

アルギン酸固定化 *Paracoccus denitrificans* による 地下水からの硝酸性窒素除去

横山 勝一*・上村 芳三**・泉原 修司***
白濱 寛和****・明賀 春樹*****・河野 恵宣*****・幡手 泰雄*****

Nitrate Removal from Ground Water Using Immobilized *Paracoccus Denitrificans*

Shoichi YOKOYAMA, Yoshimitsu UEMURA, Shuji IZUMIHARA
Hirokazu SIRAHAMA, Haruki MYOGA, Yoshinobu KAWANO and Yasuo HATATE

Concentrations of nitrate and nitrite in ground water are increasing year after year because of permeation of fertilizers and drainage from the livestock industry into the ground. These nitrogen species may cause methemoglobinemia, whose characteristic symptom is cyanosis. In this study, a denitrifying bacterium was used to remove such nitrogen species from water. Free cells and immobilized ones were compared.

1. 緒言

肥料、畜産排水等の地下浸透により、地下水中の硝酸性窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 及び亜硝酸性窒素 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 濃度が経年的な増加傾向にある。これらが飲料水中に多量に存在すれば、メトヘモグロビン血症を生じ、チアノーゼ等の症状が起こる。現在までに知られている脱窒法としては、従属栄養性脱窒法、独立栄養性脱窒法、イオン交換樹脂法、逆浸透膜法、電気透析膜法等が挙げられる。

独立栄養性脱窒法に用いられる脱窒細菌には水素供与体として水素ガスや還元態イオウ化合物などの無機物を利用する独立栄養性の細菌が知られており、これらを地下水中の硝酸性窒素除去に適用することが検討されている。一般的に独立栄養細菌は増殖収率が低く、増殖速度が遅いとされているが、これは細菌の増殖量が少ないことを意味し、余剰汚泥の発生量の低減からは好ましいことである。また、有機物の添加が不要であることから残

存有機物処理も不要となるため、飲料用を前提とした場合にこれらの特徴から注目を集めている。水素ガスを水素供与体に用いた場合の脱窒反応は化学量論的には式(1)のように示される。



水素ガスを水素供与体とする機能を有した脱窒細菌としては、*Pseudomonas* 属、*Alcaligenes* 属、*Paracoccus* 属のある種の細菌が知られている。これらの細菌はいずれも従属栄養的な脱窒能を有しているが、有機物と酸素が存在せず、水素ガスと硝酸性窒素が存在する条件下では独立栄養的な脱窒が可能である。式(1)より硝酸性窒素 1g を還元するのに必要な水素ガス量は 0.36 g である。

水素ガスを水素供与体とする脱窒法の特長としては、除去が容易で無害な水素ガスを水素供与体として使用すること、余剰汚泥の発生量が極めて少ないことなどがある。逆に問題点としては、微生物反応であるため除去速度が遅くなることが挙げられる。また水素ガスの水に対する溶解度は 20℃ において約 1.6 mg H₂/l と低い²⁾ため、水中への供給方法を工夫する必要がある。

本研究では連続処理を容易にするため、脱窒細菌 *Paracoccus denitrificans* をアルギン酸カルシウムのマイクロビーズで固定化し、硝酸性窒素除去実験を行った。

2. 実験方法

2.1 培養実験

平成10年5月31日受理

*博士後期課程物質生産工学専攻

**生体工学科

***博士前期課程物質生産工学専攻

****応用化学工学科4年

*****オルガノ株式会社

*****宮崎大学工学部物質工学科

*****応用化学工学科

Paracoccus denitrificans の増殖速度と濁度対乾燥菌体重量の検量線を求めるため栄養培地中で培養を行った。

1) スラント調製

培地…Polypeptone 1.0% Yeast extract 0.2%
MgSO₄·7H₂O 0.1% Agar 1.5%

上記組成のスラント 3 ml を 3 本作った。これに凍結保存菌体をクリーンベンチ中で解凍したものを殖菌した。その後インキュベータ中に 1 日置き、*P.denitrificans* スラントを 3 本調製した。

2) 前培養

培地…Polypeptone 1.0% Yeast extract 0.2%
MgSO₄·7H₂O 0.1%

条件…11h, 30℃ 振盪速度:150rpm

上記組成の培地を 3 本の試験管に 5 ml ずつ取り、1) で調製したスラントから接種し、往復振盪恒温槽中で培養を行った。

3) 本培養

培地…前培養時の濃度の等倍, 2 倍, 4 倍

条件…15h, 30℃ 振盪速度:150rpm

500ml のバッフル付き三角フラスコに上の条件で調製した培地 100ml と前培養後の菌体 1 ml を入れて、ロータリーシェーカー中にて 30℃, 振盪速度 150rpm で培養し、0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16 時間目にサンプリングを行い、分光光度計で 660nm における濁度を測定した。

2.2 水処理実験

1) *P.denitrificans* の培養

2.1 の 2) の培養実験の培地を使用して *P.denitrificans* の前・本培養をした。この時、前培養では同様の濃度で、本培養においては前培養時の 4 倍濃度で 18h 培養を行った。

2) 菌体の回収・洗浄

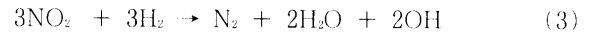
培養した菌体を遠心分離器にて 8000rpm, 5min の条件で遠心分離し、培地上清を除去後、生理食塩水 30ml で再懸濁させた。同様の操作を 3 回繰り返し、菌体を洗浄した。

3) 固定化 *P.denitrificans* の調製

回収・洗浄した菌体を 0.5 もしくは 0.75wt% アルギン酸水溶液中に懸濁させ、それを 5ml シリンジから塩化カルシウム水溶液中に滴下することで固定化 *P.denitrificans* の調製を行った。固定化 *P.denitrificans* の直径は 3 mm 程度であった。

4) 硝酸性窒素 (NO₃-N) の除去実験

硝酸性窒素は、*P.denitrificans* により以下の量論式に従って窒素まで分解することが知られている³⁾。



以下の要領で初期硝酸塩濃度 20mg/l の水を水素流通下、*P.denitrificans* による硝酸イオン分解実験を行った。使用した装置を Fig.1 に示す。

処理する水 (原水) は 20mg/l の硝酸性窒素濃度のものを用意した。調製方法は蒸留水 1 l に対し、硝酸ナトリウム (NaNO₃) 0.121 g を入れて調製を行った。条件は、200ml 三角フラスコ中に先に調整した原水 100ml と固定化 *P.denitrificans* を wet cake で 6.14 g (0.5wt% アルギン酸ゲルを用いた場合) あるいは wet cake で 6.19 g (0.75wt% アルギン酸ゲルを用いた場合) を入れ、30℃ 一定の振盪恒温槽中、水素ガス流通下にて開始直後、1 min, 30min, 60min … 8h までサンプリングを行った。

サンプリング方法は 1ml のマイクロチューブにて NO₃-N 及び NO₂-N 濃度測定分として各 1 ml ずつ、予備としての 1ml を含め計 3 ml 採取した。そして、10000rpm, 10 min の条件で遠心分離後、0.2µm のフィルターにてろ過することにより菌体を除去後、分析を行った。

採取したサンプル中の硝酸性窒素は JIS K 0102-1993 によるブルシン吸光光度法で、亜硝酸性窒素はナフチルエチレンジアミン吸光光度法により測定した。

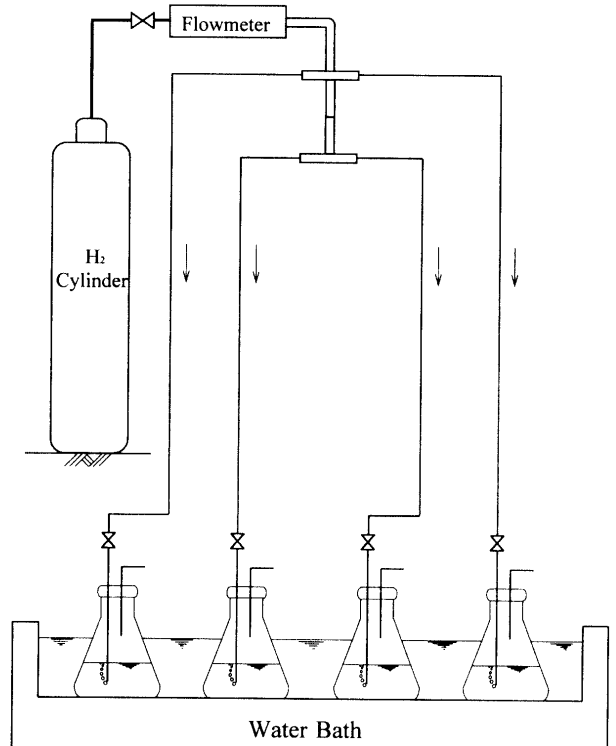


Fig.1 Experimental apparatus

3. 実験結果及び考察

3.1 培養実験

Fig.2 に栄養培地を用いた培養実験の結果を示す。いずれの培地濃度においても増殖濃度に顕著な差は無いが、定常期における密度は培地濃度が大きいほど高い。

3.2 水処理実験

水処理実験の結果を Figs.3-9 に示す。

1) Run No.1-4 (Fig.3a 及び Fig.3b)

非固定化菌体を使い実験を行った。処理水に対して菌体濃度が高くなるほど、硝酸イオンの減少が早くなっている。また硝酸イオンの減少後、亜硝酸イオンの一時的な増加から、逐次反応が生起していることが解る。

2) Run No.5, 6 (Fig.4)

0.5wt%アルギン酸で固定化したものは90minで、0.75wt%アルギン酸で固定化したものは120minで硝酸性窒素 (NO₃-N)、亜硝酸性窒素 (NO₂-N) 共に除去できた。

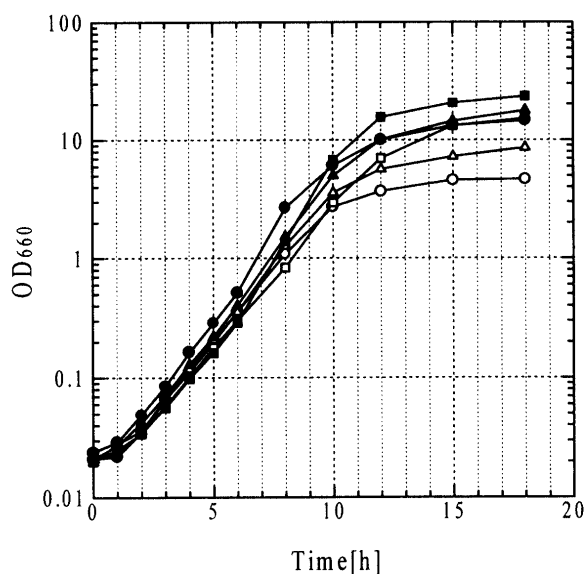


Fig.2 Growth of *Paracoccus denitrificans*

	Polypeptone	Yeast extract	MgSO ₄ · 7H ₂ O	(g/100ml)
○	1	0.2	0.1	
△	2	0.4	0.2	
□	4	0.8	0.4	
●	4	0.8	0.4	
▲	6	1.2	0.6	
■	8	1.6	0.8	

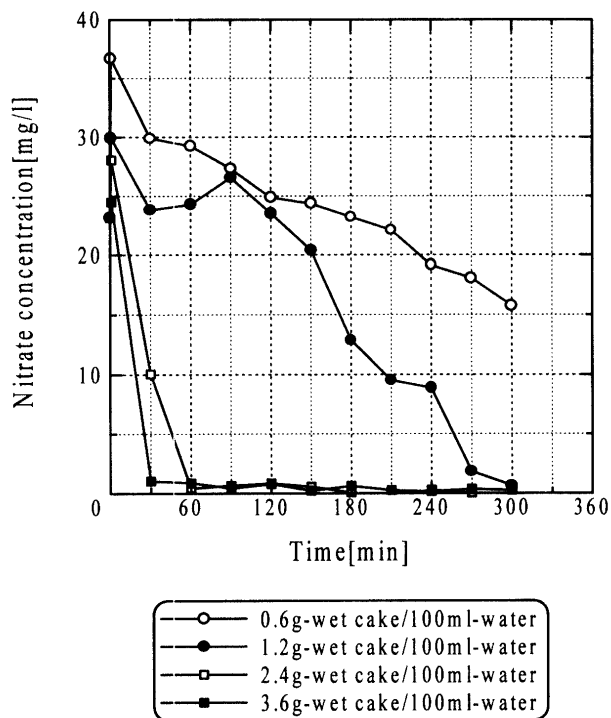


Fig.3a Time-course of nitrate concentration (free *Paracoccus denitrificans*) [Run No.1-4]

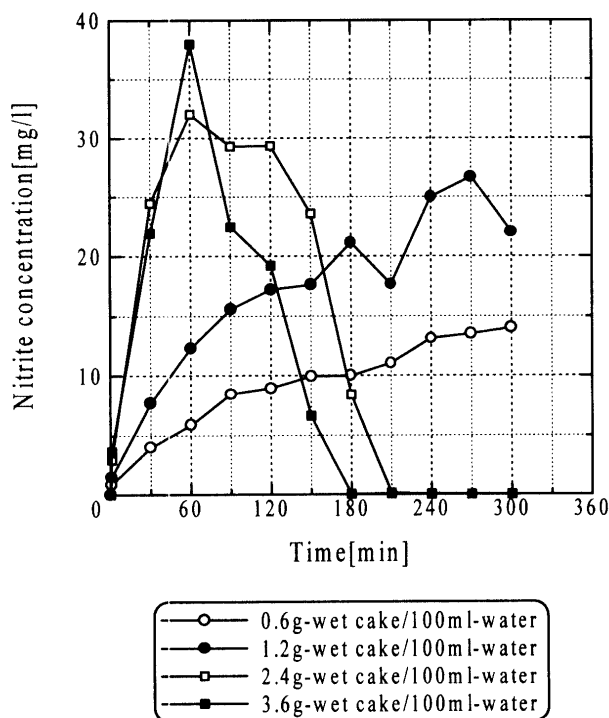


Fig.3b Time-course of nitrite concentration (free *Paracoccus denitrificans*) [Run No.1-4]

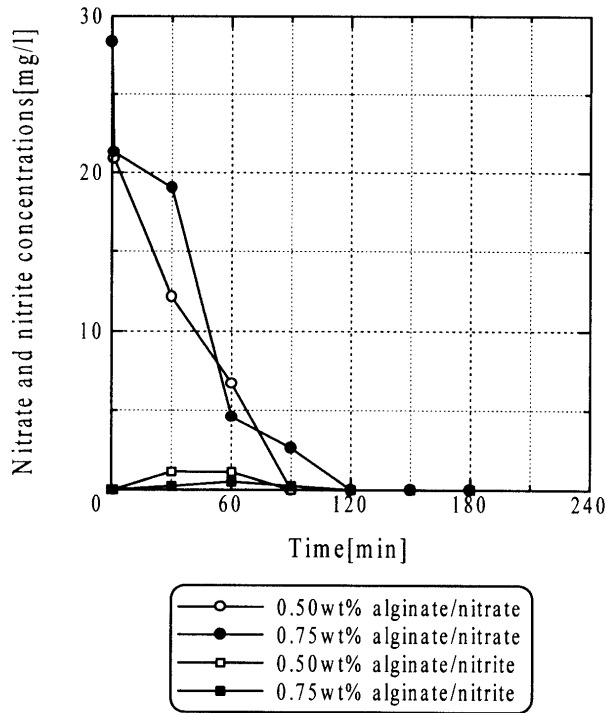


Fig.4 Time-course of nitrate and nitrite concentrations (immobilized *Paracoccus denitrificans*) [Run No.5,6]

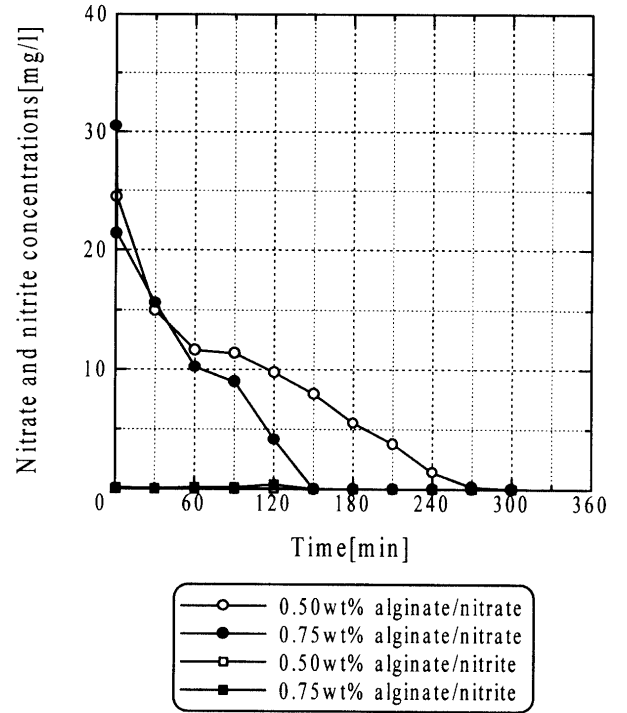


Fig.6 Time-course of nitrate and nitrite concentrations (immobilized *Paracoccus denitrificans*) [Run No.9,10]

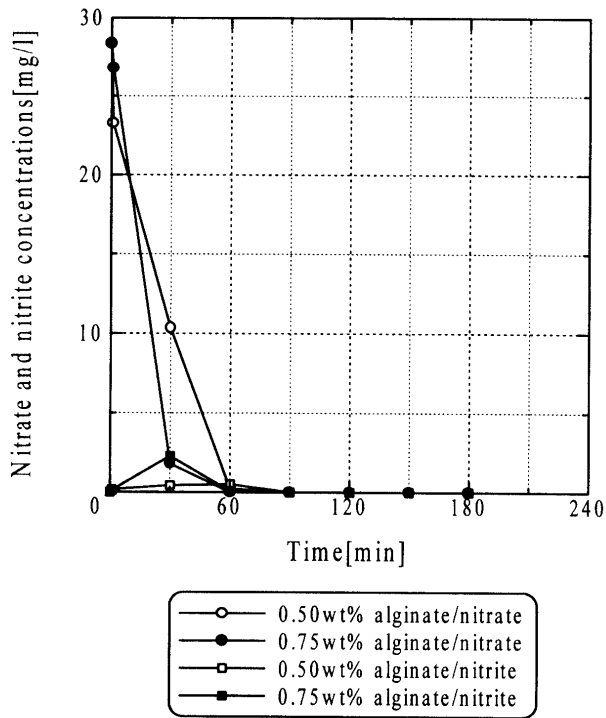


Fig.5 Time-course of nitrate and nitrite concentrations (immobilized *Paracoccus denitrificans*) [Run No.7,8]

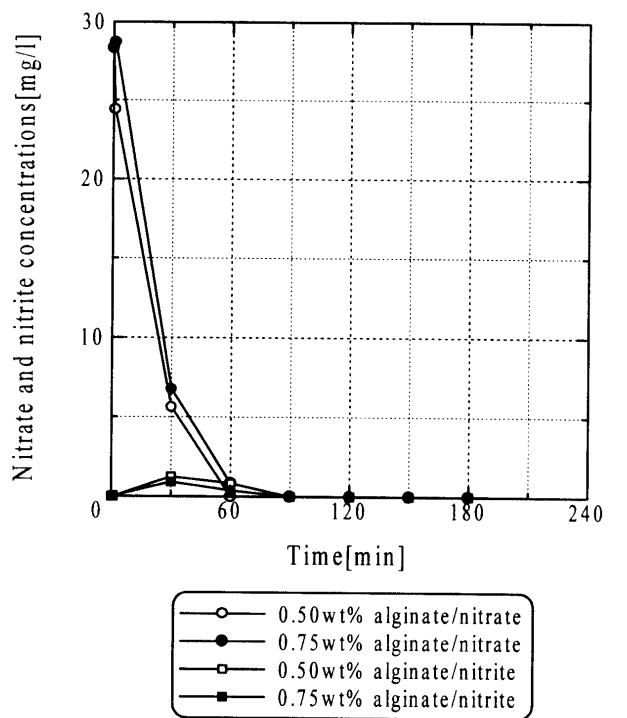


Fig.7 Time-course of nitrate and nitrite concentrations (immobilized *Paracoccus denitrificans*) [Run No.11,12]

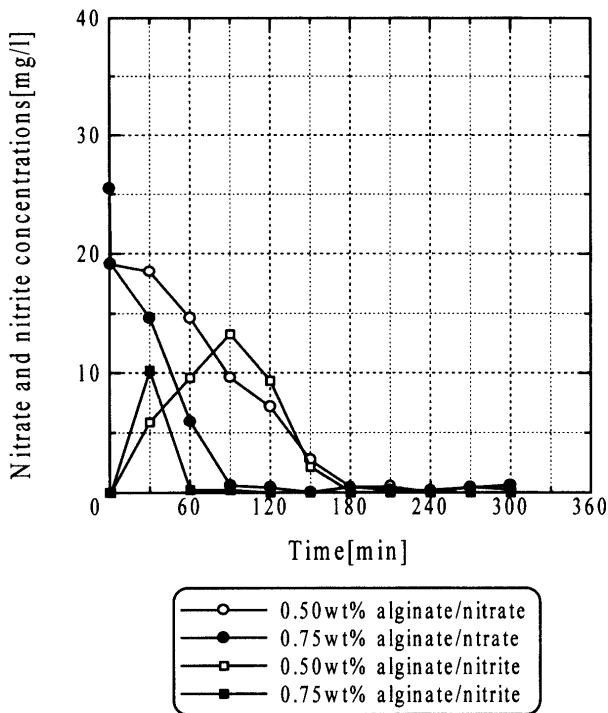


Fig.8 Time-course of nitrate and nitrite concentrations (immobilized *Paracoccus denitrificans*) [Run No.13,14]

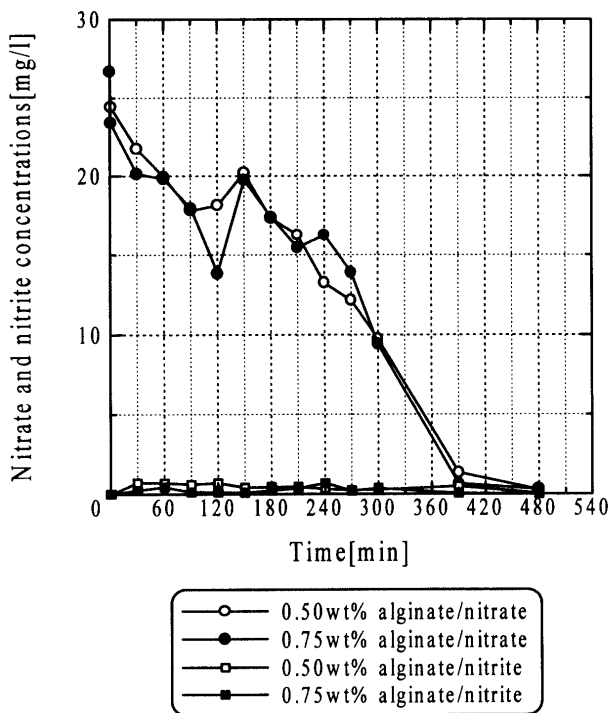


Fig.9 Time-course of nitrate and nitrite concentrations (immobilized *Paracoccus denitrificans*) [Run No.15,16]

3) Run No.7, 8

(最初の実験開始より4.5h 経過後固定化菌体再使用 : Fig.5)

固定化菌体は Run No.5, 6 において使用したものを継続使用し, 原水を入れ替えて実験を行った。0.5wt% 及び0.75wt%アルギン酸で固定化したもの共に約60min で硝酸性窒素を除去した。実験開始時よりも除去速度が早くなっているが, これは実験開始直前のマイクロビーズ調製時に塩化カルシウム中に菌体とアルギン酸の懸濁液を滴下して菌体を固定化する際におけるショックにより一時的に活性が落ちたためだと考えられる。

4) Run No.9, 10

(最初の実験開始より8.5h 経過後固定化菌体再使用 : Fig.6)

Run No.7, 8 で使用した固定化菌体をそのまま用い, 原水を入れ替えて実験を行ったものである。0.5wt%アルギン酸で固定化したもの (Run No.9) は270minで, 0.75wt%アルギン酸で固定化したもの (Run No.10) は150minと除去速度が Run No.5, 6 に比べて逆転している。

5) Run No.11, 12

(最初の実験開始より29.5h 経過後固定化菌体再使用 : Fig.7)

室温状態で一晩放置した後, 同様の実験を行った (2日目)。0.5wt% 及び0.75wt%アルギン酸で固定化したもの共に90min で除去されている。

6) Run No.13, 14

(最初の実験開始より49h 経過後固定化菌体再使用 : Fig.8)

実験開始後49h 経過したもの (3日目: 但し2日目は恒温槽中で30℃の一定温度で保存) を再度実験した。0.5wt%アルギン酸で固定化したもの (Run No.13) は180minで, 0.75wt%アルギン酸で固定化したもの (Run No.14) は90min で硝酸性窒素を除去した。除去速度については, 0.75wt%アルギン酸で固定化したものは2日目と変わらないが, 0.5wt%アルギン酸で固定化したものはかなり遅くなっている。

7) Run No.15, 16

(最初の実験開始より100h 経過後固定化菌体再使用 : Fig.9)

実験開始から100h 後に原水を入れ替えて同様の実験を行ったものである。0.5wt% 及び0.75wt%アルギン酸で固定化したもの共に硝酸性窒素は480min で除去されている。この段階ではアルギン酸の濃度の違いによる除去速度の差は全く見られなかった。

4. 結 言

脱窒細菌 *Paracoccus denitrificans* をアルギン酸カルシウムのマイクロビーズで固定化する方法で硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の除去が十分に可能であることが解った。

菌単体を使用したものと、菌をアルギン酸カルシウムで固定化した実験結果を比較すると、亜硝酸性窒素濃度変化に顕著な相違が見られる。これは固定化すると、マイクロビーズの中で亜硝酸性窒素が高濃度になるための効果と考えられる。また実験開始から100h経過しても除去が可能であることから持続性も期待できる。

今後、固定層、流動層型バイオリアクターを用いて実験を行い、実用性の高い水処理装置の開発を進める予定である。

5. 引用文献

- 1) 白濱寛和, 「新しい水処理技術の開発」, 鹿児島大学卒業論文 (1998).
- 2) 明賀春樹, 「硝酸性窒素で汚染された地下水の修復技術」, 用水と廃水, 36(8), 703-710 (1994).
- 3) 明賀春樹他, 「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), 669-675 (1994).
- 4) 藤田賢二他, 厚生省監修「水道施設設計指針・解説」, 社団法人日本水道協会 (1990).
- 5) 安藤正典他, 「上水道試験方法 (1985版) の解説」, 社団法人日本水道協会 (1990).
- 6) 真柄泰基他, 「水道水質ハンドブック」, 日本水道新聞社 (1996).