

# 嫌気性消化における酸生成細菌群の増殖特性に 及ぼすアンモニア性窒素の影響

藤島繁樹<sup>1</sup>・宮原高志<sup>2</sup>・宍戸喜彦<sup>3</sup>・野池達也<sup>4</sup>

<sup>1</sup>学生会員 工修 東北大学大学院生 工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06)

<sup>2</sup>正会員 工博 静岡大学助教授 工学部 (〒432-8561 静岡県浜松市城北3-5-1)

<sup>3</sup>福島県 喜多方建設事務所 県庁職員 (〒966-0901 福島県喜多方市松山町鳥見山字下天神6-3)

<sup>4</sup>フェロー会員 工博 東北大学教授 大学院工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06)

炭水化物とタンパク質を共に含む基質を用いた嫌気性消化における酸生成細菌の増殖特性に及ぼすアンモニア性窒素の影響を検討するため、デンプンとペプトンを用い、反応槽内のアンモニア性窒素濃度を变化させた連続実験を行った。アンモニア負荷の増大に伴い、炭水化物除去率が急激に減少し、4.21g-TAN/g-VSSで20%以下になった。この炭水化物分解がアンモニアによる阻害を強く受けた条件では、全菌体量は半減し、炭水化物とタンパク質を共に分解可能な細菌群は主にタンパク質を分解することで増殖していたことが示された。また、連続培養では、炭水化物分解の大幅な減少の前段階として、エタノールが蓄積することが明らかとなった。

**Key Words :** *anaerobic digestion, ammonia inhibition, carbohydrate consuming acidogenic bacteria, protein consuming acidogenic bacteria*

## 1. 研究の背景

下水汚泥の嫌気性消化は、有機物の微生物分解により汚泥の減量化、安定化が可能で、得られた消化ガスを消化槽の加温用熱源や焼却炉の補助燃料、さらに消化ガス発電により多様なエネルギー源として利用できる<sup>1)</sup>という特徴を持っている。しかしながら、発生汚泥量が少ない小規模下水処理場に嫌気性消化槽を設置することは、コストや用地の面から非効率的なものとなるため、現在稼働中の処理場には、消化プロセスを組み入れていないものが多い<sup>2)</sup>。また、現在、下水道整備が進められている中小市町村では、一般に集落が分散しているため、今後はこのような消化施設をもたない小規模汚泥処理場が主に建設されると予想される。汚泥の集約嫌気性消化は、このような既存及び新設の濃縮-脱水方式処理場で、固体状にした脱水汚泥を、消化施設を持つ大規模処理場に輸送し、その処理場が受け持つ下水汚泥と混合し、嫌気性消化を行うものである<sup>3),4)</sup>。この方法では、消化施設を持たない処理場から排出される未消化脱水汚泥の安定化、減量化が可能であることに加え、施設の共同化によるエネルギーの節約、運転管理費、建

設費の軽減、各処理場の規模縮小等の利点もある。しかしながら、集約後の脱水汚泥と受け入れ側の液状汚泥を混合して嫌気性消化する場合、固形物濃度10%以上の高濃度消化となることが予想される。そして、固形物濃度が10%以上の汚泥を消化する場合は、蓄積したアンモニアによりメタン生成が阻害され、VFAが多量に蓄積する可能性がある<sup>4)</sup>。

アンモニアは、タンパク質やアミノ酸等の分解により生成される。アンモニア性窒素は、細菌の増殖に必須の栄養源であるが、過剰に存在すると、嫌気性消化プロセスに対し阻害を及ぼすことが多くの研究者により報告されている。これまでの研究から、嫌気性消化に関与する細菌群の中では、メタン生成細菌がアンモニアによる阻害を受けやすいとされているが、高アンモニア濃度の条件下で、馴養され続け、その環境に順応した場合、高いアンモニア性窒素濃度においてもメタン生成は維持されることが知られている<sup>5)-8)</sup>。

筆者ら<sup>3)</sup>は、嫌気性消化において投入汚泥の固形物濃度(TS)を増大させた場合の影響を明らかにするため、脱水汚泥を基質とした連続実験を行った。その結果、投入汚泥濃度を11.0%(TS)にあげても、安定した処理性能が維持されていた。これは、消化槽中の

メタン生成細菌がアンモニアによる阻害に対して順応したためである<sup>9)</sup>。しかしながら、この時、炭水化物の分解は、投入汚泥濃度の増大に伴い、大きく減少しており、投入汚泥濃度 11.0% の条件での分解率は 27% 程度であった。それにより、メタンの生成効率も、10% 程度減少していた。この原因については様々なものが考えられるが、メタン生成細菌に比べ高いアンモニア濃度ではあるが、グルコース資化性の酸生成細菌もアンモニアによる阻害を受ける<sup>10)</sup>ことが報告されていることから、酸生成細菌へのアンモニアの阻害が最も有力と考えられている<sup>11)</sup>。

この炭水化物分解へのアンモニアの阻害により、プロセス全体が影響を受けたと思われる報告は、他にもいくつかある。Webb and Hawkes<sup>12)</sup>はタンパク質を 17% (TS)、セルロース+ヘミセルロースを 35.9% 含む養鶏堆肥を基質とした中温嫌気性消化の実験を行った。滞留時間を 29.2 日とし、基質濃度 (TS) を 1, 4, 7, 10% に変化させて実験を行ったところ、投入基質濃度の増大に伴い、アンモニア性窒素の蓄積は増大し、VS 当たりのメタン生成も減少していた。そして、この時、セルロースとヘミセルロースの分解率も 2/3 程度減少していた。また、Summers, R. ら<sup>13)</sup>も乳牛廃棄物の中温消化において、アンモニアの蓄積により固形分の分解が阻害を受け、メタン生成が減少したと報告している。この時、VFA の蓄積は少なかったことから、メタン生成細菌は阻害を受けていなかったとされている。

以上のことから、高濃度汚泥や固形廃棄物の消化を行う場合、これまではメタン生成細菌へのアンモニアの阻害に対して、注意が払われていたが、メタン生成細菌が阻害に順応した場合でも、加水分解段階が律速段階である場合には、炭水化物からの酸生成への阻害により、嫌気性消化全体の効率が低下する可能性がある<sup>10)</sup>。しかしながら、これまでのアンモニアによる酸生成への阻害に関する研究は、回分実験によるもの<sup>10), 11)</sup>が主である。回分実験の場合、阻害の影響は種汚泥の培養条件に大きく依存し、また、阻害物質存在下での連続培養で起こる菌相の変化や阻害に対する耐性、菌体増殖への阻害等不明な点も多い。そのため、回分実験では、阻害の傾向を知ることではあるが連続培養条件への適用、比較は困難である。実際、アンモニアの阻害が問題となる汚泥消化などでは、連続または半連続培養が用いられているため、連続実験により阻害の詳細を明らかにする必要がある。そこで、本研究では、連続培養における炭水化物とタンパク質からの酸生成に及ぼすアンモニア性窒素の影響を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

## 2. 実験方法

### (1) 実験装置および操作方法

本研究で用いた反応槽は、有効容積は 1.5L で、連続的に基質を投入し、発生したガスをポンプで循環させることによって槽内を攪拌し、増加した消化液を連続的に引き抜く完全混合型反応槽である。種汚泥には、山形市下水道部浄化センターの汚泥消化槽より採取した中温消化汚泥を用いた。温度を一定に保つため、反応槽は 35℃ の恒温槽内に設置した。基質中に NaHCO<sub>3</sub> を添加することにより、反応槽内の pH を 6.73-7.25 に維持し、滞留時間を 14.4 時間に設定して、以下に示す条件で連続運転を行った。

本研究では、デンプンおよびペプトンの複合基質からの酸生成に及ぼすアンモニア性窒素濃度の影響を検討するため、基質への NH<sub>4</sub>Cl の添加量を変化させ、連続培養を行った。まず、デンプンとペプトンを基質とした連続培養を 4ヶ月間行い、その後、NH<sub>4</sub>Cl 添加量を段階的に増加し、反応槽中のアンモニア性窒素濃度を 7 段階に変化させた。実験結果にあるアンモニア性窒素濃度は各定常状態における反応槽内の濃度である。各段階とも 2 週間以上の連続運転を行った。

本研究に用いた基質の組成は表-1 に示すとおりである。基質中のデンプンとペプトンは完全に溶解させて用いた。基質の変質を防ぐため、基質タンクは 3℃ の冷水中に設置し、基質の作成は 2 日おきに行った。

### (2) 分析項目及び方法

本実験における分析項目及び方法は以下の通りである。各アンモニア性窒素濃度条件で 1 週間以上運転し、定常状態に達した後、7 日間以上にわたって 3 回から 5 回、以下の分析を行った。本実験における定常状態は、3 日以上 (HRT 14.4h の 5 倍以上)、炭水化物濃度 (soluble)、タンパク質濃度 (total, soluble) の変化が ± 5% 以内を維持できた状態とした。

ガス生成量は、ガス捕集器の移動した量を測定することで求めた。発生したガス中の水素濃度の分析は、熱伝導度検出器付ガスクロマトグラフにより行った。カラムは Porapak Q が充填された 2m のステンレス製のものを用いた。検出器温度は 100℃、カラム温度は 70℃ に設定した。キャリアーガスは N<sub>2</sub> を用いた。二酸化炭素濃度の分析には、カラムに活性炭が充填された 1.5m のステンレス製のもの、キャリアーガスにヘリウムを用いた。他の条件は水素濃度の分析と同様である。揮発性脂肪酸 (VFA) の分析には、水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフを用いた。カラムは Unisole F-200 が充填された φ 3.2mm × 2.1m のガラス製カラム、キャリアーガスは N<sub>2</sub> を用い、検

出器温度を200℃, インジェクション温度190℃, カラム温度を140℃として測定した. アルコールの分析には, 水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフを用いた. カラムはGaskuropack 54が充填された2mのガラス製カラム, キャリアーガスはヘリウムを用い, 検出器温度を200℃, カラム温度を180℃として測定した. アンモニア性窒素の分析には, イオンクロマトグラフを用いた. カラムはShimpack IC-C3, キャリアーはシュウ酸(2.5mM), カラム温度は40℃, 流量は1.0(ml/min)として測定した. 溶解性炭水化物濃度の測定は, グルコースを標準物質としたフェノール硫酸法<sup>14)</sup>に従った. 溶解性および全タンパク質濃度は, アルブミンを標準物質としたLowry法<sup>15)</sup>に従って測定した. 全菌体濃度は, 細菌乾燥重量に占めるタンパク質の割合が60%とし<sup>16)</sup>, 全タンパク質濃度から溶解性タンパク質濃度を引いたものに1.67を乗じてVSSに換算したものをを用いた. pHの測定は, GST-5425C探針を装備したpHメーターを用いた. 乳酸の測定には, シグマ乳酸測定キットを用いた. 溶解性炭水化物, 溶解性タンパク質, アンモニア性窒素, 揮発性脂肪酸, アルコール, 乳酸の分析には, 反応槽の内容液を15000rpmで3分間遠心分離し, 上澄み液を0.45μmのフィルターでろ過したものを用いた.

### (3) 細菌数の計数

細菌の計数は, MPN(Most Probable Number)法に従った. 嫌気的操作には, Hungateのガス噴射法<sup>17)</sup>を用い, 噴射ガスには350℃還元銅カラムで脱酸素したN<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(80/20)ガスを使用した. 試料には, 各アンモニア性窒素濃度条件で, 14日以上連続培養したものを用いた. 計数の対象とした細菌群は, デンブ(炭水化物)資化性酸生成細菌, ペプトン(タンパク質)資化性酸生成細菌の2種類で, 各細菌群の計数に用いた培地の組成は表-2に示す通りである. 希釈水の組成は以下の通りである: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.4g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.4g/L, NH<sub>4</sub>Cl; 1.0g/L, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.1g/L, NaHCO<sub>3</sub>; 4.36g/L, 0.1% Resazurine; 2.0mL, L-Cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O; 0.5g/L, Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O; 0.25g/L.

培地および希釈水は, 作成後, 直ちにオートクレーブを用いて120℃, 1.2気圧で20分間滅菌した. デンブ資化性酸生成細菌の場合は, デンブを含まない培地を作成し, 試験管に8mLずつ添加, 密封, 滅菌後, 室温にまで冷却し, 別に作成した培地(デンブ濃度は27g/L)を各試験管に1mLずつシリンジで注入し, これを培地として使用した. デンブは0.25μmのフィルターを通して注入し, 作業は細菌の混入を防ぐためクリーンベンチ中で行った.

滅菌した希釈水および培地が室温にまで冷却した

表-1 基質の組成

試薬(mg/L)	濃度
デンブ	10000
ペプトン	20000
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	4500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	250
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100
NaHCO <sub>3</sub>	10000
NH <sub>4</sub> Cl	0-23000
Mineral solution*	10mL

Mineral solution\*(g/L): FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O: 0.4, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 0.12, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: 0.01, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>: 0.01, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 0.01, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O: 0.01, NaCl: 1.0, CaCl<sub>2</sub>: 0.02, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 0.02, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O: 0.1, ZnCl<sub>2</sub>: 0.1

後, シリンジを用いて反応槽から採取した試料10mLを希釈水90mLを加えたバイアル瓶(120mL)に注入する. これが希釈率10<sup>-1</sup>の試料となる. 次に, 希釈率10<sup>-1</sup>のバイアル瓶から試料10mLを採取し, 次のバイアル瓶に注入し, 希釈率10<sup>-2</sup>の試料を得る. 同じ方法で10<sup>-11</sup>までの試料を作成する. そして, それぞれのバイアル瓶からシリンジで試料を1mLずつ採取し, 培地を9mL加えた試験管に接種する. 接種は各希釈率につき5本ずつ行う. 最後に, これらの試験管を中温35℃の恒温培養槽に移し, 2週間培養する. 2週間の培養後, 酸生成細菌の有無を培地の白濁によって判定した. そして, 各細菌のMPNを5-5-5法の最確数表<sup>18)</sup>より算出した.

### 3. 実験結果および考察

#### (1) 有機物の分解に及ぼすアンモニア性窒素の影響

溶解性炭水化物および溶解性タンパク質の除去率に及ぼすアンモニア性窒素濃度の影響を図-1に示す. この図におけるタンパク質の分解にLuong式<sup>19)</sup>, 炭水化物の分解にPearson式<sup>19)</sup>を適用し, 各除去率が半減したアンモニア性窒素濃度を算出したところ, 炭水化物の分解では6750(mg-N/L), タンパク質では8330mg-N/Lであった. R<sub>0</sub>には, 本研究における最大の除去率, 99%と74%をそれぞれ用いて算出した.

$$\text{Response} = R_0 * [1 + (N/N_0)^a] \dots\dots\dots \text{Luong 式}$$

$$\text{Response} = R_0 * [1 + (N/N_{50})^b]^{(-1)} \dots\dots\dots \text{Pearson 式}$$

また, 他の定数は, 炭水化物の分解(Pearson式)ではb=12.0(R=0.976), タンパク質の分解(Luong式)ではa=3.49, N<sub>0</sub>=10160(R=0.993)であった.

嫌気性消化槽内のアンモニア性窒素は, アンモニ

ウムイオンと遊離アンモニアが平衡状態を保って存在しており、この中で、メタン生成細菌に対して強い影響を持つのは、遊離アンモニアとされている。これは、遊離アンモニアは、細胞膜を通過できるが、アンモニウムイオンは通過できないという説に基づいている<sup>20), 21)</sup>。そこで、酸生成細菌へのアンモニアの阻害も同様の機構により起こると仮定し、各有機物の除去率をアンモニア濃度が最も低い場合の50%に減少させる遊離アンモニア濃度を算出した。遊離アンモニア濃度は以下の式<sup>22)</sup>に従い、定常状態におけるpHと全アンモニア性窒素濃度(TAN)より算出した。

$$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$$

$$K_1 = \frac{[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]}{[\text{NH}_3][\text{H}_2\text{O}]} = 1.85 \times 10^{-5} \quad (35^\circ\text{C})$$

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = 2.09 \times 10^{-14} \quad (35^\circ\text{C})$$

$$[\text{NH}_3] = 1.13 \times 10^{-9} \frac{[\text{NH}_4^+]}{[\text{H}^+]} \quad [\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$$

$$[\text{NH}_3] = 1.13 \times 10^{-9+\text{pH}} \frac{[\text{TAN}]}{(1 + 1.13 \times 10^{-9+\text{pH}})}$$

これらの式から、炭水化物の分解では91.3mg-N/L、タンパク質では175mg-N/Lであった。以上の結果から、炭水化物の分解の方がタンパク質の分解に比べ、アンモニア性窒素による阻害を受けやすく、その差は、遊離アンモニアで表した方が顕著になることがわかる。また、後に詳しく述べるが、本研究ではアンモニア性窒素が3900mg-N/Lの場合で、すでに炭水化物代謝の阻害を示すエタノールの蓄積<sup>11)</sup>が見られたことから、阻害自体はさらに低いアンモニア濃度で開始していたと考えられる。しかしながら、本研究では、滞留時間を14.4hと従来の研究<sup>23)</sup>で知られているデンブンの酸生成に用いられる滞留時間と比較して長く設定していたことにより、除去率に対して影響があらわれるアンモニア濃度は、酸生成に対して影響のあらわれる濃度と比較して高くなったと考えられる。

アンモニアによる酸生成細菌への阻害が、細胞内にアンモニアが浸透して起こると推測されることから、反応槽内のアンモニア性窒素とそこに存在する全菌体量の比であるg-Total Ammonia Nitrogen/g-全菌体(以下g-TAN/g-VSS)を指標として用いることは有効であると考えられる。そこで、図-2に各有機物除去率へのアンモニア負荷の影響を示す。炭水化物除去率は、アンモニア負荷が1.33g-TAN/g-VSS以上で急激に減少し、3.14g-TAN/g-VSSで除去率は半減していた。一方、タンパク質除去率は、アンモニア負荷に対し、段階的の減少していた。アンモニア負荷0.61-1.71g-TAN/g-VSSで除去率は緩やかに減少し、3.30g-TAN/g-VSS以上で急激な阻害を受けていた。この結果から、タンパク質分解への阻害には負荷の違いにより少なくとも二通りの作用の仕方があるか、

表-2 各細菌の計数に用いた培地の組成(1L当たり)

組成	デンブン資化性	ペプトン資化性
	酸生成細菌	酸生成細菌
デンブン	3.0g	-
ペプトン	-	3.0g
Yeast extract	0.2g	0.2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4g	0.4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4g	0.4g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0g	1.0g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1g	0.1g
Mineral solution <sup>†</sup>	10mL	10mL
Vitamin solution <sup>‡</sup>	10mL	10mL
NaHCO <sub>3</sub>	6.0g	6.0g
L-Cysteine·HCl·H <sub>2</sub> O	0.5g	0.5g
Na <sub>2</sub> S·6H <sub>2</sub> O	0.25g	0.25g
Resazurine	0.002g	0.002g
pH	7.0-7.2	7.0-7.2

Mineral solution<sup>†</sup>:表-1のMineral solutionにN(CH<sub>3</sub>COOH)<sub>3</sub>を4.5g/Lを加えたもの。

Vitamin solution<sup>‡</sup>(mg/L):biotin;2, folic acid;2, pyridoxine HCl;10, thiamine HCl;5, riboflavin;5, nicotinic acid;5, lipoic acid;5, DL-calcium pantothenate;5, p-aminobenzoic acid;5, VitaminB<sub>12</sub>;0.1

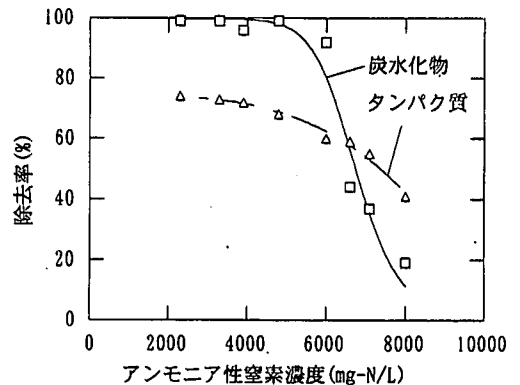


図-1 有機物の分解に及ぼすアンモニア性窒素の影響

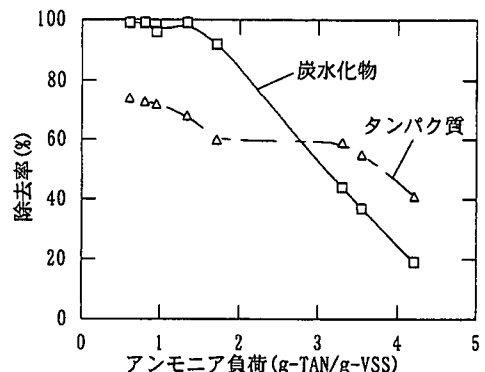


図-2 有機物の分解に及ぼすアンモニア負荷の影響

または、タンパク質分解に関与する細菌のなかにアンモニア負荷に対し異なった感度を持つものが存在している可能性が考えられる。

表-3 連続実験の結果

分析項目	Run							
	1	2	3	4	5	6	7	8
アンモニア性窒素 (mg-N/L)	2300	3300	3900	4800	6000	6600	7100	8000
アンモニア負荷 (g-TAN/g-VSS)	0.61	0.80	0.95	1.33	1.71	3.30	3.55	4.21
溶解性炭水化物 (mg/L)	70	120	350	90	800	5300	6000	7700
溶解性タンパク質 (mg/L)	2600	2700	2800	3200	4000	4100	4500	5900
全菌体量 (mg-VSS/L)	3800	4100	4100	3600	3500	2000	2000	1900
酢酸 (mg/L)	5900	6600	7600	5900	5200	3100	3500	2600
プロピオン酸 (mg/L)	1000	1200	1100	840	830	580	500	350
iso-酪酸 (mg/L)	670	740	720	610	450	390	340	190
n-酪酸 (mg/L)	2700	3300	2200	2100	2700	1700	1800	1600
iso-吉草酸 (mg/L)	1600	1600	1400	700	680	660	760	580
n-吉草酸 (mg/L)	170	-	-	-	30	20	-	-
iso-カプロン酸 (mg/L)	-	-	-	1100	700	560	360	-
n-カプロン酸 (mg/L)	380	-	-	-	-	-	-	-
エタノール (mg/L)	210	70	1200	1400	780	560	590	200
乳酸 (mg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-
pH (-)	6.93	6.73	6.84	6.88	7.00	7.10	7.10	7.25

(2) 細菌群の資化性に及ぼすアンモニア負荷の影響

表-3から、全菌体量はアンモニア負荷が低い場合は4000mg/L前後で変動しているが、1.71g-TAN/g-VSSを越えると2000mg/Lまで減少していた。この時、炭水化物の除去率も大幅に減少していることから、減少した全菌体量の大部分は炭水化物を優先的に分解する細菌由来の全菌体量と考えられる。そこで、図-3に反応槽内に存在する細菌群による各有機物分解効率に及ぼすアンモニア負荷の影響を示した。この図から、低アンモニア負荷では炭水化物分解は活発であるが、それにより増殖していた細菌群は、表-3に示した炭水化物分解が阻害を受け、菌体濃度が半減するような負荷を越えると、アンモニア濃度の増大とともに減少していくことがわかる。図-4は筆者らが先に行った実験結果<sup>11)</sup>をアンモニア負荷による影響で表したものである。この結果は回分実験によるものなので、菌体濃度は実験開始時のものを用いた。この結果から、基質にグルコースのみを用いた回分実験においても、負荷の増大とともに分解速度は減少したが、阻害はより低い濃度で開始されていた。この原因として、用いた種汚泥の馴養をグルコースで行ったため、その細菌相が本研究と異なっていたことが考えられる。また、本研究では、主に炭水化物を分解することで増殖していた細菌のなかには、有機性窒素を同化および異化代謝の窒素源に用いているものもあり、アンモニアにより炭水化物分解が強く阻害された場合、それまで用いられていたタンパク質の一部が分解されず、炭水化物分解に比べ緩やかではあるが、タンパク質分解も低下すると考えられる。本研究では、炭水化物分解効率が大きく低下した際に全菌体量も半減していたが、タンパク質分解効率はそれほど低下していなかった。このことから、

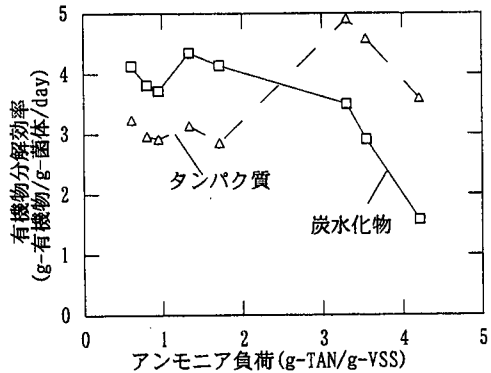


図-3 有機物分解効率に及ぼすアンモニア負荷の影響

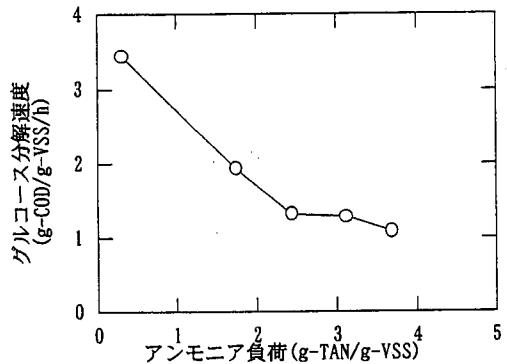


図-4 分解速度に及ぼすアンモニア負荷の影響<sup>11)</sup>

高アンモニア負荷条件では、炭水化物分解を行っていた細菌の多くはwash-outされ、反応槽内に生き残った細菌の多くはタンパク質を分解することで増殖可能なものと考えられる。佐藤ら<sup>23)</sup>が行ったスクロースとゼラチンの複合基質(10380mg/L:2930mg/L)からの嫌気性消化の研究では、あらゆる滞留時間で炭水化物の方が優先的に分解されていた。また、ゼラチンを主要炭素源として培養しているときにグル

コースを添加すると、グルコースは完全に分解され、ゼラチンの加水分解も維持されるが、ゼラチンからの酸生成は減少したという報告もある<sup>24)</sup>。以上のように、混合培養では、特殊な条件下でなければ、易分解性の炭水化物や糖類がタンパク質に比べ優先的に分解されることがわかる。しかし、これまで述べたように、高アンモニア負荷環境では、炭水化物の分解は強く阻害を受ける。嫌気性消化のタンパク質分解に関与する *Clostridium* 属細菌は、通常、炭水化物も資化できる<sup>25)</sup>が、資化性の強さは菌種により様々である<sup>26)</sup>。よって、このような細菌群の中でも元々タンパク質を優先的に利用しているものやタンパク質優先資化性へと遷移できるものが、高アンモニア負荷条件下では生き残ったことで、全菌体量当たりのタンパク質分解量が増大したと考えられる。

図-5は各細菌数に及ぼすアンモニア性窒素濃度の影響を示したものである。この図から、反応槽内における酸生成細菌の優占種は炭水化物資化性のものであることがわかる。各細菌数は、炭水化物やタンパク質の分解が阻害を受け始めたアンモニア負荷 1.71g-TAN/g-VSS までに、それぞれ 50% 程度減少し、その後はある程度の細菌数を維持していた。タンパク質の除去率と比較して、炭水化物の除去率が大きく減少しているのに対し、デンプン資化性細菌数の減少は、ペプトン資化性のもと同様に推移していた。従って、先に述べたように、アンモニアによる阻害により、一時的にタンパク質を資化していた細菌は、炭水化物を分解しにくい高アンモニア負荷環境においてもその資化能力を保持しながらタンパク質分解を行っていたと推定される。

### (3) 代謝産物の生成に及ぼすアンモニア性窒素の影響

図-6は、COD 収支に及ぼすアンモニア性窒素の影響を示したものである。COD の換算には表-3、表-4を用いた。反応槽内の溶解性炭水化物は、分解されなかったデンプンおよびデンプンが加水分解したものであるため、フェノール-硫酸法で測定した溶解性炭水化物濃度にグルコースの換算計数を乗して算出した。また、反応槽中の溶解性タンパク質は、分解されなかったペプトンとして COD 収支の算出を行った。よって、図-6のペプトンの COD は、表-3の溶解性タンパク質濃度をペプトンのタンパク質含有率 (45.5%) で除し、表-4の換算計数を乗して算出した。本実験での代謝産物は、酢酸、プロピオン酸、iso-酪酸、n-酪酸、iso-吉草酸、エタノールなどで、アンモニア性窒素濃度によっては n-吉草酸、iso-カブロン酸、n-カブロン酸も検出された。また、乳酸は全ての条件で検出されず、水素への COD 変換も非常

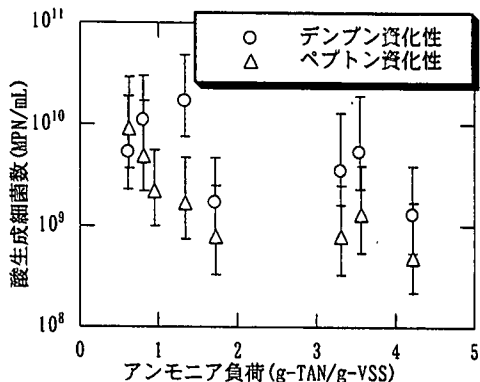


図-5 細菌数に及ぼすアンモニア負荷の影響

表-4 物質収支に用いた COD 換算計数

Parameter	Conversion factor
溶解性炭水化物	1.067mg-COD/mg-グルコース
溶解性タンパク質	0.997mg-COD/mg-ペプトン
菌体	1.420mg-COD/mg-VSS
酢酸	1.066mg-COD/mg-酢酸
プロピオン酸	1.512mg-COD/mg-プロピオン酸
酪酸	1.816mg-COD/mg-酪酸
吉草酸	2.037mg-COD/mg-吉草酸
カブロン酸	2.207mg-COD/mg-カブロン酸
乳酸	1.066mg-COD/mg-乳酸
エタノール	2.084mg-COD/mg-エタノール

に小さかった。本研究では、pH が 6.73-7.25 に維持されていたことにより、アセトンやブタノールの生成はなかった。

図-6から、アンモニア性窒素の増大に伴い、酸の生成は減少し、エタノールの生成が増加する傾向を示していた。このエタノールはアンモニア濃度がさらに増大し、炭水化物の分解が減少すると蓄積しなくなることから、炭水化物の代謝産物と考えられる。よって、炭水化物からの酸生成は、高アンモニア性窒素負荷条件では減少し、その減少分がエタノールの生成にまわされていたと考えられる。この傾向は、筆者ら<sup>11)</sup>が行った回分実験でも見られた。この研究ではこの現象の説明として酪酸生成経路がアンモニアによる阻害を受け、代用として酪酸生成と同様に NADH の処理が可能ではあるが、酸生成に比べ ATP 生産率が低い<sup>27)</sup>エタノール生成の経路を採用し、グルコース分解の活性が低下したという仮説を挙げている。本研究では、デンプンの酸生成としては滞留時間が比較的最長のため、ある程度のアンモニア性窒素負荷まではエタノール生成を行いながら菌体増殖および炭水化物分解を維持することはできたが、更に濃度が上昇した場合は、炭水化物の分解でエネルギーを得ている細菌の多くが wash-out され、炭水化物の除去率は大きく減少したと考えられる。

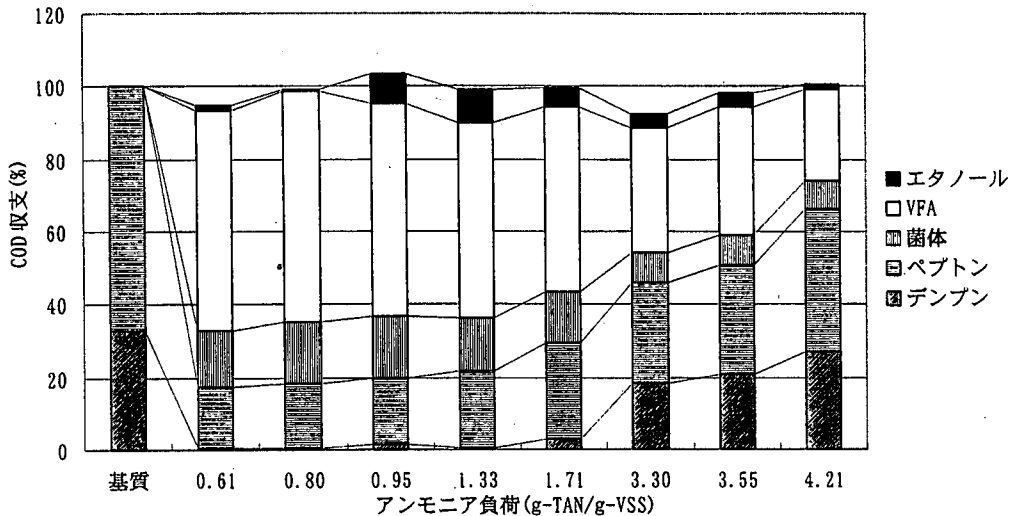


図-6 各アンモニア負荷条件の反応槽内におけるCOD物質収支

#### 4. 結論

本研究では、アンモニアによる有機物分解への影響を検討するため、反応槽内のアンモニアが、そこに存在する細菌にどれだけ行き渡るかを示すアンモニア負荷 g-TAN/g-VSS を指標として用いた。その結果、アンモニア負荷が 1.33g-TAN/g-VSS 以上で炭水化物除去率が急激に減少し、4.21g-TAN/g-VSS で 20% 以下になっていた。一方、タンパク質除去率は、アンモニア負荷の増大に対し、段階的に減少するが、4.21g-TAN/g-VSS でも 40% 程度の除去率を維持していた。

炭水化物除去率が大きく減少した場合、全菌体量も半減したが、その時、全菌体量当たりのタンパク質分解速度は増大していた。このことから、高アンモニア負荷条件では、元々タンパク質を優先的に利用していた細菌や炭水化物からタンパク質へと資化性を遷移できるものが、主に増殖可能と考えられる。

また、炭水化物資化性の酸生成細菌がアンモニアによる阻害を受けると、VFA の生成は減少し、エタノールの生成が増大した。更に濃度が上昇した場合は、菌体を維持できなくなり、炭水化物除去率も大きく減少した。筆者らが先に行った回分実験<sup>11)</sup>では、分解速度の減少とエタノール生成の増大は同時に起きていたが、本研究のように、基質の分解に対し、滞留時間を長く設定すると、アンモニア負荷に対し、エタノール生成の増大、菌体濃度の減少、炭水化物分解の大幅な減少が段階的に起こる。よって、連続培養での炭水化物分解への阻害は、エタノール濃度のモニタリングによって予測できると考えられる。

謝辞：本研究に用いた種汚泥は山形市下水道部浄化セ

ンターより提供して頂いた。また、本研究費の一部は NKK(株)による補助を受けた。記して謝意を表する。

#### 参考文献

- 1) 渡部春樹：下水汚泥の発生量と処理・利用・処分の現状、汚泥処理・再資源化技術とシステム、(株)ティー・アイ・シー、pp.14-18, 1994.
- 2) 山口登：汚泥処理施設計画・設計のポイント、下水道協会誌、Vol. 33, No. 396, pp. 29-35, 1996.
- 3) 藤島繁樹、宮原高志、水野修、野池達也：脱水汚泥の嫌気性消化に及ぼす固形物濃度の影響、土木学会論文集、No. 662/VII-11, pp. 73-80, 1999.
- 4) 尾崎正明、久保忠雄、山下洋正：中小都市における広域的な汚泥処理システムの開発に関する調査、平成 8 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp. 229-234, 1997.
- 5) Van velsen, A.F.M. : Adaptation of methanogenic sludge to high ammonia-nitrogen concentrations, *Water Research*, Vol. 13, pp. 995-999, 1979.
- 6) Robbins, J.E., Gerhardt, S.A. and Kappel, T.J. : Effects of total ammonia on anaerobic digestion and an example of digester performance from cattle manure-protein mixtures, *Biological Wastes*, Vol. 27, pp. 1-14, 1989.
- 7) Koster, I.W. : Characteristics of the pH-influenced adaptation of methanogenic sludge to ammonium toxicity, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, Vol. 36, pp. 445-455, 1986.
- 8) Koster, I.W. and Lettinga, G. : Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations, *Biological Wastes*, Vol. 25, pp. 51-59, 1988.
- 9) Fujishima, S., Miyahara, T. and Noike, T. : Effect of moisture content on anaerobic digestion of dewatered sludge: ammonia inhibition to carbohydrate

- removal and methane production, *Water Sci. Tech.*, Vol. 41, No. 3, pp. 119-127, 2000.
- 10) Gallert, C. and Winter, J.: Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 48, pp. 405-410, 1997.
  - 11) 藤島繁樹, 宮原高志, 角田俊司, 野池達也: 嫌気性消化における酸生成相へのアンモニア性窒素の影響, 土木学会論文集, No. 650/VII-15, pp. 33-40, 2000.
  - 12) Webb, A.R. and Hawkes, F.R.: The anaerobic digestion of poultry manure: variation of gas yield with influent concentration and ammonium-nitrogen levels, *Agricultural Wastes*, 14, pp. 135-156, 1985.
  - 13) Summers, R., Hobson, P.N., Harries, C.R. and Richardson, A.J.: Stirred-tank, mesophilic, anaerobic digestion of fattening-cattle wastes and of whole and separated dairy-cattle wastes, *Biological Wastes*, 20, pp. 43-62, 1987.
  - 14) 福井作蔵: 還元糖の定量法(第2版), 学術出版センター, pp. 50-52, 1990.
  - 15) 岩永貞昭: タンパク質の科学 I (生化学実験講座 1), 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 45, 1976.
  - 16) 村尾澤夫, 荒井基夫: 応用微生物学, pp. 137, 培風館, 1993.
  - 17) 日本生化学会: 微生物実験法, 新生化学実験講座 17, 東京化学同人, pp. 123, 1992.
  - 18) 日本下水道協会: 下水試験方法, pp. 404-407, 1984.
  - 19) Poggi-Varaldo, H.M., Rodriguez-Vazquez, R., Fernandez-Villagomez, G. and Esparza-Garcia, F.: Inhibition of mesophilic solid-substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, pp. 284-291, 1997.
  - 20) Sprott, G.B., Shaw, K.M. and Jarrell, K.F.: Ammonia/Potassium exchange in methanogenic bacteria, *J. biol. chem.*, 259, pp. 12602-12608, 1984.
  - 21) Sprott, G.D. and Patel, G.B.: Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria, *System. Appl. Microbiol.*, 7, pp. 358-363, 1986.
  - 22) 井出哲夫: 嫌気性消化法, 水処理工学-理論と応用-, 技報堂出版, pp. 355-400, 1993.
  - 23) 佐藤増敏, 円谷輝美, 佐藤洋一, 中村玄正: 複合基質からの嫌気性水素発酵における pH と HRT の影響について, 土木学会第 54 回年次学術講演会講演集, pp. 394-395, 1999.
  - 24) Breure, A.M., Beeftink, H.H., Verkuijden, J. and van Anel, J.G.: Acidogenic fermentation of protein/carbohydrate mixtures by bacterial populations adapted to one of the substrates in anaerobic chemostat cultures, *Appl Microbiol Biotechnol*, 23, pp. 245-249, 1986.
  - 25) Siebert, M.L. and Toerien, D.F.: The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sewage sludge, *Water Research*, Vol. 3, pp. 241-250, 1969.
  - 26) Mead, G.C.: The amino acid-fermenting Clostridia, *Journal of General Microbiology*, 67, pp. 47-56, 1971.
  - 27) 山中健生: 微生物のエネルギー代謝, 学術出版センター, pp. 18-20, 1988.
  - 28) Zhang, T.C. and Noike, T.: Comparison of one-phase and two-phase anaerobic digestion processes in characteristics of substrate degradation and bacterial levels, *Wat. Sci. Tech.*, 23, pp. 1157-1166, 1991.

(2000. 5. 24 受付)

## EFFECT OF AMMONIA-NITROGEN ON GROWTH CHARACTERISTICS OF ACIDOGENIC BACTERIA IN ANAEROBIC DIGESTION

Shigeki FUJISHIMA, Takashi MIYAHARA, Yoshihiko SHISHIDO  
and Tatsuya NOIKE

In order to investigate the effect of ammonia on acidogenic bacterial growth characteristics using carbohydrate and protein in anaerobic digestion, continuous experiment feeding with a synthetic substrate composed of starch and peptone was performed by changing ammonia nitrogen concentration of digester content. The carbohydrate degradation efficiency was decreased to below 20% with increasing the ammonia nitrogen loading rate to 4.21g-TAN/g-VSS. It seemed that acidogenic bacteria with an ability to utilize both of carbohydrate and protein grew by mainly utilizing protein under the toxic ammonia concentration. It also appeared that before the carbohydrate degradation efficiency was dramatically decreased, ethanol concentration in metabolite increased with ammonia nitrogen concentration increased.