

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19510086

研究課題名 (和文) アンモニア・硝酸塩同時除去炭化綿バイオフィルターの開発

研究課題名 (英文) Development of biofilter for simultaneous removal of ammonium and nitrate ions

研究代表者

青木 健次 (AOKI KENJI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60031225

研究成果の概要：観賞用水槽内には、飼育する魚類の排泄物や飼料に由来するアンモニア等の窒素化合物が蓄積し、魚類の生育に悪影響を与える。本研究では、我々が分離した微生物を使ってこれらの化合物を効率的に除去することを目的とした。微生物を炭化綿に包括して水槽内に設置し、循環水を流したところ、微生物を使用しない対照区と比べてアンモニアの増加を抑制し、生存する金魚数も多かった。微生物の効果がわかったので、今後の研究材料となる別の性質を持つ微生物の分離を行い、特徴ある微生物を新たに得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、同時除去、炭化綿、*Ralstonia*属、*Bacillus*属、*Pichia jadinii*、耐熱性微生物、低有機物濃度環境、酸性環境

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 排水中に含まれるNH<sub>4</sub><sup>+</sup>やNO<sub>3</sub><sup>-</sup>などの窒素化合物は、湖沼や閉鎖海域における富栄養化の原因物質の一つである。富栄養化は有害プランクトンの発生や水質汚濁をもたらすなど、深刻な問題を引き起こしており、排水中の窒素化合物の効率的除去技術の開発は緊

急を要する課題である。

(2) 従来の生物学的窒素除去法では、硝化菌を用いて好気条件下でNH<sub>4</sub><sup>+</sup>をNO<sub>3</sub><sup>-</sup>に変換（硝化）した後、脱窒菌により嫌気条件下でNO<sub>3</sub><sup>-</sup>をN<sub>2</sub>に還元する（脱窒）方法が用いられてきた。従来法では、少なくとも3種の微生

物と2つの処理槽が必要である。そこで、好氣的脱窒菌を用いて単純化したプロセスに改良するため、好気条件で脱窒を行う微生物や、硝化と脱窒を同時に行う微生物に関する研究が、国内外で行われてきた。

(3) しかし、現在までに分離された微生物の硝化・脱窒能は、従来法で使用されている微生物の能力に比較して著しく劣っている。また、従来報告された菌株は、 $N_2$ のみならず、 $CO_2$ の100～150倍の温室効果を示し、オゾン層の破壊をもたらす $N_2O$ を発生するため、この点が難点とされており、実用化には至っていない。

(4) また、近年報告されたアナモックス(anammox)微生物は、嫌気条件下において $NH_4^+$ を $NO_2^-$ で酸化して $N_2$ を生成するため、新規な処理プロセスを構築する微生物として注目されているが、 $NO_3^-$ ではなく、 $NO_2^-$ を必要とする点などにおいて、申請者の提案する*Klebsiella* sp. F-5-2株など $NH_4^+$ と $NO_3^-$ を同時に除去する菌株を用いた処理法とは異なっている。

(5) 申請者は、 $NH_4^+$ と $NO_3^-$ を同時に除去する微生物を検索中、土壌から分離した従属栄養菌*Klebsiella* sp. F-5-2株が、好気条件下で高い硝化能と脱窒能を持ち、 $N_2$ のみを発生し、 $N_2O$ を発生しないことを見いだした。その後、このような性質を持つ微生物のスクリーニングを進め、多数の菌株を得ることができた。得られた菌株は、培地中の金属イオンの濃度を調整することにより、容易に目的を達成することがわかった。

(6)  $NH_4^+$ および $NO_3^-$ が共に存在する水環境は随所に見いだすことができる。例えば、イットリウム、ランタノイドなどを含む希土酸化物の生産過程では、硝酸アンモニウムが副産物として生成する。また、水族館や家庭などの観賞用水槽、魚貝類の養殖槽では、 $NH_4^+$ が発生し、一部は $NO_3^-$ に酸化される。その結果、魚介類の養殖に障害を与える。申請者が見いだした菌株は、このような水環境における窒素の除去に関して、有効に働くと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、申請者の見いだした $NH_4^+$ と $NO_3^-$ を同時に除去する微生物を用いた水処理法、特に、観賞用水槽における $NH_4^+$ と $NO_3^-$ の除去装置開発の基礎データを得ることを目的とした。水槽水浄化に上記の菌株を使用するためには、微生物を保持するための担体が

必要である。この担体として、綿花を特殊な方法で高温処理した炭化綿が有効であるので、本品をベースとした $NH_4^+$ と $NO_3^-$ の同時除去バイオフィルターの作製を行う。

(2) 高温および中温の両条件下(耐熱性菌)、低有機物濃度、酸性など特殊環境で $NH_4^+$ と $NO_3^-$ を同時に除去する新たな微生物の分離を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 自然界から分離した*Klebsiella* sp. F-5-2や保存菌株計8株を用いた。それぞれの菌株を液体培養し、得られた菌体を炭化綿に接種して包括状態にした。同炭化綿を循環装置および温度制御装置を備え、金魚を飼育した水槽にセットし、空気の供給量を調節しながら循環水を流した。水槽中の $NH_4^+$ 、 $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ を経時的に定量するとともに生存する金魚の数を記録した。また、循環水に炭素源を加えて、 $NH_4^+$ と $NO_3^-$ の除去や金魚の生存に与える効果を調べた。

(2) 水槽中の生菌数を経時的に測定し、微生物種の解析を行った。また、炭化綿に形成されたバイオフィルム上の微生物を調べた。

(3) 特殊環境下で $NH_4^+$ と $NO_3^-$ を同時に除去する菌株を分離は、それぞれの目的に合致する条件を設定して行った。すなわち、耐熱性菌は、中温(30℃)および高温(50℃)の両方で両イオンを除去する菌株を分離した。高濃度の両イオンを除去する菌株は、培地中の $NH_4NO_3$ 濃度を次第に増加させることにより得た。有機物濃度の低い条件下で両イオンを除去する菌株の分離は、1% (w/v) D-グルコースを含む培地を用いた。酸性で両イオンを除去する菌株の分離は、pH 3.0と4.5の培地を用いた。

## 4. 研究成果

(1) 試験した8株の中で、5株が菌株を加えていない対照と比較して循環水中の $NH_4^+$ の増加を抑制した。生存する金魚の数も多かった。5株の中では、*Enterobacter cloacae* NBRC 13513株が、最も強く $NH_4^+$ の増加を抑制した。しかし、 $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ は対照と同様、次第に増加した。

(2) 循環水に各種の炭素源を加えて試験したところ、0.012% (w/v) D-グルコースを加え

た場合、最も強く $\text{NH}_4^+$ の増加を抑制した。しかし、0.02% (w/v) 以上加えると、循環水は混濁し、全ての金魚は4日以上生存できなかった。外部からの汚染菌の増加が原因であった。

(3) 循環水中の生菌数の増減は大きく変動し、信頼できる値は得られなかった。また、植菌した試験株の生存率は、現在の測定法では正確に判定することはできないことがわかった。植菌した菌株の生存率の測定法や、炭化綿上に形成されたバイオフィルムの解析法の確立が今後の課題であると考察した。

(4) 中温 (30°C) および高温 (50°C) の両方で $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を同時に除去する耐熱性菌 *Bacillus liqueniformis* T-7-2 株を土壌より分離し、両窒素化合物を除去するための最適条件を設定した。本菌は、脱窒系を有しており、日本の夏期や熱帯地方における排水処理において有効に機能すると考察した。

(5) 保存菌株中から得た *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689 株は、排水中の窒素化合物としては高濃度である 0.5%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を3日間で完全に除去できることを見いだした。本菌は高濃度の $\text{NH}_4^+$ や $\text{NO}_3^-$ が存在する条件下で使用できる。本菌も脱窒系を有しており、培養液中の全窒素は完全に除去され、菌体中には始めに添加した全窒素量の41%が含まれていた。残りは脱窒されたと考察した。

(6) GC分析により、振動数が0と40 rpmの時、NBRC 12689 株はわずかに $\text{N}_2\text{O}$ を発生し、70と100 rpmの時、 $\text{N}_2\text{O}$ を発生しないことがわかった。140 rpmの時、多量の $\text{N}_2\text{O}$ を発生した。GC-MS分析により、振動数70 rpmの時、 $^{15}\text{N}_2$ だけが発生することを示した。 $^{15}\text{NH}_4^+$ 由来の $^{15}\text{N}_2$ は見いだされなかった。本菌は高濃度の $\text{NH}_4^+$ や $\text{NO}_3^-$ が存在する条件下で使用できると考察した。

(7) 有機物濃度の低い条件下で $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を同時に除去する菌株を土壌より分離し、*Ralstonia*属と同定した。本菌は1% (w/v) グルコースでも効率的に両者を除去することを見いだした。本菌の両イオン除去に与える諸因子を検討した結果、どの通気条件でもD-グルコースおよび0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ 添加培地が最適であった。同培地では、好気条件および微好気条件で、それぞれ0.25% (w/v) および0.15% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  をほぼ完全に除去できた。本菌を培養し、培養上清および菌体中の全窒

素量の推移を調べたところ、添加した全窒素量の57% (好気条件)、58% (微好気条件) および58% (嫌気条件) が培養系外へ除去されていた。本菌は、最小限の炭素源添加で $\text{NH}_4^+$ や $\text{NO}_3^-$ を効率的に除去できることがわかった。

(8) pH 4.5、好気条件下で分離したKH-45-10株は、0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ と0.1 mM  $\text{MoO}_4^{2-}$ 存在下で、0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を48時間以内に完全に除去した。18S rRNAと26S rRNA遺伝子の解析等から、本菌を*Pichia jadinii*と同定した。本菌は、初発pH 2.0~6.0の培地において $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を完全に除去した。培養上清プラス菌体中の全窒素量は、始めに加えた全窒素量とほぼ同じであったことから、本菌は脱窒系は有していないと考察した。しかし、培養液中の $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の菌体への同化により、酸性側でも $\text{NH}_4^+$ や $\text{NO}_3^-$ を完全に除去できることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① 竹中慎治、周琦、アンピン クンチャ、ピシット シースリヤチャン、村上周一郎、青木健次：

Isolation and characterization of thermotolerant bacterium utilizing ammonium and nitrate ions under aerobic conditions. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 385-390 (2007), 査読有

② 周琦、竹中慎治、ピシット シースリヤチャン、アンピン クンチャ、村上周一郎、青木健次：

Screening and characterization of bacteria that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously with controlled cultural conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 185-191 (2007), 査読有

[学会発表] (計4件)

① 芦野可奈、竹中慎治、青木健次：硝酸アンモニウム排水の微生物処理 (第14報) 微好気条件下で $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を効率的に除去

する微生物の培養特性の解析. 日本農芸化学会2009年度大会、福岡市、2009年3月28日

- ② 周琦、竹中慎治、村上周一郎、青木健次：硝酸アンモニウム排水の微生物処理（第15報）酸性条件下で $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を効率的に除去する微生物の分離・同定および培養特性. 日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡市、2009 年 3 月 28 日
- ③ 青木健次、竹中慎治：Simultaneous removal of ammonium and nitrate salts from wastewater by bacteria and yeasts. 12th International Symposium on Microbial Ecology, Cairns, Australia, August 21, 2008.
- ④ 芦野可奈、竹中慎治、村上周一郎、青木健次：硝酸アンモニウム排水の微生物処理（第13報）微好気条件下で $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を効率的に除去する微生物のスクリーニング. 日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋市、2008 年 3 月 28 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木 健次 (AOKI KENJI)  
神戸大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：60031225

### (2) 研究分担者

竹中 慎治 (AOKI KENJI)  
神戸大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：40314512

### (3) 連携研究者

なし