



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | PEG固体化担体から単離したアンモニア酸化細菌の生理特性  |
| Author(s)        | 高嶋, 美幸; 能登, 一彦; 角野, 立夫 他  |
| Description      | 第6回衛生工学シンポジウム (平成10年11月5日 (木) -6日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 6 水処理<br>2 . 6-3           |
| Citation         | 衛生工学シンポジウム論文集, 6, 211-215   |
| Issue Date       | 1998-11-01  |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/7351">https://hdl.handle.net/2115/7351</a> |
| Type             | departmental bulletin paper   |
| File Information | 6-6-3_p211-215.pdf  |



## 6-3 PEG 固定化担体から単離したアンモニア酸化細菌の生理特性

日立プラント建設(株) ○高嶋美幸, 能登一彦, 角野立夫  
工業技術院資源環境研 諏訪裕一

### 1. はじめに

下水やし尿などの廃水中には有機物と共にアンモニア性窒素が含まれ、これが閉鎖性水域の富栄養化を引き起こすことから、廃水処理施設での除去が求められている。廃水中の窒素除去は、微生物による反応を利用した生物学的方法が用いられている。生物学的窒素除去プロセスでは、硝化(アンモニア酸化, 亜硝酸酸化)反応と脱窒反応を組合わせて用いるが、この中でアンモニア酸化過程は最も律速になりやすく、窒素除去能全体を大きく左右する過程である。アンモニア酸化を担うアンモニア酸化細菌の微生物学的な検討は、これまで比較的培養が容易とされる *Nitrosomonas europaea* を中心になされてきたが、実際の窒素除去プロセス中には、かなり多様なアンモニア酸化細菌が存在することが知られるようになってきた。生理的な性質の多様性の例として、アンモニア酸化速度に関するアンモニア濃度の半飽和定数や、高濃度アンモニアに対する感受性が異なる菌株の存在が明らかにされている(表1)<sup>1)</sup>。*N. europaea* は高濃度のアンモニアに非感受性のアンモニア酸化細菌(AH菌)であるが、下水処理活性汚泥中で優占しているのは、高濃度アンモニアに増殖が阻害され低濃度のアンモニア存在下ではAH菌よりも増殖が有利である菌種(AL菌)である<sup>1)</sup>。しかしAL菌の生理学的特性に関する知見はまだ非常に少ない。平板培地にコロニーを形成できないAL菌は純粋分離が難しく、ようやく単離されたAL菌も継代培養中に活性の低下や死滅がしばしば起こることがその一因である。

そこで下水処理活性汚泥の硝化能が最大限に得られる条件を探るための基礎検討として、AL菌を含む各種アンモニア酸化細菌の生理特性を調べることにした。今回は一般にアンモニアの硝化に対して影響の大きいとされるpHのほかに、尿素代謝性、塩濃度などの培地性状について検討した。

表1 AH菌とAL菌の違い<sup>1)</sup>

|     | $K_m$ (mM) | NH <sub>4</sub> -N 1000mg/l での増殖 | NH <sub>4</sub> -N 20mg/l での増殖 |
|-----|------------|----------------------------------|--------------------------------|
| AH菌 | 0.89       | ○                                | ○                              |
| AL菌 | 0.017      | ×                                | ○                              |

### 2. 実験方法

#### 供試菌株

活性汚泥から分離したGH22, 人工廃水を供給した実験室活性汚泥からの分離したAL212<sup>1)</sup>, 活性汚泥をPEGで包括固定した高濃度アンモニア処理PEG硝化担体から分離したHPC101, HPC202, 埋立地浸出水処理PEG硝化担体から分離したIL-6, 下水処理PEG硝化担体から分離したML-1株, および *Nitrosomonas europaea* ATCC25978 の計7株の独立栄養アンモニア酸化細菌を供試した。IL-6, AL212, ML-1の3株は高濃度では増殖不可能なAL菌であり, HPC101, HPC202, GH22

と ATCC25978 の 4 株は高濃度で増殖可能な AH 菌である。

### 培養方法

硫酸アンモニウムまたは尿素を 2 mM 含有し、リン酸緩衝液で pH を調整した無機塩培地（約 15 mM リン酸緩衝液,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 50 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 20 mg/L, 微量元素(ATCC#1573); 1 mL/L) に, NaCl を適宜加えて過減菌し, 乾熱滅菌した試験管に 7 mL ずつ無菌的に分注した。各菌株を硫酸アンモニウムを窒素源とする無機塩培地で培養した前培養液を 1/10 の濃度に希釈し, これを約 0.1 mL 植種した。同じものを 2 連ずつ調整し, アルミキャップをして 27°C で静置培養した。1 カ月間培養後, 培養液中の亜硝酸性窒素濃度を分析した。

## 3. 結果および考察

### pH の影響

培地 pH が硝化に伴う亜硝酸の生成に及ぼす影響を, HPC202, IL-6 の 2 菌株について比較した (図 1)。pH7.0 未満では, 極端に亜硝酸の生成量が低下し, 特に AL 菌である IL-6 では 1 ヶ月間の培養で亜硝酸がまったく生成されなかった。AH 菌である HPC202 株は pH7.0 と pH8.0 のどちらの場合も 1 ヶ月で完全にアンモニアを亜硝酸に変換した。IL-6 株は 1 ヶ月間の培養ではまだアンモニアが残存していたが, pH7.0 よりも pH8.0 の方が亜硝酸生成量は多かった。一般に 7.0 未満の低 pH では, 独立栄養アンモニア酸化細菌が基質として利用できる  $\text{NH}_3$  の大部分が化学平衡の移動で  $\text{NH}_4^+$  にイオン化するため増殖が困難になり, 特に pH6 以下のバッチ培養では全く増殖できないことが知られている<sup>2)3)</sup>。今回の実験でも, これを裏付ける結果が得られた。しかしながら, 環境中では酸性条件下でもアンモニアの硝化が起こることがしばしばあり, 活性汚泥でも条件によって pH5~6 で硝化の起こることがある。Allison らによると, 低 pH 条件での硝化反応は, 好酸性あるいは耐酸性の従属栄養硝化微生物によって硝化されている場合と, 酸性環境中でも尿素などを加水分解する微生物や, その他の従属栄養細菌が形成する生物膜やフロック内部で, 二酸化炭素やアンモニアの生成によって pH が上昇した微小空間内で, 独立栄養硝化細菌の硝化が進行する場合の 2 つの可能性が考えられるとしている<sup>2)</sup>。後者に関して彼らは *Nitrosomonas europaea* の

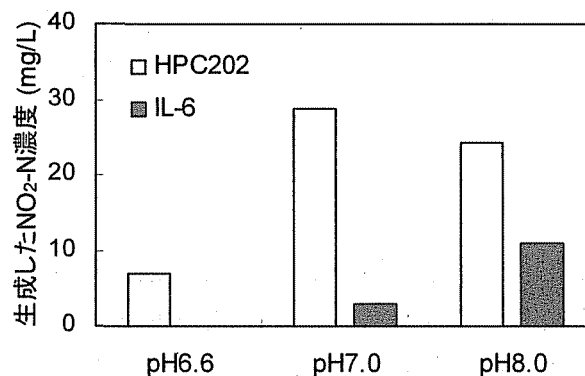


図1 アンモニア酸化に対するpHの影響

砂カラムでの連続培養において、pH6 での純粋培養が可能であったと報告している<sup>3)</sup>。実際の混合微生物系での硝化に対する pH の影響はこれらの効果を考慮する必要があると考えられた。

### 尿素の代謝

次に各菌株の尿素代謝性の有無を、AH 菌である HPC101, HPC202, GH22, *N. europaea* ATCC25978 および AL 菌である IL-6, AL212, ML-1 の 7 株のアンモニア酸化細菌について調べた (図 2)。尿素を亜硝酸にまで変換したのは IL-6, AL212, ML-1 の 3 株の AL 菌で、AH 菌はすべて尿素を亜硝酸に変換することはできなかった。Suwa らの検討では単離した AL 菌 4 株中 3 株が尿素を亜硝酸にし、AH 菌は 1 株だけ尿素代謝能を有しただけで残り 9 株には無かったとしている<sup>1)</sup>。他に尿素代謝可能なアンモニア酸化細菌として報告されているものに、*Nitrospira* sp. NpAV<sup>2)</sup>, *Nitrospira briensis* ATCC25971<sup>4)</sup>, *Nitrosomonas oligotropha*<sup>5)</sup>があり、中でも *N. oligotropha* は AL 菌と同様の低濃度アンモニアに適応した性質を持っているとされている。このように尿素代謝性のある AH 菌は非常に少ない一方、AL 菌の多くが尿素代謝可能であることは興味深い。Stehr らは、AL 菌の増殖に適したアンモニア濃度が律速になっているような低栄養環境では、ウレアーゼ活性を持つことがその微生物の生存にとって重要になるからではないかと推測している<sup>5)</sup>。高アンモニア濃度条件下での増殖という点では AH 菌が有利であるが、低アンモニア濃度条件下ではより多様な窒素源を利用できる AL 菌のほうが有利であると考えられ、これはアンモニア濃度が低い下水処理活性汚泥中で AL 菌が AH 菌よりも優占している理由の一つであると思われる。

前述のように、アンモニア酸化が低 pH で起こらないのは主に  $\text{NH}_3$  と  $\text{NH}_4^+$  の濃度平衡に起因していると考えられているが、pH によって形態の変化しない尿素の場合についても影響があるかどうか検討した (図 3)。pH6.0 では AL212, IL-6 の 2 株とも尿素から亜硝酸を生成することはできなかった。Allison らは、尿素を窒素源とした場合には、初期 pH が低くても尿素を加水分解して生成したアンモニアによって pH が上昇するために、アンモニアの亜硝酸への酸化が起こる場合

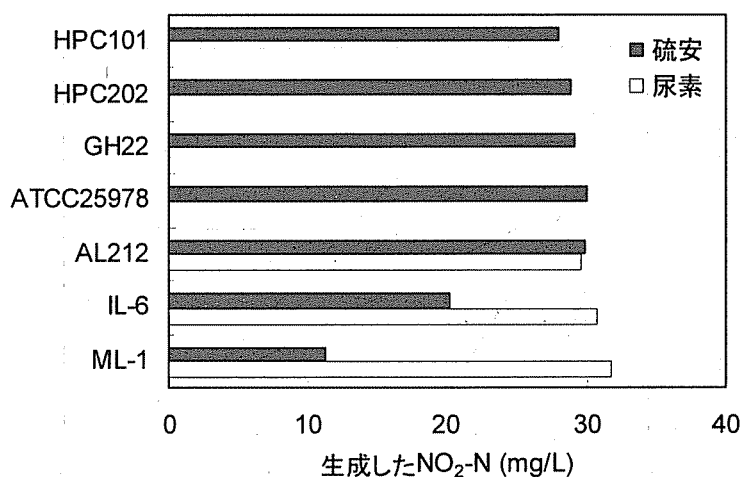


図2 尿素とアンモニアの代謝

があるとしている<sup>2)</sup>。しかし本実験ではリン酸緩衝液を加えていることから、2 mM という低濃度の尿素では完全にアンモニア化したとしても培地 pH の変化は大きくないと考えられるため、亜硝酸にまで酸化されなかったものと推測される。

#### 塩類濃度への感受性

次に塩類濃度耐性について HPC101, HPC202, GH22 および IL-6, AL212, ML-1 の6菌株について検討した(図4)。AH菌(HPC101, HPC202, GH22)はNaCl濃度11.7 g/Lまでは亜硝酸を生成し、AL菌(IL-6, AL212, ML-1)は11.7 g/L以上では亜硝酸

を生成せず、アンモニア同様NaCl濃度に対しても、AL菌はAH菌よりも明らかに感受性が高かった。*N. oligotropha*はNaCl濃度約12 g/l以上ではほぼ活性がなくなると報告されており<sup>9)</sup>、本実験で用いたAL菌群と同様の生理活性を持つ。一方、本実験で用いたAL菌群は、NaClをまったく加えない場合よりも3 g/Lの濃度で加えた方が高いアンモニア酸化活性を示し、この点ではNaClを加えない場合に高活性を示す*N. oligotropha*とは異なる性質を示した。これは分離源の環境条件の違いによるものであろう。*N. oligotropha*は河川から単離されたのに対し、IL-6, AL212, ML-1は下水や埋立地浸出水処理汚泥から単離されたため、このことが塩類濃度耐性の違いに反映しているものと考えられる。またAL菌よりも比較的塩濃度に強いAH菌でも海水並みの塩濃度(約3%)では増殖できず、海水性細菌のような特に強い耐塩性はなかった。

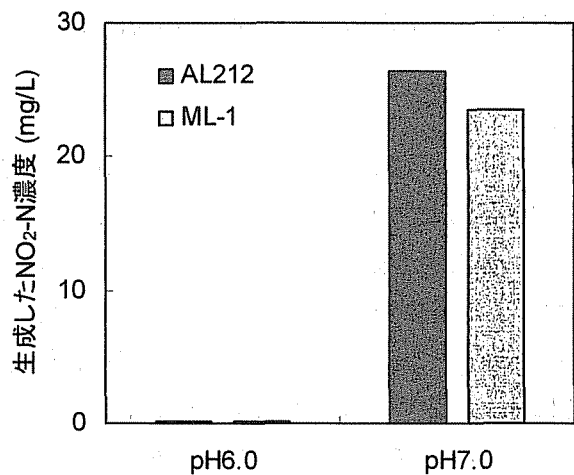


図3 尿素代謝に対するpHの影響

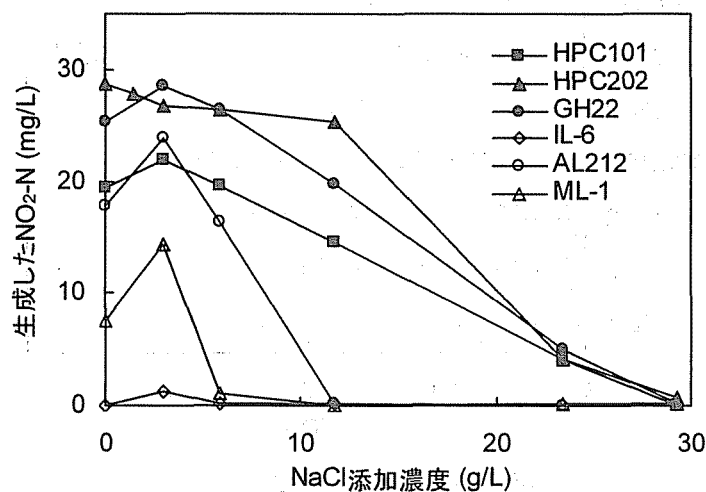


図4 NaClの影響

#### 4. まとめ

下水処理活性汚泥のようなアンモニア濃度が比較的低いところで優占的に存在していると考えられるアンモニア酸化細菌（AL 菌）も含めて、複数のアンモニア酸化細菌の生理特性を調べた。至適 pH は AL 菌 AH 菌ともに 8 前後であったが、AL 菌は AH 菌よりも pH に対して感受性が高かった。また、塩類濃度に対する感受性も AH 菌よりも AL 菌の方が高く、至適濃度は 0.3% 程度であった。しかし一方では、AH 菌のほとんどが持たないウレアーゼ活性を有しているものが多い。など、生理活性に関する多様性を示唆する結果が得られた。

このように、廃水からの窒素除去プロセス中には従来よく知られた *N. europaea* と異なる生理活性を持つアンモニア酸化細菌が存在しており、これらは従来考えられていたよりも多様なアンモニア含有廃水の処理に対応できる可能性があると考えられる。今後さらにさまざまな廃水で馴養された汚泥中のアンモニア酸化細菌相の解析し、優占種の生理特性と動態のメカニズムに関する知見を蓄積すれば、将来、最適な窒素除去プロセスの設計にも役立つに違いない。目的の廃水の組成に応じて適したアンモニア酸化細菌を増殖させ、場合によっては複数の異なる性質をもったアンモニア酸化細菌を組み合わせ、それぞれのアンモニア酸化活性を最大限に引き出すようなプロセスを開発することができれば、硝化処理能力の飛躍的向上が期待できる<sup>6)</sup>。

#### 5. 参考文献

- 1) Suwa, Y., Imamura, Y., Suzuki, T., Tashiro, T., Urushigawa, Y., 1994. Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in activated sludges. *Wat. Res.* 28(7), 1523-1532.
- 2) Allison, S. M., Prosser, J. I., 1991. Urease activity in neutrophilic autotrophic ammonia-oxidizing bacteria isolated from acid soils. *Soil Biol. Biochem.* 23(1), 45-51
- 3) Allison, S. M., Prosser, J. I., 1993. Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 25(7), 935-941
- 4) de Boer, W., Laanbroek, H. J., 1989. Ureolytic nitrification at low pH by *Nitrosospira* spec. *Arch. Microbiol.* 152, 178-181
- 5) Stehr, G., Boettcher, B., Dittberner, P., Rath, G., Koops, H.-P., 1995. The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17, 177-186
- 6) Noto, K., Ogasawara, T., Suwa, Y., Sumino, T., 1998. Complete oxidation of high concentration of ammonia by retaining incompatible nitrification activities in three-vessel system. *Wat. Res.* 32(3), 769-773