

# 脱窒細菌固定化マイクロカプセルを利用した バイオレメディエーション技術の開発

## DEVELOPMENT OF BIOREMEDIATION TECHNIQUE UTILIZING MICROCAPSULES IMMOBILIZED DENITRIFYING BACTERIA

樋之口大作\* 吉田昌弘\*\* 上村芳三\*\* 幡手泰雄\*\* 畑中千秋\*\*\*

Daisaku TENOKUCHI, Masahiro YOSHIDA, Yoshimitsu UEMURA, Yasuo HATATE  
and Chiaki HATANAKA

Nitrate nitrogen concentration in the groundwater is increasing year by year. The contaminated groundwater with nitrate nitrogen is well-known to cause serious problems for human- or animal- health. Damages of nitrate nitrogen are mainly methemoglobinemia (cyanosis) and carcinogenic risk. In this study, autotrophic denitrifying bacteria (*Paracoccus denitrificans*) were immobilized into the core/shell polymethylmethacrylate (PMMA) microcapsule used for denitrification. The core/shell PMMA microcapsules immobilized denitrifying bacteria were prepared by the combination of both phase separation and solvent evaporation methods. The particle diameters of the microcapsules were of about from 200 to 500 $\mu$ m. The thickness of PMMA shell was of about 30 $\mu$ m, and the shell had porous structures. In the denitrification experiment, nitrate- or nitrite- nitrogen could be completely reduced to nitrogen gas in the present hydrogen gas at about 18 hours. From this result, we demonstrated that the immobilized denitrifying bacteria have a function to treat the water polluted with nitrate nitrogen.

**Key words:** autotrophic denitrifying bacteria, core/shell microcapsule, denitrification, nitrate nitrogen, *Paracoccus denitrificans*

### 1. 緒言

近年、有機塩素化合物を代表とする各種化学物質による地下水や土壌の汚染が注目されている。飲料用の地下水に関しては、硝酸性窒素汚染が深刻な問題となっている<sup>6)</sup>。飲料水中に硝酸性窒素が多量に含有することによる、主たる人体への健康被害としては、メトヘモグロビン血症と発癌リスクが挙げられる<sup>7)</sup>。また、家畜のメトヘモグロ

ビン血症による死亡例も知られており、家畜へのリスクも懸念されている。河川の多い我が国では、地下水の利用は25~30%であるが、欧米では50%を超えることから、この問題は欧米でより深刻化している現状にあり、世界レベルの問題であるといえる。河川や湖沼などの表流水汚染の進行ともあいまって、今後、水源としての地下水への依存率は下がることはないと考えられ、地下水保全の重要性はさらに高まると考えられる。硝酸性窒素の汚染原因は、肥料・家畜の糞尿などに含まれる窒素成分であり、これが地下浸透して硝化細菌あるいは化学的に酸化され硝酸性窒素となり、地下

2003年8月31日受理

\* 博士後期課程物質生産工学専攻

\*\* 応用化学工学科

\*\*\* 北九州工業高等専門学校

水を汚染する<sup>8)</sup>。地下水中に浸透した硝酸性窒素は、現在の浄水場では処理することが不可能な物質であり、今すぐ原因を絶ったとしても20～50年間は汚染が継続すると言われており、極めて厄介な有害物質である。

現在、硝酸性窒素処理技術として、主にイオン交換法や逆浸透膜法等が採用されているが、ランニングコストが高く、分離処理法であるため、再生廃液や濃縮液中の硝酸性窒素の後処理が問題となる<sup>4)</sup>。硝酸性窒素を窒素ガスまで分解する処理法としては、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<sup>5)</sup>。従属栄養性脱窒法は、有機炭素源の供給が必要であり、このことは水質を悪化させる原因となる。そこで、本研究では水素ガス等の無機物の供給が必要であるが、有機炭素源の供給を必要としない独立栄養性脱窒法を選択した<sup>1)</sup>。生物化学的脱窒法は、ランニングコストが安いという特長も有するが、メンテナンスが困難であり、脱窒細菌が流出した場合の二次的環境汚染などの問題がある。これらの問題点を克服するために、脱窒細菌をマイクロカプセル中に固定化する方法がある。一般的な方法として、アルギン酸カルシウムなど粒径数mmのゲル担体を用いるものがある。しかし、これらの天然高分子を用いたマイクロカプセルは、化学的・機械的強度がなく脱窒細菌の漏洩や長時間使用によるカプセルの崩壊などの問題がある。これらの問題点を克服するためには、化学的・機械的強度がある合成高分子を用いたマイクロカプセルが必要となる<sup>2,3)</sup>。

本研究では、独立栄養性脱窒細菌を固定化したコア/シェル型ポリメチルメタクリレート (PMMA) マイクロカプセルを調製し、その脱窒能力の基礎的実験の検討を行ったので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 培養

脱窒細菌は *P. denitrificans* IFO13301 を用いた。脱窒細菌をポリペプトン 1.0wt%、酵母エキス 0.2wt%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1wt% からなる培養液 5ml 中で前培養 (30°C, 150rpm, 10h) した後、この前培養液 2ml を前培養時の4倍濃度の培養液に、それぞれ接種して本培養 (30°C, 150rpm, 18h) した。その後、遠心分離機 (8000rpm, 5min) により集菌し、得られた脱窒細菌を 0.9wt% 生理食塩水で洗浄した後、再び遠心分離機で集菌する操作を3回繰り返した。

### 2.2 脱窒細菌固定化コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルの調製

単核中に脱窒細菌を固定化したコア/シェル型 PMMA マイクロカプセルの調製を行った。図1に脱窒細菌固定化コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルの調製スキームを示す。コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルは、相分離法と液中乾燥法を併用することにより調製した。操作手順を以下に示す。

ジクロロメタン [低沸点高分子良溶媒] 20g、PMMA [カプセル壁材] 2g、ポリエチレングリコール (PEG) [カプセル親水性壁材] 0.6g、ソルビタンモノオレート (SPAN80) [エマルジョン安定剤] 0.6g からなる有機相とポリペプトン 4wt%、酵母エキス 0.8wt%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4wt% からなる 3wt% アルギン酸ナトリウム水溶液 4g [高沸点高分子非溶媒]、脱窒細菌 2g (wet 質量) からなる内水相とを混合し、この混合液を蒸留水 500g、ポリビニルアルコール (PVA) [分散安定剤] 5g、第三リン酸カルシウム (TCP-10U) [分散安定剤] 250g

からなる外水相に添加して 200rpm, 5~10°Cで 1h 攪拌し、W/O/W エマルジョンを調製した。次に 200rpm, 300hPa, 30°Cで 3h 液中乾燥を行い、ジクロロメタンを除去した。次に、0.5M 塩酸で TCP-10U を除去し、ろ過して回収した PMMA マイクロカプセルを蒸留水で洗浄した。その後、単核中の菌体量を増加させるために、PMMA マイクロカプセルを本培養液 100ml で培養 (30°C, 150rpm, 24h×3 回) した。この培養の際に、単核構成物質であるアルギン酸ナトリウム水溶液中のポリペプトン、酵母エキス、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O は、脱窒細菌増殖の手助けになるものと考えられる。また、粘性の高い 3wt%アルギン酸ナトリウム水溶液を用いることにより、脱窒細菌を均等に分散させることができる。そして、300hPa, 30°Cの条件下で液中乾燥を行うことにより、液中乾燥時間を短縮することができ、脱窒細菌に対する有機溶媒からの影響を少なくできる。

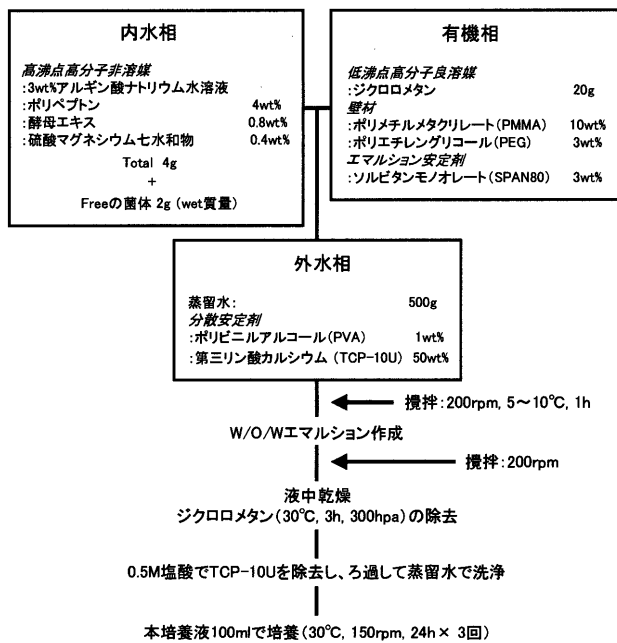


図1 脱窒細菌固定化コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルの調製スキーム

### 2.3 Free の脱窒細菌及び脱窒細菌固定化コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルを用いた脱窒実験

実験項 2.1 で培養した Free の脱窒細菌及び実験項 2.2 で調製した PMMA マイクロカプセルを用いて脱窒能力の評価を行った。

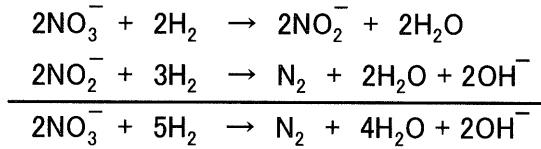
脱窒実験は、Free の脱窒細菌 3 g (wet 質量) 及び PMMA マイクロカプセル 6 g (wet 質量) を、NaNO<sub>3</sub> 0.121g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2mg/l からなる硝酸性窒素濃度 20mg/l asN の模擬水 100ml 中に、分散させることにより行った。Free の脱窒細菌では、30°C, 60rpm の振とう恒温槽中で、水素ガス 10ml/min の条件下で、PMMA マイクロカプセルでは、30°C, 100rpm の振とう恒温槽中で、水素ガス 30ml/min の条件下で脱窒実験を行った。また、模擬水は予め水素ガスで飽和させてある。硝酸・亜硝酸性窒素はイオンクロマトグラフィー (SM-8020, 東ソー) で、pH は pH メーター (HM-30G, 東亜) を用いて分析した。PMMA マイクロカプセルを用いた脱窒実験では、1 回目の脱窒実験後の PMMA マイクロカプセルを回収し蒸留水で洗浄後、再び硝酸性窒素濃度 20mg/l as N の模擬水 100ml 中に分散させ繰り返し使用する脱窒実験を 2 回行った。また、脱窒処理前後の模擬水の透過率を紫外可視分光光度計 (UV-1650PC, 島津) で分析した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 脱窒細菌 (*P. denitrificans* IFO13301)

図 2 に、培養によって得られた脱窒細菌 (*P. denitrificans* IFO 13301) の SEM 写真を示す。脱窒細菌は、約 1 μm の大きさであった。増殖最適温度は 30~36°C、最適 pH は 7~7.5 であり、アルカリ領域では pH の影響は少なく、中性からアルカリ性で最もよく脱窒が行われるとされている。水

素ガスを水素供与体に用いた場合の脱窒反応の化学量論的な反応式を以下に示す。



硝酸性窒素が還元されることにより、中間生成物として亜硝酸性窒素が生成される。また、最終的に生成される水酸化物イオンの影響で、脱窒反応後の処理液の pH は増加する。

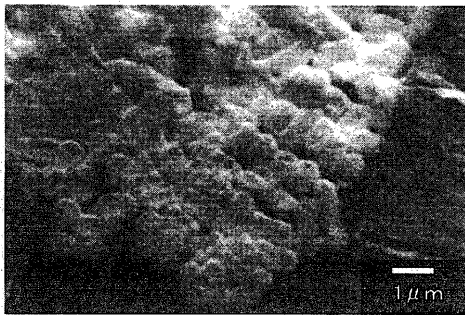


図 2 脱窒細菌 (*P. denitrificans* IFO13301)

### 3.2 脱窒細菌固定化コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルの SEM 観察結果

図 3 に脱窒細菌固定化コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルの SEM 写真を示す。粒径は、約 200~500 $\mu\text{m}$  であり、外殻は約 30 $\mu\text{m}$  で無数の細孔があり多孔質構造をしていることを確認できた。また、脱窒細菌を単核中に固定化していることを確認できた。SEM 観察の際に乾燥させるため、単核中の脱窒細菌は PMMA マイクロカプセル内表面に付着しているが、実際には、水中で単核中を自由に活動できていると考えられる。また、外殻に細孔があることで、基質となる硝酸性窒素及び水素ガスの拡散が促進され、処理速度の向上につながるものと考えられる。

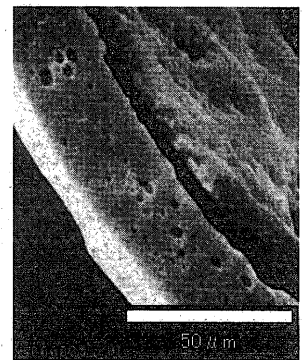
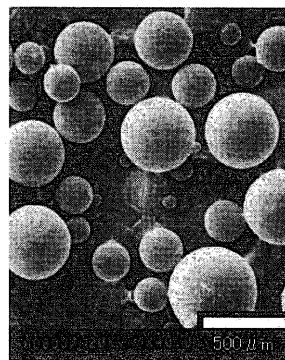
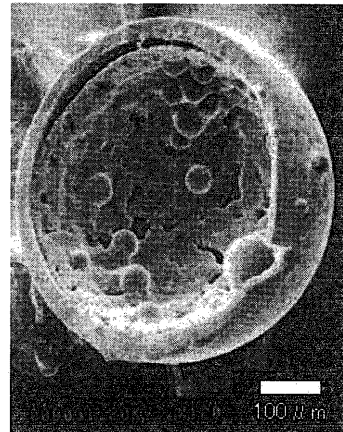


図 3 脱窒細菌固定化コア/シェル型 PMMA マイクロカプセルの SEM 写真

### 3.3 Free の脱窒細菌を用いた脱窒実験結果

図 4 に Free の脱窒細菌を用いた脱窒実験結果を示す。硝酸・亜硝酸性窒素はともに約 60min で処理した。亜硝酸性窒素は、約 5mg/l asN まで上昇し、その後減少した。

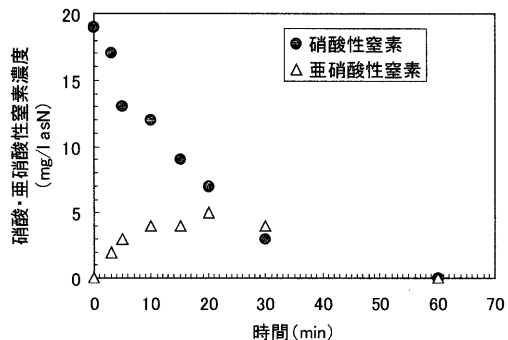


図 4 Free の脱窒細菌を用いた脱窒実験結果

### 3.4 脱窒細菌固定化 PMMA マイクロカプセルを用いた脱窒実験結果

脱窒細菌固定化 PMMA マイクロカプセルを用いた脱窒実験（1～3回）の硝酸性窒素濃度経時変化を図5、亜硝酸性窒素濃度経時変化を図6、pH経時変化を図7にそれぞれ示す。1回目では、硝酸性窒素は約9hで、亜硝酸性窒素は約50hで処理した。2回目では、硝酸・亜硝酸性窒素ともに約21hで処理し、中間生成物である亜硝酸性窒素の生成を抑制した。3回目では、硝酸性窒素は約18hで処理し、亜硝酸性窒素は全く生成されなかった。1～3回目までの結果から、PMMA マイクロカプセルを脱窒実験に用いた初期段階では、脱窒細菌内に存在する硝酸性窒素還元酵素が活性化しており、活発に亜硝酸性窒素に還元するが、亜硝酸性窒素還元酵素は活性化していないために亜硝酸性窒素の処理速度が遅いものと考えられる。繰り返し使用することで、亜硝酸性窒素還元酵素が活性化し、活発に亜硝酸性窒素を還元するものと考えられる。また、図7に示すようにpHは、亜硝酸性窒素の生成が抑制されるにつれて、平衡に達するまでの時間が短くなった。

表1に脱窒処理前後の模擬水の透過率結果を示す。培養直後のPMMA マイクロカプセルを用いた1回目の脱窒実験では模擬水が濁り、繰り返し使用すると模擬水の濁りが無くなっていくことが分かる。このことから、脱窒細菌の漏洩よりも、PMMA マイクロカプセル中の培養液の残りが模擬水を懸濁させる一番の原因であると考えられる。PMMA マイクロカプセル中の脱窒細菌が失活した場合は、培養液で脱窒細菌を再生させる必要があるため、培養後のPMMA マイクロカプセルの洗浄方法を工夫する必要がある。

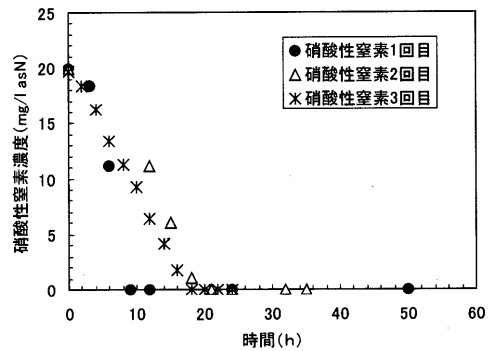


図5 PMMA マイクロカプセルを用いた脱窒実験の硝酸性窒素濃度経時変化

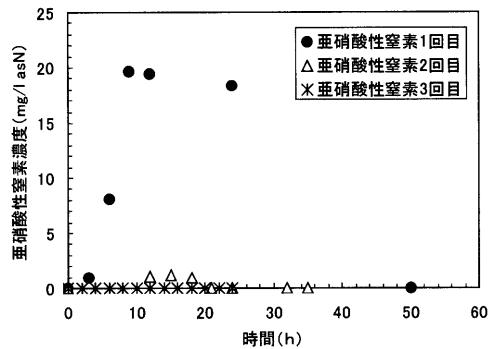


図6 PMMA マイクロカプセルを用いた脱窒実験の亜硝酸性窒素濃度経時変化

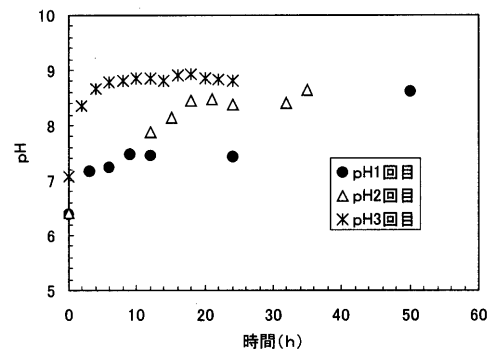


図7 PMMA マイクロカプセルを用いた脱窒実験のpH経時変化

表1 脱窒処理前後の模擬水の透過率結果

UV(660nm)	1回目	2回目	3回目
透過率(%)	98.743(0h)	92.175(0h)	97.705(0h)
	45.752(50h)	60.791(37h)	73.987(24h)

#### 4. 結言

相分離法と液中乾燥法を併用する本調製方法により、脱窒細菌を単核中に固定化したコア/シェル型 PMMA マイクロカプセルを調製することができた。この PMMA マイクロカプセルは、硝酸・亜硝酸性窒素を完全に処理することができ、繰り返し使用することで中間生成物である亜硝酸性窒素の生成を完全に抑制することができた。また、PMMA マイクロカプセルの崩壊は確認されなかった。これらの結果より、PMMA マイクロカプセル中の脱窒細菌が失活した場合、培養液で再生することで半永久的に脱窒処理可能な浄水処理システムの構築が期待される。

#### 参考文献

- 1) D. Tenokuchi, M. Yoshida, Y. Uemura, C. Hatanaka and Y. Hatate; "Preparation of core/shell microcapsules with denitrifying bacteria and an examination of their denitrification Property", *Biotechnology Letters*, in press (2003)
- 2) E. Mardriyati, M. Yoshida, Y. Kawano, Y. Uemura and Y. Hatate; "Preparation of Polystyrene Microcapsules with a Hollow Core for Cell Immobilization Matrix", *ITE Letters on Batteries. New Technologies and Medicine*, 1(4), pp.144-150 (2000)
- 3) M. Yoshida, E. Mardriyati, D. Tenokuchi, Y. Uemura, Y. Kawano and Y. Hatate; "Structural Control of Core/Shell Polystyrene Microcapsule-Immobilized Microbial Cells and Their Application to Polymeric Microbioreactor", *Journal of Applied Polymer Science*, 89, pp.1966-1975 (2003)
- 4) M. Yoshida, D. Tenokuchi, Y. Uemura, S. Yokoyama, H. Myoga, C. Hatanaka and Y. Hatate; "Denitrification of ground water utilizing core/shell microcapsule incorporated autotrophic organism", *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 53, pp.222-224 (2002)
- 5) 樋之口大作, 吉田昌弘, 上村芳三, 幡手泰雄, 畑中千秋; "脱窒細菌を固定化したコア/シェル型マイクロカプセルの調製とその脱窒能力の検討", *鹿児島大学工学部研究報告*, 44, pp.51-56 (2002)
- 6) 吉田昌弘, 上村芳三, 横山勝一, 畑中千秋, 幡手泰雄; "環境修復と有用物質生産 -環境問題へのバイオテクノロジーの利用- 第8章 固定化脱窒細菌を利用した地下水の硝酸性窒素除去技術の開発", *シーエムシー出版*, pp.111-119 (2003)
- 7) 吉田昌弘, エティック マルドリヤティ, 樋之口大作, 上村芳三, 河野恵宣, 畑中千秋, 幡手泰雄; "微生物を高効率で固定化可能なコア/シェル型機能性マイクロカプセルの開発", *ケミカルエンジニアリング*, 46(11), pp.34-41 (2001)
- 8) 吉田昌弘, 上村芳三, 横山勝一, 畑中千秋, 幡手泰雄; "固定化脱窒細菌を利用した地下水の硝酸性窒素除去技術の開発", *エコインダストリー*, 8, pp.24-32(2001)