

9 8 3 1 高濃度アンモニアを除去できる海洋性細菌を利用した新しい微生物脱臭法の開発

助成研究者：菅野 靖史 (東京工業大学 資源化学研究所)

共同研究者：正田 誠 (東京工業大学 資源化学研究所)

アンモニアは、刺激臭のある有毒な気体である。アンモニアの除去は工場の排ガス処理や、生ゴミから発生するガスの処理などで重要なプロセスのひとつである。従来から微生物処理が試みられているが、従来の微生物（主に独立栄養細菌）は、増殖速度が遅いため、他の微生物が混入すると淘汰されてしまいアンモニア除去能が低下する。そこで、本研究では、海洋性細菌が高い耐塩性を有していることに着目した。塩濃度の高い環境下では陸生の細菌の増殖は阻害されるが、海洋性細菌は旺盛に増殖するため、雑菌の混入確率を大幅に低下させることが可能であると考えた。具体的には、海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* Oiso-1（以下 Oiso-1 と記す）を用いてアンモニアの除去を試みた。Oiso-1 は、グラム陰性の従属栄養細菌である点は一般的な細菌と変わらないが、増殖に塩化ナトリウムを必要とするところが、一般の陸生の細菌と大きく異なる点である。Oiso-1 の増殖特性は、フラスコを用いた振とう培養で調べた。アンモニアの除去実験は硫酸アンモニウムと気体のアンモニアでそれぞれ行った。気体のアンモニアを用いる実験では、フラスコ振とう培養ではなく小型通気リアクターを用いた。Oiso-1 は、塩化ナトリウム濃度 3~5% で良好に増殖した。また、増殖に適した炭素源はグルコース、次いでシュクロースであった。フルクトース、ガラクトースは資化できなかった。増殖に適する pH は 8 付近と考えられ、6, 7 では培養の中期から後期にかけて菌体の死滅が見られ、5, 9 では培養開始直後から菌体の死滅が観察された。気体のアンモニアを 120 ppm の濃度で連続通気した場合は、アンモニア除去効率が実験開始から 7 日後でも 100% となったが、実験途中でグルコースの補充が必要であった。同様に、120 ppm の濃度から実験を開始し、24 時間ごとに濃度を上げて通気した場合は、2400 ppm のアンモニアを 24 時間連続除去することが出来たが、この場合も実験途中でグルコースの補充が必要であった。本研究結果から好塩性の従属栄養細菌によるアンモニア除去が可能であることが示唆された。また、アンモニアの通気方法、炭素源の添加方法、装置の改良等を行うことによって、さらにアンモニア除去能を高めることが期待できる。また、本実験におけるアンモニア除去反応の過程では、硝酸イオン、亜硝酸イオンともに検出されなかったことから、従来の硝化反応によるアンモニア除去のプロセスとは異なる反応が生じていると考えられた。今後は、除去されたアンモニアがどのような物質に変換されているかを明らかにし、アンモニア除去のメカニズムを解明する。

9 8 3 1 高濃度アンモニアを除去できる海洋性細菌を利用した新しい微生物脱臭法の開発

助成研究者：菅野 靖史 (東京工業大学 資源化学研究所)

共同研究者：正田 誠 (東京工業大学 資源化学研究所)

1. 研究目的

近年、環境問題への関心が社会的に高まっている。そのひとつに悪臭問題がある。この臭気の主成分のひとつはタンパク質を構成するアミノ酸から遊離したアンモニアである。アンモニアの発生源としては、コンポスト工場、肥料工場、水産加工工場等が大きな割合を占めている。従来から、アンモニアの処理法のひとつとして生物処理が試みられている。しかし、従来の生物処理では、独立栄養の硝化菌を使うため、菌体の増殖が遅く、その結果アンモニアの処理負荷量を大幅に増加させることは難しい。同時に、増殖速度の速い雑菌の汚染を受けやすいという欠点を有している。

そこで、本研究では、海洋性細菌が陸生の細菌と異なり優れた耐塩性を有していることに着目した。塩濃度の高い環境下では陸生の細菌は増殖不能となるが、海洋性細菌は旺盛に増殖することが可能である。従って、高塩濃度下でアンモニア除去能を有する細菌を用いることで、従来考えられなかった高塩濃度下で機能する微生物脱臭法の開発を試みる。

2. 実験方法

2.1 供試微生物

神奈川県衛生研究所の大澤から提供された、アンモニアを唯一の窒素源として増殖することができる海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* Oiso-1, *Vibrio alginolyticus* Oiso-2 (以下、Oiso-1, Oiso-2 と略す) を供試微生物とした。

2.2 Oiso-1, Oiso-2 の増殖特性

培地は Difco Heart Infusion Broth を処方に従い調製後、さらに 1% の NaCl を加え、試験管に 5 ml ずつ分注し滅菌した。これに Oiso-1, Oiso-2 をそれぞれ植菌し、120 spm, 30°C で 6 時間培養した。菌体を遠心集菌し、人工海水で数回洗浄し、菌体濃度を OD₆₆₀ で 0.4 に調整し、さらに人工海水で 10 倍に希釈した菌体懸濁液を作製した。500 ml 坂口フラスコに 100 ml の培地を入れ、滅菌後、前述の Oiso-1, Oiso-2 の菌体懸濁液 1 ml をそれぞれ植菌し、120 spm, 30°C で培養を開始し、培養 60 時間まで経時的にサンプリングを行い生菌数、培養液の濁度、pH の変化を測定した。

2.3 培地組成

基準培地の成分は H₂O 1リットルに対して、MgSO₄·7H₂O 0.036 g, K₂HPO₄ 15 g, CaCl₂·2H₂O 0.0013 g, ZnCl₂ 0.007 g, FeSO₄·7H₂O 0.001 g とした。2.4, 2.5, 2.6 の各実験に使用する培地は、基準培地に対して、塩化ナトリウム濃度、炭素源を適宜変化させたものを使用した。また窒素源として硫酸アンモニウムを使用する場合は 2 g/l となるように調製し、アンモニアを使う場合は、適宜濃度を変化させた。

2.4 Oiso-1 の炭素源依存性と硫酸アンモニウムの消費

基準培地に加える炭素源を、それぞれ 2% の、グルコース、ガラクトース、フルクトース、シュクロースとした場合の増殖の経時変化を調べた。植菌量、培養方法は、2.2 に従った。測定項目は、培養液の pH, 生菌数、アンモニウムイオンの変化を調べた。塩化ナトリウム濃度は 5% とした。

2.5 Oiso-1 の塩化ナトリウム濃度の影響

グルコースを炭素源として、塩化ナトリウム濃度を 1, 2, 3, 4, 5% として増殖の経時変化を調べた。

2.6 培養初発 pH の影響

グルコースを炭素源として、初発 pH を 5~9 まで変化させ増殖の経時変化を調べた。

2.7 アンモニア通気実験（その 1）

気体のアンモニアで同様の実験を行うために、アンモニアを窒素源として通気することができる小型バイオリアクターを用いた通気実験を行った。通気開始前の培地（初期培地）は 2.3 で示した基準培地にグルコースを 20 g/l、硫酸アンモニウムを 2 g/l となるように調製し、実験開始後、グルコースを定期的に補充した。培養開始直後は空気のみを通気し、菌体の増殖を確認後、アンモニア濃度を 120 ppm とし、通気量を 500 ml/min とした。炭素源としてグルコースを 2 日間隔で供給した。リアクターに通気するアンモニア濃度とリアクターから排気されるアンモニア濃度の差を測定することで除かれたアンモニア量を定量した。

2.8 アンモニア通気実験（その 2）

実験装置は 2.7 と同様であるが、初期培地は 2.7 のグルコース濃度を 50 g/l とし、実験開始後、定期的にグルコースを補充した。流入アンモニア濃度は、通気開始から 24 時間までは 150 ppm、以後 24 時間ごとに、300, 600, 1200 ppm と段階的に上昇させ、さらに 2400 ppm で 48 時間通気した。

3. 実験結果および考察

3.1 Oiso-1, Oiso-2 の増殖特性

両菌株の増殖特性を、Fig 1 に示す。これより、両菌株間に大きな差が見られなかったため、以下は全て Oiso-1 を用いた実験結果を示す。

3.2 炭素源依存性と硫酸アンモニウムの消費

各炭素源で培養したときの、Oiso-1 の増殖曲線を Fig. 2 に示す。この図からグルコース、シュクロースは資化するが、フルクトース、ガラクトースは資化しないことがわかる。フルクトースを炭素源とすると菌体は、死滅した。一方、ガラクトースでは菌体量は、ほとんど変化なく、48 時間後の菌数はグルコースやシュクロースの場合よりも 10^7 程度少なかった。また、培養に伴う pH の変化も見られなかった。一方、アンモニウムイオンの変化をインドフェノール法で測定した結果を Fig. 3 に示す。グルコース、シュクロースではアンモニウムイオンの減少が見られたが、ガラクトース、フルクトースでは変化がなかった。従って、グルコース、シュクロースを使って菌体が増殖する際に、アンモニウムイオンを窒素源として使用していることが明らかとなった。

3.3 塩化ナトリウムの影響

グルコースを炭素源としたときの各塩濃度における生菌数の変化を Fig 4 に示す。塩化ナトリウム濃度 2% 以下では、最大生菌数が 10^9 CFU/ml 以下であったが、死滅する菌数も少なかった。3% 以上になると最大生菌数は 10^{10} ~ 10^{11} 程度まで増加した。

3.4 pH の影響

グルコースを炭素源とし、初発 pH を各種変化させたときの生菌数の変化を Fig 5 に示す。pH 5, 9 では、培養開始直後から菌体の死滅が観察された。また pH 6, 7 では、培養の中期から後期にかけて菌体の死滅が見られたが pH 8 では生菌数が一定に保たれた。これにより、海洋の一般的な pH が 8 付近であることを考慮すれば、本菌が、海洋性細菌であることを合理的に説明できる。

3.5 アンモニアの通気実験 (その 1)

Fig 6 に示す通気実験装置を作製した。容器は 1000 ml とし、培地の張り込み量は 500 ml とした。120 ppm のアンモニアを連続通気した時のアンモニアとグルコースの経時変化を Fig. 7 に示す。また、このときの生菌数と pH の経時変化を Fig. 8 に示す。初期の培地に含まれていたグルコースは培養 2 日後に 0 となった。そして 4 日後に出口アンモニア濃度の上昇が見られたので、グルコースを 2.5 g 新たに加えたところ出

口アンモニア濃度は0に戻った。その後、約1.5日間隔で出口アンモニア濃度の減少も見られたが、その都度グルコースを添加することで出口アンモニア濃度の上昇を抑制することが出来た。

3.6 アンモニアの通気実験(その2)

段階的にアンモニアの濃度を変えて通気した時のアンモニアとグルコースの経時変化を Fig. 9 に示す。また、このときの生菌数と pH の経時変化を Fig. 10 に示す。流入濃度を 2400 ppm に増加し、さらに1日後までアンモニア除去率 100%を示した。その後、アンモニアの除去率が徐々に低下した。pH は、初期値 7.7 から低下し、アンモニアを通気し始めるときには 5.8 となり、さらに12時間後に最低値となったが、その後、徐々に増加し pH 6.5 以上になったときアンモニアの除去率が低下した。生菌数は、アンモニア通気開始から1日後までは 10^9 から 10^7 まで低下したが、その後、最大 10^{12} まで増加した。アンモニア除去率の低下とともに生菌数も急激に減少した。

4. 今後の課題

本研究で用いた Oiso-1 は、従来のアンモニア処理に用いられている細菌に比べて増殖速度が速く、アンモニア除去効率も高いことが分かった。しかし、Oiso-1 が、十分なアンモニア除去能を発揮するためには炭素源である糖の供給が不可欠である。また、グルコースよりもシュクロースの方がコスト面から実用を考えたときに有利である。そこで、一般には産業廃棄物として処理される廃糖蜜を炭素源とした実験を試みる。また、本実験で用いたリアクターは、液体培養槽であるが、高流速の気体を処理する場合、或いは菌体の固定化を試みる場合は、気相バイオフィルターが有利と考え、この方法での実験を試みる。一方、本菌によるアンモニア除去のメカニズムについては、未だ不明である。本菌のアンモニア除去の過程で亜硝酸イオン、硝酸イオンが検出されないことから、従来の硝化反応とは異なる経路でアンモニアが分解されていると考えられ、この経路の解明が重要である。

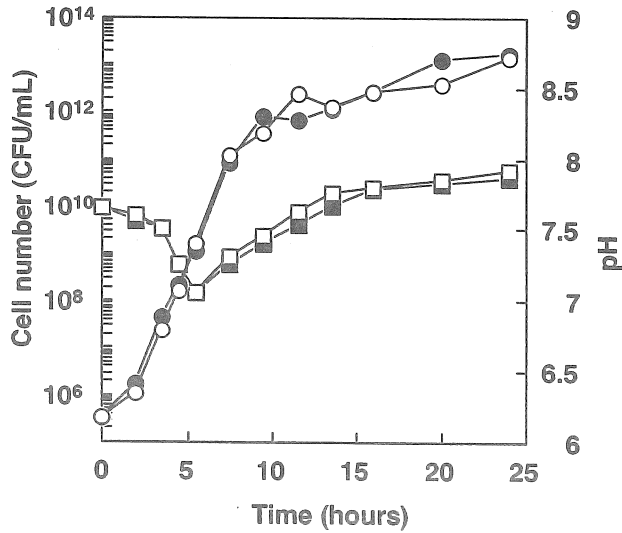


Fig. 1. Time course of viable cell number and pH change of *Vibrio alginolyticus* Oiso-1 (white symbol) and Oiso-2 (black symbol). ○●, viable cell number ; □■, pH change.

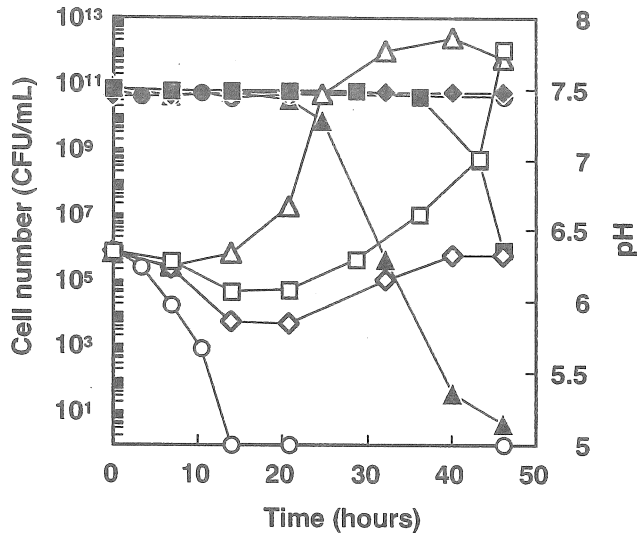


Fig. 2. Growth curves of Oiso-1 in case of several carbon sources. White and black symbols reveal viable cell number and pH, respectively. □■, glucose ; ◇◆, galactose ; ○●, fructose ; △▲, sucrose.

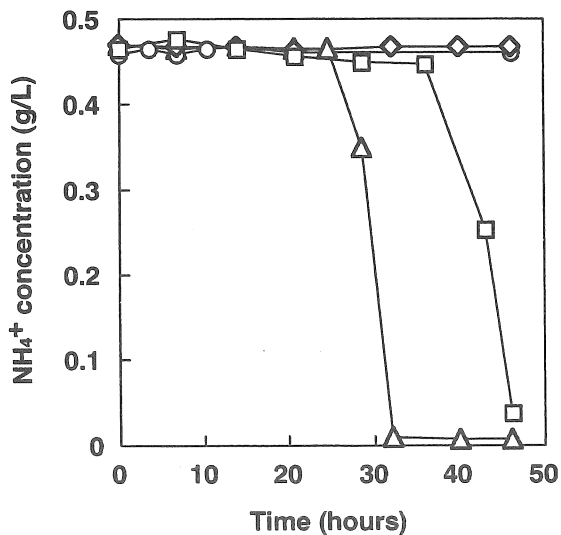


Fig. 3. Time course of NH₄⁺ concentration by Oiso-1 in case of several carbon sources.

□, glucose ; ◇, galactose ; ○, fructose ;
△, sucrose

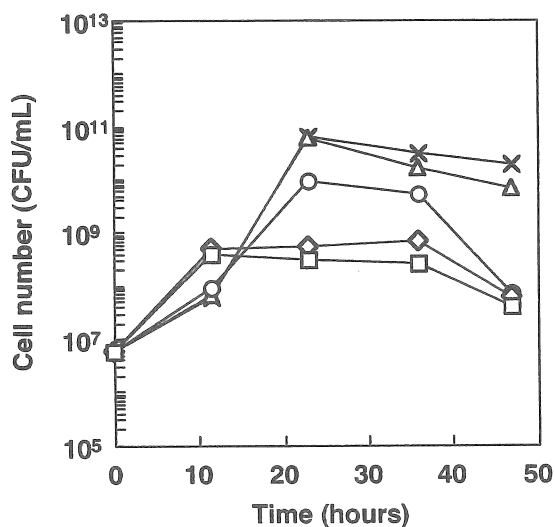


Fig. 4. Growth curves of Oiso-1 in different concentrations of NaCl. □, 1%; ◇, 2%; ○, 3%; △, 4%; X, 5%.

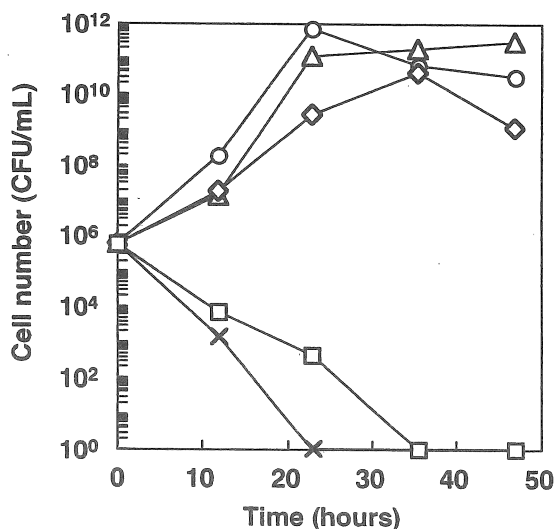


Fig. 5. Growth curves of Oiso-1 in different initial pH. □, pH5; ◇, pH6; ○, pH7; △, pH8; X, pH9.

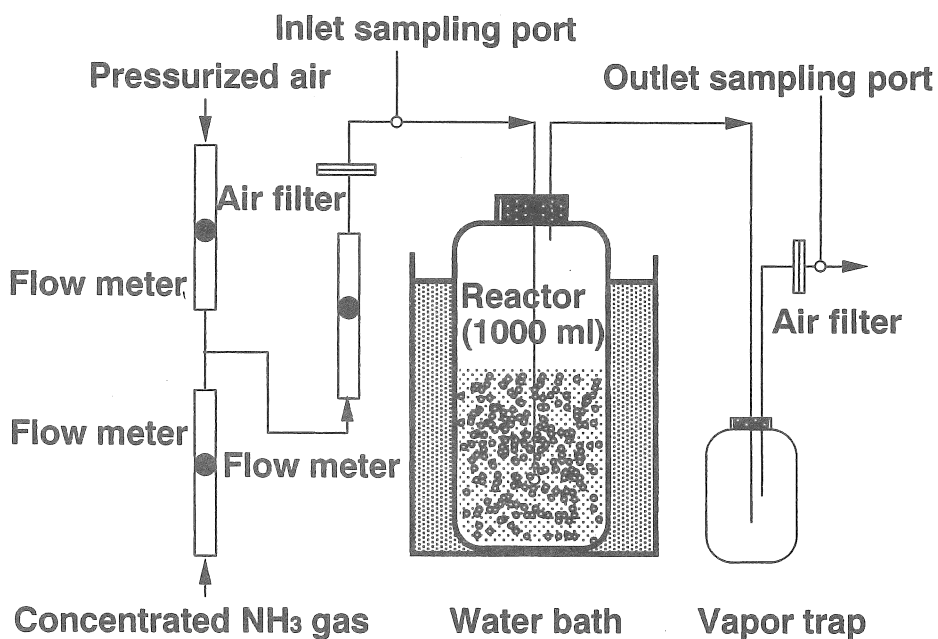


Fig. 6. Schematic diagram of a laboratory scale bubbling deodorization system (1000 ml) for ammonia gas.

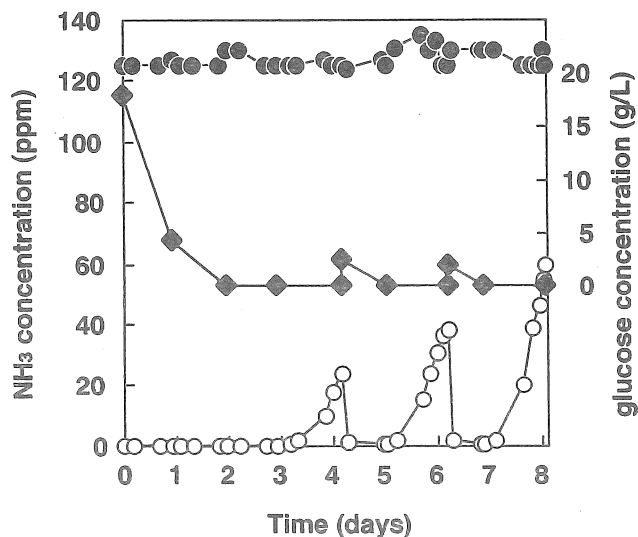


Fig. 7. Time course of NH₃ and glucose concentration in case of bubbling culture by constant NH₃ supplying method. ○, outlet NH₃ concentration ; ●, inlet NH₃ concentration ; ◆, glucose concentration.

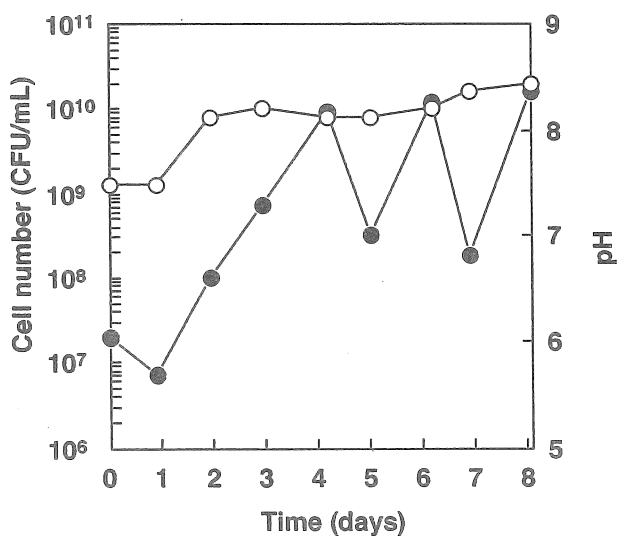


Fig. 8. Time course of cell number and pH in case of bubbling culture by constant NH₃ supplying method. ○, cell number; ●, pH.

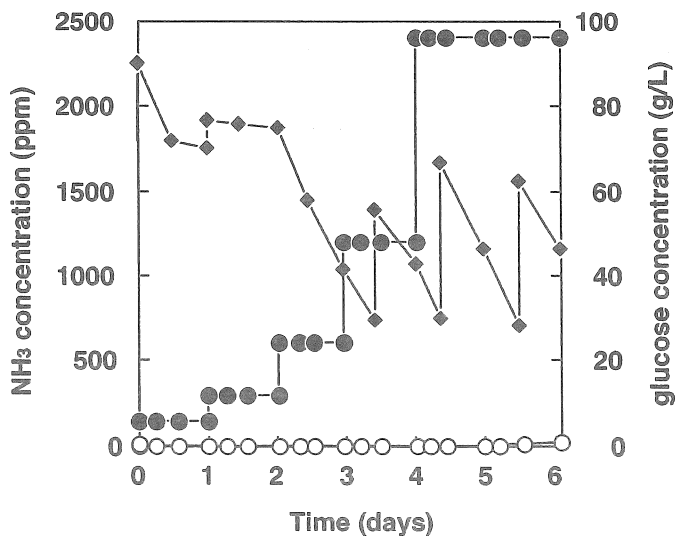


Fig. 9. Time course of NH₃ and glucose concentration in case of bubbling culture by stepwise NH₃ supplying method. ○, outlet NH₃ concentration ; ●, inlet NH₃ concentration ; ◆, glucose concentration.

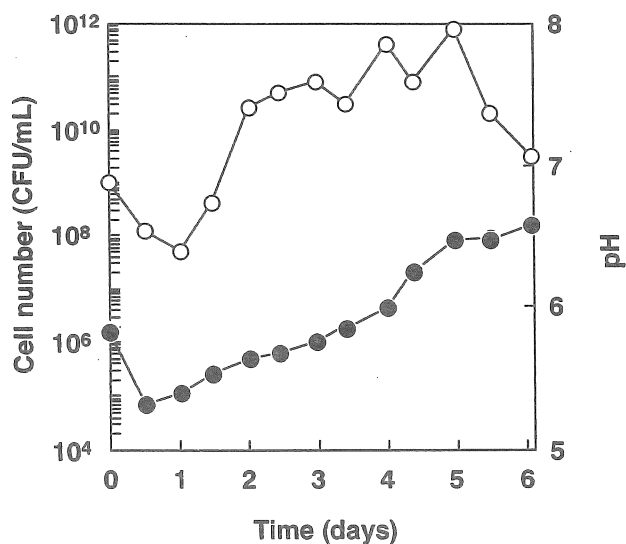


Fig. 10. Time course of cell number and pH in case of bubbling culture by stepwise NH₃ supplying method. ○, cell number; ●, pH.

Development of a novel ammonia removal method by using a marine bacterium

Yasushi Sugano and Makoto Shoda

Research Laboratory of Resources Utilization,
Tokyo Institute of Technology

Summary

Ammonia is a toxic and fouling gas. Therefore, ammonia removal from several environments, such as exhaust gas from fertilizer plants or garbage composting plants, is important. So far, several biodeodorization treatments to remove ammonia have been reported. Although autotrophic bacteria have been often used to construct ammonia removal system, it is difficult to prevent the contamination of other organisms as the growth rate is very slow compared with general heterotrophic bacteria. Low growth rate reveals low ammonia removal capacity or rate. Furthermore, contamination of other organisms results in the lowered ammonia removal performance of the system. Therefore, in this study, we propose a novel system to remove ammonia using *Vibrio alginolyticus* Oiso-1, which is a heterotrophic and halophilic bacterium. This strain grows fast and reveals high salt-tolerance compared with general microorganisms. Therefore, using this strain leads to decrease the risk of contamination and increase ammonia removal capacity. The growth pattern of this strain was investigated using ammonium sulfate for nitrogen source. The optimum salt concentration and carbon source for growth were 3 to 5% and glucose, respectively. In case of the salt concentration was lower than 2%, the number of viable cells was lower than those of optimum condition. Besides glucose, Oiso-1 could use sucrose as a carbon source but not use fructose and galactose. Using ammonia gas as a nitrogen source, two supplying patterns of inlet concentration of ammonia have been done. When ammonia supply concentration is constant (120 ppm), ammonia was removed for 7 days. When the supply concentration was stepwise increased, maximum removal concentration achieved 2400 ppm even though the optimum condition was not been determined yet. Therefore, it is considered that ammonia removal capacity could further raise by which the system would be improved. These results reveal that ammonia removal method by using Oiso-1 may be a promising method. It is important to clarify the ammonia removal mechanism as a future work.