

助成番号 9905

新しい海洋性細菌を利用した高濃度アンモニア除去システムの開発

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)

平井 光代(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 *Vibrio alginolyticus* Oiso-1 (以下 Oiso-1 と記す) 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、Oiso-1 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と考え、特に雑菌汚染対策を行わない2通りのアンモニア除去システムを考案し、アンモニア除去能、および雑菌汚染の影響を評価した。第一の方法は Oiso-1 の培養液にアンモニアを直接通気する方法で、濃度 500, 1000, 2000 ppm のアンモニアを通気したところ、それぞれ 10.7, 8.1, 3.6 日間、アンモニアの除去率(流入量に対する非流出量の割合)が 100%となった。500 ppm の場合が最も長期間アンモニアを除去し続けたが、入口濃度と完全除去(除去率 100%) 期間の積で求められる積算除去量は 1000 ppm の場合に最も多くなった。次に、Oiso-1 を無機担体に吸着させ、これにアンモニアを通気する方法(バイオフィルター)でのアンモニア除去能を調べた。流入アンモニア濃度を 200~1200 ppm の範囲で種々に変化させたところ、61 日間に渡って除去率が 80%以上となった。これから、Oiso-1 のアンモニア完全除去能は 18.6 g-N/kg-dry-fuyolite/d、最大除去能は 22.8 g-N/kg-dry-fuyolite/d であることがわかった。この値は、現在知られている独立栄養細菌が除去できる値の 4.6 倍に相当した。どちらの方法も雑菌汚染対策を行わなかったにもかかわらず、Oiso-1 が優先的に増殖し、Oiso-1 に対する雑菌の混入量は最大で約 10%に過ぎなかった。従来の独立栄養細菌が雑菌汚染に極めて弱いのと対照的に、Oiso-1 は、それ自身が耐塩性であるために、高塩濃度下で、雑菌汚染に対し強い抵抗力を示すことが実証された。すなわち、塩濃度を上げるだけで雑菌の混入を防止することができることから、汚染対策のための装置類が不要となりシステムの簡略化が可能である。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ず、培養液中から複数のニヒドリン反応を示す物質が得られたことから、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。

助成番号 9905

新しい海洋性細菌を利用した高濃度アンモニア除去システムの開発

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)

平井 光代 (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。これまで、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の増殖は阻害されるが、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雑菌の混入を抑制し、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

供試微生物として、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 (以下、Oiso-1 と略す) を用いた。Oiso-1 は、3-5%の塩化ナトリウムを含む培地で旺盛に増殖し、塩化ナトリウム濃度が1%以下になると著しく増殖が阻害される。

2.2 培地組成

Oiso-1 の増殖、生菌数測定には、基準培地に対して塩化ナトリウム濃度、炭素源、窒素源を適宜変化させたものを使用した。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。基準培地の成分はH₂O 1 lに対して、NaCl 30 g 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。

雑菌の混入チェックには、塩化ナトリウムを加えないポテトデキストロース寒天培地(栄研)と普通寒天培地(栄研)で作製したプレートを使用した。

2.3 前培養

培地は Difco Heart Infusion Broth を処方に従い調製後、さらに1%のNaCl（トータルで2%）を加え、試験管に5 ml ずつ分注し滅菌した。これに Oiso-1 を1白金耳植菌し、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。

2.4 通気培養によるアンモニア通気実験

アンモニアを窒素源として通気する小型バイオリアクターを用いた通気実験を行った。Fig 1 に示す通気実験装置を作製した。実験中、雑菌の混入を防止するフィルター等は装着しなかった。容器は500 ml とし、培地の張り込み量は300 ml とした。通気開始前の培地（初期培地）は23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た。前培養で調製した菌体懸濁液を3 ml 植菌し、空気を300 ml/min (1 vvm) で通気し培養を開始した。培養開始24時間後から流量を1 vvm に固定し、一定のアンモニア濃度（500, 1000, または2000 ppm）で通気実験を行った。グルコースを毎日1回6 g 補充した。pH 調整は行わなかった。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。また、実験中の Oiso-1 の生菌数、および実験系に混入した雑菌数を測定した。

2.5 バイオフィルターによるアンモニア通気実験

Fig 1 に示した通気培養槽に代えて、Fig 2 に示す固定化バイオフィルターを作製した。まず、Fuyolite 7号（芙蓉パーライト製）を充填したカラム（50 mm φ x 200 mm L）を作製し、ここに Oiso-1 を植菌した培地200 ml を0.15 ml/min で循環させた。培地は基準培地に塩化ナトリウム30 g/l、グルコース40 g/l、硫酸アンモニウム2 g/l となるように作製した。通気量は1 l/min とし、温度、pH は制御せず雑菌混入防止用のエアフィルター等は装着しなかった。2日後に、アンモニア通気を開始した。通気実験中の栄養分と水分供給のため1日4回、各1時間ずつ0.15 ml/min で硫酸アンモニウムを除いた培地を供給した。バイオフィルターに流入するアンモニア濃度と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。また、浸出水に含まれる Oiso-1 の生菌数、雑菌数を測定した。

2.6 培養液の窒素バランス

基準培地にグルコース20 g/l、塩化ナトリウム30 g/l、硫酸アンモニウム5 g/l を加えた培地で Oiso-1 を1日間培養し、培養液を遠心分離し、菌体と上清に分離し、菌体内窒素含量と上清中の窒素含量を元素分析により測定した。さらに、培養上清をゲル濾過クロマトグラフィーに供し、窒素を含む画分を特定した。

3. 実験結果および考察

3.1 通気培養槽によるアンモニアの通気実験

Fig 3 に 500, 1000, 2000 ppm のアンモニアを連続通気した時の入口アンモニア濃度と出口アンモニア濃度の経時変化を示す。また、Fig 4, 5 にそれぞれ Oiso-1、雑菌の生菌数の経時変化を示す。アンモニアの除去率（流入量に対する非流出量の割合）が 100%である期間は、2000 ppm で 3.6 日間、1000 ppm で 8.1 日間、500 ppm で 10.7 日間であった。相対的に低濃度の方が 100%除去できる期間が長くなっているが、トータルで比較すると 1000 ppm の場合が最も多い量のアンモニアを除去できた。また、アンモニアの除去率の低下と Oiso-1 の生菌数の低下に関連があることが明らかとなった。流入アンモニア濃度が 500 ppm の時は 8 日目から雑菌の混入が確認された。しかし、その数は、Oiso-1 の生菌数の 1/1000 程度であったため雑菌混入の影響は低いと考えられる。

3.2 バイオフィルターによるアンモニアの通気実験

流入アンモニア濃度、流入アンモニア負荷、空間速度を各種変えてアンモニア通気実験を 61 日間行った時の流入アンモニア濃度と流出アンモニア濃度の関係を Fig 6 に示す。流入アンモニア濃度 200 ppm から 1200 ppm の範囲で 80%以上のアンモニア除去率が得られた。この結果を基に流入アンモニア負荷に対するアンモニア除去能の関係を Fig 7 に示す。これより、Oiso-1 のアンモニア完全除去能は 18.6 g-N/kg-dry fuyolite/d、最大除去能は 22.8 g-N/kg-dry fuyolite/d であった。この濃度は、現在知られている独立栄養細菌が除去できる濃度の 4.6 倍に相当する。また浸出水中の雑菌の混入は、培養槽を用いた場合よりも多くなったが、Oiso-1 に対する割合は最大で 10%であることから、アンモニア除去能に大きな影響を及ぼしていないと考えられた。

3.3 培養液の窒素バランス

Oiso-1 によりアンモニアがどのような物質に変換されているのか調べるために、培養液を培養上清と菌体に分け、それぞれの窒素含量を測定した。その結果、菌体と上清に含まれる窒素量は、それぞれ 0.49 g/l、0.51 g/l であった。これは、培地に含まれていた窒素量 1.06 g/l にほぼ一致した。これにより、Oiso-1 によってアンモニアが別の揮発性物質に変換される可能性はなくなった。上清をさらにゲル濾過クロマトグラフィに供したところニンヒドリン反応を示す複数の物質が得られた（データ示さない）。

4. まとめと今後の課題

本研究で用いた Oiso-1 は、通気培養槽を用いた液体培養においても担体に担持したバイオフィルターとして用いても従来のアンモニア処理に用いられている独立栄養細菌である硝化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。また、当初の予想通り、アンモニア通気実験中に特に滅菌操作を行わなくても Oiso-1 が優先的に増殖しアン

モニアを除去することから、実際の生物処理システムを構築するうえで極めて有利であると
 考えられた。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。現在、グルコースを炭素源として供給しているが、実用化を考
 えた場合、コスト面からグルコースよりも安価な炭素源を使う必要がある。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も試みている。一方、Oiso-1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ことは明らかである。また、本菌の培養上清中に複数のニンヒドリ
 ン反応を示す物質の存在が示唆されていることから、アミノ基を有する非揮発性の化合物に
 変換された可能性が高い。今後は、反応生成物を特定し、本菌によるアンモニア除去のメカ
 ニズムを明らかにする予定である。

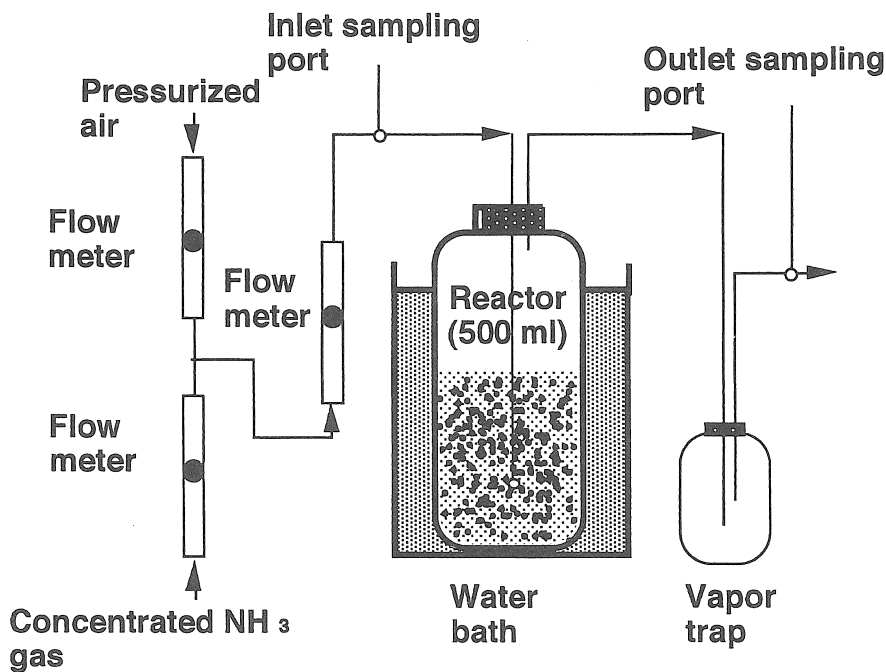


Fig. 1. Schematic diagram of a laboratory scale bubbling deodorization system for NH₃ removal

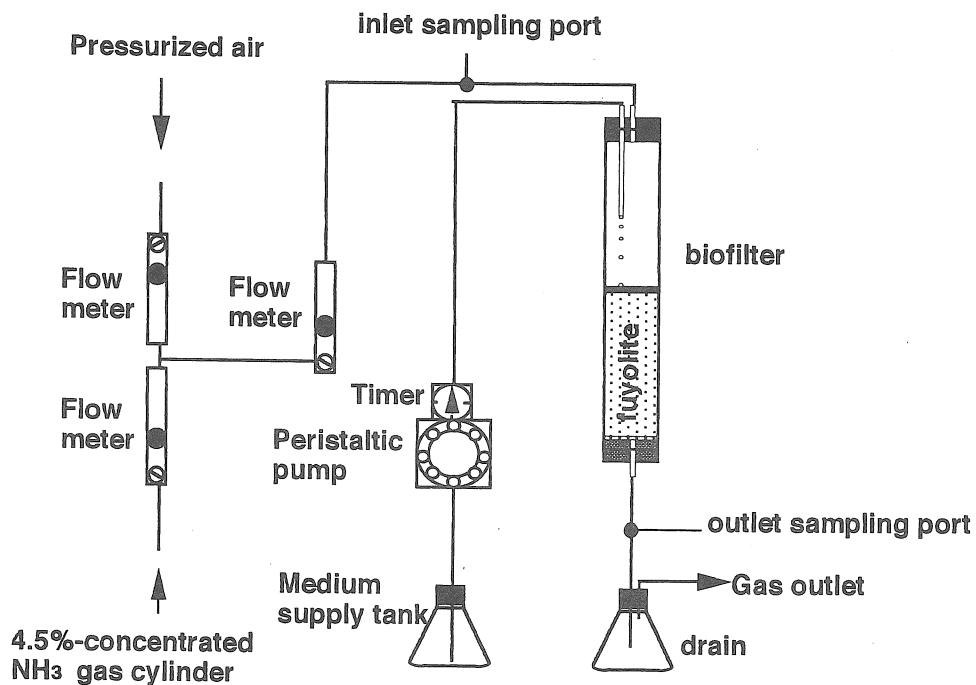


Fig. 2 Schematic diagram of a laboratory-scale fuyolite biofilter (50 mm ϕ x 200 mm L) for NH₃ removal.

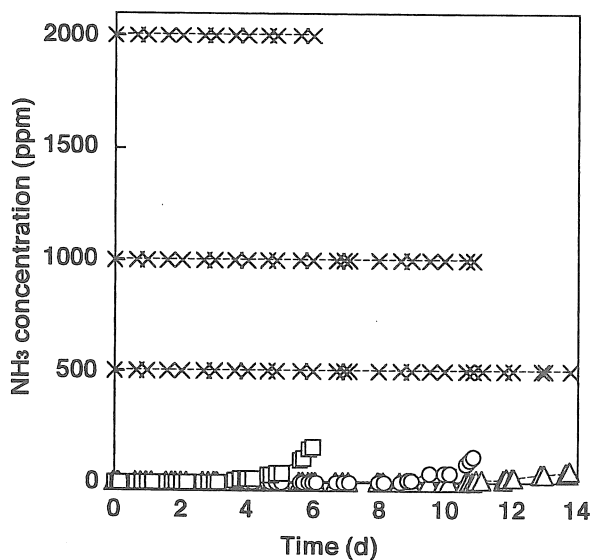


Fig. 3 Time courses of outlet NH₃ concentrations in different inlet NH₃ concentrations. Cross symbol means inlet NH₃ concentration. Triangle, circle and square symbols mean outlet NH₃ concentration in case of inlet NH₃ concentration of 500, 1000, and 2000 ppm, respectively.

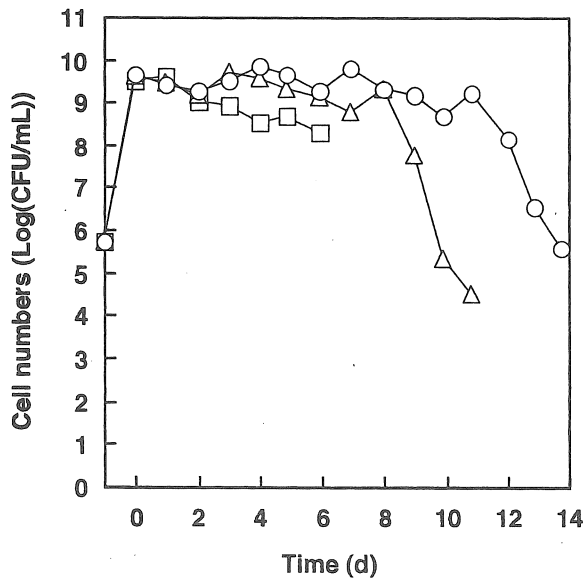


Fig. 4 Time courses of viable cells of *V. alginolyticus* Oiso-1 on various inlet NH_3 concentrations. \circ , 500 ppm; \triangle , 1000 ppm; \square , 2000 ppm

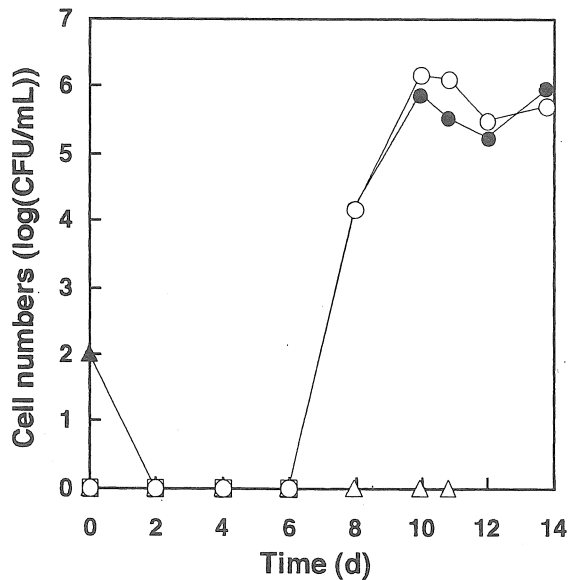


Fig. 5 Time courses of viable cells of contaminated microorganisms. Viable cells on nutrient agar plate and potato dextrose agar plate are shown in open and closed symbols, respectively. Circle, triangle and square symbols correspond to 500, 1000 and 2000 ppm of NH_3 concentration, respectively.

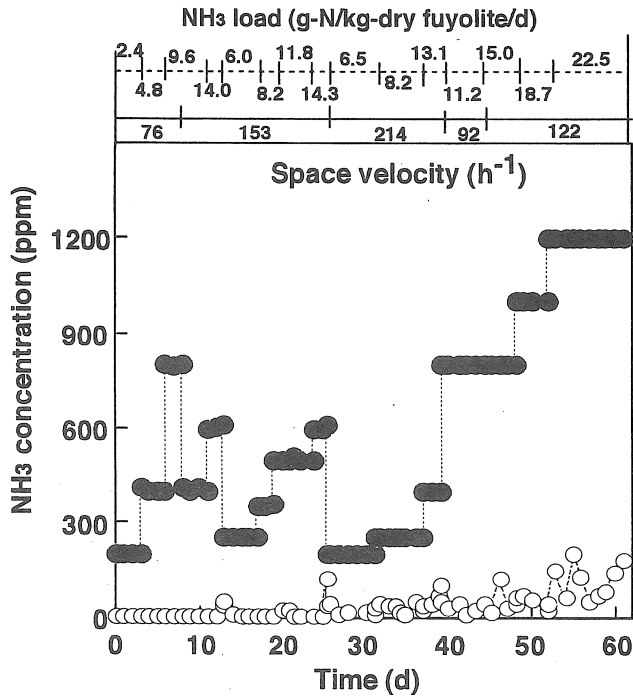


Fig. 6 Relationship between various inlet NH₃ concentration and outlet NH₃ concentration. Closed and open circulars correspond to inlet and outlet NH₃ concentrations, respectively.

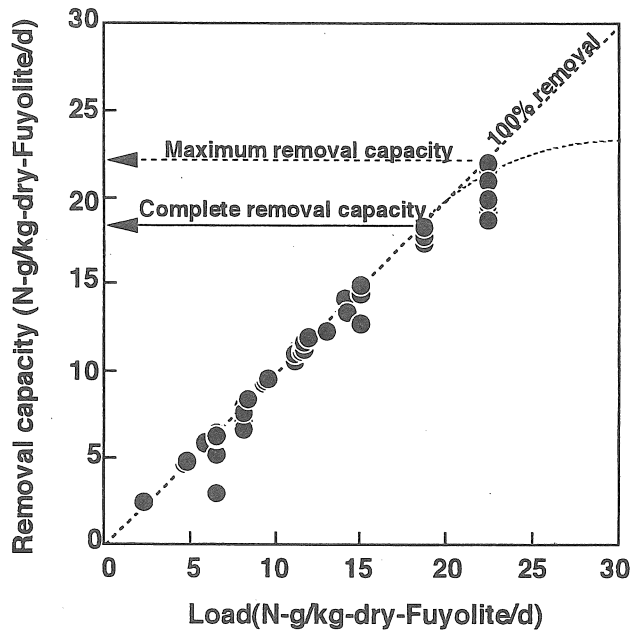


Fig. 7 Relationship between removal capacity and load of NH₃ for biofilters

Development of a high performance ammonia removal system by using a novel marine bacterium

Yasushi Sugano, Mitsuyo Hirai, 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. In this work, using ammonia gas as a nitrogen source, two ammonia removal systems are proposed. One is a bubbling system and another is a biofilter system. The former system was constructed with 300 ml of Oiso-1 liquid culture in which ammonia gas was aerated. The complete ammonia removal ratio (100% ammonia removal period) was achieved for 10.7, 8.1, and 3.6 days in case of 500, 1000, and 2000 ppm of ammonia loading, respectively. The latter system was constructed with glass column and inorganic carrier (fuyolite) containing Oiso-1. This system is generally called a biofilter. More than 80% of ammonia was removed when various concentrations of ammonia (200-1200 ppm) were loaded during 61 days. From this result, maximum and complete ammonia removal capacities were estimated to be 22.8 and 18.6 g-N/kg-dry-fuyolite/day, respectively. These data were higher than any other reported data and revealed that ammonia removal method by using Oiso-1 might be a promising method. It is important to clarify the ammonia removal mechanism as a future work.