

研究報告 微生物の機能を利用した水質浄化 (第2報)  
— 固定化低窒素同化細菌による窒素除去 —

中谷純夫、松岡行利、山川雅弘、柏 雅美\*、木村俊夫\*\*、菅原 庸\*\*\*

\* 三重大学生物資源学部水産微生物学研究室

\*\* 農学博士 三重大学生物資源学部助手

\*\*\* 農学博士 三重大学生物資源学部教授

脱窒能を有する低窒素同化細菌をバイオリアクターとして利用するため、低窒素同化細菌 Sc 51 株細胞の固定化を試みた。

ポリビニルアルコールを担体として使用したとき、固定化担体内への硝酸イオンの透過性は他の固定化材とほぼ同程度であった。調製した固定化 Sc 51 株細胞ゲルを、30℃にて24時間活性化処理することにより担体細胞数は増加し、ゲル1gあたり $10^9$  cfu (コロニー形成単位)のレベルとなった。

固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性は、30℃付近にて最大であり、50℃においても最大値の60%程度の活性を示した。また、固定化 Sc 51 株細胞は20～30℃で安定であったが、温度増加に伴い失活し、50℃ではほぼ50%程度の活性が残存するにすぎなかった。

固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性は、pH 7～8付近で最大であり、pH 6あるいは9において最大値の85%程度の活性が認められた。固定化細胞の脱窒活性はpH 7で最も安定であったが、酸性域で不安定でpH 5では40%程度の活性が残存するにすぎず、pHの増加とともに安定性が低下した。

調製したモデル廃水を用いて、固定化 Sc 51 株細胞による窒素除去を試みた。この系では硝酸塩の減少に伴い若干量の亜硝酸塩が蓄積するものの、窒素ガスが生成された。反応は6時間以内に速やかに進行し、硝酸塩は12時間で完全に消失したが、硝酸塩の減少により脱窒速度も減退し、調製廃水中の硝酸・亜硝酸態窒素合計量は24時間後にほぼ完全に消滅した。算出された窒素除去速度は $90.8 \mu\text{mol/L/hr}$ であった。

つぎに、終末処理廃水を用いて、固定化 Sc 51 株細胞による窒素除去を試みた。終末処理廃水にはなお $780 \mu\text{mol/L}$ 程度の硝酸塩、COD値として $3.38 \text{mg/L}$ 程度の有機物が残存していたが、固定化 Sc 51 株細胞により廃水中の硝酸塩が速やかに減少し、脱窒が12時間まで直線的に進行した。廃水中の硝酸・亜硝酸態窒素合計量は24時間後にほぼ完全に消滅した。算出された窒素除去速度は $55 \mu\text{mol/L/hr}$ であった。

## 1. はじめに

生物機能を利用した環境の修復 (バイオリメディエーション bioremediation) は物理・化学的手段のみでは解決が困難な環境の修復に有効な手段として注目されている<sup>1)</sup>。微生物は自然界において有機物の分解・無機化の役割を担い、多様な機能を有している。微生物の浄化機能を人為的に強化・促進させ

た環境改善・修復技術は、今後ますます重要になってくるものと思われる。さらに、環境修復微生物の選別、機能特性・機能発現維持条件の解明、修復機能の増強などを通じて、環境にやさしくかつ調和した方法で水質・底質の浄化あるいは環境の修復・改善が可能と考えられる。

低窒素同化細菌は微量窒素化合物を認識して細胞

内に取り込む能力を有する細菌として、これまでにいくつかの知見が報告されている<sup>9)~11)</sup>。前報<sup>9)</sup>では、低窒素同化細菌の機能を水質浄化に開発・利用するため、さまざまな環境からの分離を試み、代表菌について生育特性を明らかにした。脱窒能を有する低窒素同化細菌の機能をバイオリアクターとして利用するためには、低窒素同化細菌を固定化することが必要である。これまでに、細胞包括固定化担体としてポリアクリルアミド、 $\kappa$ -カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、寒天、ポリビニルアルコールなどさまざまな素材が報告されている。寒天、アルギン酸ナトリウム、 $\kappa$ -カラギーナンなどは毒性はないが、生分解性およびゲル強度の面で問題がある。ポリアクリルアミドは安価で化学合成物質であるため、生分解性に乏しく安定であるが、ゲル調製時に用いられるアクリルアミドモノマーは神経毒性を示し、迅速な固定化が要求される。ポリビニルアルコール(以下PVAと略す)は合成高分子であるが、毒性がなく、調製も簡便であるという利点がある。これまでに、低窒素同化細菌によりアンモニアを同化させて除去するため、担体として $\kappa$ -カラギーナンやポリアクリルアミドを利用して低窒素同化細菌の包括固定化を検討してきた<sup>9)</sup>が、本研究では、固定化担体としてPVAを使用して脱窒性低窒素同化細菌の固定化を試みた。PVAのゲル化には、ホウ酸法<sup>12)</sup>と冷凍法<sup>13)</sup>が用いられている。ホウ酸法は球形に成形して大量に固定化細胞を調製することが可能とされているが、実際に均一な大きさで完全な球形に成形することがかなり困難である。また、ホウ酸飽和溶液中に15~24時間放置しなければならず、固定化操作の間に微生物の活性が害なわれる可能性がある。一方、PVAは10℃で放置すると架橋剤を添加しなくてもゲル化する。このため、冷凍法では、PVA溶液に細胞懸濁液を添加して-20~-80℃以下で24時間以上凍結して細胞を固定化する<sup>10)</sup>。PVAはゲル化が瞬時反応ではないため、球形に成形できないが、安価でゲル強度が強く、耐久性に優れている。冷凍法では、固定化の凍結操作中に細胞の死滅が若干認められるが、担体での細胞の増加・活性化は増菌培養により可能と考えられる。

本研究は微生物機能を利用して水質環境の改善をはかるため、広範囲の窒素成分濃度のもとで生育で

き、かつ窒素処理能力・親和性の高い低窒素同化細菌に着目し、それらの細胞を固定化してその特性を明らかにするとともに、環境からの窒素の完全除去に有効な方策を探り、応用への基礎的知見を得るために実施した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 使用培地

窒素制限寒天平板培地<sup>14)</sup>：グルコース 0.2 g、グリセリン 0.2 g、マンニトール 0.2 g、酢酸ナトリウム 0.2 g、クエン酸三ナトリウム 0.2 g、酵母エキス 0.01 g (全N量約 1.1 mg)、精製寒天 15 g、人工海水または蒸留水 1,000 mL、pH 7.2~7.5

NS 培地<sup>9)</sup>：トリス(ハイドロオキシ)アミノメタン 12.1 g、グルコース 2.5 g、NH<sub>4</sub>Cl 0, 1, 2, 10 または 100 mg、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g、人工海水または蒸留水 1,000 mL、pH 7.2~7.5

硝酸還元・脱窒培地：ポリペプトン 5 g、酵母エキス 2 g、KNO<sub>3</sub> 1g、人工海水または蒸留水 1,000 mL、pH 7.0

改変 NS-KNO<sub>3</sub> 培地：トリス(ハイドロオキシ)アミノメタン 12.1g、クエン酸三ナトリウム 0.2 g、酢酸ナトリウム 0.2 g、グルコース 2.5 g、KNO<sub>3</sub> 1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g、人工海水または蒸留水 1,000 mL、pH 7.2~7.5

PY 培地：ポリペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、蒸留水 1,000 mL、pH 7.0

### 2-2. 低窒素同化細菌の保存

低窒素同化細菌の分離には窒素制限寒天平板培地を、低窒素同化能の判定には NS 培地を使用した。分離した低窒素同化細菌は窒素制限あるいは改変 NS-KNO<sub>3</sub> 培地の寒天斜面に接種し、25℃にて一定期間培養した後、5℃にて保存した。これを適宜、各種培地に接種培養して実験に供した。

### 2-3. 硝酸還元・脱窒能の判定

硝酸還元・脱窒液体培地 5 mL を添加した小試験管に分離菌株の一白金耳を接種後、25~30℃にて2週間培養した。ダーラム管中にガスの蓄積が認められたものを脱窒能陽性と判定した。硝酸還元能は、GR 試薬と Zn 粉末を使用し、培地中の硝酸塩の消失あるいは亜硝酸塩の生成が認められたものを陽性

### 3. 結果および考察

#### 3-1. 固定化担体内への硝酸イオンの透過性

PVAの硝酸イオン分配係数は0.89であり、固定化材として硝酸イオンの取り込みに支障のないものと考えられる。橋本ら<sup>13)</sup>はPVAホウ酸法で調製されたビーズの $\text{NH}_4^+$ 分配係数が0.91、 $\text{NO}_3^-$ 分配係数が0.90と報告しており、本研究で得られた値とほぼ一致している。また、ポリアクリルアミドを用いた角野ら<sup>13)</sup>も $\text{NH}_4^+$ に対して0.85、 $\text{NO}_3^-$ に対して0.95と類似した値を得ており、透過性は他の固定化材とほぼ同程度であると思われる。

#### 3-2. 固定化細胞ゲルの活性化による担体細胞数の変動

固定化細胞ゲル調製の際の細胞濃度を $\text{OD}_{550}$  1.0および3.0としたとき、活性化による担体細胞数の変動を調べた。凍結によるゲル調製直後の担体細胞数は $\text{OD}_{550}$  1.0調製ゲルでは $10^4$  cfu/mLのレベル、 $\text{OD}_{550}$  3.0調製ゲルでは $10^7$  cfu/mLのレベルにまで低下した。しかし、図1に示したように、ゲル細胞数は $\text{OD}_{550}$  3.0調製ゲルでは12時間で、 $\text{OD}_{550}$  1.0調製ゲルでは24時間で $10^8$  cfu/mLのレベルにまで増加し、48時間で最大となった。このため、 $\text{OD}_{550}$  3.0調製ゲルで24時間活性化処理したものを以後の実験に供した。

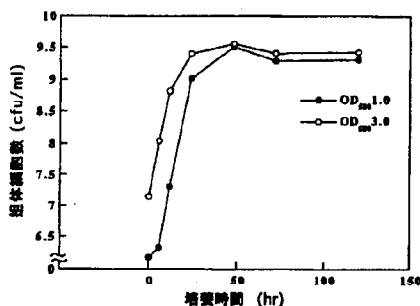


図1 固定化Sc51株細胞ゲルの活性化による担体細胞数の変動

設楽ら<sup>14)</sup>は濃縮した脱窒細菌 *Alcaligenes sp.* 細胞懸濁液を $\kappa$ -カラギーナンに固定化し、調製したゲルを増殖処理することによりゲル内細胞数を $10^4$ から $10^8$  cfu/mL (ゲル) にまで増大させた。これらのことは、ゲル調製操作でゲル内細胞数が低下したとしても、増殖・活性化処理することにより、ゲル1 mLあたり $10^8$  cfuのレベルにまで細胞が増加していることを示している。

#### 3-3. 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性の最適温度および温度安定性

固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性は、図2に示したように、30℃付近にて最大であり、50℃においても最大値の60%程度の活性を示した。また、固定化 Sc 51 株細胞は図3のように20~30℃で安定であったが、温度増加に伴い失活し、50℃ではほぼ50%程度の活性が残存するにすぎなかった。

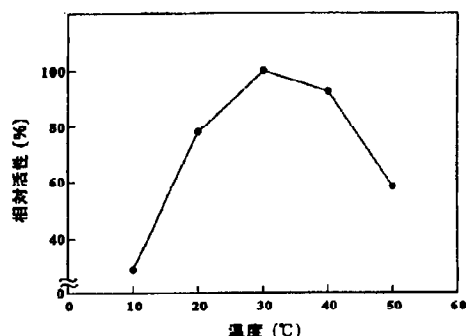


図2 固定化Sc51株による脱窒活性に及ぼす温度の影響

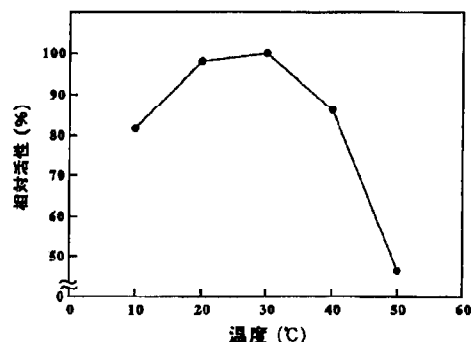


図3 固定化Sc51株細胞による脱窒活性の温度安定性

菅原はさまざまな水域から分離した低窒素同化細菌について、 $\kappa$ -カラギーナンおよびポリアクリルアミドを固定化担体として用いてアンモニア同化活性を調べた<sup>7)</sup>。 $\kappa$ -カラギーナンに固定化した低窒素同化細菌株の場合、アンモニア同化活性は40℃で最大であった。また、ポリアクリルアミドに固定化した低窒素同化細菌株の場合、アンモニア同化活性の最適温度は30℃付近であり、30℃以上で安定性が低下し、40~50℃、1時間の熱処理で活性の約15%が失活した。設楽ら<sup>15)</sup>によると、 $\kappa$ -カラギーナンに固定化した脱窒細菌 *Alcaligenes* および *Bacillus firmus* による硝酸還元活性は40℃で最大であり、

と判定した。

#### 2-4. ポリビニールアルコールを用いた細胞固定化

純水 (Ultra Pure Water) 90 mL にポリビニールアルコール (PVA) (重合度 2000、ケン化度 90 ~ 100 mol %) 15 g を混ぜ、オートクレーブにて殺菌・溶解する。培養・集菌した Sc 51 株を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) に懸濁し、最終濃度が OD<sub>550</sub> で 3.0 となるように PVA 溶液に添加し、均一になるよう混合した。これを無菌プラスチックトレイ (208 × 158 × 53mm) に流し込み、-30℃にて 30 時間凍結した<sup>10)</sup>。PVA 細胞ゲルを室温にて解凍し、3 ~ 5 mm 角に裁断・成形した。成形した細胞固定化ゲルを滅菌水にて洗浄し、PY 培地にて 30℃にて 24 時間培養し、固定化細胞を増菌・活性化させた。

#### 2-5. 固定化担体内への硝酸イオンの透過性

固定化担体内への硝酸イオンの透過性を調べるため、担体の分配係数を測定した。3 mm 角に成形した菌体無添加の PVA 担体を十分に洗浄後、その 10 mL を硝酸カリウム溶液 (0.1 mg/L) 10 mL に添加して全量 20 mL として 24 時間放置し、溶液中に残存している硝酸イオン濃度を測定した。担体の分配係数は平衡時の外液中の基質濃度と担体中の基質濃度の比で定義され、山根らの式で表される<sup>11)</sup>。

$$V_0 C_0 = V_0 C_1 + (V_1 - V_0) C_2$$

この式を整理すると、

$$K_p = (C_2 / C_1) = V_0 (C_0 - C_1) / (V_1 - V_0) C_1$$

となる。ここで、 $V_0$  は担体を加える前の溶液量 (mL)、 $V_1$  は担体を加えた後の [溶液 + 担体] 量 (mL)、 $C_0$  は担体を加える前の基質濃度 (mg/mL)、 $C_1$  は担体を加えた後の基質濃度 (mg/mL)、 $C_2$  は担体中の基質濃度 (mg/mL) である。

#### 2-6. 固定化細胞ゲルの活性化による担体細胞数の変動

調製した固定化細胞ゲルを PY 培地にて増菌・活性化させ、一定時間毎に担体を回収し、ゲル 1 mL あたりに固定化された細胞数をコロニー計数法にて調べた。

#### 2-7. 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性の最適温度および温度安定性

固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性に及ぼす温度の影響を調べるため、BODビン内に反応混液 (KNO<sub>3</sub> 0.10 g、0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,000 mL) 90 mL に固定化細胞ゲル 10mL の割合で調製し、10 ~ 50℃にて 12 時間反応させて、反応混液中の残存硝酸・亜硝酸塩量を測定した。また、固定化 Sc 51 株細胞の温度安定性を調べるため、固定化細胞を 0.1 M リン酸緩衝液中で各温度にて 1 時間処理した。つぎに、硝酸カリウムを 0.1g/L となるように添加し、30℃にて 12 時間反応させて、反応混液中の残存硝酸・亜硝酸塩量を測定した。活性は最大活性を示した温度における値を 100 としたときの相対値にて表示した。

#### 2-8. 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性の最適 pH および pH 安定性

固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性に及ぼす pH の影響を調べるため、BODビン内に各 pH の反応混液 (KNO<sub>3</sub> 0.10 g、0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,000 mL) 90 mL に固定化細胞ゲル 10mL の割合で調製し、30℃にて 12 時間反応させて、反応混液中の残存硝酸・亜硝酸塩量を測定した。また、固定化 Sc 51 株細胞の pH 安定性を調べるため、固定化細胞を各 pH の 0.1 M リン酸緩衝液中で 30℃にて 1 時間処理した。つぎに、固定化細胞ゲルを取り出して硝酸カリウム 0.1g/L 含有リン酸緩衝液 (pH 7) に添加して 30℃にて 12 時間反応させて、反応混液中の残存硝酸・亜硝酸塩量を測定した。活性は最大活性を示した pH における値を 100 としたときの相対値にて表示した。

#### 2-9. 固定化 Sc 51 株細胞による廃水からの窒素除去

調製したモデル廃水を用いて、固定化 Sc 51 株細胞による窒素除去を試みた。調製モデル廃水 (KNO<sub>3</sub> 0.10 g、水道水 1,000 mL) 90 mL に固定化細胞ゲル 10 mL の割合で調製して反応させ、一定時間毎に調製廃水中の残存硝酸・亜硝酸塩量を測定した。また、放流前の終末処理廃水を用いて、固定化 Sc 51 株細胞による窒素除去を同様の方法で調べた。

亜硝酸還元活性は *Alcaligenes* の場合 40℃、*Bacillus firmus* の場合 30～40℃で最大であった。一方、アルギン酸ナトリウムに固定化した脱窒細菌 *Pseudomonas denitrificans* の硝酸・亜硝酸還元活性は 35℃付近まで安定であったが、45℃で完全に失活した<sup>16)</sup>。固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性の最適温度および温度安定性は、これまでの報告とほぼ同様であった。

### 3-4. 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性の最適 pH および pH 安定性

固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性は、図 4 に示したように、pH 7～8 付近で最大であり、pH 6 あるいは 9 においても最大値の 85% 程度の活性が認められた。

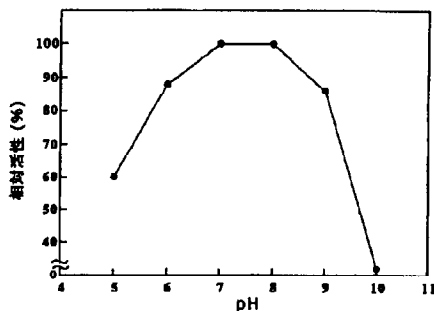


図 4 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性に及ぼす pH の影響

また、固定化 Sc 51 株細胞は図 5 に示したように pH 7 で最も安定であったが、酸性域で不安定で pH 5 では 40% 程度の活性が残存するにすぎず、pH の増加とともに安定性が低下した。

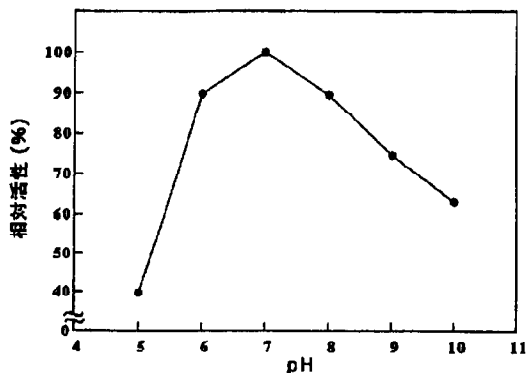


図 5 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性の pH 安定性

菅原<sup>17)</sup>によると、κ-カラギーナンに固定化された

低窒素同化細菌株は pH 4～7 で高いアンモニア同化活性を有していたが、pH 9 では最大活性の 30% 程度に低下した。また、ポリアクリルアミドに固定化された低窒素同化細菌株は pH 7 で最大活性を示し、pH の上昇あるいは下降によりアンモニア同化活性が低下し、とくに pH 8 以上で活性は不安定であった。低窒素同化細菌のアンモニア同化と脱窒とでは窒素代謝にかかわる反応系は異なっているが、それぞれの最適温度、最適 pH は類似していた。一方、固定化脱窒細菌 *Alcaligenes* による硝酸還元活性は pH 6、亜硝酸還元活性は pH 6～7 で最大であり、固定化脱窒細菌 *Bacillus firmus* の硝酸還元および亜硝酸還元活性は pH 6～9 で高く<sup>15)</sup>、本研究でみられた固定化 Sc 51 株細胞による脱窒の最適 pH とほぼ同様な傾向を示した。

### 3-5. 固定化 Sc 51 株細胞による廃水からの窒素除去

調製したモデル廃水を用いて、固定化 Sc 51 株細胞による窒素除去を試みた。図 6 および図 7 に固定化 Sc 51 株細胞による硝酸・亜硝酸態窒素合計量の上澄液区分からの減少(脱窒量)を示した。

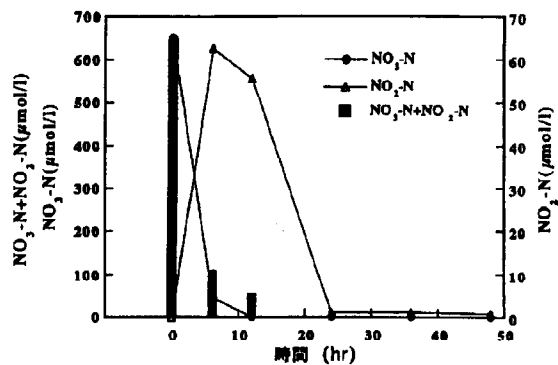


図 6 固定化 Sc 51 株細胞による調整廃水からの窒素除去

図 6 に示したように、この系では硝酸塩の減少に伴い若干量の亜硝酸塩が蓄積するものの、窒素ガスが生成した。反応は 6 時間以内に速やかに進行し、硝酸塩は 12 時間で完全に消失したが、硝酸塩の減少により脱窒速度も減退した。調製廃水中の硝酸・亜硝酸態窒素合計量は 24 時間後にほぼ完全に消滅した。図 6 から算出された窒素除去速度は 90.8 μmol/L/hr であった。

図 7 に示したように、終末処理廃水にはなお 780 μmol/L 程度の硝酸塩、COD 値として 3.38 mg/L

程度の有機物が残存していたが、固定化 Sc 51 株細胞により硝酸塩が速やかに減少し、脱窒が 12 時間まで直線的に進行した。廃水中の硝酸・亜硝酸態窒素合計量は 24 時間後にほぼ完全に消滅した。図 7 から算出された窒素除去速度は  $55 \mu\text{mol/L/hr}$  であった。

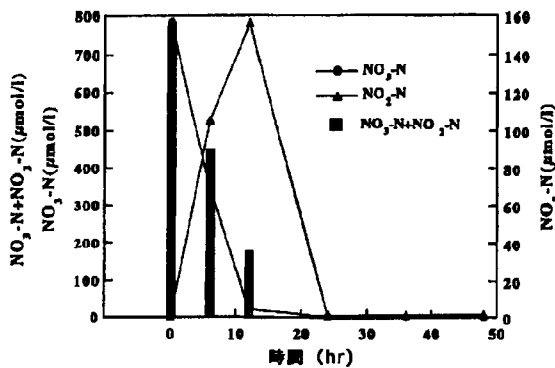


図 7 固定化 Sc 51 株細胞による廃水からの窒素除去

$\kappa$ -カラギーナンに固定化した低窒素同化細菌をアンモニア除去に利用するため、細胞固定化ゲルをカラムに充填し、調製したモデル廃水 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 mg/L) を注入し、流出液中の残存  $\text{NH}_4\text{Cl}$  濃度を調べたところ、流出液中の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  が急激に減少し、100 分後には 0.02 mg/L となった<sup>7)</sup>。しかしながら、100 分以後、流出液中の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  濃度が増加しはじめ、240 分後には 0.25 mg/L 程度となった。このことは調製廃水中の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  が低窒素同化細菌細胞内に取り込まれたものの、細胞内  $\text{NH}_4\text{Cl}$  濃度の増加と細胞内エネルギー源の消耗のため、同化能が低下したことによるものと考えられた<sup>7)</sup>。

本研究では、固定化 Sc 51 株細胞による硝酸塩除去のための連続負荷実験を実施していないが、脱窒による硝酸塩除去のため、アンモニアの同化が一部認められるものの、細胞内窒素プールの増加のための処理能力の低下は大きくはないものと考えられる。しかしながら、アンモニア同化・脱窒ともにエネルギー源を必要とするので、固定化細胞内のエネルギー物質が窒素除去能を制約することになる。このため、適宜、固定化細胞の活性化が必要となるが、処理すべき廃水中になんらかの有機物が存在している場合、これらの有機物が窒素除去のためのエネルギー源となりうる。連続的に硝酸塩を負荷した場合、固定化 Sc 51 株細胞がどのように脱窒能を維持でき

るかについて、さらに検討する必要があると思われる。

#### 4. まとめ

微生物の機能を利用した水質浄化・環境改善をはかるため、低窒素同化細菌の生育特性を明らかにしようとした。得られた結果は以下のとおりである。

- (1) ポリビニルアルコールを担体として使用したとき、固定化担体内への硝酸イオンの透過性は他の固定化材とほぼ同程度であった。
- (2) 調製した固定化 Sc 51 株細胞ゲルを、30℃にて 24 時間活性化処理することにより担体細胞数は増加し、ゲル 1 g あたり  $10^9$  cfu (コロニー形成単位) のレベルとなった。
- (3) 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性は、30℃付近にて最大であり、50℃においても最大値の 60% 程度の活性を示した。また、固定化 Sc 51 株細胞は 20 ~ 30℃で安定であったが、温度増加に伴い失活し、50℃ではほぼ 50% 程度の活性が残存するにすぎなかった。
- (4) 固定化 Sc 51 株細胞による脱窒活性は、pH 7 ~ 8 付近で最大であり、pH 6 あるいは 9 においても最大値の 85% 程度の活性が認められた。また、固定化 Sc 51 株細胞は pH 7 で最も安定であったが、酸性域で不安定で pH 5 では 40% 程度の活性が残存するにすぎず、pH の増加とともに安定性が低下した。
- (5) 調製したモデル廃水を用いて、固定化 Sc 51 株細胞による窒素除去を試みた。この系では硝酸塩の減少に伴い若干量の亜硝酸塩が蓄積するものの、窒素ガスが生成された。反応は 6 時間以内に速やかに進行し、硝酸塩は 12 時間で完全に消失したが、硝酸塩の減少により脱窒速度も減退し、調製廃水中の硝酸・亜硝酸態窒素合計量は 24 時間後にほぼ完全に消滅した。算出された窒素除去速度は  $90.8 \mu\text{mol/L/hr}$  であった。
- (6) つぎに、終末処理廃水を用いて、固定化 Sc 51 株細胞による窒素除去を試みた。終末処理廃水にはなお  $780 \mu\text{mol/L}$  程度の硝酸塩、COD 値として 3.38 mg/L 程度の有機物が残存していたが、固定化 Sc 51 株細胞により廃水中の硝酸塩が速やかに減少し、脱窒が 12 時間まで直線的に進行した。廃水中の硝酸・亜硝酸態窒素合計量は 24 時間後

にほぼ完全に消滅した。算出された窒素除去速度は  $55 \mu \text{mol/L/hr}$  であった。

#### 参 考 文 献

- 1) 農林水産環境修復技術推進委員会編：生物機能を利用した農林水産環境修復技術に関する調査、農林水産技術情報協会、pp.279(1995)
- 2) Hill, S. and J.R. Postgate: Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen. *J. Gen. Microbiol.*, 58, 277-285 (1969).
- 3) Jones, K.L. and M.E. Rhodes-Roberts: Physiological properties of nitrogen-scavenging bacteria from the marine environment. *J. Appl. Bacteriol.*, 49, 421-433 (1980).
- 4) Sugahara, I., T. Kimura and K. Hayashi: Occurrence and distribution of nitrogen-scavenging bacteria in marine environment. *Bull. Fac. Fish., Mie Univ.*, No.14, 49-54 (1987).
- 5) Sugahara, I., T. Kimura, M. Aizawa and Y. Hayakawa: Generic composition and physiological properties of nitrogen-scavenging bacteria isolated from marine environments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1441-1447 (1989).
- 6) 松岡行利、山川雅弘、柏 雅美、菅原 庸：微生物の機能を利用した水質浄化（第1報）低窒素同化細菌の生育特性、三重県環境科学センター研究報告、17、1-10 (1997)
- 7) 菅原 庸：細胞・酵素固定化による海洋微生物機能の開発・利用に関する研究、平成6年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書、pp.39(1995)
- 8) 橋本 奨、古川憲治、濱 宏：活性汚泥の固定化とその浄化に関する研究—PVA-ホウ酸法について—、下水道協会誌、23 (262)、41-48 (1986)
- 9) 橋本 奨、古川憲治、濱 宏：活性汚泥の固定化とその浄化に関する研究—PVA-冷凍法について—、下水道協会誌、23 (261)、16-22 (1986)
- 10) Ariga, O., H. Takagi, H. Nishizawa and Y. Sano: Immobilization of micro-organisms with PVA hardened by iterative freezing and thawing. *J. Ferment. Technol.*, 65, 651-658 (1987).
- 11) 福井三郎ほか：酵素工学、東京化学同人、p.245-252 (1981)
- 12) 橋本 奨、岩上昭夫：PVA-ホウ酸固定化ビーズの基質透過に関する研究、第24回下水道研究発表会講演集、p.284-286 (1987)
- 13) 角野立夫、昆 正浩、森 直道、中島一郎：包括固定化微生物を用いた廃水処技術、用水と廃水、27、1024-1029 (1985)
- 14) 設楽惣助、渡辺 昭、鈴木達彦：固定化微生物による汚水処理の基礎的研究 (1) 脱窒菌の固定化の試み、下水道協会誌、20 (234)、31-36 (1983)
- 15) 設楽惣助、渡辺 昭、鈴木達彦：固定化微生物による汚水処理の基礎的研究 (2) 固定化脱窒菌の活性比較、下水道協会誌、20 (236)、35-45 (1984)
- 16) Nilson, I., S. Ohlson, L. Haggstrom, N. Molin and K. Mosbach: Denitrification of water using immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *European J. Appl. Microbiol.*, 10, 261-274(1980).

## Bioremediation by Bacterial Functions - II

### — Nitrogen Removal by Immobilized Nitrogen-scavenging Bacteria —

NAKAYA Sumio, MATSUOKA Yukimichi, YAMAKAWA Masahiro,  
KASHIWA Masami\*, Dr. KIMURA Toshio \*\* and Dr. SUGAHARA Isao \*\*\*

\* *Marine Microbiology Lab., Faculty of Bioresources, Mie University,  
Tsu, 514-0008 Japan*

\*\* *Assistant Professor, Marine Microbiology Lab., Faculty of Bioresources,  
Mie University, Tsu, 514-0008 Japan*

\*\*\* *Professor, Marine Microbiology Lab., Faculty of Bioresources,  
Mie University, Tsu, 514-0008 Japan*

In order to utilize immobilized nitrogen-scavenging bacteria capable of denitrifying as a bioreactor, properties of immobilized cells of nitrogen-scavenging bacteria strain Sc 51 were examined.

The bacterial number on carrier increased by activation treatment at 30 °C for 24 hours, and reached at the level of  $10^9$  cfu per 1 g of gel containing immobilized cells.

An optimum temperature for denitrifying activity of immobilized Sc 51 cells was 30 °C, and 60 % of the maximum activity still remained at 50 °C. The activity was stable at 20 ~ 30 °C, and about 50 % of the activity inactivated by the treatment at 50 °C for 1 hour. An optimum pH for denitrifying activity of immobilized Sc 51 cells was around pH 7 ~ 8. The activity was stable at pH 7, and unstable at acidic pH range.

The nitrogen removal by the immobilized Sc 51 cells was tried using prepared waste water and final treated water at the waste treatment facility. Nitrate in waste water was reduced to nitrite, and further to nitrogen gas. Nitrate in prepared waste water completely disappeared in 12 hours. The calculated nitrogen removal activity was 90.8  $\mu$  mol/L/h. On the other hand, waste water from the final treatment facility contained 780  $\mu$  mol/L of nitrate and organic matter (COD about 3.38 mg/L). The nitrogen removal from waste water also proceeded by the immobilized Sc 51 cells. Nitrate and nitrite completely eliminated within 24 hours. The calculated nitrogen removal activity was 55  $\mu$  mol/L/h.