

竹粉を利用した排水処理材の開発（第2報）

溝添暁子*¹・里岡嘉宏*²・中田一則*¹

Development of Wastewater Treatment Materials using Bamboo Powders

Akiko MIZOZOE, Yoshihiro SATOOKA and Kazunori NAKATA

これまでの報告*において、竹粉の脱窒効果が微生物によるものであることを明らかにし、検出された微生物の遺伝子解析を行い、また、竹粉を利用した実証試験により養液排水の脱窒の有効性を報告した。しかし、その一方で竹粉は脱窒効果の再現性に課題があることがこれまでの試験で分かっている。そこで、本研究では脱窒効果の安定性を向上させるために、これまでに検出された微生物を選別してその菌株を凍結乾燥して、製剤化を行い、その脱窒効果を有することを明らかにした。

キーワード：脱窒，竹，微生物

1 はじめに

竹は、成長が早く資源として注目されているが、全国的に放置竹林、田畑への植害等が問題になっており、県内にも竹林が多数存在することからその有効利用が求められている。一方、農業において使用される肥料の成分の一つである硝酸態窒素が農業系外に排出され、環境に負荷を与えていることから硝酸態窒素低減化の必要性が高まっている。

本研究では、県内未利用資源である竹資源を活用し、より安価で効率の良い硝酸除去（脱窒）効果の高い排水処理材等を開発することを目的に、これまでに選別した菌株を利用して凍結乾燥させ、その効果を確認したのでそれを報告する。

2 実験方法

2-1 竹粉試料

当県林業技術センターにて、伐採、破碎処理し、さらに県総合農業試験場において、乾燥されたものを竹粉試料とした。伐採後の乾燥時間、破碎処理法、竹粉乾燥時間は、毎回一定条件のもと行った。

2-2 脱窒菌の凍結乾燥

2-2-1 菌株の選別

前々報において分離した菌株をさらに詳細に調査し、硝酸及び亜硝酸の分解能について優れた菌株を選別し、これらを組合せた菌株を用いて、硝酸及び亜硝酸の分解試験をそれぞれ行い、脱窒能を比較した。すなわち、液体培地において培養した組合せた菌群を硝酸カリウム溶液（1,000 mg/l）100 ml に2 ml 添加し、経時的にイオンクロマトグラフ（ダイオネクス社製：DX-500）で硝酸イオンおよび亜硝酸イオン濃度を測定した。培養は30℃で行った。この結果より硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの分解能が高い菌株を凍結乾燥用菌とした。

2-2-2 凍結乾燥

選別した凍結乾燥用菌の液体培養を、1/2NB 培地（Beef Extract 1.5 g, Peptone 2.5 g）にて行った。培養後、6 L の液体培地を約 500 ml ずつ遠心分離を行い、上澄みを廃棄して、残りを合わせ、さらにその行程を繰り返すことにより濃縮された菌培養液を得ることができた。濃縮菌培養液をナス型フラスコに分注し、予備凍結後、凍結乾燥（東京理化工器械 FDU-2100）を行った。

2-3 凍結乾燥品による確認試験

2-3-1 凍結乾燥品による硝酸分解試験

2-3にて作製した凍結乾燥品を0.03 g 秤量し、10 ml の生理食塩水に溶かし、試料菌液とした。1/2NB 培

* 竹粉を利用した排水処理材の開発

*1 資源環境部

*2 資源環境部（現 宮崎県産業支援財団）

地を基に 1000 ppm の硝酸カリウム溶液を調製し、その 100 ml に試料菌液 2 ml 添加した。培養は 30°C で行い、経時的に硝酸イオン及び亜硝酸イオンをイオンクロマトグラフにて測定した。

2-3-2 竹粉処理への添加

脱窒能の低い竹粉を 1 g、硝酸カリウム溶液 100 ml に添加した後、2-3-1 と同様に硝酸分解試験を行った。

2-3-3 PCR-DGGE 法による菌叢比較

2-3-1 及び 2-3-2 で経時的に採取した試料において、タカラバイオ社製 DNA 抽出キットにて、DNA 抽出を行った。それを鋳型として Primer 5F, 531R を用いて PCR により遺伝子断片の増幅を行い、得られた PCR 産物を DGGE 試料とした。アクリルアミド濃度は 8 %、変性剤濃度 40~70 % (変性剤 100 % は 7 M 尿素, 40 % ホルムアミドに相当) に調製した。PCR-DGGE には、D CODE SYSTEM (Bio Rad 社) を用い、泳動条件は、電圧 120 V、泳動槽温度 60 °C、泳動用緩衝液 1×TAE で 2 時間半行い、菌叢の経時的变化を調査した。

3 結果及び考察

3-1 菌株の選別及び凍結乾燥

前々報より選別した菌株を表 1 に示す。

表 1 選別菌及びそのシーケンス結果

菌株	シーケンス結果
A22	<i>Achromobacter sp.</i>
A24	<i>Klebsiella sp.</i>
A25	<i>Klebsiella sp.</i>
A37	<i>Klebsiella sp.</i>
B24	<i>Klebsiella sp.</i>
B38	<i>Ochrobacterium sp.</i>
C23	<i>Ochrobacterium sp.</i>
D19	—
E7	<i>Bacillus sp.</i>
E18	<i>Microbacterium sp.</i>
E21	—
E30	<i>Bacillus sp.</i>
E35	<i>Enterobacter sp.</i>

これらの菌をいくつかの組合せ、硝酸分解試験を行った結果、分解速度の速い菌株の組合せが得られた。この組合せは、B24 と B38 であり、他の組合せより分解速度に有意性が見られた。この得られた菌株を凍結乾燥用菌として、液体培養後、凍結乾燥を行った。

3-2 凍結乾燥品による硝酸分解試験結果

凍結乾燥品による硝酸分解試験結果を図 1 に、凍結乾燥品と竹粉による処理試験結果を図 2 に示す。

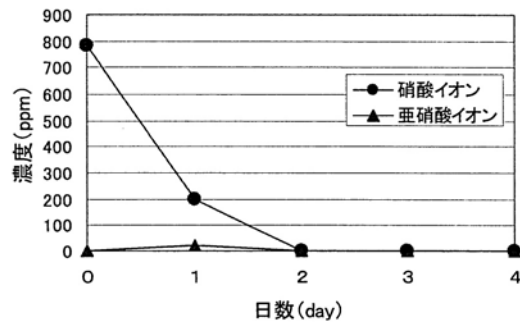


図 1 凍結乾燥品による硝酸分解試験結果

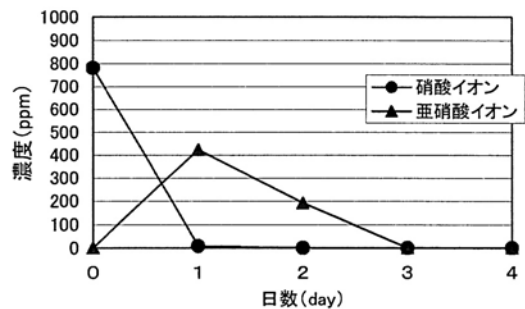


図 2 凍結乾燥品と竹粉による硝酸分解試験結果

凍結乾燥品による硝酸分解試験においては、亜硝酸イオンがほとんど発生することなく、硝酸イオン、亜硝酸イオンともに 2 日でほぼ分解した。また、凍結乾燥品と竹粉で処理した結果、硝酸イオンは 1 日でほぼ分解し、亜硝酸イオンは発生した後、3 日でほぼ分解した。

3-3 PCR-DGGE 法による菌叢比較

3-2 で行った試験における PCR-DGGE 法による菌叢比較を図 3 に示す。図 3 の左半分は、図 1 の菌叢を、右半分は図 2 を表している。なお、図上部の A, B は 3-2 の図 1, 2 に、番号は試験開始日からの処理期間日に対応している。

A の下部において楕円で囲んだ2箇所横のバンドが見られる。このバンドは、初日 (A-①) から5日目 (A-⑤) に至るまで変わることなく、これは、菌叢が凍結乾燥品に含まれる2菌株より成っていることを示している。Bにおいては、初日 (B-①) は、Aと同じく2つのバンドが見られるが、2日目以降 (B-②) は、大きな楕円で囲んだところに雑多な菌のバンドが見られる。このバンド類は竹粉に付着した菌と考えられ、処理期間が進むにつれ、凍結乾燥品の2菌のうち1菌が弱くなり、さらに下部に菌のバンドの発生と消滅、上部に新たなバンドが発生が認められ、菌叢が落ち着いていくのが分かる。図2から明らかのように亜硝酸イオンが生成して3日後にはほぼ分解するのに伴い、図3-Bでは凍結乾燥品の菌が弱くなり、上部の竹粉に付着した菌のバンドが強くなっていることから、亜硝酸分解は、これらの菌により行われていると推測された。

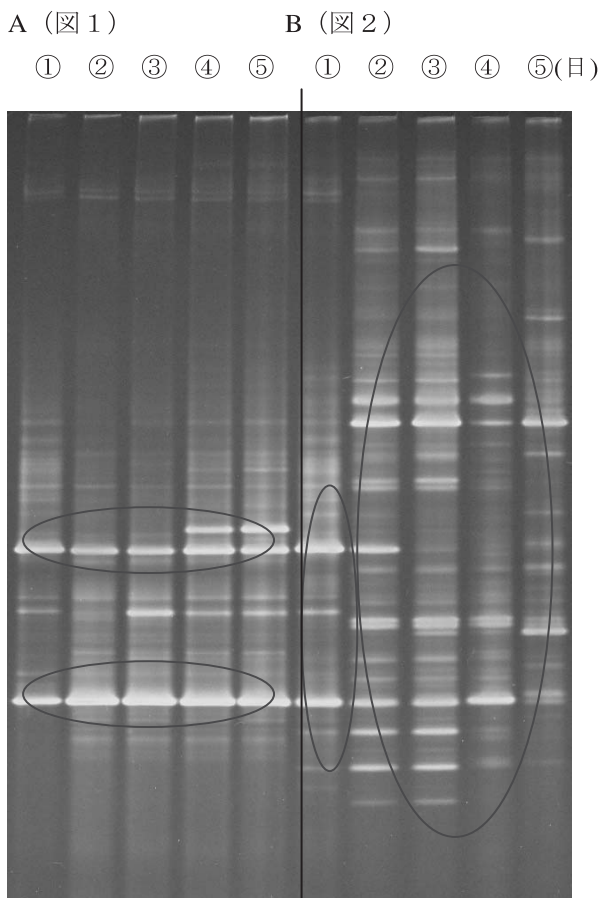


図3 PCR-DGGE法による菌叢の比較

これまでの調査により、養液排水処理の初期における菌叢の起ち上げにおいては、硝酸・亜硝酸がほぼ完全に分解するまでに4~5日かかることが確認されている。その初期段階に凍結乾燥品を投入することにより、初期の硝酸・亜硝酸解に大きく寄与できるのではないかと考えられた。しかし、一方で菌株の一部が減少していることについては、菌叢中の菌の競合によるものと推測されることから、凍結乾燥菌株の生息条件についてより詳細に設定する必要があると考えられた。

4 まとめ

選別した菌株の凍結乾燥を行い、その脱窒能を調査した結果、次のことが明らかになった。

- (1) これまでに得られた10菌株を組み合わせた結果、そのうちの2菌を組み合わせることにより、より分解速度の速い菌群を得ることができた。
- (2) 凍結乾燥品を用いて硝酸分解試験を行った結果、硝酸イオンは1日で、亜硝酸イオンはほとんど発生せずに2日でほぼ分解した。
- (3) 凍結乾燥品と竹粉により硝酸除去試験を行った結果、凍結乾燥品のみと比較して、硝酸イオン分解の速度は高くなったが、亜硝酸イオンについては、3日後にはほぼ消失した。
- (4) 凍結乾燥品、凍結乾燥品及び竹粉による硝酸除去試験の遺伝子解析をPCR-DGGE法で行った結果、竹粉を添加したものについては、凍結乾燥品由来の菌の減少が確認される一方で、竹粉由来の雑多な菌のバンドが確認され、さらには亜硝酸分解に関与すると思われるバンドが確認された。

5 参考文献

- 1) 溝添暁子, 竹田智和, 里岡嘉宏, 西原基樹, 中田一則: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 51, 3-7 (2006)
- 2) 溝添暁子, 里岡嘉宏, 甲斐由美, 中田一則: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 52, 3-5 (2007)
- 3) 溝添暁子, 里岡嘉宏, 地頭所真美子, 中田一則: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 53, 5-8 (2008)