

生物学的有機物・窒素の同時除去に関する基礎的研究

—脱窒菌の増殖特性—

深川勝之*・原田利男*・竹内正美*
村上定瞭*・中西 弘**

Studies on Simultaneous Removal of Organic matter and Nitrogen Characteristics on Growth of *Pseudomonas denitrificans*

Masayuki FUKAGAWA Tosio HARADA Masami TAKEUTI
Sadaaki MULAKAMI and Hiroshi NAKANISHI

Abstract

Pseudomonas denitrificans were cultivated in a flask. Then the influence of total ion concentration, nitrate concentration, nitrite concentration and pH on the growth was considered. The results are the following.

The growth velocity on aerobic condition was 1.5 times as large as that on anaerobic condition. The growth may be inhibited over 1.0g-ion/l of the total ion concentration on aerobic and anaerobic condition.

On aerobic condition, when ammonium was sufficient to increase, nitrate was not related with the growth. On the one hand, on anaerobic condition, when nitrate was sufficient to increase, ammonium was not necessarily. But the high concentration of nitrate inhibited the growth by the formation of nitrite, and the low concentration of nitrate could not enough promote the growth. The suitable concentration of nitrate may be about 5.0×10^{-2} mol/l.

When the initial pH was prepared between pH 5.2 and pH 9.3, *P. denitrificans* increased, while they did not increase at the lower than pH 5.2 or the higher than pH 9.3.

We got 0.151 hr^{-1} for μ_{\max} on anaerobic condition.

1. 緒言

脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) は嫌氣的雰囲気下で硝酸イオンを、亜硝酸イオンや窒素ガスに還元する。この性質を利用して、排水処理における活性汚泥法やその他の生物学的脱窒素の技術が多く開発され実用に供されている。また、混合微生物集団中で行われる脱窒素反応の過程は、工学的意味での反応機構が、明らかにされつつある¹⁾。近い将来、固定化菌による排水処理技術の発

展や、バイオリクターによる大量生産も行われることが期待される。しかし、脱窒菌の増殖特性については、未だ不明の部分が多い。

本研究は上記 *Pseudomonas denitrificans* をモデルとして培養実験を行ない pH, アンモニウムイオン濃度, 硝酸イオン濃度等の影響, 亜硝酸イオンの生成による影響など, 種々の因子について増殖に対する影響を調べたものである。二, 三の知見が得られたので報告する。

2. 実験方法

前処理としての培養方法としては Nishimura 等の方法²⁾で行なった。好気培養の実験には、振とう培養装置を

*宇部工業高等専門学校工業化学科

**山口大学工学部

用いた。嫌気培養の実験にはフラスコに高純度の窒素ガスを吹き込み、嫌氣的雰囲気において実験を行なった。培養槽容積はいずれも500mlである。用いた合成培地の成分および濃度を表1に示す。培地成分を変化させるため、この培地を基本培地(pH7.0)と呼ぶ。温度を変化させない場合は、全て30°Cで行なった。

サンプリングはあらかじめ、長い注射針をフラスコ内に固定しておき、シリンダーで適量採取した。硝酸イオン、亜硝酸イオンの分析は直接紫外吸光度法で行った。

表1 合成培地の成分および濃度

成分	濃度(g/l)	成分	濃度(mg/l)
クエン酸三ナトリウム	6.0	FeSO ₄ ・7H ₂ O	10.0
二水和物		CaCl ₂	20.0
K ₂ HPO ₄	1.0	Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	2.5
KH ₂ PO ₄	0.5	CuSO ₄ ・5H ₂ O	1.0
NaCl	0.5	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	1.1
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.2	MnCl ₂ ・6H ₂ O	0.1
KNO ₃	10.0	CoCl ₂ ・6H ₂ O	2.0
NH ₄ Cl	1.0	Na ₂ SeO ₄	0.2

菌の分離は遠心分離器(6000rpm)で行った。pHの調節には水酸化ナトリウム、塩酸、リン酸水素一カリウム、リン酸水素二カリウムを用いた。菌の濃度は濁度法による。濁度1.0は、1640mg/l(乾燥菌体換算)に相当する。

3. 結果および考察

3.1 温度の影響

脱窒菌は中温菌であるので30°C付近でよく増殖する。好気条件下30°C, 35°C, 40°Cで培養した結果、40°Cでは増殖しなかった。35°Cでの菌体量は30°Cの1~1.2倍程度であり、大きな差は認められなかった。しかし、増殖速度の程度は μ_{max} によって判断されるべきである。本実験では μ_{max} を求めていないので、定量的判断はできない。

3.2 雰囲気の影響

脱窒菌は通性嫌気性菌であるため好気、嫌気いずれの雰囲気においても増殖する。基本培地で比較したところ好気条件下では12~17時間、嫌気条件下では、18~24時間で最大濃度に達した。時間に幅があるのは菌の初発濃度が異なるためである。しかし、最大濃度は前者では4500~5000mg/l、後者では1800~2000mg/lとなった。増殖

速度の差は、呼吸源の硝酸イオンと酸素の違いによるものと考えられる。最大濃度の差については3.5で考察する。

3.3 pHの影響

水溶液中の微生物にとって、pHは重要な環境因子である。表2は基本培地中の総イオン量は変化させずにリン酸水素一カリウムと、リン酸水素二カリウムの比率を変化させることにより、pHを調整し、中位のpH領域での増殖に対する影響を見たものである。pHが6.4~8.0の間ではいずれも最大濃度に達する時間は17~18時間、その時の濃度4600~4700mg/l、pHは8.8~8.9とこのpH領域では顕著な差が見られなかった。このことは回分培養の場合、初発pHをそれほど厳重に決める必要のないことを示すものである。pHの上昇はクエン酸塩の消費により、水酸化物イオンが生成したためである。

表3は基本培地からリン酸塩を取り除き、塩酸、水酸化ナトリウムにより初発pHを調整したものと、基本培地を塩酸、水酸化ナトリウムにより初発pHを調整したものの増殖に対する影響を見たものである。リン酸塩の有無にかかわらず、低pH領域、高pH領域では増殖しない。しかし、低pH領域の場合菌は増殖しなかったが死滅はしなかったのに対し、高pH領域では死滅した。このことは脱窒菌が酸性に強く、塩基性に弱いことを示す。表2および表3に見られる通り、脱窒菌は少なくともpH5.2~9.3のかなりの範囲で増殖活性を有することが明らかとなった。

3-4 総イオン量の影響

基本培地中のリン酸塩により、緩衝作用が生じる。基本培地のリン酸塩濃度を11倍(初発pH8.8)にしたところ、全く増殖しなかった。しかし、基本培地を水酸化ナトリウムでpH9.3に調整した場合は増殖し、pHは8.7に低下した(表3)。このことより、リン酸塩濃度が11倍のときはpHが高いために増殖しなかったのではなく、培地中の総イオン量が多すぎたために増殖しなかったものと考えられる。リン酸塩濃度8倍(初発pH5.4)のものは増殖したが、最大濃度に達する時間は26時間で、基本培地の場合の約1.5倍要した。最大濃度は3020mg/lとなり、基本培地のときの約65%にとどまった。また、最大濃度を示したときのpHは6.3で基本培地に比べて、強い緩衝作用を受けたことを示している。しかしこのpH値は増殖に対して影響を与えないことは先に示した(表2)。したがって、この場合の増殖速度の低下は、やはり総イオン量の影響と考えるべきであろう。総イオン量は基本培地では0.42g-ion/l、8倍量のもの0.96g-ion/l、11倍

第2 リン酸塩でpHを調整した場合の増殖

(総イオン濃度一定)

pH ₀	X _{max} (mg/l)	t _{max} (hr)	pH _{max}
6.4	4640	17.0	8.9
7.1	4610	17.0	8.9
7.8	4720	18.0	8.8
8.0	4640	18.0	8.9

表3 NaOHとHClでpHを調整した場合の増殖

pH ₀	リン酸塩なし			基本培地		
	X _{max} (mg/l)	t _{max} (hr)	pH _{max}	X _{max} (mg/l)	t _{max} (hr)	pH _{max}
1.5	60*	—	1.5	60*	—	1.5
3.1	50*	—	3.1	50*	—	3.1
5.2	1270	40	8.9	4460	21	8.7
7.0	1000	24	9.2	4560	14	8.9
8.4	1220	25	9.2	4580	14	8.9
9.3	800	25	8.05	4150	21	8.7
10.0	40**	—	9.4	50*	—	9.3
11.9	15**	—	10.4	—	—	—

* 初濃度から変化せず。(50~60は同じ程度と考えてよい)

** 初濃度より低くなっている。

量のもものは、1.17 g-ion/lである。1 g-ion/l程度の濃度になると、増殖は阻害されるものと思われる。

3-5 アンモニウムイオン、硝酸イオン、亜硝酸イオンの影響

好気条件下で培養された脱窒菌は硝酸還元活性が嫌気条件下で培養されたものより、著しく劣ることが知られている。これは好気培養の場合、呼吸源として硝酸塩は必要ではなく、また細胞合成のための窒素源としてはアンモニウムイオンが選択的に利用されるためと考えられる。このことが好氣的雰囲気において増殖活性に関係するかどうかを調べたのが、図1である。いずれもよく増殖したが、約7%程度基本培地から硝酸塩を取り除いた培地の方が良く増殖した。この7%の違いは硝酸イオン由来の阻害物質の蓄積によるものと考えられるが³⁾、硝酸イオンの存在が増殖に著しく阻害したとは言えない。むしろ、アンモニウムイオンが存在しない場合には硝酸イオンが細胞合成の窒素源として利用されることを考えると、適量の硝酸イオンは必要であろう。ただ、本実験で用いた基本培地中の硝酸塩の濃度は全イオン濃度の約50%に達し、多すぎることが考えられる。嫌气的条件下では、アンモニウムイオン、硝酸イオンが存在する場合にはアンモニウムイオンが細胞合成、硝酸イオンが呼吸

源として利用される⁴⁾。アンモニウムイオンが存在しない場合には硝酸イオンが細胞合成にも利用される⁴⁾。このことから、アンモニウムイオンの存否が嫌気培養において、

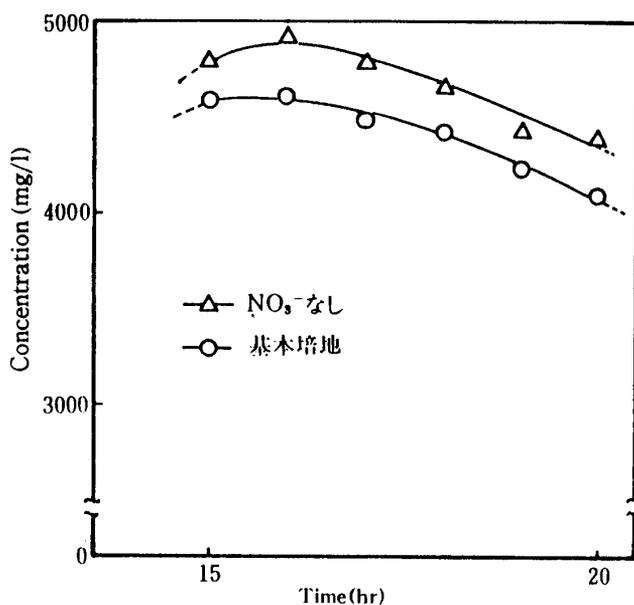


図1 好気培養におけるNO₃⁻の影響

増殖に影響することが考えられる。そこで、基本培地と基本培地からアンモニウム塩を取り除いたものについて、比較を行った。結果を図2に示した。両者ともよく増殖しており、20~22時間で最大濃度に達した。このことは硝酸イオンがアンモニウムイオンの利用のされかたと変わらない程度に細胞合成に利用されていることを示し、好気培養における硝酸イオンの役割とは全く異なる。アンモニウムイオンを含む場合がわずかに増殖速度において勝っているが、この程度では大差なく、むしろ嫌気培養の場合には必ずしも、アンモニウムイオンは必要としないと考えてよいのではなかろうか。

嫌気性では、硝酸イオンは脱窒菌により還元され、一部は亜硝酸イオンとなる。亜硝酸イオンの生成がどのように増殖に対して影響しているかを、基本培地の硝酸イオン濃度を変化させて調べた。結果を図3および表4に示した。

最もよく増殖したのは $4.95 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ (基本培地の二分の一)のものであった。硝酸イオンを $9.89 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ 含むものは、22時間までは前者と同程度の増殖速度であったが、22時間を越えたところで増殖は停止した。これは硝酸イオン濃度が、基本培地の十分の一しか含まれていないので、少なくなり過ぎたためと考えられる。硝酸イオン濃度が $9.89 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ (基本培地) のものは前

二者に比べて増殖速度は低下している。これは表4に示した通り、亜硝酸イオンが大量に生成したためと考えられる。亜硝酸イオンが脱窒菌の増殖を阻害していることは、硝酸塩の代わりに亜硝酸塩を $1.45 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$ 加え

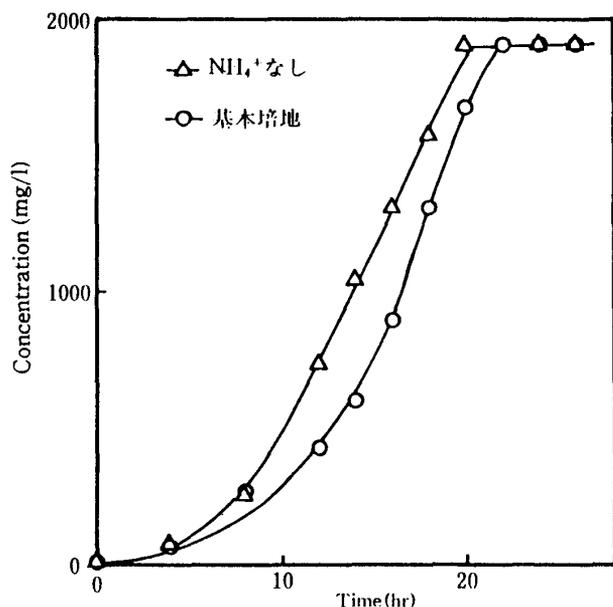


図2 嫌気培養における NH_4^+ の影響

た場合、ほとんど増殖しなかった(図3)ことから明らかである。このように嫌気培養であっても、また硝酸イオンの量が多くても少なくても、脱窒菌の増殖に対して影響のあることが示された。硝酸イオン濃度は $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ 程度が適当と思われる。

3-6 最大比増殖速度(μ_{\max})の決定

増殖速度を定量的に把握するために最大比増殖速度を求めた。P. denitrificansの脱窒活性は嫌気性において著しい。混合微生物集団中では嫌気性でなくても溶存酸素濃度が低い場合には硝酸イオンは還元される⁵⁾。しかし最も活性が優れているのは嫌気性の場合であるから、基本培地を用いて、嫌気培養における μ_{\max} を図4より求めた。図4は菌の初発濃度の異なる場合の2例を示したものである。指数増殖期は時間のずれのみで、ほぼ平行である。この結果より時間tにおける菌体濃度Xは

$$X = X_0 \exp(\mu_{\max} t), \quad \mu_{\max} = 0.151 (\text{hr}^{-1}) \quad (1)$$

と表わすことができる。これは Monod 型式において

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} X \quad (2)$$

K_S はある増殖制限基質の濃度依存性を表わす定数と考え

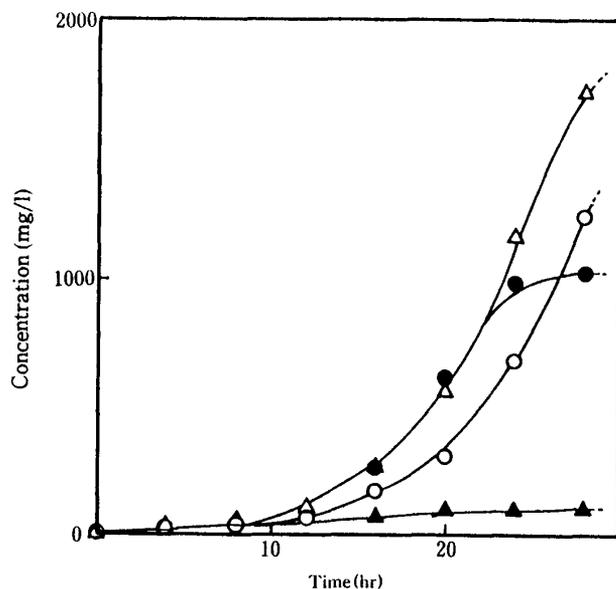


図3 嫌気培養における NO_2^- の影響

- $(\text{NO}_3^-) = 9.89 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$
- △ $(\text{NO}_3^-) = 4.95 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$
- $(\text{NO}_3^-) = 4.95 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$
- ▲ $(\text{NO}_2^-) = 1.45 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$

表4 嫌気培養における NO_2^- の影響

NO_3^- 初濃度 (mol/l)	* X_{28} (mg/l)	X_{28} における NO_2^- 濃度 (mol/l)
9.89×10^{-2}	1240	7.50×10^{-2}
4.95×10^{-2}	1720	2.40×10^{-2}
9.59×10^{-3}	1020	4.50×10^{-3}
1.45×10^{-1} **	100	1.44×10^{-1}

* X_{28} : 28時間後の菌体濃度

** NO_2^- 初濃度である。

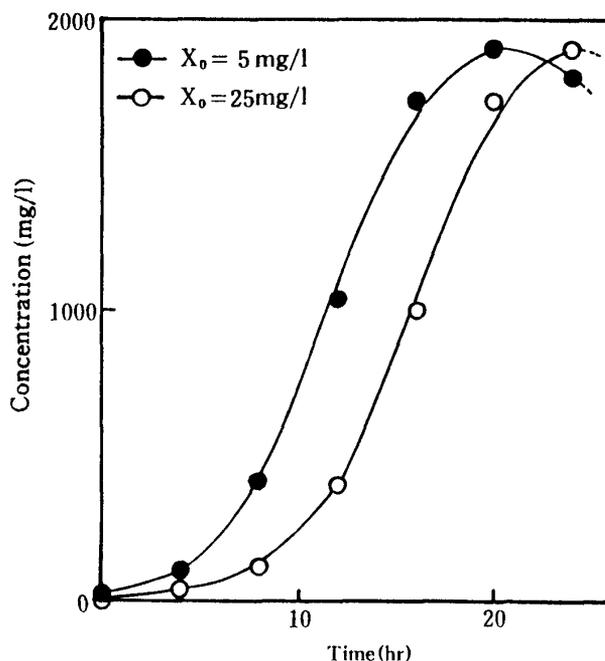


図4 基本培地による嫌気培養

られる。本実験では微量有効成分およびリン、窒素、酸素源等の成分が十分に存在するため、指数増殖期の増殖制限基質はクエン酸である。一般的に炭素源に対する K_s は極めて小さい。したがって、本実験では $K_s \ll S$ であるから(2)式は

$$dx/dt = \mu_{max}x \quad (3)$$

となり、(1)式に一致し、脱窒菌の指数増殖期の速度式は Monod 型式で表わすことができる。

4. 結言

P. denitrificans は通性嫌気性菌であることから、様々な因子の影響を受けることが明らかとなった。本実験で明らかになった点は次の通りである。

- (1) 好気雰囲気中で培養されたものの最大増殖濃度は、嫌気雰囲気中で培養されたものの約1.5倍であった。
- (2) 低 pH, 高 pH 領域では増殖はしなかった。高 pH 領域では菌は死滅したが、低 pH 領域では死滅しなかった。pH5.2~9.3というかなり広範囲の領域で増殖することが分かった。
- (3) 好気培養では、アンモニウムイオンが存在する場合には硝酸イオンは増殖に無関係である。多すぎるとイオン濃度の増大により、増殖が阻害される。嫌気培養では十分に硝酸イオンが存在すれば、アンモニウムイオンは必ずしも必要としない。
- (4) 嫌気培養において、過剰の硝酸イオンは多量の亜硝酸イオンを生成するため増殖が阻害される。少なすぎると増殖は不十分となる。 $5.0 \times 10^{-2} \text{mol/l}$ 程度が好ましい。

本実験により、増殖特性の一部を明らかにすることができた。しかし回分操作は非定常操作であるためまだ不

明な点が多い。連続培養を行うことにより、不明な点が明らかにされるはずである。そして連続培養を行なうことにより、最適 pH の決定、亜硝酸イオンの挙動の把握さらには連続培養における最適操作条件の決定などが期待される。

使用記号

t	: 時間 (hr)
t_{max}	: X_{max} に達する時間 (hr)
X	: 時間 t における菌体濃度 (mg/l)
X_0	: $t = 0$ における菌体濃度 (mg/l)
X_{max}	: 菌体の最大濃度 (mg/l)
μ_{max}	: 最大比増殖速度 (hr^{-1})
K_s	: 飽和定数 (mg/l)
pH_0	: 初発 pH
pH_{max}	: X_{max} 時における pH

参考文献

- 1) 石川宗孝: 曝気条件下における窒素除去に関する研究, 京都大学学位論文 (1985)
- 2) Yushi Nishimura et al. : Biochem. Biophys. Res. Comm. 87,140 (1979)
- 3) 山根恒夫: 生物反応工学, 産業図書 (1980)
- 4) 山岡邦雄: 脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) における硝酸還元活性について, 宇部工業高等専門学校研究報告, 28, (1982)
- 5) 深川勝之等: 完全混合型曝気槽による窒素除去, 京都大学環境衛生工学研究会, 第7回シンポジウム(1985) (昭和61年10月9日受理)