

高分子ろ材を用いた脱窒菌高密度培養法の検討

田中 孝国^{*1}, 池田 元気^{*2}, 齋藤 央樹^{*3}

Evaluation of High Density Cultivation for Denitrification Microbe using Porous Materials

Takakuni TANAKA, Genki IKEDA, Hiroki SAITOU

Denitrifying bacteria (*Pseudomonas stutzeri*) performs denitrification of waste water under anaerobic condition. Generally, this bacterium for waste water treatment is operated high density cultivation (high concentration bacteria shows high removal rate of ammonium nitrogen). However, this bacteria shows float in medium and flow outside a bioreactor. Therefore, this bacterium has to be immobilized on polymer carrier. In this study, we try to immobilize of *P. stutzeri*, and evaluate culture conditions by removal of ammonium nitrogen. We got the following results, (1) *P. stutzeri* adheres to carrier in culture medium, (2) PU (polyurethane) carries strongly adhere *P. stutzeri*.

KEYWORDS: *Pseudomonas stutzeri*, denitrification, high density culture

1. 緒言

我々の排出する廃水中に含まれる窒素(N)成分の除去方法は、大別するとアンモニアストリッピング法、不連続点塩素処理法、イオン交換法、生物学的処理法の4種があり実用化されている¹⁾。これらの中でも活性汚泥法に代表される生物学的処理法は、あらゆる窒素成分の分解処理に対応し、二次産物を出さないことから、広く用いられている方法である。

生物学的方法では、廃水中の有機態窒素は、有機態窒素の酸化(硝化反応)、窒素酸化物の窒素ガスへの還元(脱窒反応)により分解処理されている。硝化反応では、亜硝酸菌及び硝酸菌により好気条件下で硝酸性窒素に変換される。脱窒反応では嫌気条件下、脱窒菌によって窒素ガスにまで分解が進むことが知られている。廃水処理の代表例である活性汚泥法では硝化・脱窒処理のために、好気・嫌気槽を設けて分解を促進している(実際はリンの処理も行うため、もう1つの槽を接続したA₂O方式と呼ばれる方法が主である)²⁾。しかし、活性

*1 物質工学科 (Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail:tanakatakakuni@oyama-ct.ac.jp

*2 物質工学科5年 (Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering)

*3 専攻科物質工学コース1年 (Advanced Course of Materials Chemistry and Bioengineering)

汚泥は浮遊微生物(群)の集合体であることから、処理後に汚泥を処理水と沈降分離によって分け、返送汚泥として曝気槽などに戻す操作が必要である。活性汚泥濃度を設定濃度以上にすると、硝化-脱窒反応が進行する一方で、沈降分離(固液分離)に多大な時間を要し、結果的に処理時間の増加に結びついてしまうことが大きな問題である³⁾。

従って、活性汚泥濃度を設定濃度以上にしつつ固液分離を容易にする方法として、高分子素材で構成されている多孔質担体を廃水処理槽に添加した生物付着固定化法が広く使用されている^{3,4)}。この手法は、硝化細菌やその他の浮遊微生物種が固形担体に付着する性質を持つ^{4,5)}ことや、汚濁成分も担体に付着する⁶⁾こと、担体に付着した微生物種による汚濁成分の取り込み効果⁷⁾もあることが報告されている。更に、担体による微生物の凝集・高密度化が進行すると同時に、担体に固着した微生物(群)は、浮遊状態よりも処理廃水とふり分けし易いサイズにまとまるという利点を持っており、下流プロセスでの利点も大きい¹⁾。

前報⁸⁾で我々は、脱窒菌の脱窒反応の効率的運転法等について検討を行ってきたが、脱窒菌は浮遊性であるため、培養槽から流出しやすく、硝酸性窒素分解能も進行しなくなるという問題があった。そのため、強い脱窒作用を持つ培養槽を構成するには、高密度脱窒菌培養条件の検討が必要不可欠であった⁹⁾。

我々は今回、企業より高密度化培養の基礎データ収集のために、高分子素材である PE-PP(ポリエチレン-ポリプロピレン)を提供された。PP-PE 担体は、不織布であるため表面積が広く、担体の内部まで貫通した細孔が多数存在するので、培養時に内部に侵入した微生物がそのまま保持されることが期待できる。更に、生物付着能はそれほど高くないものの、洗浄して再利用性が望めることも利点であると考えられる(雨水などの粗ろ過プロセスに良く見られる)。今回は、比較実験として、同サイズ同形状の PU(ポリウレタン、市販品)を用いた。PU は、強い微生物付着能、水溶液中に溶解している化合物などの吸着能を有する多孔質素材である¹⁰⁾ため、比較用担体として採用した。

我々は、この 2 種の担体を用いて脱窒菌の高密度化法とその硝酸性窒素処理能の評価試験を行ったので報告する。

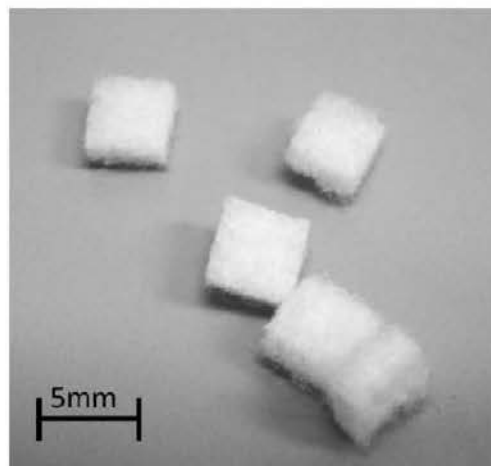


図 1 PE-PP 製の高分子担体
(1 つが 5.0×5.0×3.5mm サイズ)

2. 実験方法

脱窒菌の前培養として、*Pseudomonas stutzeri* (通性嫌気性細菌, NBRC13596) を、NBRC 指示書に従って、好気下で振とう培養を 24 時間行い増殖させた。実験に用いた脱窒菌は以下の手順で作成した。まず、入手した乾燥細菌を復水させた後に、指定培地で培養(増殖)を行い、約 1mL ずつマイクロチューブに培養液を分注し、各々に滅菌したグリセロールを 30%重量濃度になるように添加して混合液を作成し(グリセロールストック)、良く混ぜ合わせた後、-30~-40℃の冷凍庫で急冷し、以後の研究に用いる脱窒菌保存株とした。

本実験は嫌気条件下、3 種の条件で脱窒菌の連続培養を行うことで評価した。実験器具として、セパラブルフラスコを簡易脱窒菌培養槽とし、図 2 のようなバイオリアクターを組み立て、表 1,2 の Giltay 培地 (KNO₃ を含む *P. stutzeri* (脱窒菌) 増殖用培地、pH7.0~7.2)⁵⁾ をそれぞれ混ぜ合わせ、オートクレーブ滅菌を行った。

図-2の滅菌後に、脱窒菌を無菌的に 5mL 加えたものを control とした(担体を入れない条件)。続いて PE-PP 製の担体と脱窒菌を 5mL 加えたものを条件 1、PU 製の担体と脱窒菌を 5mL 加えたものを条件 2 とした。control、条件 1、条件 2 は脱窒菌を加えてから好気培養で 3 日間回分培養を行い脱窒菌の増殖を行ってから、Ar ガスを通気して嫌気条件下にし、脱窒反応を開始した。培養条件は恒温槽温度 25-30℃、攪拌速度 150rpm、培地流入流出速度を 0.25mL/min とし、連続培養を行った。

Ar ガスの通気は、1 日置きに行った。尚、図-2 のバイオリアクターに投入した担体量は、活性汚泥への研究報告で効果が見られた基礎データを基に培養液の総体積の 1/8 とした¹⁰⁾。

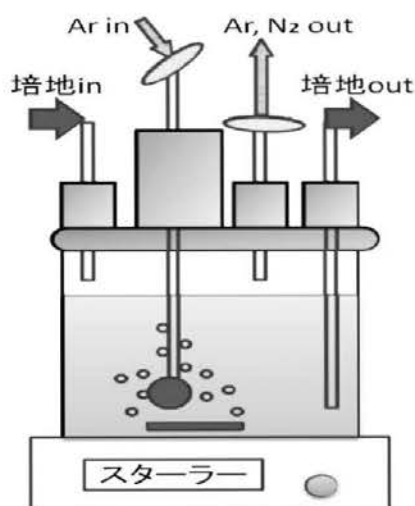


図-2 脱窒菌バイオリアクター

(Ar ガスの通気は滅菌フィルター(図中の丸いパーツ)を介して行った。培養中のサンプリングは、培地 out に接続した流出チューブより行った。培地 in 及び out は逆流防止弁付きであり、連続運転を定量ポンプによって行った)

表 1 Giltay 培地の組成 A

脱窒細菌用培地 (Giltayの培地) - A	
KNO ₃	1.0g
L-アスパラギン	1.0g
BTB溶液(1w/v%)	5.0mL
Distilled water	500mL

表 2 Giltay 培地の組成 B

脱窒細菌用培地 (Giltayの培地) - B	
クエン酸ナトリウム	1.0g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.0g
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.05g
KH ₂ PO ₄	1.0g
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.2g
Distilled water	500mL

培養中の測定項目は、脱窒菌の流出量濃度 (まず分光光度計にて OD660 を測定し、乾燥重量 [mg/L] = 2.63 × OD660、の実験的に得られた換算式で算出した)、硝酸性窒素濃度、pH の 3 項目の測定を行った。硝酸性窒素濃度は、迅速水質分析計 DR/850 (HACH 社、カドミウム還元法) を使用した。我々は同時に文献¹⁰⁾に基づいた、ろ材中の脱窒菌濃度の測定も試みたが、本実験では有意な差は見られなかったため、データは記載していない。

3. 実験結果及び考察

脱窒に高分子ろ材の担体を用いていない場合 (control)、PE-PP を担体として用いた場合 (条件 1)、PU を担体として用いた場合 (条件 2)、それぞれのバイオリアクター内からの脱窒菌流出量の変化を図-3 に示し、硝酸性窒素濃度の変化を図-4、培養中の pH の変化を図-5 に示した。

図-3 より脱窒菌の流出量に関しては、条件 1、2 共にバイオリアクター内からの流出量が少なく、control と比べ担体を用いることでバイオリアクター内に脱窒菌を保持する効果が非常に高くなることが判明した。図-3 の流出量のデータからは、条件 1, 2 の脱窒菌保持能力の差は見られなかった。両担体の培養時の大きな差は、条件 2 の担体が培養液中に含まれる BTB (プロモチモールブルー、酸・塩基指示薬、pH < 6.0 で黄色、pH > 7.6 で青色、中間では緑色) を吸着除去し、培養液を透明にしたことである。複数回の実験においても、BTB 吸着による乾燥重量や硝酸性窒素濃度の変化は見られなかったため、この効果は以後の実験結果に影響なしと判断した。control の示す流出量の変化は、担体投入の場合と比較して安定してはならず、培養初期の好気下の回分培養時の脱窒菌の増殖に合わせて流出量も増えており、浮遊性脱窒菌の高密度化が担体なしでは難しいことが示唆された。

担体内部への脱窒菌の付着具合については、2. 実験方法に記述した通り、明確な違いは見られなかった。また、顕微鏡等による観察においても、明確な差は把握出来なかった。脱窒菌の流出量と担体への保持量の関係は比例しないことと、担体への保持の限界量を把握して最適な担体投入量などを解析するために、今後この評価法を再考したい。

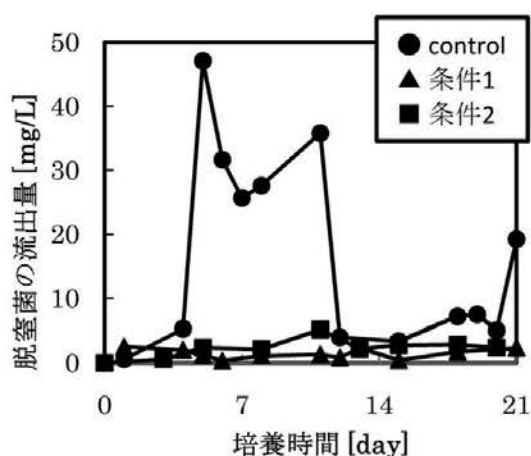


図-3 各培養時間における
脱室菌流出量の乾燥重量の変化

図-4 より、硝酸性窒素濃度の変化に関しては control に比べ条件 1、条件 2 共に早い日数で低濃度まで硝酸性窒素を分解していることが確認された。一方で、条件 1, 2 の培養 10 日以降を比較すると条件 1 は硝酸性窒素の分解能の低下が起きているのに対し、条件 2 は分解能を安定的に維持していた。このことより条件 2 の PU の担体が脱室の際の担体として優れていると考えられた。条件 1 で起きた事象の要因として考えられることは、PE-PP 担体に形成された脱室菌の微生物膜の剥離・流出であったが³⁾、流出量(図-3)では変化が見られていないこと、後述の pH 上昇(図-5)による脱室菌の死滅も考えにくいことから原因は不明である。

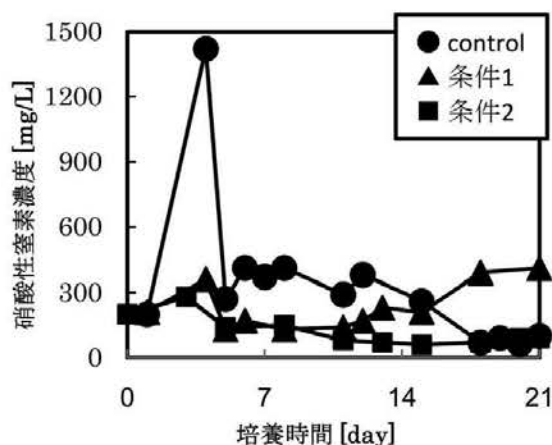


図-4 各培養時間における
硝酸性窒素濃度の変化

この PE-PP 担体は再使用が可能であり、洗浄後

に再び用いることが出来た。使用後の PE-PP 担体を水で洗浄後に、次亜塩素酸を低濃度含む市販の洗浄液に一晩漬けた後に、再び水で十分に洗浄すると、新品時と同様に使用することが可能であった。再使用の脱室実験でも新品時と同様の結果が得られている(データは未記載)。一方で、PU 担体の再使用は素材が洗浄に耐えられなかったことから出来なかった。

図-5 は、pH の変化を示したグラフである。pH は、いずれの条件においても培養の期間において、今回使用した脱室菌 *P. stutzeri* の生育環境である 7.0~9.0 の間を推移していた。PU 担体を投入した条件 2 の場合、pH が 8.0 前後を示していたことから、硝酸性窒素の分解を最も示していることが判明した(硝酸性窒素濃度が高いと溶液は酸性側に傾く)。通常、脱室過程では pH が上昇することが知られており¹²⁾、今回の PU 製のデータは、その傾向を示していることが判明した。今後 21 日以上脱室を行い、pH 調整のタイミングについても知見を得たいと考えている。

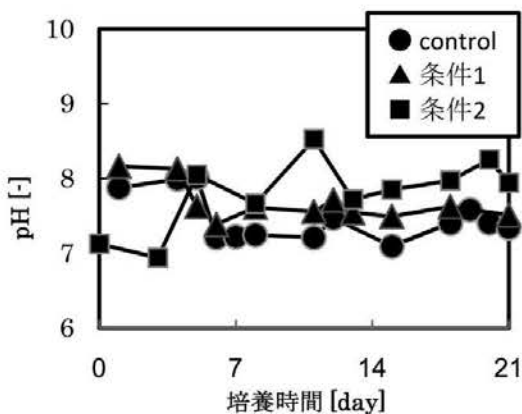


図-5 各培養時間における pH の変化

硝酸性窒素濃度は、今回得られたデータで最も低い場合でも約 60-70mg/L であった。処理後に放流する場合は、条例や法改正で変動はあると思われるが現在の処理濃度以下を安定的に示さなければならない。従って、より脱室を進めるために、水素供与体(メタノールなど)や資化しやすい栄養源の添加を別途考慮する必要がある^{4,9,12)}。脱室を進行させる電子供与体や栄養源は、安価で定期的に入手可能な物質が理想的であるため、今回のデータを基に、これらの追加投入の検討を進めていく予定である。

以上の結果より、担体を使用した場合はいずれ

も脱窒菌を保持し、硝酸性窒素の分解を早い段階から安定的に示すことがわかった。特に PU は、安定した脱窒が可能なことが判明した。

4. 今後の予定

脱窒反応を進めるため補助栄養剤である有機物(共同研究先より提供された乾燥生ゴミ廃材^{4,5)})の添加を行い、脱窒と高密度化を促進させる予定である。

参考文献

- 1) 和田洋六：実務に役立つ水処理の要点，工業調査会，pp.190-193 (2008)
- 2) 常田聡，他：ステップ流入式嫌気/好気/無酸素プロセスによる窒素・リン同時除去，用水と廃水，Vol.47，No.3，pp.56-62 (2005)
- 3) 森直道，他：高濃度アンモニア性窒素耐性菌による窒素処理技術，化学装置，pp.36-41 (2004)
- 4) 大澤善次郎，他：種々の高分子材料による排水中窒素の生物学的除去方法の比較，マテリアルライフ学会誌，Vol.17，No.2，pp.67-71 (2005)
- 5) 須藤隆一編：環境微生物実験法，講談社，p.265 (1997)
- 6) 佐々木功，他：担体を用いた活性汚泥法による高濃度窒素の処理について，第 37 回下水道研究発表会講演集，pp.641-643 (2000)
- 7) 鈴木良地，他：畜産浄化槽処理水に対する各種資材の吸着能力調査，愛知農総試研報 38，pp.181-185 (2006)
- 8) 田中孝国，他：セメント固化微生物製剤による廃水処理技術の検討，小山高専紀要第 42 号，pp.147-152 (2010)
- 9) 田中孝国：乾燥生ゴミを用いた固化微生物製剤の開発，化学工学会誌，Vol.74，No.2，pp.76-78 (2010)
- 10) ケイ新会，他：多孔質ポリウレタンの流動粒子に担持した微生物群による有機質および窒素の同時除去，水質汚濁研究，Vol.14，No.2，pp.127-130 (1991)
- 11) 田中淳一：高度廃水処理用担体に付着する硝化細菌群の解明，塗料の研究，No.139，pp.2-11 (2002)
- 12) 森長久豊，他：微生物の活性炭への付着が微生物活性に及ぼす影響，Vol.24，No.4，pp.240-243 (2001)

[受理年月日 2010 年 9 月 15 日]

