った。また、この相互作用は、第四級アンモニウム塩を添加することによって抑制されることから、強い静電的相互作用が働いていることは、予想されない。

おわりに、本研究について、種々ご検討をいただきました、大阪府立大学工学部黒木宣彦教授ならびに片山明助教授に感謝申し上げます。

文 献

- 1) P. Mukerjee, A.K. Ghosh; *J. Phys. Chem.*, **67**, 193(1963)
K.K. Rohatgi, G.S. Singhal; *J. Phys. Chem.*, **70**, 1695(1966)
- 2) 矢留智津子, 小川利彦, 高瀬福巳, 織学誌, **27**, 525(1971)
- 3) 矢留智津子, 高瀬福巳, 片山 明, 黒木宣彦, 小西謙三, 織学誌, **24**, 127(1968), 矢留智津子, 小川利彦, 高瀬福巳, 織学誌, **27**, 533(1971), **29**, 556(1973)
- 4) 山木 清, 工化, **65**, 1861(1962)
- 5) R.L. Kay, T. Vituccio, C. Zawayski, D.F. Evans; *J. Phys. Chem.*, **70**, 2336(1966)
矢留智津子, 高瀬福巳, 織学誌, **30**, 30(1974)
- 6) R.L. Kay, D.F. Evans; *J. Phys. Chem.*, **70**, 2325(1966)
- 7) 片山 明, 石素 鈴, 黒木宣彦, 第12回染色化学討論会要旨集, p.12(1970)

(昭和49年5月17日受理)

活性汚泥微生物による塩基性染料の処理*

岐阜大学工学部 小川利彦・井高英一
山田芳郎

TREATMENTS OF BASIC DYES BY MICROBIAL POPULATIONS IN ACTIVATED SLUDGE*

By Toshihiko Ogawa, Eiichi Idaka and Yoshiro Yamada

(Faculty of Engineering, Gifu University,
Kagamigahara City, Gifu Prefecture, Japan)

To elucidate the culture conditions and the inhibitive mechanism in the biological treatments of basic dyes, the dye concentration, cell concentration and the uptake of oxygen in media were measured in the course of cultures on a reciprocating shaker. The cultures were performed at 30°C by the use of media prepared from peptone, meat extract, glucose and mineral salts. In order to treat effectively the dye solution of about 20 ppm, it was necessary to use media, that were the concentration of 100 times of the BOD in the usual sewerage and were adjusted to pH 7.5. Basic Violet 1 owing to the high bioflocculation despite the strong toxicity power induced the decrease ratio of 90% by the culture for 24 hours, while Basic Orange 22 did only about 10% owing to the low bioflocculation despite the weak toxicity power. This difference of the biofloculations led Basic Violet 1 and Basic Orange 22 respectively to non- and unantagonistic inhibition. By the repeated inoculations in media of the same composition containing a certain dye, lag phases of the growth curves of the microbes became shorter to result from the acclimatization of microbes to the media. When the microbes acclimated to Basic Violet 1 were inoculated to the medium containing the other dye, acclimatization of the microbes was maintained for the basic dyes of a homologous series with Basic Violet 1 that was a triphenylmethane derivatives, but not for the basic dyes of the other series, the acid dyes and the direct dyes.

(Received May 17, 1974)

*この報文を「色素類の生物化学的性質に関する研究(第2報), Studies on the biochemical behaviors of the colouring matters(II)」とする。

1. 緒 言

染色廃水の処理には各種の方法があるが、現状では都市下水に放流または工場内での生物処理によるものが多い¹⁾。しかし、染料は一般に微生物に対する毒性作用を有し²⁾、菌の増殖を阻害する。また染料除去率も必ずしも高いと云えない³⁾。そこで、この処理における浄化機能を高めることが重要な課題となるが、そのためには、生物処理における培養条件と染料の特性を明らかにする必要がある。吾々はさきに酸性染料の生物処理について報告した³⁾。本報では数種の塩基性染料について培養条件、酸素吸収阻害および菌の馴養性について検討した。その結果、染料のうちでも特に殺菌力の強いトリフェニルメタン系染料においても、充分に高い栄養培地中では90%以上の染料除去率が得られ、また染料により酸素吸収の阻害型式に相違のあることが認められたので、これらについて以下報告する。

2. 試料および方法

2.1 試料および培地

供試染料は下記のものを、いずれもエチルアルコールで再結晶して使用した。

培地はつぎの組成に調製し、これを標準培地とした。なお保存中の分解をさけるため、使用の都度、新たに調製、滅菌した。植種物質には、岐阜市中部下水処理場

より採取した新鮮な返送汚泥を用いた。これを1mm²の金網でこして夾雑物を除き、パイプロシエカー中で激しくかきまぜて均一にした後、白金耳で接種した。

標準培地

ペプトン	6.0 g/l
ブドウ糖	14.0 g/l
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	160 mg/l
KCl	200 mg/l
MgSO ₄	140 mg/l
肉エキス	4.0 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
NaCl	400 mg/l
CaCl ₂	200 mg/l
FeCl ₃	100 mg/l

2.2 方法

培養は前報³⁾と同様に30℃で振とう培養によって行なった。菌体量の変化は波長670mμの透過率を測定し、別に作製した透過率-乾燥菌体量の検量線によって求めた。このさいの乾燥菌体量は、遠心分離して得た菌体を50℃で恒量になるまで减压乾燥して求めた。染料減少率は、培養液を8,000 rpmで15分間遠心分離し、その上澄液をpH7に調整し、可視部極大吸収波長の吸光度を測定して求めた。

酸素吸収速度については、標準培地中で培養した菌を遠心分離し、その一定量を染料を含む各種濃度の培地に

Basic Orange 22

Basic Blue 8

Basic Blue 9

Basic Violet 1

Basic Violet 3

Acid Orange 20

Acid Violet 17

Direct Red 2

添加した後、直ちに溶存酸素の消費の経時変化を測定した。その測定には、記録計を接続した東芝ベクマン製 Fieldlab 溶存酸素計を使用した。そして最初の溶存酸素が直線的に消費される部分について解析した。

染料の平衡吸着量については、pH 7.5 の Clark - Labs 緩衝溶液中に一定量の菌と染料を添加し、振とう型恒温槽中で 30℃ にて 48 時間放置した。その後、遠心分離した上澄液の染料濃度を可視スペクトルの測定によって求めた。

3. 結果と考察

3.1 培地の pH、濃度の影響

培地の初発 pH と 24 時間処理後の染料減少率の関係は、図 1 に示すようになる。なお酸性染料の結果と比較するため、前報³⁾の Acid Orange 7 についても同図に転載した。Basic Violet 1 は、pH 7.5~9.0 の範囲では、肉眼的にも菌の増殖が最も顕著である。一般に多くの細菌類の増殖に適った pH は 7.0~7.5 であり⁴⁾、また中西らの報告⁵⁾によれば、活性汚泥は緩衝作用によりほぼ 7.2 を維持する傾向がある。また Acid Orange 7 は培地が酸性になると染料減少率が緩慢に低下する。しかし塩基性染料 Basic Violet 1 では pH 7 以下で急激に低下する。一般に、酸性溶液中で菌は酸性染料に対し結合座席を有するが、塩基性染料に対してはむしろイオンの反ぱつが優位となる。したがって、塩基性染料は酸性域では菌との結合が困難となるため、酸性染料に比して染料減少率が急激に低下したものと考えられる。

Fig. 1 Influence of pH on the decrease of dyes: temperature 30℃, ○ Basic Violet 1 5.0×10^{-5} mol/l, □ Acid Orange 7 2.5×10^{-4} mol/l.

つぎに、染料濃度を 5.0×10^{-5} mol/l で一定として培地の濃度が染料減少率におよぼす影響を検討した。その結果は図 2 に示すようである。Basic Violet 1 では

標準培地の 1/2 濃度で最も高い染料減少率が得られる。それ以下の培地濃度では染料の菌の増殖に対する阻害作用が強いため、染料の減少率は急激に低下する。また標準培地の約 2 倍以上の濃度では、培地が富栄養となり、浸透圧が増大するため、逆に菌の増殖が抑制される。このため染料の減少率は低下する。これらのことから、上記の染料濃度を処理するには、標準培地前後の濃度が適当と判断される。したがって本実験ではこのものを培地として使用した。このさいの COD は 13600 ppm, BOD は 18000 ppm で、通常の公共下水の約 100 倍の濃度である。また Basic Orange 22 は、各培地濃度において Basic Violet 1 に比して染料減少率は低い。これは後に述べるように菌と染料との結合性の低いことに基づく。

Fig. 2 Influence of the concentration of the substrate on the decrease of dyes: temperature 30℃, ○ Basic Violet 1 5.0×10^{-5} mol/l, □ Basic Orange 22 5.0×10^{-5} mol/l.
* showing the ratio of the concentration of the substrate to the standard culture medium.

また標準培地中での染料濃度による影響は、図 3 に示すようになる。Basic Violet 1 では 1.5×10^{-4} mol/l 以上、Basic Orange 22, Basic Blue 9 では 0.5×10^{-4} mol/l 以上の高濃度になると染料減少率は低下する。これらのさい、Basic Violet 1 では 1.0×10^{-4} mol/l 以下の濃度では下層に紫色沈殿物、上層に白色沈殿物、 1.5×10^{-4} mol/l では紫色沈殿物をそれぞれ生じた。また 2.0×10^{-4} では沈殿物が認められなかった。このことは、染料が低濃度のときは、増殖した菌が染料の大部分と結合して沈降するが、その後も菌が増殖を続けることを意味する。また 1.5×10^{-4} mol/l 程度の染料濃度では、増殖した菌は染料の一部と結合して沈降するが、染料の阻害作用が強く、その後の増殖はおこらない。さらに 2.0×10^{-4} mol/l 以上では、菌の増殖がおこらずしたがって染料が沈降しない。また Basic Orange 22, Basic Blue 9 では、各染料とも生じた沈殿は、僅かに

橙または青味をおびた白色を呈している。これは、後述のように染料の毒性作用が低く、菌は増殖するに拘らず、染料と菌との結合力が低いため、染料を十分に沈降させるに至らないものと考えられる。なおBasic Blue 9においては、 1.0×10^{-4} mol/l 以上、では、図の破線で示したように急激に染料減少率が増加している。これは、培養中に泡が多量に発生し、泡沫処理におけると同様の効果が働き、染料が器壁や泡の表面に付着したためであり、微生物との結合によるものではない。

Fig. 3 Relations between the concentration and the decrease of dyes: temperature 30 °C, ○ Basic Violet 1, ● Basic Orange 22, ● Basic Blue 9.

3.2 菌体量と染料減少率の関係

上記により、染料減少率には菌体量、および染料と菌との結合性が影響する。そこで菌体量と染料減少率の関係について測定した結果は、図4のようである。染料濃度 2.0×10^{-5} mol/l における生育曲線は、約8時間までが誘導期、約16時間までが対数増殖期、それ以降が定

Fig. 4 Relations between the decrease of Basic Violet 1 and the growth of microbes: temperature 30 °C, dye concentration ○● 0.2×10^{-4} mol/l, □■ 0.5×10^{-4} mol/l, ▲ 1.0×10^{-4} mol/l, — decrease of dye, ---- total cell.

常期、死滅期となる。染料減少率は、各濃度とも対数増殖期に急激に上昇し、定常期以降は一定値となる。このことからBasic Violet 1の除去は菌の増殖過程で起こると理解される。沈殿物の観察では、対数増殖期では紫色沈殿が主であり、定常期にはいと上澄液は退色し、染料と結合していない菌による白色沈殿物となる。このことから、Basic Violet 1の除去は、染料と菌体との結合が主であり、少くとも培養の初期においては生物分解による寄与は少ないものと考えられる。また染料が高濃度になると誘導期が長くなり、毒性効果の強いことが知られる。

また後述のようにBasic Violet 1はBasic Orange 22よりも菌の増殖に対する阻害作用が強い。それにも拘らず染料減少率が高いのは、Basic Violet 1が染料と菌との結合性の高いことによると推定される。この関係を明らかにするため、pH 7.5における染料の平衡吸着量を測定した。その結果、Basic Violet 1はBasic Orange 22よりも吸着量が大であることが知られた。またその等温吸着曲線は図5に示すようなLangmuir型になった。このことから、微生物は染料に対する吸着の活性点を有することが推定される。したがってその吸着は、微生物の構成たんぱく質がpH 7.5では等電点以上であるため負に荷電し、染料の陽イオンとイオン結合を形成したものと理解される。このことは、さきに酸性培地中で塩基性染料の染料減少率が急激に低下することを、微生物の結合座席が減少すると推定したことと一致する。

Fig. 5 Langmuir plot for the equilibrium adsorption of the dye on the microbes: temperature 30 °C, pH 7.5, $[D]_0$ the free dye (mol/l), $[D]_e$ the adsorbed dye on microbes (mol/g), ○ Basic Orange 22, □ Basic Violet 1.

3.3 染料の毒性作用

菌の増殖が染料減少率に影響することから、染料の菌に対する毒性を知ることが重要となる。またその毒性効

ように染料により阻害型式の異なることは、(4)、(6)式から明らかのように、染料と菌との結合性の相違が阻害作用に影響することを意味する。そして、前述において、Basic Violet 1はBasic Orange 22に比して染料の菌に対する吸着量が極めて大であったことから、両染料の阻害型式の相違が理解できる。

Fig. 6 Lineweaver Burk plot for dyes: temperature 30°C, pH 7.5, ○ control, ● Basic Orange 22 2.5×10^{-5} mol/l, □ Basic Violet 1 2.3×10^{-5} mol/l.

3.4 菌の馴養効果

活性汚泥は混合微生物集団であり、多くの毒物に対しても馴養により抵抗力を増し、ホルムアルデヒド、フェノール、シアン化合物等を分解する。そこで本実験では各種塩基性染料を含む培地で10~20日間馴養し、その間の染料減少率を比較した。しかしいずれの染料も24時間培養後の染料減少率は、馴養によって向上する傾向がほとんど認められなかった。また培養における経時変

Fig. 7 Influence of the repeated inoculations on the decrease of Basic Violet 1 and the growth of microbes: temperature 30°C, dye concentration 5.0×10^{-4} mol/l, ● ■ culture after the repeated inoculations for 10 days, ○ □ culture without the above treatment, — decrease of dye, ---- total cell.

化は図7に示すようである。未馴養の菌では誘導期が約10時間であったものが、10日間の馴養により約4時間に短縮している。それとともに染料が減少しはじめる時間も短くなる。同様に20日馴養した菌について行なった結果は、10日間馴養したものと全く一致したので、10日間でほぼ完全に馴養されたものとみられる。

つぎにBasic Violet 1を含む培地で馴養した菌により他の染料を処理し、馴養菌の適応性を検討した。その結果を表2に示す。誘導期は、トリフェニルメタン系染料であるBasic Violet 3, Basic Blue 8では馴養菌による場合、約1/2に短縮する。しかし他の塩基性染料Basic Orange 22では僅かに短縮されるのみであり、さらに酸性染料Acid Orange 20, Acid Violet 17, 直接染料Direct Red 2では全く変化しない。また24時間培養における染料減少率は、同種の染料については、馴養菌と未馴養菌による差異は殆んど認められない。しかし他種の染料については、Basic Violet 1で馴養した菌で培養した場合、未馴養に比して低下する。つぎに対数増殖期における菌体量の変化についてみる。一般にこの時期においては次式が成立する。

$$\frac{dS}{dt} = KS \quad (8)$$

ただし S : 菌体量 (mg/ml), K : 増殖定数 (hr^{-1})
 t : 培養時間 (hr)

(8)式を積分し、 $t = t_0$ における S を S_0 で表わせば

$$\ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = k(t - t_0) \quad (9)$$

となる。また1つの菌が現れ、これが2つに増殖するまでの平均時間(平均世代時間)を G とすれば、 G と K との間には

$$G = \frac{\ln 2}{K} \quad (10)$$

が成立する。実験結果を(9)、(10)式に適用して得た増殖定数、平均世代時間を同じく表2に示す。これらによればBasic Violet 1で馴養した菌を他の染料に適用した場合、トリフェニルメタン系染料に対しては未馴養の場合に比して菌の増殖が速くなる。しかしその他の染料に対してはいずれも遅くなり、菌の適応性が得られない。また世代時間は塩基性染料特にトリフェニルメタン系染料では他の染料に比して長く、菌の増殖が遅い。このことからトリフェニルメタン系染料の毒性作用の強いことが知られる。また以上の結果から、トリフェニルメタン系染料で馴養した菌は、それと同系統の染料に対しては適応性を有し、誘導期が短くなり、対数期における菌の増殖が速くなる。しかしその他の染料に対しては適応性が認められない。

Table 2 The growth of microbes and the decrease of dyes.
temperature 30 °C, dye concentration 5.0×10^{-5} mol/l

C.I.name of dye	Basic Orange 22		Basic Blue 8		Basic Violet 1		Basic Violet 3		Acid Orange 20		Acid Violet 17		Direct Red 2	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Incubation*														
Lag phase(hr)	5.0	4.7	10.7	4.7	10.0	4.0	9.3	4.7	4.7	4.7	4.3	4.0	4.0	4.0
Decrease of dye(%)	5	5	90	94	96	93	96	93	79	59	90	42	76	70
Growth constant(hr^{-1})	0.57	0.43	0.13	0.18	0.16	0.20	0.09	0.10	0.71	0.63	0.30	0.27	0.64	0.39
Mean generation time(hr)	1.2	1.6	5.0	3.9	4.2	3.5	7.0	6.9	1.0	1.1	2.3	2.6	1.1	1.8

* Incubation I : culture by microbial populations in the activated sludge.

Incubation II: culture by microbes obtained after the repeated inoculations in the media contained Basic Violet 1 for 10 days.

(1974年4月日本化学会第30春季年会で発表)

4. 総 括

活性汚泥微生物による塩基性染料の生物処理について検討した結果、つぎの知見を得た。

1. 塩基性染料の減少率は、培養液の初発 pH 7.5 ~ 8.0 において最大であり、酸性側での菌への吸着が困難となり低い値を示す。培養液濃度については、標準培地濃度付近で最も高い染料減少率を示す。また染料濃度の増加により菌生育の誘導期が長くなり、染料減少率が低下する。

2. 染料の減少は対数増殖期において現れ、トリフェニルメタン系染料は菌に対する吸着量が大きいため、標準培地で90%前後の染料減少率を得る。トリフェニルメタン系染料で馴養した菌は、同系統の他の染料についても適応性を有する。また塩基性染料特にトリフェニルメタン系染料は強い毒性作用を有し、供試の酸性染料、直接染料に比して菌の世代時間が長い。

3. 阻害型式は染料により異なり、酸素吸収速度、等温吸着曲線の測定結果から、Basic Orange 22は不拮抗阻害であり、Basic Violet 1は非拮抗阻害であることを推定した。

なお、本研究にあたり有益な御助言をいただいた本学の高瀬福巳、佐藤成美の両教授と、実験の一部に協力いただいた本学学生浦田義治、出口修平の両君に感謝します。

文 献

- 堀口 博：合成染料，p. 49, 三共出版
- 橋本 奨，藤田正憲，福智真知，松井 勲：水処理技術，13, No. 3, 1(1972)
- 小川利彦，井高英一，平林和弘，高瀬福巳：繊維誌，30, T 153(1974)
- 山口和夫，山口辰良：応用微生物入門，p. 61, 技報堂
- 中西 弘，中田信一郎，合田 健：下水道協会誌，4, No. 32, 19(1967)
- 関根隆光，笹川泰治，森田茂広，高橋 甫：化学の領域増刊，20, 南江堂(1955)
- J. L. Webb: Enzyme and metabolic inhibitors Vol. 1, Academic Press(1963)
- J. Monod: Ann Review of Microbiol., 3, 371(1949)
- I. S. Wilson: Advance in Water Pollution Res., 2, 27(1962)
- A. L. Downing, H. A. Painter and G. Knowles: J. Inst. Sew. Purif. Part II, 130(1964)
- 中西 弘，吉田作治，合田 健：下水道協会誌，3No. 31, 42(1966)
- 橋本 奨，藤田正憲：下水道協会誌，5, No. 50, 2(1968)
- 金子光美：下水道協会誌，10, No. 108, 2(1973)