

亜硝酸菌 *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 のアルギン酸カルシウムへの固定化

萩元 孝子・太田 欽幸

広島大学生物生産学部
1987年4月30日 受理

Immobilization of *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 onto Ca-Alginate

Takako HAGIMOTO and Yoshiyuki OHTA

Laboratory for Microbial Biochemistry, Faculty of Applied
Biological Science, Hiroshima University

硝化過程はアンモニアから亜硝酸、亜硝酸から硝酸へと一連の逐次反応であり、主として独立栄養性絶対好気性菌である *Nitrosomonas* 属、および *Nitrobacter* 属の菌により、それぞれの反応は進行する¹⁾。独立栄養細菌一般に見られるように両菌とも増殖速度が非常に遅く、その最大比増殖速度は一般に 0.1~0.5 (1/day) である²⁻⁵⁾。このため、工場廃水などの硝化過程が全脱窒素プロセスの律速段階となり、また硝化の達成度が全過程での窒素除去率を左右することになる³⁾。そこで本研究では、この過程の中でも特に律速段階となっている *Nitrosomonas* 属が担っている過程を、従来より速やかに、効率的に行わせるため、適当な担体を用いて菌体を直接固定化した。固定化法として、結合反応を起こさず、菌体の失活の可能性が小さく広い適用範囲を持っている包括法を採用した。

現在まで *N. europaea* の固定化については、Tramper ら⁶⁾ のアルギン酸ナトリウムを用いた実験が報告されている。しかし、この研究では、*Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 を用いており、具体的な固定化条件、培養条件も示されていないうえ、低濃度のアンモニア除去についてであった。そこで本研究では、*Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 を用いて、この菌体を固定化するための担体の選択、固定化条件、固定化菌体の培養条件、およびできるだけ高濃度アンモニアを除去するための連続培養について検討した。

実 験 方 法

供試菌株 *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 を用いた。

試薬 酵母エキス(半井化学製)、コーンステイープリカー (C. S. L.) (三和濃粉製)、ポリペプトン(和光純薬製)、肉エキス(極東製薬製)を用いた。その他の化学試薬は市販の特級品を使用した。また、水は精製水を用いた。

培地および培養方法 種菌の培養には 1 M のリン酸緩衝液を含む Lewis & Prammer 培地⁷⁾、固定化実験には K_2HPO_4 を 0.5 g/l 含む Engel & Alexander 培地⁸⁾ を用いた。種菌培養は 500 ml 容三角フラスコに培地 100 ml を入れ、30°C、125 rpm で振とう培養(T398T 高崎製)を行った。また、固定化実験には、上記の方法で 2 日間培養した対数増殖期の菌を遠心分離 (12,000×g, 15 min) し、Engel & Alexander 培地で 3 回洗浄の後、反応に供した。

生育度の判定 菌の生育は、培養液中に生成した NO_2-N 量を測定することによって判定した。 NO_2-N の定量は、Standard Methods⁹⁾に従った。

固定化用材料 供試菌株の固定化には、次に示す材料を用いた。すなわち、アルギン酸ナトリウム(和光純薬および半井化学製)、寒天(半井製)、*k*-カラギーナン(伊那工業製)、硬化樹脂、ENT (関西ペイント製)、活性炭(富士炭素製)、セライト(マンビル製)、ゼオライト(クレオラオス製)およびビスケットビーズ

(半井製)をそれぞれ用いた。

固定化法 上述の洗浄菌体を固定化用菌体として用い、各固定化材について固定化を行った。a) アルギン酸ナトリウム 2.5 ml の洗浄菌体懸濁液をオートクレーブした 5% (w/v) のアルギン酸ナトリウム溶液と混合し、これを 5 ml 容シリンジ (テルモ製) で吸い上げ、0.1 M 塩化カルシウム溶液 100 ml 中に滴下し、粒状に固定化した。これを室温で 20 分放置後、固定化菌体のみをテフロン製の網を用いて分離し反応液で洗浄し、アンモニア酸化反応に用いた。b) 寒天 pH 8.0 に調整した反応液で懸濁した 5% (w/v) 寒天溶液を 100 ml 容ビーカーに 2 個用意し、オートクレーブ後、片方に温度計を入れ、40°C になったところで同量の菌体懸濁液をもう片方のビーカーに加え、手早く混合した。その後、室温で冷却、固化させ、滅菌メスで適当の大きさに切って反応に用いた。c) *k*-カラギーナン 寒天と同様の方法で行った。d) 光硬化樹脂 (ENT) ENT, 光重合開始剤 S, 成形助剤としてのアルギン酸ナトリウム (3% (w/v)) 溶液を 10 : 0.1 : 2.5 の割合で混合し、これを 0.1 M 塩化カルシウム溶液中へ注射器先端より滴下した。5 分後、この粒子を取り出し、シャーレに入れ紫外線照射を行い、洗浄の後反応に用いた。

その他の固定化材料 500 ml 容三角フラスコに Lewis & Prammer 培地を 100 ml と、セライト、ゼオライト、ビスケットビーズあるいは活性炭を培地の 10% (w/v) 入れ、オートクレーブ後、菌体懸濁液を接種し反応に用いた。

連続培養 固定化菌体によるアンモニアの連続処理には、Fig. 1 に示す装置を用いた。エアポンプで通気し、ペリスタポンプにより 10 mM 塩化カルシウム溶液、2.5% の K_2CO_3 溶液を含んだ Alexander 培地を 3.5 ml/h の流速で供給した。2 重管の外側に 30°C の水を循環させることにより温度を一定に保った。インドフェノール法¹⁰⁾ によりアンモニア態窒素量を求め、アンモニアから亜硝酸への変換率を算出した。

固定化菌体量の測定 アルギン酸ナトリウムに固定化させた菌体の量は、桑田の方法¹¹⁾ に従い、アルギン酸をリン酸存在下で溶解させたのち、菌体を濁度で測定した。図中には、予め作製した標準曲線により重量に換算して表示した。

実験結果

固定化材の選択 その後、菌体を固定化し、それぞれの材料について、30°C、4 日間振とう培養し亜硝酸の生成量を調べた。その結果、Table 1 に示すようにアルギン酸ナトリウム、*k*-カラギーナンおよびセライト No. 625 が、 NO_2 -N の生成量が 20 mg/mg cells 以上であった。しかし、*k*-カラギーナン、寒天に固定化した場合、固化温度が *Nitrosomonas* の死滅温度の 50°C¹²⁾ に近く、活性の低下が見られ、操作に困難があった。また、セライト No. 625, No. 640, ゼオライト No. 5, ビスケットビーズおよび活性炭は振とう中に溶解してしまい、使用に耐えなかった。さらに、ENT では亜硝酸を全く生成しなかった。このような理由から、

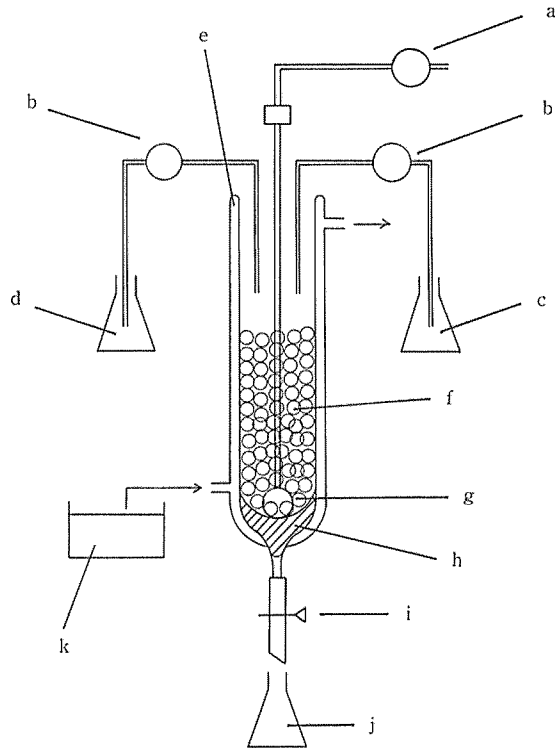


Fig. 1. Apparatus for continuous cultivation.

Symbols: a) Air pump; b) Peristaltic pump; c) 2.5% K_2CO_3 solution + Engel & Alexander medium⁸⁾; d) 10 mM $CaCl_2$ solution; e) Glass column with jacket; 40 mm in inner diameter and 450 mm long; f) Immobilized cells; g) Glass ball filter; h) Gauze; i) Pinch cock; j) Effluent; k) Water bath (30°C)

本実験ではアルギン酸ナトリウムを固定化用の担体として選択した。

アルギン酸ナトリウムへの固定化 *N. europaea* の亜硝酸生成が非固定化菌体よりも効率的に行われるような固定化条件の検討を行った。また、300, 500および1000 cps, それに混合体についてそれぞれ同量の菌体を固定し、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の生成量を調べた。その結果、混合体(和光製)のアルギン酸ナトリウムが最も良好であり、取り扱いも容易であった。次いでそのアルギン酸の濃度は、1, 2, 3, 4および5% (w/v) で菌体を固定化し、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の生成量を検討した結果、4% (w/v)で最も生成され、その値は11.8 mg/mg cellsであった。次いで固定化時の塩化カルシウムの濃度は、0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75および1.0 Mで検討した結果、0.1 Mで最も $\text{NO}_2\text{-N}$ が生成され、その値は12.7 mg/mg cellsであった。さらに、アルギン酸ナトリウムおよび塩化カルシウムの濃度をそれぞれ4%および0.1 Mとしてその固定化時間を0, 5, 10, 15, 20および30分と変えて検討した結果、20分間が最も良く、この場合の $\text{NO}_2\text{-N}$ の生成量は22.1 mg/mg cellsであった。次に固定化の菌体量を種々変えて、その $\text{NO}_2\text{-N}$ 生成に及ぼす影響を調べた。その結果、Fig. 2に示すように、33-62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の菌体濃度が最も良く、それよりも菌体濃度が高くても低くても菌体量当たりの

$\text{NO}_2\text{-N}$ の生成量は減少した。非固定化菌体よりも固定化菌体の方が13% $\text{NO}_2\text{-N}$ の生成量が多かった。さらに、固定化用菌体の培養時間について、24, 48, 72および96時間培養した。そしてそれぞれの菌体を固定化して調べた。その結果、固定化用菌体の培養時間は、長くなると、それぞれ、7.5, 18, 22, 74 mg/lとなり菌体量は増加した。しかし、乾燥菌体1 mg当たりの $\text{NO}_2\text{-N}$ 生成量はそれぞれ16.2, 14.7, 7.5および2.5 mg/mg cellsとなりその菌体当たりの生成量は減少した。そこで固定化用菌体の培養時間は、培養24時間では単位菌体当たりの $\text{NO}_2\text{-N}$ 生成量は多いが、菌体量が少ないので培養時間は24-48時間とした。

固定化菌体の培養条件 a) 初発 pH の影響 固定化菌体および懸濁菌体を20 mM リン酸緩衝液およびTris-HCl 緩衝液を用いて pH 6, 7, 8 および9.0に調整した培養液中で培養し、pHの生育に及ぼす影響を調

Table 1. Materials for Immobilization

Material	Concentration (% w/v)	$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg/mg cells)
Sodium alginate	4.0	25.3
Agar	2.0	10.3
<i>k</i> -carrageenin	3.0	21.1
E. N. T.—2000*	2.5	trace
Activated carbon	5.0	18.6
Celite No. 640	10	3.37
Celite No. 625	10	23.9
Zeolite No. 5	10	3.7
Biscuit beads	10	9.8

* E. N. T. is the oligomer produced by hydroxyethylacrylate, isophorondiisocyanate and polyethyleneglycol. The number of 2,000 means polyethyleneglycol molecular weight.

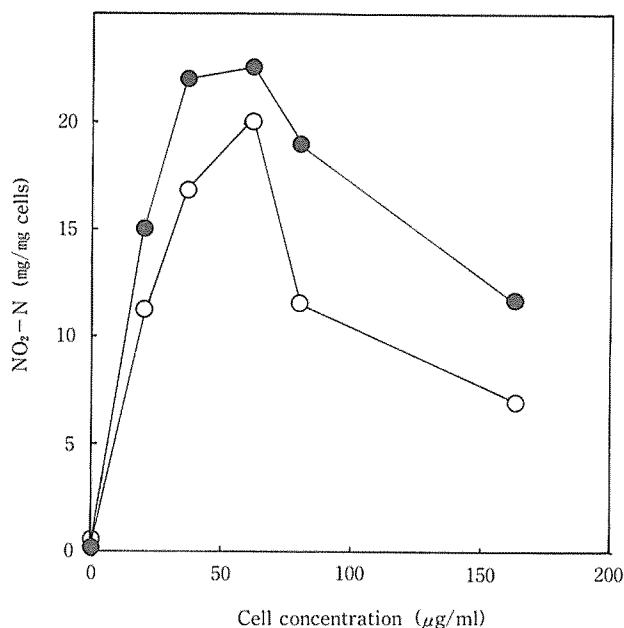


Fig. 2. Influence of cell concentration on $\text{NO}_2\text{-N}$ production. Amount of NO_2 produced for 4 days was shown.

Symbols: ●, Immobilized cells; ○, Suspended cells.

べた。この結果、固定化菌体の生育量は、懸濁菌体のそれと比べると、pH 8.0 の Tris-HCl 緩衝液を用いた場合、約35%劣っていた。また、リン酸緩衝液を用いた場合、生育量が高いが、アルギン酸ゲルが溶解するので培養には不適当であった。両菌体とも pH 8.0 で生育量が最高となった。これより固定化しても菌体の生育至適初発 pH 範囲は変化せず、その至適 pH 8.0 であることがわかった。b) 温度の影響 両菌体を、20, 30, 37および50°Cで培養し、生育に及ぼす温度の影響を調べた。固定化、非固定化両菌体とも生育至適温度は30°Cとなり、固定化による生育至適温度の変化は起こらなかった。c) エネルギー源の濃度の影響

窒素源かつエネルギー源であるアンモニウムイオンの濃度を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ でおおの 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 12.0および 15.0 g/l となるよう培養液を調整し、これが両菌体の生育に及ぼす影響について4日間培養し検討した。その結果、Fig. 3に示すように、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 量が 3 g/l までは、懸濁菌体の方が生育量が高く、その後伸びないのに対し、固定化菌体は 7 g/l になっても増加し続けた。しかし、生成した $\text{NO}_2\text{-N}$ 当りの添加アンモニア濃度の割合、すなわちアンモニアの利用効率は 1 g/l のとき100%, 7 g/l のとき53.9%である。このことから、1 g/l 以上の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を本菌株は、この試験した4日間では完全には利用しきれないということがわかった。また、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 量が培養液中に多くなるほど、ビーズがもろくなり壊れやすくなった。d) 金属イオンの影響 Co^{2+} , Cu^{2+} , Mo^{6+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} をおのおの 1 mM となるように各金属イオンの塩化物を培養液中に添加した。ただし、 Mo^{6+} は、モリブデン酸アンモニウムの形で添加した。そして各金属イオンの $\text{NO}_2\text{-N}$ の生成に及ぼす影響を調べた。その結果、Table 2 に示すように、 Mo^{6+} の添加で、無添加の67%増加した。また、 Co^{2+} , Mg^{2+} および Ba^{2+} の添加でそれぞれ54, 43および34%増加した。また、 Ni^{2+} , Zn^{2+} および Mn^{2+} ではそれぞれ10%の増加が見られた。そこで最も生育を促進した Mo^{6+} についてその濃度を0.5, 1および2 mM と変えて添加すると、1 mM の場合が最もよく、2 mM の濃度にしたところ、1 mM の場合の70%となり阻害的となった。次いで、 Co^{2+} の濃度を0.5, 1および2 mM と変えて添加した。その結果、これらのどの濃度でも生育の促進作用が見られた。*Nitrosomonas* の生育に Co^{2+} は 5×10^{-4} M で阻害作用を示すと報告されているが¹³⁾、上述のように、0.5, 1および2 mM と添加濃度を変えても阻害作用は見られなかった。これより、

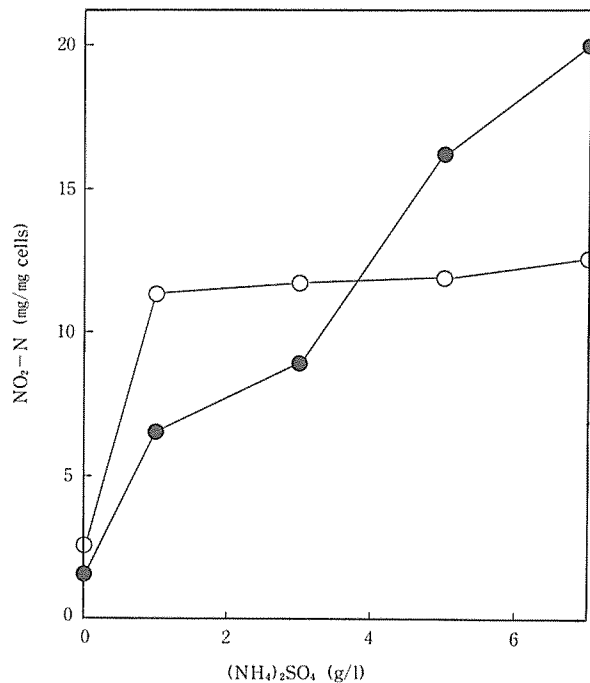


Fig. 3. Effect of ammonium sulfate concentration on conversion ammonium to nitrite ion.

Symbols: ●, Immobilized cells; ○, Suspended cells.

Table 2. Effect of various metal ions on growth of *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978.

Metal ion (1 mM)	$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg/mg cells)
Control	100%
Mo^{6+}	167
Co^{2+}	154
Mg^{2+}	143
Ba^{2+}	134
Ni^{2+}	118
Zn^{2+}	112
Mn^{2+}	108
Cu^{2+}	100

Metals were supplied in the form of chloride in the medium except Mo^{6+} which was added in the form of ammonia salt.

固定化することにより阻害作用を受けにくくなることがわかった。同様の結果が Mo^{6+} および Mg^{2+} についても濃度の実験の結果から得られた。e) 微量元素の影響 肉エキス, ペプトン, C. S. L. 酵母エキスおよびカザミノ酸, 以上5種類の微量元素を培地中に0.02~0.4%添加し, 生育に及ぼす影響を検討した。その結果, このうち生育を促進したのは C. S. L. のみであった。C. S. L. を添加していないものと比較すると, 0.2%添加で83%, 0.04%添加で70%の生育量が増加した。また, 窒素を含む物質は硝化細菌の生育を阻害することが認められているが¹⁴⁾, 今回用いた酵母エキス, ペプトン, カザミノ酸および肉エキスはすべて窒素原子が含まれていたにもかかわらず, ほとんど生育の阻害は見られなかった。

連続培養 上述した固定化条件および, 固定化菌体の培養のそれぞれの至適条件で菌体を固定化および培養し, 連続的にアンモニアを $\text{NO}_2\text{-N}$ に変換する実験を行った。すなわち, *N. europaea* ATCC 25978 を乾燥重量で 15.9 mg を 60 ml の 4% アルギン酸ナトリウムに懸濁し, 直径 5 mm のビーズ状にした。そして, Fig. 1 に示すカラムに, 2.5% の K_2CO_3 溶液, 1 g/l の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, アルギン酸カルシウムの崩壊防止のために 10 mM の

CaCl_2 溶液を流速 3.5 ml/h で流入させた。これらの溶液の注入はペリスタポンプを用いて行った。カラム中の水温はジャケット中に30°Cの循環水を流すことによって30°Cに保った。また, 通気は, ガラス製のフィルターボールを通し, 1 l/min の通気量で泡状にして行った。このような条件下で流出された溶液中の $\text{NO}_2\text{-N}$ 量と NH_4^+ 量を定量した。その結果, Fig. 4 に示すように, 培養10日目で 0.3 mg/ml 量のアンモニアが 100% $\text{NO}_2\text{-N}$ に変換されて, その活性が13日間保持された。

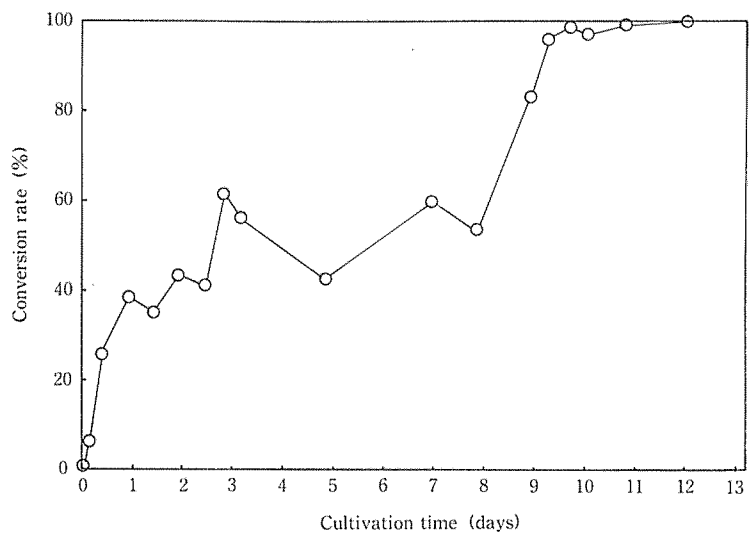


Fig. 4. Continuous cultivation for Conversion of NH_4^+ to NO_2^- was carried out for 13 days at 30°C, pH 8.0 with 2.5% K_2CO_3 solution. Solutions of 0.1 M CaCl_2 and medium of Engel & Alexander⁸⁾ were supplied at the rate 3.5 ml/h with a perista pump. Conversion rate was followed by measuring amounts of $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in the eluated solution.

考 察

上述のように, 亜硝酸菌 *Nitrosomonas* は, 増殖速度が遅いため, 硝化過程が全脱窒素プロセスの律速段階となっており, 硝化の達成度が全過程での窒素除去率を左右している。そこでその過程をできるだけ効率的に行わせることを目的として菌体の固定化を試みた。それは, 固定化の大きな利点として安定性の増大, 連続操作の容易さなどがあるからである。

そこでまず, *Nitrosomonas* のアンモニア酸化反応系を最も穏和な条件で行わせることができる包括法の代表的な担体であるアルギン酸ナトリウム, 寒天, および *k*-カラギーナンを用いて菌体をそのまま固定化した。活性炭などを用いる担体結合法でも行ったが, この中で, 固定化操作の容易さ, 固定化条件の穏和さ, 菌体の活性が高いなどの理由から, アルギン酸ナトリウムを選択した。菌体の固定化条件, 培養条件として, 菌体濃度 60 $\mu\text{g/ml}$ 前後, 温度 30°C, 初発 pH 8.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度 1 g/l が得られた。これは懸濁菌体の培養

条件とほぼ同じ値であった。しかし、固定化菌体は、金属イオンや微量要素、雑菌に対し耐性が高かった。この雑菌に対する耐性試験は、固定化・懸濁両菌体の入った三角フラスコを2本ずつ用意し、片方は無菌的に取り扱い、4日間培養後、普通寒天培地にその培養液1 mlを塗布して行った。その結果懸濁菌体は、雑菌の混入により亜硝酸生成量が50%以上減少するが、固定化菌体には差は見られなかった。つまり固定化菌体は、懸濁菌体もっている条件(30°C, pH 8.0)を維持しながら懸濁菌体には見られない金属イオンでの高い促進効果、阻害物質に対する耐性などの有利な性質を持っていることがわかった。

固定化によって酵素および菌体の安定性が増加する例は広く知られている^{15, 16}。 *N. europaea* ATCC 25978のアンモニア酸化活性も、非固定化菌体であると、4日又は5日毎に植え継ぎをしなければ低下するが、固定化し、連続培養するとその酸化能は(NH₄)₂SO₄ 1 g/l、すなわち210 mg/lのアンモニア溶液中で13日間保持された。Tramperら⁶の実験では16日間と報告されているが、これは191 mg/lのNH₄Cl、すなわち51 mg/lのアンモニア溶液中であった。

また、本実験では、金属イオンでの高い生育促進、阻害物質や雑菌に対する耐性も顕著に見られた。この原因としては、ゲル状のアルギン酸カルシウムと菌体外膜とが強固に結合し、ゲル外からの物質、雑菌の混入を防いでいると考えられる。ただし、金属イオンに関しては、アルギン酸の水酸基と、外部液層中に存在する金属イオンとの相互作用で、懸濁菌体よりも影響を受けやすくなったのではないかと考えた。

今後、実用化に向けて、まず検討すべきことは、リン酸を含む溶液中でのこの菌体の取り扱いである。また、これも含めて、アンモニア酸化反応の固定化実験からの解明なども望まれる。

要 約

本実験では、固定化硝化細菌によるアンモニア除去に関して検討を行った。その結果を以下に要約する。

1) *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978を固定化し、亜硝酸生成に供する担体の選択を行った。寒天、*k*-カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、光硬化樹脂(ENT)、セライト、ゼオライト、ビスケットビーズ、活性炭などの担体の中から、固定化操作の容易さ、固定化条件の穏和さ、および非固定化時と比較した場合の亜硝酸生成量の増加の割合より、アルギン酸ナトリウムを選択した。

2) 菌体の固定化および亜硝酸生成反応の至適条件は、初発 pH 8.0、温度30°C、(NH₄)₂SO₄ 濃度、1 g/lであった。また、Mo⁶⁺ および C. S. L. の添加により生育量がそれぞれ65%および85%高くなった。

3) 固定化菌体は、カラム中で通気培養することにより、13日間連続培養できた。また、培養10日目に初めてアンモニアから亜硝酸へ100%転換した。

参 考 文 献

- 1) BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 450 pp., Williams and Wilkins Co., Baltimore, New York (1974)
- 2) ZOLTEK, J. Jr. and LEFEBRE, L.: *J. WPCF*, 48, 2183 (1976)
- 3) SUTTON, P. M., MURPHY, K. L., JANK, B. E. and MONAGHAN, B. A.: *J. WPCF*, 47, 2665 (1975)
- 4) ROQUE, H., MASBERMAT, L. and TSACOYANNIS, J. *Water Res.* 10, 265 (1976)
- 5) GUJEN, W. and JENKINS, D.: *Water Res.* 9, 561 (1975)
- 6) C. G. VAN GINKEL, J. TRAMPER, K. CH. A. M. LUYBEN and A. KLAPWIJK: *Enzyme Microb Technol.* Vol. 5. July (1983)
- 7) LEWIS, R. F. and PRAMMER, D.: *J. Bacteriol.* 76, 524-528 (1958)
- 8) M. S. ENGEL. and ALEXANDER, M.: *J. Bacteriol.* 76, 217-222 (1958)
- 9) TARAS, M. J.: *Standard Methods for the Examination of Water, Sewage, and Industrial wastes.*: American Public Health Association, New York, 240-243
- 10) SCHEINER, D.: *Water Res.* 10, 31 (1976)
- 11) 桑田佳典: 広島大学生物生産学部修士論文 (1986)
- 12) MEYERHOF, O.: *Arch. ges. Physiol.*, 166, 240-280 (1917)
- 13) WARINGTON, R.: *J. Chem. Sci.* 35, 429 (1879)

- 14) 有馬 啓, 浅野浩司: 醗酵協会誌 20(7), 445(1963)
- 15) SIGEYOSHI, F. TOSHIYUKI, N. and KOJI, F.: *Biotechnology and Bioengineering* XX, 1465 (1978)
- 16) KIERSTAN, M. and BUCKE, C.: *Biotechnology and Bioengineering*, XIX, 387 (1977)

Summary

A nitrifying bacterial strain *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978 was successfully immobilized onto calcium alginate, which was selected as a suitable carrier among many other material tested. The optimal conditions for immobilization were: Na-alginate, 4% (w/v); concentration of CaCl_2 , 0.1 M; immobilizing time, 20 min; cell concentration 60 $\mu\text{g/ml}$, diameter of alginate bead, 5 mm; precultivation time of cells for immobilization, 24-48 hr. Optimal cultivations for the immobilized cells were: ammonium sulfate concentration, 1 g/l; initial pH, 8.0; temperature, 30°C. One mM Mo^{6+} and 0.2% C. S. L. accelerated the growth 65 and 85%, respectively. Continuous cultivation was performed for 13 days.