



脱窒細菌を固定化する多孔質マイクロ/ナノカプセルを用いた硝酸性窒素除去技術の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉田, 昌弘, 武井, 孝行, 幡手, 泰雄, 清山, 史朗, 塩盛, 弘一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/5928

特集 微粒子とマイクロ/ナノカプセルが拓くエネルギー・資源の未来

脱窒細菌を固定化する多孔質マイクロ／ ナノカプセルを用いた硝酸性窒素除去技術の開発

Development of Removal Technology of Nitrate Nitrogen Utilizing Porous
Micro/Nanocapsules with Denitrifying Bacteria

吉田 昌弘*・武井 孝行*・幡手 泰雄**・清山 史朗***・塩盛 弘一郎****
Masahiro Yoshida Takayuki Takei Yasuo Hatate Shiro Kiyoyama Kouichiro Shiomori

1. まえがき

土壌中や地下水における各種化学物質による環境汚染が深刻化している。中でも硝酸性窒素による地下水の汚染は、地下水への依存率が高い欧米諸国をはじめ世界各地で深刻な問題となっており、日本においても多数の井戸から高濃度の硝酸性窒素が検出されている。硝酸性窒素は、人体に健康被害を及ぼす危険な物質である。硝酸性窒素そのものの急性毒性は大きくないが、多量に摂取すると胃の中で亜硝酸性窒素へ還元され、血液中のヘモグロビンと結合してメトヘモグロビンとなり、酸素運搬能力を低下させてブルーベビー症候群といわれるメトヘモグロビン血症を誘発する。また、硝酸性窒素は消化器官内の微生物によって還元されて亜硝酸性窒素となり、体内のアミンやアミドと反応して発がん性物質であるニトロソアミンを生成すると指摘されている。ニトロソアミンが生成されると、膀胱の病気と胃塩酸欠乏症にかかる人が増加することが明らかになっている。このことから、早急な浄化対策が求められているが、現在の浄水システムでは処理することが不可能である。

現在用いられている硝酸性窒素の除去法は、物理化学的処理法と生物学的処理法に分けられる。物理化学的処理法では主に、イオン交換法やRO（逆浸透）膜法が挙げられるが、コストが高く、水中の硝酸性窒素を分離するため濃縮液や再生廃液中に高濃度の硝酸性窒素が含有するという問題がある。これに対し、低コスト、操作性の容易さから

生物学的処理法は魅力的な方法といえる。硝酸性窒素を窒素ガスまで分解する処理法として、脱窒細菌を用いた従属栄養性脱窒法と独立栄養性脱窒法がある。従属栄養性脱窒法は処理速度が大きい、有機物を電子供与体として用いるため残留有機物や余剰汚泥による水質悪化が懸念されている。一方、独立栄養性脱窒法は処理速度が遅いが、無機物を電子供与体として使用するため余剰汚泥による水質悪化の心配がない。以上のことから本研究では、独立栄養性脱窒法を選択した^{1, 3~7)}。独立栄養性脱窒法で用いる脱窒細菌は、電子供与体として水素ガスを用いることで硝酸性窒素を無害な窒素ガスまで還元することができる。しかし、微生物自体が非常に小さいため、反応器内に分散すると取り除くことが困難になり、反応器外に流出した場合は二次的環境汚染を引き起こす可能性がある。この問題を解決するために、微生物をマイクロカプセル（MC）中に固定化する技術に注目した^{2, 7)}。微生物を固定化する方法としては、アルギン酸カルシウム、キトサンなどの生体適合性に優れた天然高分子からなるゲル素材の担体が一般的に用いられている。しかし、これらの素材は潜在的に脆く、長時間の使用による担体の崩壊や微生物の漏洩などの問題が生じてしまう。この問題点を克服するため、本研究では高分子素材^{2~7)}であるジビニルベンゼン（DVB）及びトリメタクリル酸トリメチロールプロパン（TRIM）を用いたゲル素材以上の耐久性を有するMCの開発に取り組んだ。さらに、MCの構造を多孔質構造とすることで、微生物の反応面積を拡大でき、汚染物質のMC内への拡散性の向上が期待できる。そこで、浸透圧効果を利用して多孔質構造型MCを調製し⁸⁾、調製した多孔質構造型MCの基礎特性評価を行った。そして、脱窒細菌を固定化したMCを用いて硝酸性窒素を含む模擬汚染水からの脱窒反応試験を行うことで、脱窒細菌固定化MCの脱窒能力を評価した。

2. 実験および評価法

2.1 試薬

MCの調製には以下の試薬を使用した。NaCl, DVB, TRIM, 2,2アゾビス（2,4-ジメチルバレロニトリル）

*鹿児島大学大学院理工学研究科
〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-40
E-mail : myoshida@cen.kagoshima-u.ac.jp
E-mail : takei@cen.kagoshima-u.ac.jp
**株MCラボ
〒890-0046 鹿児島市西田1-3-2-808
E-mail : mc-laboy@nifty.com
***都城工業高等専門学校
〒885-8567 宮崎県都城吉尾町473-1
E-mail : shiroh@miyakonojo-nct.ac.jp
****宮崎大学工学部
〒889-2192 宮崎市学園木花台1-1
E-mail : shiomori@cc.miyazaki-u.ac.jp

(ADV N), ポリビニルアルコール500 (部分けん化型) (PVA500), ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬工業株式会社製のものを, トルエンは関東化学株式会社製のものを, 縮合リシノレイン酸ポリグリセリル (818SX) は太陽化学株式会社製のものを使用した。

脱窒細菌の培養および生菌数カウントには以下の試薬を使用した。硫酸マグネシウム七水和物, 寒天は和光純薬工業株式会社製のものを, ポリペプトンは日本製薬株式会社製のものを, Bact Yeast ExtractはDifco Laboratories社製のものを使用した。

脱窒反応試験には以下の試薬を使用した。硝酸ナトリウム, 亜硝酸ナトリウム, リン酸二水素ナトリウム, 炭酸水素ナトリウムは和光純薬工業株式会社製のものを使用した。

2.2 MCの調製

図1にMCの調製スキーム, 表1にMCの調製条件を示す。

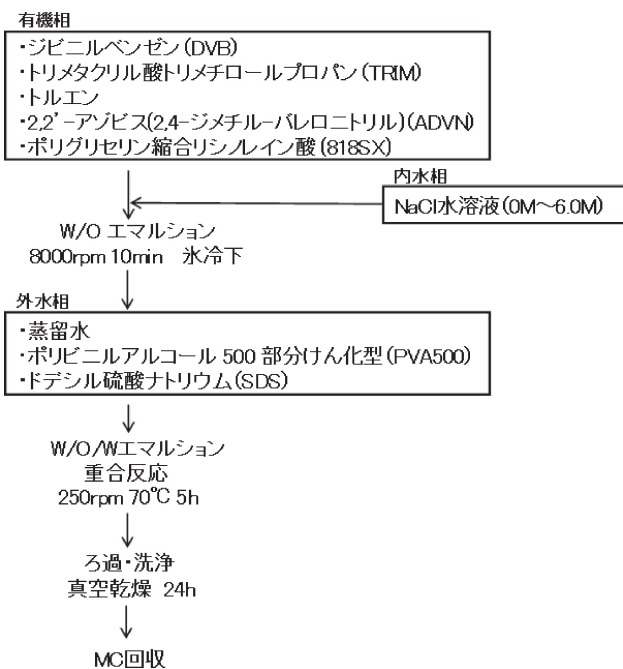


図1 MCの調製スキーム

表1 MCの調製条件

内水相	NaCl濃度 [mol/L]	0	1.5	3.0	4.5	6.0
		NaCl水溶液 [g]			1.0	
有機相	DVB [g]			1.99		
	TRIM [g]			5.18		
	818SX [g]			0.9		
	ADV N [g]			0.09		
	トルエン [g]			0.9		
外水相	蒸留水 [g]			90		
	PVA500 [g]			1.8		
	SDS [g]			0.23		

本研究では, 浸透圧効果を利用して多孔質構造を有するMCの調製を行った⁸⁾。具体的に, 浸透圧の効果を高める塩を内水相に添加した際の影響を確認するため, 塩濃度を変化させMCの調製を行った。重合禁止剤の除去を行った壁材溶液 (DVB, TRIM, 818SX, ADV N, トルエン) からなる有機相と所定濃度のNaCl水溶液からなる内水相を

混合 (8,000rpm, 10min, 氷冷下) し, W/Oエマルジョンを形成した。続いて, PVA500およびSDSを溶解させ, 外水相を作製した。作製後の外水相は, ジャケット付きセパラブルフラスコ (容量300mL, 口内径80mm, VIDREX製) に移した。この外水相にW/Oエマルジョンを加え, テフロン製4枚羽根攪拌翼を使用して攪拌 (250rpm, 5h, 70°C) し, W/O/Wエマルジョンを形成した。その後, 窒素雰囲気下で攪拌を続け, 重合反応を進行させた。重合反応終了後, 調製したMCをろ過し, 洗浄 (蒸留水1L) を行い, 真空乾燥した後, 回収した。回収したMCの回収率を(1)式より算出した。

$$R [\%] = \frac{Q_{MC}}{W_{DVB} + W_{TRIM} + W_{ADV N} + W_{818SX}} \times 100 \quad (1)$$

ここで, Rは回収率 (%), Q_{MC} は回収したMCの重量 (g), W_{DVB} , W_{TRIM} , $W_{ADV N}$, W_{818SX} はそれぞれ仕込みのDVB, TRIM, ADV N, 818SX重量 (g) である。

多孔質構造を形成するために, 本研究では浸透圧効果を利用した。細孔の形成メカニズムとして, まず内水相と有機相を混合したW/Oエマルジョンを外水相に添加し, W/O/Wエマルジョンを形成した。内水相にNaClを添加しているため, 内水相と外水相では浸透圧差が生じ, 外水相から内水相に水が拡散する。水の拡散と並行して有機相中で重合反応が進行するため, MCの表面及び断面に細孔が形成し, 多孔質構造となる。

2.3 形態観察

走査型電子顕微鏡 (S-3000N, 日立製) (SEM) を用いて調製したMCの形態観察を行った。

2.4 平均粒子径測定

実体顕微鏡 (SMZ1500, Nikon製) で撮影した写真より200個のMCの粒子径を測り, 平均粒子径を算出した。

2.5 脱窒細菌の培養およびMCへの固定化

脱窒細菌の培養に使用した培地の組成を表2に示す。脱窒細菌は*Paracoccus denitrificans* NBRC13301を用い, 前培地5mL中で前培養 (30°C, 150rpm, 24h) を行った。その後, 調製したMCを加えた本培地100mL中に前培養液を加え, 本培養 (30°C, 150rpm, 24h) を行った。培養終了後, 生理食塩水で脱窒細菌固定化MCを洗浄した。培養には全て滅菌した器具を使用した。

表2 脱窒細菌の培養に使用した培地組成

	試薬	組成
前培地	ポリペプトン	1.0%(w/w)
	Bact Yeast Extract	0.2%(w/w)
	硫酸マグネシウム七水和物	0.1%(w/w)
本培地	ポリペプトン	4.0%(w/w)
	Bact Yeast Extract	0.8%(w/w)
	硫酸マグネシウム七水和物	0.4%(w/w)

2.6 連続回分脱窒反応試験

図2に脱窒反応試験の模式図を示す。脱窒細菌固定化MCの脱窒能力を検討するために、図2に示す装置を用いて連続回分脱窒反応試験を行った。脱窒反応条件として、脱窒細菌固定化MCを初期硝酸性窒素濃度20ppmに調整した合成模擬汚染水300mLおよび無機炭素源である炭酸水素ナトリウム0.3gの入ったリアクター内に加え、脱窒反応試験(30℃, 150rpm)を行った。電子供与体として水素ガスを使用し、100mL/minで150min, 24hおきにバブリングを行った。なお、合成模擬汚染水はあらかじめ、30mL/minの条件で30minバブリングし、溶存水素を高めた状態で脱窒反応試験を開始した。脱窒反応試験中は溶存酸素計(SevenGo pro, メトラートレド株式会社製)を用いて溶存酸素を、溶存水素計(KM2100-DH, 共栄電子研究所製)を用いて溶存水素を、pHメーター(HM-25R, 東亜ディーケーケー株式会社製)を用いてpHを測定した。脱窒反応試験中の模擬汚染水は経時的にサンプリングし、メンブレンフィルターを用いてろ過した後、イオンクロマトグラフィー(日立L-2470型 電気伝導度検出器 日立製)にて硝酸性及び亜硝酸性窒素濃度を測定し、脱窒能力を評価した。

96h経過後、リアクター内の模擬汚染水を取り除き、新たな模擬汚染水をリアクター内に加え上記と同様の手順で脱窒反応試験を行った。また、脱窒細菌固定化MCの活性が低下した脱窒反応試験4サイクル後、脱窒細菌固定化MCをリアクターから回収し、本培養液を用いて再培養を行った。その後、再培養後の脱窒細菌固定化MCを用いて脱窒反応試験を続行した。

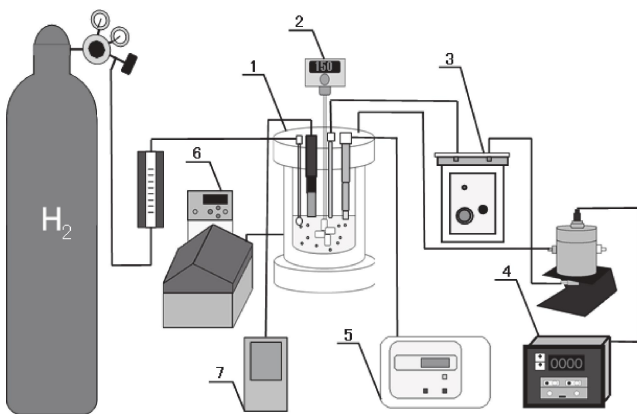


図2 リアクターの模式図 (1) リアクター, (2) 攪拌機, (3) ペリスタポンプ, (4) 溶存水素計, (5) pHメーター, (6) 恒温装置, (7) 溶存酸素計

3. 結果および考察

3.1 MCの基礎特性評価

NaCl濃度変化がMCの形態に及ぼす影響について検討を

行った。表3にMCの特性評価、図3にMCのSEM観察写真、図4に平均粒子径測定結果を示す。NaClを添加したすべての条件で、MCの表面および断面に細孔を確認することができた。NaClを添加していないMCは、表面に細孔が見られなかった。この結果から、浸透圧効果によってMCの細孔は形成されたと考えられる。また、NaCl濃度の増加に従って、平均粒子径は増加した。平均粒子径の増加は、NaCl濃度の増加に伴う浸透圧効果の増大によると考えら

表3 MCの特性評価

NaCl濃度 [mol/L]	0	1.5	3.0	4.5	6.0
回収量 [g]	7.1	7.2	6.9	7.0	7.1
回収率 [%]	86.3	88.5	84.1	84.1	86.3
平均粒子径 [μm]	199	208	303	512	597
算出比表面積 [m ² /g]	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01
実測比表面積 [m ² /g]	0.2	10.9	11.0	9.8	10.4
相対比表面積 [-]	6	378	515	731	829
圧縮強度 [kgf]	0.75	0.50	0.21	0.11	0.09

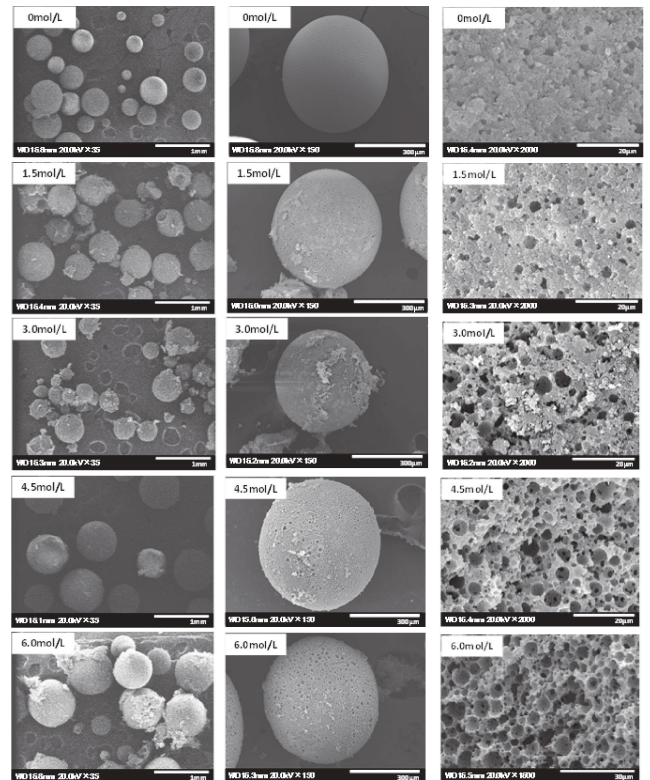


図3 MCのSEM写真 (左:全体, 中央:拡大, 右:断面)

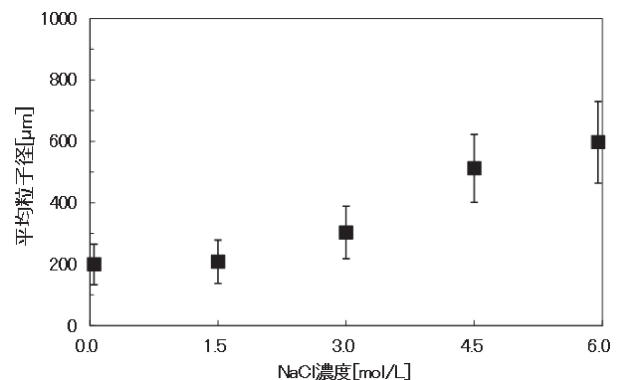


図4 塩濃度と平均粒子径の結果

れる。浸透圧の効果により、外水相からW/O/Wエマルジョン液滴内に水が拡散し、エマルジョンが膨潤する。エマルジョンが膨潤した状態のまま重合反応が進行し、より大きな粒子を形成したと考えられる。

3.2 連続回分脱窒反応試験による脱窒細菌固定化MCの脱窒能力評価

最も塩強度の高い条件 (NaCl濃度1.5mol/L) で調製したMCに脱窒細菌の固定化を行い、その後の連続回分脱窒反応試験に用いた。図5に連続回分脱窒反応試験結果を示す。

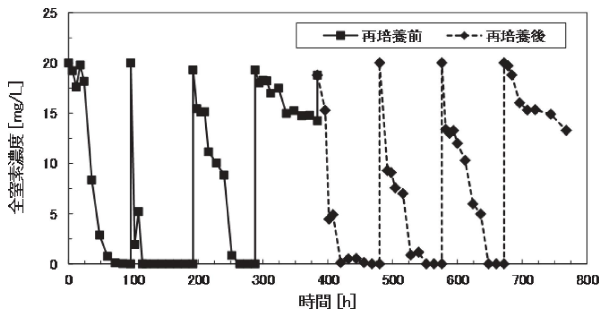


図5 連続回分脱窒反応試験結果 (8サイクル)

脱窒反応試験1サイクル目においては、約72hで硝酸性及び亜硝酸性窒素を完全に還元することができた。2サイクル目においては、約18hで完全に還元できた。この要因として、固定化されている脱窒細菌が硝酸性及び亜硝酸性窒素の存在下に順応し、脱窒能力が高まったことが考えられる。しかし、3サイクル目では還元時間が約72hとなり、4サイクル目においては96h以内の脱窒処理が不可能となった。これは、連続的に使用したことによる、活性の低下および生菌数の減少が原因であると考えられる。しかし、活性の低下した4サイクル後に再培養を行うことで再び硝酸性及び亜硝酸性窒素を完全に処理することが可能となった。また、5サイクル目(再培養後1回目)の汚染物質の処理時間は、1サイクル目に比べ早くなっていることが確認できた。これは、連続使用により硝酸性及び亜硝酸性窒素の存在下に適応し、脱窒能力の高まった脱窒細菌が増殖したためだと考えられる。また、試験後の脱窒細菌固定化MCは壊れることなく形状を維持できていることが確認できた。本実験の結果より、脱窒反応試験を3サイクル

終えた時点で培養を行うことで、活性を落とさずに長期間、脱窒細菌固定化MCを使用できると考えられる。

4. まとめ

浸透圧効果を利用して多孔質構造型MCを調製した。脱窒細菌を固定化したMCを用いて硝酸性窒素を含む模擬汚染水からの脱窒反応試験を行った。脱窒細菌固定化MCの脱窒能力を評価した結果、リサイクル可能であることを確認した。

参考文献

- 1) 明賀春樹, 角田ふで子, 楊 敏, 三宅酉作, 眞柄泰基; 水素酸化脱窒細菌の比脱窒速度に及ぼす諸因子の検討, 水環境学会誌, 17-10 (1994), 669-675.
- 2) M. Yoshida, E. Mardliyati, D.Tenokuchi, Y. Uemura, Y. Kawano, Y. Hatate; Structural control of core/shell polystyrene microcapsule-immobilized microbial cells and their application to polymeric microbioreactor, J. Appl. Polym. Sci., 89 (2003), 1966-1975.
- 3) D. Tenokuchi, M. Yoshida, Y. Uemura, C. Hatanaka, Y. Hatate; Preparation of core/shell polystyrene microcapsule with denitrifying bacteria and an examination of their denitrification property, ITE Lett., 5-2 (2004), 31-36.
- 4) K. Ohkubo, M. Yohsida, Y. Uemura, C. Hatanaka, Y. Hatate; Cross-linked Poly (vinyl alcohol) Microcapsule Immobilized Denitrifying Bacteria and Application to Denitrification of Groundwater, ITE Lett., 5-6 (2004), 589-593.
- 5) D. Tenokuchi, M. Yoshida, C. Hatanaka, E. Toorisaka, Y. Hatate; Core-shell microbioreactor microencapsulated denitrifying bacteria for nitrate-nitrogen treatment, Polymer Bulletin, 56 (2006), 275-284.
- 6) T. Takei, M. Yoshida, N. Hayashi, Y. Ohzuno, C. Hatanaka, E. Toorisaka, Y. Hatate; Core-shell microbioreactor encapsulated denitrifying bacteria for nitrate-nitrogen treatment, ITE-IBA Letters on Batteries, New Technologies & Medicine, 1-1 (2008.2), 60-64.
- 7) T. Takei, K. Ikeda, H. Ijima, K. Kawakami, M. Yoshida, Y. Hatate; Preparation of polymeric microcapsules enclosing microbial cells by radical suspension polymerization via water-in-oil-in water emulsion, Polymer Bulletin, 65 (2010), 283-291.
- 8) S. Kiyoyama, K. Shiomori, M. Yoshida; Extraction of Palladium(II) with through-hole type microcapsules containing trioctylamine, Ars separatoria acta., 7 (2009/2010), 49-60.