

Paracoccus denitrificans による脱窒素反応の速度論的解析

(阪大・工・醸酵) 〇脇 哲朗, 川戸義彦, 島谷庸一, 村山敬一, 市川邦介

1. 目的 廃水の三次処理としての窒素除去プロセスは、好気条件における硝化と、嫌気条件における脱窒の二工程よりなる。脱窒素反応を行なう細菌は通性嫌気性菌であり、好気条件下では酸素呼吸により増殖し、嫌気条件下では硝酸塩(亜硝酸塩)と炭素源の存在で脱窒を行なう。このような性質を利用した単一汚泥式窒素除去法、好気-嫌気槽連結式窒素除去プロセスはさまざまな変法を含めて、建設コストが安価であり、良好な汚泥沈降性が得られ、また高い窒素除去効率を得られるものとして注目されているものである。しかしながら装置設計や運転条件の設定にあたっては経験的なものが多く、特に反応に関与する脱窒菌の生理特性を考慮した動力学的な取り扱いはあまりなされていない。本研究は代表的な脱窒細菌である Paracoccus denitrificans をとりあげ、好気、嫌気、好気-嫌気遷移状態での増殖特性を調べ、好気-嫌気槽連結式窒素除去プロセスにおける最適運転条件について検討を加えることを目的とする。

2. 方法 使用菌株は P. denitrificans IFO 12442。培地は炭素源としてグルコースを含み、窒素源として硝酸、硝酸及びアンモニア、または亜硝酸、さらに酵母エキスその他の微量無機塩を含む。回分及び連続培養は2.6ℓ培養槽(操作容量1.3ℓ又は1.5ℓ)を用い、30℃、pH 7.5で行なった。培養槽内を嫌気状態に保持するために、ヘリウム又はアルゴンガスを培養槽に供給した。菌体濃度はOD<sub>660</sub>を測定し、乾燥菌体重量に換算した。硝酸、亜硝酸の測定はJIS-K0102法及び硝酸はカドミウム還元法、亜硝酸はナフチルエチレンジアミン法を併用し、アンモニア態窒素は、ネスラー法を用いた。脱窒酵素(硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素)活性の測定には、メチルピオロゲン(還元型)を電子供与体として用いた。グルコース濃度の測定には、グルコスタット法を用いた。

3. 結果 硝酸を用いた場合の脱窒素反応は  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$  によって示される逐次反応で進行し、反応中間体である亜硝酸は、回分系では最大160mg N/ℓ蓄積するが、連続培養系では高い希釈率においてもわずかに蓄積するのみであった(5mg N/ℓ以下)。硝酸、亜硝酸からの最大比窒素ガス生成速度はそれぞれ160, 120 mg N<sub>2</sub>/g·cell·hrであり、それぞれを制限基質とする連続培養では希釈率0.3, 0.15 (1/hr)でwashoutがおこった。菌体の最大比増殖速度は硝酸を基質とした場合、亜硝酸を基質とした場合に比して約2倍であり、これに起因して、硝酸を基質とした時、高い総括脱窒速度が得られた。硝酸還元に対してグルコースを制限基質としたとき、硝酸を制限物質とした場合よりずっと低い希釈率(0.2 1/hr)でwashoutしたがこれは蓄積した亜硝酸による阻害効果と考えられる。好気培養と嫌気培養を比較すると炭素源に対する増殖収率や最大比増殖速度は好気培養の方が1.3倍程度大きく、逆に脱窒酵素活性は嫌気培養の方が大きく、またアンモニアの添加で好気条件における硝酸還元酵素の発現は抑えられた。回分系において脱

シンポジウム (廃液処理)

窒素還元活性は対数増殖期で高い値を示したが、静止期においてもかなりの活性があり、内生呼吸による脱窒の可能性が示唆された。連続培養系における硝酸還元酵素の比活性は、増殖速度によらずほぼ一定の値を示した。また回分、連続系における脱窒酵素活性から計算される脱窒速度は実際のそれよりかなり大きく、脱窒酵素は菌体内に過剰に存在していると考えられる。

(Fig. 1) 回分及び連続系で好気から嫌気条件へ環境が変わると増殖及びグルコース消費は速かに停止するが、硝酸は急に減少するという現象がみられ、これに呼応して亜硝酸の蓄積がはじまり、約3時間後に最大値130 mg N/lまで蓄積した。硝酸還元酵素は、嫌気状態になると酸素による抑制の解除により次第に増加しはじめるが、最大値に達するのに6時間程度もかかる。一方亜硝酸還元系の発現は、硝酸還元系の発現よりも遅く、嫌気状態とな

っても3時間はあまり活性が増大せず、これが遷移状態での亜硝酸の蓄積をもたらしたと考えられる。(Fig. 2) このように嫌気状態に変換直後、グルコース消費および増殖の停止にもかかわらず、硝酸の消費がおこることは、遷移状態において脱窒反応と共役した酸化のリン酸化がおこっていないことを示唆する。嫌気から好気になると、硝酸の消費は急速に低下し、硝酸還元酵素活性も急激に減少することが回分及び連続系両方で確かめられた。この脱窒活性の低下は短時間のうちに嫌気状態に戻すと硝酸の急激な減少及び硝酸還元酵素活性の回復がみられた。このことは好気槽滞留時間が短い場合は嫌気槽に流入した菌体はかなり硝酸還元能をもっていることを示唆している。

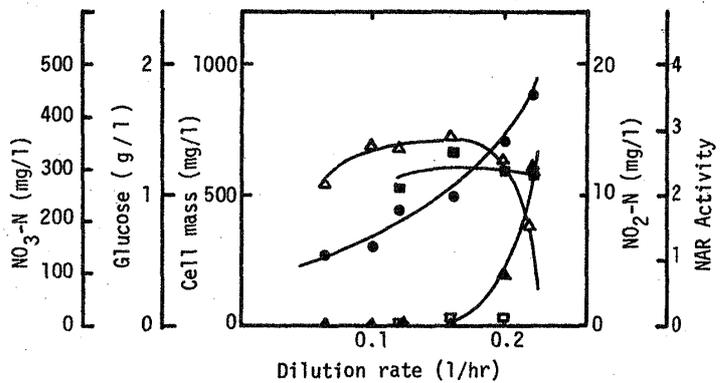


Fig. Steady state relationship in the continuous system.

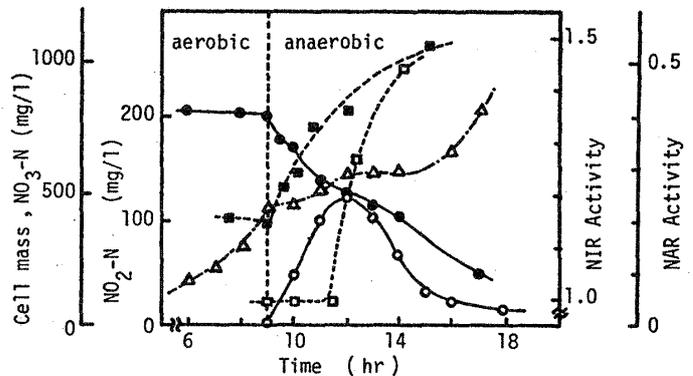


Fig. Response of batch culture from aerobic to anaerobic.

△: Cell mass, ●: NO<sub>3</sub>-N, ○: NO<sub>2</sub>-N, □: Nitrite reductase, ■: Nitrate reductase, ▲: Glucose.

T. Shimizu et al., "Metabolic Characteristics of Denitrification by *Paracoccus denitrificans*"  
J. Ferment. Technol., 56 207 (1978)

T. Shimizu et al., "Kinetic Study on Denitrification by *Paracoccus denitrificans*"  
J. Ferment. Technol., 56 214 (1978)