

脱窒細菌を固定化する架橋 poly(vinyl alcohol) ゲルマイクロカプセルの調製と脱窒能力の評価

大久保 一心* 吉田 昌弘** 上村 芳三** 幡手 泰雄** 畑中 千秋***

PREPARATION OF CROSS-LINKED POLY(VINYL ALCOHOL) GEL MICROCASULE IMMOBILIZED DENITRIFYING BACTERIA AND THEIR EVALUATION OF DENITRIFICATION ABILITY

Kazuhito OHKUBO, Masahiro YOSHIDA, Yoshimitsu UEMURA, Yasuo HATATE
and Chiaki HATANAKA

Recently, nitrate-nitrogen concentration in groundwater increases gradually. Drinking water including nitrate-nitrogen is possible to cause several human- and animal- health damages. Therefore, efficient denitrification methods have been investigated from all angles. In this study, autotrophic denitrifying bacteria, *Paracoccus denitrificans* IFO 13301 using H₂ gas as a hydrogen donor was immobilized in microcapsules composed of cross-linked poly(vinyl alcohol) gel. The efficient microencapsulation method was reported and the denitrification ability utilizing the microcapsules was evaluated.

Keywords : Nitrate-nitrogen, Groundwater, Denitrification, Autotrophic denitrifying bacteria,
Cross-linked poly(vinyl alcohol) gel

1. 緒言

現在全国的な下水道整備が進み、我が国の水質汚濁状況は相対的には改善傾向にある。しかし、近年、有機塩素系化合物をはじめ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。特に地下水に関しては硝酸性窒素による汚染が進

行・拡大し、世界中で深刻な社会問題として据えられている。飲料水中に硝酸性窒素が高濃度に含有する場合、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ガンリスクが挙げられる。また家畜のメトヘモグロビン血症による死亡例も報告されており、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、飲料水としての地下水の利用率は 25~30% であるが、欧米では 50% を超えることからより深刻化しており、世界レベルの問題である。我が国の表流水汚染の進行状況を考えると、今後、飲料水源としての地下水

2004 年 8 月 日受理

* 博士前期課程応用化学工学専攻

** 応用化学工学科

*** 北九州工業高等専門学校

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。この硝酸性窒素による地下水汚染の原因は窒素肥料や家畜糞尿中の窒素成分であり、これが土壤中で硝化細菌あるいは化学的に酸化され硝酸性窒素となり、地下水を汚染する。地下水に浸透した硝酸性窒素は現在の浄水技術では処理することが不可能な物質であり、今すぐに原因を絶ったとしても20～50年間は汚染が継続する極めて厄介な有害物質である。

水中からの硝酸性窒素除去技術として、微生物を利用した生物化学的脱窒法がある。この方法は微生物の呼吸を利用して、有害な硝酸性窒素を無害の窒素ガスへと還元除去する方法であり、従属栄養性脱窒法と独立栄養性脱窒法とに大別される。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。本研究では、無機物の供給を必要とする有機物の供給が不要である独立栄養性脱窒法を選択した。生物化学的脱窒法は、ランニングコストが安いというメリットを有するが、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の危険性がある。これらの問題を解決するために脱窒細菌をマイクロカプセル内に固定化する方法がある。この場合マイクロカプセルに要求される性質としては、物理的・化学的安定性および、親水性・生体適合性が挙げられる。アルギン酸カルシウムなどの天然高分子ゲルを使用した方法は親水性および生体適合性に優れるが物理的・化学的安定性に乏しく長期間の使用によるカプセル崩壊などの問題が指摘される。一方、ポリスチレンなどの合成高分子を用いたマイクロカプセルは物理的・化学的安定性に優れるが親水性および生体適合性の面から高い処理能力が期待できない。

したがって、本研究では物理的・化学的安定性および、親水性・生体適合性を併せ持つ架橋ポリビニルアルコール（以下、PVAと略記）ゲルに注目した。架橋PVAゲルで構成されたコア/シェル型のマイクロカプセル内に独立栄養性脱窒細菌 *Paracoccus denitrificans* を固定化するための調製条件の最適化および、本マイクロカプセルを用いた脱窒試験について検討したのでここに報告する。

2. 実験

2.1 培養

脱窒細菌は *P.denitrificans* IFO13301 を使用した。脱窒細菌をポリペプトン 1.0wt%、イーストエキス 0.2wt%、硫酸マグネシウム 0.1wt% からなる培養液 5ml 中で前培養（振とう恒温槽：30℃、150rpm、24h）した。この前培養液 2ml を前培養時の 4 倍濃度の培養液 100ml に分注し本培養（ロータリーシェーカー：30℃、150rpm、24h）を行った。その後、遠心分離（8000rpm、5min）により脱窒細菌を回収し、0.9wt%生理食塩水で洗浄した後再び遠心分離機で回収する操作を3回繰り返し、得られた脱窒細菌を以下の操作で使用した。

2.2 脱窒細菌固定化架橋PVAゲルマイクロカプセルの調製

脱窒細菌を固定化したコア/シェル型の架橋PVAゲルマイクロカプセルの調製を行った。本マイクロカプセルは、マイクロカプセル壁材であるPVAのエマルジョンと、PVAの架橋剤であるグルタルアルデヒドのエマルジョンを調製し、それらを混合してPVA粒子と架橋剤粒子が衝突した界面で架橋反応を進行させゲル化させることで調製した。図1に脱窒細菌固定化架橋PVAゲルマイクロカプセルの調製スキームを示した。

まず、アルギン酸ナトリウム(Alg)水溶液に脱窒細菌を分散させ、PVA水溶液と混合した。この混合溶液を、2,2,4-トリメチルペンタン(イソオクタン)とソルビタンモノオレエート(span80) [界面活性剤] からなる有機相に分散させ w/o エマルジョン I とした。またグルタルアルデヒド(GA) [架橋剤] と濃塩酸(HCl) [架橋反応触媒] からなる水相を上記と同様の有機相に分散させ w/o エマルジョン II とした。この w/o エマルジョン II を w/o エマルジョン I に添加し、昇温してPVAとグルタルアルデヒドの架橋反応を進行させマイクロカプセルを調製した。その後桐山ロートによりマイクロカプセルを回収した後、ヘキサンと蒸留水にて洗浄し脱窒細菌固定化架橋PVAゲルマイクロカプセルとした。

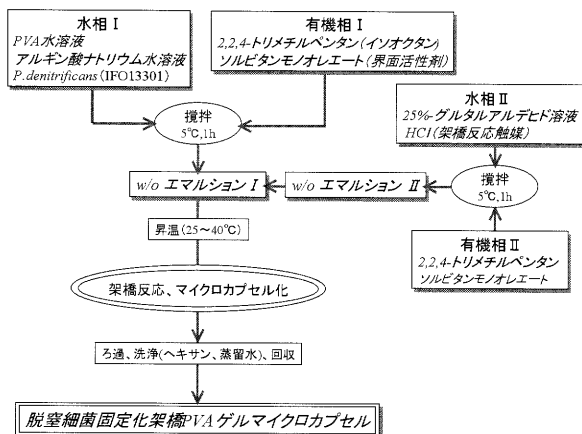


図1 脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセル調製スキーム

2.3 回分脱窒試験

2.3.1 Free 脱窒細菌を使用した回分脱窒試験

2.1 節で培養した脱窒細菌を用いて回分脱窒試験を行い、脱窒細菌の仕込み量による脱窒能力の違いについて検討した。

脱窒試験には処理水として、蒸留水 II に対して硝酸ナトリウム 0.121g とリン酸二水素カリウム 0.2mg を溶解させた、硝酸性窒素濃度 20mg/l の模擬地下水を使用した。この処理水 100ml に Free 脱窒細菌を 1g および 3g 仕込み、30℃、100rpm の振とう恒温槽中で、水素ガスを 10ml/min で供給して脱窒試験を行った。処理水は予め水素ガスで飽和させたものを使用した。処理水を経時的にサンプリングして、硝酸性窒素と亜硝酸性窒素濃度をイオンクロマトグラフィー (SM-8020、東ソー) を用いて測定し脱窒能力について検討した。

2.3.2 脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセルを使用した回分脱窒試験

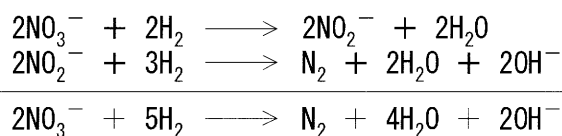
2.2 節で調製した脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセルを用いて脱窒試験を行った。脱窒試験には 2.3.1 項と同様の模擬地下水を使用し、模擬地下水 100ml に対して脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセル 6g を仕込み、30℃、100rpm の振とう恒温槽中で水素ガスを 30ml/min で供給し脱窒試験を行った。分析方法に関しても

2.3.1 項と同様の方法で行い脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセルの脱窒能力について検討した。

2. 実験結果および考察

3.1 脱窒細菌 (*P. denitrificans* IF013301)

図 2 に 2.1 節によって得られた独立栄養性脱窒細菌 (*P. denitrificans* IF013301) の SEM 写真を示した。SEM 観察の結果、脱窒細菌の大きさは約 1μm であった。増殖最適温度は 30~36℃、最適 pH は 7~7.5 で、中性から塩基性領域で最もよく脱窒が行われているとされている。水素ガスを水素供与体としたときの脱窒反応の化学量論式を以下に示した。



硝酸イオンが窒素ガスへと還元される過程で中間生成物として亜硝酸イオンが生成される。

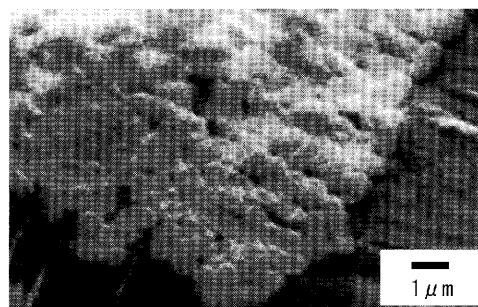


図2 脱窒細菌 (*P. denitrificans* IF013301)

3.2 脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセルの調製

種々の条件で脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセルを調製し、カプセル調製条件の最適化について検討した。表 1 にマイクロカプセルの調製条件および調製結果を示した。調製条件 A,B,C において良好なマイクロカプセルが調製可

能であった。PVA に対する Alg の比率が大きい調製条件 D,E,F においては、調製過程で粒子同士が凝集してしまいカプセル化することができなかった。以上のことから、PVA に対する Alg の量が増加すると粒子の粘度が増大し、凝集し易くなる傾向がみられた。良好なマイクロカプセルが調製可能であった条件 A,B,C を比較すると、得られた粒子の形状や大きさはほぼ等しかったことから、界面活性剤や GA (架橋剤)、HCl (架橋反応触媒) の添加量はカプセル形状に影響をおよぼさないことを確認した。条件 B においては調製後に未反応の GA が確認できた。また HCl は微生物に対して毒性が強いため使用量を低減させた方が好ましい。したがって、界面活性剤や GA、HCl の添加量が少なく、良好なカプセルが得られた調製条件 C が最適な調製条件であると考察できる。

調製したマイクロカプセルを培養することで単核中の脱窒細菌が増殖することを確認した。また、培養後のマイクロカプセル表面に脱窒細菌の存在が確認できなかったことからマイクロカプセル内部からの脱窒細菌の漏洩は無いことも確認した。

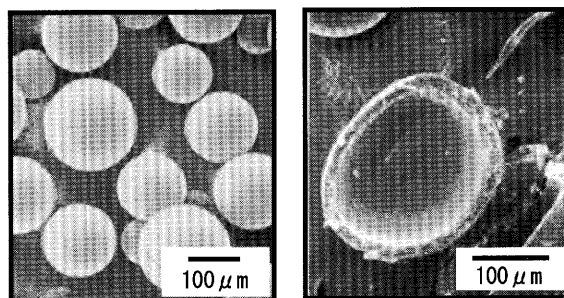


図3 脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセル (調製直後)

表1 架橋 PVA ゲルマイクロカプセル調製条件

	PVA 濃度 *1 [wt%]	PVA 質量 *2 [g]	Alg 濃度 *3 [wt%]	Alg 質量 *4 [g]	界面 活性剤 [g]	GA [ml]	HCl [g]	攪拌 速度 [rpm]	カプセル 調製結果
A	3	100	3	5	6	10	4	175	◎
B	3	100	3	5	8	20	3	175	◎
C	3	100	3	5	4	10	3	175	◎
D	3	50	4	5	4	5	2	200	×
E	5	50	4	5	4	5	2	175	×
F	5	50	3	10	4	10	2	200	×

*1: 水相1におけるPVA水溶液濃度 *2: 水相1で使用するPVA水溶液濃度*1の重量
*3: 水相1におけるAlg水溶液濃度 *4: 水相1で使用するAlg水溶液濃度*3の重量

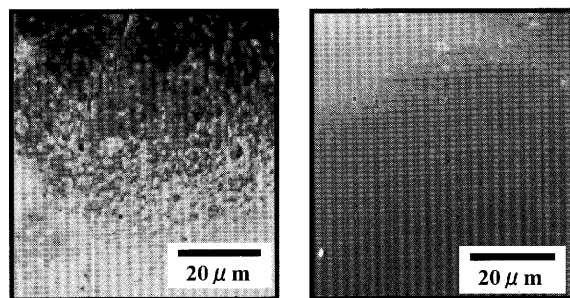


図4 脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセル (5日間の培養後 右: カプセル表面)

3.3 脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセルの SEM 観察結果

図3に調製した脱窒細菌固定化架橋PVAゲルマイクロカプセルの SEM 写真を示した。調製したマイクロカプセルは直径 100~200 μm の球状粒子であり、外壁の膜厚は 20 μm 程度であった。調製直後のマイクロカプセル内に脱窒細菌の存在はほとんど確認できなかった。そこで、調製したマイクロカプセルを 2.1 項の本培養でを使用した培養液内で培養することでカプセル単核中に存在する脱窒細菌を増殖させた。図4に培養後のマイクロカプセルの SEM 写真を示した。5日間の培養後のマイクロカプセル内部には微生物膜が成長しており、

3.4 Free 脱窒細菌を用いた回分脱窒試験結果

Free 脱窒細菌を使用した回分脱窒試験を行った。Free 脱窒細菌を 1g 仕込んだ場合の結果を図5に、3g 仕込んだ場合の結果を図6にそれぞれ示した。図5,6より、脱窒細菌を 1g 仕込んだ場合は約 180 分で、3g 仕込んだ場合では約 60 分で硝酸性窒素と亜硝酸性窒素を完全に処理した。このことから硝酸性窒素の処理能力は、脱窒細菌の仕込み量にほぼ比例しており、実際のマイクロカプセルを使用した脱窒処理においてマイクロカプセル仕込み量を増やすことで、高い脱窒能力が期待できることが予測される。

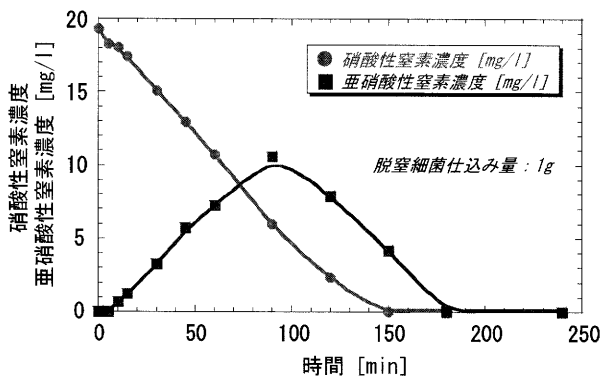


図5 Free脱窒細菌を使用した回分脱窒試験
(脱窒細菌仕込み量：1g)

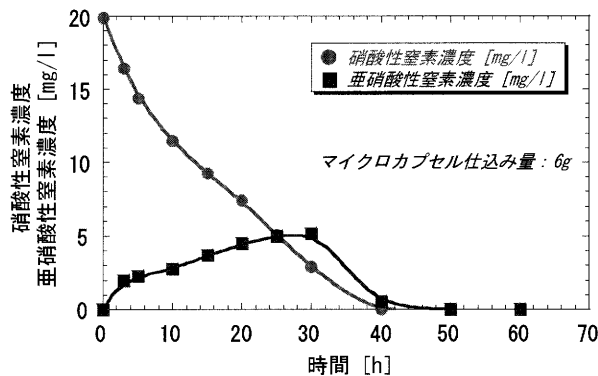


図7 脱窒細菌固定化架橋ゲルマイクロカプセルを使用した回分脱窒試験結果

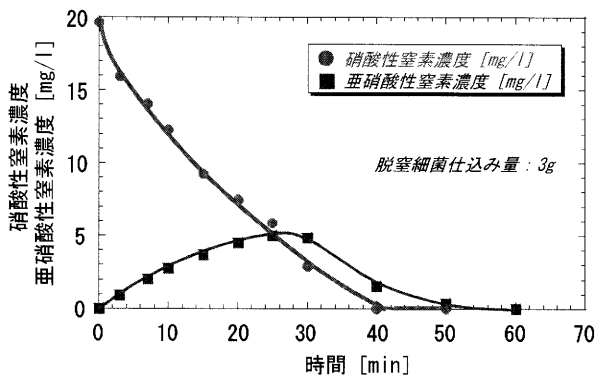


図6 Free脱窒細菌を使用した回分脱窒試験
(脱窒細菌仕込み量：3g)

3.5 脱窒細菌固定化架橋 PVA ゲルマイクロカプセルを使用した回分脱窒試験

図7に、調製した脱窒細菌固定化架橋PVAゲルマイクロカプセルを使用した回分脱窒試験結果を示した。図7より、硝酸性窒素・亜硝酸性窒素は約50時間で完全に処理することができた。また、脱窒反応中、亜硝酸性窒素は5mg/l以下に維持することができた。今回は、処理水100mlに対して仕込みマイクロカプセル量は6gであったが、この量を増やすことで処理時間はさらに短縮できるものと考えられる。今後、処理速度向上に対しての基礎的条件の更なる検討が必要である。以上のことから本マイクロカプセルを使用した高効率硝酸性窒素処理プロセスの可能性が示された。

4. 結言

物理的・化学的強度および親水性・生体適合性に優れる架橋PVAから構成された、単核中に脱窒細菌を固定化するマイクロカプセルを調製することができた。マイクロカプセル内部では脱窒細菌が自由に活動でき、培養液内で培養することでカプセル内部の脱窒細菌を増殖させることができた。本マイクロカプセルは、硝酸性窒素と亜硝酸性窒素を完全に処理することができ、マイクロカプセル仕込み量を増やすことや、更なる反応系の検討を加えることでより短時間で処理可能であり、本マイクロカプセルを使用した硝酸性窒素処理プロセスの構築が期待される。

参考文献

- 1) D. Tenokuchi, M. Yoshida, Y. Uemura, C. Hatanaka, Y. Hatate, "Preparation of Core/Shell Microcapsules with Denitrifying Bacteria and on Examination of Their Denitrification ability", *ITE Lett.*, vol.5, No.2, pp.31-36 (2004)
- 2) M. Yoshida, E. Mardriyati, 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.*, Vol.89, pp.1966-1975 (2003)

- 3) M. Yoshida, D. Tenokuchi, Y. Uemura, S. Yokoyama, H. Myoga, C. Hatanaka, Y. Hatate, "Denitrification of ground water utilizing core/shell microcapsule incorporated autotrophic organism", *J. Chem. Ind. Engineer.*, Vol.53, pp.222-224 (2002)
- 4) 吉田昌弘, 樋之口大作, 永徳圭一, 大久保一心, 塩盛弘一郎, 清山史郎, 上村芳三, 河野恵宣, 幡手泰雄, "微生物の反応場としてのカプセル型マイクロバイオリアクターの開発とその利用技術", *ケミカルエンジニアリング*, Vol.49, No.4, pp.25-32 (2004)
- 5) 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)
- 6) 吉田昌弘, Etik Mardiyati, 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*, Vol.46, No.11, pp.31-41 (2001)
- 7) 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", *Eco Industry*, Vol.8, pp.24-32 (2001)