〈論 文〉

低温下で活性の高い脱窒菌の基礎的研究 (I)

— 脱窒菌の分離とその性質 —

Denitrifying Bacterium which gives High Activity at Low Temperature (I) — Isolation and Characteristics of a Denitrifying Bacteria —

松山 英俊*, 石崎 紘三*
Hidetoshi MATSUYAMA Kozoh ISHIZAKI

Abstract

A bacterium which gives the high denitrifying activity at low temperature was isolated from rice field soil. Almost all the properties of the new isolate (N-1 strain) were in good agreement with those of *Pseudomonas fluorescens*.

For the denitrification by N-1 strain, optimum C/N ratio was about 3.5, and optimum temperature was about 25°C. Acetic acid, citric acid, and glycerin were good carbon sources for the denitrification by N-1 strain.

The specific removal rate of NO_3^- -N in the batch experiments at 5°C varied from 0.0140 to 0.0210 mg NO_3^- -N/mg Cell/hr.

1 結 言

廃水の窒素除去技術は、生物学的脱窒法と物理化学的脱窒法に大別されるが、生物学的脱窒法が有望とされ、わが国でもいくつかの実プラントが稼動している。脱窒を行う微生物は通常、通性嫌気性菌であり、脱窒菌に関しては、Payne¹⁾の総説に詳述されている。

脱窒菌が環境因子によって大きな影響を受けることは、従来良く知られており、関与する環境因子として pH、C/N 比、炭素源の種類、溶存酸素、温度等があげられている。遠矢ら²⁾は、し尿の脱窒では混合培養液の pH が脱窒菌の脱窒機能に大きな影響を与えることを明らかにしている。また、Delwiche ら³⁾によると、*Pseudomonas aeruginosa* の脱窒の最適 pH は 7.0 から 8.0 の範囲にあり、pH 7.3 よりアルカリ側では生成ガスとして N_2 ガスを発生するが、pH 7.3 から酸性側になるにつれて N_2O ガス発生量が増加するとされている。

脱窒菌の多くは従属栄養細菌で、水素供与体として有機物を必要とするが、有機物の種類および NO_3^- -N に対する有機物の量比 (C/N 比) によって、脱窒速度が影響を受けることが知られている。また、脱窒に対する溶存酸素の影響に関しても多くの報告がある。^{4), 5), 6)}

脱窒に影響を及ぼす環境因子のなかでは、水温の低下が実用上特に重要な因子である。Alexander⁷⁾は、脱窒菌の最適温度は 25 ~ 30 °C であると報告している。また、遠矢ら⁸⁾は、アレーニウスプロットから脱窒の活性化エネルギーを求め、脱窒菌の温度依存性が高いことを報告している。Dawson ら⁹⁾は、*Pseudomonas denitrificans* を優占種とする活性汚泥を用いて脱窒の温度依存性を検討しているが、5 °C で 0.0135 ~ 0.0175 mg NO_3^- -N / mg Cell / hr の脱窒活性を得ている。その結果、低温での生物学的脱窒法の困難さも、脱窒菌の濃度を増すことなどによって解決しうることを示唆している。しかし寒冷地の冬期における生物学的脱窒法は、脱窒菌の活性低下によりその実施は困難であるばかりか、低温下での脱窒菌に関する基礎的なデータも少ないのが現状である。

著者らは、寒冷地における冬期の生物学的脱窒法を、より効率よく行うことを目的として研究を開始した。低温で効率よく脱窒を行うためには、装置の改良、菌体濃度の増加など工学的見地からの工夫も考えられるが、また、生物学的見地から、低温下でも活性の高い脱窒菌を探索して、その菌を用いた脱窒を工夫することも有望な方法と考えられる。

* 工業技術院北海道工業開発試験所 〒061-01 札幌市豊平区月寒東2条17-2-1, Government Industrial Development Laboratory Hokkaido, (17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo, Japan 061-01)

本報では、5℃で活性を示す脱窒菌の分離、同定を行い、その菌を用いて、低温下における脱窒菌の基礎的なデータを得るために環境因子の影響等について検討した。

2 実験材料と実験方法

2.1 脱窒菌の分離

農水省北海道農業試験場の水田の土壌を採取し、5℃で集積培養を行った。脱窒菌の集積培養用の基本培地として、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.5 g, KH_2PO_4 4.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, KCl 2.8 g, グルコース 4 g, KNO_3 3.5 g, 脱イオン水 1 liter, pH 6.8の培地を用いた。脱窒菌の純粋分離は、微生物研究法懇談会編「微生物学実験法」¹⁰⁾に記述されている方法によって行った。

2.2 分離菌株の同定

同定実験のほとんどは、長谷川武治編著「微生物の分類と同定」¹¹⁾に記述されている方法によって行った。

脱窒菌の形態観察は、電子顕微鏡(日本電子, JEM-6A)を用いて行った。ペン毛染色後、銀でシャドーイングして観察した。脱窒菌の生育温度範囲は、温度勾配バイオフィットレコーダ(東洋科学産業製)を用いて検討した。

2.3 脱窒試験

脱窒試験は回分系で、2つの方法によって行った。一つは、BODテスター(大洋科学工業製)により、 N_2 ガス発生量を測定する方法、他の一つは、培養液を経時的にサンプリングして $\text{NO}_3^- - \text{N}$ を $\text{NO}_2^- - \text{N}$ を測定する方法である。実験に用いた装置はFig. 1に示した。反応液を嫌気条件にするため、滅菌流動パラフィンを重ね置した。反応槽は恒温水槽に入れて温度を一定にした。 N_2 ガス発生量の測定はFig. 1に示すように、発生ガス中の

Fig. 1 Diagram of laboratory batch reactor

A: Adjustable Magnetic Stirrer B: Stirring bar
C: Water Bath D: Liquid Paraffin E: Soda Lime
F: Manometer G: Sampling Tube H: Syringe

CO_2 をソーダライムで除去した発生ガス容量をマノメータによって測定した。この CO_2 を除去した発生ガスをサンプリングして、Molecular Sieve 5Aカラムを用いたガスクロマトグラフを行うと、事実上、 N_2 ガスが100%であることを確認した。サンプリングした液の菌体濃度は、O.D. 660によって測定し、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ と $\text{NO}_2^- - \text{N}$ はカドミウム還元法を用いたオートアナライザーIIシステム¹²⁾により測定した。

3 実験結果および考察

3.1 分離菌株の同定

5℃で脱窒活性を示す分離菌株のうち、N-1株が最も高い脱窒能を示したので、この菌株を用いて次の実験を行った。Fig. 2にN-1株の電子顕微鏡写真を示したが桿菌で極毛を持つことがわかった。N-1株の性質はTable 1に示した通りで、Bergeyの細菌分類第8版¹³⁾に記述されている*Pseudomonas fluorescens*の性質によく一致していた。従って、N-1株は*P. fluorescens*

Fig. 2 Electron micrograph of denitrifying bacteria N-1 strain (Bar represents 1μm)

Table 1 Biochemical and morphological characteristics of N-1 strain

Shape	rod
Gram-stain	negative
Motility	+
Flagellation	polar multitrichous
Oxidase	+
O-F test	oxidative
Pigments	
Ps. F agar	+
Ps. P agar	-
Carbon sources for growth	
L-Arabinose	+
Sucrose	+
Propionia	+
Butyrate	+
Sorbitol	+
Adonitol	-
Propylene glycol	+
Ethanol	+
Glucose	+
Trehalose	+
meso-Inositol	+
Geraniol	-
L-Valine	+
β-Alanine	+
DL-Arginine	+

と思われるが、未調査の性質もあり同定までには、さらに詳細な検討が必要と思われる。N-1株の好気的な生育温度範囲は Fig. 3 にみられる通りで、最適生育温度が25℃付近にあり、Morita¹⁴⁾の定義によると、この菌株は“psychrotroph”に属すると言える。また、生育pH範囲は5～10で、最適pHは8付近であった。

脱窒試験中に発生したガスは前述のように、CO₂ガス以外はN₂ガスであった。確認のためN₂OガスPorapak Q S カラムを用いたガスクロマトグラフで調べると、N₂Oガスは検出されなかった(検出限界 約20 ppm)。

3.2 N-1株の脱窒能に対する環境因子の影響

3.2.1 C/N比の影響

グルコースを炭素源とした基本培地を用いて、C/N比の影響を検討した。脱窒能はN₂ガス発生量を測定し

Fig. 3 Growth of N-1 strain

N-1 strain was incubated in basal medium employing a temperature-gradient bio-photorecorder (Toyo Kagaku Sangyo, Co., LTD)

て求めた。15℃におけるC/N比とN₂ガス発生量の関係は、Fig. 4 に示した。この結果は、従来言われているように、C/N比2以下ではN₂ガス発生量が少ないことを示している。

3.2.2 炭素源の影響

炭素源の種類によって脱窒速度が変化したり、中間体としてのNO₂⁻-Nの蓄積がみられたりすることは、従来よく知られている。さきの実験でN₂ガス発生の良いC/N比3.5、pH 7.7の条件で、Table 2 に示した改変培地に8種の炭素源を加えて脱窒能を比較した。15℃におけるN₂ガス発生量を測定した結果をFig. 5 に示した。酢酸、クエン酸、グリセリンなどが炭素源の時にはN₂ガス発生量は多かった。しかし、グルコースを唯一炭素源とした場合には、酢酸を炭素源とした場合の約1/2のN₂ガスを発生したにすぎなかった。また、メタノールを炭素源とした場合にはN₂ガスの発生を観察することはできなかった。Fig. 6 は5℃での実験結果を示したもので、炭素源としては、酢酸、クエン酸およびグルコースを用いた。図から明らかなように5℃においても、グルコースを炭素源とした場合にはN₂ガス発生

Fig. 4 The effect of C/N ratio on the denitrification by N-1 strain

Medium: Basal Medium 200ml
KNO₃ (NO₃⁻-N: 194 mg/200ml)
glucose (84~420 mg/200ml)
Temperature: 15 °C
Inoculum size: 0.358 mg dry cell weight

Table 2 Modified Medium

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	22 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.005 g
KCl	2.8 g
KNO ₃	1.4 g
Carbon Source (C/N ratio 3.5)	
Deionized Water	1 liter
PH	7.7

Fig. 5 The effect of carbon sources on the denitrification by N-1 strain at 15 °C

Medium: Modified Medium 200ml, C/N ratio 3.5
Inoculum: 4 ml (O. D. 660 0.285)

量は少なかった。しかし、ガス発生終了時のO.D.値は、炭素源として酢酸を用いた時には0.124, グルコースを用いた時には0.177であった。

Fig. 6 The effect of carbon sources on the denitrification by N-1 strain at 5°C
Medium: Modified Medium 200ml, C/N ratio 3.5
Inoculum size: 1.2ml (O.D. 660 0.796)

3.2.3 温度の影響

酢酸を唯一炭素源とした改変培地 350 mlを用いて、温度を5, 10, 15, 20および25°Cの5段階に設定して、各温度における脱窒試験を行った。反応過程において経時的に、注射器でそれぞれの試料をサンプリングし、液中の NO_3^- -N, NO_2^- -NおよびO.D.値を測定した。得られた結果は、Fig. 7に示した。5°Cでは脱窒の過程で、液中に中間体の NO_2^- -Nが著量に蓄積したが、水温が高くなるにつれて、 NO_2^- -Nの蓄積はみられなくなった。低温で NO_2^- -Nの蓄積がみられるのは、硝酸還元酵素系よりも、亜硝酸還元酵素系の方が、低温における活性の低下が大きいと推測された。

Fig. 7 The temperature dependency of the denitrification by N-1 strain
Modified Medium contained autic acetic acid as a sole carbon source was used.
At appropriate intervals, samples were taken for the determination of NO_3^- -N, NO_2^- -N, and O.D. 660 nm
—— concentration of NO_3^- -N - - - - - concentration of NO_2^- -N

乾燥菌体重量当りの脱窒活性を求めるために、乾燥重量とO.D.との関係を求めた。温度によって両者の関係は異なると考えられるが、5°Cの場合の測定結果をFig. 8に示した。この図から最小二乗法により、 $y = 932.2x + 6$ の式を得たが、定数項6は無視しうものとして、 $y = 932.2x$ を用いた。O.D.値から乾燥菌体重量 (mg/ℓ) の値を求め、5°Cにおける脱窒活性を計算すると、約0.0140 ~ 0.0210 mg NO_3^- -N/ $\text{mg Cell}/\text{hr}$ となった。一般に知られている脱窒菌の5°Cでの脱窒活性は0.0080 mg NO_3^- -N/ $\text{mg Cell}/\text{hr}$ より小さく^{6), 15)}本菌の脱窒活性は一般の脱窒菌に比べてかなり高く、Dawson⁹⁾らの報告している脱窒活性と、ほぼ同じか、やや高い値であった。しかし、本実験は回分系で行ったもので、さらに正確な脱窒活性を求めるためには、連続

Fig. 8 Relationship between the Optical Density at 660 nm and the Dry Cell Weight

系での成績を求めることも必要であろう。

4 結 論

低温下で活性を示す脱窒菌の探索と分離菌株の同定を試みるとともに、分離菌株を用いて、環境因子の脱窒への影響を検討し、次の結果を得た。

- 1) 水田土壌から分離した 5℃ で脱窒能を示す菌株のなかで、活性の高い N-1 株を得た。この菌は, Bergey の細菌分類書第 8 版¹³⁾ の *Pseudomonas fluorescens* の記載と、その性質がよく一致したが、未調査の性質もあり同定までには、さらに詳細な検討が必要と思われた。また、Morita¹⁴⁾ の定義によると、N-1 株は生育温度範囲より “psychrotroph” に属すると考えられた。
- 2) 脱窒活性におよぼす環境因子を調べたところ、C/N 比 3.5 付近が最適で、炭素源としては、酢酸、クエン酸、グリセリン等が優れていた。水温は 25℃ 付近で脱窒活性が高く、低温になるに従って、中間体としての NO_2^- -N が著積するようになった。供試菌は 5℃ で、約 0.0140 ~ 0.0210 mg NO_3^- -N/ mg Cell/hr の脱窒活性を示した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、親切的御助言をいただいた北海道大学農学部農芸化学科 佐々木博先生に感謝します。また、御協力をしていただいた酪農学園大学 菊地政則先生、当試験所第 3 部 西村興男氏に厚く御礼します。

(原稿受理：昭和 56 年 11 月 26 日)

— 引 用 文 献 —

- 1) Payne, W. J. (1973) Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 37, 409 - 452
- 2) 遠矢泰典 (1974) “脱窒法” 再生水の造水と利用技術資料集大成, フジテクノシステム, 東京
- 3) Delwiche, C. C. (1956) Denitrification, A Symposium of Inorganic Nitrogen Metabolisms (edited by McElroy and Grass) p233, Johns Hopkins Press, Baltimore.
- 4) Skerman, V. B. D. and MacRae, I. C. (1957) The influence of oxygen in the reduction of nitrate by adapted cells of *Pseudomonas denitrificans*. *Can. J. Microbiol.*, 3, 215 - 230
- 5) Smith, J. M., Masse, A. N., Feije, W. A. and Kamphate, L. J. (1970) Nitrogen removal from municipal wastewater by columnar denitrification. Presented at A. C. S. Meeting, Chicago.
- 6) Mulbarger, M. C. (1970) Modifications of the activated sludge process for nitrification and denitrification. Presented at 43rd Annual Conference of the Water Pollution Control Federation, Boston Massachusetts.
- 7) Alexander, M. (1961) “Introduction to soil Microbiology” John Wiley & Sons, Inc. New York and London.
- 8) 遠矢泰典, 松尾吉高, 鈴木隆幸 (1973) 窒素除去を目的とした新しい下水処理技術 (I), 用水と廃水 15, 1058 - 1074
- 9) Dawson, R. N. and Murphy, K. L. (1972) The Temperature dependency of biological denitrification. *Water Res.*, 6, 71 - 83
- 10) 微生物研究法懇談会編 (1979) 微生物学実験法 P 67 - 69 講談社, 東京
- 11) 長谷川武治 編著 (1979) 微生物の分類と同定 P 203 - 245 学会出版センター, 東京
- 12) American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1976) “Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater” Fourteenth Edition, P 620 - 624 American Public Health Association, Washington
- 13) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974) Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 8th Edition, P 219 - 221 The Williams & Wilkins Company, Baltimore
- 14) Morita, R. Y. (1975) Psychrophilic Bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 39, 144 - 167
- 15) Focht, D. D. and Chang, A. C. (1975) Nitrification and Denitrification Processes Related to Waste Water Treatment. *Adv. Appl. Microbiol.*, 19, 153 - 186