

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	固定化微生物を用いた窒素除去バイオリアクターに関する研究
Title(English)	
著者(和文)	植本弘明
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第3491号, 授与年月日:2000年12月31日, 学位の種別:論文博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第3491号, Conferred date:2000/12/31, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

固定化微生物を用いた窒素除去バイオリアクター  
に関する研究

平成12年12月

東京工業大学大学院  
生命理工学研究科  
生物プロセス専攻

植本 弘明

## 目次

第1章 序論	1
1.1 緒言	2
1.1.1 窒素化合物による環境汚染	2
1.1.2 既存の窒素除去技術	3
1.1.2.1 物理化学的処理法	3
1.1.2.2 生物学的処理法	4
1.1.2.2.1 硝化を行う生物種	4
1.1.2.2.2 脱窒を行う生物種	9
1.1.2.2.3 硝化と脱窒を同時に行う生物種	9
1.1.2.3 生物学的処理法を用いた排水処理装置	11
1.1.2.3.1 活性汚泥方式の処理プロセス	11
1.1.2.3.2 固定床および流動床方式の処理プロセス	13
1.1.2.3.3 包括固定化法を用いた硝化脱窒装置	14
1.1.2.3.4 同時硝化脱窒装置	17
1.2 本論文の目的	17
1.3 本論文の構成と内容	19
第2章 チューブ状ゲルを用いた窒素除去法	21
2.1 緒言	22
2.2 材料および方法	22
2.2.1 供試菌株とその培養	22
2.2.2 固定化方法	22
2.2.3 膜状ゲルによる窒素除去	24
2.2.4 チューブ状ゲルによる窒素除去	24
2.2.5 分析方法	24
2.3 結果	24
2.3.1 膜状ゲルによる窒素除去	24
2.3.2 チューブ状ゲルによる窒素除去	26
2.4 考察	26
2.5 本章のまとめ	32

第3章 チューブ状ゲル内部の微生物分布	33
3.1 緒言	34
3.2 材料および方法	34
3.2.1 供試菌株とその固定化方法	34
3.2.2 模擬排水の組成とその連続処理	34
3.2.3 蛍光抗体法によるゲル内部の微生物染色	34
3.3 結果	36
3.3.1 模擬排水の連続処理	36
3.3.2 ゲル内部の微生物分布	39
3.4 考察	39
3.5 本章のまとめ	44
第4章 チューブ状ゲル内部の微生物分布の改変	45
4.1 緒言	46
4.2 材料および方法	46
4.2.1 供試菌株とその固定化方法	46
4.2.2 水素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理	46
4.2.3 酸素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理	48
4.2.4 蛍光抗体法によるゲル内部の微生物染色	48
4.3 結果	48
4.3.1 水素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理	48
4.3.2 ゲル内部の微生物分布に及ぼす水素ガスの影響	51
4.3.3 酸素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理	55
4.3.4 ゲル内部の微生物分布に及ぼす酸素ガスの影響	58
4.4 考察	58
4.5 本章のまとめ	64
第5章 封筒状ゲルを用いたバイオリアクターによる窒素除去	66
5.1 緒言	67
5.2 材料および方法	67
5.2.1 封筒状ゲルの作製	67
5.2.2 模擬排水のバッチ処理	67
5.2.3 模擬排水の連続処理	67

5.3	結果	71
5.3.1	バッチ処理による封筒状ゲルの馴養	71
5.3.2	リアクターの浄化能力に及ぼすエタノール添加量の影響	71
5.3.3	リアクターの浄化能力に及ぼす排水の滞留時間の影響	76
5.4	考察	76
5.5	本章のまとめ	78
第6章 プレート型バイオリアクターによる実排水の処理		82
6.1	緒言	83
6.2	材料および方法	83
6.2.1	供試菌株とその固定化方法	83
6.2.2	プレート型バイオリアクターの作製	83
6.2.3	模擬排水および実排水のバッチ処理	83
6.2.4	水棲生物飼育装置への適用	86
6.3	結果	88
6.3.1	模擬排水および発電所実排水のバッチ処理	88
6.3.2	水棲生物飼育装置における連続運転	88
6.4	考察	92
6.5	本章のまとめ	94
第7章 総括		96
7.1	本研究の総括	97
7.2	今後の課題	98
参考文献		100
本論文に関する著者の印刷論文		113
謝辞		114

## 第1章

### 序論

排水中に含まれる窒素化合物による湖沼や閉鎖性海域における富栄養化の実態について述べるとともに、富栄養化防止のため現在使われている窒素除去技術の現状とその問題点について述べ、本研究の目的を明らかにする。

## 1.1 緒言

### 1.1.1 窒素化合物による環境汚染

我が国における水環境は、下水道の整備や工場などに排水処理施設が整備されたことにより、著しく改善された。重金属などの有害物質に関してはほぼ環境基準が達成され、BOD、COD などの生活環境の保全に関する項目についても全国平均で改善傾向にある<sup>1)</sup>。しかし、湖沼<sup>2, 3)</sup> および内湾・内海などの陸岸に囲まれた海域（閉鎖性海域）<sup>4, 5)</sup> においては、水質の改善が進まず横這いもしくは悪化の傾向にある。これは、流入した有機物が拡散しにくいことに加え、流入した無機態の窒素、リンが植物プランクトンの増殖を促進し、富栄養化と呼ばれる水質悪化が進行してしまうことによるものである<sup>6, 7)</sup>。この様な窒素、リンによる富栄養化現象は、景観の悪化や悪臭の発生といった地域住民の生活環境上の問題だけでなく、アオコや赤潮による漁業被害といった経済的損失を引き起こす。また、近年では富栄養化した湖沼において高濃度のアオコ毒により人や家畜が死亡する被害<sup>8)</sup> や、汽水域において殺し屋プランクトンと呼ばれる新種プランクトンの発生も米国において報告<sup>9)</sup> されており、経済的被害や人的被害を発生する深刻な環境問題となっている。そのため、この富栄養化現象に対して早急な対策が求められている。

窒素化合物による環境汚染は、湖沼や閉鎖性海域における富栄養化現象を促進させるだけでなく、生活用水などに用いられる地下水においても報告されている<sup>10, 11)</sup>。これは、農作物の栽培に多量に使用される化学肥料や畜産系糞尿由来の窒素化合物が、土壤中で硝酸態窒素にまで酸化され、地下水中に蓄積することにより引き起こされる。国内でも、環境庁調査<sup>13)</sup> によると全国 15 都市の 1360 検体の約 80% から硝酸態窒素が検出され、その 10% が飲料水基準である 10ppm を超えている状況が報告されている<sup>14, 15)</sup>。これは、トリクロロエチレンやテトラクロロエチレンなどの有機塩素系化合物による汚染を上回るものであるが、国内においては、地下水を生活用水として使用する割合が低いため、人的被害は報告されていない。しかし、生活用水の大半を地下水に依存している北欧、北米においては、硝酸態窒素に汚染された水を摂取することにより、乳幼児のメトヘモグロビン血症や成人の胃ガンの発生率上昇などが危惧されている状況にあり<sup>16)</sup>、国内においても窒素化合物による地下水汚染に対し早急な対応が求められている。

この様な窒素化合物による環境汚染に対して、1985 年から琵琶湖、霞ヶ浦などの多くの湖沼<sup>17)</sup> において窒素化合物に関して規制が進められ、東京湾、大阪湾などの閉鎖性海域<sup>18)</sup> においても 1993 年から規制が行われている。しかし、現在の窒素化合物の排水規制値は、最大 120 mg/L、日平均 60 mg/L 以下であり、排水量が 1 日 50 m<sup>3</sup> 以上の事業所にのみ適用され、一部業種には高めの暫定的な基準値が設定されている状況にある。さらに、排水量が 1 日 50 m<sup>3</sup> 以下の小規模事業所からの排水や農業用水、家庭排水をはじめとした多くの窒素含有排水には規制は適用されていない。このため、内湾や河川における環境基準達成率は 70~80%、湖沼における達成率は 40%程度にとどまっている状

況にある。従って、富栄養化現象を防止するとともに、水道水源となる河川水、地下水などを含めた水環境を改善するための重要な方策の一つは、小規模事業所を含めた多くの窒素含有排水を処理し窒素除去を行うことであり、そのためには効率の良い窒素除去装置の開発が望まれている。

### 1.1.2 既存の窒素除去技術

排水からアンモニア態、亜硝酸態、硝酸態の窒素化合物（以下、アンモニア、亜硝酸、硝酸とする）を除去する技術として、多くの方法が開発され、実用化に至っているが、以下に示す物理化学的処理法と生物学的処理法に大別される<sup>19)</sup>。

#### 1.1.2.1 物理化学的処理法

代表的な物理化学的処理法としては、アンモニアストリッピング法、不連続塩素処理法、イオン交換法などがあり、近年では触媒脱窒法という新しい方法も検討されている。

アンモニアストリッピング法<sup>20)</sup>は、アンモニアを含む排水のpHを上昇させ、アンモニアガスとして排水から除去する方法である。アンモニア態窒素は、水中でアンモニウムイオン(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)と遊離アンモニア(NH<sub>3</sub>)が平衡を保って存在しているが、pHが高くなるにつれて遊離アンモニアの比率が高くなり、pH11以上ではそのほとんどが遊離アンモニアの形となる。この遊離アンモニアは外気に飛び出しやすい状態にあり、木製やプラスチック製の充填材が入った脱アンモニア塔において、攪拌、曝気などの物理的刺激により容易に水中より大気に放出される。この方法は、操作が簡単でアンモニア除去率が高く、低コストである。しかし、排水中のアンモニアの形態の窒素だけしか除去できないことに加え、発生したアンモニアガスによる2次公害の恐れがある。また、大量の空気を送り込む必要があり、温度の影響を強く受けるなどの問題点がある。

不連続塩素処理法<sup>21)</sup>は、塩素で水中のアンモニアを酸化して除去する方法である。塩素を水に注入すると次亜塩素酸を生じる。この次亜塩素酸はアンモニアと反応し、モノクロロアミン、ジクロロアミンなどを生成する。次に生成したモノクロロアミンは、次亜塩素酸およびジクロロアミンと反応して窒素ガスとなり除去される。溶液中に還元物質が存在しない場合、アンモニアを完全に除去するために必要な塩素量は、アンモニア1モルに対し1.5モルである。しかし、実際にはアンモニアの一部が硝酸にまで酸化されるため、1.65モルとなる。この方法では、処理量が多いと投入する塩素量が多くなり、脱塩素処理も必要となり維持管理コストが高くなることに加え、有害なモノクロロアミンなどが残留する可能性があり、それらの処理も問題となる。

イオン交換法<sup>22)</sup>は、選択性のあるイオン交換体を用いてアンモニウムイオンや硝酸イオンなどを吸着除去する方法である。イオン交換体としては、アンモニウムイオンの場合、クリノプチロライトやモルデナイトなどの天然ゼオラ



イトが多く用いられている。しかし、これらの天然ゼオライトは、硝酸イオンや亜硝酸イオンを吸着できない。一方、硝酸イオンの場合、スルホン酸樹脂の様な弱塩基樹脂が用いられが、これらの樹脂はアンモニウムイオンの吸着ができない。このイオン交換法は冬季でも効果が落ちない、敷地面積が少なくて済む特徴がある。しかし、溶液中のマンガン、カリウムなどの金属イオンに悪影響を受けるとともに、全カチオン、アニオン濃度が高い場合には、それぞれ、アンモニウムイオン、硝酸イオンの除去率が低下する。また、処理コストが高く、イオン交換体の再生が必要であるが、その再生時に生じる高濃度のアンモニア排液または硝酸排液などの処理が必要であるなどの問題がある。

触媒脱窒法<sup>23)</sup>は、アンモニア排水に別途等量の亜硝酸を添加し、高温高压の条件下で金属触媒により窒素ガスに変換するものである。設置面積が小さく、処理コストは生物処理と同等以下であり、処理水質も生物処理と同等の10mg/L以下にできる。運転管理が容易で、生物処理のような汚泥の発生が無いなどの利点が挙げられる。しかし、高価な貴金属触媒を使うことにより反応温度と圧力を下げることができるが、生物処理槽に比べ高温高压(160℃、8kg/cm<sup>2</sup>)の反応槽を必要とするとともに、排水中に銅、鉄、亜鉛などの金属類の影響で触媒性能が低下するため、頻繁な酸洗浄による触媒再生が必要となるなどの問題点を有している。また、実際の運転では負荷量が増えるため、アンモニア、亜硝酸を常に等量で反応させることが難しく、アンモニア、亜硝酸のいずれかが残存するため、後で述べる生物学的処理法などと組み合わせる必要がある。

これらの方法の他に物理化学的方法としては、逆浸透膜法や電気透析法などがある<sup>24)</sup>。しかし、いずれも処理コストが高く、除去できる窒素化合物の種類に限られることや、イオン交換法と同様に濃縮されたアンモニア排液などの処理が必要となる問題点を有している。

#### 1.1.2.2 生物学的処理法

生物学的処理法は硝化脱窒法<sup>25)</sup>と呼ばれ、以下に示すような硝化菌(アンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌の総称)と脱窒菌という2種類の微生物の働きにより、アンモニアを亜硝酸または硝酸に酸化する過程(硝化)と、生成した亜硝酸と硝酸を窒素ガスに還元する過程(脱窒)を組み合わせ、排水中のアンモニアを窒素ガスとして除去する方法である(図1-1)。この方法は、常温・常圧の条件下でアンモニア、亜硝酸、硝酸の全ての無機窒素化合物を除去でき、生成物は無害な窒素ガスだけである。さらに、大量の排水を安価に処理でき、小規模から大規模な事業所まで幅広く用いられている実績を持つ<sup>26)</sup>。

##### 1.1.2.2.1 硝化を行う生物種

一般的な硝化脱窒法で用いられているアンモニア酸化菌<sup>27, 28)</sup>としては、独立栄養細菌である *Nitrosomonas europaea*、*Nitrosomonas eutropha*、*Nitrosococcus oceanus*、*Nitrosococcus nitrosus*、*Nitrosococcus mobilis*、*Nitrospira briensis*、*Nitrosovivrio tenuis*、*Nitrosolobus multififormis* などが知られている。これらの細

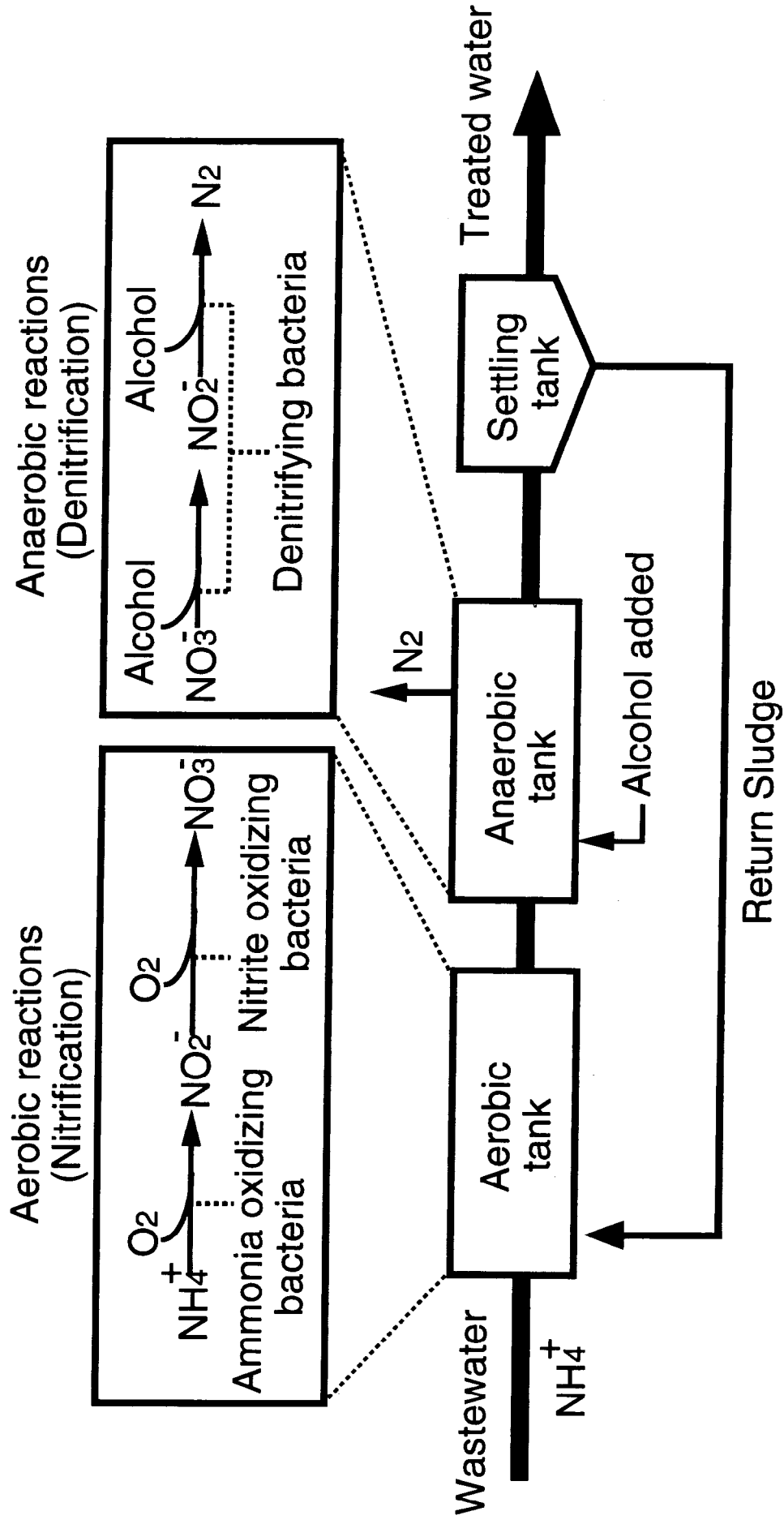


FIG. 1-1. Biological system for nitrogen removal

菌は、絶対好気性であり、生育至適温度は 25~30℃、至適 pH は 7.5~8.0、至適基質濃度は 2~10mM であり、世代時間は 8 時間から数日を要する。しかし、汚泥処理槽の様な酸素がほとんど存在しない微好気な反応槽中にも存在しており、水温 5℃以下の深海や 60℃以上の温泉、pH4 以下の土壌などの多くの環境から分離されている。これらの細菌は、アンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) とヒドロキシルアミノオキシドリダクターゼ (HAO) の 2 つの酵素を持ち、AMO の働きによりアンモニアはヒドロキシルアミンに、HAO の働きによりヒドロキシルアミンは亜硝酸へと酸化される<sup>29)</sup> (図 1-2A)。また、アンモニア酸化菌は、アンモニアを酸化し亜硝酸を生じるため、培養液の pH が著しく低下する。

亜硝酸酸化菌<sup>27, 30)</sup>としては、独立栄養細菌である *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrospina gracilis*, *Nitrococcus mobilis*, *Nitrospira marina* などが知られている。これらの細菌もアンモニア酸化菌と同様に、絶対好気性であり、生育至適温度は 25~30℃、至適 pH は 7.5~8.0、至適基質濃度は 2~30mM であり、世代時間は 8 時間から数日を要する。そして、アンモニア酸化菌と同様に、土壌、汚泥、淡水、海水などの多くの環境から分離されている。これらの細菌は、亜硝酸オキシドリダクターゼという酵素を持ち、この酵素により亜硝酸は硝酸に酸化される<sup>31)</sup> (図 1-2B)。この亜硝酸酸化菌においては、培養液の pH が低下することはないが、亜硝酸オキシドリダクターゼは pH が 6 以下になると強い硝酸還元活性を示すことが知られている。そのため、アンモニア酸化菌の働きにより pH が低下した場合、硝酸を亜硝酸に還元してしまう可能性がある。

前述した独立栄養細菌以外に、従属栄養細菌の中にもアンモニアをヒドロキシルアミン、亜硝酸、硝酸に酸化し、硝化を行う細菌が知られている<sup>32, 33)</sup>。この従属栄養硝化細菌としては、*Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Thiosphaera* などの多くの菌株が報告されている (表 1-1)。これらの細菌が硝化を行う経路は、独立栄養硝化菌と似たものであると考えられており<sup>29)</sup>、*Paracoccus denitrificans* からは AMO<sup>34)</sup> が、*Arthrobacter globiformis* や *Thiosphaera pantotropha* などからは HAO<sup>35-37)</sup> が得られている。しかし、これらの従属栄養硝化菌から得られた AMO や HAO は、*N. europaea* の AMO や HAO と少し異なり、AMO に関してはアセチレンに対する感受性が、HAO に関してはヘム C の有無に違いがあることが報告されている。また、独立栄養細菌の場合と異なり、これらの従属栄養細菌が硝化を行うのは、アンモニアとともに炭素源としてクエン酸や乳酸などの簡単な有機物が存在する場合に限られる。しかし、グルコースが存在する場合には *Bacillus coagulans* はアンモニア酸化を行わないことも報告されており、有機物の酸化のみにより十分なエネルギーが得られない場合にのみアンモニア酸化を行うのではないかと考えられている<sup>38)</sup>。*Methylococcus thermophilus* はヒドロキシルアミンの酸化により ATP を得ることが報告されており、*Pseudomonas* PB16 もヒドロキシルアミンの酸化により菌体量が増加していることが示されているが、アンモニア酸化によりエネ

Nitrification

A) Ammonia oxidizing bacteria



B) Nitrite oxidizing bacteria



Denitrification

C) Denitrifying bacteria

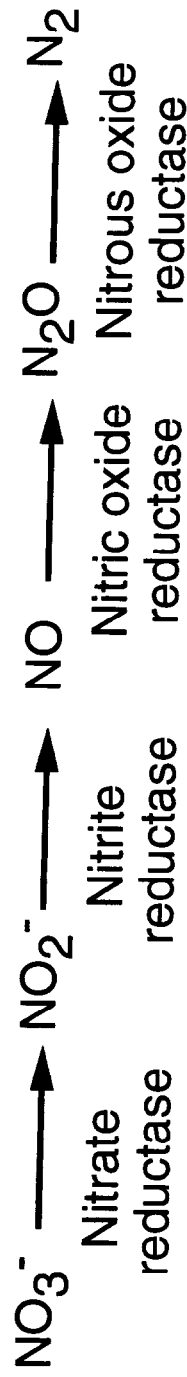


FIG. 1-2. Nitrification and denitrification

Table 1-1 Examples of nitrifying heterotrophs

Species	Substrate	Product
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Ammonium	Hydroxylamine
<i>Aspergillus flavus</i>	Ammonium	Monohydroxamic acids
<i>Streptomyces</i> sp.	Ammonium	Monohydroxamic acids
<i>Mycobacterium phlei</i>	Ammonium	Dihydroxamic acids
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Ammonium	Dihydroxamic acids
<i>Rhodotorula</i> sp.	Ammonium	Dihydroxamic acids
<i>Ustilago sphaerogena</i>	Ammonium	Trihydroxamic acids
<i>Neurospora crassa</i>	Ammonium	Trihydroxamic acids
<i>Streptomyces griseus</i>	Ammonium	Trihydroxamic acids
<i>Thiosphaera pantotropha</i>	Ammonium	Trihydroxamic acids
<i>Aspergillus flavus</i>	Ammonium	Nitrite
<i>Proteus</i> sp.	Hydroxylamine	3-Nitropropionic acids
<i>Alcaligenes</i> sp.	Oximes	Nitrite
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aliphatic nitro compounds	Nitrite
<i>Flavobacterium</i> sp.	Aliphatic nitro compounds	Nitrite
<i>Nocardia</i> sp.	Aliphatic nitro compounds	Nitrite
<i>Chlorella</i> sp.	Ammonium	Nitrate
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Ammonium	Nitrate
<i>Aspergillus wentii</i>	Nitrite	Nitrate
<i>Aspergillus flavus</i>	Aliphatic nitro compounds	Nitrate
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aliphatic nitro compounds	Nitrate

ルギーが得られるかどうかは不明であり、従属栄養細菌が硝化を行う理由は良く分かっていない<sup>39, 40)</sup>。さらに細胞当たりの硝化能は、独立栄養細菌の活性に比較し著しく小さい(表 1-2)ため、排水処理に適用されるには至っていない。しかし、地球規模の窒素循環においては、従属栄養硝化細菌の数は多いため、近年、その働きは独立栄養硝化細菌の働きに匹敵すると考えられるようになってきている<sup>41)</sup>。

硝化菌ではないが、酵母およびカビの中にも硝化作用を示すものが多数知られている<sup>42, 43)</sup>。酵母やカビによる硝化では、細菌と異なり、アンモニアの酸化ではなく、有機化合物中の窒素が直接酸化されて硝酸を生成するが多い。しかし、酵母 *Candida rugosa* は亜硝酸を硝酸に酸化し、それにカタラーゼが関与していることが分かっている。また、*Chlorella* sp. もまた、アンモニアを硝酸に酸化することが知られている。

#### 1.1.2.2.2 脱窒を行う生物種

脱窒菌<sup>44)</sup>としては *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus azotoformans*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus denitrificans* など非常に多くの菌株が知られている。これらの細菌の多くは従属栄養細菌であるため、世代時間が独立栄養硝化細菌に比較し短く1時間程度である。そして、北極から南極に至る様々な土壌、汚泥、淡水、汽水、海水サンプルなどから分離されている。また、通性嫌気性であり、酸素が存在すれば酸素を最終電子受容体として用いて呼吸するが、酸素がない嫌気状態となる場合にのみ電子受容体として亜硝酸、硝酸などを用いて呼吸(脱窒)する。この脱窒に必要な嫌気度は菌株によって異なり、*Paracoccus denitrificans* や *Thiobacillus versutus* の様に高い嫌気度を必要とする細菌から、*Alcaligenes* sp. の様に50%程度の嫌気度で脱窒を行う細菌や *Thiosphaera pantotropha* などの様に90%以上の好気条件下においても脱窒を行う細菌も報告されている<sup>45-47)</sup>。これらの細菌は、硝酸リダクターゼ、亜硝酸リダクターゼ、酸化窒素リダクターゼ、亜酸化窒素リダクターゼの4つの酵素を持ち、硝酸を亜硝酸、酸化窒素、亜酸化窒素を経て窒素ガスまでに還元する<sup>48, 49)</sup>(図 1-2C)。これらの酵素の一部を持ち、硝酸を亜硝酸や亜酸化窒素までに還元するが、最終生成物として窒素ガスを生成しない異化的な硝酸還元をする細菌は、さらに多くのものが分離されており<sup>50)</sup>、*Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Halococcus*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Vibrio* など87属もの細菌が報告されている。しかし、窒素ガスを生成しないこれらの細菌は、硝酸呼吸菌などと呼んで、脱窒菌とは区別されている。また、脱窒は、アンモニア酸化とは逆に培養液のpHの上昇をもたらす。

#### 1.1.2.2.3 硝化と脱窒を同時に行う生物種

硝化と脱窒を同時に行う細菌<sup>51-55)</sup>として、*Thiosphaera pantotropha*, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha* などが報告されている。

*Thiosphaera pantotropha* は従属栄養硝化菌と脱窒菌の両方で述べたように、

Table 1-2 Nitrification rate calculated from published batch culture results

Species	Activity (nmol NH <sub>3</sub> min <sup>-1</sup> /mg dry weight)	N-compound used
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12-18	Hydroxamate
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70-90	Hydroxylamine
<i>Aspergillus</i> sp.	33	Pyruvic oxime
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	2.6	Pyruvic oxime
<i>Thiosphaera pantotropha</i>	35.4	Ammonia
<i>Nitrosomonas</i> sp.	130-1550	Ammonia

If other nitrogen compounds were originally used, the results have been re-calculated as though for ammonia.

好気条件下で硝化と脱窒を行うことができる。しかし、細胞当たりの硝化能は、独立栄養硝化細菌の硝化能よりも低く（表 1-2）、好気条件下での脱窒は嫌気条件下での脱窒よりも活性が低い、さらに、亜酸化窒素リダクターゼが酸素により阻害され、窒素ガスではなく亜酸化窒素が大量に発生する可能性があり<sup>56, 57)</sup>、実際の排水処理に適用されるには至っていない。

独立栄養硝化菌である *Nitrosomonas europaea*、*Nitrosomonas eutropha* は、好気条件においては普通にアンモニア酸化を行うが、微好気条件に置かれるとアンモニアを電子供与体として、亜硝酸を電子受容体として使い、微好気的条件下でアンモニアから直接、窒素ガス<sup>58, 59)</sup> や亜酸化窒素など<sup>60-68)</sup> を生成することが報告されている。しかし、消失する窒素量は極めて少なく、細胞の増殖は観察されていない。よって、この硝化と脱窒を同時に行う反応は、独立栄養硝化菌が酸素が不足している環境においても生き残るためのものと考えられている。

さらに、近年、嫌気条件下においても、硝化と脱窒を同時に行う細菌が報告されている<sup>69, 70)</sup>。この細菌は、アンモニアと亜硝酸を組み合わせて窒素ガスを生成する反応（Anammox）を行うものであり、*Planctomycetales* 目に属す独立栄養細菌と同定されている。しかし、従来の微生物学的手法では培養することができず、純粋分離もされていない。さらに、その増殖は極めて遅く、2週間に1回しか分裂しない。そのため、排水処理への適用が期待されているが、実用化の目途はたっていない。

### 1.1.2.3 生物学的処理法を用いた排水処理装置

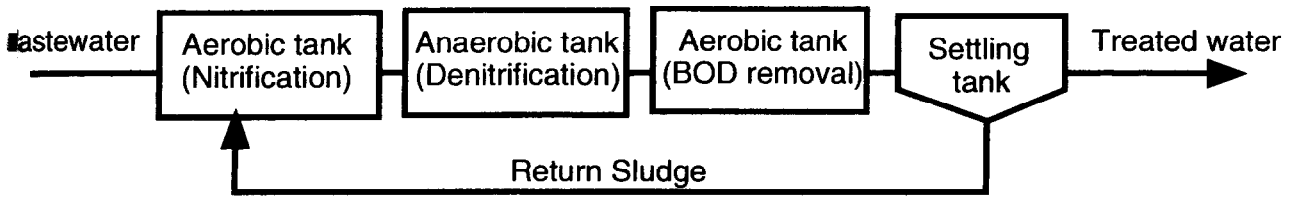
現在、一般的に用いられている生物学的処理法を用いた排水処理装置は、前述した独立栄養硝化菌を好気条件下の反応槽において、脱窒菌を嫌気条件の反応槽において用いるものである<sup>25)</sup>。そして、反応触媒となる硝化菌および脱窒菌などの反応槽内における存在状態や、排水とそれら細菌の接触方法などの違いから、活性汚泥方式、固定床方式、流動床方式などに分けられる。また、これらの方法を組み合わせたものもある。さらに、これらの方式以外にも、さらなる効率化を目指し、包括固定化法を用いた硝化脱窒装置や同時硝化脱窒装置も検討されている。

#### 1.1.2.3.1 活性汚泥方式の処理プロセス

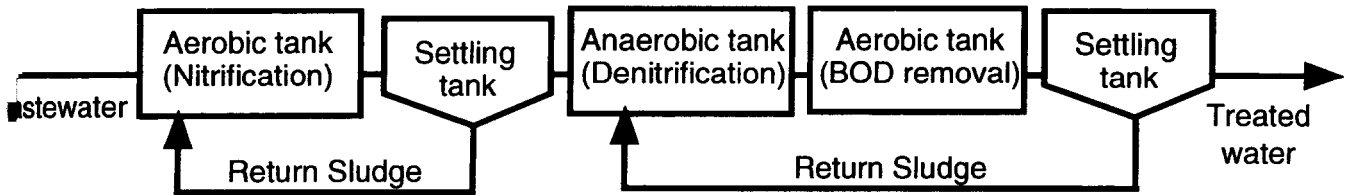
活性汚泥方式は、下水処理場などで使われている一般的な活性汚泥法と同様に、硝化菌および脱窒菌を含んだ汚泥を排水中に分散させ用いる方式であり、さらに、単相活性汚泥方式、2相活性汚泥方式、循環方式、1段硝化脱窒方式などに分けられる<sup>71-73)</sup>。これらの処理方式の中で、最も簡単な処理プロセスは単相活性汚泥法であり、発電所などの窒素含有排水の処理にも用いられている<sup>74, 75)</sup>。その装置構成は、好気槽、嫌気槽に加え、もう一つの好気槽と沈殿槽からなる（図 1-3A）。そして、この装置の処理プロセスは以下の通りである。排水中のアンモニアは、最初の好気槽において、アンモニア酸化菌の働き



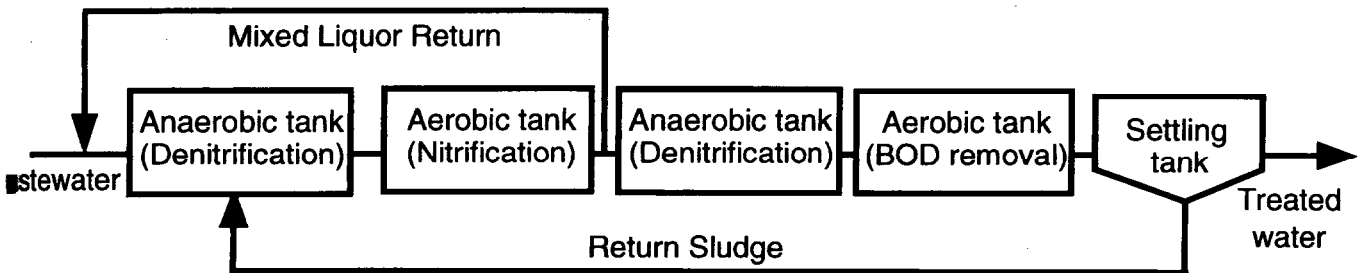
**A) One sludge system**



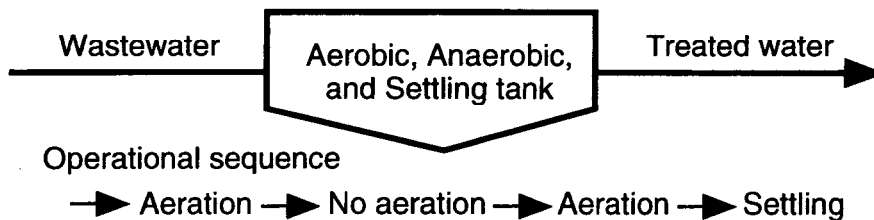
**B) Two sludge system**



**C) Bardenpho system**



**D) Alternating aerobic/anaerobic system**



**FIG. 1-3. Nitrogen removal system using activated sludge**

により亜硝酸に酸化され、生成した亜硝酸の一部は、亜硝酸酸化菌の働きにより硝酸にまで酸化される（硝化）。この硝化過程で反応槽内の pH が低下するため、pH 調整用にアルカリ薬剤が添加される。次に、嫌気槽において、脱窒菌の働きにより、亜硝酸と硝酸は窒素ガスに還元され（脱窒）、排水中から除去される。この嫌気槽において、脱窒菌の電子供与体として、アルコールなどの有機物が排水中に直接添加される。そして、窒素除去後に処理水中に残存する有機物は、もう一つの好気槽により除去される。最後に、沈殿槽により、アンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌、脱窒菌などの微生物を含む汚泥と処理水の分離が行われる。この方法に対し、2 相活性汚泥法（図 1-3B）は硝化と脱窒の個々のプロセスを 1 段階ずつ完結させるため、独立栄養硝化菌の様に増殖速度の遅い細菌を汚泥内に維持することが容易となり、安定な条件で処理が行えるものである。しかし、沈殿槽と汚泥の返送がそれぞれ必要なため、敷地面積が大きくなり、設備費、処理コストが高くなる。また、循環方式（図 1-3C）は、硝化で低下した pH を調整するアルカリ剤および脱窒に必要な電子供与体を節約するため、排水中に含まれる有機物質を利用するものであり、下水処理や食品工場排水などの有機物濃度の高い排水から窒素除去を行う場合に用いられている。しかし、循環運転ではアンモニアの除去率を高くできないため、嫌気槽を追加して除去率を向上させる必要があり、処理プロセスは非常に複雑となる。これらの好気槽と嫌気槽をそれぞれ硝化と脱窒のために用いている方法に対し、1 段階硝化脱窒方式（図 1-3D）は、好気槽、嫌気槽、沈殿槽を兼ねる曝気槽 1 つからなる<sup>76-78)</sup>。そして、排水の注入、曝気、嫌気攪拌、有機物質注入、沈殿、放流のプロセスを順番に行う。この方式では、1 つの反応槽だけですむため、敷地面積が小さい利点があるが、排水の性状や処理状況に合わせて運転プロセスを綿密に制御する必要があり、複雑な操作が必要となる。

以上述べたように、活性汚泥方式には様々な方式があるが、その中で最も簡単な処理プロセスである単相活性汚泥方式の処理装置においても、多くの反応槽を組み合わせ、pH 調整、脱窒のための電子供与体の添加とその除去などの制御を行う必要がある。また、1 段階硝化脱窒方式の装置においても、反応槽は 1 つであるが、好気と嫌気条件の制御、pH 調整、脱窒のための電子供与体の添加とその除去などの制御は必要である。さらに、この方式では、好気から嫌気へ、または嫌気から好気への切り替えの際、アンモニア酸化菌にとって酸素が不足する状態や、脱窒菌にとって嫌気度が低い状態が生じてしまう。このような微好気な状態において、アンモニア酸化菌<sup>60-68)</sup>、脱窒菌<sup>47-51)</sup>がともに亜酸化窒素を放出することが報告されている。亜酸化窒素は、二酸化炭素の百倍の効果を持つ温室効果ガスであり、現状では亜酸化窒素の発生に対し規制は無いが、このような温室効果ガスの発生は今後大きな問題になると考えられる。

#### 1.1.2.3.2 固定床および流動床方式の処理プロセス

前述したように、独立栄養硝化菌の増殖速度は著しく遅いため、反応槽内に高密度に維持することは難しい。そのため、これらの細菌を反応槽内に充填す

る濾材と呼ばれる基盤に付着させて用いる固定床方式と流動床方式の装置がある<sup>25, 73)</sup>。これらの方式は、有機物除去などにも用いられ、固定床方式は散水濾床法や浸漬濾床法として古くから用いられているものである。しかし、窒素除去装置においては、脱窒槽に用いられる場合もあるが、多くは硝化槽のみにこれらの方式が適用されることが多い。

固定床方式は、反応槽内に固定した濾材の表面に硝化菌を吸着させ、硝化菌を含む生物膜を使って硝化を行うものである<sup>79)</sup> (図 1-4A)。濾材には、様々な物が用いられるが比表面積の大きいプラスチック製の波板やハニカムチューブと呼ばれるものが用いられる。しかし、長期間使用した場合、濾材を充填した反応槽が閉塞したり、硝化菌の生物膜が他の従属栄養細菌などに覆われて活性が低下する問題や、生物膜が剥がれ落ちるなどの問題が指摘されている。

流動床方式は、比表面積の大きいビーズ状の多孔質の濾材に硝化菌を含む生物膜を形成させ、その濾材を反応槽内で攪拌し流動させるものである<sup>80, 81)</sup> (図 1-4B)。この方式は固定床方式よりも単位容積当たりの生物量を多くとれ、高い浄化能力を維持できる。また、塔型などの反応槽が用いられるため、設置面積を小さくできる利点がある。しかし、固定床方式と同様に濾材表面に付着した生物膜を用いているため、激しい攪拌によって生物膜が剥がれ落ちたり、生物膜が他の従属栄養細菌などに覆われ活性が低下する問題点がある。

#### 1.1.2.3.3 包括固定化法を用いた硝化脱窒装置

独立栄養硝化菌を生物膜のように剥がれやすい形態ではなく、より安定した状態で反応槽内に維持するため、これらの細菌を濾材に積極的に固定化する技術の検討も行われている<sup>82, 83)</sup>。この微生物の固定化は、医薬、食品などの分野で積極的に研究が進められ、微生物以外にも酵素、動物細胞、オルガネラなどの固定化が行われている。固定化法としては、担体結合法、架橋法、包括法、マイクロカプセル法などが考案 (図 1-5) されており、これらの方法の中で排水処理分野においては担体結合法<sup>84-86)</sup> と包括法<sup>87-97)</sup> が用いられている。前述の固定床や流動床方式に用いる生物膜は担体結合法に分類されるものである。一方、包括法は、アクリルアミドやポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなどの高分子樹脂の格子内部に細胞を生きたまま閉じ込め利用するものである。この包括法は、微生物の固定化操作に要するコストが高いため、独立栄養硝化菌にのみ適用される場合が多く、*Nitrosomonas europaea*、*Nitrobacter winogradskyi*、硝化菌を含む汚泥などを固定化した球状やキュービック状の担体を、生物膜の付着しただけの濾材の代わりに曝気槽に投入して流動床方式で用いられている。しかし、酸素やアンモニアなどが供給が担体表面のみに限られるため、内部の硝化菌は活性を失ってしまう。そのため、包括法で作製した濾材の活性は、多孔質の濾材表面に硝化菌の生物膜を形成したものとほとんど変わらないことが指摘されている。また、硝化菌を固定化した高分子樹脂が新たに形成される従属栄養細菌などの生物膜に覆われてしまい活性が低下する問題もあり、高いコストをかけて包括法を用いる必要性は低いと考えられている。



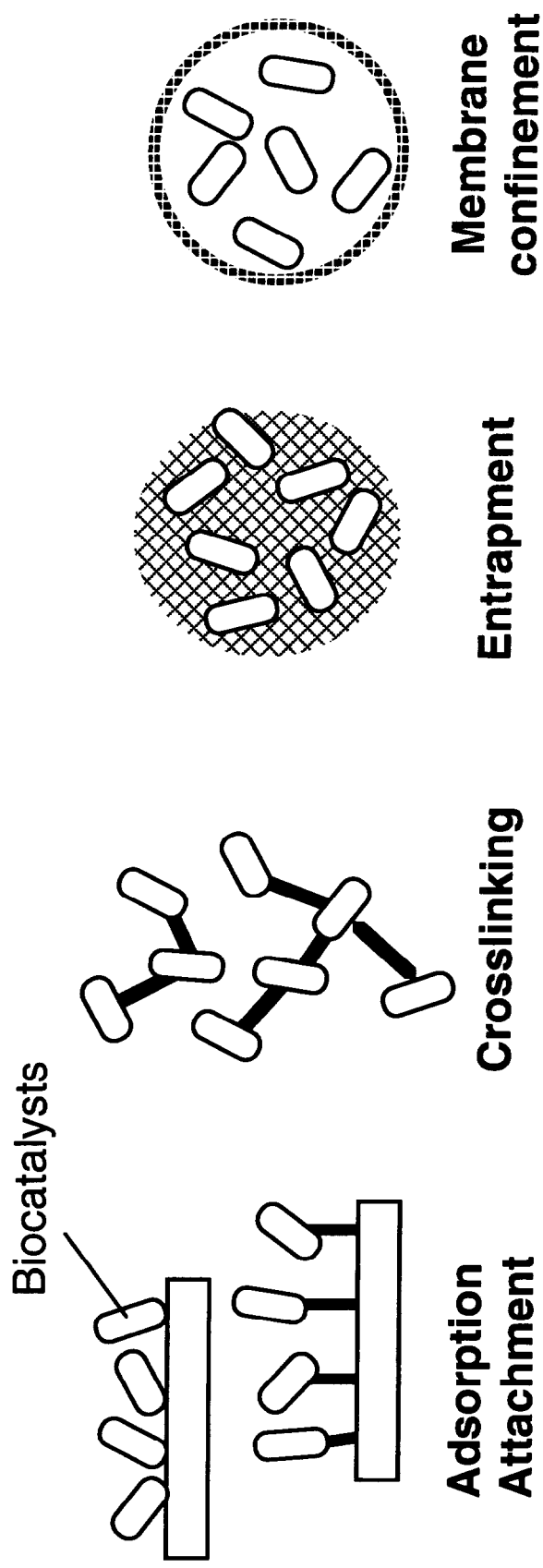


FIG. 1-5. Various methods of immobilized biocatalysts

#### 1.1.2.3.4 同時硝化脱窒装置

硝化と脱窒を同時に行う細菌や1つの反応槽で硝化と脱窒を行う1段硝化脱窒方式を前に述べたが、これらの方法とは異なり、独立栄養硝化菌と脱窒菌を用いて複雑な反応槽の運転制御を行わない同時硝化脱窒装置も検討されている<sup>98-102)</sup>。この方法では、独立栄養硝化菌と脱窒菌を一緒に包括固定化したビーズ状の高分子樹脂の担体を流動床方式で用いるものである。包括固定化法の項目で述べたように、高分子樹脂内部では、その表面付近しか酸素が届かないため、担体内部のほとんどは嫌気な状態となる。そのため、好気条件下の担体表面において硝化を、嫌気条件下の担体内部において脱窒を行うことが可能となる(図 1-6)。これまでに、独立栄養硝化菌 *Nitrosomonas europaea* と脱窒菌 *Paracoccus denitrificans* を光硬化性樹脂などで包括固定化したビーズを用いて、この装置について検討が行われている。排水中のアンモニアは特別な操作無しに窒素ガスとして除去できることから、大幅に装置と処理プロセスの簡素化が図れることが期待できる。しかし、担体内部の脱窒菌は電子供与体となる有機物を必要とするため、アルコールなどの有機物を好気槽に直接添加する必要がある。この有機物質の添加は、他の従属栄養の微生物による酸素と電子供与体の浪費を招くとともに、長期間使用した場合、担体表面にそれら微生物が生物膜を形成し、ゲル内部が機能しなくなる可能性も考えられる。さらに、1段硝化脱窒方式と同様に、硝化と脱窒を同時に行う条件下では、好気状態および嫌気状態が不完全となり、硝化菌<sup>60-68)</sup>、脱窒菌<sup>47-51)</sup> がともに亜酸化窒素を放出する可能性が高いなどの問題点があり、実用化されるまでには至っていない。

#### 1.2 本論文の目的

排水中に含まれるアンモニアなどの窒素化合物は様々な環境問題を引き起こしており、効率の良い小型で簡便な処理プロセスからなる窒素除去装置の開発が求められている。しかし、大量の排水を安価に処理でき、幅広く適用されている実績のある生物学的処理法に関しても、前述のように、多くの反応槽を有する複雑な装置であり、処理プロセスも複雑である問題を有している。本論文では、物理化学的処理法と比較して優れた特徴を持つ生物学的処理法の利点を生かし、かつ簡便な処理プロセスからなる新しい窒素除去バイオリアクターを開発することを目的とし、以下の項目について検討する。

- 1) 生物学的処理法における複雑な処理プロセス(硝化と脱窒など)を単純化するため、アンモニア酸化菌と脱窒菌を固定化したチューブ状ゲルについて検討する。
- 2) チューブ状ゲル内部におけるアンモニア酸化菌と脱窒菌の分布状態を解析するとともに、その分布を改変することにより、ゲルの浄化能力向上を図る。
- 3) ゲルの形状を改変することにより、リアクターに充填するゲルの充填率を

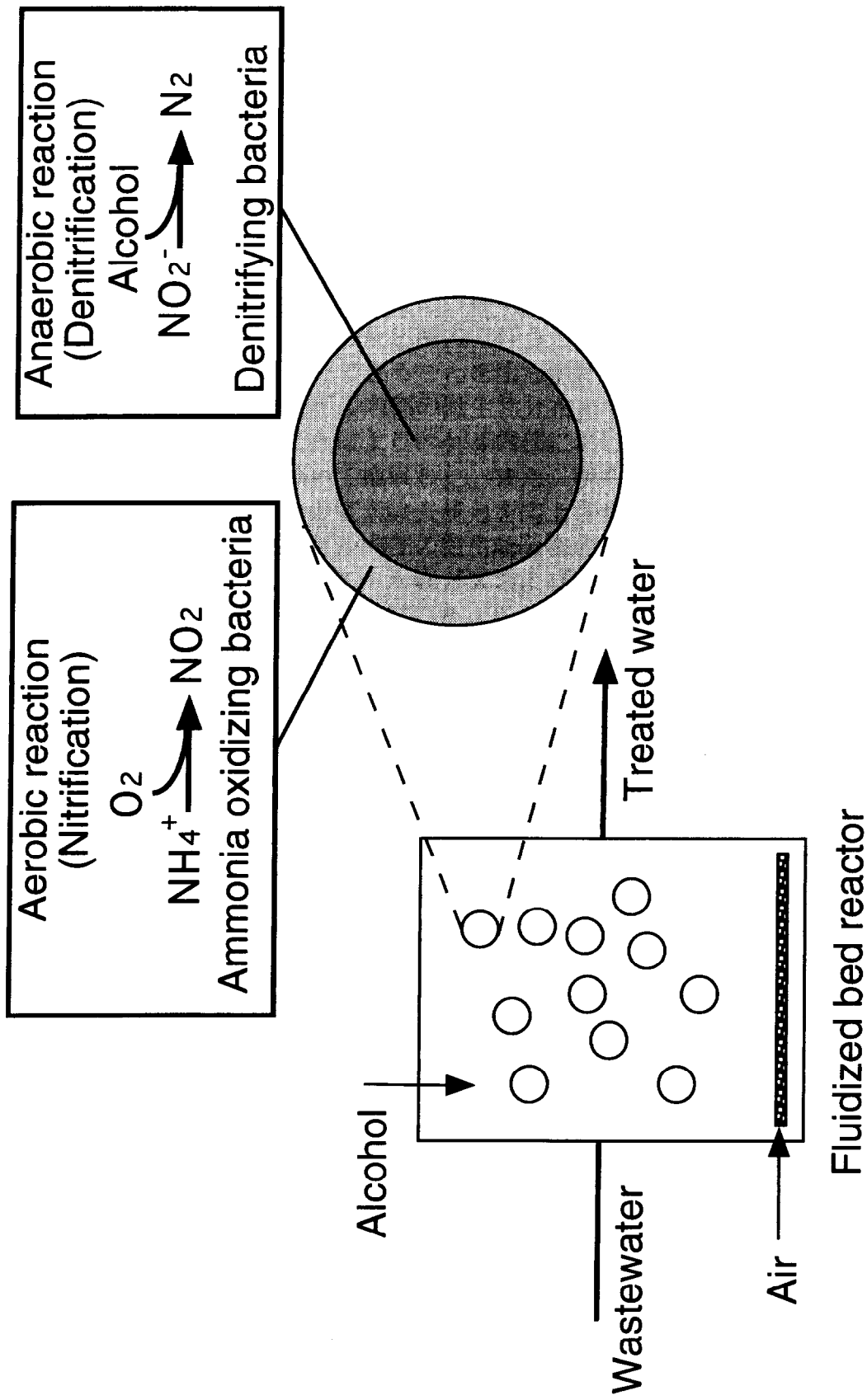


FIG. 1-6. Simultaneous nitrification and denitrification system

上げ、リアクター容積当たりのゲル表面積の増大によりリアクターの浄化能力向上を図る。

- 4) 本窒素除去バイオリアクターが、様々な実排水の処理に適用可能であることを明らかにする。

### 1.3 本論文の構成と内容

本論文は、第1章「序論」を含み7章から構成される(図1-7)。

第2章「チューブ状ゲルを用いた窒素除去法」では、窒素除去のための複雑な処理プロセスを単純化するため、好気の微生物反応である硝化と嫌気の微生物反応である脱窒を一つの反応槽内で行うことが可能なチューブ状ゲルの概念を提案し、実際に単純化できることを明らかにした。

第3章「チューブ状ゲル内部の微生物分布」では、チューブ状ゲル内部の微生物分布を解析することにより、ゲル内部における好気と嫌気の微生物反応が起こっている領域について推察した。また、明らかになったゲル内部の微生物分布から、リアクターの窒素除去能力を向上させる方法について考察した。

第4章「チューブ状ゲル内部の微生物分布の改変」では、チューブ状ゲルの浄化能力向上を目的として、水素ガスおよび酸素ガスを使用することによりゲル内部の微生物分布の改変を試みた。そして、微生物分布の変化とチューブ状ゲルの活性との関係について考察した。

第5章「封筒状ゲルを用いたバイオリアクターによる窒素除去」では、リアクターの浄化能力を向上させるため、チューブ状ゲルと同等の機能を持ち、かつリアクターへの高密度での充填が可能な封筒状ゲルを作製した。この封筒状ゲルを用いることにより、容積当たりのゲル表面積を大きくしたリアクターの窒素除去能力について検討した。

第6章「プレート型バイオリアクターによる実排水の処理」では、封筒状ゲルと同様に、容積当たりのゲル表面積が大きい構造のリアクターを膜状ゲルを積層することにより作製した。そして、本リアクターが様々な分野に幅広く適用できることを明らかにするため、高濃度のアンモニア排水として発電所の実排水を、低濃度のアンモニア排水として水生生物飼育装置の飼育水を処理することを試み、本リアクターの有効性について検討した。

第7章「総括」では、本論文で得られた結果を総括するとともに、今後、検討すべき課題について述べた。



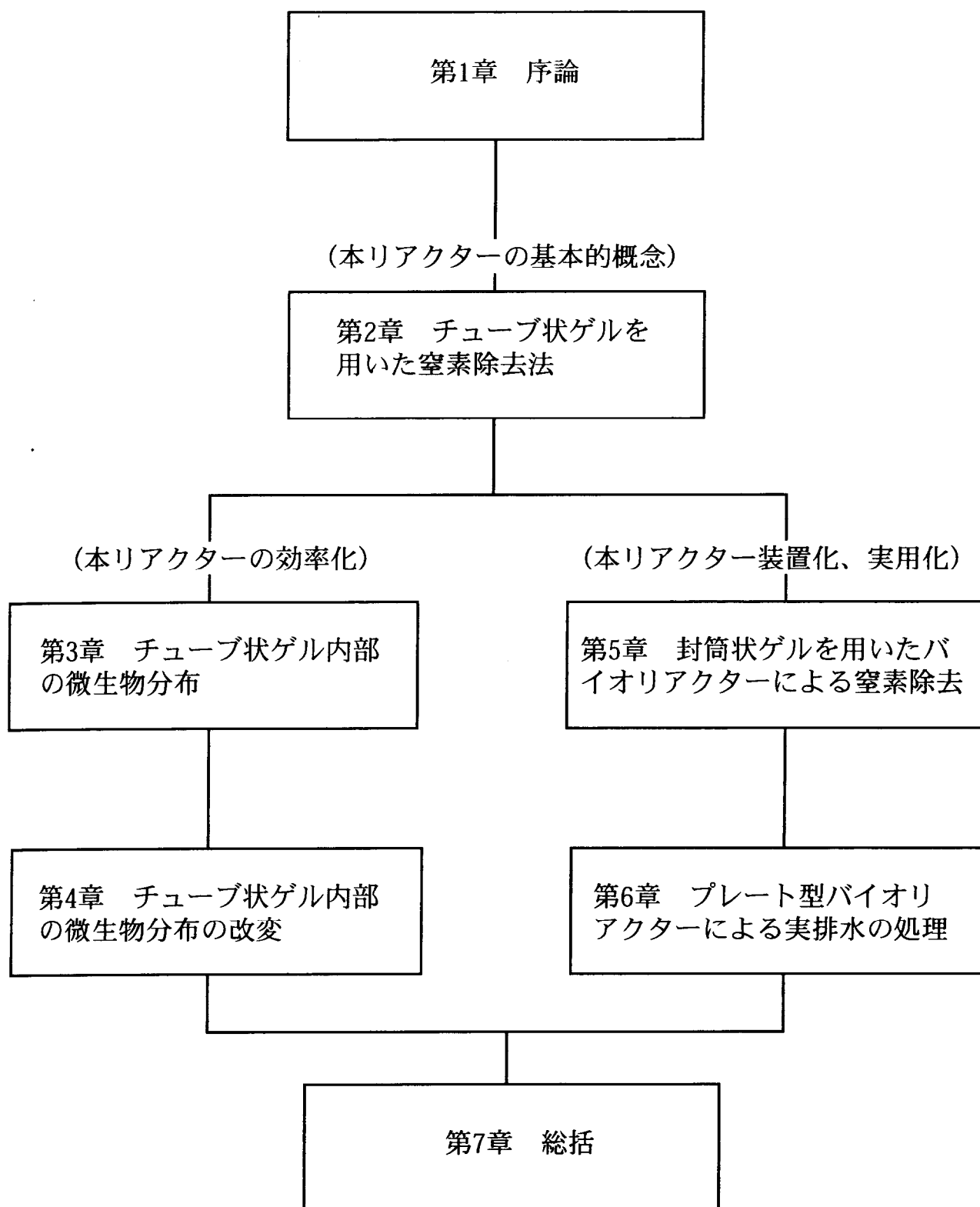


図1-7 本論文の構成

## 第2章

### チューブ状ゲルを用いた窒素除去法

既存の窒素除去技術の問題点を解決するため、硝化と脱窒を同時に行うことができるチューブ状ゲルを用いた新しい窒素除去バイオリクターを提案し、その窒素除去能力について検討する。

## 2.1 緒言

生物学的処理法を用いた窒素除去装置を効率化するため、独立栄養硝化菌や従属栄養硝化菌を用いた好気条件下の硝化と嫌気条件下の硝化、そして、好気条件下の脱窒と嫌気条件下の脱窒などの様々な微生物学的な研究が進められている。また、硝化と脱窒のプロセスを様々な組み合わせで、処理装置の効率化や処理コストの低下などが図られている。しかし、硝化と脱窒のプロセスを様々な組み合わせた方式では、好気槽、嫌気槽などの複数の反応槽と複雑な処理プロセスが必要であり、硝化と脱窒を同時に行う方式では、好気状態および嫌気状態が不完全となり、硝化菌、脱窒菌がともに亜酸化窒素を放出する問題などがある。

本章では、独立栄養硝化菌を反応槽内に高濃度化することと硝化と脱窒の同時処理の観点から、アンモニア酸化菌 *Nitrosomonas europaea* と脱窒菌 *Paracoccus denitrificans* を包括固定化した膜状またはチューブ状の高分子ゲルを作製した。そして、これらの膜状およびチューブ状ゲルが有する表と裏の2つのゲル面を利用することにより、亜酸化窒素が発生することなく硝化と脱窒を同一反応槽内で行える新しい窒素除去の概念を提案する。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 供試菌株とその培養

アンモニア酸化菌として *Nitrosomonas europaea* IFO-14298、脱窒菌として *Paracoccus denitrificans* JCM-6892 を用いた。培養には、*N.europaea* は IFO Medium List No. 240、*P.denitrificans* は JCM Medium List No. 22 (Nutrient agar No.2) を基本とした液体培地 (表 2-1) を用いた。それぞれ 30℃ で振とう (110 rpm) 培養後、遠心分離 (20,000 × g、4℃、10 min) により集菌し、リン酸緩衝液 (9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.5) により3回洗浄した。洗浄菌体は、*N.europaea* は 8 mg dry wt./mL、*P.denitrificans* は 33 mg dry wt./mL になるようそれぞれリン酸緩衝液に懸濁した。

### 2.2.2 固定化方法

光硬化性樹脂 PVA-SbQ (SPP-H-13、東洋合成工業製) 9 mL に対し、前述の *N.europaea* の懸濁液 1 mL、*P.denitrificans* の懸濁液 2 mL を混合し固定化した。*N.europaea* を単独で固定化する場合は、*P.denitrificans* の懸濁液の代わりにリン酸緩衝液 2 mL を添加した。菌体と樹脂の混合液は、プラスチックシャーレまたはガラス棒を入れたガラス管を鋳型として用い、1時間のメタルハロゲンランプによる光照射 (光強度 1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) により、膜状 (直径 50 mm、厚さ 5 mm) またはチューブ状 (直径 12 mm、内径 5 mm、長さ 125 mm) に成形した。チューブ状ゲルは、ゲル内部にエタノール溶液を供給するため、直径 4 mm、内径 2 mm のシリコンチューブをチューブ状ゲルの前後に光硬化性樹脂を用いて接着した。

Table 2-1 Media for cultivating *N.europaea* and *P.denitrificans*

Medium for <i>N.europaea</i>		Medium for <i>P.denitrificans</i>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g/l	Peptone	10 g/l
NaCl	0.3 g/l	Meat extract	10 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g/l	NaCl	5 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.3 g/l		(pH 7.0~7.2)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.03 g/l		
Phenol red*1	2 mg/l		
	(pH 8.0)		

\*1 Phenol red was used to indicate pH in medium. The pH was adjusted by adding K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### 2.2.3 膜状ゲルによる窒素除去

*N.europaea* を単独で固定化した膜状ゲル、または *N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルを用いて、アンモニアを含んだ模擬排水の処理を行った。実験装置の模式図を図 2-1A に示す。実験は、30℃の条件下で行い、エアレーション (100 mL/min) とスターラーによる攪拌 (300 rpm) を行った。実験に用いた模擬排水は、0.944 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、trace element 溶液 (ZnSO<sub>4</sub> 100 mg/L、MnCl<sub>2</sub> 30 mg/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 300 mg/L、CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 200 mg/L、CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10 mg/L、NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 20 mg/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 30mg/L) 1 mL/L を添加した 200 mL 溶液 (pH 7.8) を用い、経時的に排水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度を測定した。

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルについては、脱窒のための電子供与体としてエタノールを添加した。エタノールの添加方法は、排水中に 99.5 %エタノール 0.5 mL (最終濃度 0.25 %) を直接添加する方法と、膜状ゲルの裏側 (シャーレとの間隙) に注入した 5 mL のリン酸緩衝液に、24 時間毎に 99.5 %エタノールを 0.125 mL (4日間の総添加量 0.5 mL) を添加する方法の 2 通りで行った。

### 2.2.4 チューブ状ゲルによる窒素除去

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて、アンモニアを含んだ模擬排水の処理を行った。実験装置の模式図を図 2-1B に示す。実験は膜状ゲルの場合と同様の条件下で行い、実験に用いた模擬排水も同様のものを用いた。そして、経時的に排水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸、TOC 濃度を測定した。なお、チューブ内部では 99.5%エタノール 0.1 mL を添加した 10 mL のリン酸緩衝液 (エタノール濃度 1.0 % v/v) が循環するようにポンプを設定 (5 mL/h) した。エタノール溶液は、実験開始時に窒素ガスを用いて曝気し、酸素を除去した後実験に用いた。また、発生ガスは捕集し、組成を分析した。

### 2.2.5 分析方法

排水中のアンモニア、亜硝酸濃度は、それぞれインドフェノール青吸光光度法、ナフチルアミン吸光光度法により測定した<sup>103)</sup>。硝酸濃度はイオンクロマトアナライザ (IC-500P、横河電機製)、TOC 濃度は燃焼-赤外線式全有機炭素分析計 (TOC-500、島津製作所製)、発生ガスの組成については PID 検出器付ガスクロマトアナライザ (G-3000、日立製作所製) により分析した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 膜状ゲルによる窒素除去

*N.europaea* を固定化した膜状ゲル、または *N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルを用いて、アンモニアを含んだ模擬排水の処理を行った。*N.europaea* を固定化した膜状ゲルにおいては、排水中のアンモニア濃度は時間

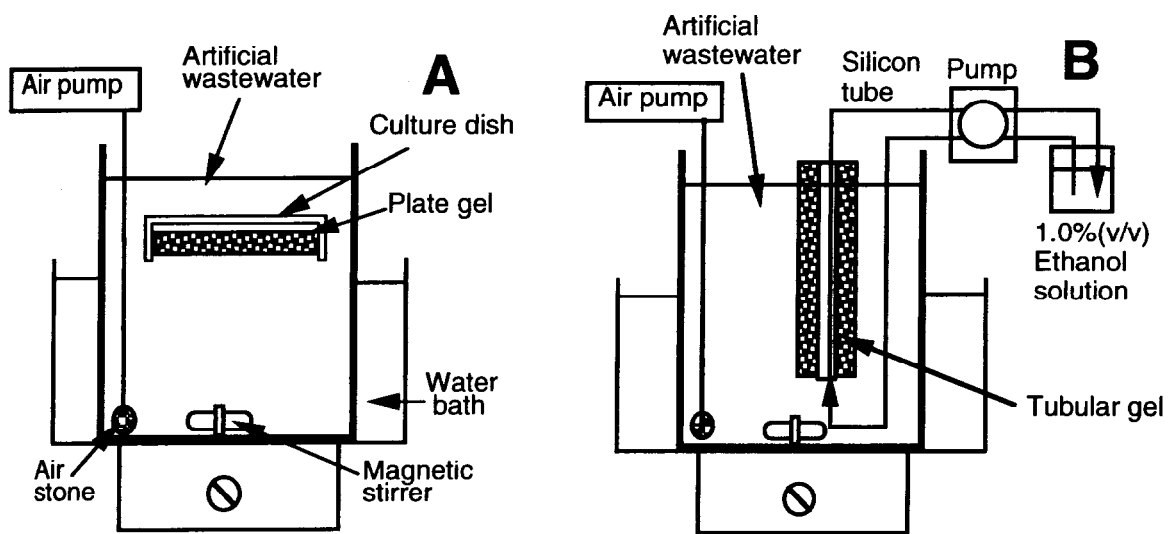


FIG. 2-1. Schematic diagrams of experimental apparatus with plate gel (A) and tubular gel (B) in batch system.

の経過とともに減少し、亜硝酸濃度が上昇した（図 2-2A）。一方、*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルにおいては、排水中のアンモニア濃度は時間の経過とともに減少したが、亜硝酸濃度の上昇は小さく、実験終了時にはアンモニアとともに消失した（図 2-2B）。エタノールの供給方法（排水中に直接添加した場合、または膜状ゲルとシャーレの間に添加）を変えても、アンモニア、亜硝酸の濃度変化は同様の傾向を示した。また、硝酸については、実験途中および実験終了時において、全ての実験区において検出されなかった（ $<0.05$  mg-N/L）。

実験開始から 13.5 時間経過後の排水中のアンモニア、亜硝酸濃度から算出されたアンモニア酸化速度（硝化のみの速度： $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ ）と窒素除去速度（硝化と脱窒の速度： $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ ）を表 2-2 に示す。アンモニア酸化速度は、*N.europaea* を単独で固定化した膜状ゲルの場合よりも *N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルの方が高かった。また、*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルにおいて、エタノールの供給方法を変えた場合もアンモニア酸化速度と窒素除去速度に違いが認められなかった。

### 2.3.2 チューブ状ゲルによる窒素除去

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて、チューブ内にエタノール溶液を循環させ、膜状ゲルと同様にアンモニアを含んだ模擬排水の処理を行った。*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルの場合と同様に、排水中のアンモニア濃度は時間の経過とともに減少した。亜硝酸濃度は 2 日目以降に若干上昇したが、実験終了時にはアンモニアとともに消失した（図 2-3）。また、排水中から硝酸は検出されなかった（ $<0.05$  mg-N/L）。排水中の TOC 濃度は、実験開始時から上昇し、実験終了時には 58 mg-C/L となった（図 2-4）。脱窒によるガス発生は、実験期間中、チューブ内部において観察されたが、チューブ外部においては観察されなかった。また、収集したガスの組成について、窒素は検出されたが、脱窒反応の中間生成物である亜酸化窒素は検出されなかった（ $<1$  ppm）。

## 2.4 考察

本実験において、アンモニア酸化菌 *N.europaea* と脱窒菌 *P.denitrificans* を固定化した光硬化性高分子ゲルを用いることにより、硝化と脱窒が同時に起こることが明らかになった（図 2-2、図 2-3）。*N.europaea* は好気条件下においてアンモニアを酸化するのに対し、*P.denitrificans* は、脱窒のために高い嫌気度を必要とする<sup>104, 105)</sup>。従って、ゲルの外側表面と内部に、それぞれ硝化と脱窒に適した環境がつけられたものと考えられる。硝化と脱窒を同時に行った実験としては、国府田ら<sup>100)</sup>の報告などがある。彼らは、高分子電解質複合体を用いてビーズ状固定化担体を作製し、硝化と脱窒が同時に行えたことを報告している。これらのことから、高分子ゲルの種類および形状に関わらず、ゲル内部において酸素の拡散速度が低いことを利用して、好気と嫌気反応を行うことは

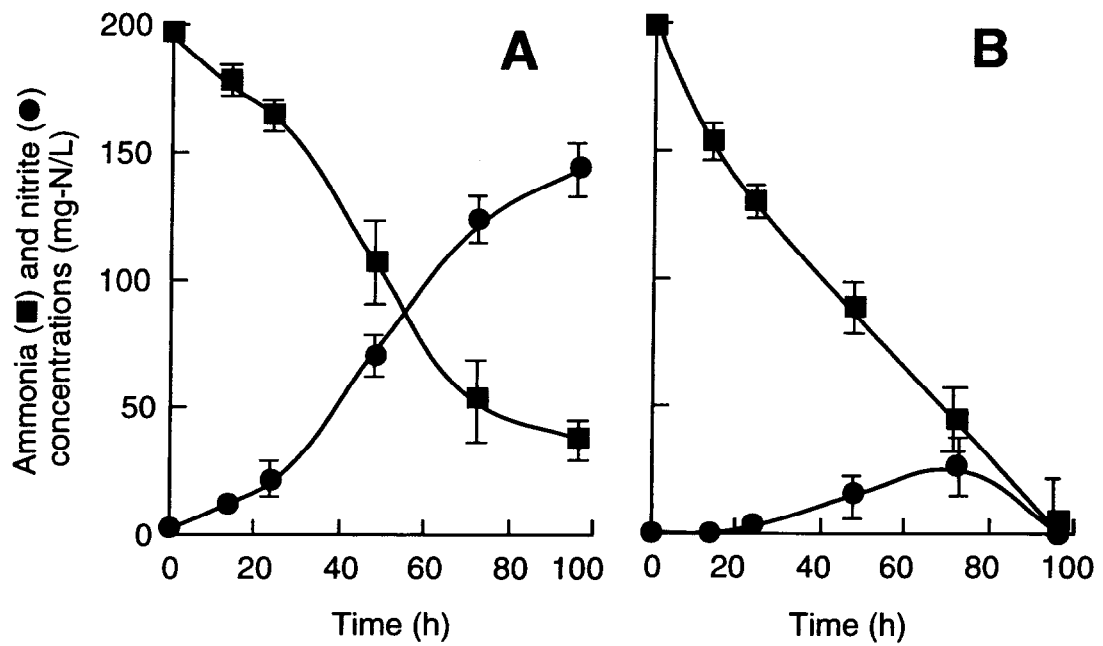


FIG. 2-2. Changes of ammonia and nitrite concentrations in wastewater. The wastewater was treated with the plate gels. The plate gel contained *N.europaea* (A), or *N.europaea* and *P.denitrificans* (B). Bars show standard deviation (n=3).



Table 2-2 Rates of ammonia oxidation and nitrogen removal by immobilized cells

Immobilized cells	Ammonia oxidation rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) (g-N per day for 1m <sup>2</sup> of gel surface)	Nitrogen removal rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ )
Immobilized cells <i>N.europaea</i>	1.82 ± 0.31	0.71 ± 0.27
Co-immobilized cells <i>N.europaea</i> + <i>P.denitrificans</i> *1 (EtOH + Medium)	5.42 ± 0.57	5.39 ± 0.56
<i>N.europaea</i> + <i>P.denitrificans</i> *2 (EtOH / Medium)	5.17 ± 0.21	5.16 ± 0.20

Rates were calculated based on changes in ammonia and nitrite concentrations over the initial 13.5 h of the experiments. Values are expressed as the mean ± SD (n=3 or 4)

\*1 Ethanol was directly added to the wastewater.

\*2 Ethanol was injected into the space between the gel and the culture dish.

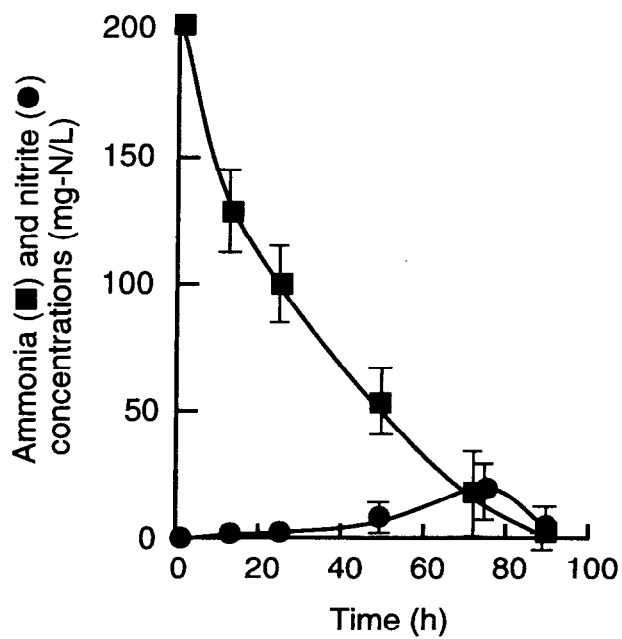


FIG. 2-3. Changes of ammonia and nitrite concentrations in wastewater. The wastewater was treated with the tubular gel. The tubular gel contained *N.europaea* and *P.denitrificans*. Bars show standard deviation (n=3).

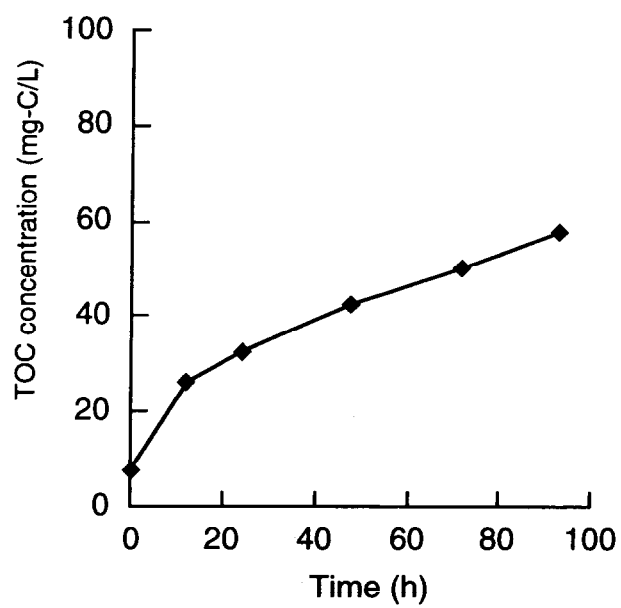


FIG. 2-4 Accumulation of TOC in wastewater treated with tubular gel.

可能であると考えられる。

アンモニア酸化菌と脱窒菌の同時固定化は、硝化と脱窒が同時に行えるだけでなく、さらに多くの利点を有していると考えられる。従来の生物学的処理法では、アンモニア酸化菌とともに亜硝酸酸化菌も存在するため、アンモニアは亜硝酸を経て硝酸まで酸化され、その後、硝酸は亜硝酸を経て窒素ガスへと脱窒菌により還元される。これに対し、本実験では、硝酸は検出されておらず、アンモニアから亜硝酸を経て窒素ガスへ変換されたものと考えられる。亜硝酸と硝酸の間の酸化還元反応には、酸素とエタノールが余分に消費されることから、アンモニア酸化菌と脱窒菌のみを固定化した本実験の方が窒素除去の効率が良いものと考えられる。また、同時固定化した場合、*N.europaea* を単独で固定化した場合よりも硝化活性が向上したこと（表 2-2）から、*N.europaea* の反応生成物である亜硝酸が *P.denitrificans* によって速やかに除去される環境、すなわち、アンモニアから亜硝酸を経て窒素ガスに変換される反応が、ゲル内部において速やかに行われているものと考えられる。本現象は、国府田ら<sup>100)</sup>によっても報告されている。さらに、硝化反応では pH が低下し、脱窒反応では pH が上昇するため、それぞれ pH 調整が必要であるが、硝化と脱窒反応を同時に行うことにより、pH 調整に必要な薬剤を低減できるものと考えられる。

膜状ゲルまたはチューブ状ゲルを用いたバイオリアクターは、ゲルが表と裏の 2 つの面を持つ特徴を有する。このことは、ゲルの一方の面からアンモニアと酸素を、他方の面からエタノールを供給することにより、ゲル内部の環境を容易に好気と嫌気部分に制御できることを示すものである。本実験においては、ゲルの一方の面からアンモニア、酸素、エタノールを供給した場合においても、ゲルの一方の面からアンモニアと酸素を、他方の面からエタノールを供給した場合においても、硝化と脱窒が観察され、その硝化と脱窒速度に違いは見られなかった（表 2-2）。しかし、長期的にゲルの一方の面からアンモニア、酸素、エタノールを供給した場合、ゲル膜表面に生物膜が生成する問題や、エタノールが好氣的に利用され酸素が浪費されること、さらに亜酸化窒素の発生といった問題が生じると考えられる。ゲルの一方の面からアンモニアと酸素を、他方の面からエタノールを供給した場合、これらの問題の発生を回避できることから、ゲルの 2 つの面を利用する本概念は、窒素除去プロセスにとって極めて有効であると考えられる。

既存の処理装置は、排水中に直接エタノールなどの有機物を添加し、窒素を除去した後に処理水中に残存するエタノールを取り除く必要があった。これに対し、チューブ状ゲルを用いたリアクターは、処理水中に直接エタノールを添加しないため、ゲル内部でエタノールが消費されるよう設定すれば、残存エタノールの除去が不要なシステムが可能になると考えられる。本実験では、処理水中にエタノールや増殖した菌体などの漏れ出しと推察される有機物の蓄積が観察された（図 2-4）。しかしながら、本実験でチューブ内を流したエタノール（0.1% v/v 溶液 10 mL）は 26 mg-C に相当し、100 mg-N/L 濃度のアンモニア溶液 200 mL（20 mg-N）を脱窒するのに必要なエタノール量の理論値 16.5

mg-C よりも高い値となっている。従って、エタノール濃度および循環流量を最適化することにより、エタノールおよび菌体の漏れ出しを抑制でき、有機物除去のための好気槽が不要な装置も可能となると考えられる。

## 2.5 本章のまとめ

アンモニア酸化菌 *N.europaea* と脱窒菌 *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いることにより、以下に示すように窒素化合物を効率的に除去できる新しいバイオリアクターの概念を示すことができた。

- 1) アンモニア酸化菌と脱窒菌を固定化したチューブ状ゲルは、硝化と脱窒を同一反応槽内で行うことが可能であった。
- 2) アンモニア酸化菌と脱窒菌を固定化したゲルの活性は、アンモニア酸化菌だけを単独で固定化したゲルの活性よりも高く、ゲル内部においてアンモニアから亜硝酸を経て窒素ガスに変換される反応が速やかに行われている状況にあると考えられる。
- 3) チューブ状ゲルを用いたリアクターは、処理水中に直接エタノールを添加しないため、ゲル表面に生物膜が発生する問題や亜酸化窒素が発生するなどの問題が無く、ゲル内部でエタノールが消費されるよう最適量に設定すれば、残存エタノールの除去も不要になると考えられる。

## 第3章

### チューブ状ゲル内部の微生物分布

硝化と脱窒を同時に行うチューブ状ゲル内部の微生物分布を観察することにより、ゲル内部において起こっている窒素除去の微生物反応を解析する。

### 3.1 緒言

第2章において、アンモニア酸化菌と脱窒菌を固定化したチューブ状ゲルを用いることにより、一つの反応槽内において好気と嫌気の微生物反応を行い、窒素化合物を効率的に除去できる新しいバイオリアクターを提案することができた。そして、チューブ状ゲルの外側表面においてアンモニア酸化菌によるアンモニアの亜硝酸への酸化反応が、ゲル内部において脱窒菌による亜硝酸の窒素ガスへの還元反応が起こっているものと推察された。

本章では、チューブ状ゲル内部の微生物分布を蛍光抗体法を用いて観察することにより、ゲル内部において起こっている窒素除去の微生物反応を解析した。また、ゲル内部の微生物濃度とチューブ状ゲルの活性の経時変化について検討し、チューブ状ゲルを用いたリアクターの活性を向上させる方策について考察した。

### 3.2 材料と方法

#### 3.2.1 供試菌株とその固定化方法

アンモニア酸化菌 *N.europaea* および脱窒菌 *P.denitrificans* の培養および固定化操作は、第2章と同様に行い、光硬化性樹脂 PVA-SbQ を用いてチューブ状ゲル（直径 12 mm、内径 5 mm、長さ 125 mm）を作製した。

#### 3.2.2 模擬排水の組成とその連続処理

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて、100 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水の連続処理を行った。実験には、チューブ状ゲルを充填した容量 100 mL のリアクターを用い、エアレーション（100 mL/min）により酸素の供給と攪拌を行い、温度は恒温槽により 30℃とした。模擬排水は、15 mL/h の流速でポンプを用いて注入し、オーバーフローするように設定した（図 3-1）。実験に用いた模擬排水は、第2章で用いたものと同じ組成のものを使用し、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  濃度のみ 0.472 g/L とした。また、脱窒反応の電子供与体として 0.5 % (v/v) のエタノール溶液 100 mL がチューブ内部を循環するようにポンプを設定（5 mL/h）した。エタノール溶液は、前述のリン酸緩衝液にエタノールを添加したものであり、1 週間毎に交換した。そして、33 日間、経時的にオーバーフローした処理水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度を測定した。アンモニア、亜硝酸、硝酸濃度の分析は、それぞれ第2章に示した方法により行った。

#### 3.2.3 蛍光抗体法によるゲル内部の微生物染色

模擬排水の連続処理を行ったチューブ状ゲルについて、内部に固定化した *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布状態を、蛍光抗体法を用いて検討した。チューブ状ゲルは、実験開始時（固定化直後）、4 日目、10 日目、33 日目（実験終了時）にその一部をサンプリングし、Hunik らの方法<sup>106)</sup>に従い、パラホルムアルデヒドによる固定、エタノールによる脱水、ポリエチレングリコール

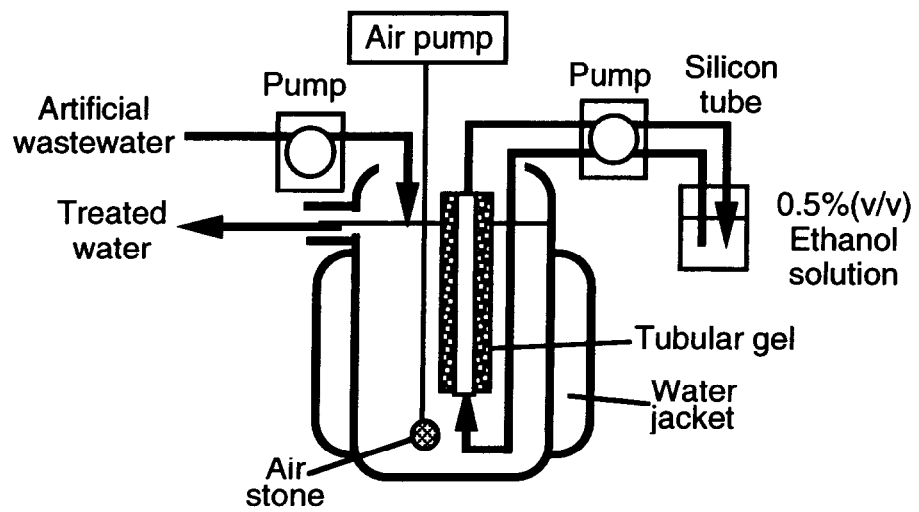


FIG. 3-1. Schematic diagram of experimental apparatus of once-through reactor with tubular gel.



(PEG4000 と PEG1500 の 1:2 の混合物 ) により包埋を行った。包埋したブロックは、ミクロトームにより  $5\mu\text{m}$  の厚さにスライスし、蛍光抗体法による染色に用いた。作製した切片は、染色する前に、 $0.1\text{ M NH}_4\text{Cl}$  を用いてアルデヒド基のブロックングを 5 分間行い、次に  $1\%$  (wt/vol) 牛血清アルブミン (BSA) 溶液を用いてバックグラウンドのブロックングを 60 分間行った。そして、 $0.1\%$  (v/v) BSA 溶液を用いて 30 分間の洗浄を 2 回行った。BSA 溶液は、BSA をリン酸緩衝液 (PBS:  $3.227\text{ g/L Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.45\text{ g/L NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $8\text{ g/L of NaCl}$ , pH 7.2) に溶解して作製した。蛍光抗体による染色は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) でラベルされた *N.europaea* 抗体または *P.denitrificans* 抗体 (それぞれ PBS を用いて、十分な蛍光強度が得られる  $1/8$  と  $1/32$  濃度に希釈) を用いて、 $52^\circ\text{C}$  で、45 分間、湿度  $100\%$  暗所の条件下で行った。これらの蛍光抗体は、*N.europaea* または *P.denitrificans* を抗原とし、ウサギを用いて常法<sup>107)</sup> により作製した。蛍光抗体により染色した切片は、PBS を用いて 10 分間の洗浄を 7 回行った後に、蛍光顕微鏡による観察に供試した。

顕微鏡観察には、UPlan FI 対物レンズ ( $20\times/0.50\text{ NA}$ )、DM505 ダイクロイックミラー、BP470-490 励起フィルター、BA515IF エミッションフィルターを設置した蛍光顕微鏡 (BX-60、オリンパス製) を用いた。ゲル内部における蛍光の分布は、顕微鏡写真を画像解析 (IPLab Spectrum、Signal Analytics Corp.) することにより数値化した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 模擬排水の連続処理

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて、模擬排水の連続処理を行った。処理水中のアンモニア、亜硝酸濃度の経時変化を図 3-2 に示す。処理水中のアンモニア濃度は、実験開始 1 日目において模擬排水中の  $100\text{ mg-N/L}$  から  $34.7\pm 6.1$  (平均±標準偏差、反復数=4)  $\text{mg-N/L}$  まで減少し、その後、10 日目には  $18.5\pm 5.3\text{ mg-N/L}$  まで減少し、約  $20\text{ mg-N/L}$  でほぼ一定となった。一方、処理水中の亜硝酸濃度は、実験開始 1 日目の  $0.2\pm 0.1\text{ mg-N/L}$  から、4 日目には  $11.9\pm 9.4\text{ mg-N/L}$  となり、その後、約  $15\text{ mg-N/L}$  でほぼ一定となった。これら処理水中のアンモニア、亜硝酸濃度の和は、1 日目、4 日目、10 日目、33 日目にそれぞれ  $34.9$ 、 $43.7$ 、 $28.7$ 、 $42.9\text{ mg-N/L}$  となった。また、いずれの場合においても、処理水中から硝酸は検出されなかった ( $<0.05\text{ mg-N/L}$ )。

チューブ状ゲルの活性の経時変化について検討するため、アンモニア酸化速度、窒素除去速度を図 3-2 に示した処理水中のアンモニア、亜硝酸濃度から算出した (表 3-1)。実験開始 1 日目は、アンモニア酸化速度と窒素除去速度はそれぞれゲル表面積  $1\text{ m}^2$  当たり  $4.19\pm 0.91\text{ g-N/day}$  と  $4.18\pm 0.91\text{ g-N/day}$  であった。その後、アンモニア酸化速度は、4 日目、10 日目、33 日目にそれぞれ  $4.46\pm 0.70$ 、 $5.88\pm 0.72$ 、 $5.75\pm 0.47\text{ mg-N/h}$  であった。一方、窒素除去速度は、4 日目、10 日目、33 日目にそれぞれ  $3.64\pm 0.60$ 、 $5.14\pm 0.51$ 、 $4.64\pm 0.92\text{ mg-N/h}$

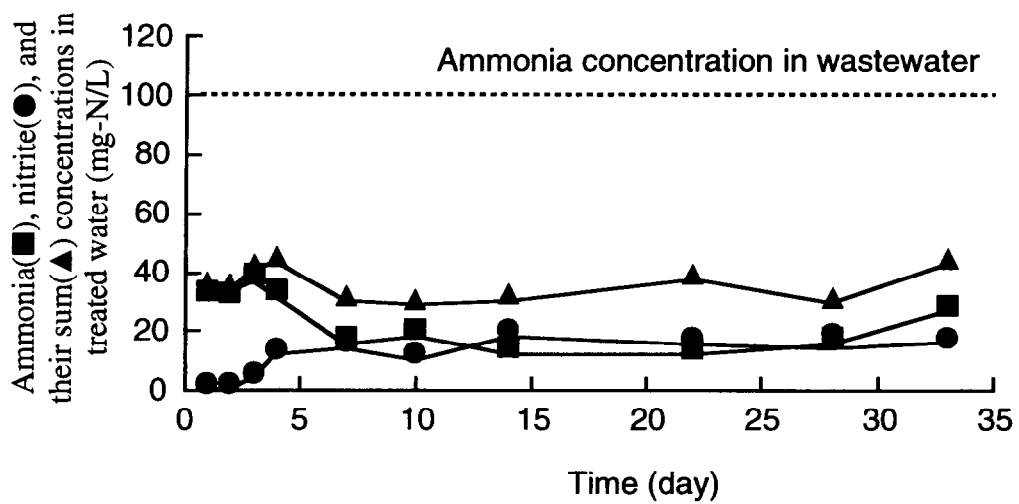


FIG. 3-2. Changes of ammonia, nitrite, and their sum concentrations in treated water.

Table 3-1 Rates of ammonia oxidation and nitrogen removal of tubular gel in once-through reactor

Days	Ammonia oxidation rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ )	Nitrogen removal rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ )
	(mg-N/h for 100 ml of working volume in reactor)	
1	4.19 ± 0.91	4.18 ± 0.91
4	4.46 ± 0.70	3.64 ± 0.60
10	5.88 ± 0.72	5.14 ± 0.51
33	5.52 ± 0.45	4.46 ± 0.89

Ammonia oxidation rate was oxidation activity from ammonia to nitrite. Ammonia removal rate was both oxidation activity from ammonia to nitrite and reduction activity of nitrite to nitrogen gas. Values are expressed as the mean ± SD (n=4).

であった。

### 3.3.2 ゲル内部の微生物分布

チューブ状ゲル内部に固定化された *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布の経時変化を、蛍光抗体法を用いて検討した。固定化直後、実験開始4日目、10日目、33日目に採取したゲル内部の *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布状態を、それぞれ図3-3、図3-4に示す。また、図3-3、図3-4に基づいて画像解析を行い、ゲル表面から内部までの蛍光を発している部分の面積比により、ゲル内部における両菌株の分布を表した。得られた両菌株に関するデータをグラフ化したものを図3-5に示す。*N.europaea* に関して、固定化直後はほとんどコロニーが見られなかったが、実験にともない徐々にゲル表面付近において、コロニー数とその大きさが増大した。しかし、ゲル中央部では、コロニーの増大は見られなかった。そして、実験開始から33日目の試料において、ゲル表面から200 $\mu$ mまでの領域に *N.europaea* のコロニーの増大が観察され、特に表面から100 $\mu$ mまでの領域での増大が著しかった。200 $\mu$ mより奥の領域(200 $\mu$ mから3mm)の分布は、固定化直後とほぼ同様であり、コロニーの増大は観察されなかった。一方、*P.denitrificans* に関して、固定化直後から小さなコロニーがゲル全体に均一に分布していたが、大きなコロニーは見られなかった。実験開始から10日目には、ゲル表面付近においてコロニーサイズの増大が観察され、ゲル中央部のコロニーよりも大きくなった。33日目においては、大きなコロニーがゲル表面から300 $\mu$ mまでの領域に観察され、特に表面から200 $\mu$ mまでの領域の増大が著しかった。300 $\mu$ mより奥の領域(300 $\mu$ mから3mm)の分布は、固定化直後とほぼ同様であり、小さいコロニーがゲル全体に均一に分布したままであった。

### 3.4 考察

チューブ状ゲルの活性を、アンモニア酸化速度と窒素除去速度から評価した。アンモニア酸化速度は、実験開始から10日目には、ゲル表面積1m<sup>2</sup>当たり4.19g-N/dayから5.88g-N/dayに、窒素除去速度は4.18g-N/dayから5.14g-N/dayに若干高まり、その後横這いとなった(表3-1)。実験終了時とした33日目の両速度は、それぞれ5.75g-N/dayと4.64g-N/dayとなり、第2章で示した模擬排水をバッチ処理した場合の両速度(5.17g-N/dayと5.16g-N/day)とほぼ同等であった。これらの結果から、チューブ状ゲルの処理能力は処理方式に関係なく一定であり、ゲル表面積によって規定されることが分かった。また、33日間であるが、安定した処理が行え、装置として効率的な運用が図れるものと考えられる。

一方、チューブ状ゲル内部の微生物分布は、時間の経過にともない大きく変化した(図3-5)。*N.europaea* はゲル表面から200 $\mu$ mまでの領域で増殖が観察された。*N.europaea* は増殖に酸素を必要とする<sup>27, 28)</sup>ことから、ゲル内部においては、酸素はゲル表面から200 $\mu$ mの領域まで届いていることが推察され

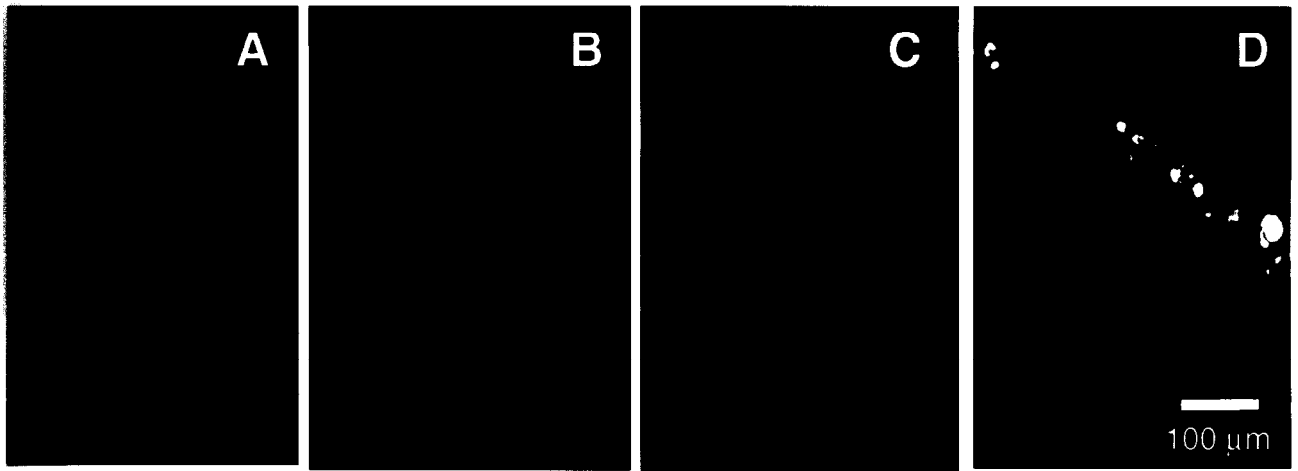


FIG. 3-3. Photomicrographs of labeled *N.eurapaea* in tubular gel at the start (A), fourth (B), 10th (C), and 33th day (D) of operation. Bar=100 μm. Upside of the photomicrographs indicates outer surface of the gel.

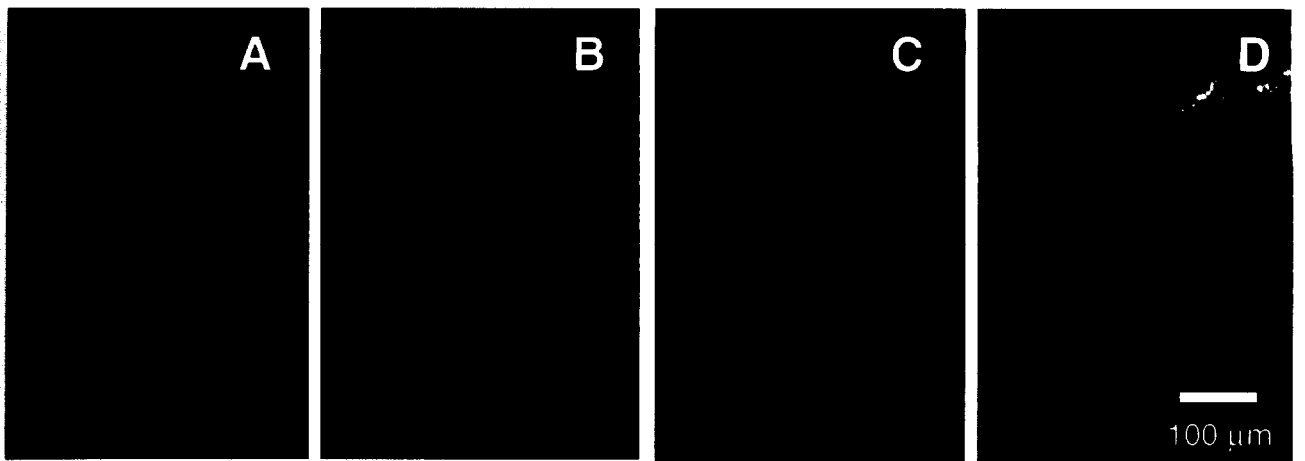


FIG. 3-4. Photomicrographs of labeled *P.denitrificans* in tubular gel at the start (A), fourth (B), 10th (C), and 33th day (D) of operation. Bar=100 μm. Upside of the photomicrographs indicates outer surface of the gel.

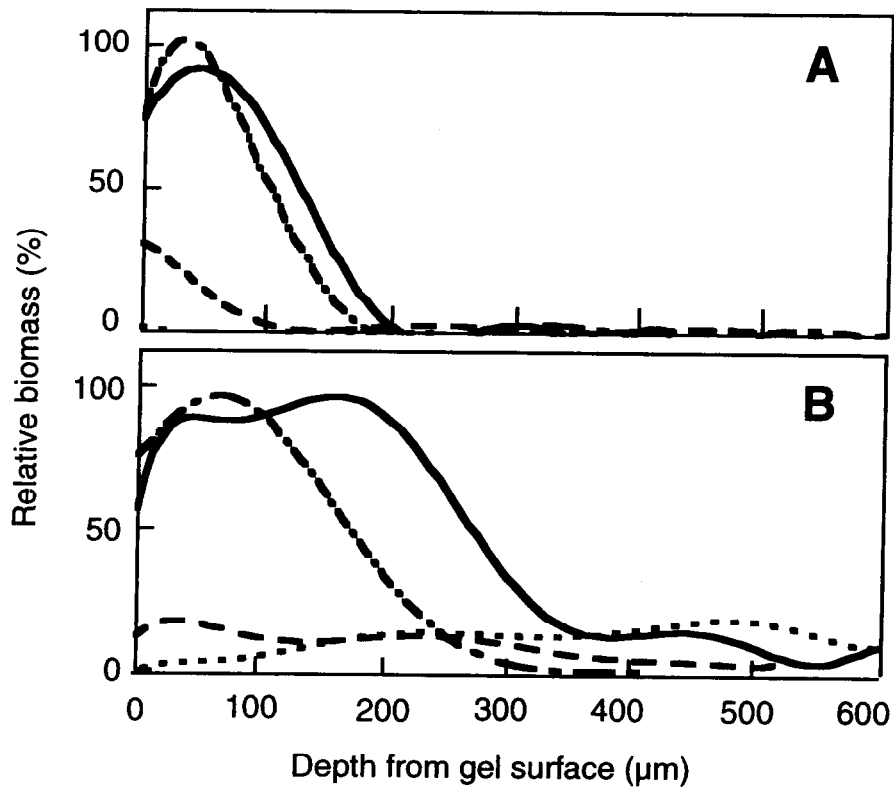


FIG. 3-5. Changes of distributions of *N.europaea* (A) and *P.denitrificans* (B) in tubular gel. Each curves show bacterial distributions at the start (.....), fourth (----), 10th (— · —), and 33th day (—) of treatment.

た。この  $200\mu\text{m}$  という値は、高分子ゲルのビーズにおいて、好気部分はゲル表面から  $100\sim 200\mu\text{m}$  程度であるという他の文献値<sup>106, 108-113)</sup> と一致するものである。また、 $100\mu\text{m}$  よりも奥の領域では、ゲル内部の酸素濃度は徐々に減少し、 $200\mu\text{m}$  より奥では完全な嫌気条件となり、アンモニアの酸化は行われていない状態となったと考えられる。これに対し、*P.denitrificans* はゲル表面から  $300\mu\text{m}$  までの *N.europaea* よりも広範囲の領域で増殖が観察された。*P.denitrificans* は生育のための電子受容体として酸素と亜硝酸の両方を使用できる<sup>22)</sup>。それゆえ、*P.denitrificans* は、ゲル表面から  $100\mu\text{m}$  までの領域においては電子受容体として酸素を、 $200$  から  $300\mu\text{m}$  までの領域においては亜硝酸を使って増殖したものと考えられる。そして、これらの領域の間にある  $100$  から  $200\mu\text{m}$  までの領域において、*P.denitrificans* が酸素と亜硝酸のどちらを使用しているかは不明である。これは、*P.denitrificans* は亜硝酸を電子受容体とする脱窒反応のために厳密な嫌気条件を必要とするからである<sup>104, 105)</sup>。しかし、第2章において、ゲル内部に固定化した *N.europaea* の濃度が同じであるにもかかわらず、*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したゲルのアンモニア酸化速度は、*N.europaea* のみを固定化したゲルのアンモニア酸化速度よりも3倍高いことを示した(表2-2)。これは、ゲル内部から *P.denitrificans* によって速やかに亜硝酸が除去されたためと考えられる。この結果は、酸素を使用している *N.europaea* と亜硝酸を使用している *P.denitrificans* が近接して存在していることを示唆するものである。従って、 $100$  から  $200\mu\text{m}$  の領域においては、アンモニア酸化とともに脱窒も同時に起こっていると考えられる(図3-6)。

前述のように、チューブ状ゲル内部の *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布状態は、時間の経過とともに大きく変化したのに対し、ゲルの活性はほぼ一定であった。すなわち、ゲル内部の *N.europaea* と *P.denitrificans* の両菌株の細胞数が増加している(図3-5)にもかかわらず、アンモニア酸化速度、窒素除去速度の大きな上昇は観察されなかった(表3-1)。これは、好気的なゲル表面から  $100\mu\text{m}$  の部分において *P.denitrificans* が増殖したためと考えられる。好気的な領域において増殖した *P.denitrificans* は、アンモニア酸化に必要な酸素を浪費し、*N.europaea* の細胞全てに十分な酸素が供給されない状態が生じたと考えられる。従って、ゲル表面から  $100\mu\text{m}$  の部分における *P.denitrificans* の増殖を抑え、アンモニアの酸化に必要な酸素が浪費されないように、ゲル内部を最適化することができれば、ゲルの活性をさらに向上できる可能性があると考えられる。また、ゲル内部において *N.europaea* と *P.denitrificans* が増殖し、窒素除去の微生物反応に使われているのは、ゲル表面から約  $300\mu\text{m}$  までの領域であった。従って、チューブ状ゲルの厚さは約  $300\mu\text{m}$  程度で十分であると考えられる。このことは、より細かいチューブ状ゲルを使用し、ゲル体積当たりのゲル表面積を増大させることにより、リアクターの容量当たりの能力をさらに向上できる可能性を示すものである。

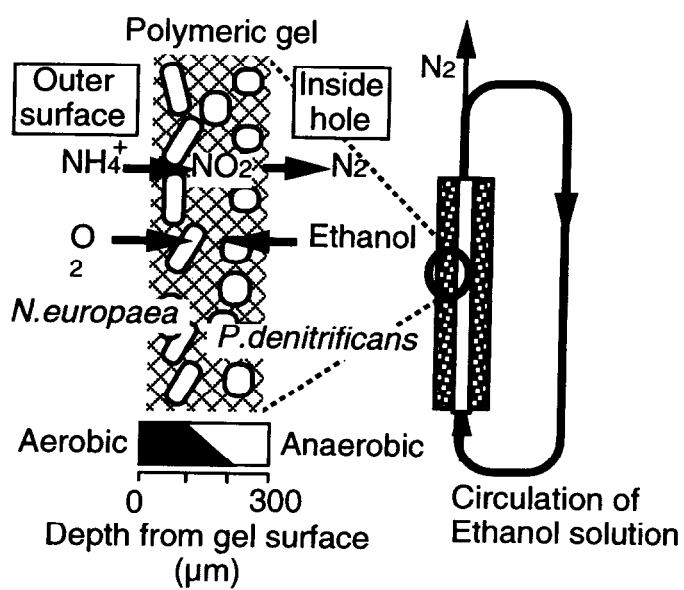


FIG. 3-6. Presumed mechanisms of nitrogen removal in tubular gel.



### 3.5 本章のまとめ

アンモニア酸化菌 *N.europaea* と脱窒菌 *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて模擬排水を連続処理することにより、以下に示すような結果を得た。

- 1) チューブ状ゲルの処理能力は処理方式に関係なく一定であり、ゲル表面積によって規定されることが分かった。また、33 日間にわたって安定した処理が行え、装置として効率的な運用が図れるものと考えられる。
- 2) チューブ状ゲル内部は、アンモニアから亜硝酸への酸化が行われる好気部分（ゲル表面から 100  $\mu\text{m}$  までの領域）、アンモニア酸化のための好気部分と脱窒のための嫌気部分が共存する部分（100  $\mu\text{m}$  から 200  $\mu\text{m}$  までの領域）、亜硝酸から窒素ガスへの脱窒のみが行われる嫌気部分（200  $\mu\text{m}$  よりも奥の領域）の 3 領域からなると考えられる。

ゲル内部の *N.europaea* と *P.denitrificans* は、ゲル表面付近において酸素を奪い合っている状況にある。従って、この領域の微生物分布を最適化することができれば、ゲルの活性をさらに向上できる可能性があると考えられる。また、窒素除去の微生物反応に使われているのは、ゲル表面から約 300  $\mu\text{m}$  までの領域であることから、より細いチューブ状ゲルを使用し、ゲル表面積を増大させることにより、リアクターの容量当たりの能力をさらに向上できる可能性があると考えられる。

## 第 4 章

### チューブ状ゲル内部の微生物分布の改変

チューブ状ゲル内部の微生物分布を改変することにより、チューブ状ゲルの活性の向上を試みるとともに、ゲル内部の微生物分布と活性の関係について検討する。

## 4.1 緒言

第3章において、チューブ状ゲル内部は *N.europaea* と *P.denitrificans* の働きにおいて3つの領域に分けられることを示した。この3つの領域の中で、ゲル表面から 100  $\mu\text{m}$  までの領域部分においては、*N.europaea* と *P.denitrificans* が酸素を奪い合っている状況にあり、*N.europaea* の細胞全てに十分な酸素が供給されない状態が生じたため、アンモニア酸化が *N.europaea* の細胞数の増加にともなって上昇しなかったと考えられた。従って、チューブ状ゲルの窒素除去能力をさらに向上させるためには、*P.denitrificans* による酸素の浪費を防ぐとともに、*N.europaea* の細胞に大量の酸素を供給する方法を検討する必要がある。

本章では、チューブ状ゲル内部の微生物分布を最適化することにより、ゲルの活性向上を図ることを目的として、第2、3章において脱窒の電子供与体として利用したエタノールの代わりに水素ガスを用いてゲル内部における *P.denitrificans* の分布を改変することを試みた。また、エアレーションの代わりに酸素ガスを利用してゲル内部の *N.europaea* に大量の酸素を供給することも試みた。しかし、高濃度の酸素は微生物<sup>114, 115)</sup> や動物細胞<sup>116, 117)</sup> に対し毒性を示すことが知られているため、高濃度の酸素ガスが *N.europaea* のゲル内部における分布とアンモニア酸化活性に及ぼす影響について検討した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 供試菌株とその固定化方法

アンモニア酸化菌 *N.europaea* および脱窒菌 *P.denitrificans* の培養および固定化操作は、第2章と同様に行い、光硬化性樹脂 PVA-SbQ を用いてチューブ状ゲル（直径 12 mm、内径 5 mm、長さ 125 mm）を作製した。

### 4.2.2 水素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて、100 mg-N/L 濃度のアンモニアまたは硝酸を含んだ模擬排水のバッチ処理を行った。実験装置の模式図を図 4-1 に示す。実験は、30℃の条件下で行い、エアレーション（100 mL/min）とスターラーによる攪拌（300 rpm）を行った。実験に用いたアンモニアを含む模擬排水（アンモニア排水）は、第3章と同じものを使用した。また、硝酸を含む模擬排水（硝酸排水）は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の代わりに 0.722 g/L  $\text{KNO}_3$  を添加した以外は、アンモニア排水と同様の組成とした。脱窒反応の電子供与体として 99.99 % の水素ガスを用い、50 mL/min の速度でチューブ内部に供給した。模擬排水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度は、第2章で示した方法に従い測定した。

アンモニア排水の処理に用いたチューブ状ゲルに関して、実験開始 96 時間後に処理済みの排水を新しい模擬排水と交換し、馴化を目的としてバッチ処理を同条件にて繰り返し行った。また、5回目のバッチ処理実験時には、チューブ状ゲルより発生、または漏れ出してくるガスを回収するために、チューブ状ゲルの上部に、ガス捕集器を設置した。また、チューブ状ゲル内部を流れた後

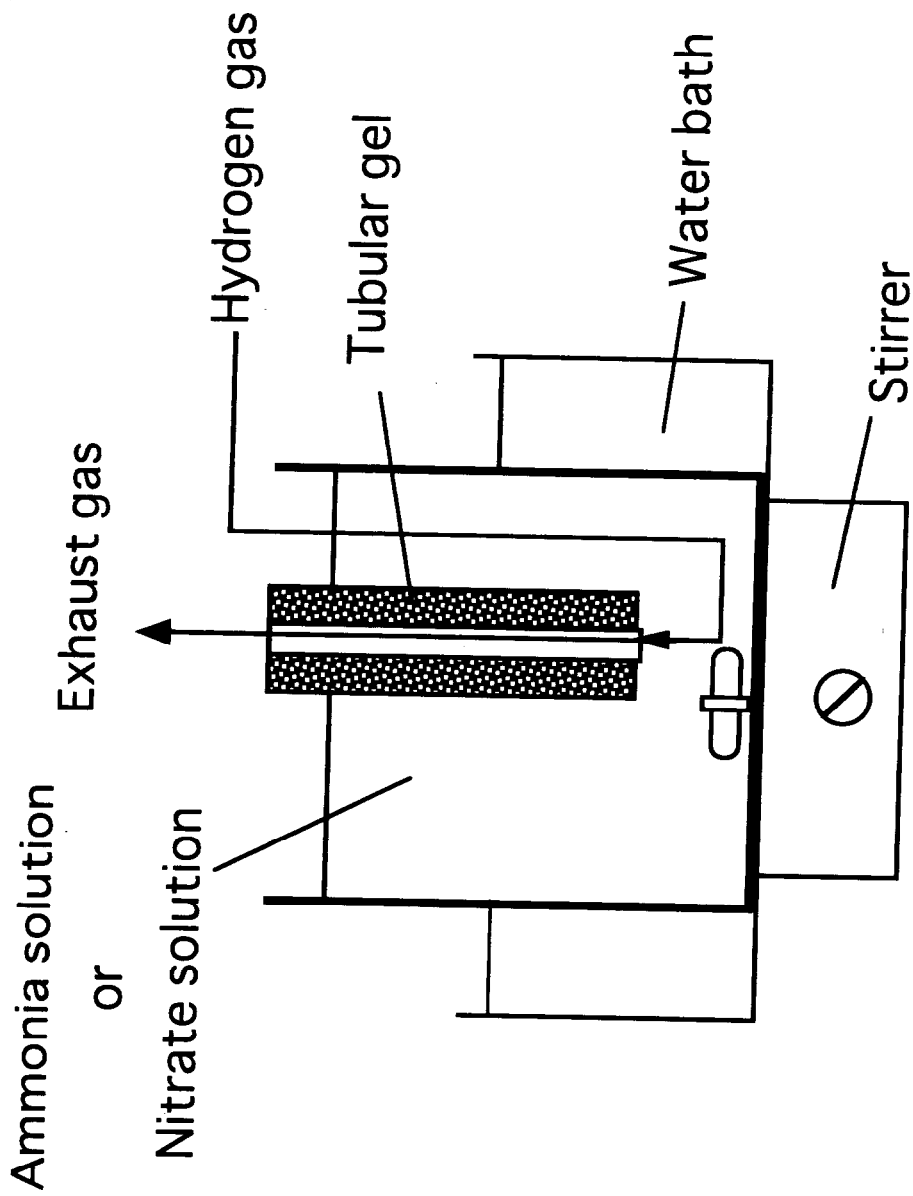


FIG. 4-1. Schematic diagram of batch system using tubular gel. Artificial wastewater (200 mL) containing 200 mg-N/L of ammonia or nitrate was treated. The wastewater was agitated by stirring (100 rpm) at 30 °C. Hydrogen gas serving as an electron donor for denitrification flowed through the lumen of the tube (50 mL/h).

のガスもテトラパックに回収した。そして、回収したガスについては、 $\mu$ TCD 検出器と PoraPlot Q カラムを装着したガスクロマトアナライザー（Chrompack 社製、Micro GC CP2002）を用いて分析した。

#### 4.2.3 酸素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて、水素ガスを用いた実験と同様に 100 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水（アンモニア排水）のバッチ処理を行った。実験装置の模式図を図 4-2 に示す。本実験では酸素濃度の影響を検討するため、模擬排水中にエアレーションの代わりに酸素濃度 10%、20%、30%、50%、100%の混合ガス（99.99%酸素ガスと 99.99%窒素ガスとを混合することにより調整）を用い曝気した（100 mL/min）。脱窒反応の電子供与体として 99.99 %の水素ガスを用い、50 mL/min の速度でチューブ内部に供給し、模擬排水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度を測定した。また、固定化していない *N.europaea* に対する酸素ガスの影響を検討するため、*N.europaea* のみの菌懸濁液（8 mg dry wt./mL）0.1 mL をチューブ状ゲルの代わりに模擬排水中に植菌し、同様にアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度の経時変化を測定した。

20%、50%、100%酸素ガスによる曝気条件下のチューブ状ゲルに関しては、実験開始 96 時間後に処理済みの排水を新しい模擬排水と交換し、馴化を目的としてバッチ処理を同条件にて 5 回繰り返し行った。

#### 4.2.4 蛍光抗体法によるゲル内部の微生物染色

水素ガスおよび酸素ガスを用いたバッチ処理実験により馴養したチューブ状ゲルについて、内部に固定化した *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布状態を、蛍光抗体法を用いて検討した。チューブ状ゲルは、実験開始時（固定化直後）と 5 回のバッチ実験後（合計 20 日間の処理後）にその一部をサンプリングし、第 3 章に示した方法に従い、蛍光抗体法による観察に供試した。そして、蛍光顕微鏡を用いた観察および顕微鏡写真の画像解析も、第 3 章と同様にして行った。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 水素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルを用いて、水素ガスを供給する条件下、アンモニア排水のバッチ処理を行った。溶液中のアンモニア濃度は、経過時間にもなって直線的に減少し、実験開始から 72 時間後には、100 mg-N/L から 1.7 mg-N/L に低下した（図 4-3A）。これに対し、溶液中の亜硝酸濃度は、経過時間にもなって徐々に増加し、実験開始から 48 時間後には、10 mg-N/L に上昇したが、その後、減少し、96 時間後には 2.0 mg-N/L にまで低下した。硝酸は、実験期間中、溶液中から検出されなかった（ $< 0.05$  mg-N/L）。硝酸排水に関しても、水素ガスを供給する条件下、チューブ

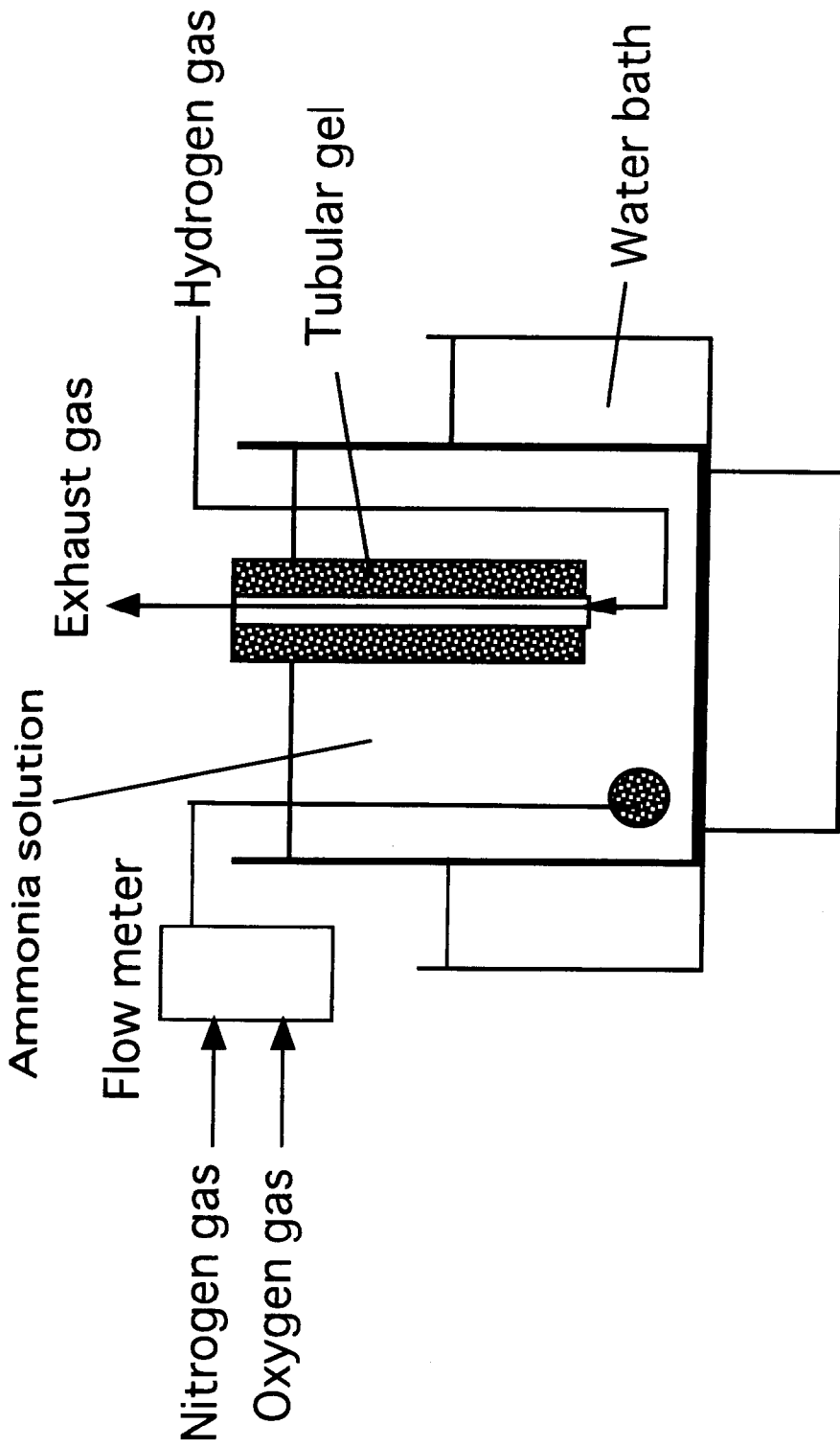


FIG. 4-2. Schematic diagram of batch system using tubular gel. Artificial wastewater (200 mL) containing 200 mg-N/L of ammonia was bubbled with gas mixtures containing nitrogen and oxygen at 30 °C. Hydrogen gas serving as an electron donor for denitrification flowed through the lumen of the tube (50 mL/h).

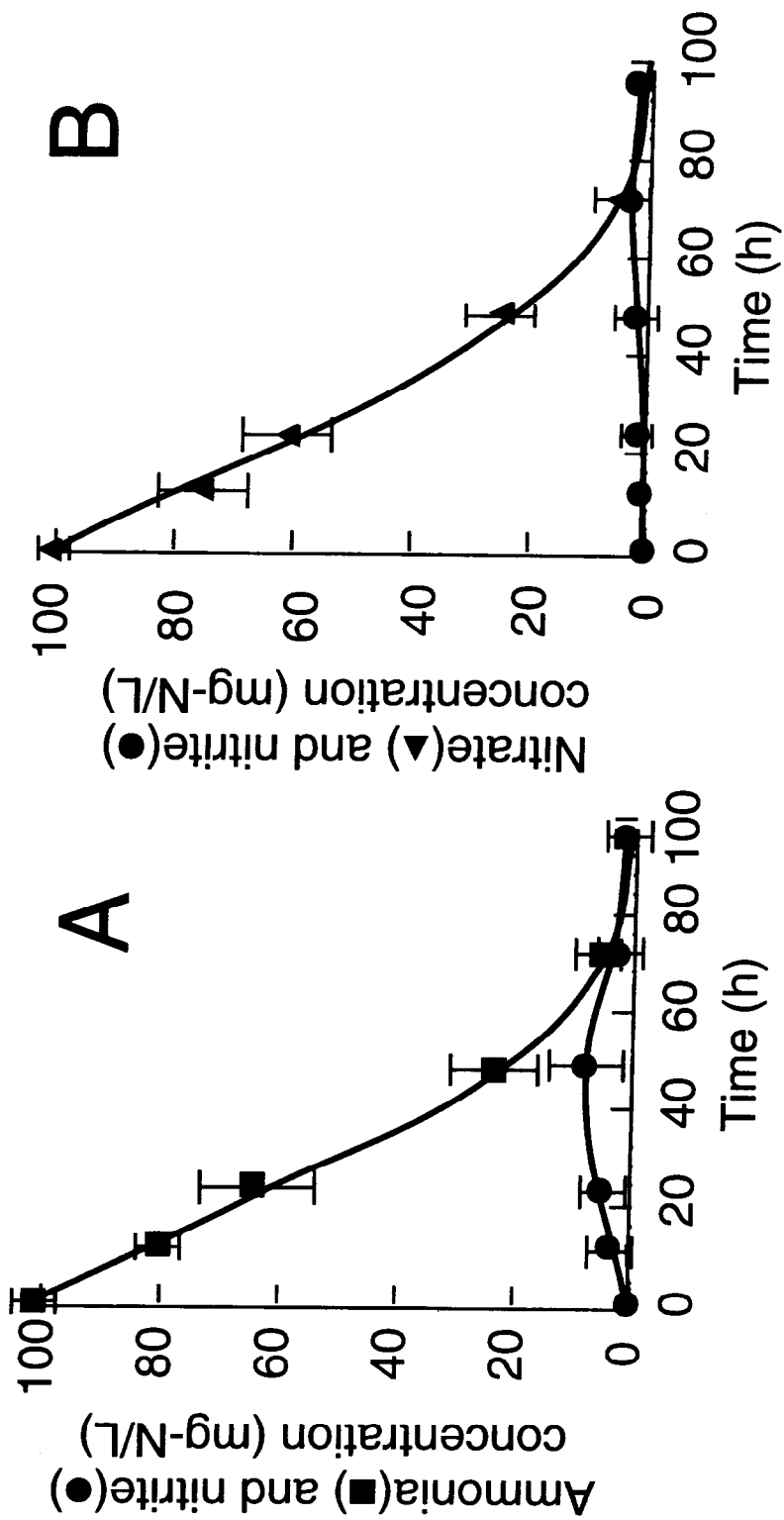


FIG. 4-3. Time dependent changes of the nitrogen concentration in wastewater containing ammonia (A) or nitrate (B) during the first batch experiment. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n=4).

状ゲルを用いてバッチ処理を行った。溶液中の硝酸濃度は、経過時間とともに直線的に減少し、実験開始から 72 時間後には、100 mg-N/L から 8.3 mg-N/L に低下した (図 4-3B)。これに対し、溶液中には若干の亜硝酸が検出されたが、実験期間中 3 mg-N/L 以下に保たれた。アンモニアは、実験期間中、溶液中から検出されなかった (<0.05 mg-N/L)。

一方、水素ガスが脱窒の電子供与体として使われていることを確認するため、水素ガスの代わりに窒素ガス (99.99%) を供給する条件下、硝酸排水をチューブ状ゲルを用いてバッチ処理した。その結果、実験開始時に若干の硝酸濃度の減少が観察されたが、24 時間経過以降は溶液中の硝酸濃度は減少しなかった。また、溶液中には、亜硝酸やアンモニアは検出されず、水素ガスが脱窒の電子供与体として使われていることが明らかとなった。

模擬排水中のアンモニア、硝酸などの窒素化合物が、チューブ状ゲルにより窒素ガスとして除去されている事を確認するため、チューブ状ゲルより排出されるガスの分析を行った。排出されるガス中に脱窒反応の中間産物である亜酸化窒素ガスは検出されなかった (<1 ppm)。また、チューブ状ゲルの外側からは、いかなるガスの漏れ出しも観察されなかった。チューブ状ゲルから排出される窒素ガスを亜酸化窒素の形態で検出した場合も、排出されたガスから全く亜酸化窒素は検出されなかったのに対し、アセチレンガスに 30 分間の暴露をした後のチューブ状ゲルを用いた場合には、排出されたガスから 9.9 ppm 濃度の亜酸化窒素が検出された。従って、チューブ状ゲルにおいて、窒素化合物はチューブ内部から窒素ガスとして除去されていることが明らかとなった。

水素ガスを供給する条件にチューブ状ゲルを馴化するために、アンモニア排水のバッチ処理を繰り返し行った。そして、チューブ状ゲルのアンモニア酸化速度と窒素除去速度を、バッチ処理開始から 12 時間経過後までの溶液中のアンモニア、亜硝酸濃度の変化量に基づいて算出した (表 4-1)。最初のバッチ処理実験におけるアンモニア酸化速度は、ゲル表面積 1 m<sup>2</sup> 当たり 1.62±0.19 g-N/day であり、窒素除去速度は 1.47±0.44 g-N/day であった。アンモニア酸化速度は、バッチ処理を繰り返し行ったことにより上昇し、5 回目のバッチ処理においては 6.89±0.35 g-N/day となった。また、窒素除去速度は、2 回目のバッチ処理実験において 3.24±0.76 g-N/day まで上昇したが、その後一定となり、5 回目のバッチ処理実験においても大きな変化はなかった。

#### 4.3.2 ゲル内部の微生物分布に及ぼす水素ガスの影響

水素ガスを使用する条件に馴化したチューブ状ゲル内部の *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布を、蛍光抗体法を用いて観察した (図 4-4)。図 4-4 を画像解析した結果を図 4-5 に示す。処理実験に使用する前のチューブ状ゲル内部においては、*N.europaea* のコロニーはゲル全体にまばらに分布しており、大きなコロニーは観察されなかった。5 回のバッチ処理実験を行った後のチューブ状ゲルにおいては、*N.europaea* のコロニーはチューブの外側表面から約 100 μm までの領域に集中して観察され、さらに内側の領域については、実験前と変



Table 4-1 Changes of ammonia oxidation rate and nitrogen removal rate of tubular gel by acclimation

Batch processes	Ammonia oxidation rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) (g-N per day for 1m <sup>2</sup> of gel surface*1)	Nitrogen removal rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ )
1	1.62 ± 0.19	1.47 ± 0.44
2	4.86 ± 0.27	3.24 ± 0.76
3	5.39 ± 0.27	3.59 ± 0.24
4	6.12 ± 0.19	3.63 ± 0.08
5	6.89 ± 0.35	3.37 ± 0.24
cf.*2	5.52 ± 0.45	4.46 ± 0.89

Values are expressed as the mean ± SD (n=3 or 4)

\*1 The gel surface showed the external surface of the tube.

\*2 The conferred values were the rates of the tube using ethanol after 33 day's acclimation in the section 3

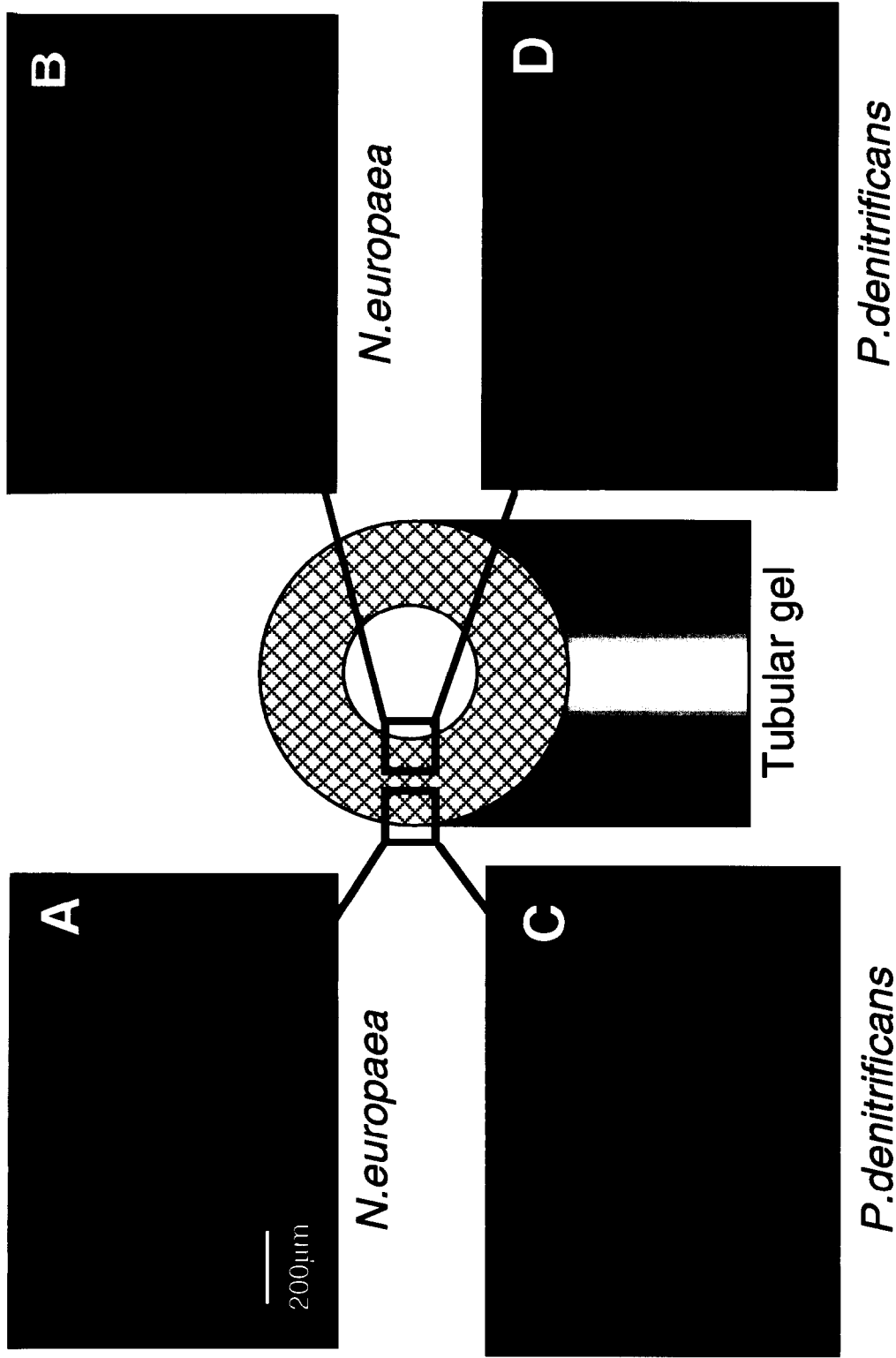


FIG. 4-4. Fluorescence photomicrographs of *N. europaea* (A and B) and *P. denitrificans* (C and D) in regions of tubular gel cut in cross section. Panels A and C show the external surface of the tubular gel, whereas panels B and D show the internal surface. The corresponding areas within the tubular gel are illustrated in the center diagram.

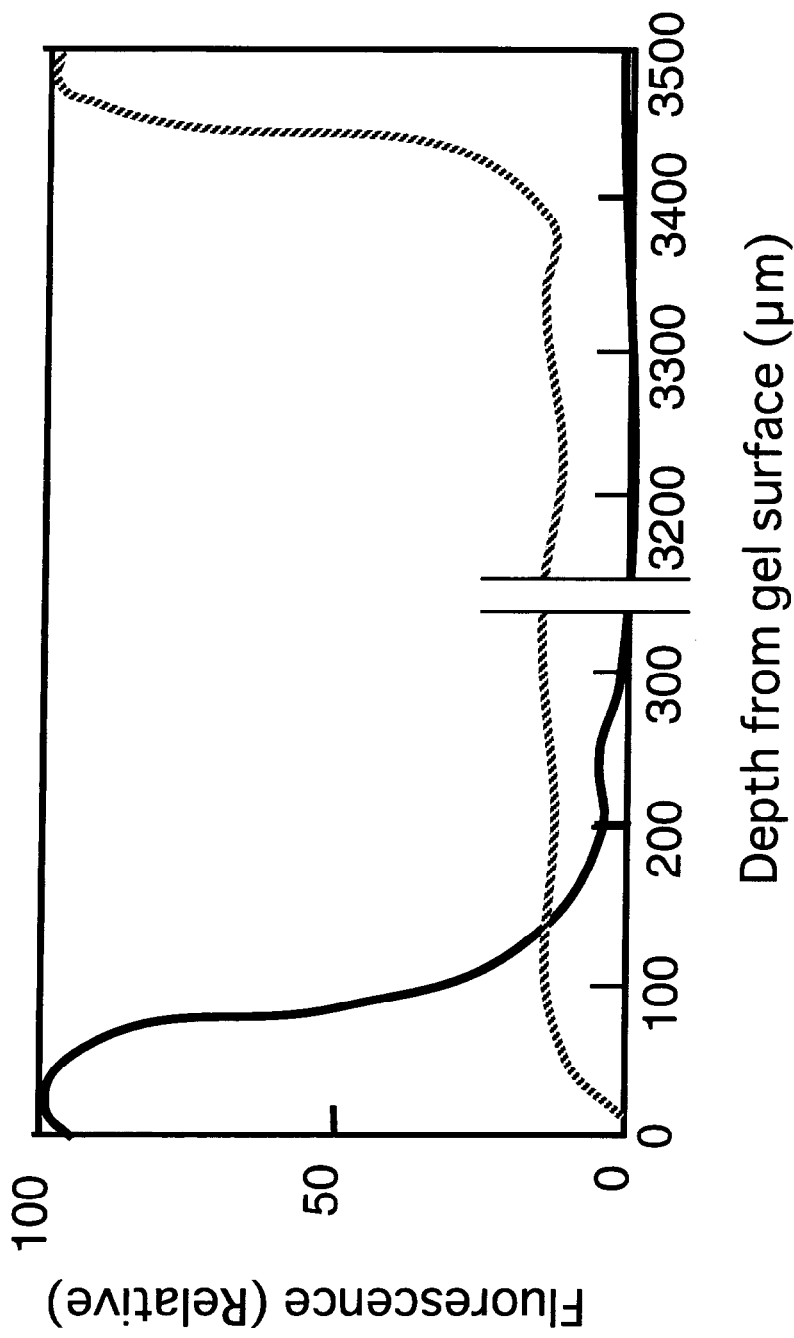


FIG. 4-5. Distributions of *N. europaea* and *P. denitrificans* within tubular gel. The solid and dotted curves show the relative biomass of *N. europaea* and *P. denitrificans*, respectively. These curves were determined by analysis of the images in Figs. 3A and 3D.

化が無かった。また、チューブの外側表面に近い領域のコロニーの方が、チューブの内側のコロニーよりも大きかった。一方、*P.denitrificans* のコロニーも、処理実験の使用前においては、ゲル全体に均一に分布しており、大きなコロニーは観察されなかった。5回のバッチ処理実験後においては、*P.denitrificans* のコロニーはチューブの内側表面から約 80  $\mu\text{m}$  までの領域に集中しており、さらに外側の領域については、実験前と変化が無かった。また、チューブの内側表面に近い領域のコロニーの方が、チューブ外側のコロニーよりも大きかった。水素ガスを脱窒の電子供与体として使用した場合、チューブ状ゲル内部において、*N.europaea* はゲルの外側表面に近い領域に、*P.denitrificans* はゲルの内側表面に近い領域に明確に分かれて分布することが明らかとなった。

#### 4.3.3 酸素ガスを用いた場合の模擬排水のバッチ処理

*N.europaea* に対する酸素の毒性を検討するため、種々の濃度の酸素ガスによりアンモニア排水を曝気する条件下、固定化しない *N.europaea* を用いてバッチ処理を行った。その結果、10~30%酸素ガスを用いた実験区では、溶液中のアンモニア濃度は直線的に減少し、実験開始から 24 時間経過後には 5.0 mg-N/L にまで低下した (図 4-6A)。そして、除去されたアンモニア量に相当する亜硝酸が溶液中に蓄積するのが観察された (図 4-6B)。これに対し、50、100%酸素ガスを用いた実験区では、12 時間経過時までは溶液中のアンモニア濃度は直線的に減少したが、その後アンモニア酸化は停止し、*N.europaea* に対する高濃度の酸素の毒性が観察された。硝酸に関しては、10~50%の酸素ガスを使用した場合、実験期間中、溶液中から検出されなかった (<0.05 mg-N/L)。100%酸素ガスを用いた場合にのみ、実験終了時に溶液中から 0.57 mg-N/L 濃度の硝酸が検出された。

*N.europaea* と *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルに対する高濃度の酸素ガスの影響を検討するため、固定化していない *N.europaea* と同様にしてチューブ状ゲルを用いてバッチ処理を行った。10%酸素ガスを用いた実験区では、溶液中のアンモニア濃度は直線的に減少し、実験開始から 72 時間経過後は 10.0 mg-N/L にまで低下した (図 4-7A)。このアンモニア濃度の減少は、曝気する混合ガス中の酸素濃度の上昇にともなって早くなり、100%酸素ガスを用いた実験区では 48 時間後には 3.0 mg-N/L にまで低下した。一方、亜硝酸濃度については、10%酸素ガスを使用した場合、実験期間中に蓄積することなく 8.0 mg-N/L 以下に維持された (図 4-7B) が、酸素ガス濃度が上昇するに従い、亜硝酸の蓄積が観察された。100%酸素ガスを使用した場合、実験開始から 48 時間後には、亜硝酸濃度は 50.0 mg-N/L に達し、96 時間後には 32.0 mg-N/L にまで減少した。硝酸に関しては、10~50%の酸素ガスを使用した場合、実験期間中、溶液中から検出されなかった (<0.05 mg-N/L)。100%酸素ガスを用いた場合にのみ、実験終了時に溶液中から 0.52 mg-N/L 濃度の硝酸が検出された。

高濃度の酸素ガスに対する長期的な影響を検討するため、20、50、100%酸素ガスを用いた実験区についてさらにバッチ処理を繰り返し、各濃度の酸素に

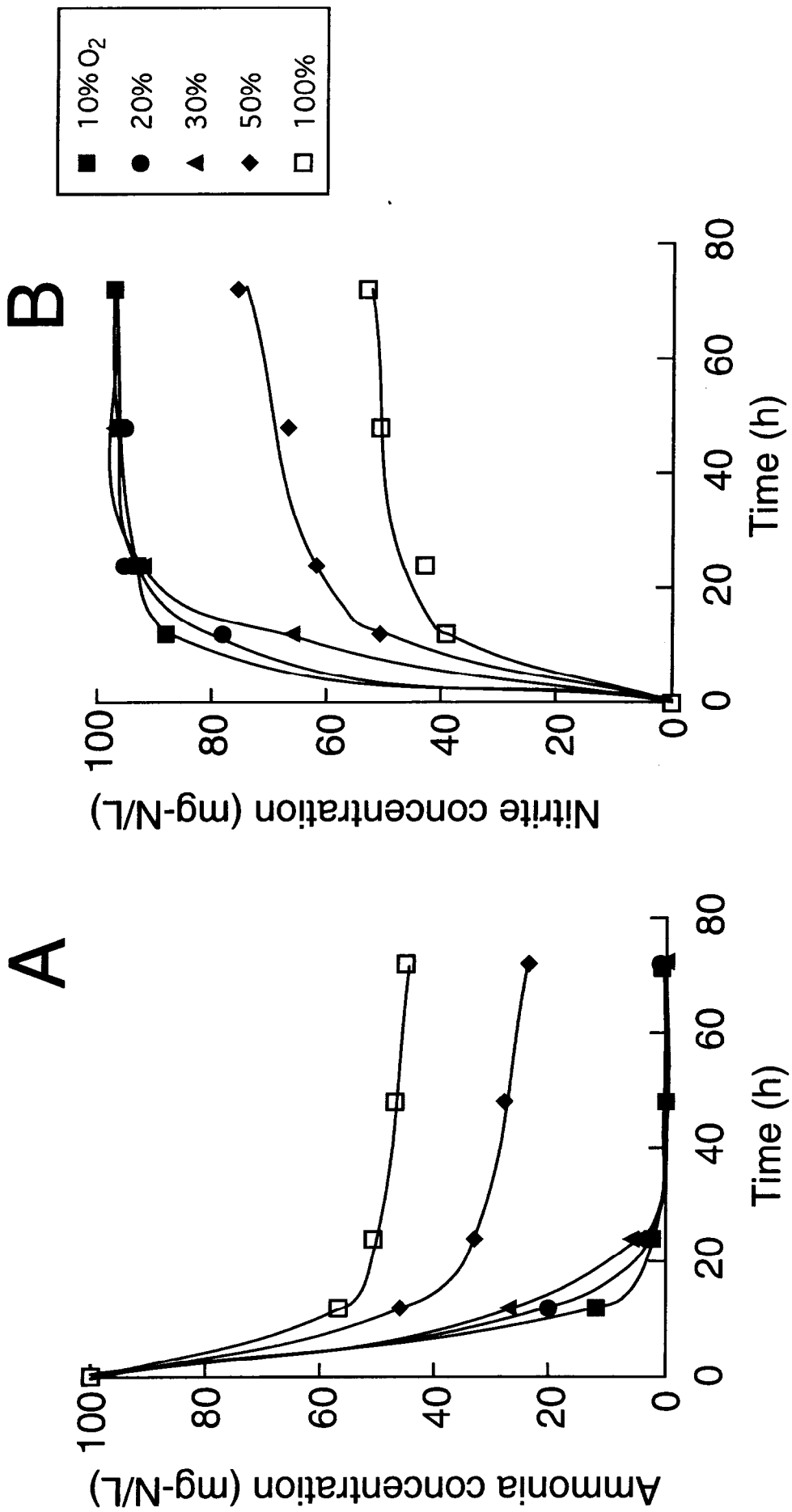


FIG. 4-6. Time dependent changes of ammonia (A) or nitrite (B) concentrations in wastewater treated with free cells of *N.europaea*.

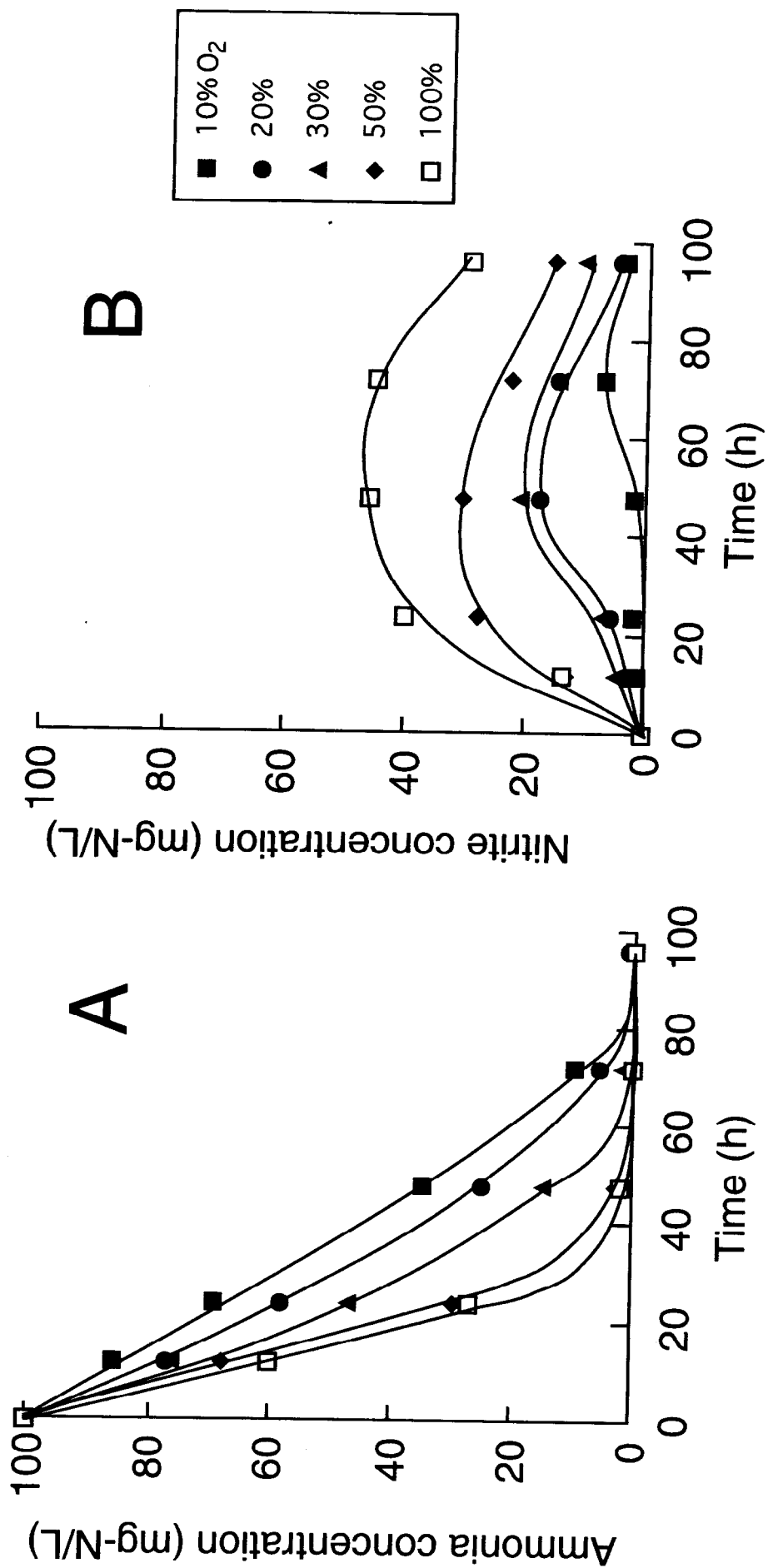


FIG. 4-7. Time dependent changes of ammonia (A) or nitrite (B) concentrations in wastewater treated with tubular gel.

対する馴化を行った。その結果、酸素濃度が高いほど溶液中のアンモニア濃度が減少する速度は早く、亜硝酸の蓄積が観察された（図 4-8）。この傾向は、馴化前の傾向とほぼ同じであった。チューブ状ゲルのアンモニア酸化速度と窒素除去速度の変化を、12 時間経過後までの溶液中のアンモニア、亜硝酸濃度の変化量に基づいて算出した（図 4-9）。100%酸素に馴化したチューブ状ゲルのアンモニア酸化速度は、ゲル表面積  $1\text{ m}^2$  当たり  $14.7 \pm 0.8\text{ g-N/day}$  であり、窒素除去速度は  $3.1 \pm 0.6\text{ g-N/day}$  であった。50%酸素に馴化したチューブ状ゲルについては、それぞれ  $8.5 \pm 0.2\text{ g-N/day}$  と  $3.6 \pm 0.6\text{ g-N/day}$  であり、20%酸素に馴化したチューブ状ゲルについては、 $6.8 \pm 0.2\text{ g-N/day}$  と  $3.4 \pm 0.2\text{ g-N/day}$  であった。

#### 4.3.4 ゲル内部の微生物分布に及ぼす酸素ガスの影響

酸素ガスを曝気する条件に馴化したチューブ状ゲル内部の *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布を、蛍光抗体法を用いて観察した（図 4-10）。図 4-10 を画像解析した結果を図 4-11 に示す。20%酸素ガスを曝気する条件に馴化したチューブ状ゲルにおいては、*N.europaea* のコロニーはチューブの外側表面から約  $100\text{ }\mu\text{m}$  までの領域に集中して観察され、さらに内側の領域については、実験前と変化が無かった。また、チューブの外側表面に近い領域のコロニーの方が、チューブの内側のコロニーよりも大きかった。これに対し、50%酸素ガスを曝気する条件に馴化したチューブ状ゲルにおいては、*N.europaea* のコロニーはチューブの外側表面から内側の領域である約  $80\text{ }\mu\text{m}$  から  $150\text{ }\mu\text{m}$  までの領域に集中して観察され、100%酸素ガスを曝気する条件においては、約  $150\text{ }\mu\text{m}$  から  $250\text{ }\mu\text{m}$  までの領域に集中して観察された。一方、*P.denitrificans* のコロニーは、酸素ガスの濃度に関係なくチューブの内側表面から約  $80\text{ }\mu\text{m}$  までの領域に集中しており、さらにゲルの外側の領域については、実験前と変化が無かった。チューブ状ゲル内部に固定化された *N.europaea* は、曝気に用いた混合ガス中の酸素濃度が上昇するにしたがって、チューブ状ゲルの外側表面から離れた内側の領域において増殖することが分かった。また、*P.denitrificans* はゲルの内側表面に近い領域に分布し、酸素濃度の影響を全く受けなかった。

#### 4.4 考察

本章では、チューブ状ゲル内部の微生物分布を最適化することにより、ゲル自体の活性向上を図ることを目的として、脱窒の電子供与体として水素ガスを用いることを試みた。アンモニア排水および硝酸排水のバッチ処理を行った結果、排水中の窒素化合物は全て溶液中から消失し（図 4-3）、本チューブ状ゲルはガス状の水素を溶液中に溶解することなく、脱窒の電子供与体として利用できることが分かった。*P.denitrificans* の様な水素細菌かつ脱窒菌である微生物に水素ガスを供給することによって、脱窒を行う研究は既に行われており<sup>118-121)</sup>、パイロットプラントレベルにおいても検討されている<sup>122, 123)</sup>。その場合、溶液中の脱窒菌に水素を供給するため、水素ガスを水に溶解する操作とそ

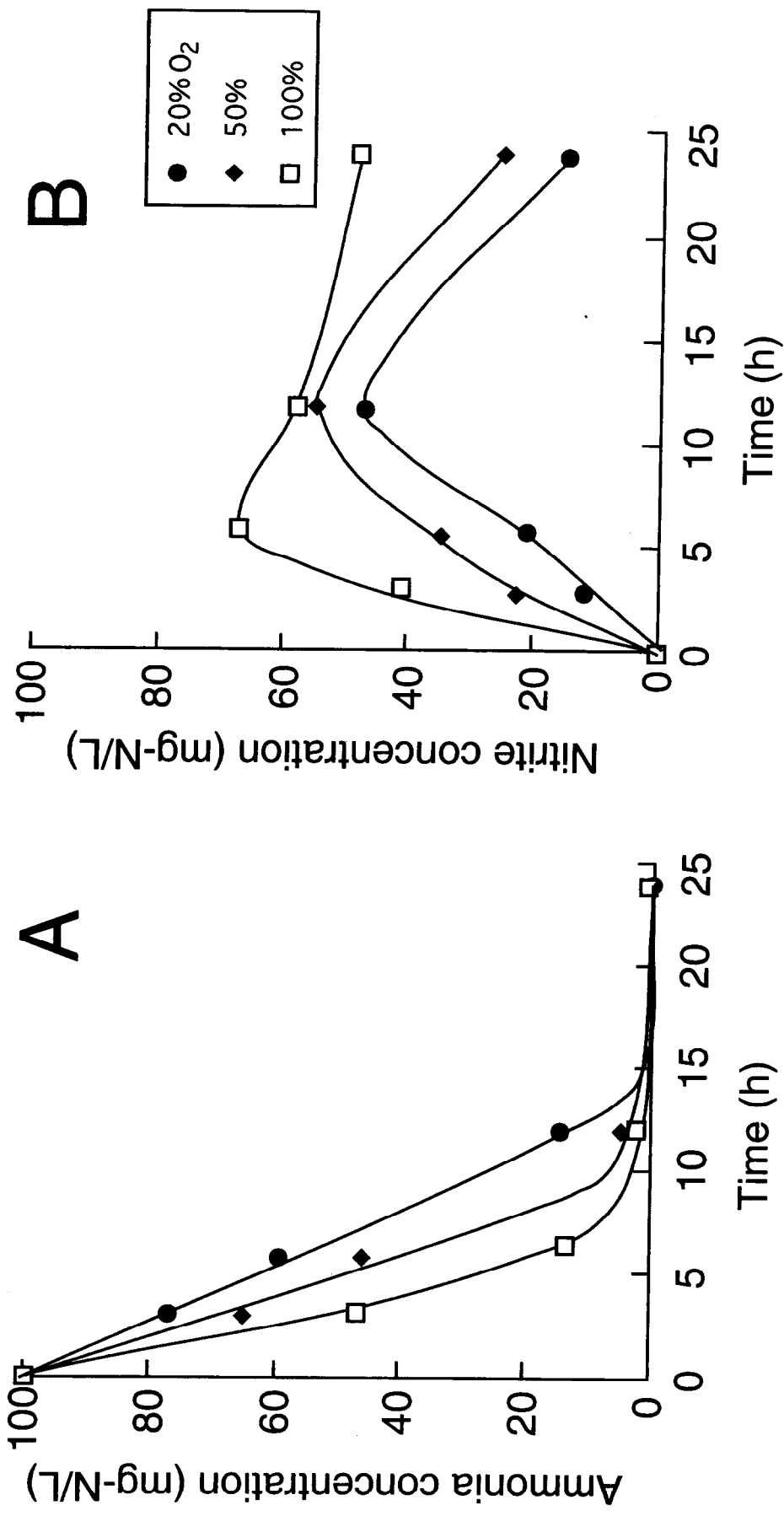


FIG. 4-8. Time dependent changes of ammonia (A) or nitrite (B) concentrations in wastewater treated with acclimated tubular gel.



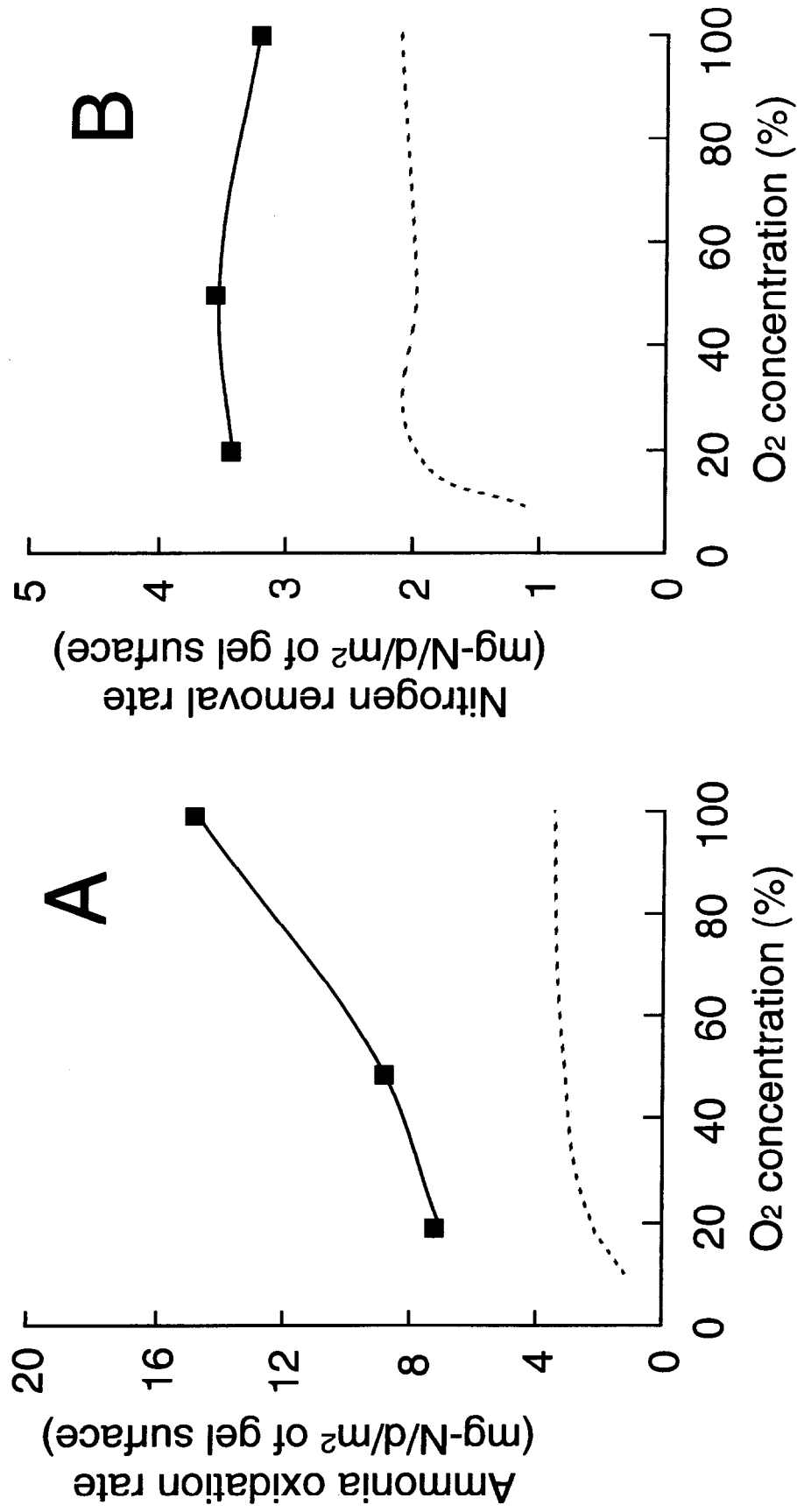
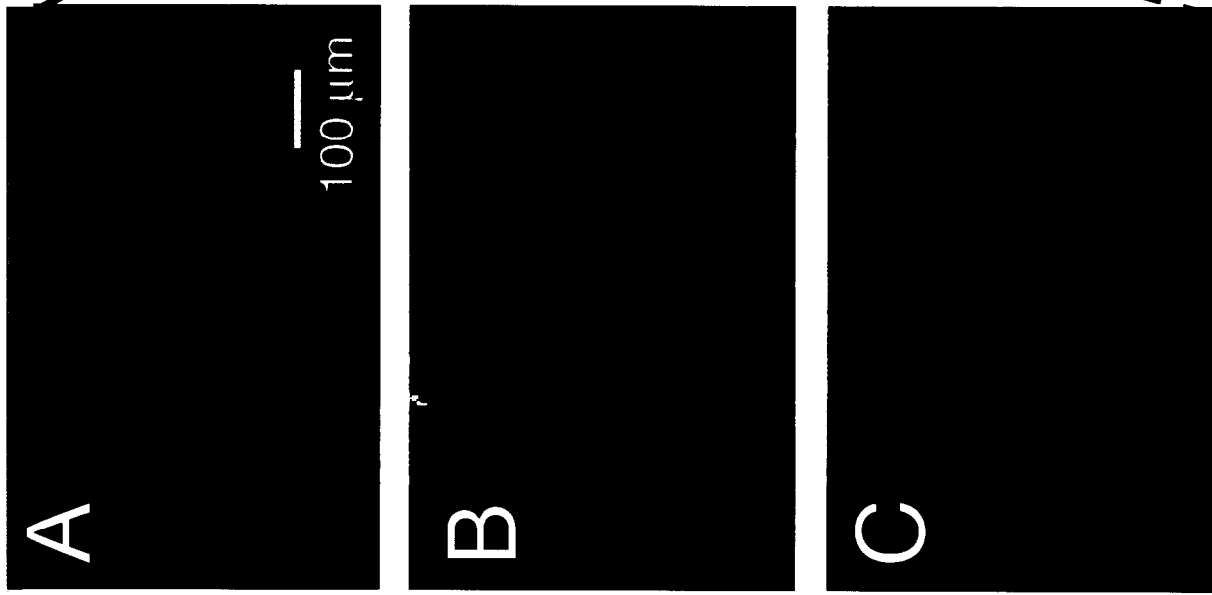


FIG. 4-9. Ammonia oxidation rate (A) and nitrogen removal rate (B) of tubular gel before and after acclimation. Dotted lines show the rates of the tube before acclimation. Solid lines show the rates of tube after acclimation.



*N.europaea*

*P.denitrificans*

Tubular gel

FIG. 4-10. Fluorescence photomicrographs of *N. europaea* (A, B and C) and *P. denitrificans* (D) in regions of tubular gel cut in cross section. Panels A, B, and C show the external surface of the tubular gel acclimated to 20 %, 50 %, and pure O<sub>2</sub>, respectively. Panel D shows the internal surface. The corresponding areas within the tubular gel are illustrated in the center diagram.

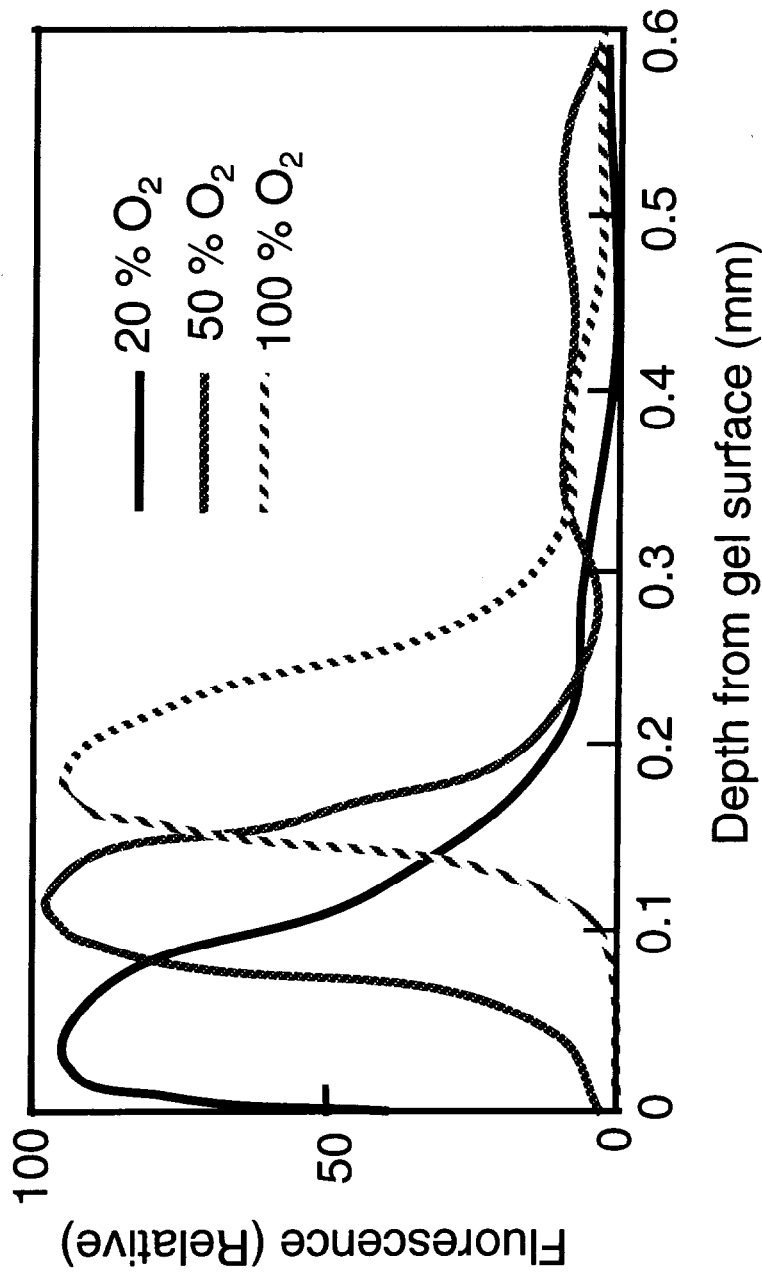


FIG. 4-11. Distributions of *N. europaea* and *P. denitrificans* within tubular gel acclimated to pure hydrogen. These curves were determined by analysis of the images in Fig. 4-10.

のための反応槽が必要となる。溶解度が非常に低い水素 (0.021/1 (v/v), 0 °C, 1 atm) を溶かすための激しい攪拌には大きなエネルギーを要することに加え、溶液中の微生物は、水中に溶解したわずかの水素ガスしか利用することができない。本チューブ状ゲルは、水素ガスを水に溶解することなく、ガス状のまま脱窒の電子供与体として利用できることは、本リアクターを実用化する際に利点となると思われる。

水素ガスを流す条件下において、チューブ状ゲル内部の *N.europaea* と *P.denitrificans* の分布の経時変化を蛍光抗体法により観察した。その結果、*N.europaea* のコロニーはチューブの外側表面に近い領域に、*P.denitrificans* のコロニーはチューブの内側表面に近い領域に分布しているのが観察された (図 4-5)。このような分布が観察されて理由については、酸素 (0.049/1 (v/v), 0 °C, 1 atm)、水素がともに水に溶解しにくくゲル内部への供給速度が遅いことが挙げられる。すなわち、*N.europaea* はチューブの外側表面からの酸素の供給律速により、*P.denitrificans* はチューブの内側表面からの水素の供給律速により、ともにゲル表面に近い領域までしか増殖できなかったものと考えられる。一方、脱窒の電子供与体としてエタノールを使った場合のチューブ状ゲルにおいては、*N.europaea* と *P.denitrificans* が外側表面から 100 μm までの領域に重複して分布しており、*N.europaea* が必要とする酸素を *P.denitrificans* が消費してしまう問題点を第 3 章において考察した。これに対し、水素ガスを用いた場合には、*N.europaea* と *P.denitrificans* の分布の重なりがないため、両菌株が効率よく働ける環境が維持されるものと考えられる。これにより、水素ガスを用いた馴養後のチューブ状ゲルのアンモニア酸化速度は、エタノールを用いた場合のアンモニア酸化速度よりも約 25% 高い値を示したものと思われる (表 4-1)。

エアレーションの代わりに酸素ガスを利用してゲル内部の *N.europaea* に大量の酸素を供給することにより、ゲル自体の活性を向上させることを試みた。固定化していない *N.europaea* に高濃度の酸素を暴露した場合、アンモニア酸化は停止し (図 4-6)、高濃度の酸素が *N.europaea* に対し毒性を示すことが確認された。微生物に対する酸素の毒性に関しては多くの報告<sup>114-117)</sup>があり、細胞内に活性酸素 ( $O_2$ 、 $H_2O_2$ 、 $OH^+$ ) が蓄積することにより損傷が起こることが指摘されている。固定化していない *N.europaea* においても過剰の酸素が供給されたため、蓄積したこれらの活性酸素により細胞が損傷を受けアンモニア酸化活性を失ったものと考えられる。これに対し、チューブ状ゲルのアンモニア酸化速度は、酸素濃度の上昇にともなって高くなり、バッチ処理を繰り返すことにより長期間高濃度の酸素に曝した場合にも、その傾向は変わらなかった (図 4-9A)。これは、ゲル内部の *N.europaea* は、曝気に用いた混合ガス中の酸素濃度が上昇するにしたがって、チューブ状ゲルの外側表面から離れた内側の領域において増殖 (図 4-11) することにより、高濃度の酸素の毒性から逃れたものと考えられる。さらに、高濃度の酸素によってゲル内部への酸素の供給量は増加したことから、ゲルのアンモニア酸化速度が向上したと考えられる。一方、チューブ状ゲルの窒素除去速度に関しては、100% 酸素使用時の速度と 20%

酸素使用時の速度にほとんど差が無かった（図 4-9B）。また、チューブ状ゲル内部の *P.denitrificans* はゲルの内側表面に近い領域に分布し（図 4-11）、酸素濃度の影響を全く受けなかった。これらのことから、ゲル中の *P.denitrificans* は高濃度の酸素に対し全く影響を受けておらず、脱窒に必要な嫌気な領域は 100%濃度酸素に暴露した場合においても維持されたと考えられる。

チューブ状ゲルは、水素ガスおよび酸素ガスを利用して効率の良い窒素除去が行えることが分かった。水素ガスは不活性であり、水の組成に影響を与えないため、飲料水の浄化や水棲生物の飼育水の浄化などにおいては、最適な電子供与体と考えられる。そのため、排水処理以外の幅広い分野においても、チューブ状ゲルを利用した窒素除去バイオリアクターを適用できるものと思われる。また、水素ガスは水の電気分解により容易に発生させることができる。従って、電気分解時に陰極において発生する水素を脱窒の電子供与体として利用するとともに、陽極において同時に発生する酸素は、*N.europaea* によるアンモニア酸化速度を向上させるために利用することが可能である。この様な、電気エネルギーを利用したシステムは、電気が使用できる場所であればどこでも使用できることから、さらなる窒素除去装置のコンパクト化や適用範囲の拡大につながるものと考えられる。

#### 4.5 本章のまとめ

本章では、チューブ状ゲル内部の微生物分布を最適化することにより、ゲル自体の活性向上を図ることを目的として、チューブ状ゲルの脱窒の電子供与体として水素ガスを、排水中へのエアレーションの代わりに酸素ガスを用い、以下の結果を得た。

- 1) チューブ状ゲルはガス状の水素を溶液中に溶解することなく、脱窒の電子供与体として利用できることが分かった。また、水素ガスを使うことにより、*P.denitrificans* と *N.europaea* の分布を完全に分離することができたため、両菌株が効率よく働ける環境が維持された。これにより、水素ガスを用いた場合のアンモニア酸化速度は、エタノールを用いた場合のアンモニア酸化速度よりも約 25%高い値を示す結果となった。
- 2) 固定化していない *N.europaea* に対し、高濃度の酸素は毒性を示した。これに対し、ゲル内部に固定化された *N.europaea* は高濃度の酸素条件下で高い活性を示した。これは、酸素濃度が上昇するにしたがって、チューブ状ゲルの外側表面から離れた内側の領域において *N.europaea* が増殖し、高濃度の酸素の毒性から逃れるとともに、高濃度の酸素によって増加したゲル内部への酸素供給により、ゲルのアンモニア酸化速度が向上したためと考えられる。また、チューブ状ゲル内部の *P.denitrificans* の脱窒活性および分布状態は、酸素濃度の影響を全く受けず、脱窒に必要な嫌気な領域は 100%酸素使用時においても維持されたと考えられる。
- 3) チューブ状ゲルは、水素ガスおよび酸素ガスを利用して効率の良い窒素除

去が行える。従って、水の電気分解により発生する水素と酸素を利用することにより、小型で適用範囲の広い窒素除去装置の開発が可能になると思われる。

## 第 5 章

### 封筒状ゲルを用いたバイオリアクターによる窒素除去

チューブ状ゲルに代わる新しいゲル形状として、2枚の膜状ゲルからなる封筒状ゲルを作製し、その窒素除去能力について検討する。

## 5.1 緒言

第2章において、チューブ状ゲルは窒素除去に必要な好気、嫌気のプロセスを単純化し、既存の装置を小型化、簡便化できることを示した。また、第3章における蛍光抗体法を用いたゲル内部の微生物分布の解析から、窒素除去に有効なゲル領域はゲル表面から 300  $\mu\text{m}$  程度であり、チューブ状ゲルの容積当たりの表面積を増加させることによるリアクターの能力向上が図れることを示した。しかしながら、チューブ状ゲルをそのままの形状でリアクターに高密度に充填することは困難であり、高密度化が可能なゲルの形状についても検討する必要がある。

本章では、リアクターの浄化能力を向上させるため、チューブ状ゲルと同等の機能を持ち、かつリアクターへの高密度での充填が可能な封筒状ゲルを作製した。この封筒状ゲルを用いることにより、容積当たりのゲル表面積を大きくしたリアクターの窒素除去能力について検討した。

## 5.2 材料と方法

### 5.2.1 封筒状ゲルの作製

アンモニア酸化菌 *N.europaea* と脱窒菌 *P.denitrificans* を固定化した膜状ゲルを、第2章と同様の固定化操作により作製した。膜状ゲルの大きさは、横 48 mm、縦 100 mm、厚さ 0.5 mm とし、U字型のスペーサーをはさんで張り合わせ、図 5-1 に示すような封筒状ゲルを作製した。封筒状ゲル上端には、外径 2 mm、内径 1 mm のテフロンチューブ 2 本を接着し、膜と膜の間の空間に、脱窒のための電子供与体であるエタノール溶液を供給できるようにした。

### 5.2.2 模擬排水のバッチ処理

封筒状ゲルを用いて、200 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水 250 mL のバッチ処理を行った。実験装置の模式図を図 5-2 に示す。実験は、30°C の条件下で行い、エアレーション (100 mL/min) とスターラーによる攪拌 (300 rpm) を行った。実験に用いた模擬排水は第2章と同様のものを用いた。模擬排水の pH は、1 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  を用いて 7.8 に調整した。また、脱窒反応の電子供与体として 0.5 % (v/v) のエタノール溶液 1 mL を実験開始時に封筒状ゲル内部に添加し、以後、24 時間毎に 0.5 % (v/v) のエタノール溶液 1 mL を添加した。エタノール溶液は、前述のリン酸緩衝液 (pH 7.5) にエタノールを添加して作製した。模擬排水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度は、それぞれ第2章の方法に従い測定した。

### 5.2.3 模擬排水の連続処理

バッチ処理により活性が安定した封筒状ゲルを 8 個充填した容量 250 mL のリアクターを用い、模擬排水の連続処理を行った。実験装置の模式図を図 5-3 に示す。実験は 30°C の条件下で行い、エアレーション (100 mL/min) による攪拌を行った。実験に用いた模擬排水は、バッチ処理で用いたものと同様であ



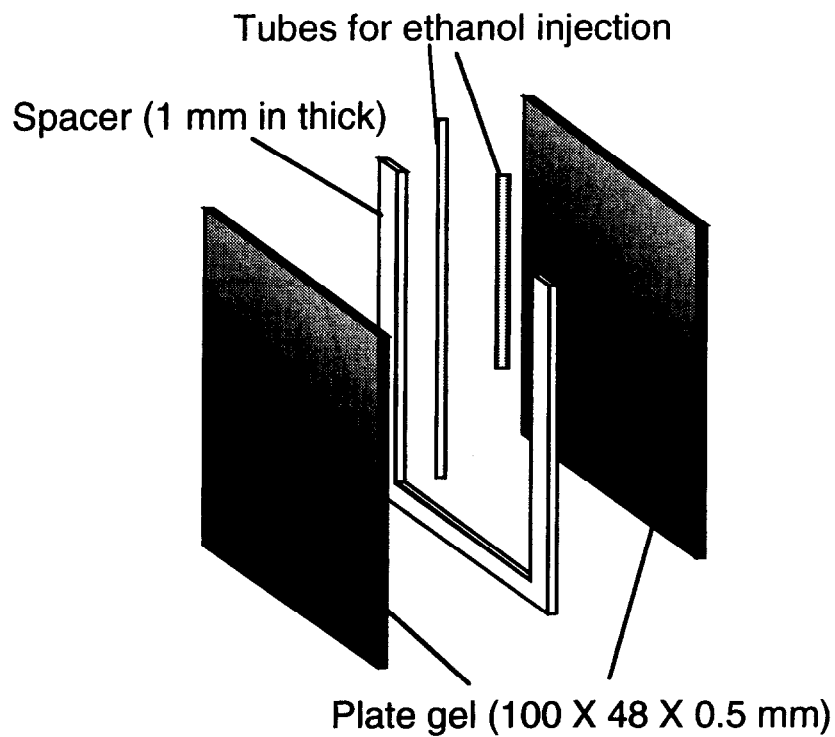


FIG. 5-1. Schematic diagram of packed gel envelope. The envelope consisted of two plate gels and a spacer between them. Ethanol as an electron donor for denitrification was injected to the internal space of the envelope through the tubes on its top.

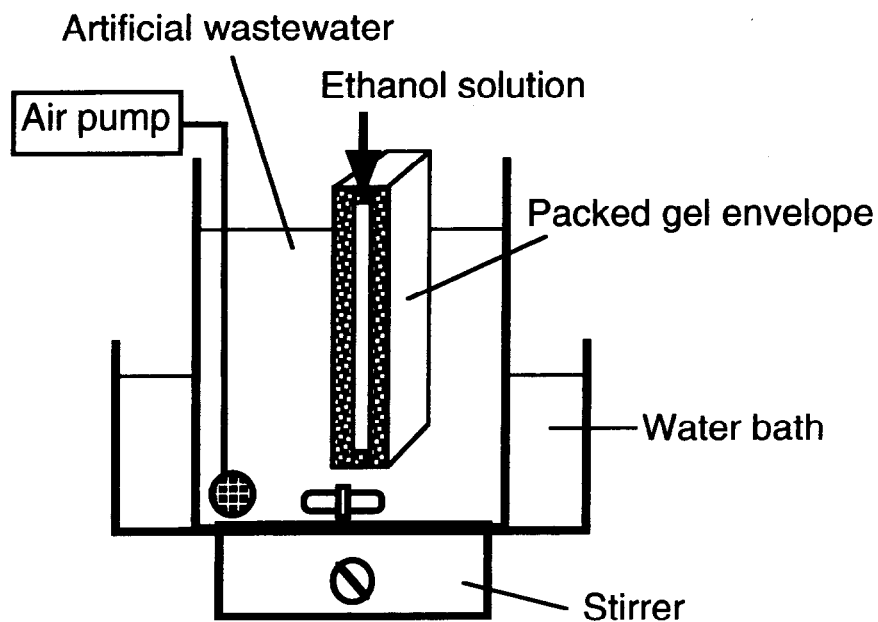


FIG. 5-2. Schematic diagram of batch system using packed gel envelopes. Artificial wastewater (250 mL) containing 200 mg-N/L of ammonia was treated by the batch system. The wastewater was agitated by aeration (100 mL per minute) and stirring (300 rpm) at 30 °C. The wastewater was replaced by new one after 96 hours. The batch experiment was carried out repeatedly for acclimation of the gel.

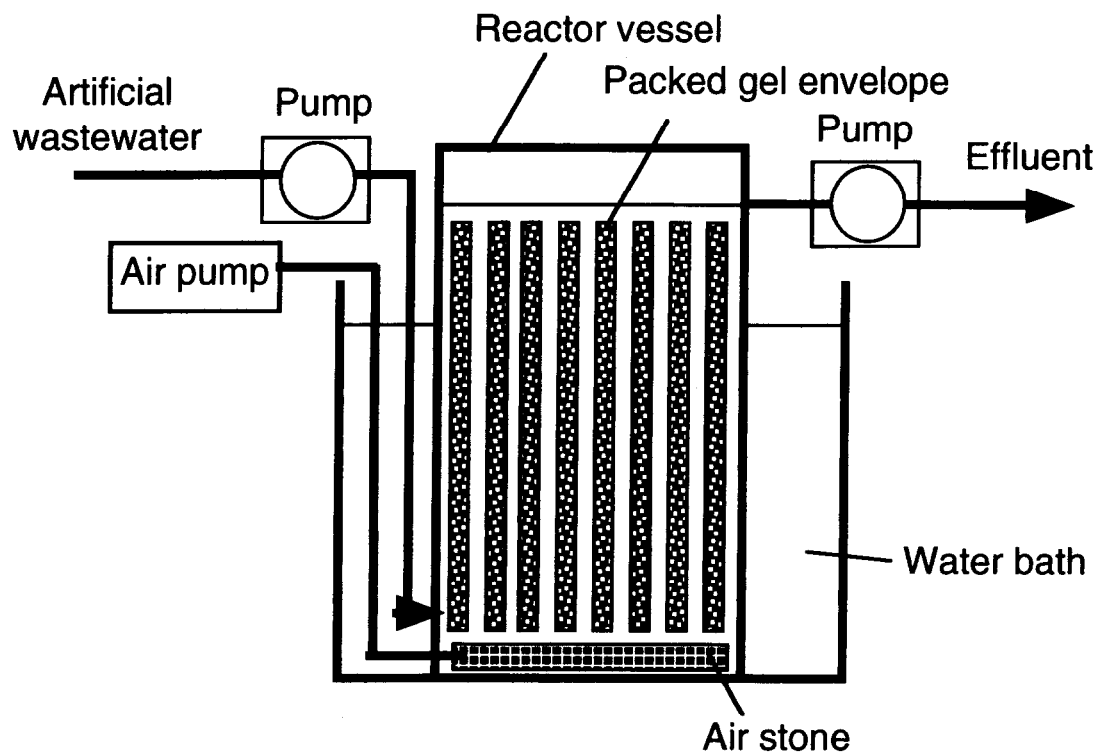


FIG. 5-3. Schematic diagram of once-through reactor containing eight packed gel envelopes. The eight acclimated envelopes were placed at intervals of three millimeter in the reactor vessel whose working volume was 250 mL.

り、ポンプを用いて注入し、オーバーフローするように設定した。

リアクターのアンモニア酸化速度と窒素除去速度に及ぼすエタノール添加量の影響を調べるため、リアクターへの模擬排水の供給ポンプの流速を固定（250 mL/h、滞留時間 1 時間）した条件下において、エタノール添加量を変化させた。エタノール濃度は 10 % (v/v) とし、1 時間毎に 8 個の各封筒状ゲル内に 0.04、0.1、0.2、0.3、0.4 mL ずつ添加した。そして、オーバーフローした処理水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸、T O C 濃度を測定した。

また、リアクターのアンモニア酸化速度と窒素除去速度に及ぼす模擬排水の滞留時間の影響を調べるため、エタノール添加量を固定（各封筒状ゲル内に 10 % (v/v) のエタノール溶液 0.2 mL ずつを 1 時間毎に添加）した条件下において、ポンプの流速を 78~320 mL/h（滞留時間 3.2~0.8 時間）に変化させて、オーバーフローした処理水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度について測定した。

### 5.3 結果

#### 5.3.1 バッチ処理による封筒状ゲルの馴養

封筒状ゲルを用いて、200 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水のバッチ処理を行った。模擬排水中のアンモニア濃度は亜硝酸の蓄積なしに減少し（図 5-4）、硝酸は検出されなかった（ $<0.05$  mg-N/L）。また、模擬排水中のアンモニア濃度の減少量から算出されるゲル表面積 1 m<sup>2</sup> 当たりのアンモニア酸化速度は、最初のバッチ処理では、 $4.14\pm 0.41$ （平均±標準偏差、反復数=3）g-N/day であり、窒素除去速度は  $3.14\pm 0.43$  g-N/day であった。その後、模擬排水を交換し、バッチ処理を繰り返した結果、2 回目のバッチ処理では、それぞれの速度は  $5.58\pm 0.31$  と  $5.04\pm 0.40$  g-N/day に上昇したが、3 回目以降はほぼ一定となった（表 5-1）。

#### 5.3.2 リアクターの浄化能力に及ぼすエタノール添加量の影響

滞留時間が一定（1 時間）の条件下、1 時間毎に添加するエタノール量を変化させて 200 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水の連続処理を行った。各エタノール添加量における処理水中のアンモニアと亜硝酸濃度を図 5-5 に示す。処理水中のアンモニア濃度は、エタノールを添加しない場合  $120.7\pm 3.2$ （平均±標準偏差、反復数=4）mg-N/L であったが、エタノールを添加した場合においても、ほとんど変化しなかった。一方、処理水中の亜硝酸濃度は、エタノール添加量の増大にともなって著しく減少し、エタノール添加量 0.2 mL 以上においては、5 mg-N/L 以下となった。また、いずれの場合においても、処理水中から硝酸は検出されなかった（ $<0.05$  mg-N/L）。

処理水中の T O C 濃度については、エタノールを添加しない場合において  $5.3\pm 0.1$ （平均±標準偏差、反復数=4）mg-N/L であり、処理前の模擬排水中の T O C 濃度 4.2 mg-N/L よりも若干高かった（図 5-6）。これに対し、エタノールを添加した場合、添加量 0.2 mL までは、添加しない場合と T O C 濃度に差が

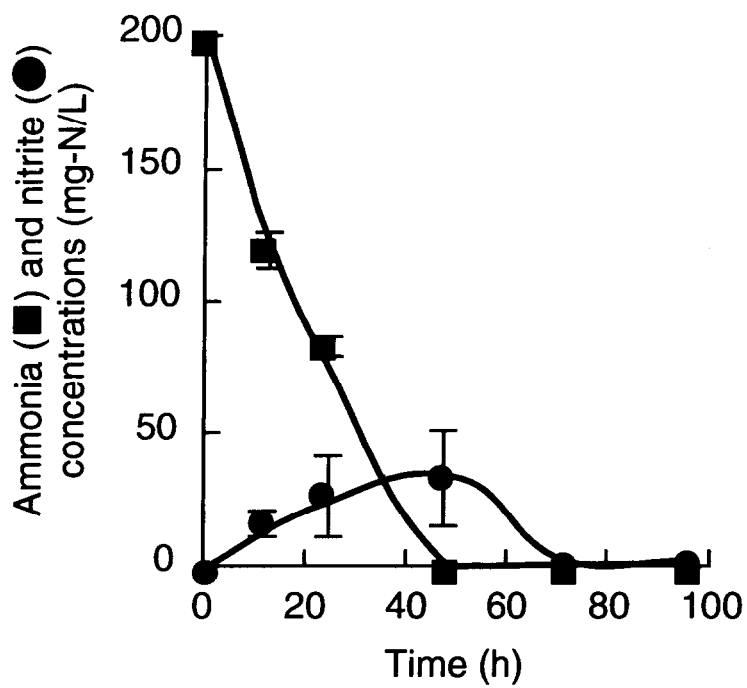


FIG. 5-4. Changes in ammonia and nitrite concentrations in wastewater during first batch examination. Bars show standard deviations (n=4).

Table 5-1. Change in rates of ammonia oxidation and nitrogen removal by acclimation of packed gel envelope.

Batch process	Ammonia oxidation rate	Nitrogen removal rate
	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ (g-N/day for 1 m <sup>2</sup> of gel surface)	$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$
1	4.14 ± 0.41	3.14 ± 0.43
2	5.58 ± 0.31	5.04 ± 0.40
3	5.38 ± 0.41	4.82 ± 0.18
4	5.50 ± 0.79	4.73 ± 0.72

Batch process was carried out repeatedly to acclimate the gels. Values are expressed as the mean ± SD (n = 4).

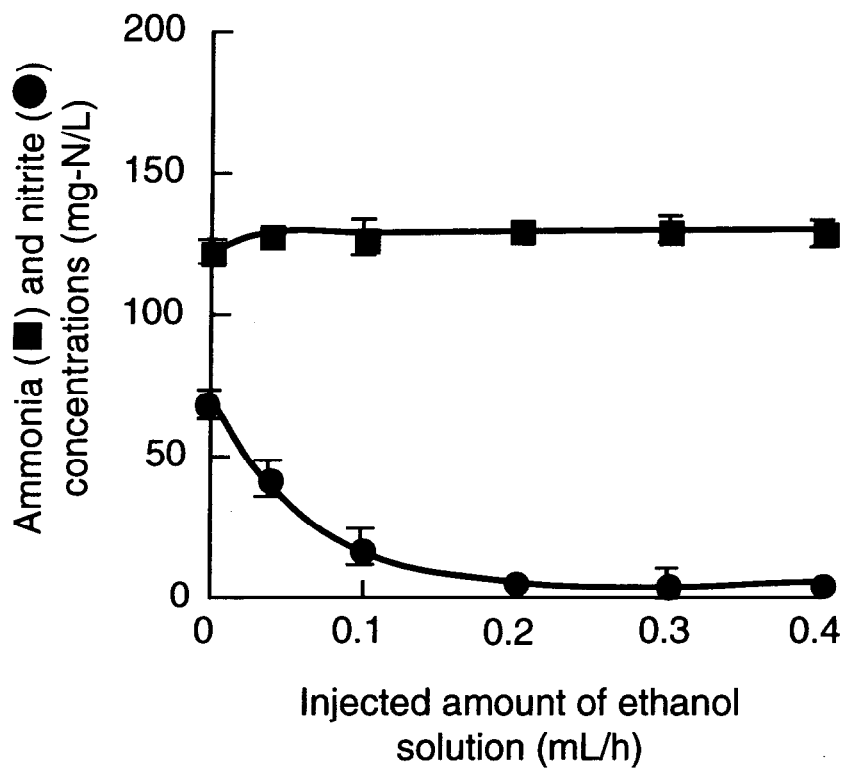


FIG. 5-5. Effect of ethanol injection on nitrification and denitrification by reactor using pack gel envelopes. Various amounts, 0 to 0.4 mL of 10% (v/v) ethanol solution was periodically injected to the internal space of the envelopes every an hour. Bars show standard deviations (n=3).

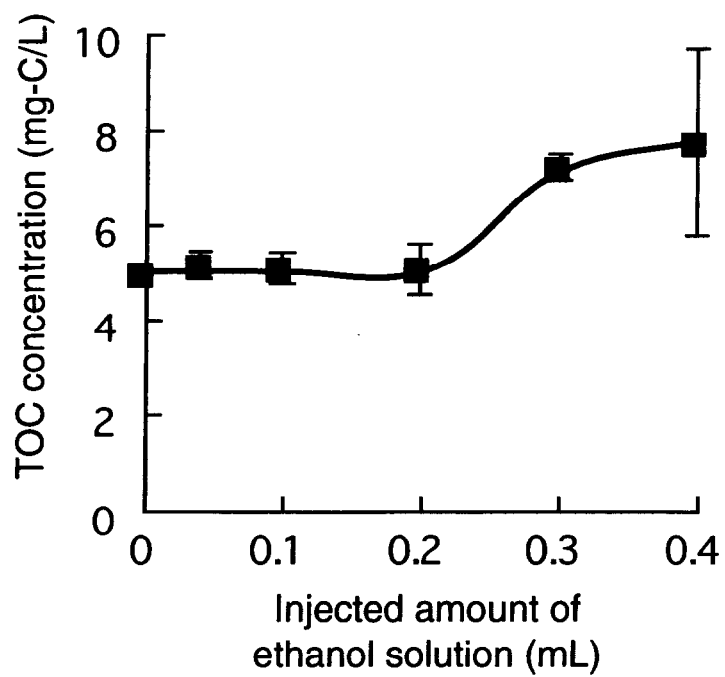


FIG. 5-6. Effect of ethanol injection on TOC concentration in effluent. Bars show standard deviations (n=3).



なかったが、添加量 0.3 mL 以上においては、添加量の増加とともに上昇した。

### 5.3.3 リアクターの浄化能力に及ぼす排水の滞留時間の影響

エタノールの添加量が一定 (0.2 mL) の条件下、滞留時間を変化させて 200 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水の連続処理を行った。模擬排水の各滞留時間における処理水中のアンモニアと亜硝酸濃度を図 5-7 に示す。処理水中のアンモニア濃度は、滞留時間の増大ともなって減少し、滞留時間 3.3 時間では 10 mg-N/L 以下となった。一方、亜硝酸濃度は、滞留時間 1 時間では 10 mg-N/L 以下であったが、滞留時間の増大とともに若干上昇する傾向が見られた。また、いずれの場合においても、処理水中から硝酸は検出されなかった (<0.05 mg-N/L)。

## 5.4 考察

本実験では、2枚の膜状ゲルからなる封筒状ゲルを作製し、その浄化能力について検討した。封筒状ゲル単体を用いたバッチ処理実験において、模擬排水中のアンモニアは、亜硝酸、硝酸の蓄積なしに除去され (図 5-4)、封筒状ゲルの表面積 1 m<sup>2</sup> 当たりのアンモニア酸化速度は 5.5g-N/day、窒素除去速度は 4.7g-N/day であった (表 5-1)。この値は、第 3 章のチューブ状ゲルのアンモニア酸化速度 5.9 g-N/day と窒素除去速度 5.1 g-N/day に近い数値であった。従って、封筒状ゲルは、硝化と脱窒を同時に行うというチューブ状ゲルの特徴とともに、同等のゲル表面積当たりの活性を有していることが分かった。今回用いた封筒状ゲルは、厚さは 0.5 mm の膜状ゲル 2 枚を張り合わせただけという単純な構造であり、第 2 章などで使用した約 5mm の厚さを持つチューブ状ゲルに比較して著しく薄いものを利用した。これは、第 3 章におけるチューブ状ゲル内部の微生物分布の解析結果により、ゲル内部の有効領域はゲル表面から約 0.3 mm 程度であることが分かったためである。本実験で用いた封筒状ゲルにおいてもチューブ状ゲルと同等の活性が得られたことから、固定化微生物が硝化と脱窒を行う領域は、0.5 mm の厚さのゲル内部に確保されていることが明らかとなった。0.5 mm という薄いゲル膜が利用できることは、ゲルの容積当たりの表面積を増加させることになるため、単位容量当たりの浄化能力が高いリアクターの設計が可能になると考えられる。

バッチ処理により活性が安定した 8 個の封筒状ゲルを充填したリアクターを用いて、模擬排水の連続処理を行い、その浄化能力について検討した。最初に、封筒状ゲルへのエタノール添加量が、リアクター全体の活性に及ぼす影響について検討した。処理水中のアンモニア濃度は、エタノールの添加に関係なくほぼ一定であったが、亜硝酸濃度はエタノール添加量の増加ともなって減少し、0.2mL 以上では 5 mg-N/L 以下となった (図 5-5)。ゲル内部の *N.europaea* は、アンモニア酸化にエタノールを必要としないため、*N.europaea* の活性を示すアンモニア酸化速度はエタノール添加により全く影響を受けなかったと考えられる。しかし、大量にエタノールが供給された場合、脱窒菌やその他の従属栄養

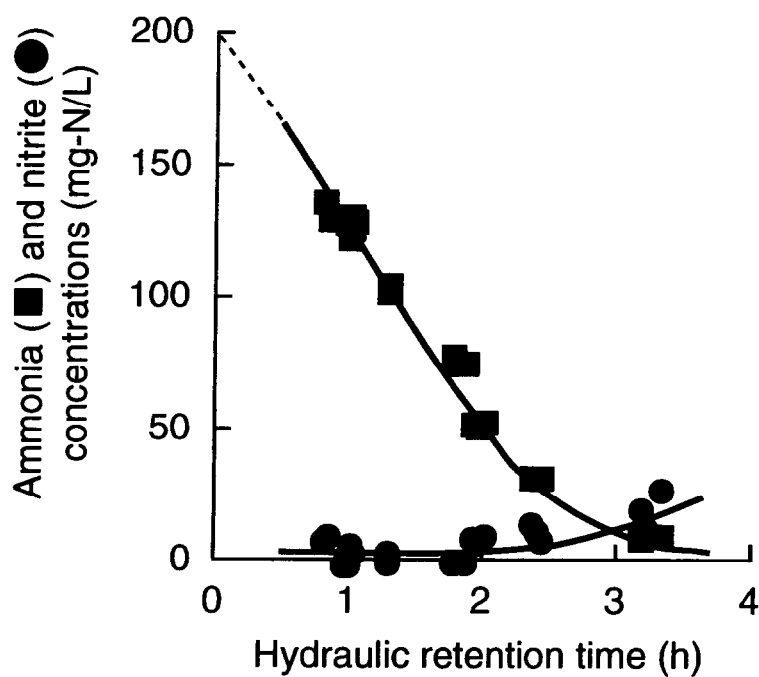


Fig. 5-7. Effect of hydraulic retention time of wastewater on ammonia and nitrite concentrations in effluent. The wastewater was continuously fed to reactor at the various rates. The hydraulic retention time was calculated by the rates and the reactor volume.

細菌が過剰のエタノールを利用して、アンモニア酸化菌が必要とする酸素を消費してしまう可能性がある。本実験では、0.4 mL 添加時においてもアンモニア酸化速度はほぼ一定に保たれているが、処理水中のTOC濃度の上昇が観察されており（図 5-6）、長期的には悪影響が現れるものと考えられる。一方、*N.europaea* と *P.denitrificans* の両方の活性を示す窒素除去速度は、エタノール添加量の影響を強く受け、ゲル内部の *P.denitrificans* がエタノールを利用して脱窒を行ったことが観察された。エタノール添加量 0.2mL 以上では亜硝酸濃度は 5 mg-N/L 以下に保たれたことから、*P.denitrificans* による脱窒には 0.2mL 以上のエタノールが必要であることが分かった。これ以上の添加は、処理水中のTOC濃度が上昇していることから、エタノールが脱窒による消費量を超えて処理水中に漏れ出しているものと考えられる。従って、本実験条件においては、エタノール添加 0.2mL が最も良いと判断された。

エタノール添加量 0.2 mL の条件下、模擬排水の滞留時間を変化させ、リアクターの処理能力について検討した。図 5-7 に示した処理水中のアンモニアと亜硝酸濃度から、リアクター容量 1m<sup>3</sup> 当たりのアンモニア酸化速度、窒素除去速度を算出した（図 5-8A）。また、処理水中のアンモニアの除去率と滞留時間との関係についても示した（図 5-8B）。アンモニア酸化速度と窒素除去速度は、滞留時間 1.0 時間時にそれぞれ 1.9 と 1.6 kg-N/day に達した。これらの速度は、滞留時間 2.4 時間でそれぞれ 1.7 と 1.5 kg-N/day となり、処理水中のアンモニア除去率は約 80% に達した。3.3 時間の滞留時間においては、アンモニア除去率は 95% にまで達したが、アンモニア酸化速度と窒素除去速度はそれぞれ 1.4 と 1.2 kg-N/day に低下した。これらの速度が低下した理由については、溶液中のアンモニア濃度が低下し律速となったためと考えられる。これに対し、これまでに報告されている窒素除去バイオリアクターの窒素除去速度<sup>92, 95, 96, 100, 124)</sup> は、処理条件が異なるため、単純に比較が困難であるが、最大で 1.5 kg-N/day 程度である（表 5-2）。従って、これらと比較して、本リアクターが同等以上の処理能力を持つことが明らかとなった。本実験においては、微生物を高濃度に固定化したゲルを利用したことに加え、リアクター容積当たりの封筒状ゲルの充填率は約 50% (v/v) となるまでリアクター内に充填した。このような高密度の条件下においても、ゲルの表面積当たりの活性は封筒状ゲル単体で使用した時と同等であった。封筒状ゲルが規則正しく平行して並んでいることから、効率の良い曝気攪拌が可能となり、高い処理能力が発揮できたものと考えられる。また、本リアクターの特徴である硝化と脱窒が同時に効率よく起きていることも、これらの速度の向上に寄与しているものと考えられる。

## 5.5 本章のまとめ

封筒状ゲルを用いたバイオリアクターを用いて、模擬排水のバッチ処理および連続処理を行うことにより、以下の結果を得た。

- 1) 封筒状ゲルは、硝化と脱窒を同時に行うチューブ状ゲルの特徴と、ゲル表

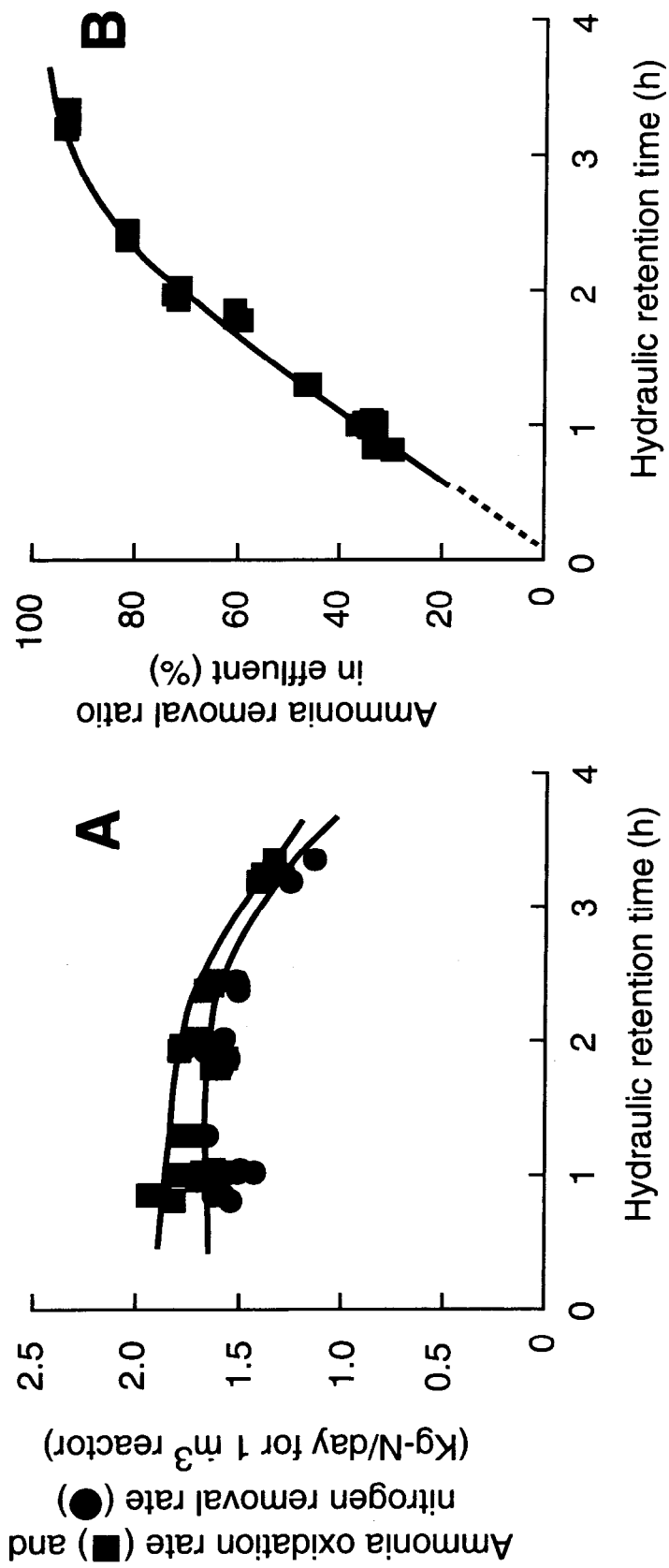


Fig. 5-8. Effect of hydraulic retention time of wastewater on rates of ammonia oxidation and nitrogen removal by reactor (A), and on ammonia removal ratio in reactor effluent (B). The two rates and the removal ratio were calculated based on the ammonia and nitrite concentrations shown in Fig. 5-7.

Table 5-2. Rates of ammonia oxidation and nitrogen removal by nitrogen removal system using immobilized cells

Reactor system (reactor volume)	Immobilized bacteria	Polymeric gel for immobilization	Ammonia oxidation rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) (g-N/day for 1 m <sup>3</sup> reactor volume)*	Nitrogen removal rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ )
Bioreactor (0.34 dm <sup>3</sup> ) (Ginkel C.G. et al. 1983)	<i>N.europaea</i> (ATCC 19718)	Calcium alginate	255.7	
Column reactor (2.4 L) (Itoh K. et al. 1988)	<i>N.europaea</i> (ATCC 25978)	Photocrosslinkable resin (PVA-SbQ)	84.7	
Air-lift loop reactor (1.3 dm <sup>3</sup> ) (Wijffels R.H. and Tramper J. 1989)	<i>N.europaea</i> (ATCC 19718)	k-Carrageenan	997.9	
Bubble-column reactor (150 mL) (Santos V.A.P.M. dos et al. 1996)	<i>N.europaea</i> (ATCC 19718) and <i>Pseudomonas denitrificans</i> (LMD 22.21)	Double-layer (calcium alginate and k-carrageenan)		1542
Water-jacketed glass column (31.4 mL) (Kokufuta E. et al. 1987)	<i>N.europaea</i> (ATCC 25978) and <i>Paracoccus denitrificans</i> (IFO 12442)	Polyelectrolyte complexes- stabilized calcium alginate		611.5
Reactor using packed gel envelopes (250 mL) (In this study)	<i>N.europaea</i> (IFO 14298) and <i>Paracoccus denitrificans</i> (JCM 6892)	Photocrosslinkable resin (PVA-SbQ)	1907	1603

\*The rates of ammonia oxidation and nitrogen removal were calculated based on the data described in the previous papers to compare with those of our reactor in this paper.

面積当たりの活性では同等の能力を持つことが分かった。また、封筒状ゲルは、2枚の膜状ゲルを張り合わせただけという単純な構造であり、0.5 mm という薄いゲル膜が利用できることから、ゲルの容積当たりの表面積を増加させ、単位容量当たりの浄化能力が高いリアクターの設計が可能になると考えられる。

- 2) 封筒状ゲルを充填したリアクターは、1時間に0.2 mLのエタノールを各封筒状ゲルに添加する条件下において、亜硝酸を蓄積することなくアンモニアを除去することができ、処理水中のTOC濃度も5 mg-C/Lに維持できた。従って、処理水中にエタノールが残存することなく、アンモニアを除去できるリアクターの運用が可能であることが分かった。
- 3) 封筒状ゲルを充填したリアクターのアンモニア酸化速度と窒素除去速度は、それぞれ最大で1.9と1.6 kg-N/dayに達し、既存の窒素除去バイオリアクターの文献値と比較し、同等以上の処理能力を持つことが分かった。これは、封筒状ゲルが規則正しく平行して並んでおり、効率の良い曝気攪拌が可能な構造を有していること、硝化と脱窒が同時に効率よく起こっていることなどが、その理由と考えられる。

## 第6章

### プレート型バイオリアクターによる実排水の処理

膜状ゲルを用いたバイオリアクターが、模擬排水だけでなく発電所実排水の処理や宇宙ステーション用水棲生物飼育システムといった様々な分野の水処理に適用できるかについて検討する。

## 6.1 緒言

第5章において、封筒状ゲルを利用したバイオリアクターは、窒素除去に必要な好気、嫌気のプロセスを単純化し、既存の装置に比べ大幅な小型化と操作の簡便化が期待できるだけでなく、リアクター容積当たりの窒素除去能力も高いことが分かった。しかし、排水中のアンモニア濃度が低下することにより、アンモニア酸化速度、窒素除去速度ともに低下したことから、本リアクターの浄化能力も、排水の性状によって大きな影響を受けることが考えられる。

本章では、封筒状ゲルをさらに工業化しやすい形状とするため、膜状ゲルを張り合わせることなく利用できる新しいプレート型バイオリアクターを作製した。そして、模擬排水だけでなく発電所実排水の処理<sup>74, 75)</sup>や宇宙ステーション用水棲生物飼育システム<sup>125)</sup>といった様々な分野の水処理に対し、本バイオリアクターを適用することを試みた。

## 6.2 材料と方法

### 6.2.1 供試菌株とその固定化方法

アンモニア酸化菌 *N.europaea* と脱窒菌 *P.denitrificans* の培養および固定化操作は、第2章と同様に行い、光硬化性樹脂 PVA-SbQ (SPP-H-13、(株)東洋合成工業製) を用いて膜状ゲル (100 mm X 50 mm、厚さ 1 mm) を作製した。なお、本実験ではゲル膜に強度を持たせるため、1 mm 厚の金網 (SUS304) にゲルを塗布後、メタルハイドランプによる光照射を行うという手順で作製した。

### 6.2.2 プレート型バイオリアクターの作製

作製した膜状ゲルは、図 6-1 に示すようにテフロン製のホルダーを間に挟んで2枚一組として重ね合わせ、窒素除去バイオリアクターとした。本リアクターにおいて、排水と脱窒反応の電子供与体となるエタノール溶液は別々にリアクター内部に供給される。膜状ゲルの一方の面は排水だけに、他方の面はエタノール溶液だけに接する構造となっており、2つの溶液は混合することなく、リアクターから排出される。

### 6.2.3 模擬排水および実排水のバッチ処理

2枚の膜状ゲルを組み込んだプレート型バイオリアクターを用いて、100 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水 2 L のバッチ処理を行った。実験装置の模式図を図 6-2 に示す。実験は 30 °C の恒温槽内で行い、模擬排水は 500 mL/h、エタノール溶液は 200 mL/h の流速でポンプを用いて別々にリアクター内部に供給した。模擬排水を入れた容器は常時エアレーション (100 mL/min) を行った。模擬排水は第2章で使用したのと同じ組成のものを使用し、pH は、1 M  $K_2CO_3$  を用いて 7.8 に調整した。また、脱窒反応の電子供与体としては、0.1 % (v/v) のエタノール溶液 200 mL を使用した。そして、模擬排水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度を第2章と同様の方法により測定し、その経時



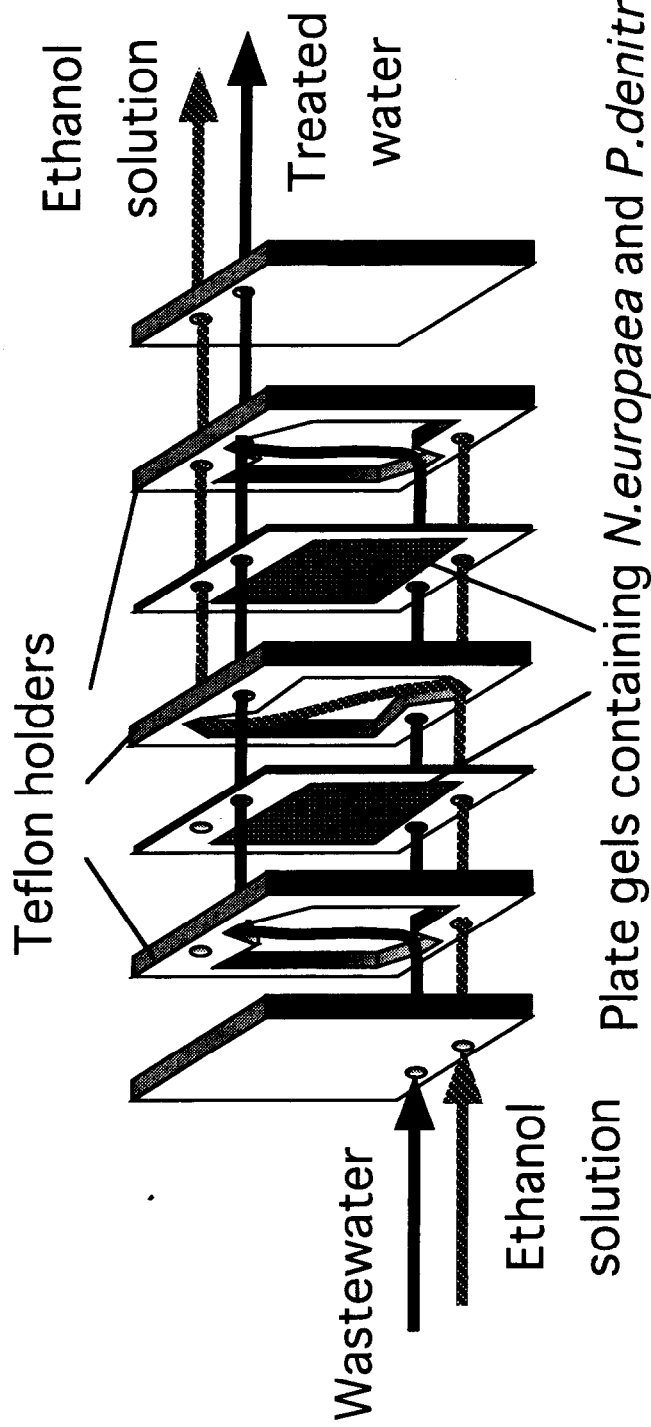


FIG. 6-1. Schematic diagram of plate type of bioreactor. The bioreactor was constructed by two polymeric plate gels containing *N.europaea* and *P.denitrificans*. The wastewater and ethanol solution as an electron donor for denitrification were separately fed to the bioreactor.

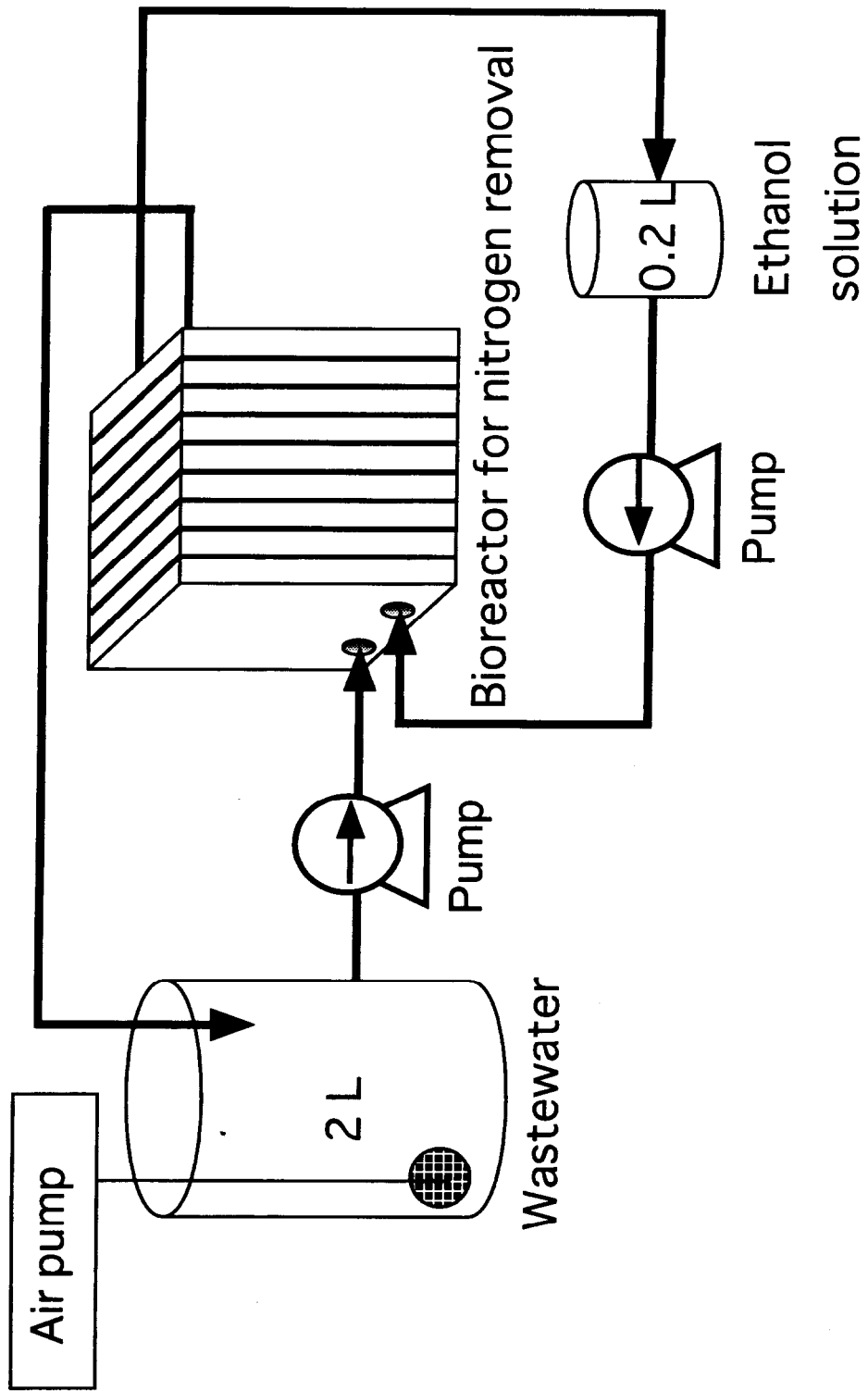


FIG. 6-2. Schematic diagram of batch system for acclimation of the bioreactor.

変化を観察した。硝酸濃度および総有機炭素 (TOC) 濃度の分析には、それぞれイオンクロマトアナライザ (DX-AQ、ダイオネックス社製) と TOC 分析計 (TOC-650、東レエンジニアリング社製) を用いた。

実験開始から 96 時間後、模擬排水とエタノール溶液を新しい溶液と交換し、バッチ処理を繰り返し行った。そして、リアクターの活性が安定するのを待ってから、実排水の処理実験を行った。アンモニアを主成分とする実排水として、発電所の脱硝装置排水 (アンモニア濃度 31.7 mg-N/L、亜硝酸濃度 0.7 mg-N/L、硝酸濃度 0.01 mg-N/L 以下、TOC 濃度 5.8 mg-C/L) を用いた。実排水のバッチ処理実験においては、排水に最終濃度で 100mg-N/L になるよう硫酸アンモニウムを添加し用いた。処理条件は、模擬排水の場合と同様のバッチ処理であり、循環する実排水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度を測定し、その経時変化を観察した。

#### 6.2.4 水棲生物飼育装置への適用

プレート型バイオリアクターを、宇宙ステーション用水棲生物飼育装置に適用することを試みた。水棲生物飼育装置は、宇宙ステーションにおいて魚などの水棲生物を完全な閉鎖系水槽で 90 日間にわたって飼育し、水棲生物の交尾、産卵、発生といった生命活動に及ぼす重力などの影響を検討する装置である。本飼育装置は、ポリ塩化ビニル製の円筒型飼育槽 (内容量 10L)、懸濁物質除去槽、UV 殺菌灯 (Flon Fine、Photoscience Japan 製)、人工肺 (Capiox SX-10、テルモ製)、送液ポンプ、およびプレート型バイオリアクターと乳酸タンク (脱窒のための電子供与体) から構成され、飼育水は完全密閉状態で装置内を循環する構造となっている (図 6-3)。本実験に用いたプレート型バイオリアクターは、8 枚の膜状ゲルを組み込んだものを使用し、200 mg-N/L 濃度のアンモニアを含む模擬排水のバッチ処理によって馴化した後、飼育装置に組み込んだ。人工肺は、エアレーションの代わりに飼育水中への酸素の供給を行うため用いた。

実験は、25℃の条件下で行い、5 匹のフナ *Carassius auratus langsdorfiicarps* (平均体重 23.6±3.6g、平均体長 120±6mm) を 91 日間飼育し、本バイオリアクターの浄化能力の変化を観察した。フナの餌としては市販のペレット状のもの (Hikari Lionhead、Kyorin Food 製) を使用し、実験開始から 52 日目までは 1 日 0.5g を、53 日目から 70 日目までは 1 日 1.0g を、71 日目から実験終了時までは 1 日 4.0g を 2 回に分けて与えた。脱窒の水素供与体として乳酸ナトリウムを用い、実験開始から 42 日目以降に 10% 溶液 10mL を定期的に乳酸タンクに添加した。また、実験開始から 17 日目、36 日目、66 日目、87 日目には、リアクターの浄化能力を確認するため、10 mg-N/L 濃度になるよう飼育水中に硫酸アンモニウムを添加した。そして、循環する飼育水中のアンモニア、亜硝酸、硝酸濃度の経時変化から、プレート型バイオリアクターの浄化能力の測定した。

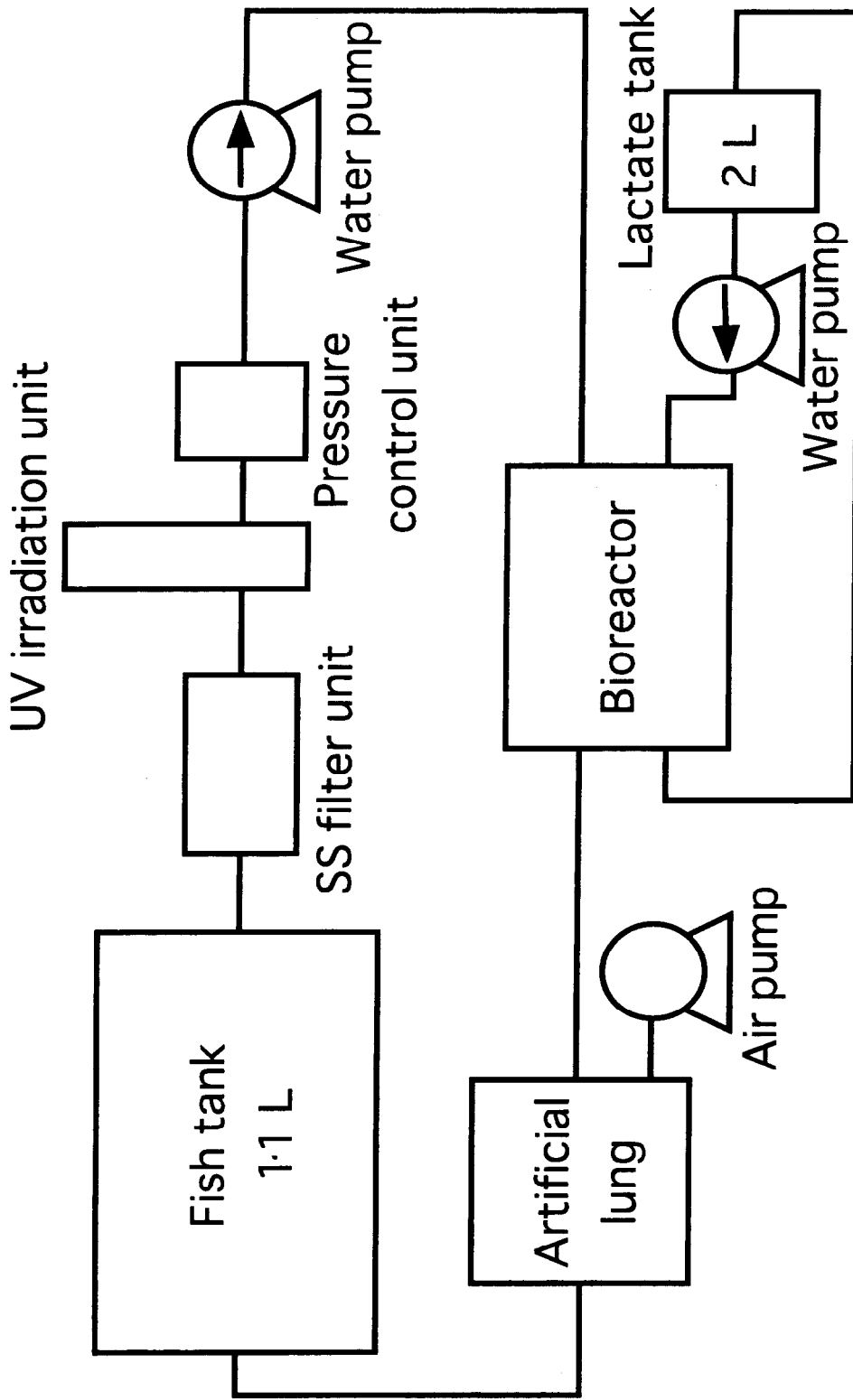


FIG. 6-3. Schematic diagram of closed water recirculating system. Water temperature was controlled about 25 °C. The closed system contained a total of 18 L of rearing water, which had been circulating through the system at 0.5 - 0.9 L/min. Water pressure in the system was kept about 4 kPa with a pressure control buffer.

### 6.3 結果

#### 6.3.1 模擬排水および発電所実排水のバッチ処理

2枚の膜状ゲルを組み込んだプレート型バイオリアクターを用いて 100 mg-N/L 濃度のアンモニアを含んだ模擬排水のバッチ処理を行った。その結果、模擬排水中のアンモニア濃度は、時間の経過とともに直線的に減少し、亜硝酸の蓄積が若干観察されたが、72 時間後にはアンモニア、亜硝酸ともに溶液中から消失した (図 6-4)。実験期間中に、溶液中から硝酸は検出されなかった (0.05mg-N/L 以下)。また、模擬排水中の TOC 濃度は、実験開始時の 5 mg-C/L からほとんど変化しなかった。

模擬排水中のアンモニア、亜硝酸濃度の経時変化量から、排水と接する膜状ゲルの表面積 1 m<sup>2</sup> 当たりの活性を算出した。アンモニア酸化速度と窒素除去速度は、それぞれ 3.86 g-N/day と 2.58 g-N/day であった (表 6-1)。その後、模擬排水を交換し、バッチ処理を繰り返した結果、2 回目のバッチ処理では、アンモニアと亜硝酸の消失が早くなり、アンモニア酸化速度は 6.00 g-N/day、窒素除去速度は 5.31 g-N/day に上昇した。その後、バッチ処理を繰り返したが、3 回目以降のアンモニア酸化速度と窒素除去速度はほぼ一定となった。

模擬排水のバッチ処理により馴化したプレート型バイオリアクターを用いて、発電所の実排水である脱硝装置排水のバッチ処理実験を行った。その結果、模擬排水と同様にアンモニアは亜硝酸の蓄積なしに消失し、硝酸の蓄積も観られなかった (0.05mg-N/L 以下)。また、排水中の TOC 濃度も、実験開始時の 5 mg-C/L からほとんど変化しなかった。バッチ処理実験で得られたアンモニア酸化速度と窒素除去速度を、模擬排水の場合と同様に算出した。その結果、膜状ゲルの表面積 1 m<sup>2</sup> 当たりのアンモニア酸化速度は 6.42 g-N/day、窒素除去速度は 5.26 g-N/day であった (表 6-1)。すなわち、活性が安定化したプレート型バイオリアクターは、実排水においても模擬排水で得られたアンモニア酸化速度と窒素除去速度と同様の浄化能力を示した。

#### 6.3.2 水棲生物飼育装置における連続運転

プレート型バイオリアクターを組み込んだ水棲生物飼育装置を用いて、5 匹のフナ *Carassius auratus langsdorfii* carps を 91 日間飼育した。5 匹のフナは、実験期間中異常な挙動を見せることなく生育し、平均体重は 23.6±3.6g から 31.7±2.6g に増加し、平均体長も 120±6mm から 140±8mm に増加した。

飼育水中のアンモニア濃度に関しては、実験開始後 15 日間 0.9~3.1 mg-N/L であったが、その後はアンモニアを飼育水中に添加した時以外は 0.05 mg-N/L 以下に維持された (図 6-5A)。また、17 日目、36 日目、66 日目、87 日目にリアクターの浄化能力を確認するため添加したアンモニアも速やかに消失した。亜硝酸濃度は、実験開始から 41 日目までは乳酸タンクに乳酸ナトリウムを添加しなかったため、脱窒が起きなかった。そのため、亜硝酸濃度は時間の経過とともに上昇したが、21 日目以降は減少し、アンモニア添加時以外は 0.05 mg-N/L 以下に維持された (図 6-5B)。硝酸は 21 日目以降、徐々に蓄積し、41

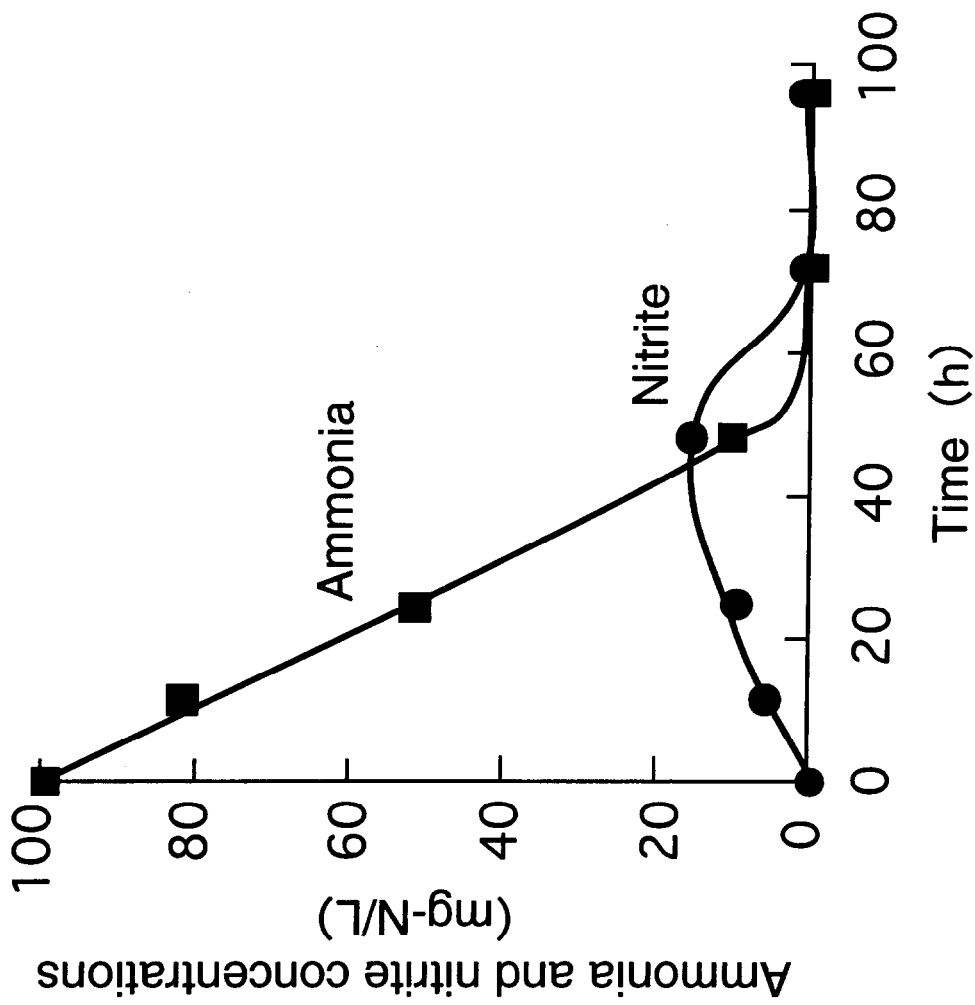


FIG. 6-4. Changes in ammonia and nitrite concentrations in wastewater during first batch experiment using plate type of bioreactor.

Table 6-1 Rates of ammonia oxidation and nitrogen removal of plate type of bioreactor

Batch process	Ammonia oxidation rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ )	Nitrogen removal rate ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ )
(g-N/day for m <sup>2</sup> of gel surface)		
1	3.86 ± 0.60	2.58 ± 0.60
2	6.00 ± 0.58	5.31 ± 0.89
3	6.44 ± 0.88	5.52 ± 0.61
4	6.24 ± 0.64	5.57 ± 0.54
Actual wastewater	6.42 ± 0.95	5.26 ± 0.79

Ammonia oxidation rate was oxidation activity from ammonia to nitrite. Ammonia removal rate was both oxidation activity from ammonia to nitrite and reduction activity of nitrite to nitrogen gas.

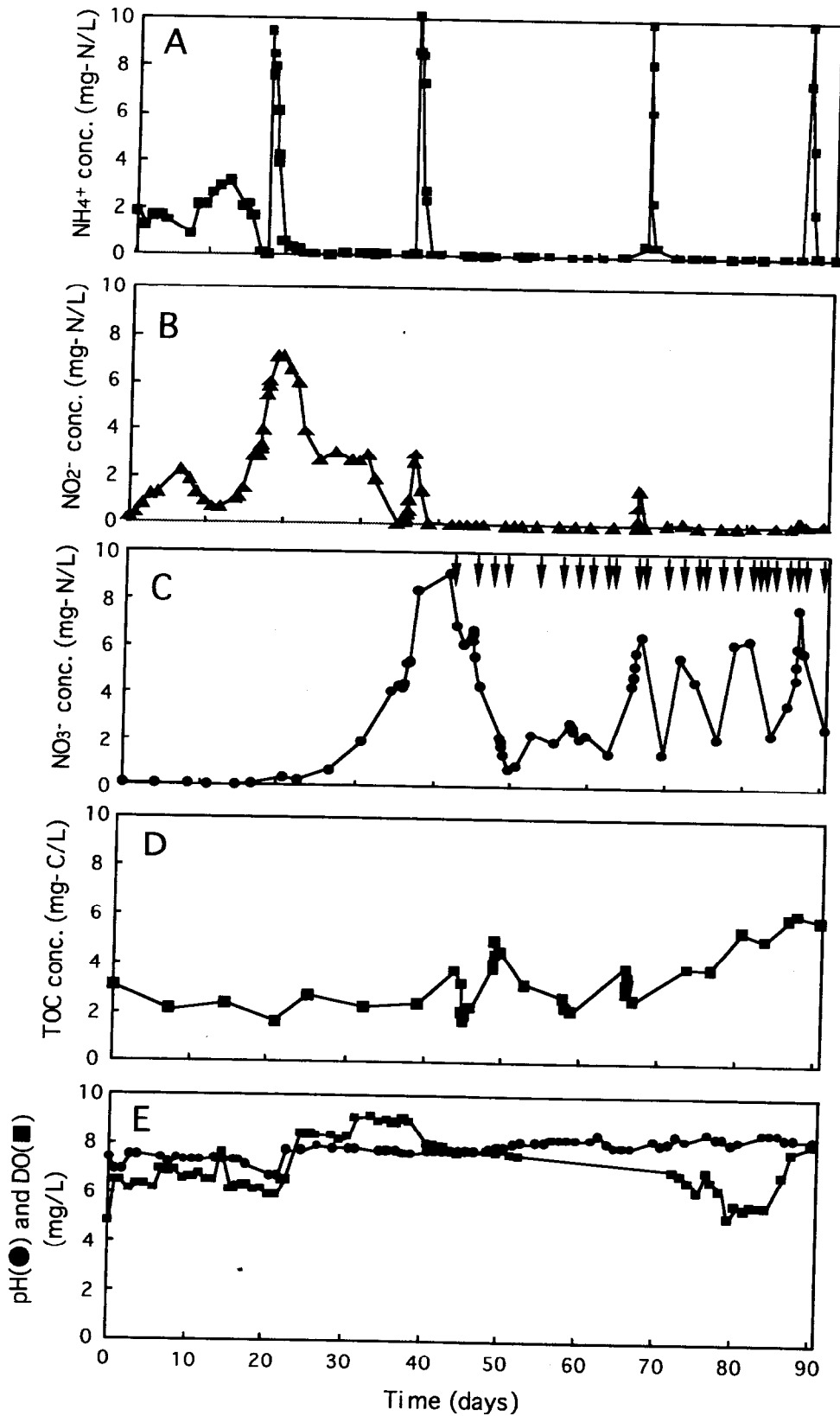


FIG. 6-5. Profile of ammonia (A), nitrite (B), nitrate (C), TOC (D), DO concentrations and pH (E) in rearing water. Ammonium sulfate was artificially added to the rearing water on the 17th, 36th, 66th and 87th day of the rearing experiment. The arrows in the C show the addition of lactate solution (10 mL of 10% sodium lactate) for denitrification to the lactate tank.



日目には 9.1 mg-N/L 濃度に達した。その後、乳酸タンクに乳酸ナトリウムを添加することにより、50 日目には 0.7 mg-N/L にまで低下した。その後は、定期的に乳酸ナトリウムを添加することにより、2~8 mg-N/L 濃度に維持された (図 6-5C)。

飼育水中の TOC 濃度に関しては、乳酸タンクの TOC 濃度は乳酸ナトリウムの添加により 130 mg-C/L まで上昇したが、飼育水中の TOC 濃度は 91 日間 6mg-C/L 以下に維持された (図 6-5D)。また、飼育水の pH に関しては、実験開始時の 7.8 から 22 日目には 6.7 にまで低下した。そのため、3g の  $\text{NaHCO}_3$  を添加し pH を 7.8 とした。そして、40 日目には 7.5 まで低下したが、脱窒のために乳酸ナトリウムを乳酸タンクに添加した後は pH の低下は見られなくなり、実験終了時まで 8 付近に維持された (図 6-5E)。飼育水中の溶存酸素量(DO)に関しても、人工肺により飽和量の 60%以上である 5.0~8.4mg/L に維持された (図 6-5E)。

プレート型リアクターの浄化能力の変化を観察するため、飼育実験前後に行った模擬排水のバッチ処理実験および飼育期間中のアンモニア添加時におけるアンモニア酸化速度および窒素除去速度を算出した (表 6-2)。飼育実験前のアンモニア酸化速度および窒素除去速度は、それぞれゲル表面積 1m<sup>2</sup> 当たり 2.90 g-N/day と 1.82 g-N/day であったが、飼育実験開始から 66 日目にはそれぞれ 5.82 g-N/day と 5.33 g-N/day にまで上昇し、実験後のバッチ処理時においてもその活性は維持される結果となった。

#### 6.4 考察

第 5 章で使用した封筒状ゲルは膜状ゲルを 2 枚張り合わせた構造であり、大型化した場合、エタノールなどの水素供与体が封筒状ゲルから漏れ出さないように工夫する必要がある。また、封筒状ゲルの一つ一つにエタノールを供給し、窒素ガスを排出するためのパイプなどを設置する必要がある。これに対し、本章で使用したプレート型リアクターは、膜状ゲルとテフロン製のパッキンを一緒に挟みこむだけの構造であり、エタノールなどの水素供与体が漏れ出す危険性が少ない。また、膜状ゲルを追加して枚数を増やすことによりリアクターの処理能力を調整できる利点もある。本章において、模擬排水および実排水の処理を行った実験から、プレート型リアクターのゲル表面積当たりのアンモニア酸化速度および窒素除去速度はそれぞれ 6.4 g-N/day と 5.2 g-N/day であった (表 6-1)。これらの速度は、第 3 章のチューブ状ゲルのアンモニア酸化速度 5.9 g-N/day と窒素除去速度 5.1 g-N/day、第 5 章の封筒状ゲルのアンモニア酸化速度 5.5 g-N/day と 4.7 g-N/day と同等であった。従って、プレート型バイオリアクターは、チューブ状ゲルの概念を生かしたまま、大型化と工業化を図るに適した構造であると考えられる。

本章では、プレート型バイオリアクターを水棲生物飼育装置という特殊な装置に適用し、魚が排出するアンモニアの処理も行った。本装置は、宇宙ステーションへの搭載を想定し、小型で簡便な構造を有するとともに、処理水中のア

Table 6-2 Activity of bioreactor used to convert ammonia to nitrogen in closed water recirculating system

	Water volume (L)	Initial ammonia concentration (mg-N/L)	Activity of bioreactor* (g-N/day per 1 m <sup>2</sup> gel)	
			Ammonia oxidation (NH <sub>3</sub> to NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Nitrogen removal (NH <sub>3</sub> to N <sub>2</sub> )
Before rearing	2	200	2.90	1.82
17th day	18	10	5.54	-
36th day	18	10	5.22	-
66th day	18	10	5.82	5.33
87th day	18	10	7.93	5.60
After rearing	2	200	6.40	6.37

\* The rates of ammonia oxidation and nitrogen removal in the bioreactor were calculated based on changes in the ammonia and nitrite concentrations in the ammonia solution or rearing water added ammonia artificially.

ンモニア濃度を常時 1 mg-N/L 以下に維持する浄化能力と信頼性の高さなどが要求される。本実験の飼育水中においては、魚毒性の高いアンモニアと亜硝酸濃度はともに 0.05mg-N/L 以下に維持することができ、魚毒性の低い硝酸濃度も乳酸ナトリウムの添加により 2~8mg-N/L に維持することができた (図 6-5)。また、飼育期間中に添加したアンモニアは速やかに除去され、模擬排水の処理で得られた高いアンモニア酸化速度と窒素除去速度と同等の速度を示した (表 6-2)。これらの結果から、本リアクターは 200mg-N/L から数 mg-N/L の幅広い濃度範囲のアンモニア排水に適用可能であり、91 日間の長期間にわたって高い浄化能力を維持できることが分かった。本章で実験に用いた発電所実排水や魚飼育水は、*N.europaea* や *P.denitrificans* に対する阻害物質を含んでおらず、有機物濃度も低い排水である。従って、模擬排水と同様の高い活性を得ることができたと考えられる。これに対し、有機物濃度が高い排水を処理する場合、ゲル表面に他の従属栄養細菌などが繁殖し生物膜を形成することによって、ゲル内部のアンモニア酸化菌に酸素が十分に供給されず、活性が低下する可能性がある。このような排水を処理する場合、既存の有機物を対象とした排水処理装置と組み合わせ、その後段に本リアクターを設置するという使い方が有効であると考えられる。

模擬排水および実排水の処理実験においては、アンモニアは硝酸が検出されることなく除去された。これに対し、水棲生物飼育装置に本リアクターを適用した場合にのみ、飼育水中に硝酸が蓄積した (図 6-5C)。本論文において、ゲル内部に亜硝酸酸化菌は固定化していない。そのため、亜硝酸の硝酸への酸化は起こらず、硝酸の蓄積は見られないはずであるが、水棲生物飼育装置においては、魚などに由来して様々な細菌などが混入したことが考えられる。また、飼育実験開始時に脱窒を行わない条件下で運転したため、亜硝酸が蓄積し、魚由来の亜硝酸酸化菌が増殖し易い環境が形成されたものと思われる。硝酸は亜硝酸よりも魚毒性が低いため、この亜硝酸の硝酸への酸化は、魚飼育にとって問題とはならない。しかし、本リアクターを実験開始時から脱窒を行わせるよう設定し、飼育水中の亜硝酸濃度を低く抑えることにより、このような亜硝酸酸化菌の働きを抑制し、効率の良いアンモニアの除去が行えるものと考えられる。また、飼育実験期間中において、脱窒を行わない条件下では pH の低下が観察されたが、乳酸ナトリウムを添加し脱窒を行った場合には pH は 8.0 付近に維持された。これは、理論値では硝化による pH 低下の半分が脱窒による pH 上昇によって補われたことになるが、さらに、脱窒の電子供与体として添加した乳酸ナトリウムがアルカリとして作用したため、pH の低下が見られなかったものと考えられる。

## 6.5 本章のまとめ

プレート型バイオリアクターを用いて、アンモニアを含んだ模擬排水または実排水の処理実験を行うことにより、以下の結果を得た。

- 1) プレート型バイオリアクターは、膜状ゲルから構成される単純な構造であり、リアクターの処理能力を膜状ゲルを追加して枚数を増やすことで調整可能である。従って、本リアクターは、チューブ状ゲルの概念を生かしたまま大型化と工業化を図るに適した構造であると考えられる。
- 2) プレート型リアクターのゲル表面積当たりのアンモニア酸化速度および窒素除去速度は、模擬排水および発電所実排水の処理を行った場合も、魚飼育水の処理を行った場合も同等であり、200mg-N/L から数 mg-N/L の幅広い濃度範囲のアンモニア排水の処理に適用可能であることが分かった。
- 3) 本リアクターは、硝化と脱窒を同一反応槽内で行うことができるため、硝化による pH 低下を脱窒による pH 上昇と脱窒の電子供与体としての乳酸ナトリウムの添加により補うことが可能であり、pH 調整を行うことなく運用できることが分かった。

## 第7章

### 総括

本研究で得られた成果を総括するとともに、本バイオリアクターの実用化に必要な今後の課題について考察する。

## 7.1 本研究の総括

本研究では、排水中に含まれるアンモニアなどの窒素化合物を効率よく除去できる小型で操作が簡便な窒素除去バイオリアクターを開発することを目的とした。そして、アンモニア酸化菌 *N.europaea* および脱窒菌 *P.denitrificans* を固定化したチューブ状ゲルおよび膜状ゲルを作製し、これらのゲル内部の微生物分布を解析または改変することによりゲル自体の浄化能力を向上させることについて検討した。また、これらのゲルを利用する窒素除去バイオリアクターの形状などを検討することによりリアクター容量当たりの浄化能力を向上させることを試みた。最後に、本リアクターが様々な分野に幅広く適用できることを明らかにした。

第1章「序論」では、アンモニアなどの窒素化合物が湖沼や閉鎖性海域において富栄養化などの環境問題を引き起こしているため、それら窒素化合物を排水中から除去することが求められていることを示した。そして、既存の窒素除去技術について述べるとともに、それら既存の処理装置における様々な問題点を示した。

第2章「チューブ状ゲルを用いた窒素除去法」では、窒素除去のための複雑な処理プロセスを単純化するため、好気の微生物反応である硝化と嫌気の微生物反応である脱窒を一つの反応槽内で行うことが可能なチューブ状ゲルを用いた窒素除去バイオリアクターの概念を提案した。そして、実際にアンモニアを含む模擬排水のバッチ処理を行い、亜硝酸や亜酸化窒素などの窒素除去における中間産物が蓄積することなくアンモニアを除去できることを明らかにした。

第3章「チューブ状ゲル内部の微生物分布」では、チューブ状ゲル内部の微生物分布を解析することにより、ゲル内部はアンモニアから亜硝酸への酸化が行われる好気部分（ゲル表面から 100  $\mu\text{m}$  までの領域）、アンモニア酸化のための好気部分と脱窒のための嫌気部分が共存する部分（100  $\mu\text{m}$  から 200  $\mu\text{m}$  までの領域）、亜硝酸から窒素ガスへの脱窒のみが行われる嫌気部分（200  $\mu\text{m}$  よりも奥の領域）の3領域からなることを推察した。しかし、ゲル表面から 100  $\mu\text{m}$  までの領域において、*N.europaea* と *P.denitrificans* が重複して増殖し、アンモニア酸化に必要な酸素を取り合っていることが示唆された。従って、*N.europaea* と *P.denitrificans* のゲル内部における微生物分布を改変することにより、ゲル自体の活性の向上が図れる可能性が見いだされた。また、チューブ状ゲルの中で微生物反応に使われているのはゲル表面から約 300  $\mu\text{m}$  までの領域であることから、ゲル容積当たりのゲル表面積を増大させることにより、リアクターの容量当たりの能力をさらに向上できる可能性があることが分かった。

第4章「チューブ状ゲル内部の微生物分布の改変」では、水素ガスおよび酸素ガスを用いることにより、チューブ状ゲル内部の微生物分布を最適化し、ゲル自体の活性向上を図ることを試みた。本チューブ状ゲルの脱窒の電子供与体として水素ガスを使うことにより、*P.denitrificans* と *N.europaea* の分布を分離することができ、両菌株が効率よく働ける環境に改変することができた。また、高濃度の酸素は固定化していない *N.europaea* に対し毒性を示すが、ゲル内部

に固定化された *N.europaea* は高濃度の酸素条件下で高い活性を示した。これは、高濃度の酸素の毒性から逃れるため、*N.europaea* がチューブ状ゲルの外側表面から離れた内側の領域において増殖するとともに、高濃度の酸素によって増加したゲル内部への酸素供給により、ゲルのアンモニア酸化速度が向上したためと考えられる。また、チューブ状ゲル内部の *P.denitrificans* の脱窒活性および分布状態は、酸素濃度の影響を全く受けないことが分かった。

第5章「封筒状ゲルを用いたバイオリアクターによる窒素除去」では、チューブ状ゲルの代わりに封筒状ゲルを用いて、模擬排水のバッチ処理および連続処理を行った。封筒状ゲルは、硝化と脱窒を同時に行うチューブ状ゲルの特徴と、ゲル表面積当たりの活性では同等の能力を持つとともに、0.5 mm という薄いゲル膜が利用できることから、ゲルの容積当たりの表面積を増加させ、単位容量当たりの浄化能力が高いリアクターの設計が可能になると考えられる。また、封筒状ゲルを充填したリアクターは、エタノールの添加量を制御することにより、処理水中に亜硝酸およびTOCを蓄積することなくアンモニアを除去することができ、最大でリアクター容量 1m<sup>3</sup> 当たり 1.9 kg-N/day のアンモニア酸化速度と 1.7 kg-N/day の窒素除去速度を示した。これらの速度は、既存の窒素除去バイオリアクターの文献値と比較し、同等以上であり、封筒状ゲルが規則正しく平行して並んでおり、効率の良い曝気攪拌が可能な構造を有していること、硝化と脱窒が同時に効率よく起こっていることなどがその理由と考えられる。

第6章「プレート型バイオリアクターによる実排水の処理」では、封筒状ゲルをより実用化に適した構造にするため、同等の機能を持つプレート型リアクターを膜状ゲルを組み合わせることにより作製した。このリアクターは、膜状ゲルから構成される単純な構造であり、チューブ状ゲルの概念を生かしたまま大型化と工業化を図るに適した構造であると考えられる。また、プレート型リアクターのゲル表面積当たりのアンモニア酸化速度および窒素除去速度は、模擬排水および発電所実排水の処理を行った場合も、魚飼育水の処理を行った場合も同等であり、200mg-N/L から数 mg-N/L の幅広い濃度範囲のアンモニア排水の処理に本リアクターを適用できることが分かった。

## 7.2 今後の課題

本論文で示したチューブ状ゲルの概念は、既存の窒素除去装置の複雑な処理プロセスを単純化することができる。そのため、窒素除去装置を著しく小型化、単純化できる可能性を持つ点で極めて有効なものと考えられる。また、膜状ゲルを利用したプレート型バイオリアクターは、チューブ状ゲルに比較して容易に作製できるため、大型化、工業化が可能であると思われる。今後は、本リアクターの長期安定性などについて検討するため、実際の排水処理の現場における実証試験が必要と考えられる。

本論文で示したプレート型バイオリアクターが実用化する際の最大の問題は、イニシャルコストであると思われる。既存の窒素除去装置は、大きなコンクリ

ト製の反応槽と活性汚泥のみという極めてイニシャルコストの小さいものであるのに対し、本リアクターは微生物を固定化した膜状ゲルなどを必要とするため、これらの微生物の培養、固定化操作などを効率よく行うことも実用化の鍵となるであろう。また、コスト優先の排水処理ではなく、小型で処理プロセスが単純である利点を生かした排水処理の対象を探していく必要がある。その一つが、水族館や宇宙ステーションにおける水棲生物飼育装置などであろう。その場合、固定化に用いるアンモニア酸化菌と脱窒菌の濃度や組み合わせ、脱窒の電子供与体の種類やその添加方法などについてさらに検討する必要がある。



## 参考文献

1. 阿部晶: 水質環境保全の動向と転換期にきた窒素・リン対策, 公害と対策 27: 810-816 (1991)
2. 総務庁行政監察局: 指定湖沼の水質の推移, 湖沼の環境保全の現状と問題点, 大蔵省印刷局 pp.10-13 (1991)
3. 津田松苗: 湖の富栄養化, 水質汚濁の生態学, 公害対策技術同友会 pp.137-146 (1972)
4. 里見至弘: 海域の窒素・リン基準に関する諸問題, 用水と廃水 27: 106-114 (1985)
5. 津田松苗: 海域の富栄養化, 水質汚濁の生態学, 公害対策技術同友会 pp.213-221 (1972)
6. Kuenen, J. G. and Robertson, L. A.: Ecology of nitrification and denitrification, pp.161-218. In Cole, J. A. and Ferguson, S. J. (Eds.), The nitrogen and sulphur cycles, Cambridge University Press, Cambridge (1988)
7. 須藤隆一: 富栄養化の防止と廃水処理, 廃水処理の生物学, 産業用水調査会 pp.489-500 (1977)
8. 広木幹也: 水環境における健康影響微生物汚染とその対策, 資源環境対策 34: 22-25 (1998)
9. Burkholder, J. M.: The lurking perils of *Pfiesteria*, Scientific American, August 42-49 (1999)
10. 平田建正: わが国における硝酸性窒素による地下水汚染の現状と問題点, 水環境学会誌 19: 950-955 (1996)
11. 寺尾宏: 畑作地帯の硝酸性窒素による地下水汚染と軽減対策, 水環境学会誌 19: 956-960 (1996)
12. 細見正明: 硝酸性窒素の除去技術, 水環境学会誌 19: 969-972 (1996)
13. 環境庁水質保全局水質管理課: 硝酸性窒素による地下水汚染対策ハンドブ

- ック, 公害研究対策センター pp.68-85 (1993)
14. 村野健太郎: 窒素化合物で汚染が憂慮される日本の土壌, 資源環境対策 32: 49-51 (1996)
  15. 鈴木喜計: 日本の地質汚染問題の現状と課題, 資源環境対策 34: 1421-1432 (1998)
  16. 国包章一: 硝酸性窒素および亜硝酸性窒素の健康影響, 水環境学会誌 19: 965-968 (1996)
  17. 望月時男: 窒素・リン規制対象湖沼の大幅追加と湖沼浄化の行方, 資源環境対策 34: 1372-1378 (1998)
  18. 柳下正治: 水質環境保全としての富栄養化防止と窒素・リン規制, 資源環境対策 29: 718-727 (1993)
  19. 稲森悠平, 須藤隆一: 生活・産業系排水対策の現状と窒素・リン削減をめざした高度処理技術の動向, 公害と対策 27: 823-831 (1991)
  20. 小島貞男: アンモニアストリッピング法による窒素除去技術, 脱窒・脱磷技術と富栄養化対策, アイピーシー pp.749-782 (1977)
  21. 趙一先, 張大年, 藤森啓一, 竹中規訓, 板東博, 前田秦昭: ブレークポイント塩化法を利用するアンモニア性窒素を含むコークスプラント排水処理の研究, 用水と廃水 41: 804-807 (1999)
  22. Lauch, R. P. and Guter, G. A.: Ion exchange for the removal of nitrate from well water, Journal of AWWA, May 83-88 (1986)
  23. 湯浅芳郎, 泉谷進, 香川公事司, 上甲勲, 中原敏次, 高林泰彦: 火力発電所の触媒脱窒技術の開発, 火力原子力発電 47: 1241-1247 (1996)
  24. Rautenbach, R., Kopp, W., Opberqen, G., and Hellekes, R.: Nitrate reduction of well water by reverse osmosis and electrodialysis-studies of plant performance and costs, Desalination 65: 241-258 (1987)
  25. 小島貞男: 生物学的脱窒素法による窒素除去技術, 脱窒・脱磷技術と富栄養化対策, アイピーシー pp.486-557 (1977)

26. Tchobanoglous, G. and Burton, F. L.: Advanced wastewater treatment, pp. 711-726. In Clark, B. J. and Morriss, J. M. (Eds.), *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, and Reuse*, McGraw-Hill, Inc., Singapore (1991)
27. Watson, S.W., Valois, F. W., and Waterbury, J. B.: The family Nitrobacteraceae, p. 1005-1022. In Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., and Schlegel, H. G. (Eds.), *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York (1981)
28. Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H., and Hooper, A. B.: Ammonia-Oxidizing Bacteria, pp. 1818-1834. In Staley, J. T., Bryant, M., Pfennig, N., and Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore (1989)
29. Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J., and Arciero, D. M.: Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria, *Ant. Van Leeuwenhoek* 71: 59-67 (1997)
30. Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H., and Hooper, A. B.: Ammonia-Oxidizing Bacteria, pp. 1807-1818. In Staley, J. T., Bryant, M., Pfennig, N., and Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore (1989)
31. 鈴木義彦, 藤原健智, 福森義宏: *Nitrobacter winogradskyi* 亜硝酸塩酸化酵素の構造, *生化学* 69: 892-903 (1997)
32. Verstraete, W. and Alexander, M.: Heterotrophic nitrification in samples of natural ecosystems, *Environ. Sci. Technol.* 7: 39-42 (1973)
33. Castignetti, D. and Hollocher, T. C.: Heterotrophic nitrification among denitrifiers, *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 620-623 (1984)
34. Moir, J. W. B., Crossman, L. C., Spiro, S., Richardson, D. J.: The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*, *FEBS Lett.* 387: 71-74 (1996)
35. Kurokawa, M., Fukumori, Y., and Yamanaka, T.: A hydroxylamine-cytochrome c

- reductase occurs in the heterotrophic nitrifier, *Arthrobacter globiformis*, Plant Cell Physiol. 26: 1439-1442 (1985)
36. Wehrfritz, J.-M., Reilly, A., Soiro, S., and Richardson, D. J.: Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*. Identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification, FEBS Lett. 335: 246-250 (1993)
  37. Wehrfritz, J.-M., Carter, J. P., Soiro, S., and Richardson, D. J.: Hydroxylamine oxidation in heterotrophic nitrate-reducing soil bacteria and purification of hydroxylamine cytochrome c oxidoreductase from a *Pseudomonas* species, Arch. Microbiol. 166: 421-424 (1997)
  38. 山中健生: 従属栄養硝化細菌, 独立栄養細菌の生化学, アイピーシー pp. 92-95 (1999)
  39. Castignetti, D., Paulutis, D., and Turley, J.: An examination of protein translocation and energy conservation during heterotrophic nitrification, FEMS Microbiol. Lett. 66: 175-182 (1990)
  40. van Niel, E. W. J., Robertson, L. A., Cox, R. P., and Kuenen, J. G.: Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD, J. Gen. Appl. Microbiol. 38: 553-558 (1992)
  41. Castignetti, D., and Hollocher, T. C.: Nitrogen redox metabolism of a heterotrophic, nitrifying-denitrifying *Alcaligenes* sp. from soil, Appl. Environ. Microbiol. 44: 923-928 (1982)
  42. Stroo, H. F., Klein, T. M., and Alexander, M.: Heterotrophic nitrification in an acid forest soil and by an acid-tolerant fungus, Appl. Environ. Microbiol. 52: 1107-1111 (1986)
  43. Sakai, K., Takano, K., Tachiki, T., and Tochikura, T.: Purification and properties of an enzyme oxidizing nitrite to nitrate from *Candida rugosa*, Agric. Biol. Chem. 52: 2783-2789 (1988)

44. Jeter, R. M. and Ingraham, J. L.: The Denitrifying Prokaryotes, pp. 913-924. In Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., and Schlegel, H. G. (Eds.), The Prokaryotes, Springer-Verlag, New York (1981)
45. Robertson, L. A., Cornelisse, R., de Vos, P., Hadjioetomo, R., and Kuenen, J. G.: Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers, *Ant. van Leeuwenhoek* 56: 289-299 (1989)
46. Robertson, L. A. and Kuenen, J. G.: *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium, *J. Gen. Microbiol.* 129: 2847-2855 (1983)
47. Korner, H. and Zumft, W. G.: Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*, *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1670-1676 (1989)
48. Zumft, W. G.: Cell biology and molecular basis of denitrification, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616 (1997)
49. Ye, R. W., Averill, B. A., and Tiedje, J. M.: Denitrification: production and consumption of nitric oxide, *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1053-1058 (1994)
50. Carter, J. P., Hsiao, Y. H., Spiro, S., and Richardson, D. J.: Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2852-2858 (1995)
51. Dalsgaard, T., de Zwart, J., Robertson, L. A., Kuenen, J. G., and Revsbech, N. P.: Nitrification, denitrification and growth in artificial *Thiosphaera pantotropha* biofilms as measured with a combined microsensor for oxygen and nitrous oxide, *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 137-148 (1995)
52. Geraats, S. G. M., Hooijmans, C. M., van Neil, E. W. J., Robertson, L. A., Heijnen, J. J., Luyben, K. Ch. A. M., and Kuenen, J. G.: The use of a metabolically structured model in the study of growth, nitrification, and denitrification by *Thiosphaera pantotropha*, *Biotechnol. Bioeng.* 36: 921-930 (1990)

53. Kuenen, J. G. and Robertson, L. A.: Combined nitrification-denitrification processes, *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 109-117 (1994)
54. Hooijmans, C. M., Geraats, S. G. M., van Neil, E. W. J., Robertson, L. A., Heijnen, J. J., and Luyben, K. Ch. A. M.: Determination of growth and coupled nitrification/denitrification by immobilized *Thiosphaera pantotropha* using measurement and modelling of oxygen profiles, *Biotechnol. Bioeng.* 36: 931-939 (1990)
55. Papaen, H., von Berg, R., Hinkel, B., Thoene, B., and Rennenberg, H.: Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*:  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , and  $\text{NO}$  production in exponentially growing culture, *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2068-2072 (1989)
56. Anderson, I. C., Poth, M., Homstead, J., and Burdige, D.: A comparison of  $\text{NO}$  and  $\text{N}_2\text{O}$  production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3525-3533 (1993)
57. Robertson, L. A., van Niel, E. W. J., Torremans, R. A. M., and Kuenen, J. G.: Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*, *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2812-2818 (1988)
58. Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R., and Zart, D.: Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor, *Arch. Microbiol.* 163: 16-20 (1995)
59. Müller, E. B., Stouthamer, A. H., and van Verseveld, H. W.: Simultaneous  $\text{NH}_3$  oxidation and  $\text{N}_2$  production at reduced  $\text{O}_2$  tensions by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium, *Biodegradation* 6: 339-349 (1995)
60. Schmidt, I. and Bock, E.: Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*, *Arch. Microbiol.* 167: 106-111 (1997)
61. Schmidt, I. and Bock, E.: Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of

- Nitrosomonas eutropha*, Ant. van Leeuwenhoek 73: 271-278 (1998)
62. Poth, M. and Focht, D. D.:  $^{15}\text{N}$  kinetics analysis of  $\text{N}_2\text{O}$  production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification, Appl. Environ. Microbiol. 49: 1134-1141 (1985)
63. Ritchie, G. A. F. and Nicholas, D. J. D.: Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*, Biochem. J. 126: 1181-1191 (1972)
64. Yoshida, N.:  $^{15}\text{N}$ -depleted  $\text{N}_2\text{O}$  as a product of nitrification, Nature 335: 528-529 (1988)
65. Hynes, R. K. and Knowles, R.: Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea*: effects of acetylene, pH, and oxygen, Can. J. Microbiol. 30: 1397-1404 (1984)
66. Remde, A. and Conrad, R.: Production of nitric oxide in *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrite, Arch. Microbiol. 154: 187-191 (1990)
67. Stuenkel, R., Vollmer, M., and Bock, E.: The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*, Arch. Microbiol. 158: 439-443 (1992)
68. Blackmer, A. M., Bremner, J. M., and Schmidt, E. I.: Production of nitrous oxide by ammonia-oxidizing chemoautotrophic microorganisms in soil, Appl. Environ. Microbiol. 40: 1060-1066 (1980)
69. Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M.: Missing lithotroph identified as new *planctomycete*, Nature 400: 446-449 (1999)
70. Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M., van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. M., and Kuenen, J. G.: The anaerobic oxidation of ammonium, FEMS Microbiol. Rev. 22: 421-437 (1999)
71. 松尾吉高: し尿処理技術の発展と窒素除去, 水環境学会誌 18: 162-166

(1995)

72. 中村和憲, 風袋則夫, 三上栄一, 鈴木智雄: 回分式活性汚泥法における排水分割添加による窒素・リンの同時除去, 用水と廃水, 30: 295-299 (1988)
73. 須藤隆一: 富栄養化の防止と廃水処理, 廃水処理の生物学, 産業用水調査会, pp.582-593 (1977)
74. 饗庭秀俊, 八田武, 小島信夫, 鈴木康彦: 最近の排水処理技術, 火力原子力発電 48: 1238-1253 (1997)
75. 大内磐, 山中弘次: 嫌気・好気活性汚泥法による発電所排水の窒素除去システム, 公害と対策 27: 837-842 (1991)
76. 青井透: 窒素除去プロセス制御技術の新展開, 水環境学会誌 18: 183-186 (1995)
77. 山本眞, 照沼洋: DO 制御式間欠ばっ気法による汚水の高度処理, 資源環境対策 29: 747-755 (1993)
78. Kuai, L. and Verstraete, W.: Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system, Appl. Environ. Microbiol. 64: 4500-4506 (1998)
79. 須藤隆一: 生物膜法, 廃水処理の生物学, 産業用水調査会 pp.339-344 (1977)
80. Tjihuis, L., Huisman, J. L., Hekkelman, H. D., van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J.: Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors, Biotechnol. Bioeng. 47: 585-595 (1995)
81. van Benthum, W. A. J., van Loosdrecht, M. D. M., Heijnen, J. J.: Control of heterotrophic layer formation on nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor, Biotechnol. Bioeng. 53: 397-405 (1997)
82. 福井三郎: 生体触媒の固定化, バイオリアクター, 講談社 pp.7-29 (1985)
83. Nunez, M. J. and Lema, J. M.: Cell immobilization: application to alcohol production, Enzyme Microb. Technol. 9: 642-651 (1987)



84. Ascon-Cabrera, M. A., Thomas D., and Lebeault J-M.: Activity of asynchronized cells of a steady-state biofilm recirculated reactor during xenobiotic biodegradation, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 920-925 (1995)
85. Durham, D. J., Marshall L. C., Miller J. G., and Chmurny A. B.: New composite biocarriers engineered to contain adsorptive and ion-exchange properties improve immobilized-cell bioreactor process dependability, *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4178-4181 (1994)
86. dos Santos, L. M. and Livingston, A. G.: *Biotechnol. Bioeng.* 47: 90-95 (1995)
87. Cho, Y. -H. and Knorr, D.: Development of a gel and foam matrix as immobilization system for cells for microbial denitrification of water, *Food Biotechnol.* 7: 115-126 (1993)
88. Hunik, J. H., Bos C. G., van den Hoogen P., de Gooijer C. D., and Tramper J.: Co-immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells: validation of a dynamic model for simultaneous substrate conversion and growth in k-carrageenan gel beads, *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1153-1163 (1994)
89. Kuhn, R. H., Peretti S. W., Ollis, D. F.: Microfluorimetric analysis of spatial and temporal patterns of immobilized cell growth, *Biotechnol. Bioeng.* 38: 340-352 (1991)
90. Monbouquette, H. G., Sayles, G. D., and Ollis, D. F.: Immobilized cell biocatalyst activation and pseudo-steady-state behavior: model and experiment, *Biotechnol. Bioeng.* 35: 609-629 (1989)
91. 森直道, 角野立夫, 白井正明: 包括固定化法による排水の高度処理, *資源環境対策* 29: 1057-1062 (1993)
92. Sumino, T., Nakamura, H., and Mori, N.: Immobilization of activated sludge by the acrylamide method, *J. Ferment. Bioeng.* 72: 141-143 (1991)
93. Sumino, T., Nakamura, H., Mori, N., and Kawaguchi, Y.: Immobilization of nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer, *J. Ferment. Bioeng.* 73: 37-

42 (1992)

94. van Ginkel, C. G., Tramper, J., Luyben, K. Ch. A. M., and Klapwijk, A.: Characterization of *Nitrosomonas europaea* immobilized in calcium alginate, *Enzyme Microb. Technol.* 5: 297-303 (1983)
95. Tramper, J., Suwinska-Borowiec, G., and Klapwijk, A.: Characterization of nitrifying bacteria immobilized in calcium alginate, *Enzyme Microb. Technol.* 7: 155-160 (1985)
96. Itoh, K., Itadani, T., and Yosimura, H.: Immobilization of nitrifying bacteria and its application for wastewater treatment, *Eisei Kagaku* 35: 125-133 (1988)
97. Wijffels, R. H. and Tramper, J.: Performance of growing *Nitrosomonas europaea* cells immobilized in k-carrageenan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 108-112 (1989)
98. dos Santos, V. A. P. M., Bruijnse, M., Tramper, J., and Wijffels, R. H.: The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized micro-organisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 447-453 (1996)
99. Santos, V. A., Tramper, J., and Wijffels, R. H.: Simultaneous nitrification and denitrification using immobilized microorganisms, *Biomat. Art. Cells & Immob. Biotech.* 21: 317-322 (1993)
100. Kokufuta, E., Shimohashi, M., and Nakamura, I.: Simultaneous occurring nitrification and denitrification under oxygen gradient by polyelectrolyte complex-coimmobilized *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* cells, *Biotechnol. Bioeng.* 31: 382-384 (1988)
101. Kokufuta, E., Yukishige, M., and Nakamura, I.: Coimmobilization of *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* cells using polyelectrolyte complex-stabilized calcium alginate gel, *J. Ferment. Technol.* 65: 659-664 (1987)
102. Tartakovsky, B., Kotlar, E., and Sheintuch, M.: Coupled nitrification-denitrification processes in a mixed culture of coimmobilized cells: analysis and

- experiment, Chem. Eng. Sci. 51: 2327-2336 (1996)
103. Callaway, J. O.: Ammonia and nitrite, p. 4-75 to 4-87. In Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., and Eaton, A. (Eds.), Standard Methods for the examination of water and wastewater, 18th edition. American Public Health Association, Washington (1992)
104. Baumann, B., Snozzi, M., Zehnder, A. J. B., van der Meer, J. R.: Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes, J. Bacteriol. 178: 4367-4374 (1996)
105. Zumft, W. G.: The denitrifying prokaryotes, pp.554-582. In Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. (ed.), The prokaryotes, 2nd ed. Springer Verlag, Berlin, Germany (1992)
106. Hunik, J. H., van den Hoogen, M. P., de Boer, W., Smit, M., and Tramper, J.: Quantitative determination of the special distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells immobilized in k-Carrageenan gel beads by a specific fluorescent-antibody labelling technique, Appl. Environ. Microbiol. 59: 1951-1954 (1993)
107. 土壤微生物研究会: 蛍光抗体法, 土壤微生物実験法, 養賢堂 pp.155-162 (1992)
108. Monbouquette, H. G. and Ollis, D. F.: Scanning microfluorimetry of Ca-alginate immobilized *Zymomonas mobilis*, Bio/Technology 6: 1076-1079 (1988)
109. Wijffels, R. H., de Gooijer, C. D., Schepers, A. W., Beuling, E. E., Mallee, L. F., and Tramper, J.: Dynamic modeling of immobilized *Nitrosomonas europaea*: implementation of diffusion limitation over expanding microcolonies, Enzyme Microb. Technol. 17: 462-471 (1995)
110. Kurosawa, H. and Tanaka, H.: Advances in immobilised cell culture: development of co-immobilized mixed culture system of aerobic and anaerobic micro-organisms, Process Biochemistry, International: 189-196 (1990)

111. Leenen, E. J. T. M., Boogert, A. A., van Lammeren, A. A. M., Tramper, J., and Wijffels, R. H.: Dynamics of artificially immobilized *Nitrosomonas europaea*: effect of biomass decay, *Biotechnol. Bioeng.* 55: 630-641 (1996)
112. Santegoeds, C. M., Schramm, A., and de Beer, D.: Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs, *Biodegradation* 9: 159-167 (1998)
113. Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R., and Schleifer, K.-H.: Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4641-4647 (1996)
114. Onken, U. and Liefke, E.: Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 40: 137-169 (1989).
115. Wilde, E. and Schlegel, H. G.: Oxygen tolerance of strictly aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Ant. van Leeuwenhoek* 48: 131-143 (1982).
116. Kleen, M. and Messmer, K.: Toxicity of high PaO<sub>2</sub>, *Minerva Anesthesiol* 65: 393-396 (1999).
117. Knight, J. A.: Free radicals: their history and current status in aging and disease. Oxygen toxicity, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 28: 331-346 (1998).
118. Kurt, M., Dunn, J., and Bourne, J. R.: Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with H<sub>2</sub> in a fluidized-bed biofilm reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 29: 493-501 (1987)
119. Smith, R. L., Ceazan, M. L., and Brooks, M. H.: Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination, *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1949-1955 (1994)
120. Liessens, J., Vanbrabant, J., Vos, P. D., Kersters, K., and Verstraete, W.: Mixed culture hydrogenotrophic nitrate reduction in drinking water, *Microb. Ecol.* 24:

271-290 (1992)

121. 明賀春樹, 角田ふで子, 揚敏, 三宅西作, 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: 669-675 (1994)
122. Gros, H., Schnoor, G., and Rutten, P.: Biological denitrification process with hydrogen-oxidizing bacteria for drinking water treatment, Wat. Supply 6: 193-198 (1988)
123. Vanbrabant, J., Vos, P. D., Vancanneyt, M., Liessens, J., Verstraete, W., and Kersters, K.: Isolation and identification of autotrophic and heterotrophic bacteria from an autohydrogenotrophic pilot-plant for denitrification of drinking water, System, Appl. Microbiol. 16: 471-482 (1993)
124. dos Santos, V. A. P. M, Marchal, L. M., Tramper, J., and Wijffels, R. H.: Modeling and evaluation of an integrated nitrogen removal system with microorganisms co-immobilized in double-layer gel beads, Biotechnol. Prog. 12: 240-248 (1996)
125. 宇宙開発事業団: 水棲生物飼育装置(AAEU), 宇宙開発事業団技術報告, IML-2 宇宙実験成果報告, 宇宙開発事業団 pp.21-30 (1996)

本論文に関する著者の印刷論文

1. Uemoto, H. and Saiki, H.: Nitrogen Removal by Tubular Gel Containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4224-4228 (1996)
2. Uemoto, H. and Saiki, H.: Behavior of Immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* in Tubular Gel for Nitrogen Removal in Wastewater, Prog. Biotechnol. 11: 695-702 (1996)
3. Uemoto, H. and Saiki, H.: Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* Immobilized in Tubular Polymeric Gel for Nitrogen Removal, Appl. Environ. Microbiol. 66: 816-819 (2000)
4. Uemoto, H. and Saiki, H.: Nitrogen Removal Reactor Using Packed Gel Envelopes Containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*, Biotechnol. Bioeng. 67: 80-86 (2000)
5. Uemoto, H., Watanabe, A., Saitoh, S., Kondo, T., Matuki, Y., Masukawa, M., Matsumura, H., and Koike, Y.: Closed water recirculating system for fish rearing equipped with bioreactor capable of simultaneous nitrification and denitrification, Biol. Sci. Space. 13: 341-347 (1999)
6. Uemoto, H., Ando, A., and Saiki, H.: Effect of oxygen concentration on nitrogen removal by *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* immobilized within tubular polymeric gels, J. Biosci. Bioeng. Submitted.

## 謝辞

本論文の審査をお引き受けいただくとともに、論文内容に関しまして、熱心かつ懇切なるご指導を賜った東京工業大学大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻、海野肇教授に深甚の謝意を表します。また、本論文の審査をお引き受け下さいました東京工業大学大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻、永井和夫教授、丹治保典助教授、中村聡助教授、大学院総合理工学研究科化学環境学専攻、正田誠教授に心から感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、懇切なるご指導とご協力を賜った(財)電力中央研究所、生物科学部部長、斎木博博士をはじめ、生物科学部の研究員の皆様に深甚の謝意を表します。また、本研究を進めるにあたり、御助言とご協力いただいた(株)環境リサーチの沼田陽子氏、松村晴彦氏、(株)東レリサーチセンター斉藤晋氏、東レエンジニアリング(株)吉井友彦氏、松木芳行氏、(株)江ノ島水族館谷村俊介氏に感謝の意を表します。

最後に、現在に至るまで私を支えてくれました父、母、祖母をはじめとした家族と妻仁子に感謝いたします。