

山梨大学工学部 学生員 柿崎 敬
 山梨医大医学部 石川 覚之
 山梨大学工学部 正会員 平山けい子
 山梨大学工学部 正会員 平山 公明

1. はじめに

過剰な施肥などによる硝酸性窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) の地下水汚染は、近年、問題になっている。その処理方法としては、イオン交換膜や、生物脱窒、電気分解等を利用することがあげられる。ここでは、酵母を使うことにより好氣的な条件での $\text{NO}_3\text{-N}$ の処理を試みた。酵母は広く環境中に存在し、菌体自体、細菌と比較して大型であり固液分離が容易であること、培養が容易で生育が比較的早く、低い pH、高濃度の負荷に耐え、回収される菌体がバイオマスとして利用できることなどの様々な利点がある。そこで、硝酸塩資化性を有する *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052株(以下28052株)を用い $\text{NO}_3\text{-N}$ の除去に関する検討を行った。

2. 実験方法

酵母の前培養 酵母は200ml三角フラスコ中の Y M 培地 (酵母エキス3g、麦芽エキス3g、ペプトン5g、ブドウ糖10gを蒸留水1l中に含む) 50mlに1白金耳植種して、130rpm、30℃で4.5日間回転振蕩培養した。

酵母の硝酸塩資化試験 前培養した酵母の硝酸塩資化性を液体培養法によって調べた。簡易合成培地 (ブドウ糖10g, KNO_3 780mg, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100mg, NaCl 100mg, ビタミン溶液 1mlを蒸留水1l中に含む。ビタミン溶液 1ml中に biotin 2 μg , Ca-pantothenate 400 μg , inositol 2000 μg , thiamine-HCl 400 μg , piridoxine-HCl 400 μg , nicotinic acid 400 μg , p-aminobenzoic acid 200 μg を含む。) 100mlに集菌した酵母を1g/lになるように加え、前培養と同様に培養し、菌体の生育 (600nmにおける吸光度) と $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の変化を調べた。

酵母による硝酸塩資化の条件の検討 28052株を前培養の後集菌し、簡易合成培地の窒素源の種類、C/N比、pH、炭素源の種類を変化させたものに加え培養した。前培養と同様に培養し、菌体の生育、T O C、窒素濃度の変化を調べた。

菌体のアミノ酸分析 窒素源を変えて培養した菌体を0.1M塩酸で分解した後、アミノ酸組成を分析した。

3. 結果および考察

図1は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ をそれぞれ約100mg-N/lになるように培養液に別々に加えたもの (T O Cは4000mg-C/l) において、窒素濃度、菌体の生育の変化を示したものである。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ は培養2～4日で約100mg-N/l除去されていた。また、 $\text{NH}_4\text{-N}$ は1日目で約100mg-N/l除去されていた。吸光度は、培養0日目で約1.5が、培養2日目で6～8になっており、菌体が4～5倍に増殖していた。したがって、窒素源の種類による増殖の仕方に相違はないが、窒素の除去では、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が最も利用されやすいことが観察された。

図2は、pHの初期値を1～9まで変化させた場合における $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の変化を示したものである。(T O Cは4000mg-C/l、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は100mg-N/lとした。) pH 3～9では、培養2日目で約90%、また、pH 3～8では4日目で約100%除去されていた。pH 2では、3日目で80%、4日目で90%除去されていた。pH 1においては、培養4日目で約60%の除去にとどまった。したがって、pH 3～8ではほぼ完全に培地中の $\text{NO}_3\text{-N}$ を除去できることが分かった。

図3に、培養液のC/N比を10、20、30、40、60、80と変化させた場合における $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の変化を示した。($\text{NO}_3\text{-N}$ を100mg-N/lとし、炭素源の量を変えた。) C/N比=30、40、60、80では、培養2日目で約80～90%

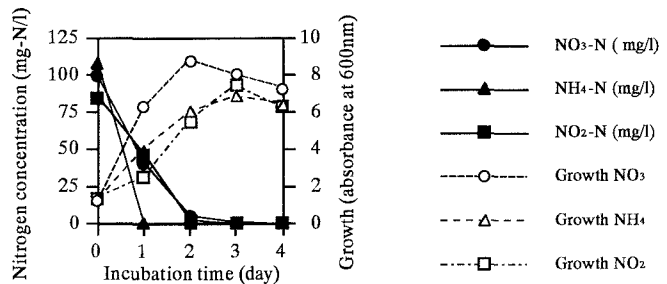


Fig. 1 Time course of $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ concentrations and the growth of *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052 in the cultured medium that contained $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ or $\text{NO}_2\text{-N}$ as the sole nitrogen source.

Key words: 亜硝酸性窒素、酵母、硝酸性窒素、*Rhodotorula*

〒400-8511 甲府市武田4-3-11 山梨大学工学部土木環境工学科 Tel 055-220-8595, Fax 055-220-8770

除去されていた。C/N比=10では4日目で約30%、C/N比=20では約60%の除去にとどまった。C/N比=40、60、80では、培養4日目ではほぼ100%除去されることから、NO₃-Nの除去には、C/N比を40以上に保つ必要があると考えられる。

図4は、培養液の炭素源を変えた場合における培養4日目のTOC除去率とNO₃-N除去率の関係について示したものである。この図より、炭素源の除去率が高いほど、NO₃-Nの除去率は高く、炭素源が利用されなければ窒素は除去されなことが分かった。

表1に窒素源を変えて培養した菌体中のアミノ酸組成を示した。グルタミン酸、アラニンの含量が比較的多かった。また、異なった窒素源で培養しても菌体のアミノ酸組成に違いは観察されなかった。

4. おわりに

本実験では、硝酸性窒素の除去を目的に、硝酸塩の資化性を有する *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052株を用い、C/N比、pH、炭素源などの条件を変えた場合の硝酸性窒素の除去について調べた。本酵母は、培地中の菌体初濃度1000mg/lで、初濃度100mg/lの硝酸性窒素を培養2日間で約90%除去した。また、亜硝酸性窒素も同様に資化することが分かった。C/N比=40、pH 3～8ではほぼ完全に培地中の硝酸性窒素を除去した。硝酸性窒素の除去は、炭素源の資化性および、C/N比に依存することが分かった。異なった窒素源で培養しても菌体のアミノ酸組成に違いは観察されなかった。

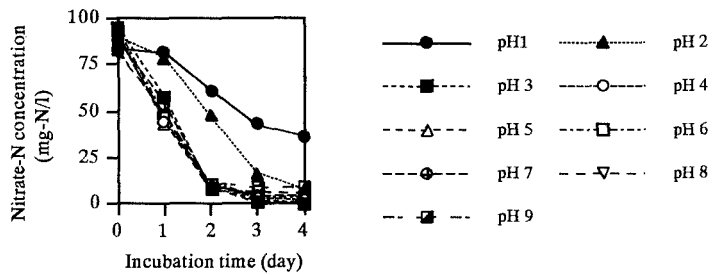


Fig. 2 Effect of an initial pH of 1 to 9 on the nitrate removal by the cells of *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052.

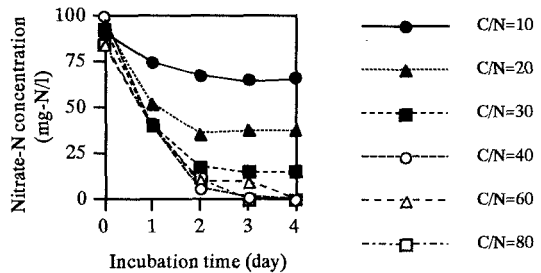


Fig.3 Time course of NO₃-N concentration in the medium that contained nitrate as the sole nitrogen source at various C/N ratios.

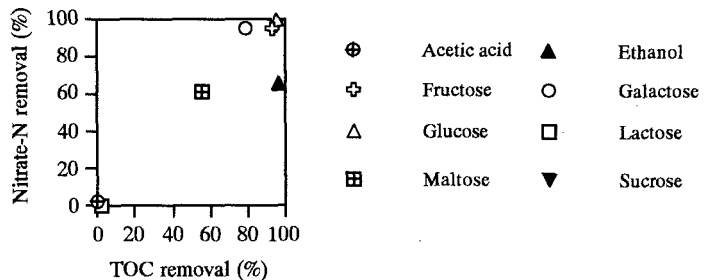


Fig. 4 Relationship between TOC removal (%) and nitrate removal (%) in the medium that contained various carbon sources and nitrate as the sole nitrogen source.

Table 1. Amino acid composition of the cells of *Rhodotorula glutinis* ATCC 28052 cultured on various nitrogen sources.

Medium	Nitrogen source	Amino acid (mol %)															
		Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro
YM medium	Peptone & Yeast extract	11.7	5.4	7.1	13.0	8.4	11.3	4.8	2.7	3.2	7.6	2.7	3.3	5.8	3.1	4.6	5.2
	NH ₄ -N	8.6	5.3	7.2	12.0	8.5	9.9	5.1	4.1	3.3	7.9	2.8	4.9	6.8	3.2	4.5	5.8
Synthetic medium	NO ₃ -N	9.3	5.9	8.1	13.2	9.2	10.6	5.2	3.2	3.0	7.5	2.3	3.1	5.9	2.5	5.1	5.9
	NO ₂ -N	8.9	5.8	7.7	11.9	8.9	10.3	5.1	2.9	3.1	7.8	2.8	4.5	6.3	3.2	5.3	5.7