

悪臭物質の微生物的分解技術の開発

近藤徹弥*¹、森川 豊*²

Development of Microbial Degradation of Odors

Tetsuya KONDO*¹ and Yutaka MORIKAWA*²Food Research Center, AITEC*^{1,2}

アンモニア酸化菌を従属栄養菌の無い状態で取得し、継続的に培養することができた。分離株 (NIT3-1株)と脱窒菌の混合培養系におけるアンモニア分解能を評価したところ、本菌と *Paracoccus denitrificans* の組み合わせが最も良好であった。その際、セラミックス担体の存在が不可欠であり、セラミックス担体が硝化・脱窒の同時反応の場となることが示唆された。乳酸添加により有害な硝酸、亜硝酸を殆ど残存させずに培地中のアンモニアを初期の数%以下にまで分解できた。アンモニアガスを連続的に両菌の混合培養液に通気して気相アンモニアの連続分解試験を行ったところ、アンモニアの分解が確認された。

1. はじめに

アンモニアは、窒素化合物の分解によって生成する物質であり、その不快臭が問題となるだけでなく、高濃度の場合には身体にも悪影響を及ぼすことから、悪臭防止法や水質汚濁法の規制成分の一つに指定されている。アンモニアは、食品工業廃水やし尿等の処理現場でしばしば問題となるが、住環境下においてもトイレや下水口から発生する。また、タバコの煙や魚の水槽にも含まれている。さらに、超高齢化社会の到来により、介護現場等でのアンモニア臭除去のニーズが高まっている。こうしたことから、アンモニアを分解する技術が強く望まれている。

アンモニアを分解する手法には、大きく分けて物理化学的方法と微生物的方法がある。物理化学的方法のうち、吸着法では、吸着後の再放散の問題がある。光触媒やオゾン等を用いた酸化分解法では、アンモニアの酸化に伴い毒性の強い亜硝酸や硝酸が蓄積する。一方、微生物的方法は運転コストが低いいため、産業界、施設用、畜産関係の廃水処理施設等で利用されており、硝化と脱窒の2工程を経てアンモニアを無害な窒素に還元することができる。しかし、硝化と脱窒では全く異なる環境を要求するため、それぞれに対応した装置が必要とされている。

本研究では、アンモニア酸化菌による硝化と脱窒菌による脱窒過程を単一槽内で実現するため、セラミックス担体を硝化・脱窒の同時反応場として活用することを検討した。

2. 実験方法

2.1 微生物及び培養条件

アンモニア酸化菌NIT3-1株の分離は、以下のように行った。土壌試料を2.5 g/Lの硫酸アンモニウム (硫酸)を含むAOB培地 (表1)で集積培養した後、2.5 g/Lの硫酸と1% ゲランガムを含むAOB平板培地上に生育してきたコロニーを単離した。本菌はAOB培地で継代培養した。アンモニア分解試験には、AOB培地で数日間、30°Cで振とう培養したものをそのまま用いた。

脱窒菌として、*Alcaligenes faecalis* NBRC 14479 (Alf菌)、*Alcaligenes xylooxidans* NBRC 13495 (Alx菌)、*Paracoccus denitrificans* NBRC 12442 (Par菌)、又は *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137 (Arg菌)を用いた。いずれの脱窒菌も普通寒天培地で継代培養した。アンモニア分解試験に用いる菌液は、普通ブイヨン培地で一夜、30°Cで振とう培養したものを遠心分離後、同量の生理食塩水に懸濁して調製した。

2.2 セラミックス担体

セラミックス担体として、日陶科学 (株) より提供された担体A (球状、φ: 約1cm)を用いた。

表1 AOB培地の組成

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g
Na ₂ HPO ₄	13.5 g
KH ₂ PO ₄	0.7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
NaHCO ₃	0.5 g
FeCl ₂ ·6H ₂ O	14.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18.4 mg
Phenol red	2 mg
(Gellan gum	10 g)

蒸留水 1 L, pH8.0

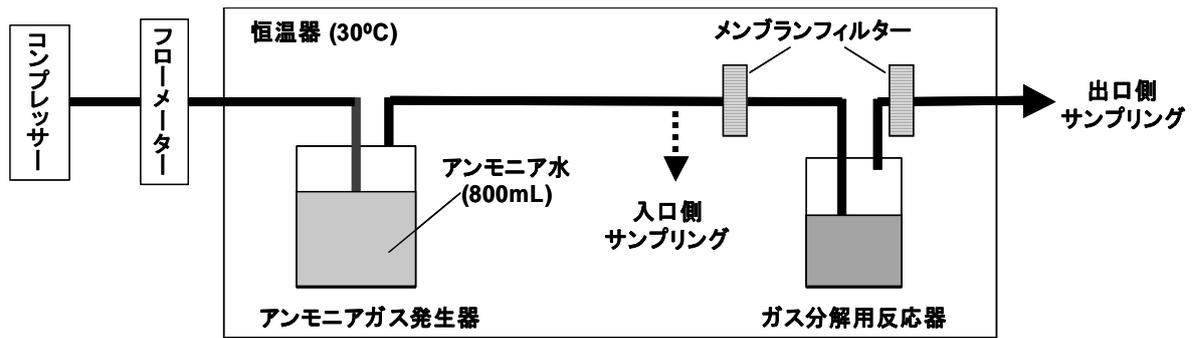


図1 アンモニアガスの連続分解装置

2.3 液相でのアンモニア分解試験

炭素源（グリセロール、エタノール、メタノール、乳酸、グルコース、又はスクロース）とアンモニア源として硫酸を含むAOB培地（6 mL）に、担体A（1粒）と菌液（培地の1/50量）を添加し、30℃で2週間振とう培養した。培養液中のアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の各濃度を測定し、それらの和を全窒素とした。初期の全窒素量を100としたときの各窒素の除去率を求めた。

2.4 気相アンモニアの連続分解試験

図1に示した分解評価系を用いた。ガス分解用反応器に、1% 乳酸ナトリウム含有AOB培地（300 mL）、担体A（60 g）、及び菌液（NIT3-1株：前培養液の10倍濃縮液を6 mL、Par菌：OD₆₀₀=10に調製した菌液を1.2 mL）を添加した。アンモニア水溶液の入ったアンモニアガス発生器にコンプレッサーで空気を吹き込み、70~100 ppmのアンモニアガスを発生させ反応器に導入した。反応器前後のアンモニアガス濃度を経時的に測定し、次式に従ってアンモニア除去率を求めた。

$$\text{アンモニア除去率(\%)} = 100 \times (\text{入口アンモニアガス濃度} - \text{出口アンモニアガス濃度}) / \text{入口アンモニアガス濃度}$$

アンモニアガスの通気量は50 mL/minとした。系全体は、30℃に設定した恒温器内に配置した。アンモニアガス発生器中のアンモニア溶液は、2~3日おきに交換した。対照試験区（Cell-free試験区）として、菌液の代わりに生理食塩水を同量添加した反応器を別途用意して、同様にアンモニアガスを通気した。

2.5 成分分析

液中のアンモニア態窒素の測定には、インドフェノールブルー法、又はα-ナフトール法を用いた^{1), 2)}。亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の測定にはHPLC法（島津製作所製、カラム：Shinapak-SA2, 検出波長：210 nm）を用いた。気相アンモニア測定には、検知管（北川式）を用いた。

3. 実験結果及び考察

3.1 アンモニア酸化菌 NIT3-1株の取得

汚泥より集積培養後、ゲランガムを固定基として用い

たAOB平板培地で画線培養して、生育してきたシングルコロニーをアンモニア酸化菌 NIT3-1株として単離した。本菌は、グラム陰性の単桿菌であり、アンモニアから亜硝酸を生成した。本菌は、寒天培地上では生育せず、ゲランガム添加AOB培地上でのコロニーは白色で1 mm以下の大きさであった。普通栄養液体培地では生育せず、完全無機塩培地（炭素源として炭酸塩、窒素源としてはアンモニア塩）で生育する独立栄養細菌であった。

3.2 NIT3-1株の硝化能に及ぼす硫酸濃度の影響

硫酸濃度を変えたAOB液体培地（担体無し）を用いて、NIT3-1株の硝化能を調べた。図2に示すように、アンモニアは亜硝酸に変換され、硝酸は検出されなかった。このことは、本菌がアンモニアを亜硝酸にまで酸化し、硝酸までは酸化しないことを示している。硫酸濃度が2 g/L以上になると硫酸濃度の増加とともに残存アンモニア量が増加した。2週間後にアンモニアが残存した培地のpHを測定したところ、いずれもほぼpH6.4であった。このことから、亜硝酸の蓄積に伴うpH低下によりアンモニア酸化菌の硝化能が低下したと考えられた。

3.3 NIT3-1株及び脱窒菌のアンモニア酸化

アンモニア酸化菌は好気的環境下でアンモニアを亜硝酸や硝酸に酸化する（硝化）。一方、脱窒菌は一般に嫌気的環境下で亜硝酸や硝酸を窒素にまで還元する（脱窒）

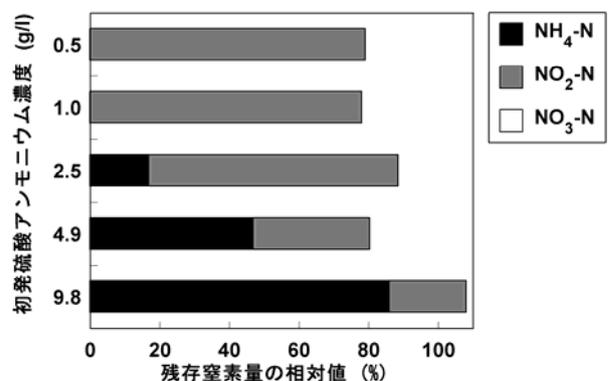


図2 NIT3-1株の硝化能に及ぼす硫酸濃度の影響
2.5 g/L 硫酸を含む AOB 培地にグリセロールを 1% 添加して 2 週間、30℃で振とう培養した。

が、微好気環境下で硝化・脱窒を行う菌の存在も報告されている³⁾。そこで本実験条件下で、NIT3-1株及び4種の脱窒菌についてアンモニアの減少、及び亜硝酸や硝酸の生成を調べた(図3)。その結果、アンモニア分解についてはNIT3-1株が最も良好であった。本菌は、アンモニア態窒素を初期の10%にまで低下させ、1%グリセロール存在下でも40%にまで低下させた。しかし、アンモニア酸化に対応して亜硝酸が生成したため、全窒素の除去率は20%未満であった。脱窒菌については、Par菌のみが1%グリセロール存在下でアンモニア態窒素を初期の50%以下まで分解し、しかも亜硝酸や硝酸が蓄積しなかった。このことから、本実験条件下でPar菌が硝化・脱窒を同時に行うことが示唆された。

そこで、最もアンモニア酸化の良好なNIT3-1株と硝化・脱窒能を持つPar菌の組み合わせによるアンモニア分解について検討した(図4)。NIT3-1株単独培養では、担体Aが無い場合、アンモニア態窒素は初期の50%未満にまで分解されたが、その分、亜硝酸態窒素が生成した。

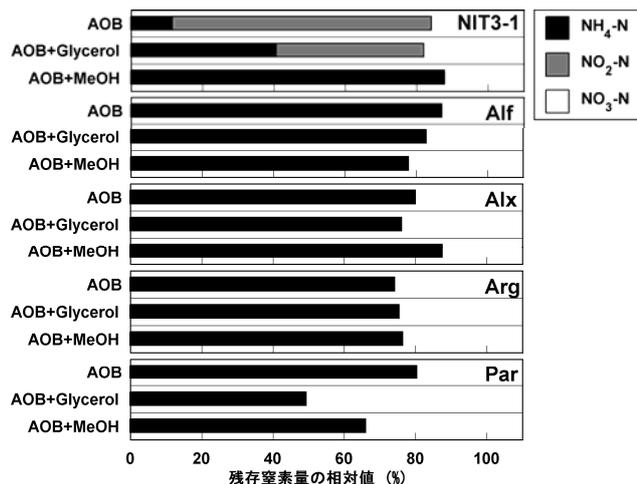


図3 NIT3-1株及び脱窒菌のアンモニア酸化能

2.5 g/L 硫酸を含む AOB 培地に炭素源として 1% グリセロール、1% メタノールを添加、又は添加しない条件で 2 週間、30°C で振とう培養した。

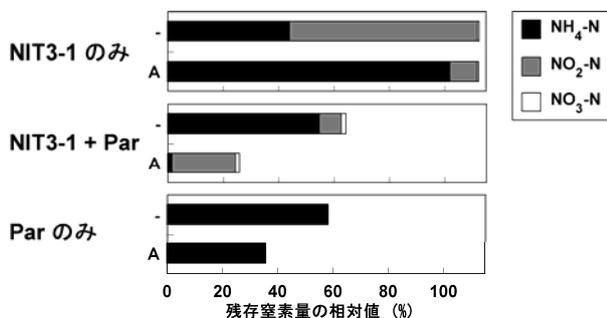


図4 NIT3-1株とPar菌との組み合わせ

2.5 g/L 硫酸及び 1% グリセロールを含む AOB 培地に担体 A 添加 (A)、又は添加しない (-) 条件で 2 週間、30°C で振とう培養した。

担体Aを共存させると、アンモニア分解が低下した。Par菌単独培養の場合、アンモニア態窒素の減少にも関わらず亜硝酸が蓄積しないことが再確認された。このとき、担体Aが共存するとアンモニア除去率が高まることもわかった。混合培養の場合、亜硝酸及び硝酸の蓄積が認められるものの、担体A存在下では、残存アンモニア態窒素が数%以下にまで減少し、全窒素も初期の30%以下に低下した。これらのことから、担体A存在下で、両菌の混合培養をすると、液中のアンモニアを分解するだけでなく、全窒素も減らせることがわかった。

全窒素除去の効率化を図るために、担体A存在下でNIT3-1株とPar菌を混合培養する際の炭素源の種類について検討した(図5)。炭素源を添加しない場合、2週間培養後もアンモニア態窒素は約80%残存した。グルコース、スクロース、又はグリセロールを添加した場合、アンモニア態窒素は初期の10%以下にまで低下したが、代わりに亜硝酸及び硝酸態が生成した。エタノールやメタノールでは、亜硝酸や硝酸は生成しなかったもののアンモニア態窒素は初期の40%以上残存した。乳酸の場合、初期の2.8%にまでアンモニア態窒素は低下し、しかも亜硝酸及び硝酸は生成しなかった。このことから、本系のアンモニア除去においては乳酸の添加が最も効果的であることがわかった。

3.4 気相アンモニアの分解

以上の結果を基に、気相中のアンモニアを液相に通気・吸収させて分解させることを試みた。

図6Aに示したように、実験開始1日後まではNIT3-1株とPar菌を接種しないCell-free試験区においても、アンモニア除去率はほぼ100%であった。これは通気したアンモニアが反応容器内の液中に吸収されたためと考えられた。その後、時間経過とともに出口側のアンモニアガス濃度が増加し始め、10日後には除去率は約40%にまで低下した。反応容器中のアンモニア態窒素もそれに対応

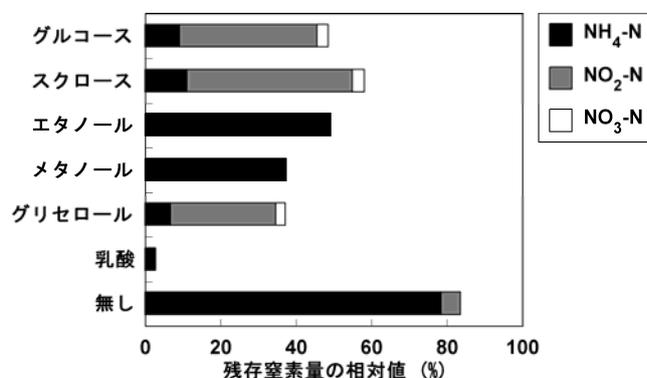


図5 様々な炭素源のアンモニア除去への影響

2.5 g/L 硫酸及び担体 A を含む AOB 培地に炭素源を 1% 添加して 2 週間、30°C で振とう培養した。

して増加した (図 6B)。

一方、NIT3-1株とPar菌を接種した試験区では、11日後まではアンモニア除去率はほぼ100%を達成しており、液中のアンモニア濃度も非常に低かった。また亜硝酸、硝酸は検出されなかった (結果は図示せず)。このことは、気相から導入されたアンモニアガスがNIT3-1株とPar菌により硝化・脱窒を経て分解されていることを示唆している。その後、菌添加試験区においても、アンモニア除去率が低下し、それに伴い反応液中のアンモニア濃度も増加した。そこで乳酸ナトリウムを添加したが、アンモニア除去率は回復しなかった (結果は図示せず)。アンモニア除去率が回復しない理由として、乳酸ナトリウム以外の栄養成分の枯渇や乳酸ナトリウムの添加時期が遅かった等により、NIT3-1株やPar菌の活性が低下したためと考えられた。

いずれにしろ本実験により得られた結果は、セラミック担体共存下におけるNIT3-1株とPar菌の混合培養系が、外部から導入したアンモニアガスを除去できる可能性を示している。今後、アンモニア負荷量や菌体の調製法、アンモニアガスの分解に適した培地組成の最適化を図る

ことにより、アンモニアガスのより効率的な除去装置が構築できると考えられる。

4. 結び

自然界より取得したアンモニア酸化菌NIT3-1株を脱窒菌と混合培養する系を用いてアンモニア分解を試みた。その結果、単一槽内での硝化・脱窒を効率的に進行させる上で、セラミック担体 (担体A)及び乳酸の添加が効果的であることがわかった。さらに本系において気相のアンモニアを分解できる可能性が示された。

文献

- 1) JIS K 0099, 排ガス中のアンモニアの分析方法 (2004)
- 2) 日本水道協会:上水試験法, P184 (1993), 日本水道協会
- 3) H-S. Joo, M. Hirai and M. Shoda: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 184 (2005)

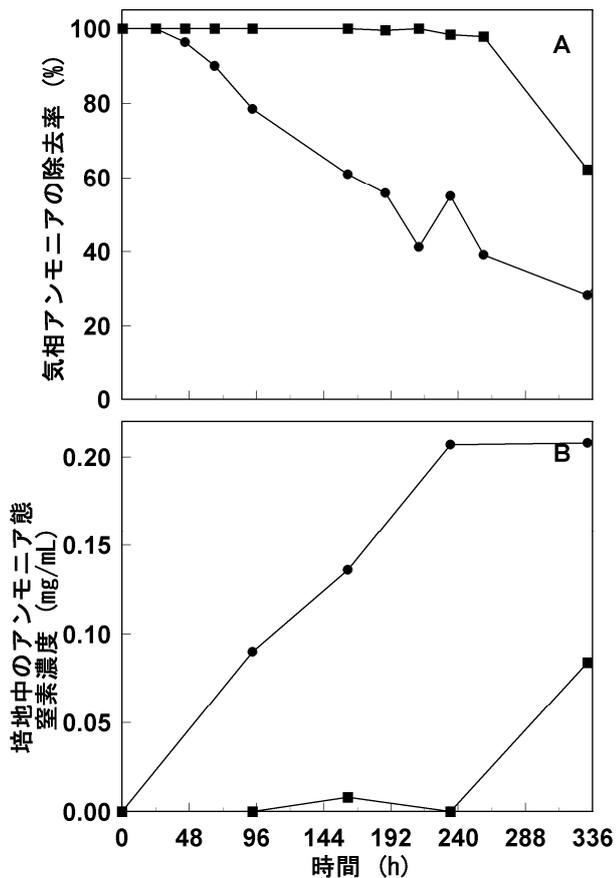


図 6 気中アンモニアガスの分解試験

A: アンモニア除去率, B: 反応容器中のアンモニア態窒素濃度
NIT3-1 株及び Par 菌接種 (■)、菌接種せず (●)