

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

PREPARATION OF CORE/SHELL POLYSTYRENE MICROCAPSULES
IMMOBILIZED DENITRIFICATION BACTERIA
AND EXAMINATION OF ITS DENITRIFICATION PROPERTY

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

Recently, the concentration of nitrate nitrogen 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 cyanosis and carcinogenic risk.

In this study, autotrophic denitrification bacteria are immobilized into polystyrene microcapsules, which are used for denitrification. The core/shell polystyrene microcapsule immobilized denitrification bacteria is prepared by the combination technique of both phase separation and solvent evaporation methods. The particle diameters of microcapsule were of about from 400 to 700 μ m. The thickness of polystyrene shell was of about 100 μ m, and the shell has porous structures. In the denitrification experiment, nitrate or nitrite nitrogen could completely be reduced to nitrogen gas in the present hydrogen gas for about 40 hours. From this result, we clarified that the immobilized denitrification bacteria have a function to treat the water polluted with nitrate nitrogen.

Keywords : denitrification, *Paracoccus denitrificans*, nitrate nitrogen, nitrite nitrogen

1. 緒言

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く含まれると、人体への健康被害としてメトヘモグロビン血症(チアノーゼ)や発癌性の2つが挙げられる。濃度上昇の原因としては、肥料や家畜の排泄物或いは排水中の窒素

成分が地下浸透して土壤中で硝化菌により硝酸性窒素に酸化されることや、酸性雨中の窒素成分が挙げられる。

飲料水中の硝酸性窒素は通常の水処理や塩素処理では変化しない。そこで、地下水中の硝酸性窒素を除去する物理化学的処理法としては、イオン交換樹脂法, RO (逆浸透膜) 法, ED (電気透析) 法等が提案されているが、いずれの方法も水中の硝酸性窒素を分離する方法であり、再生廃液中や濃縮液中に高濃度の硝酸性窒素を含有するため、

2002年8月31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

その処理が問題となる。一方、生物学的処理法は水中の硝酸性窒素を窒素ガス化することにより除去するという特長を有している。生物学的処理法には、脱窒細菌を利用した従属栄養細菌法、独立栄養性脱窒法がある。従属栄養細菌は、嫌気性条件下において、有機炭素源を栄養源として摂取し、「硝酸呼吸」を行うときに硝酸性窒素を還元し、窒素ガスとして放出する。このように従属栄養細菌では有機炭素源の供給が必要であるため水質を悪化させる原因となる。そこで、本研究では有機炭素源が存在しない場合でも脱窒能力を発現する独立栄養細菌を使用することにした。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などの無機物を利用する独立栄養性の細菌が知られている。

脱窒細菌を用いて水処理する場合、脱窒細菌だけではメンテナンスが困難、二次的な環境汚染を引き起こす可能性がある、外部からの雑菌侵入により脱窒細菌に悪影響を及ぼす可能性がある等の欠点がある。この欠点を補うためにマイクロカプセルに包括固定化する方法がある。一般的手法として、アルギン酸カルシウム等のゲル状の担体を用いる。しかし、ゲル状の担体は長時間使用すると崩壊してしまう問題がある。この問題を克服するために本研究では、独立栄養性脱窒細菌 (*Paracoccus denitrificans*) を固定化したポリスチレンマイクロカプセルの調製とその脱窒能力の検討を行った。

2. 実験

2.1 培養

脱窒細菌は *P. denitrificans* IFO 13301 を用いた。脱窒細菌をポリペプトン 1.0%、酵母エキス 0.2%

及び $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% からなる 5ml の培地中で前培養 (30°C, 150rpm, 10h) した後、前培養時の 4 倍濃度の培地 (培地組成を変えたものを比較) 100ml の培地中で本培養 (30°C, 150rpm, 18h) した。その後、脱窒細菌を回収・洗浄した。

2.2 微生物を固定化可能なコア/シェル型ポリスチレンマイクロカプセルの調製

2.2.1 脱窒細菌を保護するための過程(脱窒細菌包括アルギン酸カルシウムビーズの調製)

水相 20g としてアルギン酸ナトリウム 3wt%、0.9wt% の生理食塩水 97wt% に 3g (wet 質量) の脱窒細菌を用いた。有機相 100g としてソルビタンモノオレート (Span80) 3wt%、イソオクタン 97wt% を用いた。氷冷中でホモジナイザーを用いて 2500rpm, 5min 攪拌し、W/O エマルジョンを調製した。そして、10wt% の塩化カルシウム水溶液 200g を添加し 15min 攪拌した。得られたビーズをさらに固化するため、混合液をマグネチックスターラーで 2h 攪拌した。その後、培地中 (30°C, 150rpm) で 12h 培養した。そして、ろ過して脱窒細菌包括アルギン酸カルシウムビーズを回収した。

2.2.2 単核中に脱窒細菌包括アルギン酸カルシウムビーズを固定化したコア/シェル型ポリスチレンマイクロカプセルの調製

有機相としてジクロロメタン 20g に対してポリスチレン 10wt%、ソルビタンモノオレート (Span80) 3wt%、イソオクタン 5wt% に上記で調製した脱窒細菌包括アルギン酸カルシウムビーズ 2g (wet 質量) を用いた。水相として蒸留水 500g に対してポリビニルアルコール (PVA) 1wt%、第三リン酸カルシウム (TCP-10U) 50wt% を用いた。

80rpm,15min 攪拌し、O/W エマルジョンを調製した。次に 40℃で 8h 液中乾燥を行い、ジクロロメタンとイソオクタンを除去した。その後、培地中 (30℃,150rpm) で 18h 培養した。そして、ろ過してポリスチレンマイクロカプセルを回収した。

2.3 脱窒実験

脱窒実験は、下記に示す3通りの実験を行った。

1) 培地組成を変えた条件での脱窒細菌 3g

(wet 質量)を用いた脱窒能力評価

培地組成 1: ポリペプトン 1.0%, 酵母エキス 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% の 100ml の培地

培地組成 2: ポリペプトン 1.0%, 酵母エキス 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% の 100ml の培地に 0.5g の硝酸ナトリウムを添加

培地組成 3: ポリペプトン 1.0%, 酵母エキス 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% の 100ml の培地に 0.5g の硝酸ナトリウム, 0.5g のリン酸水素カリウム, 0.5g の $NaHCO_3$ と微量元素 5ml を添加

微量元素組成:

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ [2.2g/l], $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ [7.3g/l], $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [2.5g/l], $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ [0.5g/l], $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ [0.5g/l], $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ [5.0g/l], $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ [0.2g/l]

2) 実験項 2.2.1 で調製したアルギン酸カルシウムビーズ 3g (wet 質量)を用いた脱窒実験

3) 実験項 2.2.2 で調製したコア/シェル型ポリスチレンマイクロカプセル 2g (wet 質量)を用いた脱窒実験

上記に示す3つの脱窒処理実験は、使用するフリーの脱窒細菌及びアルギン酸カルシウムビーズやマイクロカプセルに包括固定化した脱窒細菌を、模擬汚染水として蒸留水 1 リットルに対して $NaNO_3$ 0.121g と KH_2PO_4 0.2mg を溶解したもの (20mg/l asN) 100ml 中に分散させることにより行った。また、水素ガス 10ml/min で飽和させて 30℃, 60rpm の振とう恒温槽中で行った。硝酸性窒素、亜硝酸性窒素は高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。また、pH の測定も行った。

3. 結果および考察

3.1 培地組成を変えた条件での脱窒能力の比較

図1に培地組成1で培養した脱窒菌 3g (wet 質量)を用いた脱窒実験結果を示す。硝酸性・亜硝酸性窒素を共に約 60min で処理することができた。

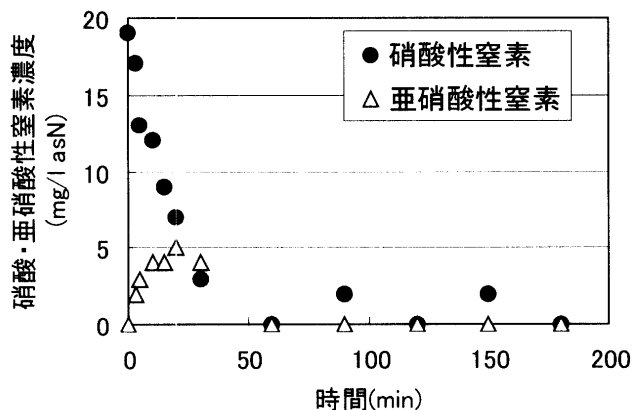


図1 培地組成1で培養した脱窒菌 3g (wet 質量)を用いた脱窒実験結果

図2に培地組成2で培養した脱窒菌 3g (wet 質量)を用いた脱窒実験結果を示す。培地に $NaNO_3$ を添加して培養した脱窒細菌は不添加のものに比べ処理能力が速く約 20min で硝酸性窒素を処理することができ、中間生成物質である亜硝酸性窒素の生成を抑制することができ、活性が高いことを確認できた。

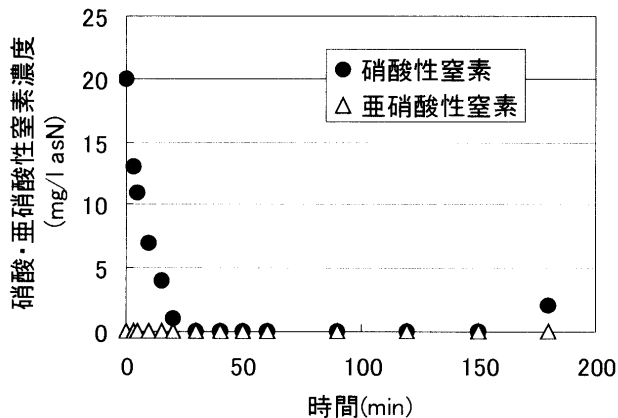


図2 培地組成 2 で培養した脱窒菌 3g(wet 質量)を用いた脱窒実験結果

図3に培地組成 3で培養した脱窒菌 3g (wet 質量)を用いた脱窒実験結果を示す。培地に NaNO_3 を添加して培養した場合よりも、脱窒菌の活性は高く、約 10min で硝酸性窒素を完全に処理することができた。さらに、亜硝酸性窒素の生成を抑制することもできた。培地に NaNO_3 、金属原子、無機炭素源を添加して培養した脱窒菌の活性が高くなる原因は、脱窒細菌が硝酸性窒素の存在する環境に早い段階で適合したことと、脱窒の4種類の還元酵素は、活性の中心にモリブデン・銅・ヘム鉄・非ヘム鉄などの金属原子が関与しており、各酵素への電子伝達に固有のシトクロムが使われているので硝酸性窒素に対する活性が高くなったと考えられる。

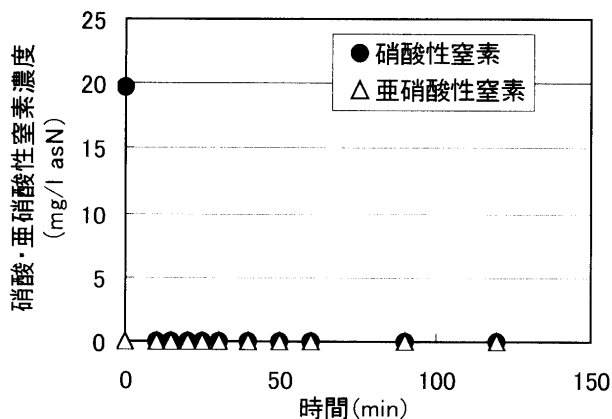


図3 培地組成 3 で培養した脱窒菌 3g(wet 質量)を用いた脱窒実験結果

3.2 脱窒細菌包括アルギン酸カルシウムビーズの脱窒能力

図4に調製したアルギン酸カルシウムビーズの顕微鏡写真を示す。粒径は約 30~100 μm であった。図5にアルギン酸カルシウムビーズ 3g (wet 質量)を用いた脱窒実験の結果を示す。硝酸性窒素、亜硝酸性窒素ともに約 3h で完全に処理することができた。この結果より脱窒細菌がアルギン酸カルシウムビーズに包括されたことを確認できた。

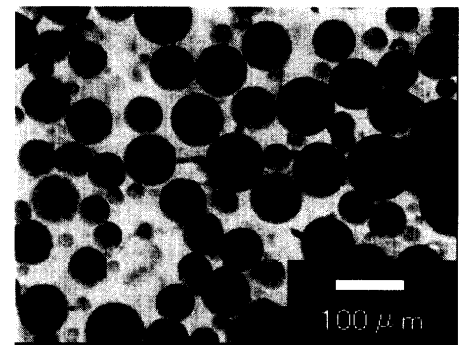


図4 調製したアルギン酸カルシウムビーズの顕微鏡写真

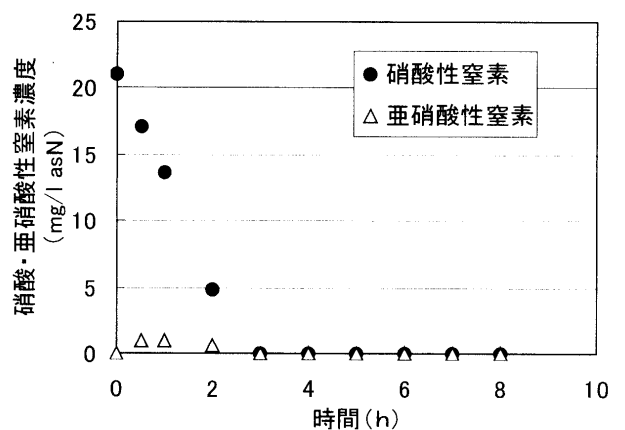


図5 アルギン酸カルシウムビーズ 3g(wet 質量)を用いた脱窒実験結果

3.3 脱窒細菌固定化コア/シェル型ポリスチレンマイクロカプセルの脱窒能力

図6に調製した脱窒細菌を固定化したコア/シェル型ポリスチレンマイクロカプセル断面の

SEM 写真を示す。50 個のカプセル断面を観察したところ、粒径は約 400~700 μm であり、ポリスチレン殻の厚さは約 100 μm で細孔が無数にあり、多孔質構造をしていることを確認できた。また、アルギン酸カルシウムビーズを包括していることから結果的に脱窒細菌を固定化していることを確認できた。

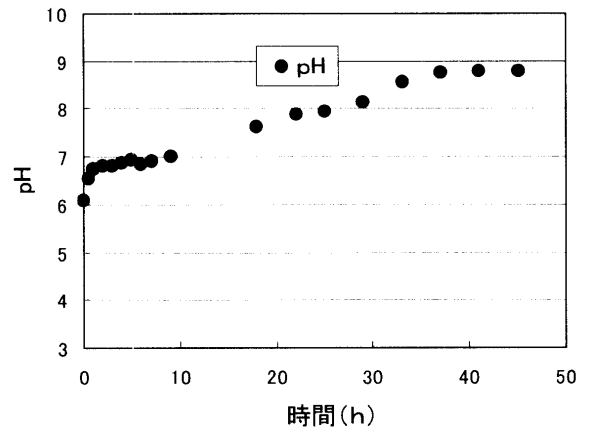
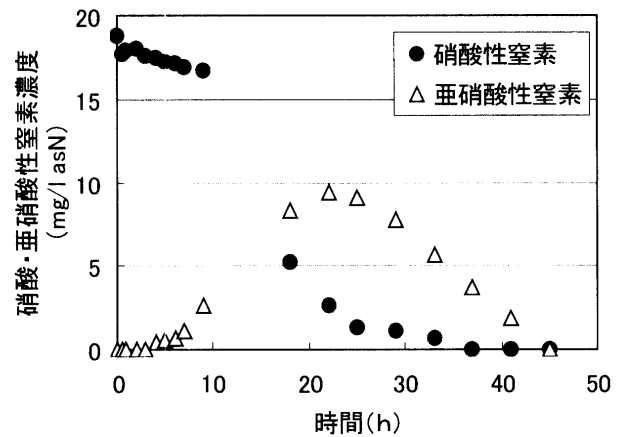


図 6 脱窒細菌を固定化したコア/シェル型ポリスチレンマイクロカプセルの SEM 写真

図 7 にポリスチレンマイクロカプセル 2g (wet 質量) を用いた脱窒実験の結果を示す。硝酸性窒素、亜硝酸性窒素をそれぞれ約 37h、45h で完全に処理することができた。硝酸・亜硝酸性窒素の合計量を環境基準値の 10ppm 以下に抑制可能となった。この結果より固定化した脱窒細菌は十分に機能していることを確認できた。アルギン酸カルシウムビーズの処理速度に比べ遅い原因として、ポリスチレン殻の厚さによる拡散抵抗とポリスチレン外殻の疎水性が考えられる。また、図 7 に示すように脱窒反応の進行に伴い pH が増加した。この原因としては、水素ガスを水素供与体として用いているため、副生成物である水酸化物イオンの影響である。

本マイクロカプセルの特徴の一つである堅牢な

カプセルが調製可能となったことから、再利用性に富むことが考察される。膜厚や多孔質度をコントロールすることが反応向上のキーポイントとなる。従って、ポリスチレン含有率 (壁材濃度)、イソオクタン含有率、液中乾燥温度というカプセル調製条件を詳細に検討する予定である。



水素ガスを水素供与体と用いた場合の脱窒反応のモデル反応式

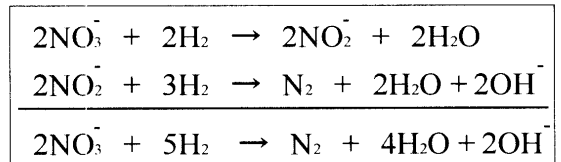


図 7 ポリスチレンマイクロカプセル 2g (wet 質量) を用いた脱窒実験結果

4. 結言

培地に NaNO_3 、金属原子、無機炭素を添加して培養すると活性の高い脱窒細菌を得られることを

確認した。また、アルギン酸カルシウムビーズ、ポリスチレンマイクロカプセルともに硝酸・亜硝酸性窒素を処理できることを確認した。ポリスチレン外殻による硝酸性窒素の拡散抵抗や疎水性により、処理速度が遅くなっていることが推察される。しかし、堅牢なカプセルが調製可能となったことから、再利用性に富むことが考察される。

参考文献

- 1) M.Yoshida,E.Mardliyati,D.tenokuchi,Y.uemura, Y.Kawano,Y.Hatate, “ Structural control of core/shell polystyrene microcapsule immobilized microbial cells and its application to polymeric microbioreactor” , *submitted to J. Appl. Polym. Sci.*, (2002)
- 2) 吉田昌弘,エティック マルドリヤティ,上村芳三,河野恵宣,幡手泰雄, “コア/シェル型多孔性ポリスチレンマイクロカプセルを用いる微生物の固定化”, 化学工学会 高機能界面・分子集合体特別研究会編, 化学工学シンポジウムシリーズ 76 高機能界面・分子集合体の基礎構築と応用分野の新展開,pp.88-95 (2001)
- 3) 吉田昌弘,Etik mardliyati,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.11, pp.34-41(2001)
- 4) 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, Vol.8, pp.24-32(2001)