数を低下させることなく，やや微増傾向を示した。*Alteromonas* は  $10^5 \sim 10^6$  cells/mLの初期菌数から減少し  $10^4$  cells/mLのレベルで推移した(図4)。

初期添加細菌数の多少にかかわらず，最終的に *Bacillus* では  $10^5$  cells/mLのレベルに，*Alteromonas* では  $10^4$  cells/mLのレベルになって推移するようになるのは，それぞれの細菌に

よって安定的に細胞を維持しうる密度が存在するものと思われる。

### 3.7 脱窒細菌と赤潮プランクトンとの共存条件下における挙動

図5に示したように，*Gymnodinium mikimotoi* および *Skeletonema costatum* では，いずれの細胞濃度においても脱窒細菌を添加したときに，無添加のコントロールよりも高い生育量が見られた。また，*Heterosigma akashiwo* は混合培養4日目までは脱窒細菌添加によりやや生育が低いようであったが，6日目では  $10^8$  cells/mLの脱窒細菌添加混合培養でコントロールとほぼ同程度の生育が認められた。これらのことから，試験したいずれのプランクトンも脱窒細菌の共存下で生育にほとんど影響を受けていないように思われた。

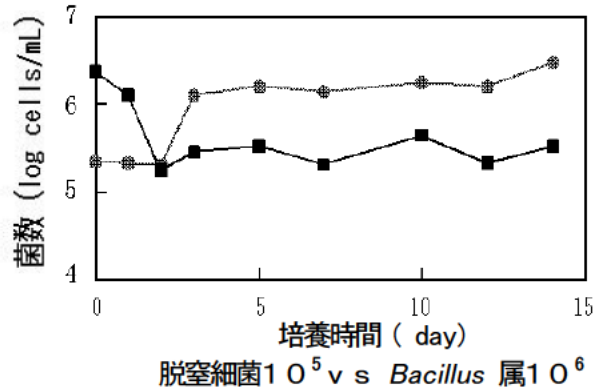
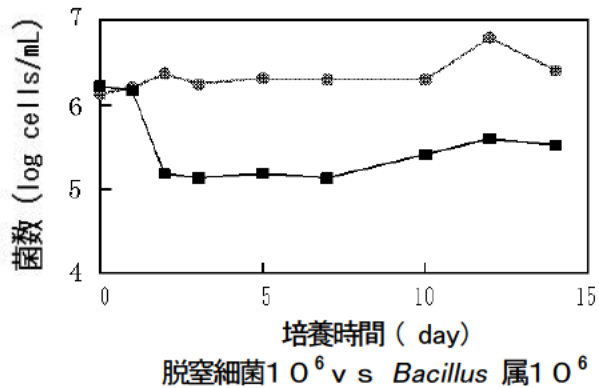
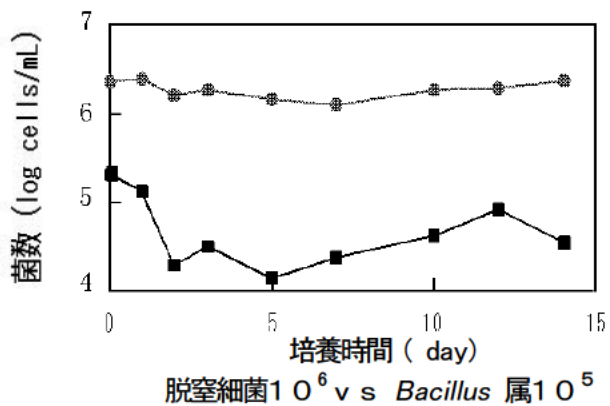
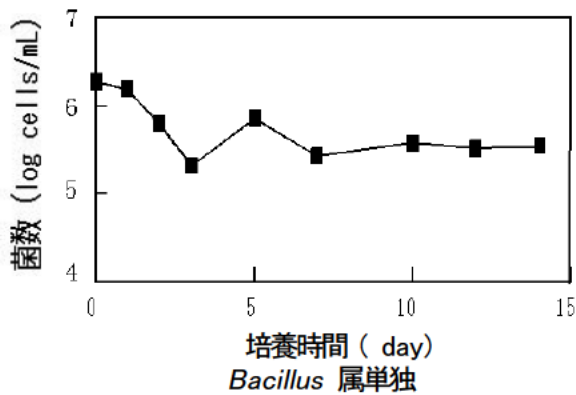
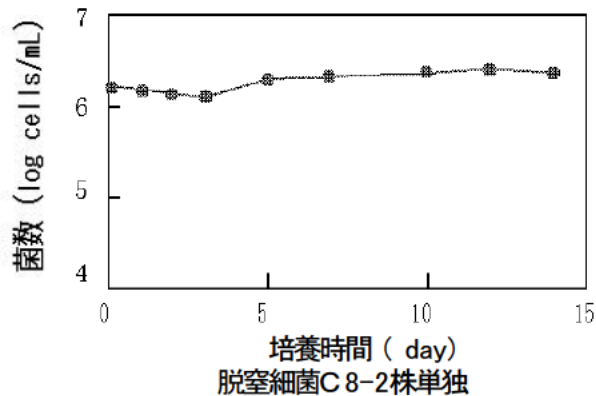


図3 脱窒細菌C8-2株の生残に及ぼす共存細菌 *Bacillus* 属の影響



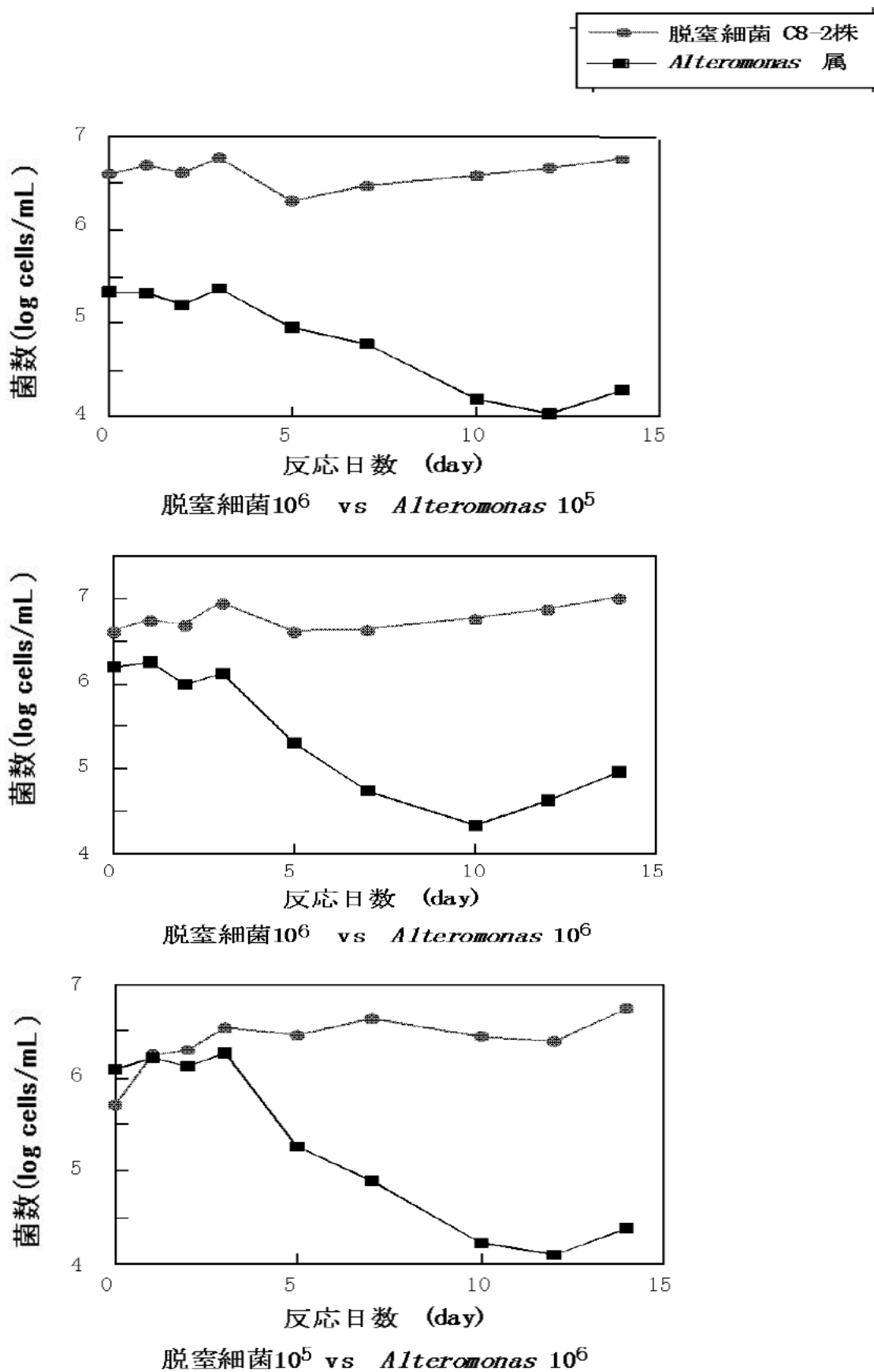


図4 脱室細菌C8-2株の生残に及ぼす共存細菌 *Alteromonas* 属の影響

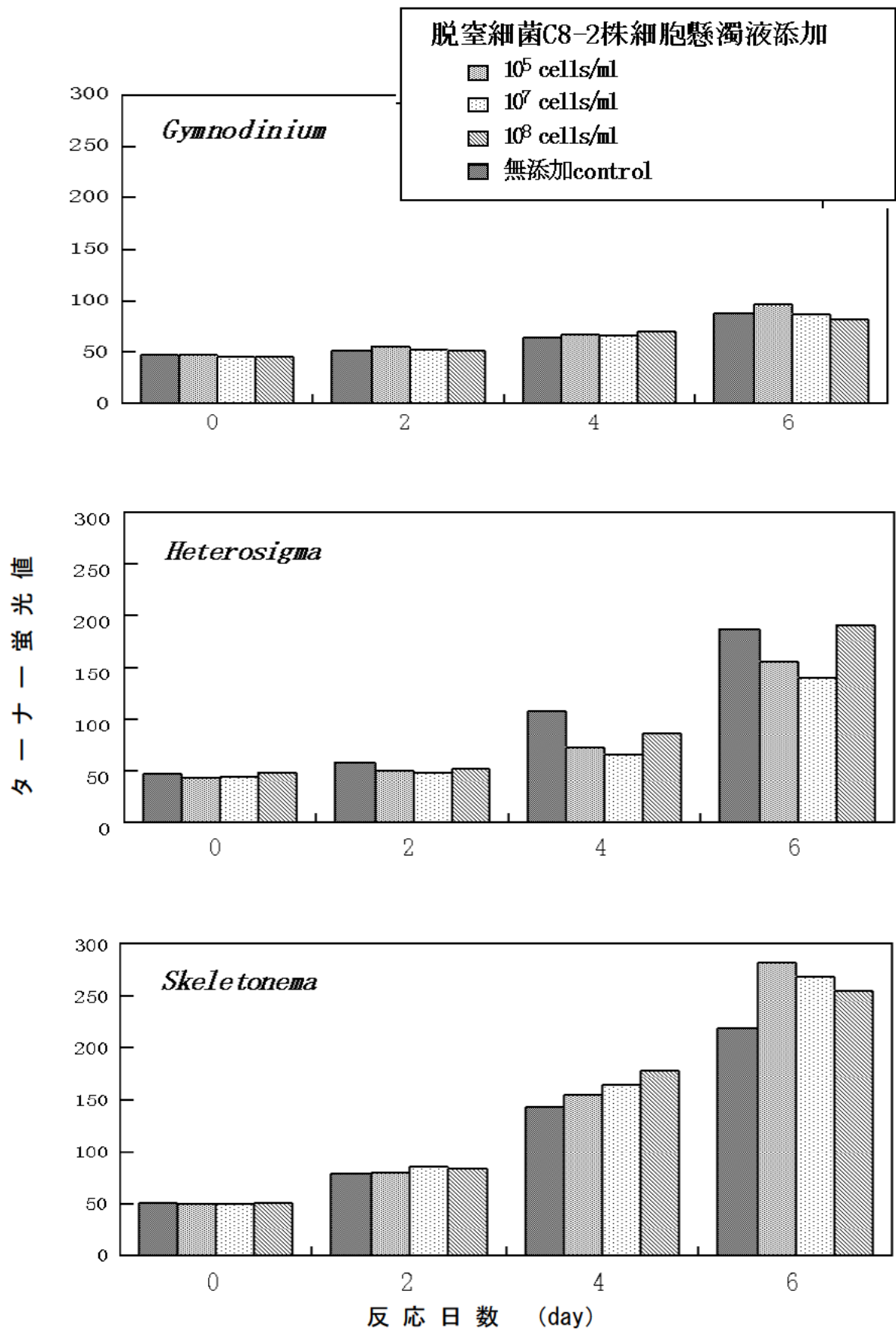


図5 脱室細菌C8-2株細胞懸濁液の植物プランクトン生育に及ぼす影響

#### 4.まとめ

微生物の機能を利用した水質浄化・環境改善をはかるため、脱窒細菌を中心とした有機物分解および窒素除去のための微生物系の構築を試みた。得られた結果は以下のとおりである。

1) 脱窒細菌 C8-2 株細胞の脱窒能は 30 付近で最大となり、20 でかなり活性が低下するが、10 でも 20 のときの約 13%の活性が残存していた。本菌株による脱窒速度を種々の硝酸塩濃度もとで測定した結果、30 における最大脱窒速度  $V_{max}$  は  $3.74 \mu\text{mol/L/hr}$ 、硝酸塩に対する  $K_m$  値は  $40.0 \mu\text{mol/L}$  であった。

2) 現場底泥に脱窒細菌 C8-2 株を散布するための現場小型モデル系を設定した。底泥の場合と C8-2 株付着担体を底泥に添加した場合の脱窒ポテンシャルを比較した結果、C8-2 株の添加により脱窒ポテンシャルの増強が認められた。脱窒ポテンシャルは C8-2 株が  $10^5$  cells/mL のレベルの場合、泥コントロールの 2 倍に、 $10^7$  cells/mL のレベルの場合、泥コントロールの約 3 倍となった。

3) 現場底泥に散布した担体中の脱窒細菌は  $10^4 \sim 10^6$  cells/g(wet) のレベルを長期間にわたって維持していた。一方、アンモニア酸化細菌は  $10^2 \sim 10^4$  cells/g(wet) のレベルを維持していたが、とくに夏季散布では菌数が変動し、かなりのアンモニア酸化細菌が周辺底泥中に脱落したと思われる。微生物を散布した海底泥における有機物分解量は  $1 \text{ m}^2$  1 日あたり、冬季で 26.4 g、夏季で 81.1 g となり、窒素除去量は底泥表層では  $1 \text{ m}^2$  1 日あたり冬季で 30.7 mgN、夏季で 59.4 mgN となり、微生物による有機物分解および窒素除去が確認され、環境改善効果が認められた。

4) 脱窒細菌が周辺に生息する生物に及ぼす影響を検討するため、他種細菌・他種プランクトンとの共存条件下における挙動を調べた。Bacillus, Alteromonas, Gymnodinium mikimotoi, Skeletonema costatum および Heterosigma akashiwo などは脱窒細菌の共存下ではほとんど影響を受けていないように思われた。

#### 参 考 文 献

- 1) 農林水産環境修復技術推進委員会編：生物機能を利用した農林水産環境修復技術に関する調査，農林水産技術情報協会，p.279,1995.
- 2) 菅原 庸：生物機能を使った内湾環境修復技術．農林水産技術研究ジャーナル，19(12)，20-24 (1996).
- 3) 平田八郎、山崎繁久、小平田栄一、中園貫幸、山内達也、松田宗之：環境調和型養殖システムの開発研究 - I . マダイ養殖生簀表層におけるアナアオサ変異種の栽培．平成 6 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，p.143(1994).
- 4) 堤 裕昭、門谷 茂：魚類養殖場直下に堆積したヘドロ(有機汚泥)のイトゴカイによる浄化の試み .日本水産学会誌 59,1343-1347 (1993).
- 5) 門谷 茂、堤 裕昭：ベントスによる漁場底泥の環境修復，生物機能による環境修復(石田祐三郎、日野明德編)，恒星社厚生閣，東京，p.65-78 (1996).
- 6) 西島敏隆、深見公雄、大山憲一、三好英夫：細菌性浄化剤による内湾の底質改善に関する研究．くろしお特別号，8，37-48 (1994).
- 7) 西島敏隆、深見公雄：微生物による漁場環境における環境修復．生物機能による環境修復(石田祐三郎、日野明德編)，恒星社厚生閣，東京，p.50-64 (1996).
- 8) 松岡行利、山川雅弘、柏 雅美、菅原 庸：微生物の機能を利用した水質浄化(第 1 報)低窒素同化細菌の生育特性．三重県環境科学センター研究報告，17，1-10 (1997).
- 9) 中谷純夫、松岡行利、山川雅弘、柏 雅美、木村俊夫、菅原 庸：微生物の機能を利用した水質浄化(第 2 報)固定化低窒素同化細菌による窒素除去 .三重県環境科学センター研究報告，18，1-8 (1998).
- 10) Sugahara, I., T. Kimura and K. Hayashi : Distribution and generic composition of denitrifying bacteria in coastal and oceanic waters, Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52, 497-503 (1986).
- 11) Sugahara, I., K. Hayashi and T. Kimura : Distribution and generic composition of

denitrifying bacteria in coastal and oceanic bottom sediments, Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 54, 1005-1010 (1988).

12) Bock, E., I. Schmidt, R. Stuvén and D. Zart: Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor, Arch. Microbiol., 163, 16-20 (1995).

13) Van De Graaf, A.A., A. Mulder, P. Bruun,

M.S.M. Jetten, L.A. Robertson and J.G. Kuenen: Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process, Appl. Environ. Microbiol., 61, 1246-1251 (1995).

14) Strous, M., E. Van Gerven, J.G. Kuenen and M. Jetten: Effects of aerobic and micro-aerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge, Appl. Environ. Microbiol., 63, 2446-2448 (1997).

### Bioremediation by Bacterial Functions - III.

Decomposition of Organic Substances and Nitrogen Removal by Microbial System Containing Denitrifying Bacteria and Ammonia-oxidizing Bacteria

Takao ICHIOKA, Eiji SARAI, Susumu KATO, Chiyo MINESAWA\*  
Toshio KIMURA\*\* and Isao SUGAHARA\*\*\*

An attempt to utilize useful marine microorganisms was carried out for improving polluted environment. Denitrifying activity of strain C8-2 cells was high at 30 °C, and the maximum denitrifying activity  $V_{max}$  was 3.74  $\mu\text{mol/L/hr}$ . The affinity for  $\text{NO}_3^-$  of denitrifying activity  $1/K_m$  was 40.0  $\mu\text{mol/L}$ .

Ceramic grains with high porosity (porous beads) were used as microbial carrier. Denitrifying bacteria were attached on and into the porous beads. Ammonia-oxidizing bacterial mixpopulation was also attached on the surface of the porous beads. The beads prepared were spread on the bottom mud of polluted closed bay on January and July.

The porous beads recovered from the bottom mud contained denitrifying bacteria and ammonia-oxidizing bacteria for a long time. The in situ eliminating activities of organic matter and nitrogen were high in summer. However, about 1/2 ~ 1/3 of the summer activities were observed in winter.

Existence of denitrifying bacteria seemed to have no remarkable influence on the survival of other bacteria (*Bacillus* and *Alteromonas*) and planktons (*Gymnodinium*, *Skeletonema* and *Heterosigma*) tested.

\* Marine Microbiology Lab., Faculty of Bioresources,

Mie University, Tsu, 514-0008 Japan

\*\* Assistant Professor, Marine Microbiology Lab., Faculty of Bioresources,

Mie University, Tsu, 514-8507 Japan

\*\*\* Professor, Marine Microbiology Lab., Faculty of Bioresources,

Mie University, Tsu, 514-8507 Japan