

# バイオオーグメンテーション用 微生物製剤の開発

住友化学工業(株) 生産技術センター

中村 洋介  
青井 正廣

## Development of Microorganism Formulation for Bioaugmentation

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Process and Production Technology Center  
Yosuke NAKAMURA  
Masahiro Aoi

A method for preparing bacterial formulations suitable for bio-augmentation was developed. Coal incinerated ash (fly ash) was used to flocculate and immobilize micro-organism granules (activated sludge), and the targeted micro-organisms in the flocculants, i.e. nitrifying bacteria, were enriched through continuous culturing in a medium containing their specific substrates, e.g. ammonium and oxygen. When the enriched nitrifying bacteria were applied in a required volume to the activated sludge, nitrification of the activated sludge was reactivated just as anticipated.

### はじめに

Koch 以後の近代微生物学は微生物の純粹培養をめざしてきた。特異な機能をもつ微生物を単離する技術の確立は、抗生物質などの医薬品やバイオコンバージョンによる工業製品の生産の礎となり、20 世紀の人類の躍進に大いに貢献した。しかしながら、Koch から 100 年を経た今に至っても、人類が培養に成功した微生物は微生物界全体の 0.1 ~ 数% に過ぎない<sup>1)</sup>。われわれは、自然界の微生物叢に奪めきあい互いに影響を及ぼしあいながら生きている微生物の集合体（コンソーシア）の営みをまだ殆んど垣間見えないといっても過言ではない。

21 世紀、人類は地球との共存を真剣に考えなければいけないときを迎えた。ヒトが地球に与えた様々なストレスの解消係として、生物圏の最終分解者としての微生物または微生物コンソーシアの機能を積極的に活用することへの期待は大きい。もとより人類は、無意識の下にこれらをうまく活用してきた歴史がある。

伝統的な発酵食品の製法などはその典型で、製造工程の要所毎にコンソーシアの中から特徴的な微生物を優占化させ、それらの機能を発現させては目的を達成してきた。

前置きが長くなったが、本稿では、主として環境利用を目的として、コンソーシアにおける特異微生物を優占化する技術の開発とその利用について述べる。技術開発の端緒となった、排水の生物学的窒素除去において重要な役割を果たしている硝化細菌を優占化し、これを一種の微生物製剤として排水処理装置に対するバイオオーグメンテーション（微生物添加）を行う例を掲げて論を進める。

### 排水の生物学的窒素除去の重要性と技術的課題

飲料水源である湖沼等に発生した有毒アオコの毒素が原因で飲み水が汚染され、地域住民や家畜の健康が脅かされるという問題が発展途上国を中心にしばしば発生している。また、身近なところでは、赤潮の繁

殖によって漁業資源に甚大な損害が及ぶという事態は後を絶たない。このように水生プランクトン類が異常増殖する原因は、下水や生活廃水、産業排水（これらをまとめて単に「排水」と呼ぶことにする）に含有される有機物に加え窒素やリンといった栄養塩類がもたらす水域の富栄養化にあり、富栄養化の抑制は水環境保全の国際的最重要課題の一つとなっている。わが国においても、平成10年に一般排水中の窒素及びリンの濃度基準が法に定められた。さらに、第5次水質総量規制により、指定地域において窒素・リンの総量規制が課せられるなど、栄養塩類の除去に対する社会的要求が高まっている。

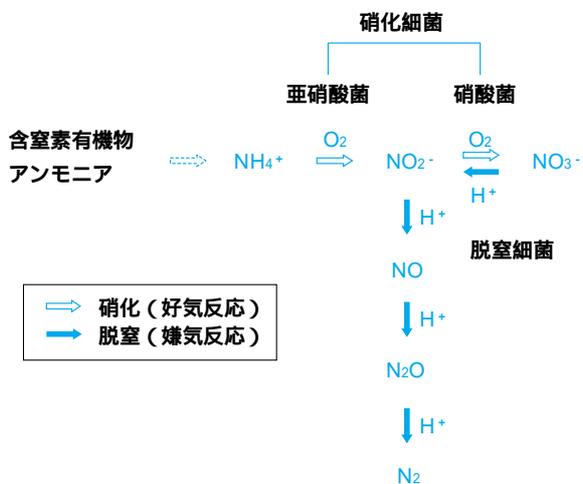
排水の栄養塩類の処理は、処理濃度やコスト等の面から主として生物学的処理（活性汚泥）法によって行われる。栄養塩類のうち、しばしば処理の難しさが問題となるのが窒素である。生物学的窒素除去のメカニズムを第1図に示す。排水中のアンモニア、及び有機物に含有されていた窒素が生分解したものに由来するアンモニア態窒素は、まず好気的条件下で亜硝酸菌（アンモニア酸化細菌）によって亜硝酸態窒素に酸化される。生成した亜硝酸態窒素は、硝酸菌（亜硝酸酸化細菌）によってさらに酸化されて硝酸態窒素になる。亜硝酸態及び硝酸態窒素は、今度は嫌気的条件下でいずれも脱窒機能を有する細菌コンソーシア（脱窒細菌）による還元を受け、最終的に窒素ガスとして大気中に放散する。亜硝酸菌と硝酸菌をまとめて硝化細菌と呼ぶ。硝化細菌は、それぞれアンモニアや亜硝酸を酸化する際に唯一エネルギーを得ることができる化学的独立栄養細菌に分類される。有機物を分解して効率よくエネルギーを獲得できる多くの細菌（従属栄養細菌）に比較して、増殖は非常に遅く、かつ様々な化学物質や重金属、外的環境要因などの影響でしばしば増殖を抑制されてしまう。ゆえに、複数種の従属栄養細菌が関与する脱窒

よりも、硝化細菌の働きのみ依存する硝化を安定化することの方が生物学的窒素除去の重要課題といえる。なお、もう一つの栄養塩であるリンについては、嫌気的条件下では菌体から放出され、好気的条件下では逆に菌体に取り込まれるという性質を利用して、生物学的処理プロセスを、嫌気-好気、またはそれらを複数段階組み合わせることによって菌体に十分取り込ませた後、余剰汚泥として抜き出すという手法が種々検討され、実現されている。生物学的に除去しきれない過剰のリンは、化学反応によって凝集沈殿させ、分離することも可能である。したがって、排水の生物学的栄養塩類除去においては、窒素処理技術の高度化が強く求められているのである。

### 微生物の凝集固定化技術の開発

生物学的窒素処理のボトルネックである硝化を安定的に保つためには、何らかの理由で硝化細菌が死滅または大きく減少してしまったり、処理すべき排水（原水）のアンモニア態窒素負荷が急激に上昇して硝化細菌の絶対数が不足したりする場面で、外部から高濃度の硝化細菌または硝化細菌が優占化した微生物コンソーシアの培養液を生物学的処理装置に添加して、硝化の賦活化を図るといった戦略が考えられる。この戦略を可能にするためには、硝化細菌の優占化と大量調製をできるだけ簡便に行う技術の確立が必須である。硝化細菌の優占化を目的とした微生物固定化技術はすでに多数開発されている。それらはどれも、樹脂や活性炭などの表面に生物膜を形成させる方法（結合担体法）と高分子ゲルに活性汚泥を包括固定化する方法（包括固定化法）のどちらかに分類されるものばかりである。ともに硝化細菌が増殖しやすい生物膜形成のための媒質を提供することを技術の原理としているが、ほとんどすべてが窒素除去を目的とするいわゆる高度排水処理装置開発の構成要素として実用化されたものである。いろいろな面から見て固定化・優占化した硝化細菌をバイオオーグメンテーション向けに使用することは困難であるし、現実に微生物製剤としての販売はなされていない。一方、正攻法に硝化細菌を純粋培養しては集菌、濃縮を繰り返して微生物製剤化した製品もいくつか存在する。しかしながら、こういった製品は、増殖が遅く菌体収率も低い硝化細菌を大量に調製するための費用が高いため、概して高価である。実際の生物学的処理装置に求められる硝化処理能力を賄おうとすると、ある程度大量にこれらを施用する必要があるため、使用者側でコスト採算がとれなくなる。製剤を供給する側もそのことは認識しているから、微生物製剤の施用量を実際に効果が現れる（と考えられる）量よ

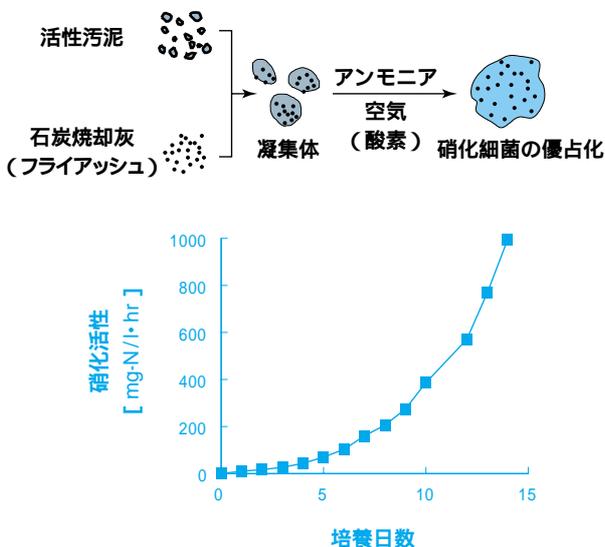
第1図 生物学的窒素除去のメカニズム



りも低く設定し、時間を置いて繰り返し施用するといった、根拠に乏しい施用法を使用者に勧めることになる。この結果、使用者側では期待した効果が得られないということになってしまいがちである。ゆえに、生物学的処理装置に対するバイオオーグメンテーションのため実用に堪える硝化細菌製剤はない、というのが実情である。

本当に使える微生物製剤の開発をめざして、著者らは、硝化細菌を優占化、高密度化した微生物製剤を比較的容易に大量調製しうる技術の開発に取り組んだ。そして、種々検討を経て、石炭焼却灰（フライアッシュ，以下CFAと略す）と活性汚泥微生物との凝集体を形成し、これに経時的に負荷量を上げながらアンモニアを連続的に与えて硝化細菌を優占化していくという手法を確立した<sup>2)</sup>。すなわち、産業廃棄物として有効な再利用方法が希求されているCFAを使用すれば、安価かつ迅速に硝化細菌を固定化し、凝集体として培養槽内に流動床のようにして留めおくことができ、これに時間の経過に伴いアンモニアの供給量を対数的に増加しながら連続培養することで、短期間に凝集体の形態で硝化細菌を優占化できることがわかった。たとえば、約2週間の培養後、実測した硝化細菌数は $10^8 \sim 10^{11}$ /mlに達し、単位時間、容積あたりアンモニアを酸化する量で表した硝化活性は約1000mg-N/l・hrに至った。これら一連の原理と硝化細菌の培養結果を第2図に例示した。一般的な下水処理場では、硝化活性に相当するアンモニア態窒素の容積負荷は数mg-N/l・hrであるから、本手法による硝化細菌の密度の高さが窺い知れよう。さらに、後でデータを示すが、このようにして得た硝化細菌を冷蔵しておけば、少なくとも1ヶ月間ほとんど生

第2図 石炭焼却灰(フライアッシュ)を用いた微生物の固定化と硝化細菌の優占化



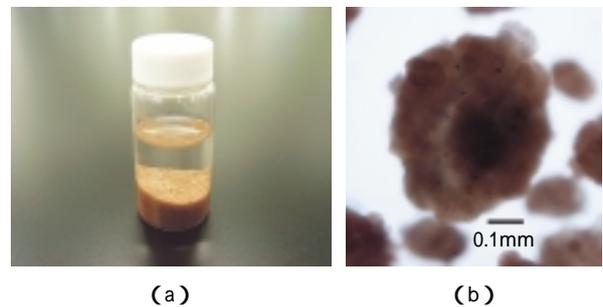
理活性を失うことなく保存可能であることも明らかとなった<sup>3)</sup>。本手法で生産された硝化細菌製剤は、微生物以外には石炭焼却灰が含まれることになるが、実際にこれを生物学的処理装置に施用する場合はせいぜい装置容積の数100分の1量に過ぎず、かつ一般に余剰汚泥は脱水濃縮後焼却処分されることを考慮すれば、硝化細菌製剤の施用が生物学的処理装置に与える影響は無視できるとみなされる。

### 硝化細菌製剤の生態学的解析

CFAによる凝集体形成に基づく硝化細菌製剤の外観及び光学顕微鏡写真を、それぞれ第3図(a),(b)に示した。

第3図 硝化細菌製剤

- (a) 50mlのサンプル瓶に移したときの外観
- (b) 光学顕微鏡写真



次に、硝化細菌製剤における硝化細菌の生態を調べるため、走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察及び蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法による硝化細菌の生態解析を行った。

FISH法は、標的微生物に固有の遺伝子プローブを蛍光標識し、蛍光顕微鏡視野で標識試薬の発色を検出する微生物の生態解析手法であり、近年広く普及しつつある。使用した16SrRNAプローブと標識試薬は次のとおりである。

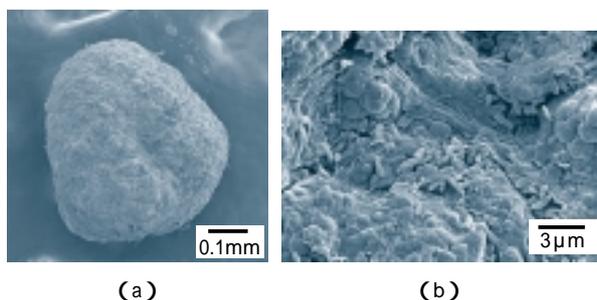
- ① EUB338 プローブ/Cy3 標識：全細菌を標的とする
- ② NEU23a プローブ/FITC 標識：亜硝酸菌 *Nitrosomonas europaea*, *N. eutropha* を標的とする

なお、亜硝酸菌 *Nitrosococcus mobilis* を標的とする Nmv プローブも使用したが、予備検討の段階で本凝集体の微生物はこれにほとんど反応しないことがわかったため、以後適用を除外した。

硝化細菌製剤全景のSEM写真を第4図(a)に、表面のクローズアップ写真を第4図(b)に、それぞれ示した。硝化細菌製剤の粒子は不定形で、最大径は0.5mm前後であった。代表的な亜硝酸菌である *Nitrosomonas* 属の形態に近い短桿菌のコロニーが顕

第4図 走査型電子顕微鏡(SEM)写真

- (a) 硝化細菌製剤(凝集体)粒子の全景
- (b) 表面部分拡大

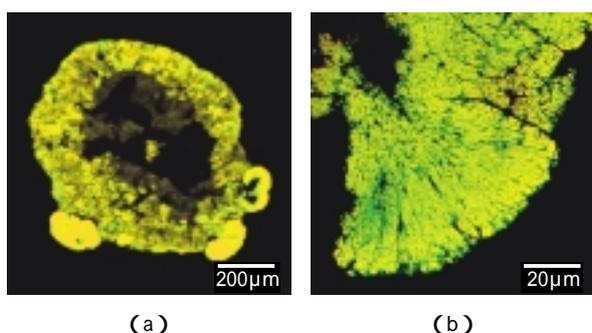


著に観察された。

第5図(a)は硝化細菌製剤全景のFISH画像である。黄または黄緑色に見える、NEU23aプローブに反応する亜硝酸菌のコロニーが、表層から約200µmの深部まで、密に存在していた。第5図(b)は部分拡大画像であるが、圧倒的多数の亜硝酸菌コロニーに混じって硝酸菌乃至はその他の細菌の存在を示す、赤色のEUB338プローブに結合する細胞も観察された。このように、CFAによる凝集体には*Nitrosomonas*属を主体とするアクティブな硝化細菌が高密度に固定化されていることが確認された。

第5図 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法蛍光顕微鏡写真

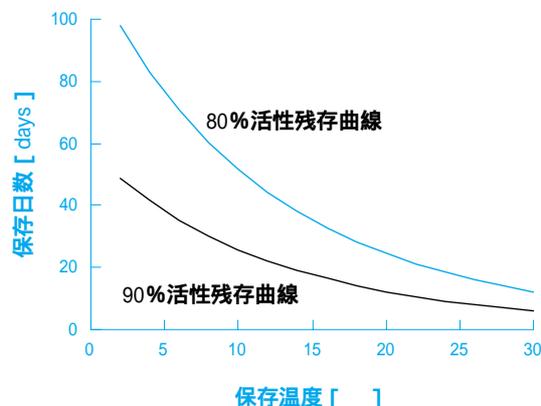
- (a) 硝化細菌製剤(凝集体)粒子の全景
- (b) 表面部分拡大



### 硝化細菌製剤のバイオオーグメンテーション試験例

つぎに、硝化細菌製剤を用いたバイオオーグメンテーション試験例を紹介する。硝化細菌製剤としては、むろん新鮮な培養液(または培養液を自然沈降した濃縮スラリー)を使用することが最も望ましいが、前に少し触れたように培養液の形態のまま保存することもできる。硝化細菌製剤の残効性は、主として保存温度に依存する。5℃で冷蔵保存すれば、硝化細菌製剤は1ヶ月後も90%を上回る硝化活性を保持する(第6図)。

第6図 硝化細菌製剤の保存温度依存性



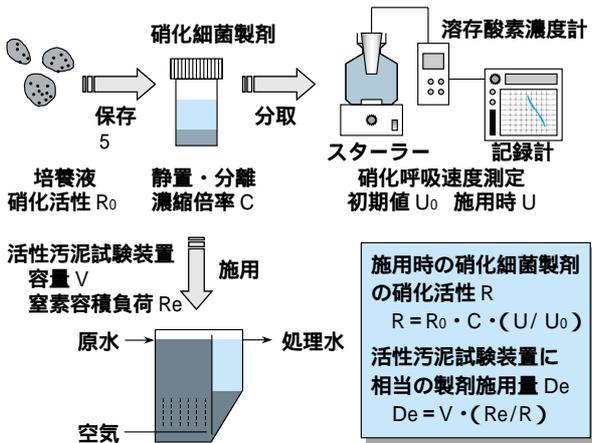
### 活性汚泥の硝化機能の賦活化

窒素除去を目的とする生物学的処理装置の運転において問題となるのが、流入水の異常による硝化阻害の発生とアンモニア負荷変動である。硝化細菌は、多くの化学物質により阻害を受ける<sup>4)</sup>。しかも、硝化細菌の増殖速度は一般の微生物に比較して非常に低いため<sup>5)</sup>、いったん硝化細菌が死滅すると復旧に長期間を要する。また、硝化細菌の増殖が遅いことで、生物学的処理装置に対して急激にアンモニア負荷が増大した場合、それに対する応答が鈍るおそれがある。このような非常事態を想定事例として、硝化細菌製剤のバイオオーグメンテーションによる活性汚泥の硝化機能の賦活化を試みた<sup>6)</sup>。

硝化細菌製剤の調製方法は、次の通りである。連続培養の硝化活性( $R_0$ とする)が $300\text{mg-N/l}\cdot\text{hr}$ 以上に到達したものを重力沈降して、上澄み液を取り除いた濃縮スラリー(濃縮倍率を $C$ とする)を硝化細菌製剤と呼ぶことにした。なお、取り除いた上澄み液の硝化活性は、 $R_0$ に対して無視できるほど小さいため、上澄み液を排除することとした。硝化細菌製剤の硝化呼吸速度を文献<sup>7)</sup>を参照して測定し、この値( $U_0$  [ $\text{mg-O}_2/\text{l}\cdot\text{hr}$ ])とする)を、硝化細菌製剤の硝化活性の基準値として記録し、硝化細菌製剤を5℃で保存した。使用時に取り出して測定した硝化細菌製剤の硝化呼吸速度を $U$  [ $\text{mg-O}_2/\text{l}\cdot\text{hr}$ ]とすると、その時点の製剤の硝化活性 $R$ は、 $R = R_0 \cdot C \cdot (U/U_0)$ と定義できる。硝化細菌製剤を施用しようとする生物学的処理装置の槽容量が $V$  [ $\text{l}$ ]、それに求められる硝化活性が $Re$  [ $\text{mg-N/l}\cdot\text{hr}$ ]ならば、 $Re$ に匹敵する硝化活性を付与するために必要な硝化細菌製剤の施用量 $De$  [ $\text{l}$ ]は、 $De = V \cdot (Re/R)$ と見積もることができる(第7図)。

一般に、実際の排水処理場における $Re$ の値は、前述したように数 $\text{mg-N/l}\cdot\text{hr}$ であることが多い。硝化細菌製剤の濃縮倍率 $C$ はおよそ2~4であるので、

第7図 バイオオーグメンテーション試験操作の流れ



R<sub>0</sub> 値は最大 500 ~ 600mg-N/l・hr を確保できれば大抵の場合十分である。

賦活化実証試験例1

- 硝化阻害物質流入事故からの機能回復 -

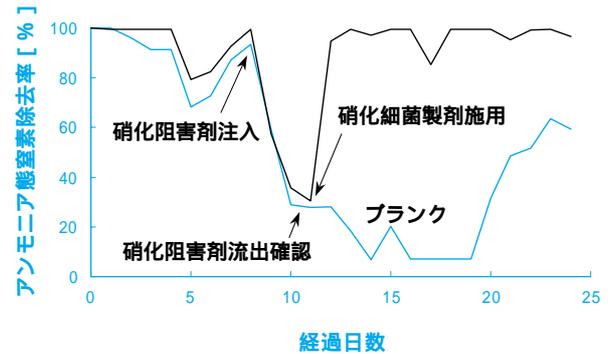
曝気部 4.7l 沈降部 1.7l からなる傾斜型連続式生物学的処理試験装置 2 基に化学工場の活性汚泥を 6000mg-MLSS/l ずつ入れ、この活性汚泥が通常処理している排水の性状に近い人工排水（硫酸アンモニウムなどを主成分とする）を流量 3.9ml/分 で供給した（曝気部の水理学的滞留時間 20 時間）。温度は室温（25 前後）に、曝気部内 pH は 7 に、曝気部内溶存酸素濃度は 3mg/l 以上に、それぞれ調整した。毎日 1 回、沈降部出口より処理水を採取して、硝化処理の達成度はイオンクロマトグラフィーによって測定した。

試験装置 2 基を同一条件で 4 日間連続運転し、硝化が十分安定している状態で、両方の試験装置に硝化阻害物質としてホルムアルデヒドを曝気部内濃度で 1500mg/l となるようにパルス添加した。人工排水の供給はそのまま継続し、3 日後沈降部出口のホルムアルデヒド濃度が 10mg/l 以下であることを確認してから、一方の試験装置にのみ曝気部のもとの硝化活性 (Re 15mg-N/l・hr) に相当する硝化細菌製剤をパルス添加した。もう一方は、そのまま運転を継続した。

結果を第 8 図に示す。試験装置の活性汚泥はホルムアルデヒドによって直ちに硝化阻害を受け、アンモニア除去率は急降下した。ホルムアルデヒドが系外に流出した後、硝化細菌製剤を施用すると素早くアンモニア除去率を回復できた。一方、施用しないで放置しておいた試験装置は機能回復が大きく遅れた。なお、外部から添加した硝化細菌製剤は、活性汚泥の有機物処理には影響を与えなかった。この実験に

おいて、硝化細菌製剤はとくに冷蔵保存を経たものは使用していないが、同様の実験を 30 日間 5 で冷蔵保存した硝化細菌製剤を用いて行い、良好な結果を得ている<sup>8)</sup>。

第8図 硝化細菌製剤の生物学的処理装置に対する施用評価試験(1) 硝化阻害からの賦活化

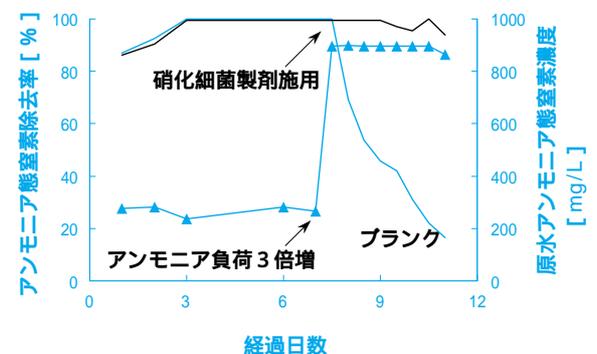


賦活化実証試験例2

- 急激なアンモニア負荷増大に対する機能維持 -

硝化細菌製剤が、生物学的処理装置に対する急激なアンモニア負荷増を想定した状況にも有効に作用することを、同様の実験によって確認した。すなわち、試験装置 2 基を同一条件で 7 日間連続運転し、硝化が十分安定している状態で原水のアンモニア態窒素濃度を約 300mg/l から約 900mg/l に増加した。このとき、同時に一方の試験装置に対してのみ 600mg/l のアンモニア態窒素濃度増加に相応の硝化活性 (Re 30mg-N/l・hr) に相当する硝化細菌製剤を施用し、もう一方 (ブランク) には施用しなかった。第 9 図に示したように、硝化細菌製剤を施用しておくことにより、急激なアンモニア負荷の増大に対してもアンモニア態窒素除去率が直ちに低下することはなかった。

第9図 硝化細菌製剤の生物学的処理装置に対する施用評価試験(2) 急激なアンモニア負荷増大への対応



## 硝化細菌製剤の特性

硝化細菌製剤の施用量については、施用した硝化細菌製剤が施用地点に留まる、すなわち生物学的処理装置から余剰汚泥の抜き出しを制限するような状況を整えてやれば、施用した硝化細菌が増殖を始めることにより、必要な硝化処理機能を発現するまでに許容される期間に応じて、初期施用量を削減することも明らかにした<sup>8)</sup>。

これまでに述べた一連の実験においては、硝化細菌製剤の調製はある化学工場の活性汚泥と、ある火力発電所のCFAとの組み合わせで行ったものだが、他の産業排水処理場や下水処理場の活性汚泥と、原料炭の起源や物理化学的性状が異なる各地の火力発電所のCFAとのいずれの組み合わせでも実施できた<sup>9)</sup>。植種活性汚泥が異なる場合にのみ硝化細菌の増殖に遅速はあったものの、最終的にはいずれの試料の $R_0$ 値も500 ~ 600mg-N/l・hrに到達した。したがって、硝化細菌製剤の調製は、必ずしも特殊な条件下でのみ実現可能な技術というわけではなく、手近な活性汚泥とCFAとを使ってどこでも実施できる。また、データは割愛するが、本硝化細菌製剤を他の高濃度のアンモニアを含有する産業排水及び公共下水処理に施用して、十分な効果が得られることも確認している。なお、本硝化細菌製剤からは、病原性大腸菌をはじめ、衛生上有害とされる主な微生物、原虫等は検出されなかった。

以上のように、まずは排水の生物学的処理向けの硝化細菌製剤として、バイオオーグメンテーション用微生物製剤に関する技術開発が完了し、当社愛媛工場内に建設したパイロットプラント（第10図）での培養試験も終えた<sup>10)</sup>。現在、エレクトロニクス関連で高濃度のアンモニア含有排水の生物学的処理を行っているある事業場から硝化細菌製剤の試用評価の依頼を受け、実証テストを行っている。

第10図 微生物培養パイロットプラント



## おわりに

これまで述べてきた事例においては硝化細菌を対象としてきたが、本技術は硝化細菌以外の微生物にも適用できると考えられる。すでに筆者らは硝化に続く脱窒細菌群の優占化、高密度化にも成功している<sup>11)</sup>。このように、本技術の面白さは、微生物コンソーシアをベースとし、培養条件の設定によって特異機能を有する微生物群を優占化したり、或いはコンソーシアのまま高密度化したりと、凝集体の柔軟な生態コントロールが比較的簡単にできることにある。現在、土壌や地下水汚染の浄化技術が注目されているが、バイオオーグメンテーションによる汚染環境の修復、いわゆるバイオレメディエーションにも本技術を応用することが期待される。たとえば、CFAを使用して微生物を凝集固定化し、環境汚染原因物質の分解能を有する微生物を優占化、高密度化し、汚染サイトにバイオオーグメンテーションを行い、浄化を促進するといった展開が考えられる。微生物の担体の役割を果たすのがもともと土の中に存在していた石炭に由来するものであるから、こういう使い方をしても自然環境に及ぼされる影響は少ないものと思われる。

また、本技術は、微生物製剤といういわばソフトウェア的志向にとどまらず、高密度に固定化した微生物による、効率の高い排水の生物学的処理装置の開発というハードウェア的志向の発展も可能である。実際に、現在ある機械メーカーと共同で、本技術を採り入れることで硝化脱窒機能を高めた高度排水処理装置の実用化に取り組んでいるところである。加えて、そもそも本技術は単位体積あたりのアクティブな微生物コンソーシア密度を高められるものであるから、窒素処理に限らずあらゆる汚濁物質の分解を促進して排水の生物学的処理機能全体を向上させることができると考えられる。つまり、処理装置内の微生物濃度を高めることで因襲的な生物学的処理法そのものを大いに効率化できる可能性がある。今後、従来よりもコンパクトなサイズかつ短い処理時間で、より多くの汚濁物質を処理する生物学的処理技術の開発を手始めに、CFAを用いた微生物の凝集体形成を基盤とする本技術を前述のようないろいろな方向へ広げていきたいと考えている。

FISH法分析に際し多大なるご協力を賜りました、早稲田大学理工学部常田聡先生及び同大学院理工学研究科日本学術振興会特別研究員青井謙輝氏に深くお礼申し上げます。

本研究の一部は、経済産業省からの地球環境保全関係産業技術開発促進費補助金を受け、(財)国際環境技術移転研究センター(ICETT)との共同研究の一環として実施したものです。

## 引用文献

- 1) 渡辺 一哉, 二又 裕之: 化学と生物, 38(4) 230 - 236(2000)
- 2) 中村 洋介: 用水と廃水, 43(2) 110 - 115(2001)
- 3) 青井 正廣, 中村 洋介: 日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集, p.379(2001)
- 4) Bédrad, C., Knowles, R.: Microbiol. Rev., 53 (1) 68 - 84(1989)
- 5) 稲森 悠平, 林 紀男, 国安 克彦: 用水と廃水, 39(8) 655 - 665(1997)
- 6) 中村 洋介: 日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集, p.87(2002)
- 7) 久住 美代子, 市川 雅英, 小西 隆裕, 豊岡 和宏: 下水道協会誌, 34(421) 51 - 59(1997)
- 8) 中村 洋介, 青井 正廣: 創立 80 周年記念日本生物工学会大会講演要旨集, p.175(2002)
- 9) 青井 正廣, 中村 洋介: 第 36 回日本水環境学会 年会講演集, p.586(2002)
- 10) ICETT News, 9(Oct.) 9 - 10(2001)
- 11) [http://www.icett.or.jp/research\\_developj.nsf/](http://www.icett.or.jp/research_developj.nsf/)

## PROFILE



中村 洋介  
Yosuke NAKAMURA  
住友化学工業株式会社  
生産技術センター  
研究グループ(愛媛プロセス)



青井 正廣  
Masahiro Aoi  
住友化学工業株式会社  
生産技術センター  
研究グループ(愛媛プロセス)