

生物学的有機物・窒素の同時除去に関する基礎的研究

—脱窒菌の連続培養特性—

深川勝之*・原田利男*・竹内正美*
村上定瞭*・中西 弘**

Studies on Simultaneous Removals of Organic subjects and Nitrogen Characteristics on Chemostat Method of *Pseudomonas denitrificans*

Masayuki FUKAGAWA Toshio HARADA Masami TAKEUTI
Sadaaki MURAKAMI and Hiroshi NAKANISHI

Abstract

Pseudomonas denitrificans were cultivated with the chemostat method. The equipment is a simple reactor. And The condition of the reactor is perfectly mixed.

The several factors which influence the growth on the anaerobic condition was examined.

After the value of the pH arrived at the maximum on the batch operation, the continuous operation should be started.

The retention time about 7.0 hours may be expected. The retention time made the pH and the concentration of the bacteria oscillated. The period of the oscillation coincided with the retention time.

The nitrite concentration over $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ inhibited the growth. And the growth was inhibited over pH 8.3.

1. 緒言

前報¹⁾、回分培養実験による、脱窒菌(*Pseudomonas denitrificans*)の増殖に対する pH、アンモニウムイオン、硝酸イオン、亜硝酸イオンの影響などを明らかにした。しかし、回分培養は増殖における、基本的な特性を把握するという意味では重要であるけれども、非正常操作であるため、データの全てを連続操作に適用することはできない。しかるに排水処理への応用、或いは大量培養への可能性などを考慮するとき、連続培養における増殖特

性を、明らかにすることは極めて重要である。本報告では、回分培養における基本データを参考に脱窒菌をモデルとし連続培養実験を行ない、特に増殖に対する pH の影響および亜硝酸イオン生成による影響を調べたものである。これらの影響を定量的に明らかにすることができたので報告する。

2. 実験装置

実験装置はケモスタット法、単一完全混合型とした。装置の概略を図1に示した。装置は雑菌汚染を防ぐようになっていなければならない。①の培地槽はあらかじめ滅菌しておき、培地を貯えておく。槽内に窒素ガスをボンベより連続的に送り込み、直接大気との接触を防ぎ、

*宇部工業高等専門学校工業化学科

**山口大学工学部

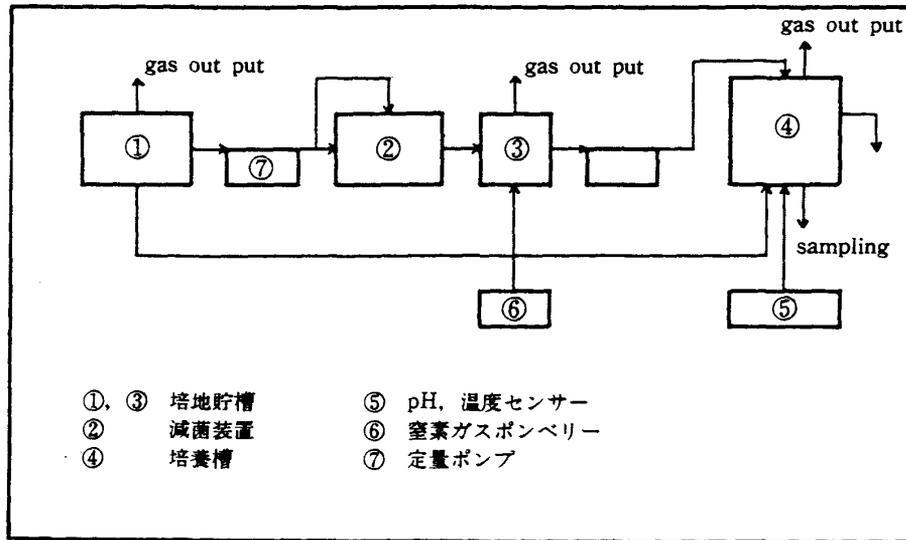


図1 実験装置の略図

雑菌汚染を防いだ。

②は①より定量ポンプで送り込まれてきた培地をさらに連続的に滅菌するための装置である。1 l 丸底フラスコの500mlの位置に枝管をつけて、オーバーフローで流出するようになっている。フラスコ上部には水冷コンデンサーを取り付け、液濃度が変化しないようにしてある。装置上部より培地が連続的に供給され、フラスコ中の培地は加熱沸騰により、滅菌される。

②をオーバーフローした培地は貯槽③に送り込まれ、さらに定量ポンプにより、所定量の培地が培養槽④に送り込まれる。

培養槽有効容積は2660mlである。増殖した菌は懸濁液として、オーバーフローにより外部へ排出される。培地槽には培地導入管、ガス導入管、ガス排出管、温度計、pHセンサー、サンプリング口を取りつけてある。好気培養の場合には酸素ガス、嫌気培養の場合にはヘリウムあるいは窒素ガスを吹き込む。ガスは全て高純度ガスを用いた。また、念のため装置のガス送入口は全て綿栓を施した。培養温度は恒温水槽により調節した。

3. 実験条件および方法

3.1 前処理

前培養などの前処理の方法、合成培地成分などについては、Nishimura 等の方法²⁾によった。ただし、嫌気培養においてはアンモニウム塩は必要ない¹⁾ので、合成培地には加えなかった。

3.2 連続培地滅菌

培地貯槽①中の培地は室温では一週間程度で培地成分濃度に僅かではあるが変化が認められた。そのため数日間隔で培地を取り替えるとともに、滅菌を確実にすることが必要であり、連続的に培地を滅菌するための予備実験を行ない。滅菌条件を決定した。

培地約300ccをフラスコ中で、103℃で約30分間沸騰させた後、振とう培養器内で一週間放置(30℃)した。その結果、いかなる菌も生えず(O.D.=0)、変化は認められなかった。30分煮沸により、完全に滅菌できることを確認した。さらに、装置②(連続滅菌装置)により滞留時間30分で同様な実験を行なった結果、培地には変化は認められなかった。このことより、装置②は少なくとも1000ml/hrまでの流量を得ることが可能である。

また、煮沸時間の差による培地成分の変化があるかどうかを調べたところ、滞留時間3時間での滅菌でも、通常の方法(オートクレーブによる滅菌)と差は認められなかった。

3.3 連続培養実験

本実験は培地成分、培養温度、送入ガス流量を一定にし、pH、菌体濃度、硝酸イオン濃度、亜硝酸イオン濃度等の挙動を調べたものである。滞留時間は連続滅菌装置の限界から、2.6時間以上で変化させた。流量制御はすべて定量ポンプで行なった。pHセンサーは高温用を用い、培地滅菌の方法に従い、30分間煮沸することにより滅菌した。

培養温度は30℃でも、35℃でも大差ない¹⁾ので、30℃で行なった。

本実験は全て嫌気性で行なった。そのため、高純度窒素ガスを1.2atmで送入し、培養槽内を陽圧とし、大気を遮断した。このガス送入は培養槽の攪はんも兼ねている。

前培養菌の接種量は、培養槽の有効容積の約1%とした。菌体量は濁度法により決定した。硝酸イオン、亜硝酸イオン濃度は直接紫外吸光光度法により決定した。菌体の分離は遠心分離機(6000rpm)で行なった。

4. 結果および考察

4.1 連続運転開始時間

培養槽へ前培養菌を接種した後、ただちに連続運転に入ることは菌体濃度が薄いため、定常状態に達するまでの極めて長時間を要する。しかも、培地供給が無駄となる。このため、最初は回分培養を行ない、最も菌が活性化されており、かなりの菌体濃度を有する時、すなわち、回分培養の指数増殖期末期に基質を流入させるのが良いとされている³⁾。

嫌気培養では18~25時間で最大濃度に達する。しかし、種菌の濃度すなわち、初発濃度により異なるため、正確には把握しにくい。したがって、連続運転開始のための指標を得ることが重要である。図2は回分培養におけるpHと菌体濃度の経時変化を見たものである。pHは指数増殖期の中間あたりで極大となり、漸次下がり、静止期で極小値を得ている。指数増殖期では増殖が最も活発なため、炭素源のクエン酸が大量に消費され、pHが急激に増大する。しかし、pHの増大は菌にとっては、環境条件の悪化を意味する。そのため、菌の防衛機能が働き、酸を生成しpHは漸次減少するものと思われる。

初発濃度にかかわらず、植種後回分培養により増殖させ、pHが極大に達した後に、連続運転に移行すれば良いことが分かった。このように、脱窒菌においてはpHは運転操作上、有力な指標となり得るものである。

4.2 定常状態

微生物の培養においては、関係する環境因子は数が多く複雑で、連続培養であっても環境因子全てを制御することはできない。したがって、厳密な意味での定常状態は現出しない。特に制御因子の項目が少ない場合には、どのような状態が定常状態とみなせるかは、実験を通じて決定することが必要である。本実験は滞留時間、培地成分、培養温度、送入ガス流量を制御したものである。

図3は滞留時間15.8時間、pHが極大に達した直後に連続運転を開始したときのpHと菌体濃度の経時変化を見

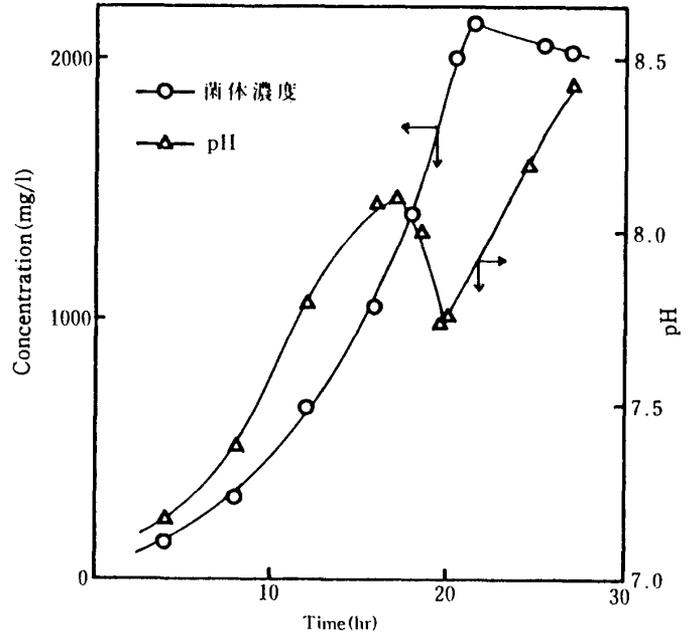


図2 回分培養における菌体濃度とpHの変化

たものである。菌体濃度は、pHが増大すると減少し、pHが減少すると増大した。pHも菌体濃度も極大、極小値を取りながら振動した。この理由については4.1で述べた通りである。本実験ではpHを制御していないのでpHは阻害因子となり、したがって基本的にはこのような振動する状態が定常状態と考えられる。

4.3 滞留時間

図4は滞留時間を種々変化させた時のpHと菌体濃度の経時変化を見たものである。振動現象は滞留時間に対応して変化しており、周期はほぼ滞留時間に一致し、滞留時間が短いほど振幅は小さくなっている。このことは、滞留時間が短いほど安定した状態が得られることを示している。図5は滞留時間を2.6~8.3時間変化させた場合の菌体濃度の経時変化である。滞留時間が6.3時間より短くなると、菌体濃度はしだいに減少し、wash outする。6.7時間以上ではwash outしない。Nishimura等による合成培地を用いた、脱窒菌の嫌気培養における μ_{max} (最大増殖速度)は $0.151hr^{-1}$ である。稀釈率 $D(hr^{-1})$ が μ_{max} を越えると、wash outする。 μ_{max} に等しい D を滞留時間に換算すると6.67時間となる。実験結果はこの値以下でwash outしており、一致した結果が得られた。したがって本実験条件下では滞留時間は7時間程度が最もよいことがわかった。

4.4 亜硝酸イオンの生成と増殖

亜硝酸イオンの生成は脱窒菌の生成を粗害する。しか

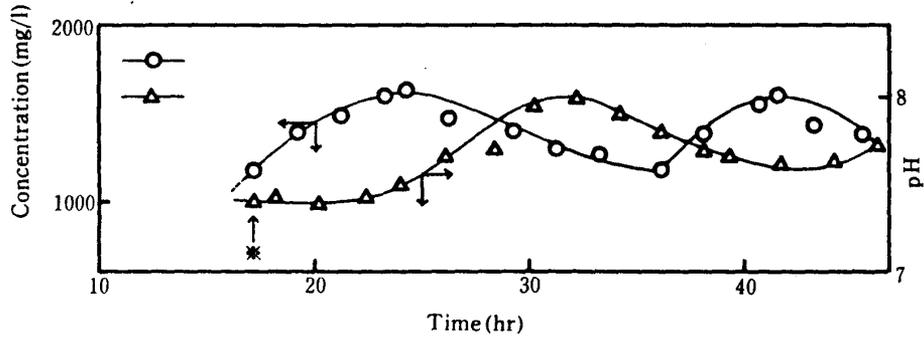


図3 連続培養におけるpHと菌体濃度変化

滞留時間15.8時間

※連続培養開始時間(17時間15分回分培養)

し定量的関係ははっきりしていない。図6は wash out しない滞留時間6.7時間以上での亜硝酸イオンの生成量と菌体濃度の関係を示したものである。菌体濃度は亜硝酸イオン濃度が $7.0 \times 10^{-2} \text{mol/l}$ 以下では、亜硝酸イオン濃度にはほぼ比例しているが、それ以上では菌体濃度はしだいに飽和する傾向となった。このことは、亜硝酸イオンが増殖を阻害することを意味するものである。本実験では培地中には亜硝酸イオンは含まれておらず、硝酸イオン

が還元されて生成したものである。そして、菌体濃度と亜硝酸イオン濃度が比例するということは脱窒菌 (*P. denitrificans*)が硝酸呼吸のみを行ない、亜硝酸呼吸は行なわれないということを示すものである。

前報告⁷⁾で硝酸イオン濃度が高い場合には大量の亜硝酸イオンを生成するため増殖を阻害するとしたが、硝酸イオン濃度が増殖に影響するかどうかを見たのが図7である。図7は横軸に残余の硝酸イオン濃度を取ったものである。菌体濃度は硝酸イオン濃度はほぼ比例関係にあり連続培養においてはこの程度の硝酸イオン濃度では増殖を阻害しないことが分かった。回分培養においては、亜硝酸イオンが蓄積されることにより増殖が阻害されるのに対して、連続培養においては蓄積せず系外に排出されるために、増殖阻害が緩和されるものと思われる。

図8に菌体濃度が一定 ($820 \pm 82 \text{mg/l}$) のときのpHと亜硝酸イオン濃度との関係を示した。亜硝酸イオン濃度の上昇につれて、pHは増大した。亜硝酸イオン濃度が $8 \times 10^{-2} \text{mol/l}$ を越えると、pHは、7.6程度で飽和している。この理由は、亜硝酸イオンが大量に生成しているということは呼吸源である硝酸イオンが減少しているということであり、したがって増殖も停止することを意味する。図2よりpHが約8.3を越えると酸を生成し、pHは減少する。亜硝酸イオン濃度が 9.6mol/l のとき硝酸イオンが一切、窒素ガスに変換されなかったとして、残余の硝酸イオン濃度は僅かに $4.9 \times 10^{-3} \text{mol/l}$ に過ぎない。しかし、一部は窒素ガスに変換されているわけであるから、実際はもっと少ない。以上の結果より、亜硝酸イオン濃度が $8 \times 10^{-2} \text{mol/l}$ 以上存在すると増殖を阻害することが分かった。しかし、脱窒菌の硝酸呼吸により、硝酸は窒素ガスと亜硝酸イオンへ還元されるが、この二つの競争反

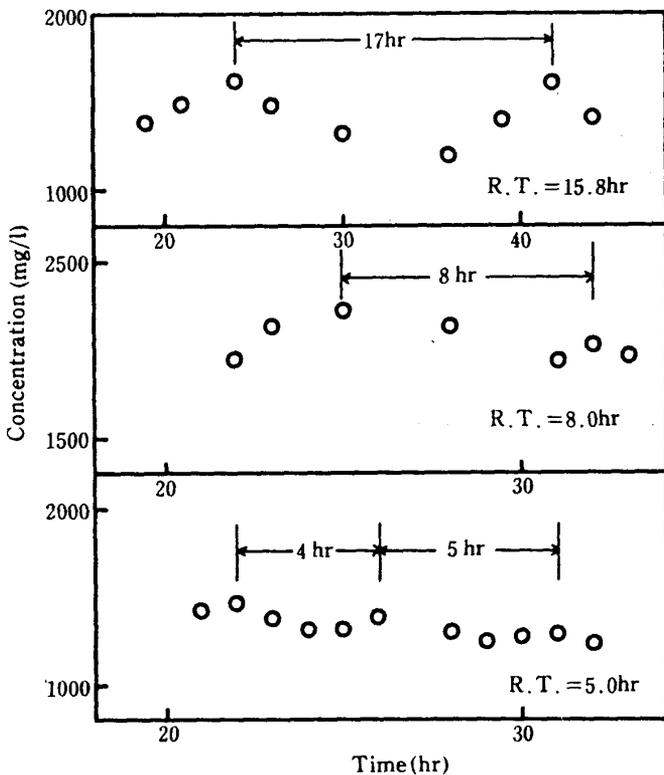


図4 滞留時間の違いによる菌体濃度の振動

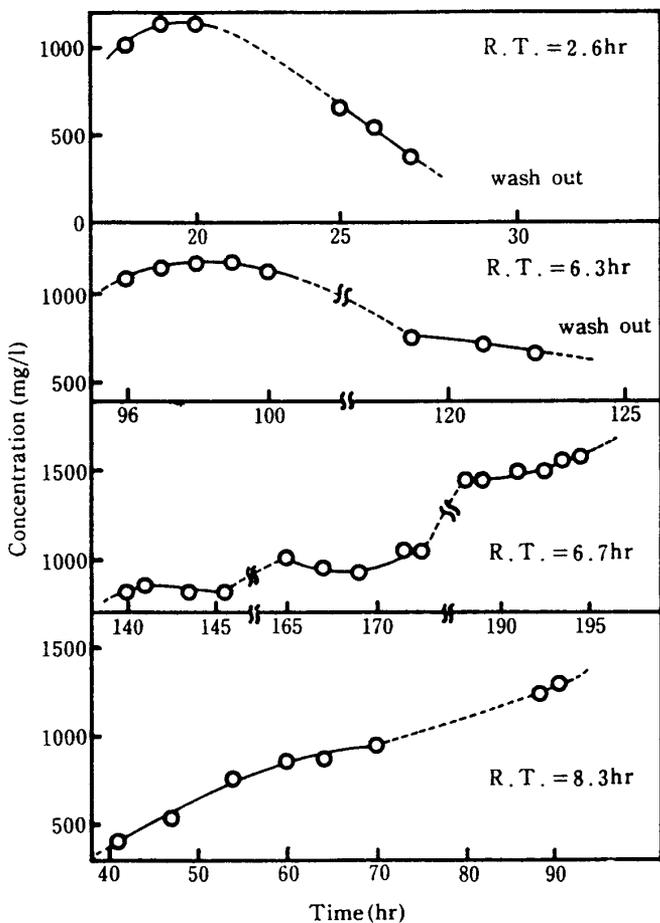


図5 滞留時間の違いによる菌体濃度の変化

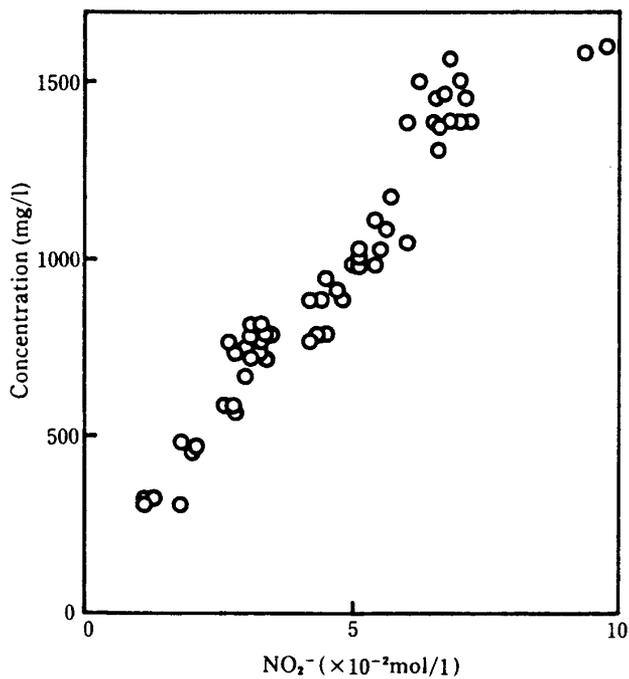


図6 亜硝酸イオン濃度と菌体濃度の関係

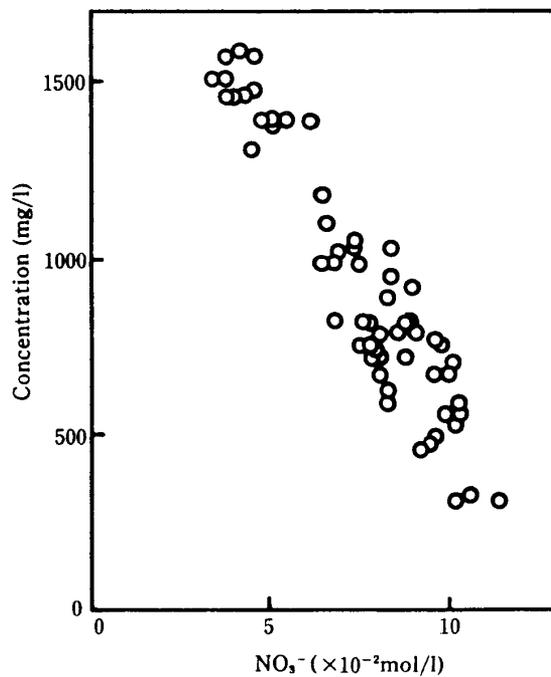


図7 硝酸イオン濃度と菌体濃度の関係

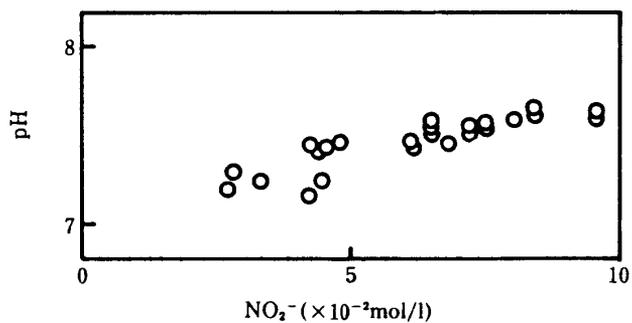


図8 pHと亜硝酸イオン濃度の関係

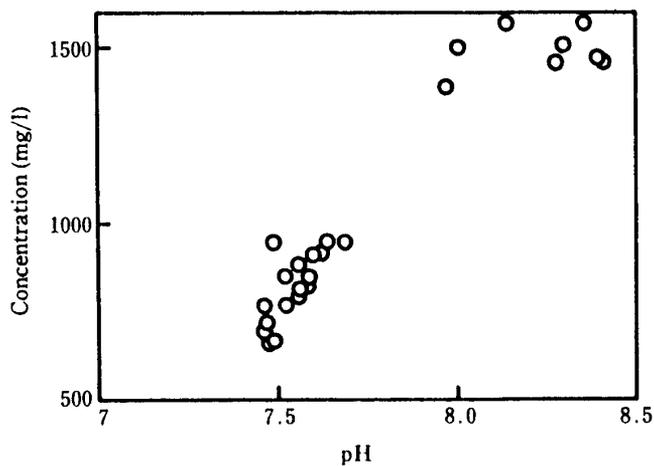


図9 pHと菌体濃度の関係

応を制御する因子が何であるかは不明である。

4.5 pH と増殖

pH は水溶液中の微生物にとって、重要な環境因子であるが、どのような影響を受けるかは微生物によって異なる。図9は亜硝酸イオン濃度が約 7×10^{-2} mol/lのときの菌体濃度とpHの関係を示したものである。pH7.5程度までは菌体濃度は急激に変化し、pH 8を越えると余り影響を受けない結果となった。このことは脱窒菌の増殖がpH 8を越えると阻害されることを示すものである。

図3、図4および図9より、増殖最適pHは7.5~7.7付近にあるものと思われる。また、pHの増大による増殖阻害はpHそのものによる阻害と、硝酸イオン濃度の減少と亜硝酸イオン濃度の増大による阻害との複合したものであることが分かった。

5. 結言

P. denitrificans をモデルとして、連続培養実験を行ない、増殖に対する制御因子として重要と考えられるpH、亜硝酸イオン濃度、滞留時間などの影響を調べた結果次のような点が明らかとなった。

- (1) 回分培養では指数増殖期の中あたりでpHは極大値を取るため、その直後に連続操作に入ることができ、pHは重要な指標であることが分かった。

- (2) 臨界稀釈率は $0.151 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$ であるから、滞留時間は7時間程度が良い。滞留時間を長くすると振動の幅が大きくなり連続操作としては好ましくない。
- (3) *P. denitrificans* は硝酸呼吸のみで、亜硝酸呼吸を行わない。亜硝酸イオン濃度の増大はむしろ増殖を阻害する。
- (4) pHの増大は増殖を阻害する。増殖最適pHは7.5~7.7と思われる。
- (5) 増殖阻害はpHと亜硝酸イオン濃度の複合したものと思われる。

本実験により、連続培養が可能となった。pHを制御することにより、さらに高効率に培養が可能となるものと思われる。しかし、硝酸呼吸による窒素ガスへの変換を選択的に行なわれる制御因子が、何であるかは不明である。この点を明らかにすることが課題である。

参考文献

- 1) 深川等：生物学的有機物・窒素同時除去に関する基礎的研究—脱窒菌の増殖特性—，宇部工業高等専門学校研究報告（1986）
- 2) Yushi Nshimura et.al：Biochem. Biophys. Res. Comm. 87,140（1979）
- 3) 山根恒男：生物反応工学，産業図書（1980）

（昭和61年10月9日受理）