

1. はじめに

嫌気性消化法において、菌体増殖に必要な窒素と欠く有機系廃棄物を処理する場合、窒素補給源として、アンモニア性あるいは硝酸性窒素等の結合窒素については多くの研究がなされているが、分子状窒素 (N_2 ガス) の利用に関する研究は見当たらない。本報は、嫌気性消化における N_2 ガスの微生物利用 (窒素固定および同化) の可能性を評価するものであり、アンモニア性窒素の場合と比較検討した。尚、基質としてグルコース、セルロース、および酢酸塩の3種類について実験も行ない、基質の生物窒素固定に与える影響も合わせて検討する。

2. 実験計画

(i) 実験装置 液相容量2Lの4基のバッチ式リアクターと備えた装置を用い、図1に示したように各リアクター-媒質は連続かく拌され、温水槽にて 35°C に保たれた。

(ii) 媒質成分 各リアクターの基質 (投入濃度 5 g/L as COD) と窒素源を図2の上部に示した。必要栄養分量は細胞組成と推定菌体量より算出して媒質に加え、pHは概ね $6.5\sim 8.0$ に保持されるようにリン酸塩緩衝剤を加えた。実験は遠心分離した消化汚泥の上澄み液 2 mL を媒質に加えることにより始められたが、 2 mL の上澄み液に含まれる有機窒素は無視できる量であることを前実験により確認した。

(iii) 分析方法 菌体量はVSSで表わすとし、窒素は蒸留法およびケルダール法で測定した。また、pHはpHメータにより、残留基質 (炭水化物) はフェーネル硫酸法、ガス組成および口膜による口過液の揮発酸とアルコールはガスクロマトグラフにより分析した。ここに、窒素固定が起こるとすれば少なくとも口酸生成期に起こるはずであり、従って分析は口酸生成期に重点を置いた。

3. 実験結果と考察

(i) 基質分解、pH変化、および菌体増殖 図2に示したように14日間の消化期間において、グルコースと基質としたR1とR4のみ基質分解とそれに伴ったpHの低下を示し、R2のセルロースR3の酢酸塩は分解せず、pHの変化もなかった。図2または図3から明らかなようにR1とR4の基質分解に約20時間の遅延が見うれた。これは、R1とR4の窒素源はそれぞれ N_2 ガスと NH_4Cl であり、R1の場合窒素固定という新たなプロセス (N_2 と NH_3 に還元) が加わったためか、あるいはR1とR4内の優占細菌の増殖速度の相違によるものと考えられる。また、R1の場合菌体増殖が基質分解に先行し、R4の場合基質分解が菌体増殖に先行した。菌体増殖量にも大きな差が見られ、定常期においてR1で約 230 mg VSS/L 、R4で約 600 mg VSS/L であり、これを基質CODよりVSSへの転換率で表わすとそれぞれ 0.047 、 $0.122\text{ mg VSS/mg COD}$ となる。菌体増殖量に差を生じた主な理由として次の事が考えられる。生物窒素固定はニトロゲナーゼと呼ばれる酵素によるもので、ニトロゲナーゼによる反応経路に N_2 と NH_3 に還元するもの (窒素固定) と媒

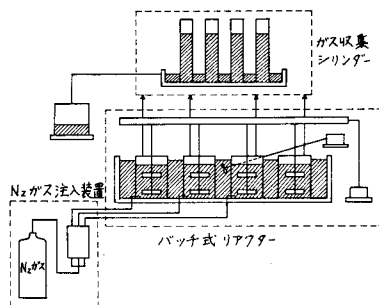


図1. 嫌気性消化実験装置

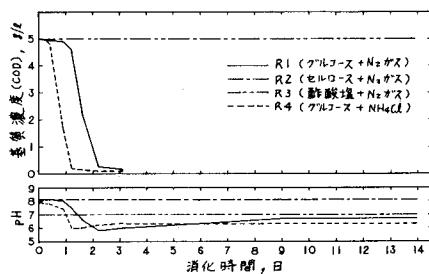


図2. 14日間の消化期間における基質分解とpHの変化

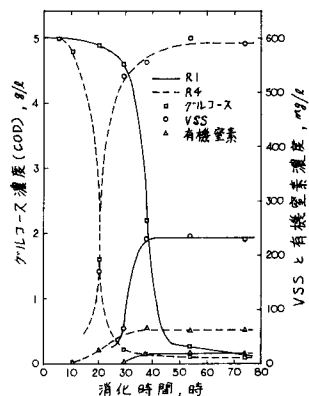


図3. 基質分解と菌体増殖(VSS)の関係

質中のH⁺とH₂に還元するもの(ATP依存性水素発生)の2つがある。窒素分子と十分に加えても還元力の約75%が窒素分子の還元に使われ、残りの約25%は水素の発生に使われると言われている。このため窒素固定反応には多くのエネルギーも必要とし、R1の場合基質分解で得たATPエネルギーの多くが固定反応のために消費され、菌体増殖に利用され得るエネルギーが少なく、増殖量も少ないものと思われる。更に、細胞内窒素(有機窒素)の含有率もR1とR4でそれぞれ乾燥重量で8%から11%と差を生じた。セルロースが分解しなかった理由として、窒素固定菌はセルロース加水分解酵素を持たず、本実験下ではセルロース分解酵素を持つ菌との共生関係は成立しなかったと考えられる。一方、酢酸塩の分解過程からは窒素固定反応に必要な電子供与体であるピルビン酸は得られず、固定反応が起こり得ないため窒素源を欠き、微生物による酢酸塩の分解は起こらなかったと考える。

(D) 揮発酸生成 基質分解の見られたR1とR4について揮発酸の生成状況を図4に示した。いずれの場合も基質分解期に酢酸の生成が見られ、基質分解完了とはほぼ同時に酢酸生成は止まりプロピオン酸と酪酸の生成へと移行した。75時間の消化ではR1にプロピオン酸の生成は見られなかったが、その生成パターンからその後生成された事も十分考えられる。消化開始から75時間後で、基質から揮発酸への変換率はCOD当量で約20%が酢酸、同様に20%がプロピオン酸、そして12%が酪酸となっている(R4)。

(E) アルコール生成 アルコールのうちエタノールだけの生成が確認された。図5に示したようにエタノールの生成パターンは酢酸のそれと類似し、基質分解期に生成が見られた。基質に対するCOD当量変換率は約15%であった。

(F) ガス生成 14日間の消化期間における最大ガス生成速度はR1とR4でそれぞれ単位採集量当り356ml/gEBと309ml/gEBであり、ガス生成が最も盛んな間R1ではH₂生成量がCO₂より多く、一方R4では両生成量とも同程度であった。紙幅が限られているためガス生成の実験データは割愛するが、14日間のR1の水素生成量はR4より多く、これはニトロゲナーゼによる水素発生によるものと考えられる。

(G) 酸発酵生成物のCOD当量組成 図6に示した酸発酵生成物のCOD当量組成を見ると、グルコース分解のほぼ完了した時点での組成は約50%が菌体、揮発酸、およびエタノールのCODからなり、残りの約50%は未知のCOD(図6の中間物COD)であった。ガスクロマトグラフ分析においてこの未知の生成物と思われる非常に尾を引くピークが見られたが、本実験ではその実体を明らかにできなかった。しかし、図6で消化が進むにつれて中間物CODは揮発酸CODへと移行しており、更に図4とも照査すると、プロピオン酸あるいは酪酸の生成開始と同時に揮発酸CODへの移行が始まっている。このことよりこの中間物はプロピオン酸あるいは酪酸の前駆物質(たとえばコハク酸やアセト酢酸)である可能性が高い。

4. おわりに

本実験により、嫌気性消化の酸生成期においてN₂ガスは菌体の窒素源として利用され、NH₄Clと窒素源とした場合に比べ菌体増殖量が半分以下で済むことが明らかにされた。今後、連続式でのメタン生成期まで含めた実験を重ねる面を考えるのも興味深い。最後に、本実験は筆者がアメリカのミシガン州立大学に留学中に行なったものである事と付記しておく。

参考文献: 1) 中村道徳, 生物窒素固定, 学会出版センター(1980)

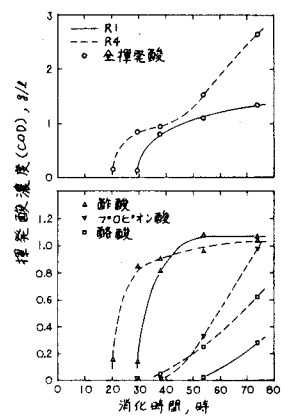


図4. 全揮発酸濃度とその組成の推移

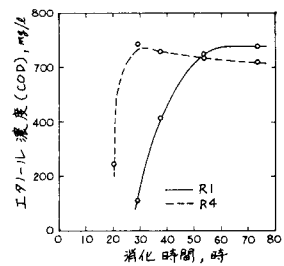


図5. エタノール濃度の推移

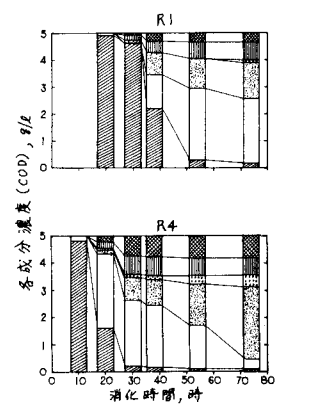


図6. 酸発酵生成物のCOD当量組成