

土壤微生物による実験廃液処理

－ 教員研修や学校におけるフェノール系実験廃液処理 －

橘 淳 治*

1. はじめに

理科教育や環境教育において実験・実習が重視されており、府教育センターの研修においても学校で実施できる生化学的な実験や環境測定の実習を多く取り入れている。

しかしながら、府教育センターのみならず学校においても実験や実習を実施する上で障害となっているものの代表例として、実験に伴う事故の問題、廃棄物処理の問題などがある。

そこで、実験者自らが廃棄物の処理をして外部に廃棄物を出さないという「廃棄物原点処理」の考えに基づき、実験の計画段階から廃棄物処理までを一連の流れとして教員研修を行っている。この教員研修の過程で土壤微生物によるフェノール系廃液の処理について詳細な実験を行ったので紹介する。

2. フェノール系実験廃液と土壤微生物

(1) フェノール

フェノール (C_6H_6O) は分子量94.11, 融点41°C, 沸点182°C, LD50 (半致死量: 生物に投与した場合に約半数の個体が死亡する投与量) はラットで414mg/kgである。皮膚等に直接付着すると薬傷を起こすほか、蒸気を吸入すると嘔吐や不眠症を起こすなど毒物及び劇物取締法では劇物に指定されており、さらに水質汚濁防止法においても規制の対象となっている物質である。

フェノールは化学実験では各種有機合成実験の材料や化学分析の主要試薬であり、また、生物実験では消毒・殺菌用に用いられることの多い試薬である。廃棄に関しては、化学の専門書¹⁾などには「可燃性溶剤に溶かして焼却する」と書かれているが、実際には廃棄物処理用の高温燃焼の焼却炉が必要になる。学校では焼却炉そのものが使用できないので、保管

して業者委託をしているのが現状である。

学校等におけるフェノール廃液等の保管と業者委託に関しては、希薄な廃液が大量に出ることが多いため、分別してポリタンク等に保管するが、揮発性があるため保管中に大気中に揮散するほか委託の処理コストもかかるという問題点もある。さらに、学校という教育の場においては、実験という名のもとに廃棄物等で環境に負荷をかけることは環境教育の観点からも望ましいことではない。

(2) 土壤微生物とそのはたらき

微生物の定義としては、肉眼では確認できず顕微鏡でなければ確認できないような小さな生物の総称であり、原生動物、菌類、微細藻類、細菌、古細菌、ウイルスなどとされている²⁾。土壤微生物とは、その棲み場が土壤中である微生物をさす。

自然界の土壤中の微生物数は大変多いと言われており、中でも分解者として重要な位置を占める細菌数は、ツンドラ地帯、砂漠、草原等にかかわらず土壌1gあたり8～40億個体と報告されている³⁾。

近年、バイオレメディエーションという考え方が広まってきた。これは、自然界に生息する微生物の分解能力を用いて汚染物質を分解処理する環境浄化の方法である。微生物は多くの有機系の汚染物質を分解してエネルギー源にすることができるが、一部の物質に関してはエネルギー源としての利用ができなかったり、また、毒性のために自らが死滅したりするものもある。一般的には石油系、畜産系廃液などは微生物の炭素源としてよく利用され、アンモニア、シアンなどは窒素源として他の炭素源があれば利用される。塩素系有機溶媒、農薬類などは微生物にとっては毒として働くため、これらの物質を分解するものの微生物は成育できないか死滅するために、この場合は新しい微生物の補給が必要となる²⁾。

フェノール系廃棄物は殺菌効果を持つが、微生物にとっては炭素源として利用されると考えられるの

*大阪府教育センター

で、微生物処理が可能と考えられる。

3. 土壤微生物による廃液処理実験

(1) 処理対象の廃液

府教育センターの指導者養成理科長期研修で行っている水質分析（インドフェノール法⁴）によるアンモニア態窒素分析）実習の試薬と概要は次のとおりである（図1）。



図1 指導者養成長期研修における水質分析実習

分析試薬としては、0.5gのフェノールに2.5mgのニトロプルシドナトリウムを加えた後、水を加えて20mLにした溶液①と、0.5mLの次亜塩素酸ナトリウムに0.25gの水酸化ナトリウムを加えた後、水を加えて20mLにした溶液②を用意する。

試水5mLに対して、溶液①を0.2mL、溶液②を0.2mLそれぞれ加えてかくはんした後、常温で5時間～24時間（70℃で湯せんすれば30分程度）放置し、分光光度計にて630nmの波長で吸光度を測定する。

試薬①と試薬②がそれぞれ20mLで100検体のアンモニア態窒素が分析できるので、通常の理科の教員研修ではこの量の試薬を調整している。

廃棄物としては、フェノールを主とし次亜塩素酸ナトリウムなどを含むものが同量出ることになる。

このフェノールを含んだ廃棄物を微生物によって処理を行うこととした。

(2) 実験方法

① 土壤の準備

市販の園芸用の土120kgにバーミキュライト20kgを混ぜた後、微生物の栄養源としての米ぬか2kgと水4Lを加えてよく混合して1週間放置した。

4個の市販のプラスチックコンテナ（縦30cm×

横40cm×高さ30cm）に約35kgずつこれらの土壤を入れた（図2）。



図2 実験用コンテナに入れた土壤

② フェノール系人工廃液の準備

学校等で生徒が行う実験によって多量の廃液が生じることを想定して、1,000検体（フェノール量として5g）、2,000検体（同10g）、3,000検体（同15g）、4,000検体（同20g）分に相当する試薬①と試薬②を調整した。①及び②の試薬量は体積でそれぞれ200mL、400mL、600mL、800mLになった。

これらに水を加えて全量を2Lにしたものをフェノール系人工廃液とし、4個の土壤の入ったコンテナにいれて、スコップを用いて均一に土壤と混ぜるようにかき混ぜた。

③ 土壤中のフェノールの定量

1つのコンテナから3検体の土壤サンプル2g～10gを採取して100mL容量の三角フラスコに入れ、蒸留水を加えて全量を50gとした。



図3 フェノール分析用パケットテスト

これを振とう器で15分間振とうさせてフェノールを抽出した。その抽出液の一部を取り出して遠心分離器にかけて懸濁物を取り除き、共立理化学研究所のフェノール用パックテストで定量した(図3)。

また、検体の比色の程度がパックテストの比色用紙の範囲を超えた時は蒸留水で希釈して定量した。測定結果は3検体の平均値を用いたが、ばらつきのある場合は最も離れた値を除き、2検体の平均値で表した。

④ 細菌数の定量

微生物(特に細菌類)に実験廃棄物を処理させる過程において、その細菌数の変化を見ることは、処理能力や処理時間を知る上で重要である。そこで、寒天培地による平板培養法で細菌数の定量を行った(図4)。



図4 細菌類の平板培養法

1つのコンテナから1検体の土壌サンプルを1g採取し、滅菌水を9mL入れた試験管に入れて振とうする。これをさらに滅菌水を9mL入れた試験管に順次入れて希釈を繰り返し、最終的に 10^7 倍と 10^8 倍に希釈した。

この2段階の希釈サンプルについてそれぞれ3枚のシャーレーに入れた寒天培地に接種し、 38°C で48時間培養して生じたコロニー数を数えた。計数結果は 10^7 倍あるいは 10^8 倍に希釈した検体のうち、数十～数百コロニーの生じた寒天培地についてコロニー数を数えて3検体の平均値を用いた。また、ばらつきのある場合は最も離れた値を除き、2検体の平均値を用いた。これに、希釈倍数をかけて土壌1g当たりの細菌数で表した。

培養に用いた培地は、水1Lに対してDiffco社のYeast Extractを0.5g、BBL社のTrypticase Peptonを5g、寒天を15g入れて高圧蒸気滅菌したものを用

いた。

4. 結果と考察

(1) フェノール系人工廃液の経時変化

フェノール系人工廃液の分解実験は10月に実験室内で行った。実験時の気温は、昼間は 28°C 前後、夜間は 24°C 前後であった。土壌の含水率は4つのコンテナの土壌で殆ど違いはなく実験中もほぼ一定で、おおよそ55%程度であった。

実験はフェノール系廃液を加えた直後、6時間後、12時間後、24時間後、30時間後、36時間後、48時間後、60時間後、72時間後に土壌サンプルを採取しフェノールの定量を行った。

1,000検体(フェノール量として5g)、2,000検体(同10g)、3,000検体(同15g)、4,000検体(同20g)相当の添加を行った土壌に残留しているフェノール量の時間的変化を表1に示した。

結果は、湿重量で土壌1g中に含まれるフェノール量(mg)で表した。

表1 土壌中のフェノール残留量の経時変化

	0h	6h	12h	24h	30h	36h	48h	60h	72h
1,000検体	0.15	0.15	0.10	0.05	0	0	0	0	0
2,000検体	0.30	0.20	0.15	0.10	0.05	0	0	0	0
3,000検体	0.40	0.35	0.30	0.15	0.10	0.05	0	0	0
4,000検体	0.55	0.55	0.50	0.30	0.20	0.05	0	0	0

Values express as mg/g

いずれの添加量に関しても実験開始12時間程度まではフェノールは徐々に分解し、24時間以降は急激に分解が進んだ。最も大量に添加をした土壌(フェノール量として20g添加)においても48時間ではフェノールは検出されなくなった。

これは、アンモニア態窒素の分析に使われる試薬には殺菌剤としての働きを持つフェノールのほか、次亜塩素酸ナトリウムも含まれており、添加直後は土壌中の細菌類の活性が低下したが、その後、時間の経過とともに細菌類の環境への順応と細菌類の増殖により、フェノールの分解が進行したと考えられる。

(2) 土壌中の細菌数の経時変化

フェノール系人工廃液の分解実験に並行して、土

壤中の細菌数についても、実験開始前、開始直後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後に土壌サンプルを採取し、平板培養を行って計数した。

結果は、1,000検体（フェノール量として5g）、2,000検体（同10g）、3,000検体（同15g）、4,000検体（同20g）相当の添加を行った土壌1g中に生息する細菌数で表した（表2）。

表2 土壌中の細菌数の経時変化

	Before	0h	12h	24h	36h	48h	72h
1,000検体	82	15	34	29	33	57	42
2,000検体	48	17	23	20	29	41	85
3,000検体	75	8.5	10	14	21	51	59
4,000検体	95	2.3	3.2	8.3	9.2	21	72

Values express as $\times 10^8$ cells/g

土壌中のフェノール残留量の経時変化と細菌数の経時変化を合わせて考えると、フェノール系人工廃液添加直後は細菌数が減少しており、この廃液が細菌にダメージを与えていることが伺える。

フェノール系廃液の添加量にもよるが、24時間～48時間後には細菌数はかなり回復しており、72時間後には、ほぼ実験前の細菌数に戻っていた。このことから、実験廃液は週に2回程度の頻度で分解処理が可能と考えられる。

5. 教員研修や学校における実験での利用

本実験は、教員研修や学校での生徒による実験の廃棄物処理の実用化を検証する目的での実証実験である。

通常の理科の教員研修であれば、教員一人あたりのアンモニア態窒素分析の検体数は10～20検体程度である。仮に、受講者が30名と仮定しても600検体であり、実験結果から見ても30時間以内で十分に処理可能である。また、学校における生徒が行う実験に

おいては、2人一組で10検体の実験を行うとして、一クラス（40名）当たりでは200検体、1学年（320名～400名）当たりでも2,000検体程度であるので、これも十分に処理可能である。

教員研修や学校での理科実験は真理の探究のみが目的ではなく、教育という大きな目的をも持っている。実験を行うことによって生じる実験廃棄物で環境に負荷をかけることは、環境教育の観点からも望ましいことではなく、教育効果を大幅に下げることにつながってしまう。

教育という重要な目的を持つ教員研修や学校の理科実験においては、実験者自らが実験廃棄物を処理して外部に廃棄物を出さないという「廃棄物原点処理」の考えを持つことは大切である。

現在、府教育センターの理科研修においては「廃棄物原点処理」の考え方を重要視し、実験の計画段階から廃棄物処理までを一連の流れとした実習を実施するようにしており、フェノール等を用いる実験においては研修受講教員自らがこの土壌による分解処理を行っている。

学校の理科実験においてもフェノールなどの有機廃液が生じるものについては、使用している試薬をよく検討した上で、重金属など微生物による処理が困難なものを含まない場合は、この土壌微生物による分解処理を取り入れると教育面でも効果があるものと考えられる。

引用・参考文献

- 1) 東京化成工業株式会社：取扱注意試薬ラボガイド、講談社サイエンティフィック(1988)
- 2) 日本微生物生態学会教育研究部会：微生物生態学入門、日科技連(2004)
- 3) 木村真人：地球の環境と土の微生物、土と微生物、59, 99(2005)
- 4) Sagi, T : The Oceanographical Magazine, 18, 43(1966)